

Evaluierung pharmakokinetischer und toxikologischer Determinaten von Nano- partikeln mittels *in vivo Neuroimaging*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktoringenieurin
(Dr. Ing.)**

von Diplom-Ingenieur für Biosystemtechnik, Nadine Voigt
geb. am 17.09.1984 in Zerbst

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Promotionskommission: Prof. Franziska Scheffler (Vorsitz)
Prof. Berend van Wachem (Gutachter)
Prof. Bernhard Sabel (Gutachter)
Prof. Hans-Joachim Galla (Gutachter)

eingereicht am: 13.11.2017

Promotionskolloquium am 14.06.2018

Teile dieser Arbeit sind bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht oder eingereicht

P. Henrich-Noack, S. Prilloff, **N. Voigt**, J. Jin, W. Hintz, J. Tomas, B.A. Sabel, *In vivo* visualisation of nanoparticle entry into the central nervous system tissue. *Archives of Toxicology* 7 (2012)

S. Tschorn, P. Henrich-Noack, **N. Voigt**, W. Hintz, J. Tomas, B.A. Sabel, Entwicklung und Charakterisierung verschiedener Nanopartikel-Formulierungen und Testung im Hinblick auf die Blut-Hirn-Schrankengängigkeit. U. Teipel, A. Weber (Hrsg.), *Produktgestaltung in der Partikeltechnologie*, Bd. 6, Fraunhofer-Verlag, Stuttgart (2013) S. 149-171

N. Voigt, P. Henrich-Noack, S. Tschorn, W. Hintz, J. Tomas, B.A. Sabel, Surfactant, not size or zeta-potential influence blood-brain barrier passage of polymeric nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2014) 87(1) (2014): 19-29

N. Voigt, P. Henrich-Noack, S. Kockentiedt, W. Hintz, J. Tomas, B.A. Sabel, Toxicity of polymeric nanoparticles *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Nanoparticle Research* 16 (2014) 2379

Schriftliche Erklärung

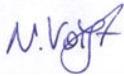
Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar Geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

Gehrden, 02.08.2018

(Ort, Datum, Unterschrift)



DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation entstand aus einem Kooperationsprojekt des Institutes für Medizinische Psychologie unter Leitung von Prof. Dr. Sabel und dem Lehrstuhl für Mechanische Verfahrenstechnik unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Tomas der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg.

Herrn Prof. Dr. Sabel danke ich für das interessante Dissertationsthema und für die Möglichkeit, die Experimente am Institut für Med. Psychologie durchzuführen. Bei Frau Dr. Henrich-Noack bedanke ich mich für die wissenschaftliche Betreuung und die konstruktive Unterstützung während der gesamten Zeit.

Mein besonderer Dank gebührt Prof. Dr.-Ing. Tomas für seine motivierenden Unterstützung und Förderung. Ebenso gebührt Herrn Prof. Dr.-Ing. Tsotsas mein Dank für seine Unterstützung.

Bei Frau Kockentiedt, geb. Tschorn, bedanke ich mich für die Herstellung der verwendeten Nanopartikel und bei Dr. Hintz für die Hilfe bei Herstellungsproblemen.

Meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Med. Psychologie möchte ich für die ständige Bereitschaft zur Diskussion und für ihre Hilfsbereitschaft danken. Bei Frau Werner bedanke ich mich herzlich für die praktische Unterstützung und die ausgesprochen nette Arbeitsatmosphäre.

Für die stets liebevolle Unterstützung sei meinen Eltern, meinem Ehemann und meiner ganzen Familie ganz herzlich gedankt.

Diese Arbeit wurde gefördert durch das Promotions-Stipendium im Rahmen der Leistungsorientierten Mittelvergabe (LOM) der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

ABSTRACT

The Blood-Brain Barrier (BBB) is a physiological barrier between blood and central nervous system (CNS). The specific features of the capillaries protect the brain from pathogens and toxins. Unfortunately, medicines and pharmacologic active substances for the treatment of many CNS disorders can usually not pass the BBB. For many diseases of the brain (like Parkinson, Alzheimer, Multiple sclerosis) there are no appropriate therapies. Therefore, polymer nanoparticles become more and more important for the industry as a drug carrier-system. To use nanoparticles for the delivery of drugs into the brain they have to fulfil important criteria: easy production and stocking, optimized system characteristics to bind drugs and to overcome the BBB, and no toxic reactions after application. In the literature, there is evidence that nanoparticle based on poly-butylcyanoacrylat (PBCA) may satisfy these requirements. This was the motivation underlying the current project, i.e. modifying and optimizing nanoparticles with respect to their ability to cross the BBB and their distribution within the CNS tissue.

The preparation of the particles was performed by miniemulsions polymerisation. This process enables an easy production and modification of PBCA nanoparticles in a short time and with only a few auxiliary supplies. Also we get a high percentage of nanoparticles with narrow particle size distribution by using this miniemulsions polymerisation. At the beginning of these studies parameters of production (duration of ultrasonication, polymerisation time, and the pH) were varied to obtain ideal particles. These results provide the basis for the next step of modifying the surface characteristics (surfactant, particle size and zeta potential) to enhance BBB penetration. By use of *In vivo* Confocal Neuroimaging (ICON) the ability of the particles to overcome the blood-retina barrier (BRB), as a model of the BBB, was studied for the first time in living animals in real time. The use of the BRB as an ideal model of the BBB could be demonstrated with the current experiments.

The analysis of the surface characteristics of the PBCA nanoparticles shows a significant influence of surfactant on the transition across the BBB. Particle size (up to a diameter of approximately 500 nm) and zeta potential (from -51mV to +20mV) did not have any influence. All modification use non-ionic and anionic tensids individually enhanced transition to the brain but a combination of non-ionic and anionic surfactants prevent crossing. In contrast to the common opinion that small and negative nanoparticles are better for transition in our current experiments also very large PBCA nanoparticles with positive zeta potential crossed the BBB. The transition across the BBB took not even 60 seconds and nanoparticles were found within retina cells. A possible mechanism could be a manipulation of tight junctions by nanoparticles. PBCA nanoparticles do not induce neuronal death in pharmacologically effective concentrations *in vivo*, even when coated with surfactants which reveal some reduction of viability in cell culture test systems. These particles seem to be a good tool for drug delivery into the CNS.

PBCA nanoparticles could be loaded with a pharmacologically active substance and showed an analgesic effect in the hot plate test.

These new findings are important for the development of treatments for diseases of the central nervous system.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) bildet aufgrund ihrer Besonderheiten im Aufbau der Kapillaren, u.a. mit den über Tight Junctions fest verbunden Endothelzellen, eine kaum überwindbare Stoffbarriere. Aufgrund dieses Schutzwalles können die meisten Erkrankungen des zentralen Nervensystems nicht zufriedenstellend behandelt werden, weil die Medikamente die BHS nicht überwinden können. Der demographische Wandel mit dem vermehrten Auftreten altersassoziierter Erkrankungen steigert das Interesse an partikulären Systemen, wie Polymernanopartikel, als Wirkstoffträger zum Überwinden der BHS nach dem Trojanischen Pferd-Prinzip.

Zu diesem Zweck müssen die Nanopartikel einige wichtige Kriterien erfüllen: Einfache Herstellung & Lagerung, optimierte Systemeigenschaften in Hinblick auf Wirkstoffbindung und Transport über die BHS und toxikologische Unbedenklichkeit. Nanopartikel aus Butylcyanoacrylat könnten diesen Anforderungen entsprechen. Deshalb wurden in dieser Studie modifizierte Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel (PBCA-NP) im Hinblick auf Hirngängigkeit, Toxizität und als Wirkstoffträger untersucht.

Mit dem Miniemulsionsprozess ist es möglich, gezielt und einfach PBCA-NP mit nur einer geringen Anzahl an Hilfsstoffen in kurzer Zeit herzustellen. Dieser Herstellungsprozess erzielt eine hohe Ausbeute an Partikeln mit gutem Massenverhältnis Tensid/Monomer und schmaler Partikelgrößenverteilung. Die zu Beginn dieser Studie durchgeführten Experimente zum Einfluss der Polymerisationsparameter (Ultraschalldauer, Polymerisationszeit & pH-Wert) auf die Beschaffenheit der Partikel erlaubte die Modifikation der Partikel (Oberflächenbeschaffenheit, Größe & Zetapotential) in Hinblick für die BHS-Gängigkeit. Mit dem live imaging Verfahren „*In vivo* Confocal Neuroimaging“ (ICON) konnte der Übertritt und die Verteilung der intravenös verabreichten PBCA-NP an der Blut-Retina-Schranke (BRS) als Modell für die BHS im lebenden Tier in Echtzeit untersucht werden. Dies ist ein enormer Vorteil gegenüber herkömmlichen *in vivo* oder *ex vitro* Verfahren. Die Nutzung der BRS als ideales Modellsystem zur Untersuchung der BHS wurde durch die hier gewonnenen Daten belegt.

Die Analyse der Eigenschaften und Beschaffenheit der PBCA-NP für die BHS-Passage zeigte eine signifikante Beeinflussung durch die für die Modifikation eingesetzten Tenside aber nicht direkt durch Größe (bis ca. 500nm) oder Zetapotential (von -51mV bis +20mV). Die gestesteten anionischen und nichtionische Tenside begünstigen den Übertritt der PBCA-NP über die BHS, wohingegen eine Kopplung der anionischen mit den nichtionischen Tensiden dies verhinderte. Im Gegensatz zur in der Literatur vorherrschenden Meinung „je kleiner und negativer, desto besser der Übertritt“ überquerten auch große PBCA-NP mit positiven Zetapotential die BHS. Die Überwindung der BHS durch die PBCA-NP erfolgte sehr schnell, innerhalb von 60s war eine zelluläre Verteilung im Gewebe erkennbar. Ein möglicher Mechanismus dafür wäre nach meiner Untersuchung die Beeinflussung der Tight Junctions durch die Nanopartikel. Die Untersu-

chungen zur Toxizität zeigten *in vitro* und *in vivo* keine aus der Applikation von PBCA-Nanopartikel resultierenden toxischen Effekte in pharmakologisch relevanten Konzentrationen. Damit erfüllen die PBCA-NP die Kriterien für die Nutzung als Arzneimittel-trägersysteme. Die Wirkstoffbindung an den Partikel und die resultierende analgetische Wirkung, gezeigt durch die Erhöhung der Schmerzschwelle im Hot plate Test, untermauern dies.

Die Ergebnisse sind aufgrund der Ähnlichkeit der Retina der Ratte und des Menschen gut übertragbar und sind somit wertvoll für die pharmazeutische Industrie zur Entwicklung wirksamer Medikamente für Erkrankungen des Zentralen Nervensystems.

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG	IV
ABSTRACT	V
ZUSAMMENFASSUNG	VII
INHALTSVERZEICHNIS	IX
ABKÜRZUNGEN	XII
Symbolverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Ziel dieser Dissertation	2
2 Theoretischer Teil	4
2.1 Blut-Hirn-Schranke	5
2.1.1 Transportsystem entlang der Blut-Hirn-Schranke	7
2.1.2 Überwindungsstrategie der Blut-Hirn-Schranke	9
2.1.3 Blut-Retina-Schranke als Modell der Blut-Hirn-Schranke	11
2.2 Nanopartikel	12
2.2.1 Hauptprozesse der Nanopartikelbildung durch Fällung	13
2.2.2 Sekundärprozesse: Agglomeration und Alterung	17
2.2.3 Partikelwechselwirkungen und Stabilität	19
2.2.4 Partikeleigenschaften	22
2.3 PBCA-Nanopartikel als Arzneimittelträger	29
2.3.1 Toxizität.....	30
2.3.2 Arzneimittel-Transport mittels PBCA-NP	32
3 Versuchsmaterialien	34
3.1 Polybutylcyanoacrylat	34
3.2 Tenside	35
3.3 Farb- und Zusatzstoffe.....	36
4 Methoden	38
4.1 Herstellung der Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel (PBCA-NP).....	38
4.1.1 Miniemulsionspolymerisation	39
4.1.2 Wirkstoffbindung	40
4.2 Charakterisierung der Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel	41
4.2.1 Partikelgröße.....	41
4.2.2 Zetapotential	41
4.2.3 Polydispersitätsindex	42
4.2.4 Formanalyse mittels REM.....	42
4.3 Visualisierung der Partikelverteilung	43

4.3.1	Verteilungsanalyse mittels <i>In vivo</i> Confocal Neuroimaging	43
4.4	Färbetechniken zur Zellstrukturanalyse	45
4.4.1	Retrogrades Markieren von Retinalen Ganglienzellen	45
4.4.2	Antikörperfärbung	45
4.5	Toxizitätsstudien	46
4.5.1	<i>In vitro</i> MTT-Test	46
4.5.2	<i>In vivo</i> Studie	47
4.6	Nachweis des erfolgreichen nanopartikulären Arzneimitteltransport in das Zentrale Nervensystem mittels Verhaltenstest	47
4.6.1	Hot plate Test	47
5	Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung	48
5.1	PBCA-Nanopartikel	48
5.2	<i>in vivo</i> Studien	49
5.2.1	Anästhesie und Nanopartikel-Applikation	50
5.2.2	Chirurgische Eingriffe	50
5.2.3	<i>in vivo</i> confocal neuroimaging	52
5.2.4	Färbetechniken	52
5.2.5	Verhaltenstest	53
5.2.6	Toxizitätstest	53
5.3	Varianzanalyse und Semiquantifizierung	54
6	Ergebnisse und Diskussion	55
6.1	Charakterisierung der PBCA-Nanopartikel	55
6.1.1	Formanalyse mittels Rasterelektronenmikroskopie	55
6.1.2	Stabilität	55
6.1.3	Diskussion	56
6.2	Verteilung von PBCA-Nanopartikeln	57
6.2.1	Vergleich Blut-Retina-Schranke und Blut-Hirn-Schranke	57
6.2.2	Zelluläre Verteilung im Gewebe der Retina	58
6.2.3	Diskussion der Verteilung der PBCA-NP im Gewebe	60
6.3	Determinanten für die Überwindung der Blut-Retina-Schranke	61
6.3.1	Größe	61
6.3.2	Zetapotential	62
6.3.3	Tensid/Emulgator	64
6.3.4	Diskussion der Determinanten zur Überwindung der BHS	66
6.4	Transportmechanismen	67
6.4.1	Aufnahmemechanismus	67
6.4.2	Zeitreihenversuche	69
6.4.3	Diskussion des Transports von PBCA-Nanopartikel	70
6.5	Toxizität und toxische Effekte	72
6.5.1	MTT-Test	72
6.5.2	<i>In vivo</i> Studie	75
6.5.3	Door-opener Effekt	79

6.5.4	Diskussion zu Toxizität	79
6.6	Verhaltenstest	81
6.6.1	Hot plate Test	81
6.6.2	Diskussion des Verhaltenstest	82
7	Zusammenfassung.....	84
8	Referenzen	87
Anhang	97
Veröffentlichungen	108
Paper	108
Konferenzbeiträge	108
Buchbeiträge	110
Curriculum vitae	111

ABKÜRZUNGEN

Abb	Abbildung
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BRS	Blut-Retina-Schranke
(C)LSM	(Confokales) Laser-Scanning-Microscope
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpt	Dioptrin
EtOH	Ethanol
i.a.	intraarteriell
i.c.	intracerebral
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICON	<i>In vivo</i> Confocal Neuroimaging
KG	Körpergewicht
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis
LDL	Low density Lipoprotein
NaCl	Natriumchlorid
NP	Nanopartikel
ONC	Optic nerve crush (Sehnervquetschung)
PBCA	Polybutylcyanoacrylat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDI	Polydispersitätsindex
PFA	Paraformaldehyd
RGZ	Retinale Ganglienzellen
Tw	Tween
ZNS	Zentrales Nervensystem

Symbolverzeichnis

Symbol	Bezeichnung	Einheit
A_S	Massenspezifische Partikeloberfläche	m^2/g
A	Fläche	m^2
B	Keimbildungsgeschwindigkeit	l/m^3s
C_N	Partikelanzahlkonzentration	m^{-3}
c	Konzentration	mol/l
c^*	Sättigungskonzentration	mol/l
c_K	Kritische Übersättigung	mol/l
Δc	Absolute Übersättigung	mol/l
D	Diffusionskoeffizient	cm^2/s
d	Durchmesser	m
E	elektrische Feldstärke	Vm
F	Kraft	N
ΔG	freie Keimbildungsenthalpie	J
h	Plancksches Wirkungsquantum	$6,62606957 \times 10^{-34} \text{ Js}$
I	Streulichintensität	Wm^{-2}
J	Teilchenstromdichte	$1/m^2s$
k_B	Boltzmann-Konstante	$1,3806505 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$
L	Charakteristische Länge	m
M	molare Masse	g/mol
m	Masse	kg
N_A	Avogadro-Zahl	$6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
N_P	Partikelanzahl	-
n	Stoffmenge	mol
Δp	Druckdifferenz	Pa
p	Impuls	Ns
R	allgemeine Gaskonstante	8,314 J/molK
Re	Reynolds-Zahl	-
r	Radius	m
S	Relative Übersättigung	-
T	absolute Temperatur	K
t	Zeit	s
V	Volumen	m^3
w	Geschwindigkeit	m/s
x	stöchiometrischer Koeffizient	-

griech.		
Symbol	Bezeichnung	Einheit
α	Mie-Parameter	-
γ	Grenzflächenspannung	J/m ²
Δ	Differenz	-
ε	Dielektrizitätskonstante	F/m
ζ	Zetapotential	mV
η	dynamische Viskosität	Pa•s
λ	Wellenlänge	m
μ	chemisches Potential	J/kmol
π	Pi-Zahl	-
ρ	Dichte	g/cm ³
σ	Übersättigungsdifferenz	-
τ	Messzeit	s
φ	Winkel	°
Θ	Streulichtwinkel	°

1 Einleitung

Verletzungen oder Erkrankungen des Gehirns, wie z.B. Schädel-Hirn Traumata, Parkinson, Alzheimer und Multiple Sklerose, gehören zu den Krankheiten mit hoher Inzidenz, die das Gesundheitssystem durch die Verschiebung der Altersstruktur auch in Zukunft stark belasten werden und für die es kaum ausreichende Therapien gibt (Shah and Moorradian, 1997; Lustig *et al.*, 2001; Farkas and Luiten, 2001; Rhodin and Thomas, 2001). Deshalb ist es kaum verwunderlich, dass das Interesse der Pharmaindustrie und der Grundlagenforschung so hoch ist, eine geeignete Lösung für dieses Problem zu finden. Laut Schätzungen sind derzeit rund 1,2 Millionen Menschen in Deutschland an Demenz erkrankt, wodurch auch die gesellschaftliche Relevanz verdeutlicht wird.

Eine geeignete Therapie für die Erkrankungen des Zentralen-Nervensystems (ZNS) zu finden wird aber durch die Blut-Hirn-Schranke erschwert. Diese natürliche und wichtige körpereigene Schutzbarriere verhindert das Eindringen schädlicher Substanzen und Erreger aber auch das Einbringen wertvoller Wirkstoffe. Nur 5 % der 7000 in der Datenbank der „comprehensive medicinal chemistry“ erfassten Medikamente können für die Behandlung von Erkrankungen des ZNS genutzt werden. Diese Medikamente werden bei Depressionen, Epilepsie und Schizophrenie in hoher Dosis eingesetzt um ins Gehirn zu gelangen und haben deshalb eine Vielzahl oft schwerwiegender Nebenwirkungen.

Ein Ansatz in der pharmakologisch/medizinischen Forschung ist der Versuch der Lipophilisierung des Medikaments. Dafür wird bei eher hydrophilen (wasserlöslichen) Wirkstoffen künstlich die Lipophilie (Stein, 1986; Chekhomin *et al.*, 1996) durch Anbinden von Amino- oder Fettsäuren erhöht um die Gehirngängigkeit zu verbessern. Andere Techniken sind intracarotische Infusion (in die Halsschlagader), direkte Infusionen ins Gehirn oder die Modifikation der BHS durch osmotische Öffnung. Diese Methoden gehen mit hohem Risiko und chirurgischem Aufwand einher und werden daher nur im Notfall eingesetzt. Einen vielversprechenden Ansatz stellt der Carrier- oder Rezeptorvermittelte Transport dar. In den vergangenen Jahren wurden die Liposomentechnologie und später das Trojanische-Pferd-Konzept mit Hilfe von Mikro- und Nanopartikel eingesetzt. Liposomen sind die am besten untersuchten Carriersysteme. Die Beladungskapazität ist einerseits von dem Volumen des Liposoms selbst aber auch von der Löslichkeit des Arzneimittels abhängig. Durch die Integration von Wirkstoffen in Liposomen können die Nebenwirkungen gesenkt werden. Es gibt auch vereinzelte liposomale Präparate im Handel, wie z.B. DaunoXome[®] (zur Behandlung des AIDS-assoziierten Kaposi-Sarkoms bei Patienten mit niedriger CD4⁺Zellen Anzahl). Allerdings ergeben sich auch bei diesen Systemen Probleme. Während der Lagerung können die Liposomen aggregieren, fusionieren oder den eingeschlossenen Wirkstoff freigegeben.

Nanopartikel scheinen die beste Möglichkeit zu sein, Medikamente in das ZNS einzuschleusen. Nanopartikel zeichnen sich durch hohe chemische Reaktivität auf Grund der körpereigenen Abwehr- und Abbaumechanismen aus. Zusätzlich ist ein gezielter Trans-

port möglich. Gelangt der Wirkstoff gezielt zum Wirkungsort und wird dort angereichert, kann durch Dosisreduktion die Zahl und das Auftreten von Nebenwirkungen deutlich minimiert werden.

Die Bestimmung der BHS-Passage ist eine besondere Herausforderung, da *in vitro* Zellsysteme aufgrund der Komplexität der BHS noch nicht zufriedenstellend die Merkmale dieser Barriere repräsentieren (Reichel *et al.*, 2003) und *in vivo* Messungen aufwändig sind. Daher ist eine systematische Analyse der Auswirkung verschiedener Modifikationen der NP auf deren BHS Gängigkeit und die zugrunde liegenden Mechanismen der Passage bisher nicht erfolgt. Da die hier verwendeten polymeren NP einfach mit Fluoreszenzfarbstoffen beladen werden können, eröffnete sich für mich die Möglichkeit, die BHS-Passage im lebenden Tier „online“ zu beobachten und parallel die Verteilung im Gewebe zu bestimmen. Dies wird ermöglicht durch die „*In vivo* Confocal Neuroimaging“ (ICON) Methode. Diese Technik ist von Vorteil, da der *in vivo* Ansatz weniger Artefakt-anfällig ist als die Zellkultur und die Ergebnisse daher zuverlässiger einen Transfer der Aussagen auf die Anwendungen beim Menschen erlauben. Für meine Arbeit hatte ich durch die Kooperation mit dem Institut für Verfahrenstechnik die Möglichkeit zielgerichtet NP Modifikationen herstellen zu lassen. In Kombination mit dem effizienten, nicht-invasiven Bildgebungsverfahren (ICON) als biologischem Testsystem ergaben sich so Untersuchungsmöglichkeiten der Kinetik und Neurotoxizität von NP, die bisher im Bereich Nanowissenschaften nicht vorhanden waren: (i) „real-time“ Darstellung der BHS-Passage, parallel (ii) die Visualisierung der zellulären Gewebeverteilung im lebenden Organismus und (iii) Bestimmung der Neurotoxizität.

1.1 Ziel dieser Dissertation

In der vorliegenden Arbeit sind der Übertritt von PBCA-Nanopartikeln über die BHS und die damit verbundene Möglichkeit, sie als Arzneimittelträgersysteme einzusetzen, untersucht worden. Dabei wurden die Nanopartikel mit Hilfe der Miniemulsionspolymerisation hergestellt und modifiziert. Die Blut-Retina-Schranke (BRS) diente auf Grundlage einiger Publikationen (Steuer *et al.*, 2004, 2005) in dieser Arbeit als Modell für die BHS. Der Fokus dieser Dissertation lag dabei auf der Klärung folgender Fragestellungen:

- **Überwinden PBCA-NP die BRS und wie verteilen sie sich in der Retina?**
Zur Beantwortung dieser Frage wurden während der Injektion von fluoreszierenden PBCA-Nanopartikeln im narkotisierten Tier Aufnahmen mit Hilfe der ICON- Technik gemacht und die Verteilung in Zellulär- und Gewebestrukturen ermittelt, außerdem wurden *ex vivo* Untersuchungen an den Retinae durchgeführt.

- **Welche physikalisch/chemischen Parameter der NP spielen bei der BHS-Passage und der Gewebeverteilung eine Rolle?** Hierfür wurden spezifische Merkmale wie Partikelgröße, Zetapotential und Oberflächeneigenschaften (Tenside) der Nanopartikel variiert und die Kinetik der fluoreszierenden Partikel mit ICON dargestellt und quantifiziert.
- **Wie überwinden PBCA-NP die BRS (Mechanismus)?** Da in der Literatur von einem rezeptorvermittelten Transport über LDL-Rezeptoren bei PBCA-NP mit Tween80 berichtet wird, wurden unterschiedliche Tenside zur Nanopartikelproduktion eingesetzt und deren Passage mit der Diffusion von Nanopartikeln nach hyperosmotischer Öffnung der BRS verglichen. Um weiterhin eine unspezifische Öffnung der BRS durch die Injektion von Nanopartikeln auszuschließen (Door-opener Effekt), wurde ein Fluoreszenzfarbstoff nach der Applikation leerer PBCA-Nanopartikel i.v. injiziert.
- **Sind PBCA-NP neurotoxisch?** Diese Frage wurde *in vitro* mit Hilfe eines Zellvitalitätstests (MTT-Test) und *in vivo* mit der Beobachtung des zellulären Überlebens und der Morphologie von Retinalen Ganglienzellen (RGZ) und dem Verhalten der Ratten geklärt.
- **Kann man mit Hilfe von PBCA-NP Wirkstoffe ins Gehirn transportieren und nachweisbare Effekte erzielen?** Zur Klärung dieser Frage wurde ein Schmerzmittel an die PBCA-NP gebunden und ein Verhaltenstest durchgeführt, mit dem die zentrale Wirkung des per se nicht Blut-Hirn-Schranken-gängigen Schmerzmittels und somit der erfolgreiche Carriertransport nachgewiesen werden konnte.

Grundlage zur Beantwortung dieser Fragen sind dabei die chemisch/ physikalische Charakterisierung und gezielte Modifikation der PBCA-Nanopartikel.

Die durch diese Studie erlangten Ergebnisse sollen das Verständnis über die Blut-Hirn-Schrankengängigkeit der PBCA-Nanopartikel vertiefen und ihr Potential als potentielle Arzneiträgersysteme verdeutlichen.

2 Theoretischer Teil

Die Nanotechnologie umfasst laut Definition Prozesse zur Herstellung oder Anwendung von Strukturen oder Materialien im Nanometerbereich.

Sie zeichnet sich durch ein breites Anwendungsspektrum in fast allen naturwissenschaftlichen und technischen Disziplinen aus. Unter anderem finden sie Anwendung bei Beton- und Poliermitteln, als Oberflächenbeschichtung und in der Kosmetik und Medizin. Beispiele für den erfolgreichen Einsatz von Nanotechnologie sind unter anderem Kontrastmittel für Bildgebungsverfahren der Computertomografie, Trägermaterialien von Pheromonen für den biologischen Pflanzenschutz, Karoserieschutz, Sonnencremes mit nanoskalierten Titandioxid und Nanobeschichtung zur Nachahmung des Lotuseffekts [SRU 2011].

Seit vielen Jahren werden Nanopartikel nicht nur zur Verbesserung von Materialoberflächen eingesetzt, sondern auch für den zielgerichteten Transport von Wirkstoffen über Zellbarrieren (Yordanov, 2012).

Nanomaterialien können erheblich veränderte Eigenschaften im Vergleich zu den chemisch identischen Ausgangsstoffen aufweisen. Beispielsweise können sich die Farbe, die elektrische Leitfähigkeit, mechanische Belastbarkeit, Reaktivität und die spezifische Oberfläche eines Stoffes verändern, was für eine Anwendung nutzbar gemacht werden kann.

Da unter dem Begriff „Nano“ die unterschiedlichsten Materialien zu finden sind, ergeben sich jeweils Vorteile für ganz unterschiedliche Anwendungsbereiche, was das enorme Potential der Nanopartikel widerspiegelt. So werden nanopartikuläre Mineralien und Metalloxide (z.B. Siliziumoxid, Eisenoxid), nanopartikuläre Metalle (z.B. Eisen, Silber, Gold), Nanofasern (Kohlenstoff-Nanoröhrchen CNT) oder komplexerer Strukturen aus Tensiden und Liposomen eingesetzt [SRU 2011]. Beispiele für den breiten Anwendungsbereich sind Filtergranulate aus nanopartikulären Silberverbindungen die zur Reinigung von Trinkwasser eingesetzt werden. Nanopartikuläre Siliziumdioxide verbessern die Festigkeit von Beton und nanoskaliges Titannitrid verbessert die Verarbeitung von Polymeren bei der Herstellung von PET-Flaschen (siehe Tabelle 01).

Die Einsatzmöglichkeiten von Nanopartikeln sind schier unendlich und auch noch lange nicht vollständig erforscht. In dieser Arbeit wird unter Berücksichtigung ihrer möglichen Toxizität der Einsatz von Nanopartikeln als Träger von Arzneimitteln näher untersucht.

Tabelle 01: Anwendungsbeispiele von Nanopartikeln in Produkten (Analysebericht LUBW 2007)

Bereich	Nanoskalige Partikel (Beispiele)	Produkte	Zweck
Kosmetik	Titandioxid (TiO ₂), Zinkoxid (ZnO), Aluminiumoxid (Al ₂ O ₃), Calciumphosphat (Ca ₃ (PO ₄) ₂)	Sonnenschutzpräparate, Hautcreme, Haarpflegemittel, Zahncreme	UV-Schutz Stabilisator biomimetischer Wirkstoff (synthetischer Wirkstoff nach biolog. Vorbild)
Nahrungsmittel	Siliciumdioxid (SiO ₂), z.T. beschichtet Carotinoide (z.B. Lycopene von BASF), Titandioxid	Raffinierte Speisesalze, Hart- und Schmelzkäse, Ketchup Limonaden Zuckerguss, Bonbons, Kaugummi	Verbesserung Rieselfähigkeit, Verbesserung der Sämigkeit, Verringerung der Haftfähigkeit, Orange färbung und längere Frischhaltung Farbstoff
Lebensmittel	Schichtsilikate, TiO ₂	Frischhaltefolien	Feuchtigkeitsverlust, Sauerstoffeintrittsminderung, UV-Schutz
	Innere SiO ₂ Beschichtung	PET-Flasche	Diffusionssperre
Papier	TiO ₂	Dekor- und Zigarettenpapier	Erhöhung der Opazität
Farben	TiO ₂	Holzfarben und Lacke, Autolacke	UV- und Korrosionsschutz, Kratzfestigkeit
Putzmittel	Al ₂ O ₃ , SiO ₂ , TiO ₂	Glas- und Keramikreiniger	Oberflächenversiegelung
Sanitärkeramik	Al ₂ O ₃ , SiO ₂	Waschbecken, Badewannen, WCs, Duschen, Fliesen	Oberflächenveredelung (Abriebfestigkeit, Hitzebeständigkeit)
Pharmabereich und Medizin	beschichtetes hochdispersives SiO ₂ Silber, Polymer- und metallische Partikel	Arzneimittel in Tabletten, Kapseln, Salben und Wundsprays, Krebsmedikamente Implantate, Prothesen	Wirkstofftransporter oder -depot antibakterielle Wirkung, Oberflächenglättung, Kontrastmittel
Landwirtschaft	Pestizide in Nanokapseln	Bayer Crop Science, Syngenta	Pflanzenschutz und Schädlingsbekämpfung
Automobil	„carbon black“ (Industrieruß) Kupferchem. Verbindungen mit hohem Fluor-Anteil Platin, Palladium	Autoreifen Schmiermittel Lack- und Scheibenreiniger „easy to clean“ Katalysatoren	Haftungsverbesserung, Verschleiß Verschleißreduzierung schmutz- und wasserabweisende Oberflächen Emissionsminderung
Textilien	Silber Silikonschichten, Anatas-Fasern (TiO ₂)	Kleidung, Schuhsohlen, Allwetter-Stoffe (Outdoor-Kleidung)	antimikrobielle Wirkung Textilveredelung
Informations- und Kommunikationstechnik	Silicium, Siliciumcarbid	elektronische Bauelemente (z.B. Chips Wafer)	mehr Leistung, weniger Ressourcenverbrauch
Sport	glasfaserverstärkte Kunststoffe Nanotubes (CNT)	trendige Sportgeräte Tennis- und Golfschläger	geringer Verschleiß, größere Stabilität

LUBW 2007: Analysebericht Landesanstalt für Umwelt, Messung und Naturschutz Baden-Württemberg: Anwendungen von Nanopartikel

2.1 Blut-Hirn-Schranke

Um Krankheiten optimal zu bekämpfen, ist die Entwicklung des richtigen Wirkstoffs eine essentielle Voraussetzung. Damit sich die Wirkung am Zielort aber überhaupt erst entfalten kann und wenige Nebenwirkungen auftreten, ist die Pharmakokinetik entscheidend, d.h. der Arzneistoff sollte schnell und unverändert dorthin gelangen. Die Verteilung vieler Arzneistoffe wird aber durch die körpereigenen Barrieren behindert oder gar verhindert und die Pharmaka gelangen so nur teilweise oder überhaupt nicht zum gewünschten Zielort. Hier bieten partikuläre Arzneiträger zahlreiche Vorteile. Sie schließen den Wirkstoff ein und schützen ihn so vor äußeren Einflüssen und vor körpereigenen Abwehrmechanismen, minimieren die Nebenwirkungen und können Barrieren wie die Blut-Hirn-Schranke überwinden.

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine physiologische Barriere zwischen Blutkreislauf und dem Zentralen Nervensystem, die zur Milieuerhaltung im Gehirn und dem Schutz

vor toxischen Stoffen dient. Die Funktionen des Gehirns sind an elektrochemische und biochemische Vorgänge gekoppelt und bedürfen eines konstanten Milieus (Homöostase) ohne Konzentrationsschwankungen oder pH-Wert Änderungen. Die BHS schützt das Gehirn vor dem Eindringen von unerwünschten Fremdstoffen oder körpereigenen Botenstoffen wie Neurotransmittern. Für wichtige Nähr- und Baustoffe gibt es ein komplexes Transportsystem.

Paul Ehrlich gelang es als einem der Ersten 1885 per Zufall, die BHS nachzuweisen (Himmelweit *et al.*, 1956-1960). Bei der Injektion eines Farbstoffes im Tier konnte er den Farbstoff nur in den Organen nicht aber im Gehirn nachweisen. Er interpretierte diese Daten aber leider falsch. Erst 1913 erkannte sein Student Edwin Goldman bei der Injektion des Farbstoffes ins Gehirn die Barrierewirkung der Blutgefäße. Ab 1960 konnte die Existenz der BHS zweifelsfrei mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie nachgewiesen werden (Hawkins and Davis 2005).

Das Schutz- und Versorgungssystem des Gehirns wird durch die Kapillare wahrgenommen. Die Kapillaren bestehen aus einer einlagigen Endothelschicht und kleiden bei Wirbeltieren die Lymph- und Blutgefäße aus. Die peripheren Kapillaren werden auch als fenestriertes Endothel bezeichnet, da sie aufgrund der Intrazellulären Spalte (Lücken zwischen den Endothellzellen) die freie Diffusion von Molekülen ermöglichen. Die Kapillaren der BHS sind im Gegensatz zu peripheren Kapillaren deutlich dichter und weisen deutliche strukturelle und funktionelle Unterschiede auf (Abbildung 01). Sie bestehen aus Endothelzellen, Astrozyten (Makroglia-Zellen) und Perizyten. Die Perizyten sind direkt in die Basalmembran, welche die Endothelzellen umschließt, eingebettet, wohingegen bei den Astrozyten nur die Endfüße auf der Basalmembran zu finden sind. Die Endothelzellen sind über Zell-Zellverbindungen, den Tight Junctions, miteinander verbunden. Die Tight Junctions werden durch Transmembranproteine, wie Occludine, Claudine (5 & 12) und Junctional Adhesions Molecules (JAM) gebildet. Die Tight Junctions verschließen den Spalt zwischen den Endothelzellen vollkommen und verhindern eine freie Diffusion von Substanzen. Im Gegensatz zu den Tight Junctions, wo ein Transport fast ausgeschlossen ist, gibt es die Kanal-Verbindungen zwischen Endothel und Perizyten, die Gap Junctions, an denen Stoffaustausch über Kanalproteine möglich ist (Madara, 1988). Weiterer Unterschiede der zerebralen zu den peripheren Kapillaren stellt die hohe Anzahl an Mitochondrien und die Basalmembran, die die Endothellzellen umgibt, dar. Aufgrund der räumlichen Nähe können die Zelltypen schnell kommunizieren und bilden als Einheit die Blut-Hirn-Schranke.

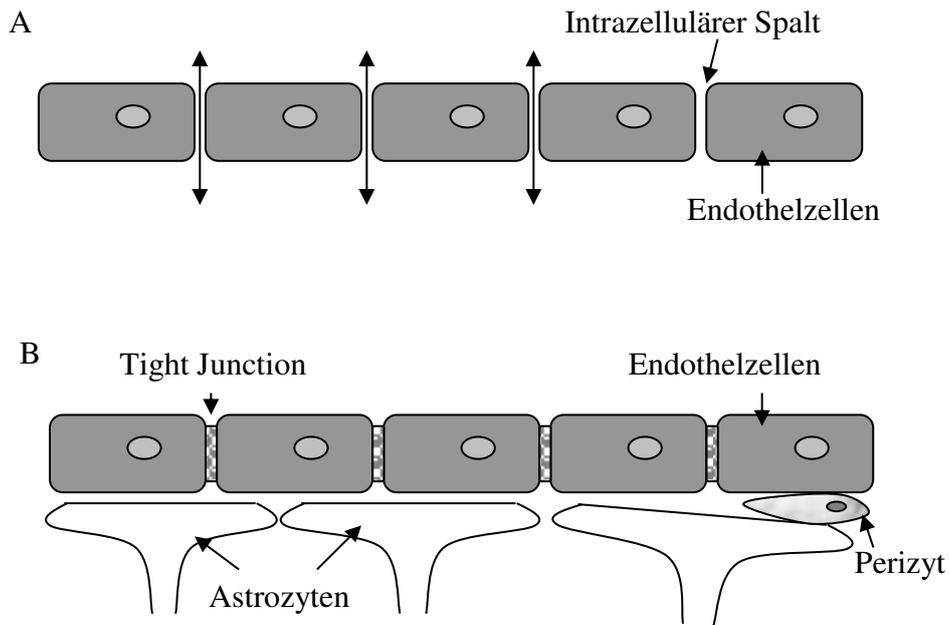


Abb. 01: Unterschiede zwischen peripheren (A) und zerebralen Kapillaren (B)

2.1.1 Transportsystem entlang der Blut-Hirn-Schranke

Aufgrund der Morphologie der BHS kann das Zentrale Nervensystem vor „Eindringlingen“ oder äußerer Beeinflussung geschützt werden. Zur Gewährleistung des Transports von notwendigen Substanzen gibt es ein komplexes individuell angepasstes Transportsystem entlang der BHS (Abb. 02) (Abbott *et al.*, 2010, Ballabh *et al.*, 2004).

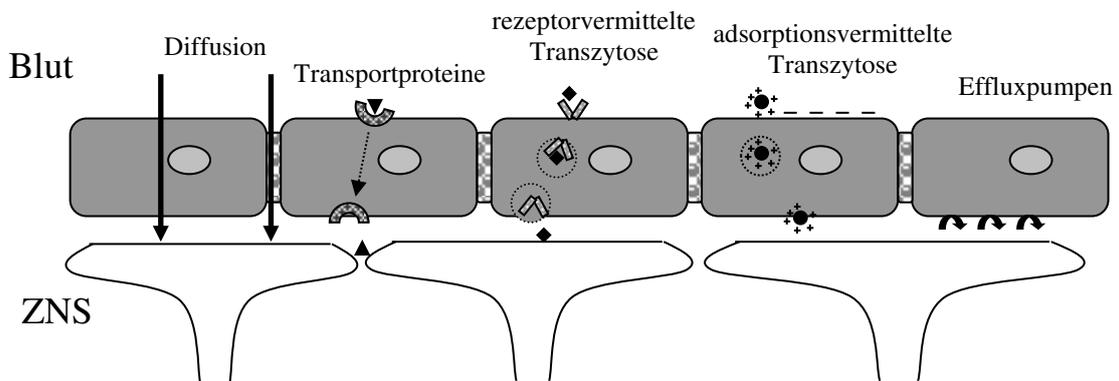


Abb. 02: Transportsysteme entlang der BHS (Abbott *et al.*, 2006)

Passive Diffusion

Die Passive Diffusion beschreibt die einfachste Form des Transportes an Membranen. Die passive Diffusion ist der Transport durch die Membran entlang des Konzentrationsgradienten ohne Energieaufwand. Die Diffusionsgeschwindigkeit ist abhängig von der Substanz und wird im einfachsten Fall durch das 1. Fick'sche Gesetz beschrieben. Dabei gilt je kleiner und lipophiler das Molekül, desto schneller der Transport.

$$1. \text{ Ficksches Gesetz} \quad J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (1)$$

J	Teilchenstromdichte
D	Diffusionskoeffizient
$\partial c / \partial x$	Diffusionsrichtung (Konzentrationsgradient)

Kleine lipophile Substanzen, wie Sauerstoff, können entlang ihres Konzentrationsgradienten durch die Membran diffundieren. Wasser, Glycerin und Harnstoff diffundieren hingegen durch die Tight Junctions. Die passive Diffusion ist beschränkt durch die Molekülgröße und die Lipophilität des Moleküls.

Transport über Transportproteine

Der Transport über Transporterproteine (Carrier) erfolgt bei größeren polaren Molekülen wie Glucose oder Nukleinsäuren. Die Moleküle werden von Carrierproteinen erkannt und durch die Membran ins Gehirn transportiert. Dabei unterscheidet man in passiv (mit dem Konzentrationsgefälle) oder aktiv mit Energieaufwand. Die benötigte Energie für den aktiven Transport wird durch die Hydrolyse von ATP in ADP gewonnen. Glucose ist der wichtigste Energielieferant des Gehirns und wird über GLUT-1-Transporter über die BHS mit dem Konzentrationsgefälle transportiert. Aminosäuren werden je nach Länge und Polarität der Seitenketten über Transporter des L- oder A-System transportiert (Smith *et al.*, 1987).

Rezeptervermittelte Transzytose

Über die Rezeptorvermittelte Transzytose wird z.B. Insulin transportiert. Hierbei wird die Substanz durch einen spezifischen Rezeptor erkannt, der Rezeptor-Substanz-Komplex wird internalisiert und bildet ein intrazelluläres Transportvesikel. Das Transportvesikel wird durch Transzytose durch die Zelle transportiert, verschmilzt anschließend mit der zum Gehirn gewandten Membran und gibt dann das gebundene Molekül wieder frei. Ein Beispiel hierfür ist auch der LDL-Rezeptor über den Low Density Lipoproteine ins Gehirn transportiert werden.

Adsorptionsvermittelte Transzytose

Eine andere Form des Transportes ist die Adsorptionsvermittelte Transzytose über die Albumin oder Avidin ins Hirn transportiert werden. Die positiv geladenen Moleküle treten mit der negativen Zelloberfläche in Wechselwirkung und werden in Form von

Transportvesikel durch das Zytoplasma der Endothelzellen transportiert. Die Transportvesikel verschmelzen mit der Membran und geben das Molekül ins Gehirn frei.

Aktive Effluxpumpen

Dieses Transportsystem dient dem Schutz und der Abführung von Substanzen aus dem Gehirn. Der Transport ist an ATP gebunden und geschieht unter Energieverbrauch. Die Vertreter der Effluxpumpen sind ABC-Transporter wie zum Beispiel P-Glycoproteine.

Schon kleine Veränderungen an der Blut-Hirn-Schranke führen zu Störungen des ZNS. Aber bei den meisten ZNS-Erkrankungen ist die BHS intakt und erschwert und behindert die Behandlung. Um Krankheiten des ZNS wie Alzheimer, Multiple Sklerose oder Hirntumore effizient behandeln zu können, muss die BHS von den Wirkstoffen in ausreichender Menge und ohne chemische Veränderungen überwunden werden. Bislang stellt die BHS für die meisten Medikamente aber eine unüberwindbare Barriere dar und es konnte noch keine zufriedenstellende Therapie für ZNS-Erkrankungen gefunden werden. Da bislang Medikamente meist nur durch stark invasive Methoden mit hohem chirurgischen Aufwand direkt ins Gehirn gebracht werden oder durch hyperosmotische Öffnung der BHS mit anderen auch unerwünschten Substanzen ins Gehirn gelangen, spielen Trägersysteme wie Nanopartikel eine entscheidende Rolle bei der Behandlung von Erkrankungen des ZNS.

2.1.2 Überwindungsstrategie der Blut-Hirn-Schranke

Nur ein Bruchteil der lizenzierten Medikamente ist in der Lage die BHS zu überwinden. Die strukturellen Besonderheiten der BHS lassen nur den passiven Transport von kleinen lipophilen Medikamenten zu, neue vielversprechende Wirkstoffe sind meist größer und komplexer und daher ungeeignet.

Chemische Modifikation von Substanzen

Eine Möglichkeit der Überwindung stellt die chemische Modifikation von Substanzen dar. Dabei wird durch die Änderung der Molekularstruktur oft die Lipophilie von Substanzen erhöht, um eine erhöhte Diffusionsrate zu erreichen. Die Erhöhung der Lipophilie wird zum Beispiel durch Diacetylierung der Substanzen erreicht. Eine andere Art der Modifikation von Substanzen hat das Ziel bestehende Transportwege über die BHS zu nutzen. Ein Beispiel dafür ist die Nutzung von Aminosäuretransportwegen. Dopamin wird beispielsweise selbst nicht über die BHS transportiert aber die Aminosäure L-Dopa wird von Transportproteinen erkannt, über die BHS transportiert und im Gehirn umgewandelt zu Dopamin. Diese Methode wird auch für den Transport von Gabapentin und Baclofen ausgenutzt. Für große Moleküle macht man sich den Peptid-Vektor-Transport über Rezeptorvermittelte Transzytose zu nutze. Dabei wird der Peptidarzneistoff an

Vektoren gebunden, spezifisch vom Rezeptor erkannt und durch Transzytose über die BHS transportiert. Als Vektoren können beispielsweise Insulin oder Transferrin genutzt werden.

Invasive Methode

Eine andere Strategie sind invasive Methoden zur Öffnung der BHS. Meist wird hier die Blut-Hirn-Schranke durch die Injektion einer hyperosmotischen Lösung geöffnet. Durch die Injektion schrumpfen die Endothelzellen, dabei geht die vorher lückenlose Verbindung der Tight Junctions auseinander und ein Spalt entsteht. Durch diese Lücke gelangen dann Substanzen und Medikamente unspezifisch ins Gehirn. Diese Technik findet zum Beispiel Anwendung bei der Behandlung von Hirntumoren aber ist mit einem hohen operativen Aufwand und Risiken verbunden.

Blockade der ABC-Transporter

Eine andere Möglichkeit stellt die Hemmung der ABC-Transporter der BHS dar um Arzneimittel einzuschleusen. Diese Blockade der Transporter und die damit verbundene Penetration der BHS verursachen einen unspezifischen Einstrom von Substanzen. Diese Methode ist risikobehaftet und die einströmenden Substanzen könnten toxische Effekte hervorrufen und Schaden verursachen.

Trägersysteme

Viele Forschergruppen beschäftigen sich daher in den letzten Jahrzehnten mit partikulären Trägersystemen. Das meiste Interesse gilt dabei den Liposomen und Nanopartikeln. Liposomen sind künstlich hergestellte Vesikel und bestehen aus einer Doppellipidschicht aus Phospholipiden und Glykolipiden. Der Durchmesser der Liposomen kann 20nm bis 3µm betragen mit einer Membrandicke von 5nm (Gregoriadis, 2005). Die Beladungskapazität ist abhängig vom Arzneistoff und vom Volumen des Liposoms selbst. Hydrophile Moleküle werden eingeschlossen, geladene an der Doppelschicht adsorbiert und lipophile in die Doppelschicht inkorporiert. Es befinden sich auch schon liposomale Präparate von diversen Herstellern im Handel wie AmBisome[®], DaunoXome[®], Myocet[®], Doxil[™] oder Caelyx[®]. Allerdings gibt es auch einige Nachteile: Lagerungsprobleme aufgrund der geringen Stabilität, orale Applikation ist durch den strukturellen Aufbau nicht möglich, sie werden oft von der Immunabwehr eliminiert (Gregoriadis, 2005) und sie weisen eine eingeschränkte Beladungskapazität auf. Nanopartikel¹ haben wichtige Vorteile gegenüber Liposomen. Die Herstellung ist mit einer geringeren Anzahl von Hilfsmitteln realisierbar und somit einfacher und preiswerter, Nanopartikel ermöglichen ein gezieltes Drug-Targeting durch entsprechende Oberflächenmodifikation (Tenside) und Freisetzung des Wirkstoffs am Zielort und sie weisen eine höhere Stabilität auf. Außerdem ist es möglich die Arzneistoffe an die Oberfläche zu binden oder einzuschließen (Tiwari and Amiji, 2006).

¹ Kleine feste Partikel aus Polymeren im Bereich von 10nm bis 1µm (Olivier, 2005)

In dieser Arbeit werden Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel (PBCA-NP) verwendet. Diese Partikel sind schon von einigen Forschergruppen als Trägersubstanzen untersucht worden (Alyautdin *et al.*, 1995; Schröder *et al.*, 1996-1998; Sommerfeld *et al.*, 1997-2000; Kreuter *et al.*, 2003; Gulyaev *et al.*, 1999). Die einfache Herstellung, die biologische Abbaubarkeit und die Beladbarkeit mit Wirkstoffen machen diese Nanopartikel so hoch interessant (Schneider *et al.*, 2008; Reimold *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2008-2009).

2.1.3 Blut-Retina-Schranke als Modell der Blut-Hirn-Schranke

Neben der BHS gibt es im Körper noch mehrere Barrieren wie die Blut-Liquor-, Blut-Plazenta-, Blut-Hoden-, Blut-Harn-, Blut-Thymus-Schranke, aber keine ist der BHS so ähnlich wie die Blut-Retina-Schranke (BRS). Die BRS ist laut Definition ebenfalls eine selektiv permeable Barriere zwischen Blutgefäß und Retina. Die Retina ist ein Teil des Gehirns und ontogenetisch aus der gleichen Struktur entwickelt (Aufbau siehe Abbildung 03). So zeigte Steuer *et al.*, 2004, dass es bei der quantitativen Analyse der Hirngängigkeit verschiedener Arzneistoffe keine Unterschiede zwischen BHS und BRS gab und dass die beiden Schranken strukturell übereinstimmen (Steuer *et al.*, 2005). Die Endothelzellen sind genau wie bei der BHS über Tight Junctions verknüpft und somit sehr dicht. Daher ist die freie Diffusion von Molekülen eingeschränkt und es bedarf eines komplexen Transportsystems.

Die Retina besteht aus verschiedenen Schichten, die sich nach Innen vom Glaskörper und nach Außen zum retinalen Pigmentepithel abgrenzen. Die innere Grenzmembran, bestehend aus der Basalmembran der Müller- Zellen, ist die Abgrenzung zum Glaskörper und wird von der Nervenfaserschicht, bestehend aus den Nervenfasern (Axone) der Ganglienzellen, abgelöst. Die anschließende Schicht ist die Ganglienschicht, bestehend aus den Zellkörpern der Ganglienzellen, und die innere plexiforme Schicht, die die Synapsen der Bipolar-, Ganglien- und Amakrinzellen enthält. Die innere Körnerschicht, welche die Zellkörper der Bipolar-, Horizontal- und der Amakrinzellen enthält, schließt sich an und wird von der äußere plexiforme Schicht, bestehend aus den Synapsen zwischen Photorezeptoren, Bipolar- und Horizontalzellen, abgelöst. Die Zellkörper der Photorezeptoren (Stäbchen & Zapfen) ziehen sich durch die anschließende äußere Körnerschicht bis hin zum Pigmentepithel. Das Pigmentepithel ist fest über Tight Junctions verbunden (äußere Blut-Retina-Schranke) und wird durch die Aderhaut versorgt. Die Ganglien- und Bipolarzellen werden durch die Blutgefäße, die sich durch die Netzhaut ziehen aufgrund ihrer Tight Junctions auch über aktive Transportvorgänge mit Nährstoffen versorgt.

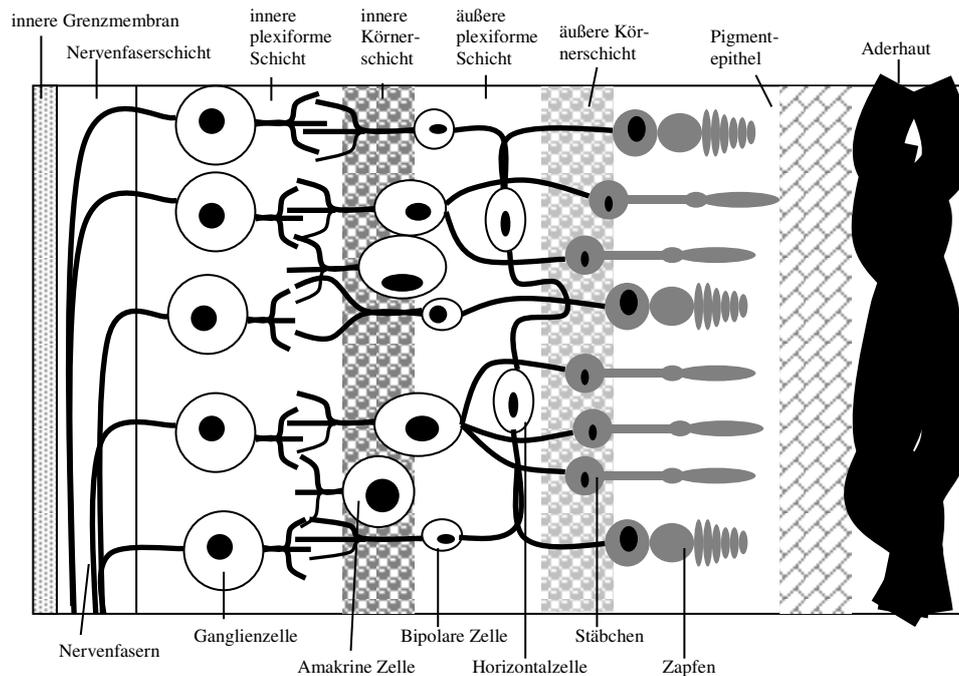


Abb. 03: Aufbau Netzhaut (Retina)

Mit der *In vivo* Confocal Neuroimaging (ICON) Methode (Sabel, 1997) kann das Auge als „Fenster ins Gehirn“ benutzt werden. Es ist möglich, die Kinetik der Blut-Hirn(Retina)-Schrankenpassage, die anatomische Verteilung der applizierten Trägerstoffe und die mögliche neuronale Schädigung in Echtzeit zu untersuchen, ohne die Tiere zu jedem Analysezeitpunkt zu töten. Die ICON Technik nutzt das Auge der Ratte als Teil des Laser-Scanning-Mikroskops, sodass das Laserlicht mit Hilfe einer Kontaktlinse direkt auf die Retina fokussiert wird (Engelmann and Sabel, 1999; Prilloff *et al.*, 2010).

2.2 Nanopartikel

Das Wort „Nanos“ kommt aus dem griechischen und bedeutet Zwerg. Nanopartikel sind somit der Definition nach kleine Feststoffpartikel aus organischen oder anorganischen Materialien im Nanometerbereich. Sie können durch Gasphasen- und Flüssigphasenprozesse (Abb.04) oder Zerkleinerung hergestellt werden. Ganz im Gegensatz zur Zerkleinerung, bei der die Partikel durch Mahlen erzeugt werden, basieren die Gasphasen- und Flüssigphasenprozesse auf dem schrittweisen Aufbau der Partikel aus einzelnen Molekülen und Atomen. Jeder Prozess bietet verschiedene Vor- und Nachteile bei der Herstellung von Nanopartikeln. So entstehen beim Zerkleinern meist Partikel mit breiter Partikelgrößenverteilung und bei den Gasphasenprozessen stellt Agglomeration ein Problem dar. Bei Gasphasenprozessen entstehen agglomerierte, polydisperse, poröse Partikel. Im Gegensatz dazu liefern Flüssigphasenprozessen monodisperse Partikel weshalb in diesem Abschnitt darauf weiter eingegangen wird.

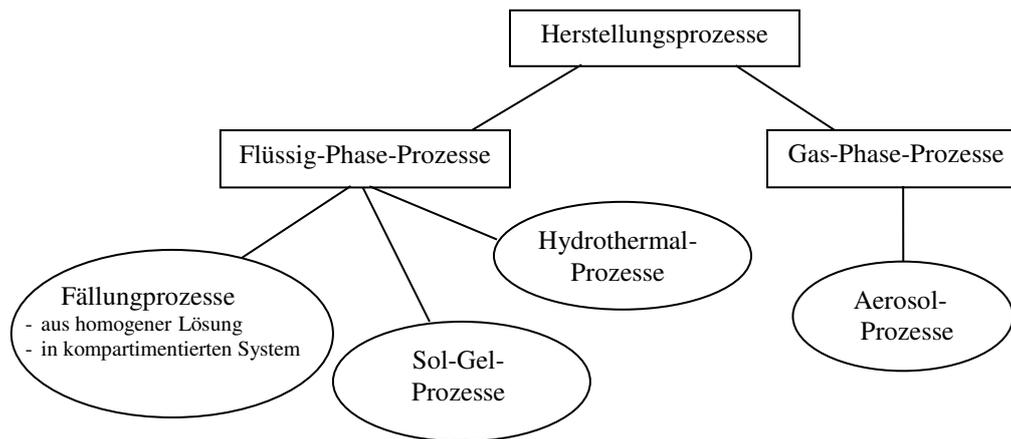


Abb. 04: Wichtige Prozesse zur Erzeugung von Nanopartikeln

2.2.1 Hauptprozesse der Nanopartikelbildung durch Fällung

Die wichtigsten Flüssigphasenprozesse bei der Partikelbildung sind Sol-Gel-Prozesse und Fällung. Der Sol-Gel-Prozess basiert auf der Hydrolyse und Kondensation mit anschließender Polymerisation bis ein Gel mit intrapartikulären Poren entsteht. Es dient zur Beschichtung von Oberflächen und soll hier nicht weiter beschrieben werden. Für die Nanopartikelbildung aus Fällung sind die Keimbildung und das Keimwachstum die entscheidenden Prozesse, um aus Ausgangsprodukten (Edukte) fertige Nanopartikel zu erhalten.

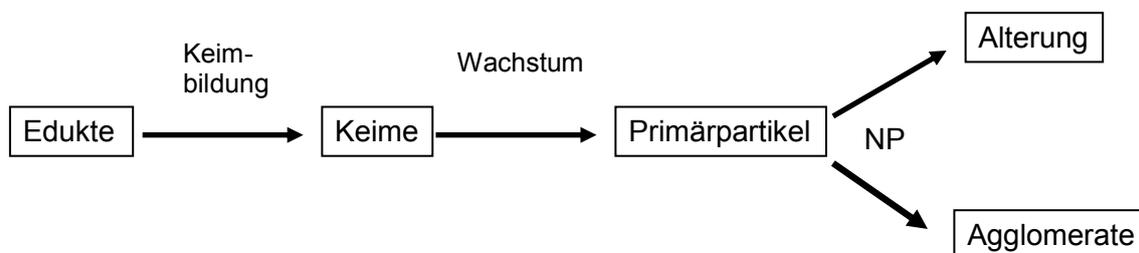


Abb. 05: Prozesse der Nanopartikelbildung

Keimbildung

Keimbildung bezeichnet den Prozess der Bildung einer neuen thermodynamisch stabilen Phase in Form von Keimen aus einer alten, nicht vollständig stabilen Phase. Die Keimbildung ist ein komplexer Vorgang, bei dem spontan Feststoffe aus einer übersättigten Lösung entstehen. Man unterscheidet dabei zwischen primärer und sekundärer Keimbildung. Die letztere beschreibt den Bildungsprozess, bei dem bereits in der Lösung Kristalle enthalten sind. Durch Kollisionen der Kristalle kommt es dann zur Keim- bzw. Partikelbildung. Die primäre Keimbildung lässt sich in homogen und heterogen unterteilen. Bei der heterogenen primären Keimbildung wird die Bildung der Keime durch das Vorhandensein von Fremdstoffoberflächen begünstigt. Diese Flächen können Verunreinigungen in der Lösung sein. Die homogene primäre Keimbildung geschieht

durch das Zusammenstoßen von gelösten Substanzen bei hoher Übersättigung im Gegensatz zur heterogenen Keimbildung, die infolge von Konzentrationsfluktuation geschieht. Da die primäre homogene Keimbildung mit zu den häufigsten Prozessen gehört, wird folgend kurz auf die betreffenden Größen eingegangen.

Die Keimbildungsgeschwindigkeit bestimmt die Anzahl der gebildeten Keime und wird wie folgt beschrieben:

$$B = \frac{1}{V} \frac{dN_p}{dt} = \frac{dc_N}{dt} \quad (2)$$

Die Keimbildungsgeschwindigkeit B beschreibt damit die zeitliche Änderung der Partikelanzahl N_p pro Volumen und somit die zeitliche Änderung der Partikelanzahlkonzentration c_N .

Damit sich eine Feststoffphase von der Lösung abscheiden kann, muss die Feststoffkonzentration c_s die Sättigungskonzentration c^* (Gleichgewichtskonzentration) bei einer bestimmten Temperatur übersteigen (absolute Übersättigung). Wachstum und Dauer der Keimbildung ist direkt abhängig von der absoluten Übersättigung Δc . Große absolute Übersättigung Δc führt zu einer hohen Keimbildungsgeschwindigkeit, was wiederum zu feinen Produkten führt.

$$\Delta c = c - c^* \quad (3)$$

c^* Sättigungskonzentration
 c in der Sättigung vorhandene Konzentration

Für die relative Übersättigung S , die das Verhältnis von vorhandener zur Sättigungskonzentration beschreibt, gilt folgendes:

$$S = \frac{c}{c^*} \quad (3.1)$$

Bei gut löslichen Stoffen wird die Übersättigung durch Abkühlung der Lösung oder durch das Verdampfen des Lösungsmittels erreicht. Üblicherweise liegt die absolute Übersättigung bei technischen Kristallisationsprozessen zwischen 0,01 bis 0,1 mol/l, bei Fällungsprozessen kann sie sogar das Tausendfache der Sättigungskonzentration betragen. Da Primärkeime bei der homogenen Keimbildung nur aus dem Anteil der Übersättigung entstehen, ist bei niedrigerer Übersättigung die heterogene Keimbildung der vorherrschende Prozess.

Zur Bildung von Keimen ist Energie notwendig, dies wird durch die freie Keimbildungsenthalpie ΔG beschrieben. Diese ist abhängig vom Keimradius r . Nur Keime, die größer als der kritische Keimradius r_k sind, bleiben bestehen und können zu Primärpartikeln wachsen. Kleinere Keime verschwinden nach Entstehen sofort wieder in Lösung.

Die freie Keimbildungsenthalpie ΔG wird wie folgt beschrieben und ist in Abb. 06 dargestellt:

$$\Delta G = \Delta G_V + \Delta G_A \quad (4)$$

$$\Delta G = \frac{4}{3} \frac{\pi r^3}{V_M} \Delta \mu_i + 4\pi r^2 \gamma \quad (4.1)$$

ΔG_A	freie Oberflächenbildungsenthalpie (benötigte Energie zur Bildung der neuen Oberfläche)
ΔG_V	Keimbildungsenthalpie der Volumenphase (freiwerdende Energie durch neue Volumenbildung)
V_M	molares Volumen
$\Delta \mu_i$	Differenzen der chemischen Potentiale des Keims (Feststoff) und der gesättigten Mutterphase
γ	Grenzflächenspannung

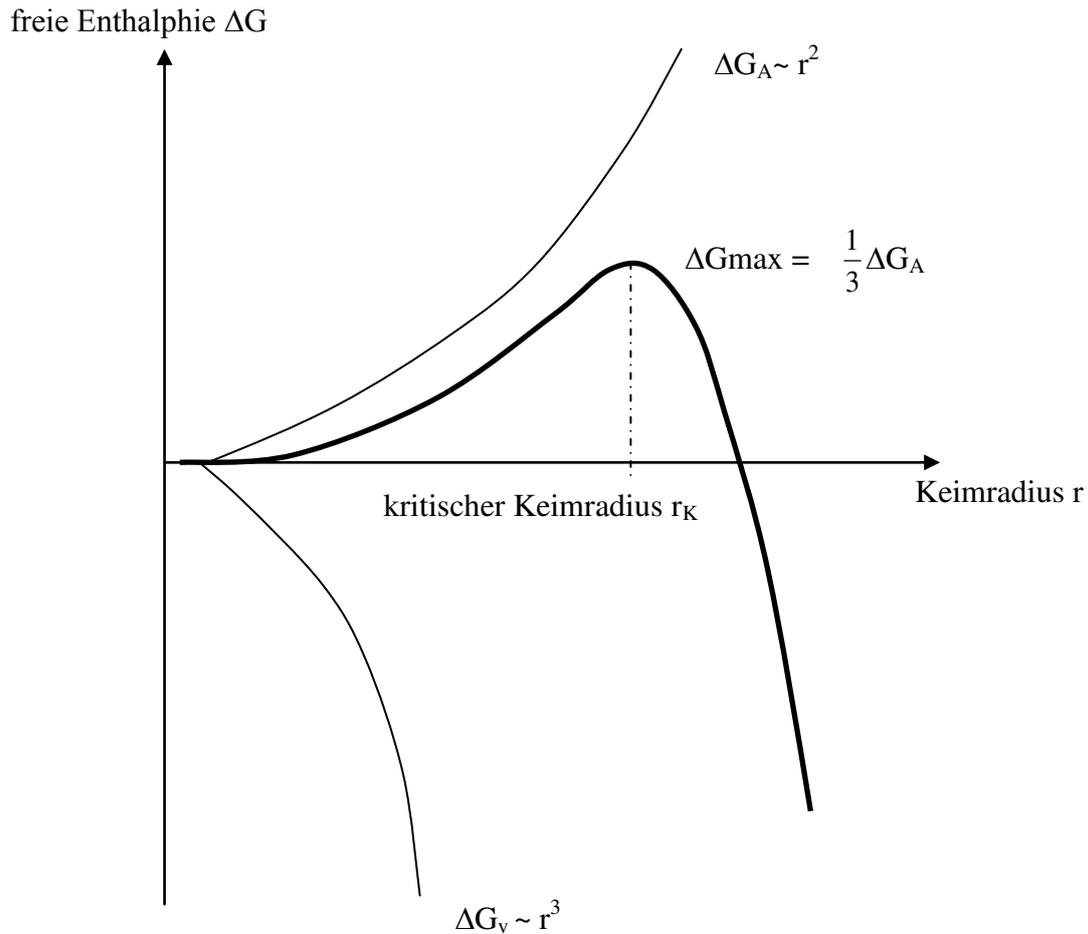


Abb. 06: Änderung der freien Keimbildungsenthalpie ΔG in Abhängigkeit vom Keimradius r

Die Differenz des chemischen Potentials $\Delta \mu_i$ stellt die treibende Kraft der Keimbildung dar:

$$\Delta \mu_i = -RT \ln S \quad (4.2)$$

$$V_M = \frac{M}{\rho_s} \quad (4.3)$$

Durch Umstellen der Gleichung (4.1) unter der Annahme von $r = r_k$ und mit Hilfe der Gleichungen (4.2) & (4.3) lässt sich der kritische Keimradius r_k durch folgende Gleichung beschreiben:

$$r_k = \frac{2\gamma}{RT \ln S} \frac{M}{\rho_s} \quad (5)$$

M molare Masse
 ρ_s Feststoffdichte
 R Gaskonstante
 T absolute Temperatur
 S relative Übersättigung

Keimwachstum

Wenn die Keime nun größer als der kritische Keimradius sind, wachsen sie und bilden Primärpartikel. Die Geschwindigkeit des Partikelwachstums oder auch Partikelwachstumsgeschwindigkeit G wird im Allgemeinen durch folgende Gleichung beschrieben:

$$G = \frac{dL}{dt} \quad (6)$$

und bezeichnet die zeitliche Änderung der charakteristischen Partikellänge (Radius, Durchmesser).

Da die Partikelwachstumsgeschwindigkeit abhängig von der Übersättigung ist, wird sie oft durch die nachfolgende Formel beschrieben:

$$G = k_g \sigma^g \quad (7)$$

$$\sigma = S - 1 = \frac{\Delta c}{c^*} \quad (7.1)$$

σ Übersättigungsdifferenz
 S relative Übersättigung
 k_g Konstanten aus experimentellen Daten (Stoffsystem-abhängig)
 c^* Sättigungskonzentration
 Δc absolute Übersättigung

Keimwachstum lässt sich in diffusionskontrolliert und einbaukontrolliert unterteilen. Beim Wachstum werden verschiedene Teilprozesse durchlaufen, die grob wie folgt ablaufen: die Wachstumseinheiten diffundieren entlang der Grenzschicht bis zur Einbaustelle, werden auf der Oberfläche adsorbiert und dort integriert. Der geschwindigkeitsbestimmende Teilprozess ist dabei namensgebend für das komplette Wachstum.

Das Modell von LaMer und Dinegar verdeutlicht den Zusammenhang von kritischer Übersättigung, Keimbildung und Wachstum für die Nanopartikelbildung (Abb. 07).

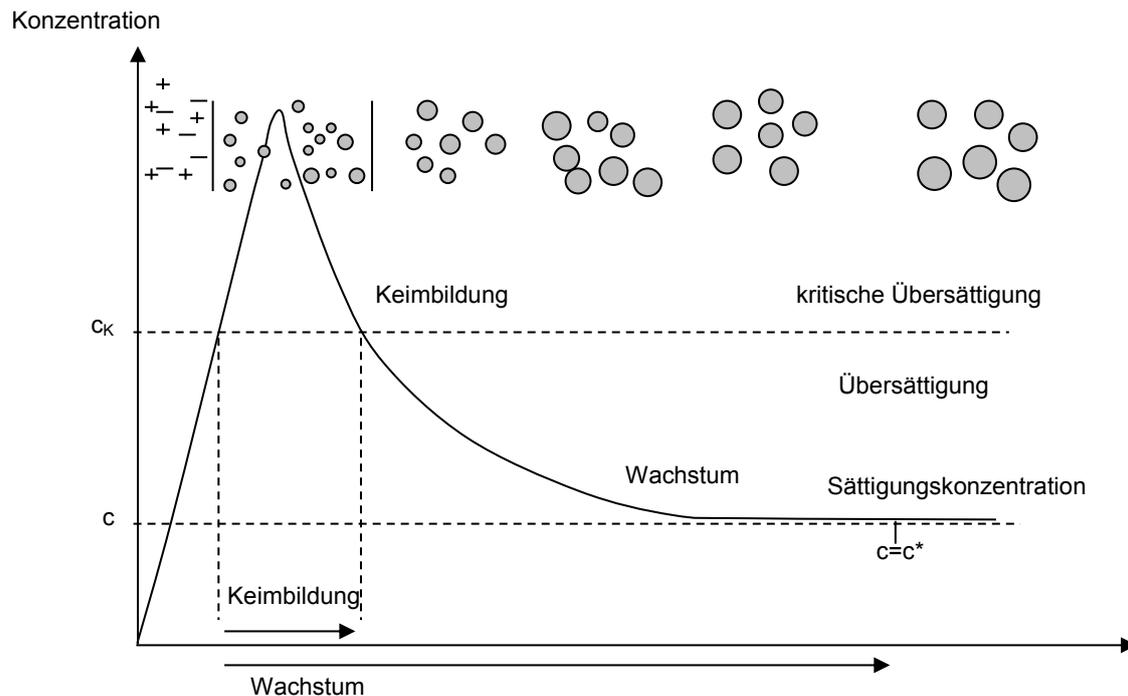


Abb. 07: Konzentrationsverlauf während eines Fällungsprozesses nach LaMer und Dinegar

Die Konzentration steigt durch die Zugabe schwerlöslicher Substanzen stark an. Ab der kritischen Übersättigung c_K kommt es zur spontanen Keimbildung. Gleichzeitig zur Keimbildung laufen Keimwachstumsprozesse ab, was zum späteren Abfall der Konzentration führt. Im Bereich zwischen der kritischen Übersättigung und der Sättigungskonzentration kommt es zu keiner Keimbildung sondern nur zum Keimwachstum oder zu Nebenprozessen wie Agglomeration.

2.2.2 Sekundärprozesse: Agglomeration und Alterung

Neben den Hauptprozessen der Keimbildung und des Keimwachstum laufen meist ungewollte Nebenprozesse wie Agglomeration/Aggregation und Alterung ab.

Unter Aggregation versteht man den Zusammenschluss der Primärpartikel zu einem festen Flächenverbund, was die Partikelgrößenverteilung beeinträchtigt. Dieser Prozess ist ganz im Gegensatz zur Agglomeration irreversibel. Agglomeration beschreibt den lockeren Zusammenschluss von Primärpartikeln als Folge physikalischer Bindungskräfte zwischen den Partikeln. Die Ursache für den Zusammenschluss stellen die mechanischen Transportvorgänge (Diffusion und Konvektion), Kollision zweier Primärpartikel und die Partikelwechselwirkungen dar. Bei beiden Prozessen nimmt die Partikelanzahl ab, während der Durchmesser sich erhöht.

Die wichtigsten Alterungsprozesse stellen Koaleszenz und Ostwald-Reifung dar (Abb. 08). Bei der Koaleszenz verschmelzen 2 kollidierte Partikeln zu einem Partikel. Die Ostwald-Reifung beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit von kleinen und großen Partikeln. Durch fortlaufenden Rückgang der Übersättigung mit fortlaufender Zeit lösen sich Partikel mit kleinem Partikeldurchmesser, auf Grund höherer Löslichkeit, zu Gunsten von Partikeln mit größerem Partikeldurchmesser auf. Dies kann durch die Gibbs-Thomson-Gleichung beschrieben werden.

$$RT \ln S = \frac{2\gamma}{r} V_M \quad (8)$$

γ	Grenzflächenspannung
V_M	molares Volumen
S	relative Übersättigung
R	Gaskonstante
T	absolute Temperatur
r	Radius

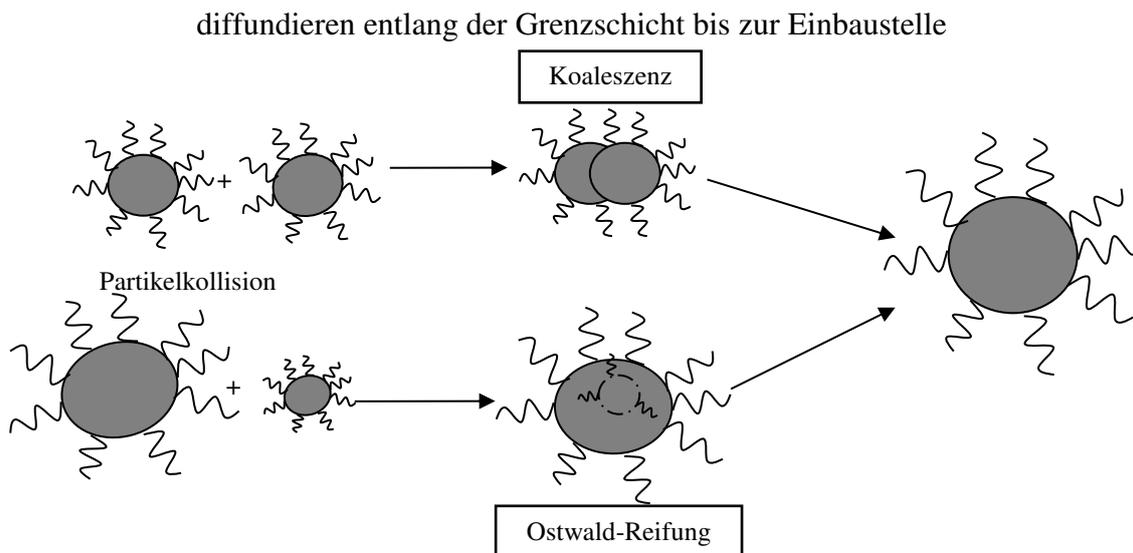


Abb. 08: Schema Ostwald-Reifung und Koaleszenz

Transportmechanismen der Partikel im Fluid

Bei der Keimbildung und Keimwachstum kommt es vor, dass die Primärpartikel kollidieren. Bei dieser Kollision der Partikel unterscheidet man den verursachenden Transportmechanismus in Diffusion und Konvektion.

Diffusion

Diffusion ist die gerichtete Partikelbewegung, verursacht durch einen Konzentrationsgradienten und dem Streben der Partikel zum Konzentrationsausgleich. Mikroskopisch wird diese Partikelbewegung auch Brownsche Partikelbewegung in Anlehnung an die Brownsche Molekularbewegung von Gasen bezeichnet. Das 1. Ficksche Gesetz be-

schreibt einen flächenbezogenen Stofftransport als Folge eines Konzentrationsgradienten.

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (1)$$

Bezogen auf die Fläche:

$$\frac{1}{A} \frac{dn}{dt} = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (1.1)$$

J	Teilchenstromdichte
D	Diffusionskoeffizient
$\partial c / \partial x$	Diffusionsrichtung (Konzentrationsgradient)
n	Stoffmenge
A	Fläche

Konvektion

Konvektion beschreibt den gerichteten Transport infolge von Strömungen. Man unterscheidet dabei in freie und erzwungene Konvektion. Die freie Konvektion entsteht durch Dichteunterschiede infolge von Temperaturänderung. Die erzwungene hingegen wird durch mechanische Mittel erzeugt beispielweise durch Verengung (Kompressor).

Zur Charakterisierung dienen Kennzahlen, die wichtigste ist die Reynolds-Zahl.

$$\text{Re} = \frac{wd\rho}{\eta} \quad (9)$$

η	dynamische Viskosität
w	Strömungsgeschwindigkeit
d	hydraulischer Durchmesser
ρ	Dichte

Die Reynoldszahl lässt dich unter der Annahme, dass Blut eine newtonsche Flüssigkeit (konstante dynamische Viskosität $0,04 \text{ cm}^2/\text{s}$) sei, berechnen:

- Aorta (50cm/s; 2,2 cm) Re= 2750
- Venen (30cm/s; 1,6cm) Re= 1200

2.2.3 Partikelwechselwirkungen und Stabilität

Zwischen den Partikeln herrschen verschiedene Wechselwirkungskräfte. Diese Kräfte können zu Agglomeraten und über weitere Feststoffbrückenbildung zu Aggregaten führen.

Van-der-Waals-Anziehung

Die einfachsten nicht-kovalente Partikel-Partikel-Wechselwirkungen stellt die Van-der-Waals-Anziehung dar. Zwischen sehr stark angenäherten Partikeln entsteht eine Anzie-

hungskraft mit nur kurzer Reichweite. Diese daraus resultierende Van-der-Waals-Bindung ist temperaturabhängig.

Elektrostatistische Wechselwirkungen

Ein Partikel in Suspension besitzt eine elektrochemische Doppelschicht, welche durch das Modell von Stern beschrieben werden kann und für die Partikelabstoßung verantwortlich ist. Laut Stern besteht die Doppelschicht, die die Partikeloberfläche bedeckt, aus der sogenannten Sternschicht und einer diffusen Schicht. Ein Maß für die Ausdehnung der Doppelschicht stellt die Debye-Länge dar. Die Sternschicht ist eine starre Schicht aus Ionen, welche den geladenen Partikelkern mit seinem negativem Oberflächenpotential (Nernstpotential ψ_0) umgibt. Das Potential der Sternschicht wird als Sternpotential ψ_s bezeichnet. Die diffuse Schicht hingegen besteht aus lockeren Gegenionen, die sich frei bewegen. Im elektrischen Feld wandern die Nanopartikel und die Gegenionen aufgrund ihrer Ladung zum entgegengesetzten Pol (Kathode und Anode). Dabei entsteht eine sogenannte Scherschicht innerhalb der diffusen Schicht. Das Potential dieser Scherschicht wird als Zetapotential ζ bezeichnet und ist ein Maß für die Stabilität eines Partikels in Suspension (Abb. 09).

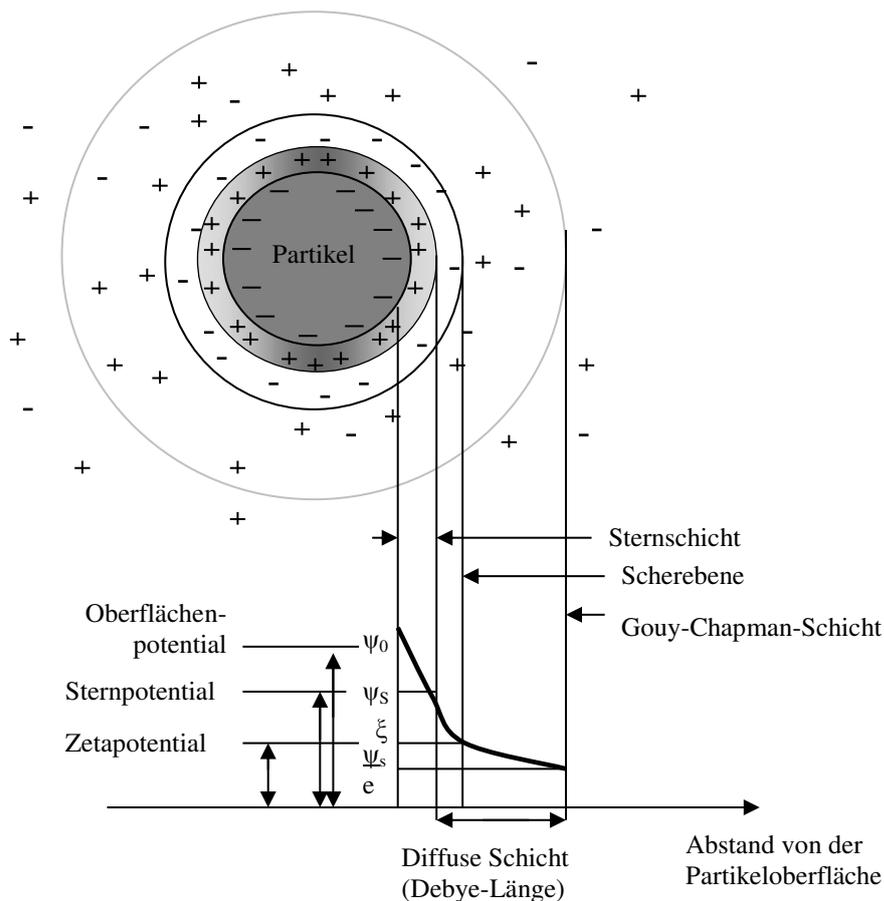


Abb. 09: Schema Zetapotential nach Stern (Lagaly *et al.*, 1997)

Die Wechselwirkungen zwischen den Partikeln aufgrund der Doppelschicht kann durch das DLVO-Modell beschrieben werden. Dieses Modell wurde von Derjaguin, Landau

und Overbeek, Verwey unabhängig voneinander entwickelt und kombiniert die van-der-Waals- Anziehung mit der elektrostatischen Abstoßung. Dieses Modell besagt, dass sich die Gesamtwechselwirkungsenergie aus der Summe der Van-der-Waals-Anziehungsenergie und des elektrostatischen Abstoßungsenergie zusammensetzt (Abb. 10).

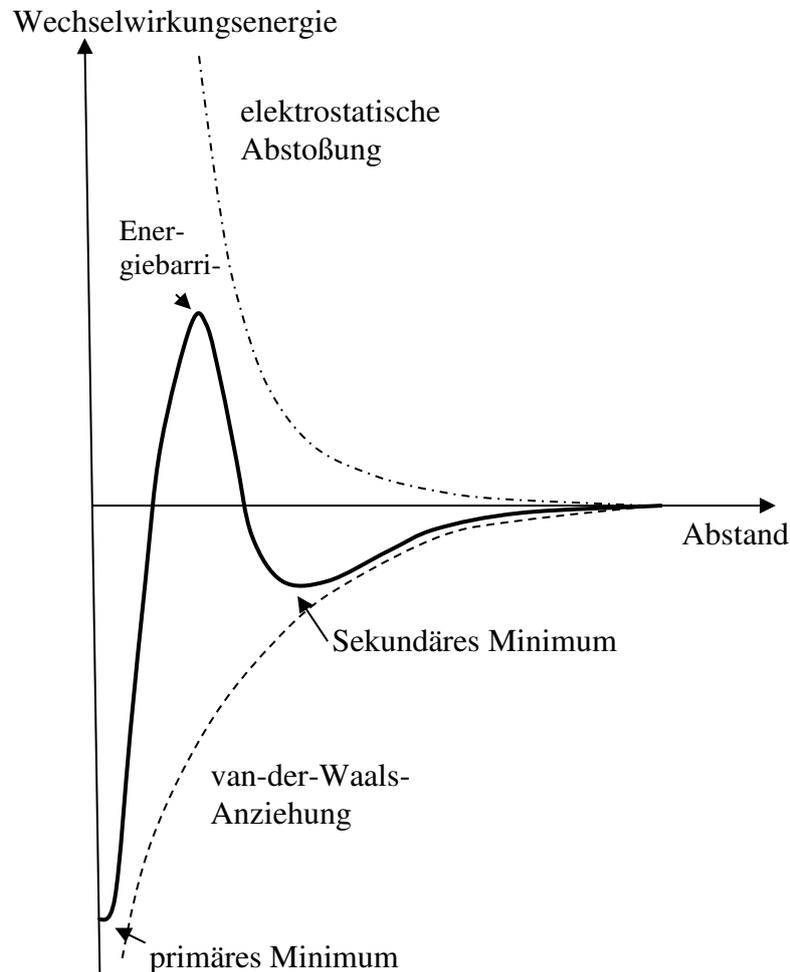


Abb. 10: Wechselwirkungsenergie bei Partikelannäherung (DLVO-Modell)

Mit größer werdendem Abstand zwischen den Partikeln nähert sich die Gesamtwechselwirkungsenergie gen 0. Überwiegt die van-der-Waals-Anziehung kommt es zur Bildung von Agglomeraten. Erreicht die Wechselwirkungsenergie einen Wert von ≤ 0 kommt es zu schneller Agglomeration, bei einem Wert von > 0 zu langsamer Agglomeration. Dies kann indirekt durch die Salzkonzentration und direkt durch den Tensidgehalt der Suspension gesteuert werden.

Sterische Wechselwirkungen

Eine Abstoßung der Partikel bzw. eine Verhinderung der Agglomeration kann auch durch die sterische Stabilisierung gewonnen werden. Dabei wird die Suspension mit einem geeigneten Dispersionsmittel, Oberflächenaktive Substanzen (Tenside, siehe Abschnitt 3.2), versetzt. Die Tenside werden an der Partikeloberfläche adsorbiert und bilden aufgrund ihrer hydrophilen funktionellen Gruppen „Ärmchen“, die die Partikel vor

direkter Kollision schützen. Einen zusätzlichen Effekt haben auch die in der Suspension noch gelösten Tenside für die Stabilität, wenn diese in hoher Konzentration vorliegen. Entscheidende Eigenschaften der Tenside als Dispersionmittel sind dabei die kritische Micellkonzentration, Adsorptionsrate an der Partikeloberfläche und die Löslichkeit in Suspension (Abb. 11).

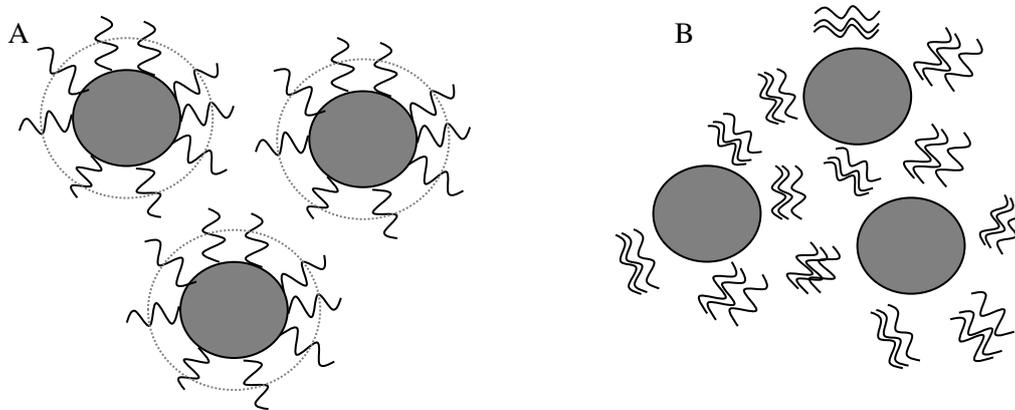


Abb. 11: Sterische Stabilisierung durch Tenside. (A) Ärmchenbildung der hydrophilen Gruppen stabilisiert die Partikel und (B) hohe Konzentration an Tensiden in Lösung verhindern Kollision.

2.2.4 Partikeleigenschaften

Für die Anwendung von Nanopartikeln als Arzneimittelträgersysteme müssen die verschiedenen physikalischen Eigenschaften, die die Partikel charakterisieren, bestimmt und optimiert werden.

Partikelgröße

Die aus Sicht der Mechanischen Verfahrenstechnik meist angewendeten Methoden zur Partikelgrößenbestimmung sind die Folgenden:

- Klassische Siebmethode ($>63\mu\text{m}$)
- Sedimentationsmethoden (Sedimentationspipetten, Röntgen-Sedimentometer)
- Sichtmethoden (Zentrifugalkraftsichter)
- Optische Partikelanalyse (Laserlichtbeugung und Streuung)

Für die Bioverfügbarkeit und die medizinische Nutzung ist die Partikelgröße zwischen 10nm bis 500nm ausschlaggebend. Die Partikelgrößenanalyse ist in diesem Bereich durch die Lichtstreuung (Photonenkorrelationsspektroskopie PCS) möglich. Die Bestimmung der Partikelgröße basiert dabei auf der Störung der Ausbreitung des Lichtes. Die verantwortlichen physikalischen Effekte sind die Streuung und Absorption. Die Störung wird vom Detektor registriert und in ein elektrisches Signal umgewandelt.

Lichtstreuung (Photonenkorrelationsspektroskopie PCS):

Physikalische Grundlage bildet die Brownsche Bewegung der Partikel im nm-Bereich.

$$\text{Rayleigh: } d \leq \frac{\lambda}{20} \quad (10)$$

$$\text{Rayleigh-Gans-Debye } d \leq \frac{\lambda}{2} \quad (10.1)$$

Mie-Theorie: Streuende Objekte bei denen die Abstrahlung untereinander und mit dem einfallenden Licht interagieren.

Laserbeugung (FRAUNHOFER- Theorie)

Grundlage bildet hier die klassische Beugung für Partikel im $1\mu\text{m}$ Bereich.

$$d > 5\lambda \quad (10.2)$$

Wechselwirkung zwischen Licht und Materie:

Licht ist eine elektromagnetische Welle. Das sich ändernde elektrische/magnetische Feld induziert in der Materie einen schwingenden Dipol (schwingende Elektronen). Die Folge daraus ist ein sich änderndes elektrisches/magnetisches Feld, die sogenannte Streustrahlung.

Die Brownschen Partikelbewegung bewirkt eine Verschiebung der Frequenz (Doppler-Effekt), welche durch hohen Aufwand gemessen werden kann. Einfacher lässt sich die zeitlichen Intensitätsfluktuationen der Streustrahlung messen. Dabei trifft der Laserstrahl auf eine Anzahl von Partikeln, die eine Streustrahlung erzeugen. Durch das ständige hinein und heraus diffundieren von kleinen und großen Partikel, wobei große Partikel langsamer diffundieren, entstehen Intensitätsfluktuationen.

$$I = I_0 f(d, \Theta, \lambda, n) \quad (10.3)$$

- d Partikeldurchmesser
- λ Wellenlänge Laserlicht
- n Brechungsindex
- Θ Streulichtwinkel

In kurzen definierten Zeitabständen ($t+\tau$) wird die Intensität des Streulichtes gemessen und diese mit der des vorhergehenden Zeitpunktes verglichen. So wird aus der Intensitätsfluktuation die Autokorrelationsfunktion $g(\tau)$ berechnet. Die Autokorrelationsfunktion steht in Beziehung zur Brownschen Bewegung und somit zum Diffusionskoeffizienten:

$$g(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{\int_{-T}^T I(t + \tau) dt}{\int_{-T}^T I(t) dt} = e^{-2DK^2\tau} \quad (11)$$

- K Betrag des Streulichtvektor
- D Diffusionskoeffizienten
- T absolute Temperatur
- τ Verzögerungszeit

Große Partikel bewegen sich langsamer und haben damit auch nur eine geringe Schwankung der Streulichtintensität. Deshalb hat die Korrelationsfunktion der großen Partikel einen langsamen Abfall wohin gegen die Korrelationsfunktion von kleinen Partikel einen schnellen Abfall zeigt (Abb. 12).

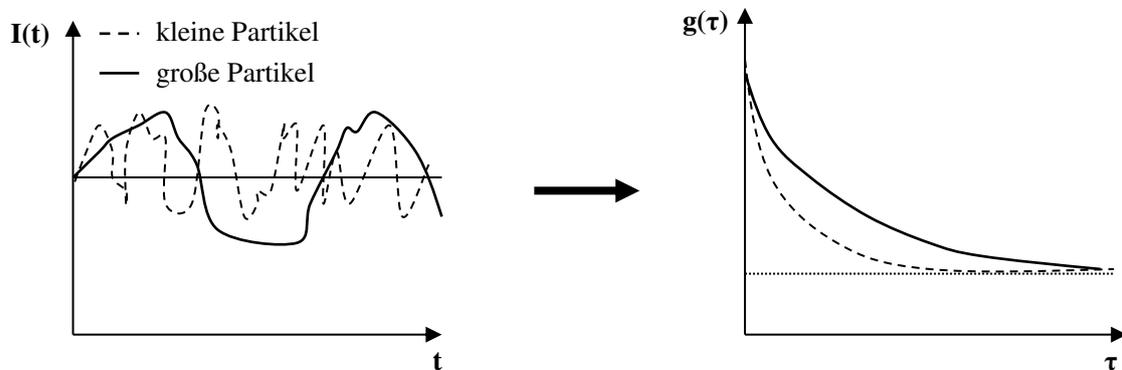


Abb. 12: Intensitätsfluktuationen und Korrelationsfunktion für große und kleine Partikel

Der Betrag des Streulichtvektors K setzt sich wie folgt zusammen:

$$K = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\Theta}{2}\right) \quad (11.1)$$

- Θ Streulichtwinkel
- λ Wellenlänge des Laserlichtes
- n Brechungsindex des Dispersionsmediums

Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung ist es dann möglich (unter Annahme kugelförmiger Partikel) den Partikeldurchmesser zu berechnen:

$$d = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (11.2)$$

- η dynamische Viskosität
- T absolute Temperatur
- k_B Boltzmann-Konstante

Bei einer Messung dient zur Auswertung der Autokorrelationsfunktion die Kumulantenanalyse:

$$\ln g(\tau) = a + b\tau + c\tau^2 \quad (11.3)$$

Als Ergebnis der Messung erhält man den mittleren hydrodynamischen Durchmesser d , basierend auf der Intensitätsverteilung des Streulichtsignals und den Polydispersitätsindex (PDI).

Der Polydispersitätsindex (PDI) ist eine dimensionslose Intensitätsverteilungsbreite und wird wie folgt definiert:

$$PDI = \frac{c}{b^2} \quad (11.4)$$

Bei idealen (monodispersen) Proben hat die Autokorrelationsfunktion einen linearen Verlauf und somit einen PDI von 0 da alle Messpunkte auf der Geraden liegen. Der PDI stellt somit eine wichtige Größe zur Beurteilung der Qualität des Messergebnisses und die Breite der Partikelgrößenverteilung dar.

PDI < 0,05	monodisperse Verteilung
0,1 < PDI < 0,2	enge Verteilung
0,3 < PDI < 0,5	breite Verteilung
PDI > 0,5	polydisperse Verteilung

Die Darstellung der Partikelgröße erfolgt mit Hilfe der Partikelgrößenverteilung $Q_r(d)$ (Verteilungssummenkurve). Die Partikelgrößenverteilung beschreibt laut DIN 66141 den Mengenanteil der Gesamtheit der Partikel, dessen Partikel kleiner als die vorgegebene Bezugspartikelgröße sind. Ebenso möglich ist auch eine Einteilung in Partikelgrößenklassen. Entscheidend ist die zugrunde liegende Mengengröße, beschrieben durch den Index r :

$r = 0$ Anzahl

$r = 1$ Länge

$r = 2$ Oberfläche

$r = 3$ Masse (Volumen)

Das bedeutet in der Darstellung $Q_0(d)$ wird für jede Partikelklasse die Anzahl der Partikel gezählt und bei $Q_3(d)$ die Masse.

Durch Differentiation der Partikelgrößenverteilung $Q_r(d^* < d)$ erhält man die Partikelgrößenverteilungsdichte $q_r(d)$:

$$q_r(d) = \frac{dQ_r(d)}{d(d)} \quad (12)$$

Zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilungsdichte $q_r(d)$ aus dem Mengenanteil für aufeinanderfolgende Klassengrenzen d_{i-1} und d_i :

$$q_r(d_{i-1} \dots d_i) = \frac{Q_r(d_i) - Q_r(d_{i-1})}{d_i - d_{i-1}} \quad (12.1)$$

Zur Umrechnung der unterschiedlichen Mengengrößen aus der gegebenen Mengengröße r und der gesuchten Mengengröße t dient folgende Formel:

$$q_t(d) = \frac{d^{t-r} q_r(d)}{\int_{d_{\min}}^{d_{\max}} d^{t-r} q_r(d) d(d)} \quad (12.2)$$

Für die Partikelgrößenverteilung $Q_t(d)$ gilt:

$$Q_t(d) = \frac{\int_{d_{\min}}^d d^{t-r} q_r(d) d(d)}{\int_{d_{\min}}^{d_{\max}} d^{t-r} q_r(d) d(d)} \approx \frac{\sum_{i=1}^n d_{m,r,i}^{t-r} \mu_{r,i}}{\sum_{i=1}^N d_{m,r,i}^{t-r} \mu_{r,i}} \quad (12.3)$$

$\mu_{r,i}$ Mengenanteil

Bei engen Klassen wird für den Partikeldurchmesser das arithmetische Mittel angenommen: $d_{m,i} = \frac{d_{i-1} + d_i}{2}$ (12.4)

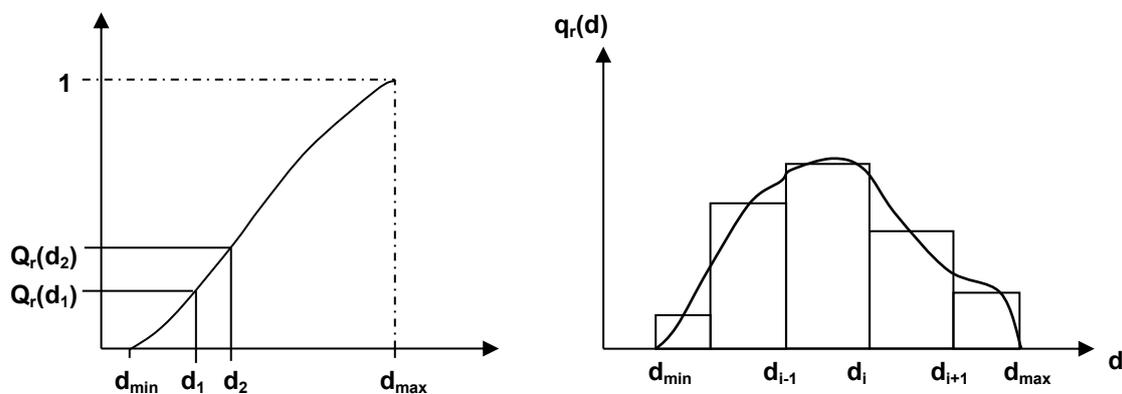


Abb.13 Partikelgrößenverteilung $Q_r(d)$ und Partikelgrößenverteilungsdichte $q_r(d)$

Der Zetasizer Nano ZS, der zur Messung der Partikelgröße genutzt wurde, bestimmt für jede Partikelgrößenklasse die Intensität (Z-Mittel). Für die Rayleigh-Theorie gilt: Intensität $\sim V^2$, Mengenart Masse/Volumen $r=0$. Aus diesem Grund wird ein weiterer Index $r = 6$ eingesetzt und die Partikelverteilungsfunktion mit $Q_6(d)$ und der mittlere Partikeldurchmesser mit $d_{m,6}$ bezeichnet.

Für die **Form- und Strukturanalyse** dienen optische Methoden wie die Rasterelektronen- (REM) und die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Die Elektronenmikroskopie beruht auf der Nutzung der Welleneigenschaften von Elektronen. Der durch eine glühende Haarnadelkathode erzeugte Elektrodenstrahl wird gebündelt und in Richtung Anode beschleunigt. Durch das Objekt/Probe werden die Elektronen gestreut oder adsorbiert, was von einem Detektor registriert wird. Die Elektronen sind durch die De-Brogie-Wellenlänge gekennzeichnet $\lambda = \frac{h}{p}$. Mit Hilfe der Beschleunigungsspannung der Elektronenkanone kann dann die Wellenlänge der Elektronen ermittelt werden. Das hohe Auflösungsvermögen und die Objektschärfe sind die Folge der sehr kleinen Wellenlänge.

Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird der Elektrodenstrahl über das massive Objekt gerastert und die zurück gestreuten Elektroden bilden den Intensitätswert des Bild-

punktes dieser Position. Die Transmissionsmikroskopie unterscheidet sich nur durch den geringen Streuwinkel, der detektierbar ist, somit muss die Probe sehr dünn sein. Durch Nutzung von Elektronen anstatt Licht, was aufgrund der Wellenlänge das Auflösungsvermögen limitiert, können auch sehr kleine Objekte im Nanometerbereich betrachtet werden.

Bestimmung der spezifischen Oberfläche

Nanopartikel zeichnen sich durch eine große spezifische Oberfläche aus, welche durch Gasadsorptionmethoden bestimmt wird. Zur Analyse dienen dabei die Oberflächenanalyse mit Hilfe der Brunauer-Emmett-Teller (BET) Adsorptionsgleichung und die Porengrößen- & Volumenanalyse nach Barrett-Joyner-Halenda (BJH). Bei der BET-Methode bestimmt man die notwendige Menge an verbrauchten Adsorbat zur vollständigen Bedeckung der äußeren Oberfläche mit einer Adsorbat-Monoschicht (Messung eines Punktes der Adsorptionsisotherme). Als Adsorbat wird hierbei meist Stickstoff und sehr selten Krypton eingesetzt.

Die beladene Feststoffoberfläche A_s lässt sich unter Annahme einer kompletten Monoschichtbelegung wie folgt berechnen:

$$A_s = A_{mg} N_A V_{gm} / V_{Ml} \quad (13)$$

A_{mg}	Platzbedarf eines Adsorbatmoleküls
N_A	Avogadro-Zahl
V_{Ml}	Molvolumen des kondensierten Adsorbat
V_{gm}	Volumen der monomolekularen Schicht

$$A_{s,m} = \frac{c}{m} \Delta p \quad (13.1)$$

$A_{s,m}$	spezifische Oberfläche
c	Faktor
m	Masse
Δp	Druckdifferenz

Stabilitätsaussagen mittels Zetapotential

Ein charakteristisches Maß für die Stabilität von Nanopartikeln in Suspension ist das Zetapotential. Es ist dabei stark abhängig vom pH-Wert und der Ionenmenge der Suspension. Nähert sich das Zetapotential gen null überwiegen die van-der-Waals-Anziehungskräfte zwischen den Partikeln und es entstehen Agglomerate. Von einer stabilen Dispersion kann bei einem Zetapotential von ± 30 mV ausgegangen werden. Das Zetapotential wird durch den pH-Wert der wässrigen Phase beeinflusst. Der Zusammenhang von pH-Wert und Zetapotential ist in Abb. 14 dargestellt (Nullladungspunkt = Punkt mit der höchsten Instabilität, Stoffsystemabhängig)

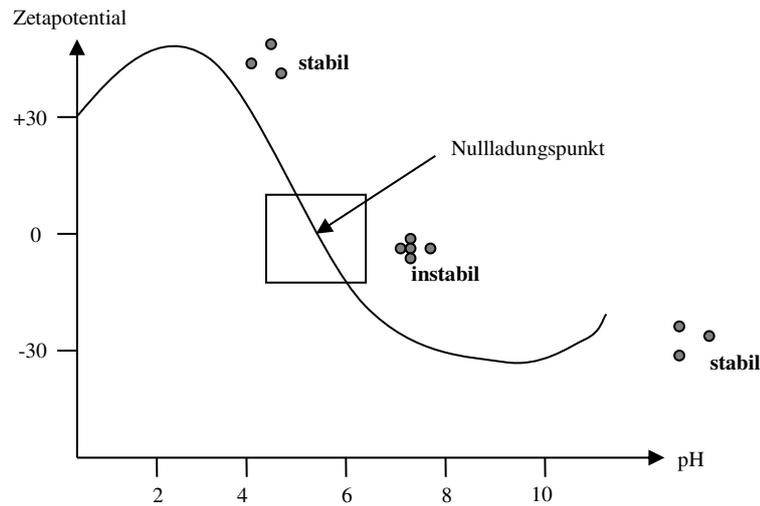


Abb. 14: Zusammenhang zwischen pH-Wert und Zetapotential (stoffsystemabhängig)

Die Messung des Zetapotentials wird mittels Laser-Doppler-Elektrophorese durchgeführt. Die Ionen der diffusen Schicht (Gouy-Chapmann-Schicht) werden durch das Anlegen eines elektrischen Stromes an der Scherschicht durch die Wirkung viskoser Reibungskräfte abgeschert. Die Nanopartikel sind nun nicht mehr neutral und werden zur Elektrode hin beschleunigt. Wenn die Reibungskraft F_R gleich der Kraft des elektrischen Feldes F_E ist, bewegen sich die Nanopartikel mit konstanter Geschwindigkeit v .

$$F_R = 6\pi r \eta v \text{ (Stokes)} \quad (14)$$

$$F_R = F_E \quad (14.1)$$

$$F_E = qE \quad (14.2)$$

Smoluchowski setzt die Ladung q mit dem Potential in Beziehung. Das Zetapotential ist damit die Differenz des Potentials am Partikel minus des Potentials unendlich weit vom Partikel entfernt. Durch die Kenntnis der Parameter der elektrischen Feldstärke E und der dynamische Viskosität kann dann mit Hilfe der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung das Zetapotential ζ berechnet werden.

$$\zeta = \frac{v}{\eta \epsilon E} \quad (15)$$

η dynamische Viskosität

ϵ Dielektrizitätskonstante $\epsilon = \epsilon_r \times \epsilon_0$

E elektrische Feldstärke

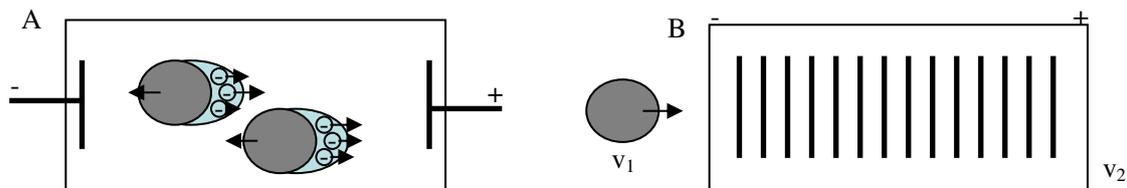


Abb. 15: Laser-Doppler-Elektrophorese. Die Elektronen der diffusen Schicht werden im elektrischen Feld abgeschert und zur Elektrode beschleunigt (A). Die Partikelgeschwindigkeit wird mittels Doppler-Effekt gemessen (B).

Diese Partikelgeschwindigkeit wird mittels Doppler-Effekt gemessen. Dabei wird mittels Laserstrahl durch einen Strahlteiler ein Interferenzstreifenmuster (Hell-Dunkel-Strichmuster; Streifenabstand Δx) erzeugt. Passieren die Nanopartikel dieses Interferenzstreifenmuster erzeugen sie ein Streulichtsignal, welches von einem Photodetektor gemessen wird. Die Frequenz f des Streulichtes ist proportional zur Partikelgeschwindigkeit v (Mobilität).

$$f = v \frac{2 \sin \varphi}{\lambda} \quad (15.1)$$

$$\Delta x = \frac{\lambda}{2 \sin \varphi} \quad (15.2)$$

φ Winkel
 λ Wellenlänge

2.3 PBCA-Nanopartikel als Arzneimittelträger

Möchte man Nanopartikel als Trägersysteme im biologischen System nutzen, werden viele verschiedene Ansprüche an die Partikel und das Material gestellt.

Die pharmakologische Wirkung von Arzneimitteln kommt durch sehr komplexe Vorgänge im Organismus zustande, welche sich durch eine 3-Phasen-Reaktionskette beschreiben lassen. Die pharmazeutische Phase, bestimmt durch die galenischen Eigenschaften wie Auflösung des Wirkstoffes, die pharmakokinetische Phase, bestimmt durch die Verteilung und die pharmakodynamische Phase, bestimmt durch die Wechselwirkungen mit dem Organismus. Die Wirksamkeit des Arzneimittels wird daher durch die Konzentration am Wirkungsort, die Dauer der Wirkung und die biologische Abbaubarkeit bestimmt.

Nanopartikel im Einsatz als Trägersubstanzen sollten daher folgende Merkmale aufweisen (Lockmann *et al.*, 2002):

- nicht toxisch und biologisch abbaubar
- schnell zum Wirkungsort gelangen ohne störende Wechselwirkungen zu erzeugen

- den Wirkstoff vor Einflüssen wie Licht oder Sauerstoff schützen
- körpereigene Abwehr umgehen
- Wirkstoff je nach Anwendung langsam oder schnell freisetzen
- unkomplizierte Herstellung und Lagerung
- optimale Bindung/ Einschluss des Wirkstoffs

Um diese Punkte zu erfüllen, kommt es auf die richtige galenische Formulierung an. Zahlreiche Forschergruppen arbeiten in den letzten Jahren mit verschiedenen Carriersystemen. Die häufigsten sind Liposomen, feste Lipidnanopartikel, Polyalkylcyanoacrylat-Nanopartikel (PACA), Polymilchsäure-Nanopartikel, Albumin-Nanopartikel, Polyethylenglycol-Nanopartikel und die in dieser Arbeit verwendeten Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel. [Schöler, 2001]

Polybutylcyanoacrylat Nanopartikel wurden schon von einigen Wissenschaftlern erforscht. Sie zeichnen sich durch die einfache Herstellung, der Nichttoxizität der Abbauprodukte und der Beladbarkeit mit Substanzen aus. Das Monomer BCA wird auf Grund seiner hervorragenden Hafteigenschaften und der Bioverträglichkeit als Gewebekleber eingesetzt (Handelsname Indermil[®] Henkel). PBCA-NP sind stabil und eine spontane Polymerisation ist so gut wie ausgeschlossen. Die verwendeten PBCA-Nanopartikel wurden durch Miniemulsionspolymerisation hergestellt.

2.3.1 Toxizität

Für die Anwendung von Nanopartikeln als Arzneimittelträgersysteme müssen sie gut verträglich sein, ohne toxische Effekte hervorzurufen.

Man unterscheidet hierbei zwischen akuter und chronischer Toxizität. Die akute Toxizität kann gut mit Hilfe von *in vitro* Modellen bestimmt werden, wobei jedoch indirekte Effekte, wie Zytotoxizität durch Abbauprodukte, schwer zu untersuchen sind.

Zu den verbreitetsten *in vitro* Testsystemen gehören Zellstress- und Zellvitalitäts-Tests. Diese Tests basieren auf dem photometrisch bestimmten Farbumschlag bei proliferierenden Zellen nach Inkubation mit der zu untersuchenden Substanz und liefern so indirekt ein Maß für die Toxizität der Testsubstanzen.

Die chronische Toxizität wird im Tiermodell bestimmt. Hierfür werden die Tiere nach wiederholter Gabe über einen längeren Zeitraum beobachtet und klinisch untersucht.

Je nach Therapieziel der Arzneiträgersysteme ist eine Anreicherung in bestimmten Zellen oder Organen wünschenswert und in anderen zu vermeiden. Bei Tumoren der Leber z.B. ist eine Anreicherung in der Leber gewollt aber in anderen Organen unerwünscht.

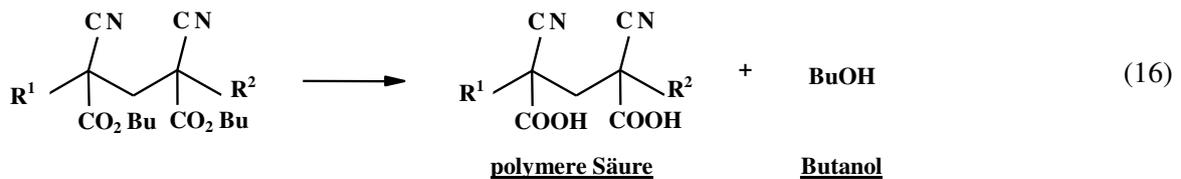
Zytotoxische Wirkungen von Trägersystemen außen an der Zellmembran oder im Inneren der Zellen können auch aufgrund der eingesetzten Oberflächentenside oder Abbauprodukte auftreten.

Einige Trägersysteme sind schon gut auf diese toxischen Effekte untersucht. So wurde gezeigt, dass Polymethylcyanoacrylat-Nanopartikel die Zellmembran perforieren, die Abbauprodukte von PACA-Nanopartikel die Membranfunktion beeinträchtigen aber das langkettige Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel (PBCA-NP) im Gegensatz zum Polymethylcyanoacrylat-Nanopartikel nicht zur Perforation der Zellmembran führt. [Schöler, 2001]

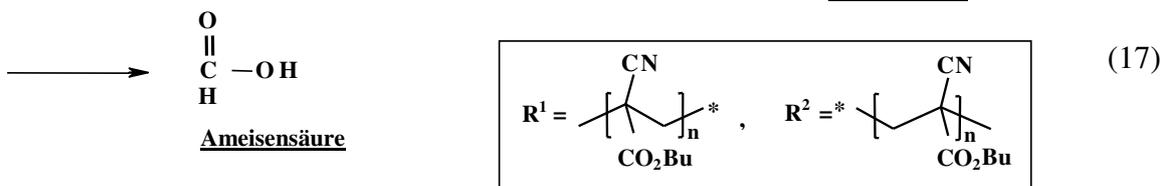
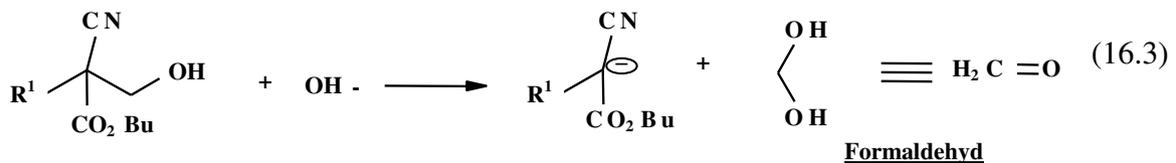
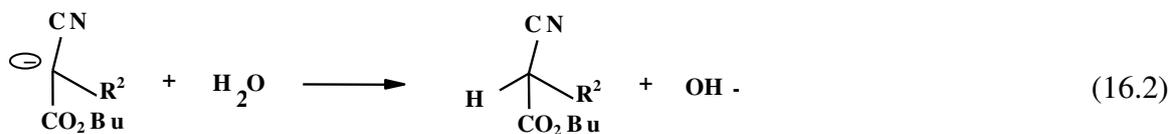
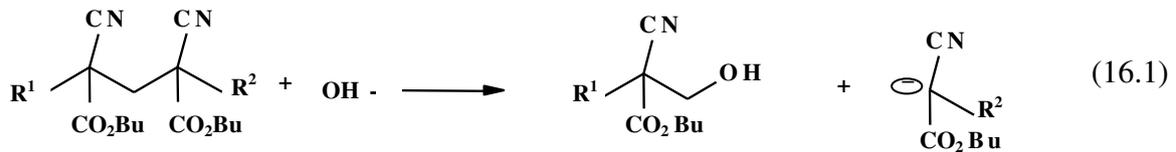
Die Toxizität von PBCA-NP wird als gering eingeschätzt und die Partikel für den Einsatz am Menschen als geeignet eingestuft (Kante *et al.*, 1982). Das Monomer ist schon seit Jahrzehnten aufgrund der hervorragenden Hafteigenschaften als Gewebekleber im Gebrauch. Die Monomerbausteine sind in der Lage feste Bindungen mit polaren Substanzen und auch mit Gewebe einzugehen. Auch wurde eine mögliche Zellschädigung durch die Partikel bereits in verschiedenen Zellkulturen getestet, darunter Fibroblasten (Lherm *et al.*, 1989), Hepatozyten und Makrophagen. Eine Schädigung trat erst nach sehr hohen Dosen auf (Gipps *et al.*, 1987; Kante *et al.*, 1982; Kreuter, 1983). Die PBCA-NP sind auch schon in der Klinik bei der Behandlung von Lebertumoren eingesetzt worden (Zhou *et al.*, 2009). Die akute Toxizität (LD_{50}) wird bei Mäusen mit 230mg/kg KG für leere PBCA-NP angegeben (Kante *et al.*, 1982)

Der Abbau von PBCA-NP kann nach zwei chemischen Reaktionen ablaufen, dem Hauptmetabolisierungsweg, d.h. die Esterspaltung in Buttersäure und Polymersäure oder der eher untergeordneten Retro-Knoevanagel-Reaktion (Lenaerts *et al.*, 1984; Ve-zin and Florence, 1980; Stein und Hamacher, 1992), bei der Formaldehyd entsteht. Die Abbauprodukte sind meist nicht toxische, natürliche Verbindungen.

1. Esterspaltung



2. Retro-Knoevenagel-Reaktion



Gleichzeitig gibt es aber auch Bedenken bei der Toxizität an der Blut-Hirn-Schranke. Oliver *et al.*, 1999 beschreibt eine Zerstörung der Tight Junctions nach Verabreichung von 10µg/ml Polysorbat80-beschichteten PBCA-NP.

2.3.2 Arzneimittel-Transport mittels PBCA-NP

Einige Forschergruppen konnten bereits zeigen, dass PBCA-Nanopartikel die Blut-Hirn-Schranke überwinden und Pharmaka ins Gehirn bringen.

Schröder *et al.*, 1998 zeigte mittels Verhaltenstest, dass PBCA-NP die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Die PBCA-NP wurden dabei mittels anionischer Emulsionspolymerisation mit Dextran 70.000 als Stabilisator und Tween80 als Oberflächentensid hergestellt. Die Polymerisationszeit betrug 4 Stunden und der Wirkstoff genau wie Tween80 wurde im Anschluss adsorbiert. Im Verhaltenstest zeigten die Mäuse, denen der Wirkstoff gebunden an die PBCA-NP mit Tween80 verabreicht wurde, eine erhöhte

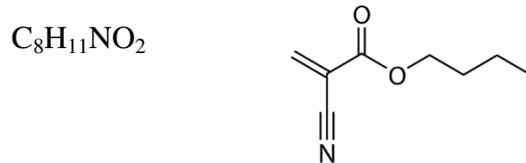
Schmerztoleranz. Die Erhöhung der Schmerztoleranzgrenze beweist, dass die PBCA-NP die Blut-Hirn-Schranke überwinden.

Bei den Untersuchungen wurden jedoch noch nicht explizit die Eigenschaften der Nanopartikel betrachtet, die einen Einfluss auf die Überwindung der BHS und Verteilung der Partikel im Gewebe haben. Deshalb wurde in diesem Projekt bei der Produktion der PBCA-Nanopartikel die wichtigsten Eigenschaften der Partikel in Hinblick auf Blut-Hirn-Schrankengängigkeit systematisch variiert. Dazu gehören die Partikelgröße, Zeta-potential und die Oberflächenmodifikation durch Tensid.

3 Versuchsmaterialien

3.1 Polybutylcyanoacrylat

Butylcyanoacrylat (BCA) gehört zu den Acryl-Estern und ist eine farblose Flüssigkeit. Es zeichnet sich durch seine Fähigkeit in Anwesenheit von Blut und Gewebeflüssigkeit zu polymerisieren aus. Deshalb wird es auch bevorzugt in der Medizin als Gewebekleber für Wunden eingesetzt. Die hohe Zugfestigkeit und die bakteriostatischen Eigenschaften wirken sich dabei zusätzlich positiv aus.



Durch Polymerisation von BCA entsteht Polybutylcyanoacrylat und bei der Herstellung von Nanopartikeln dient es als Grundbaustein.

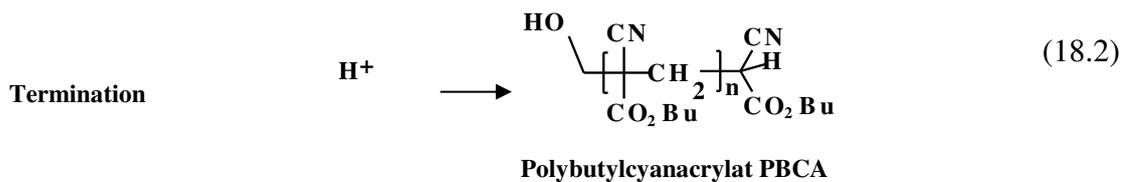
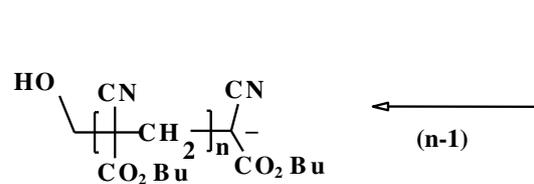
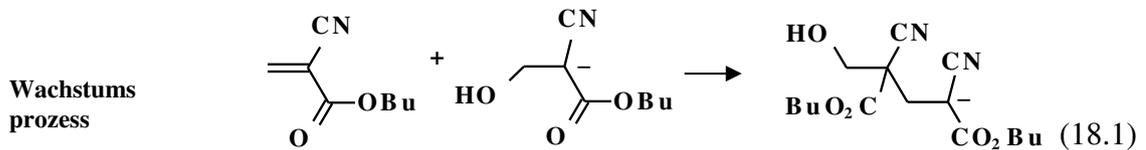
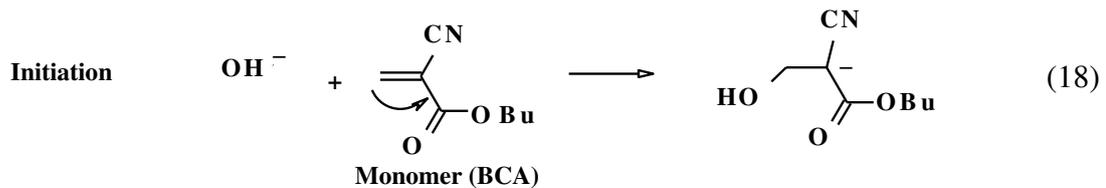


Abb. 16: Polymerisationsprozess (in Anlehnung an Nicolas and Couvreur, 2009)

3.2 Tenside

Tenside sind Verbindungen, die aus einer hydrophoben langkettigen Kohlenwasserstoffkette und einer hydrophilen Kopfgruppe bestehen. Sie können die Grenzflächenspannung zweier Phasen herabsetzen und so die Bildung von Dispersionen unterstützen. So ermöglichen sie eine Vermischung zweier vorher nicht mischbarer Flüssigkeiten wie Öl und Wasser (Abb. 17).

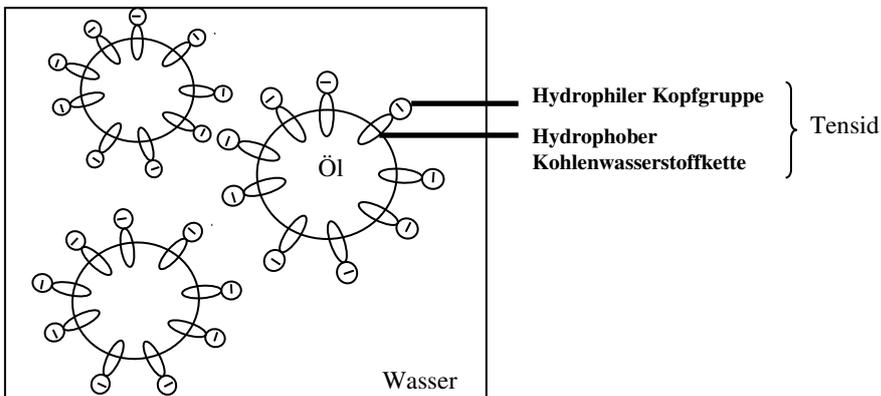


Abb. 17: O/W Emulsion. Durch Zugabe von Tenside werden Öltröpfchen eingeschlossen.

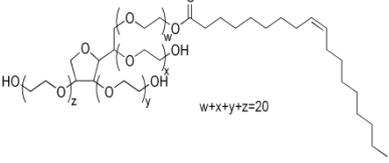
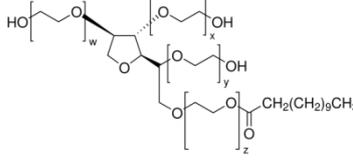
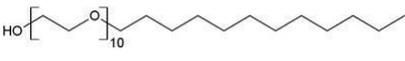
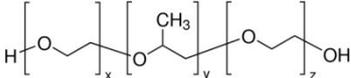
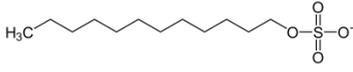
Die Tenside werden aufgrund ihrer Ladungsstruktur der Kopfgruppe (funktionelle Gruppe) in nichtionische, anionische, amphotere (zwitterionisch) und kationische Tenside eingeteilt. Nichtionische Tenside werden bevorzugt als Dispersionmittel in der Industrie eingesetzt. Deshalb wurde in dieser Arbeit auch vorrangig mit nichtionischen Tensiden und einem anionischen Tensid gearbeitet.

Tabelle 02: Verwendete Tenside

Tenside		
nicht ionisch	anionisch (-)	kationisch (+)
Tween 20 & 80 Lutrol F68 Brij 35 Lutensol AT80	Natriumdodecylsulfat SDS	Cetyltrimethylammoniumbromid CTAB

Die Tenside wurden in der wässrigen Phase der Emulsion gelöst und bilden eine Schicht an der Oberfläche der PBCA-NP. Diese Oberflächenmodulation dient der Stabilität der Nanopartikel ebenso der molekularbiologischen Modifikation in Hinblick auf die Blut-Hirn-Schrankengängigkeit.

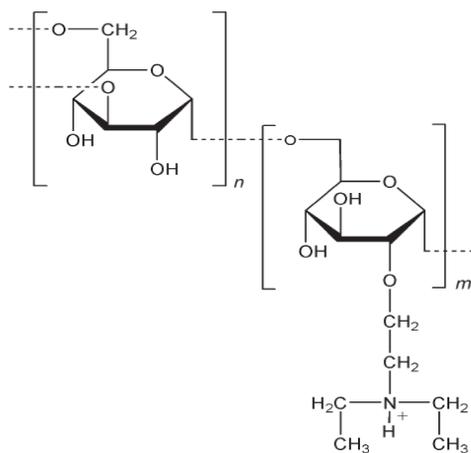
Tabelle 03: Verwendete Tenside Herstellung der PBCA-Nanopartikel

<p><i>Tween80 (Polysorbat80)</i> HLB 15, CMC $1,2 \cdot 10^{-5}$ mol/l</p> 	<p><i>Lutensol</i> HLB 13, keine weiteren Daten vorhanden</p>	<p><i>Tween20 (Polysorbat20)</i> HLB 16,7, CMC 0,06 mM</p> 
<p><i>Brij35</i> HLB 16,9, CMC 0,09 mM</p> 	<p><i>Lutrol F68</i> HLB 29, CMC $1,14 \cdot 10^{-3}$ mol/L</p> 	<p><i>Natrium dodecylsulfate SDS</i> HLB 40, CMC $8,14 \cdot 10^{-3}$ mol/l</p> 

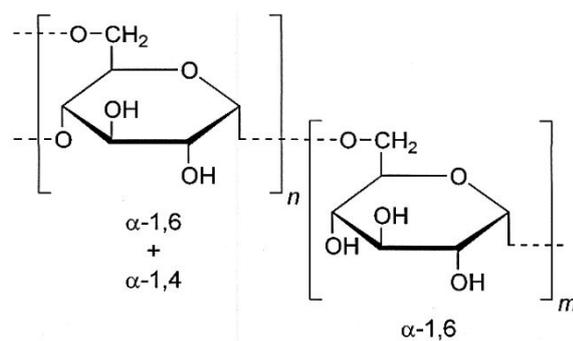
HLB (Hydrophil-Lipophil-Balance)² = Masseverhältnis zwischen polaren und unpolaren Teil
 CMC (kritischen Mizellbildungskonzentration) = Konzentration des Tensids, bei der sich Mizelle bilden (25°C H₂O)

3.3 Farb- und Zusatzstoffe

In dieser Arbeit wurden DEAEDextran und Dextran 70.000 verwendet. Dextrane sind hochmolekulare Biopolysaccharide und wasserlöslich. Die Wasserlöslichkeit ist dabei aber abhängig von der Molekularmasse, die oft namensgebend ist. Dextrane werden in der Medizin als Blutplasmaersatz verwendet. In dieser Arbeit dienen sie zur Stabilisierung und Modifikation der Nanopartikel.

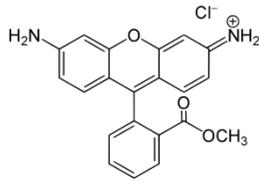


Diethylaminoethyl (DEAE)dextran

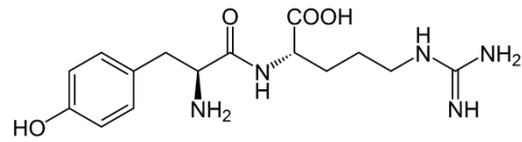


Dextran 70.000

² Hoher HLB bedeutet gute Benetzung hydrophiler Oberflächen, niedriger HLB Fettlöser



Rhodamin 123



Kyotorphin

Rhodamin123 ist ein Derivat von Xanthen und wird oft als Marker zur Untersuchung von Transportvorgängen eingesetzt. Das Absorptionsmaximum liegt bei 507nm und Emissionsmaximum bei 529nm. Rhodamin wurde in diesen Versuchen als Fluoreszenzfarbstoff zur Visualisierung der PBCA-NP-Verteilung mittels ICON genutzt.

Kyotorphin ist ein neurophysiologisches Opioid Dipeptid mit analgetischer Wirkung. Es kann die BHS nicht von selbst überwinden und ist auch unter dem Namen L-Tyrosyl-L-Argenin bekannt. In dieser Arbeit diente es als Arzneistoff zum Nachweis des Potentials von PBCA-NP als Arzneiträgersystem (Anbindung, Wirksamkeit).

4 Methoden

4.1 Herstellung der Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel (PBCA-NP)

Es gibt verschiedene Herstellungsprozesse für die PBCA-Nanopartikel wie die Grenzflächenpolymerisation, die Nanopräzipitation, die anionische und die radikalische Emulsionspolymerisation und die Miniemulsionspolymerisation. Bei der Nanopräzipitation wird das Polymer in einem flüchtigen, organischen Lösungsmittel wie Aceton gelöst und durch die Zugabe zu einer wässrigen, neutralen Tensidlösung in Form von Nanopartikeln ausgefällt. Das leicht flüchtige Aceton kann im Nachhinein entfernt werden. Bei der Grenzflächenpolymerisation wird BCA in einer Mischung aus Öl und Ethanol gelöst und in eine wässrige, saure Tensidlösung getropft. Die Hydroxid-Ionen initiieren dann die Polymerisation des Monomers an der Grenzfläche zwischen Öl und Wasser und es entstehen Nanokapseln. Die Emulsionspolymerisation stellt den mit am häufigsten verwendeten Herstellungsprozess für PBCA-Nanopartikel dar. Durch die Zugabe des Monomers zum wässrigen Polymerisationsmedium bei niedrigem pH-Wert (pH 1 bis 3) und der Anwesenheit von Stabilisatoren (z.B. Dextran 70.000) kommt es zur Ausbildung von Monomertröpfchen. Die Polymerisation wird bei der anionischen Emulsionspolymerisation durch die Anlagerung von Hydroxidionen an die stark aktive Doppelbindung des Butylcyanoacrylats gestartet. Dann kommt es zur linearen Kettenverlängerung durch die Anlagerung von weiteren Monomeren bis der Wachstumsprozess durch die Addition eines Protons terminiert wird. Die erste Anwendung der anionischen Emulsionspolymerisation zur Herstellung von partikulären Systemen aus Polyalkylcyanoacrylat beschreibt Couvreur (Couvreur *et al.*, 1979-1982) in seinen Arbeiten. Auch die Arbeitsgruppe um Prof. Kreuter führte umfangreiche Studien mit PBCA-Nanopartikeln, die nach der anionischen Emulsionspolymerisation im sauren Medium hergestellt wurden, durch (Kreuter *et al.*, 1983-2004; Douglas *et al.*, 1984-1985). Ein saurer pH-Wert ist dabei essentiell für eine kontrollierte Polymerisation und somit auch für den Partikeldurchmesser. Die radikalische Emulsionspolymerisation unterscheidet sich nur durch die Initiierung der Polymerisation, in diesem Fall geschieht dies durch Anlagerung eines Radikals an die aktive Doppelbindung des BCAs.

Da die Partikelgrößenverteilung bei der anionischen Emulsionspolymerisation häufig recht breit ist, es nur eine geringe Massenkonzentration von PBCA und ein schlechtes Massenverhältnis Tensid/Monomer gibt, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Partikel nach dem Miniemulsionspolymerisations-Prozess hergestellt. Alle getesteten PBCA-NP wurden von Frau Sarah Kockentiedt am Lehrstuhl für Mechanische Verfahrenstechnik hergestellt und auch vermessen. Der Lehrstuhl für Mechanische Verfahrenstechnik verfügt über eine große Expertise bei der Produktion und Charakterisierung von verschiedenen partikulären Systemen (Petrova *et al.*, 2008; Pieper *et al.*, 2011; Namdeo *et al.*, 2009; Hintz *et al.*, 2008-2012; Günther *et al.*, 2006), was die Optimierung der

Herstellung der verwendeten PBCA-Nanopartikel entscheidend vorangebracht hat und mir die Möglichkeit gab gezielt modifizierte Partikel herstellen zu lassen.

4.1.1 Miniemulsionspolymerisation

Miniemulsionspolymerisation (siehe Abbildung 18) ist ein Prozess, bei der eine Ölphase mit Monomer und eine Wasserphase mit Emulgator durch eine hohe Scherkraft eine Miniemulsion bilden. Die Miniemulsion besteht aus kleinen, stabilen, eng verteilten (monodispersen) Tröpfchen welche durch Ultraschall- oder Hochdruckhomogenisierung erzeugt werden. Dieser Prozess wurde in der Literatur u.a. von Prof. Dr. Landfester detailliert beschrieben (Landfester, 2000/2009; Weiss *et al.*, 2007)

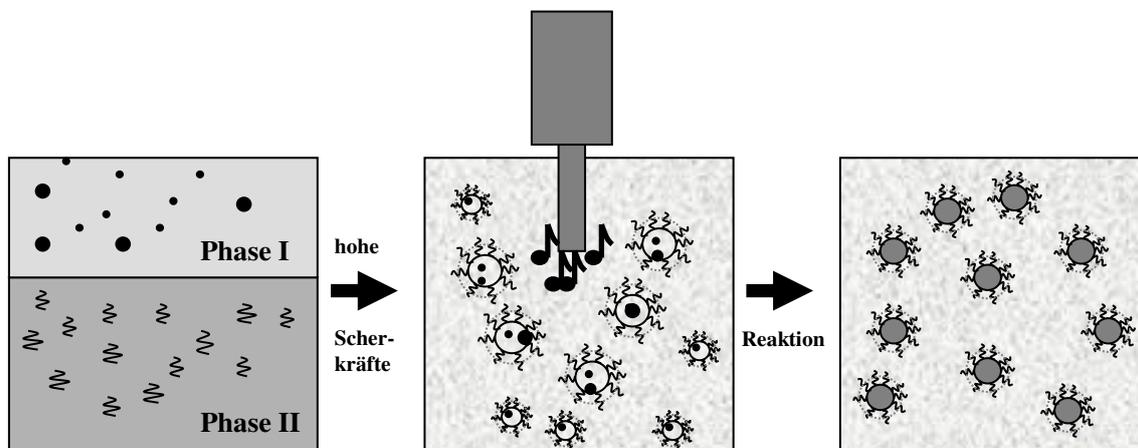


Abb. 18: Schematische Darstellung der Miniemulsionspolymerisation (modifiziert nach Landfester, 2009)

Zwei nicht mischbare Phasen werden durch hohe Scherkräfte zur Bildung von Nanotröpfchen gezwungen. Die Polymerisation innerhalb der Tröpfchen zu fertigen Nanopartikeln erfolgt in einer nachfolgenden Reaktion. Dies macht auch den Vorteil zu anderen Polymerisationsprozessen aus. Die Partikel bleiben ab der Tröpfchenphase unverändert in ihrer Größe. Die Größe der entstehenden Nanopartikel ist abhängig vom Mischungsverhältnis der Komponenten, speziell von der Menge des eingesetzten Tensids und den Scherkräften (Landfester *et al.*, 1999-2001). Mit zunehmendem Energieeintrag nimmt die Teilchengröße ab. Aber es existiert für jede spezifische Zusammensetzung ein Grenzwert für den Energieeintrag. Nachdem die minimale Tröpfchengröße zwischen den beiden Phasen ausgebildet ist, führt zusätzlich eingebrachte Energie zu einer Reduzierung der Polydispersität.

Zur Herstellung monodisperser Emulsionen müssen die Tröpfchen gegen mögliche Koaleszenz stabilisiert werden. Dies wird erreicht durch die Zugabe eines geeigneten Tensids. Der Einsatz von nichtionischen Tensiden bietet verschiedene Vorteile, wie der guten Mischbarkeit mit anderen Tensiden, Veränderung der Oberflächenaktivität der

Partikel und der Stabilisierung von Dispersionen. Deshalb werden sie auch am häufigsten eingesetzt (Baudisch, 2001). In der Literatur wird aber auch oft beschrieben, dass zur Stabilisierung das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) eingesetzt wird. SDS führt bei Polymerpartikeln zur betragsmäßig hohen Zetapotentialwerten. Aufgrund seiner denaturierenden Eigenschaften und der daraus resultierenden möglichen Toxizität ist der Einsatz jedoch kritisch zu sehen.

4.1.2 Wirkstoffbindung

Je nach Wirkstoff und Zielausrichtung ergeben sich zwei Möglichkeiten für die Bindung des Arzneimittels an die Nanopartikel, die jeweils Vor- und Nachteile haben: Adsorption oder Inkorporation. Bei der Adsorption wird der Wirkstoff erst nach der Polymerisation an die fertigen Nanopartikel gebunden und ist somit leichter freisetzbar, beeinflusst aber die Oberflächeneigenschaften und somit möglicherweise den Transport. Bei der Inkorporation wird der Wirkstoff schon bei der Herstellung der Nanopartikel in der wässrigen Phase gelöst und somit im Nanopartikel verkapselt. In diesem Fall ist der Wirkstoff vor äußeren Einflüssen geschützt, kann gezielt am Wirkungsort vom Partikel freigesetzt werden und verändert die Partikeloberflächenbeschaffenheit nicht.

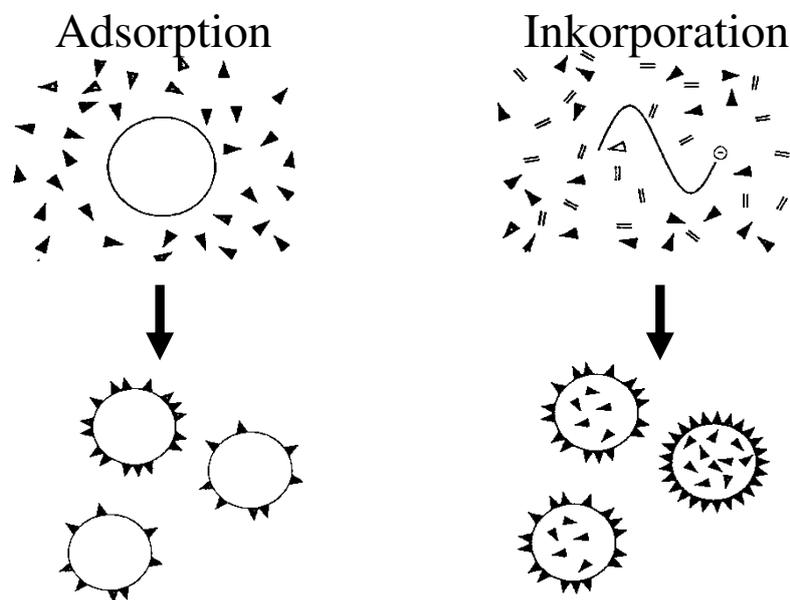


Abb. 19: Schema Adsorption vs. Inkorporation

4.2 Charakterisierung der Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel

Die entscheidenden Eigenschaften der NP sind die Partikelgröße und das Zetapotential. Darüber hinaus sind der Polydispersitätsindex und der Feststoffgehalt entscheidend für die Anwendung als Arzneiträger für die Pharmaindustrie.

4.2.1 Partikelgröße

Mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) oder auch Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) kann die Partikelgröße sehr kleiner Partikel bestimmt werden (Müller & Schuhmann, 1996). Bei der DLS wird die Partikelgeschwindigkeit resultierend aus der Brownschen Molekularbewegung mit Hilfe der Laserlichtstreuung zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Der Zusammenstoß der Partikel mit den Molekülen des Dispersionsmediums bewirkt die Bewegung. Bei Übertragung der gleichen Energie werden kleine Partikel im Gegensatz zu großen beschleunigt. Die Geschwindigkeit wird mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung beschrieben und damit indirekt die Partikelgröße bestimmt (Malvern Instruments. Dynamic light scattering). Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe des Zetasizer Nano ZS der Firma Malvern Instruments. Dabei dient ein Laser als intensitätsstarke Lichtquelle und erzeugt einen Strahl der auf die Probe fokussiert wird. Die durch die Bewegung der Teilchen entstehende Lichtstreuung wird durch einen Photomultiplier bei einem Winkel von 173° detektiert, an den Korrelator gesendet und durch einen angeschlossenen Computer analysiert.

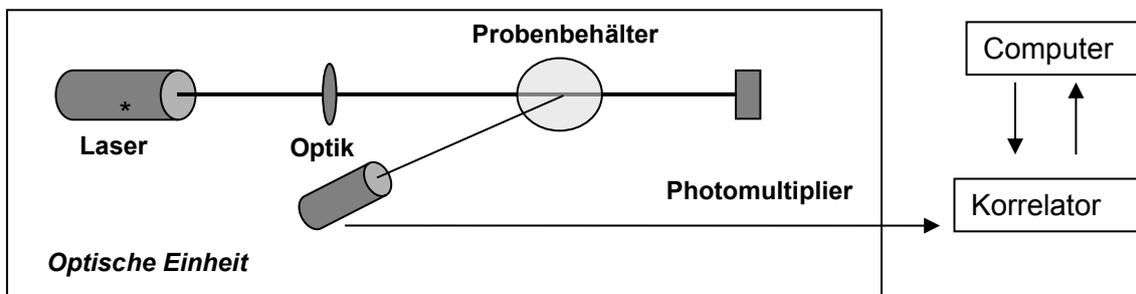


Abb. 20: Partikelgrößenmessung mittels PCS

4.2.2 Zetapotential

Das Zetapotential, welches durch das Abscheren von Ionen der diffusen Schicht, die die Partikel umgibt, entsteht, ist eine entscheidende Größe auch zur Bestimmung der elektrostatischen Stabilität (theoretische Grundlagen Müller, 1996; Lagaly *et al.*, 1997). Die Höhe des Zetapotentials ist ein Maß für die Abstoßungskräfte zwischen benachbarten Teilchen gleicher Ladung. Ist das Potential gering überwiegen die Anziehungskräfte und es kommt zu Agglomeration und die Dispersion kann ausflocken.

Das Zetapotential ist proportional zur Geschwindigkeit der Partikelbewegung in einem elektrischen Feld und wird durch das Anlegen einer elektrischen Spannung in der Dispersion mit Hilfe eines Lasers gemessen (Malvern Instruments. Zeta potential). Dabei erzeugt der Laser ein bewegtes Hell-Dunkel-Strichgitter, welches die Partikel bei ihrer Bewegung in Richtung der Elektrode durchlaufen und einen Lichtblitz erzeugen, der vom Detektor gemessen wird. Aus der Frequenz des Lichtblitzes werden die Geschwindigkeit des Partikels und daraus das Zetapotential mit Hilfe der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung errechnet.

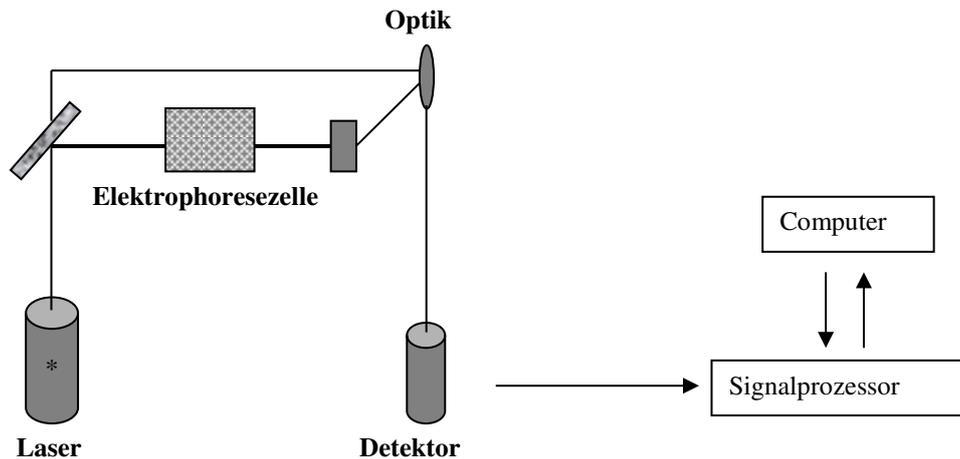


Abb. 21: Zetapotentialmessung (Malvern Instruments. Zeta potential)

4.2.3 Polydispersitätsindex

Der Polydispersitätsindex (PDI) ist ein dimensionsloses Maß für die Breite der Partikelgrößenverteilung. Ein PDI von 0 entspricht dabei einem streng monodispersen System, welches in der Praxis nicht existiert. Zwischen 0,1-0,2 spricht man von monodispersen Systemen mit enger Verteilung, zw. 0,3-0,5 noch monodispers mit breiter Verteilung und ab 0,5 von polydispersen Systemen. Der PDI-Wert wird automatisch bei der Größenbestimmung durch den Zetasizer bestimmt. Die verwendeten Nanopartikel hatten einen PDI zwischen 0,18 bis 0,4.

4.2.4 Formanalyse mittels REM

Für die Formanalyse wurde die Nanopartikelsuspensionen auf den Probetellern dünn aufgetragen und über Nacht getrocknet. Anschließend wurden die Proben mit Gold überzogen und mit dem REM bei 2-5 kV vermessen. Die Rasterelektronenmikroskopie wurde von Herrn Prof. Dr. Wendt am Institut für Werkstoff- und Fügetechnik der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg durchgeführt.

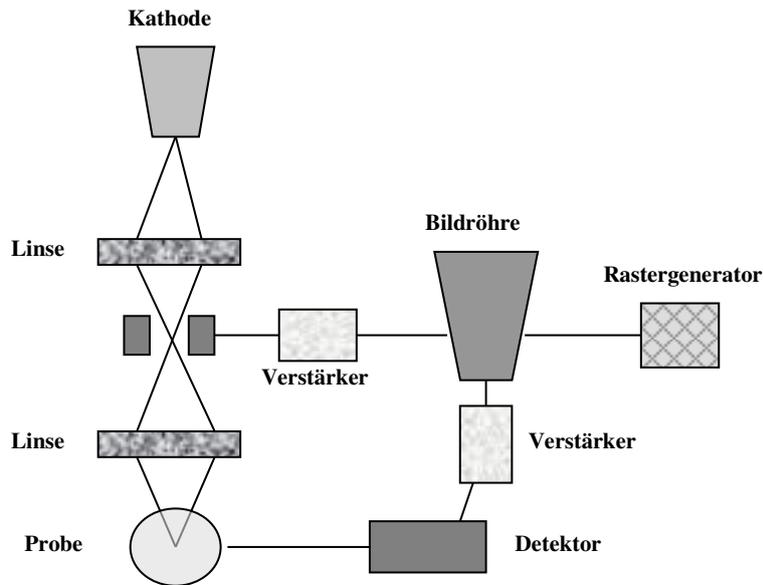


Abb. 22: Aufbau Rasterelektronenmikroskop

4.3 Visualisierung der Partikelverteilung

4.3.1 Verteilungsanalyse mittels *In vivo* Confocal Neuroimaging

In vivo Confocal Neuroimaging (ICON) ist eine nicht-invasive Methode zur repetitiven Visualisierung von einzelnen Zellen des Nervensystems in lebenden Tieren (Sabel et al. 1997; Rousseau et al. 1999; Rousseau & Sabel, 2001; Prilloff et al. 2007) (Abb. 24). Mit der ICON-Technik ist es möglich Zellen in einem Tier wiederholt in Echtzeit zu untersuchen ohne die Tiere zu töten.

Grundbaustein bei der ICON-Technik ist ein Standard Laser-Scanning-Mikroskop (LSM). Die Besonderheit liegt in der Kontaktlinse, die das Auge der Ratten zu einem Teil der Mikroskopoptik macht.

Das Laser-Scanning-Mikroskopie (Konfokales Mikroskop) ist eine besondere Form des Lichtmikroskops. Während bei herkömmlichen Lichtmikroskopen das gesamte Präparat durchleuchtet wird, wird beim LSM erst nur ein Bruchteil und durch Rasterung nacheinander ein kompletter Ausschnitt abgebildet. Das LSM besteht aus einem Laser (als leistungsstarke Lichtquelle), Scanner (bewegt fokussierte Strahl), Objektiv (bestimmt Bildqualität), Farbteller (Strahlentrennung), konfokale Blende (Pinhole, Bildqualität) und dem Photomultiplier (Detektor). Durch die Besonderheit der Kontaktlinse auf dem Rattenaugen wird der Fokus des Standard LSM verändert, so dass der Lichtstrahl auf der Retina fokussiert wird. Ohne die Kontaktlinse würde der Lichtstrahl auf den Glaskörper fokussiert sein.

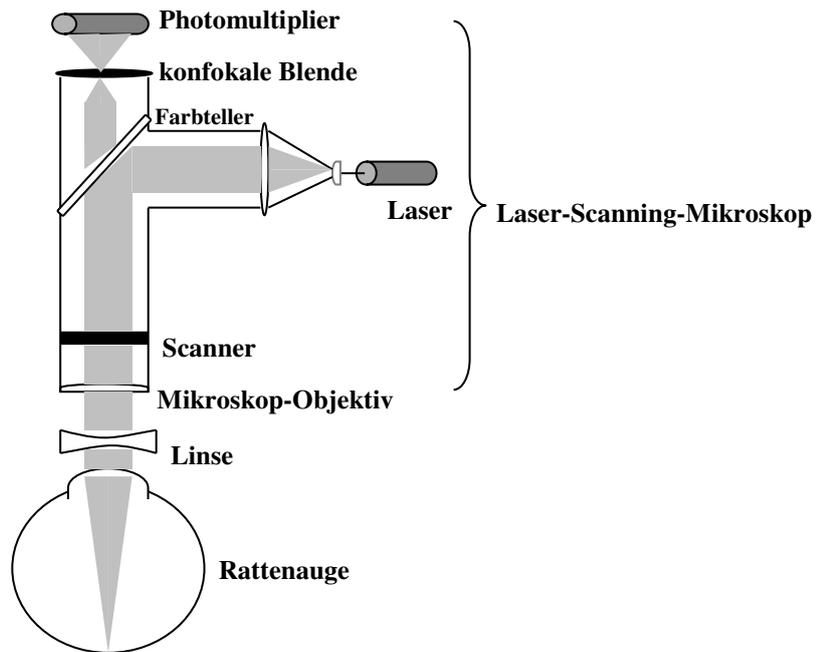


Abb. 23: Prinzip der ICON-Technik

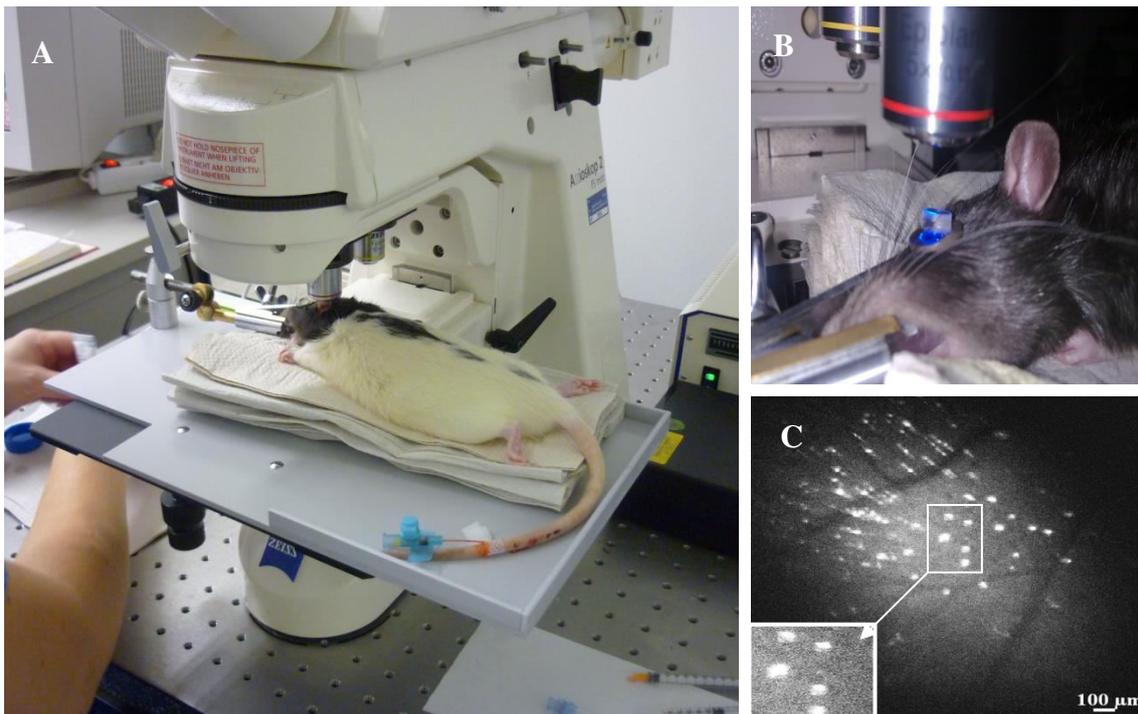


Abb. 24: ICON Setup. (A) zeigt eine narkotisierte Ratte unter dem LSM. In (B) ist die Fixierung der Ratte über die Schnauzenhalterung und die Bündelung des Laserlichtes durch die Kontaktlinse auf der Cornea dargestellt. Eine typische ICON-Aufnahme ist in (C) zu sehen mit den schwarzen Blutgefäßen und den hell leuchtenden RGZ (Maßstab 100 μ m).

4.4 Färbetechniken zur Zellstrukturanalyse

4.4.1 Retrogrades Markieren von Retinalen Ganglienzellen

Retinale Ganglienzellen (RGZ) sind Nervenzellen und bestehen aus einem Zellkörper mit Dendriten und einem Axon. Die Axone aller Retinalen Ganglienzellen werden gebündelt als Nervenfaserschicht und laufen als Sehnerv (Nervus opticus) zusammen (erster Abschnitt der Sehbahn). Die Sehbahn verläuft dann über Sehnervkreuzungen bis zum Superior Collicullus und visuellen Kortex.

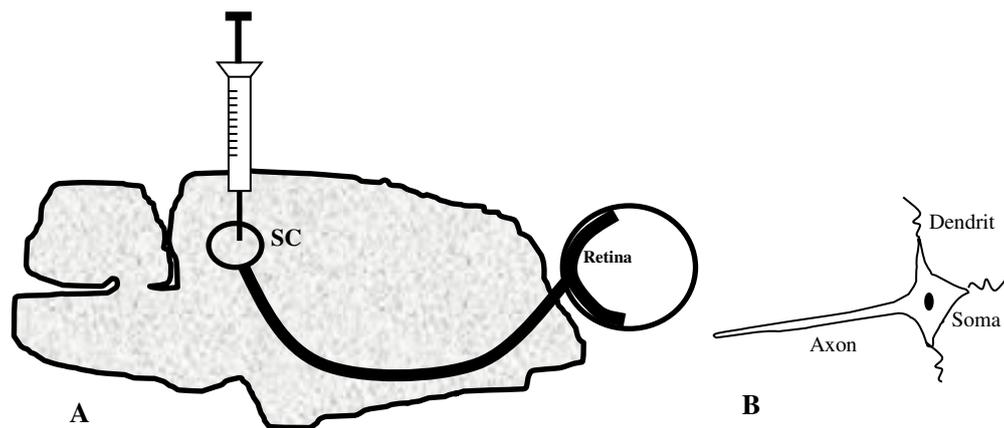


Abb. 25: Retrogrades Markieren von Retinalen Ganglienzellen (RGZ). (A) Injektion in den Superior Colliculli (SC) und Verteilung zur Retina und (B) Aufbau der Retinalen Ganglienzellen.

Für das Markieren der Retinalen Ganglienzellen wird ein Fluoreszenzfarbstoff in den Superior Collicullus injiziert. Der Farbstoff wird dann über die Axone zum Zellkörper (Soma) transportiert, verteilt sich und färbt das Soma an.

4.4.2 Antikörperfärbung

Antikörper sind Eiweiße, die zur Immunglobulinfamilie gehören und als Reaktion auf einen Antigen gebildet werden. Sie bestehen aus einer H-Kette und zwei L-Ketten, die als Bindungsstellen für die Antigene dienen.

Bei der Antikörperfärbung gibt es 2 Methoden: direkt und indirekte Färbung. Bei der direkten Färbung ist der Antikörper direkt mit einem Florochrom oder Marker gekoppelt und bindet an das Antigen. Diese Methode geht zwar sehr schnell ist aber sehr teuer und das Farbsignal ist sehr schwach. Bei der indirekten Färbung gibt es einen Primär- und Sekundärantikörper (oder $n+1$). Der Primärantikörper bindet auch hier spezifisch an das Antigen. Aber der Sekundärantikörper, mit Florochrom oder Marker konjugiert, ist spezifisch gegen die Tierspezies (Produzent) des Primärantikörpers. Diese Methode hat den Vorteil einer höheren Sensitivität und damit einem breiteren Einsatzfeld. (Abb. 26)

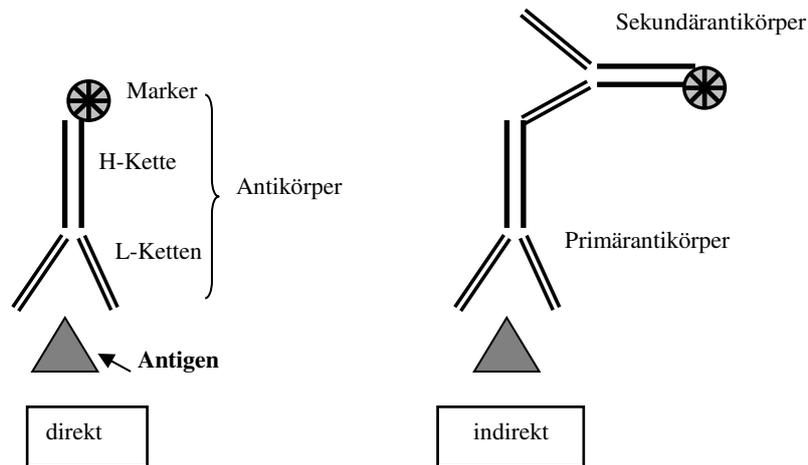


Abb. 26: Prinzip der Antikörperfärbung

4.5 Toxizitätsstudien

In vitro Testsysteme in der Zellkultur zur Klärung der Toxizität von Substanzen basieren meist auf der Messung des Zellstress oder der Zellvitalität. Da Untersuchungen an Zellkulturen nur eine auf die spezifischen Konditionen beschränkte Aussagekraft haben, wurden die Nanopartikel in Hinblick auf ihre Toxizität auch *in vivo* an Ratten getestet.

4.5.1 *In vitro* MTT-Test

Der Zellvitalitäts-Test (MTT) misst die Umwandlung des gelben Tetrazoliumsalses (MTT-Salz) in ein violettes Formazan. Die mitochondriale Dehydrogenase ist für diese Umwandlung in gesunden Zellen verantwortlich und somit ist die gemessene Konzentration ein Maß für die Aktivität der Zellen.

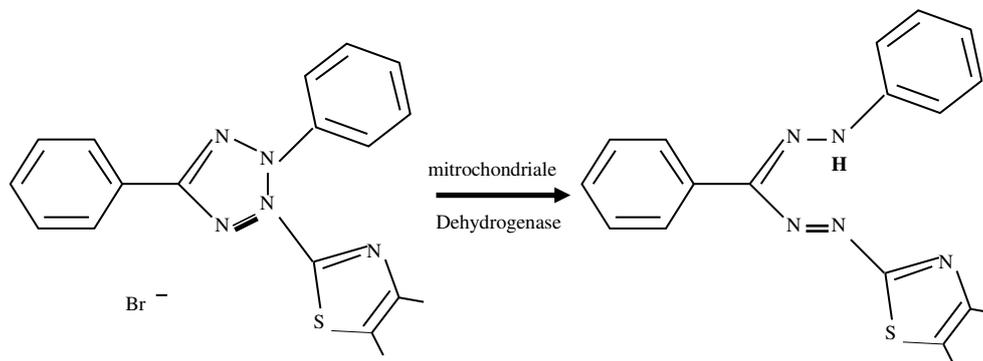


Abb. 27: Umwandlung des gelben MTT-Salz zu violetten Formazan

4.5.2 *In vivo* Studie

Bei *in vivo* Studien wurden die zu untersuchenden NP-Suspension mehrfach i.v. verabreicht und das Versuchstier beobachtet. Wichtige Parameter für die Einschätzung des Allgemeinzustandes der Tiere *in vivo* sind Gewicht, Verhalten, externe Veränderungen (wie Haarausfall), Sekretion, Atemgeräusche und Gang, welche wöchentlich bzw. täglich kontrolliert wurden. Am Ende des Versuchs wurden die peripheren Organe auf offensichtliche Veränderungen wie Tumore, Korrosion oder andere Defekte untersucht. Generell sind nicht alle Organe gleich stark von Nebenwirkungen betroffen: vorrangig werden Störungen in Organen mit hohem Blutfluss erwartet (Leber, Niere, Myocardium und Lunge) und besonders bei den sehr empfindlichen Neuronen (Retinalen Ganglienzellen (RGZ)). Die Veränderungen in der Retina wurden beispielhaft zur Bewertung von Schäden des zentralen Nervensystems herangezogen. Die Untersuchung der Retinalen Ganglienzellen (Somagröße, Fluoreszenzintensität) nach wiederholter Verabreichung der PBCA-Nanopartikel ermöglicht eine Aussage über die Neurotoxizität. Dabei werden die fluoreszierenden Retinalen Ganglienzellen vorab vermessen und die Ausgangswerte für Somagröße und Fluoreszenzintensität mit denen nach Verabreichung von PBCA-NP mit Hilfe der Mikroskopsoftware verglichen. Als positive Kontrolle diente dabei die Verabreichung der Rhodamin123-Kochsalzlösung (keine Schädigung erwartet) und als negative Kontrolle die Schädigung der Retinalen Ganglienzellen mittels Quetschung des Sehnervs (ONC). Diese Schädigung der Retinalen Ganglienzellen führt zu einer Stressreaktion (veränderte Somagröße & Fluoreszenzintensität) bis hin zum Absterben der Retinalen Ganglienzellen.

4.6 Nachweis des erfolgreichen nanopartikulären Arzneimitteltransport in das Zentrale Nervensystem mittels Verhaltenstest

4.6.1 Hot plate Test

Der Hot plate Test ist ein Schmerzreaktionstest, bei dem Versuchstiere auf eine Wärmeplatte mit definierter Temperatur verbleiben bis die erste Schmerzreaktion gezeigt wird. Dieser Test kann zur Überprüfung von pharmakologischen Effekten von nanopartikulären Arzneimittel-Träger-Systemen benutzt werden. Die Versuchstiere, meist Mäuse oder Ratten, zeigen deutlich die erste Schmerzreaktion durch Lecken oder Anheben der Hinterfüße. Mit Hilfe dieses Tests kann der Nachweis erbracht werden, ob ein Schmerzmittel durch die Bindung an PBCA-Nanopartikel die BHS überwindet, seine Wirkung im Gehirn entfalten kann und somit die Schmerzschwelle des Tieres erhöht.

5 Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung

In diesem Abschnitt wird die detaillierte Versuchsdurchführung beschrieben die zur Klärung der Verteilung der modifizierten PBCA-Nanopartikel nach intravenöser Verabreichung (BHS-Überwindung, Zellstrukturanalyse), der möglichen Toxizität und der Effektivität als Arzneimittelträger zur Überwindung der BHS dient.

5.1 PBCA-Nanopartikel

Die PBCA-Nanopartikel wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes von Frau Sarah Kockentiedt geb. Tschorn am Lehrstuhl für Mechanische Verfahrenstechnik hergestellt und charakterisiert. Deshalb wird in dieser Arbeit auf die Optimierung der Polymerisationsbedingungen und die Stabilitätsuntersuchungen nur kurz eingegangen.

Herstellung

Für die Visualisierung der NP mit ICON wurde der Fluoreszenzfarbstoff in Anlehnung an die Verfahren zur Wirkstoffbindung an die Tween80-PBCA-NP adsorbiert oder inkorporiert. Alle Varianten für die Klärung der Frage des Einflusses der chemisch/physikalischen Eigenschaften der NP auf die BHS-Passage wurden mit inkorporiertem Farbstoff hergestellt.

Die Herstellung erfolgte nach dem Miniemulsions-Prozess (Reimold et al., 2008). Für die Miniemulsion wurden zwei Lösungen hergestellt: die Wasser- und die Öl-Phase. Die Wasser-Phase (Lösung 1) enthielt wahlweise Rhodamin123, Tensid (Emulgator) und Phosphorsäure und die Öl-Phase (Lösung 2) enthielt das Monomer und Sojaöl. Lösung 1 wurde bei Raumtemperatur 30min gerührt und im Anschluss 5min in Eiswasser gestellt. Lösung 2 wurde dann zur Lösung 1 gegeben und mit Hilfe eines Ultraschallhomogenisators bei 70% Leistung 4min unter Eiskühlung homogenisiert. Durch tröpfchenweises Zugeben der Miniemulsion zur Ammoniaklösung wurde die Polymerisation unter ständigem Rühren gestartet. Nach 5min war die Polymerisation abgeschlossen und der pH-Wert wurde durch Zugabe weiterer Ammoniaklösung auf 7 eingestellt. Die fertige Nanopartikelsuspension wurde unter Lichtausschluss im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die detaillierte Zusammensetzung der Nanopartikel-Modifikationen ist in Tabelle 08 (Anhang) aufgelistet.

Die Herstellung der Nanopartikel mit Arzneistoff (Analgetikum) erfolgte analog, nur dass Rhodamin durch Kyotorphin ersetzt wurde. Für die Partikel mit adsorbierter Substanz wurden erst leere PBCA-NP hergestellt und nach Beendigung der Polymerisation die gelöste Substanz durch Rühren (5min) angelagert.

Charakterisierung und Optimierung

Zu Beginn der Studien mit den modifizierten PBCA-Nanopartikeln wurden die Herstellungsparameter und die wesentlichen Systemeigenschaften zur Optimierung des Herstellungsprozesses kontrolliert. Der Einfluss der Polymerisationsbedingungen, insbesondere des pH-Werts, Ultraschalldauer, Polymerisationszeit und das Massenverhältnis Tensid/Monomer auf die Nanopartikeleigenschaften wurde detailliert untersucht (veröffentlicht in Tschorn et al., 2013). Daher war eine gezielte Modifikation der PBCA-Nanopartikel mit optimalen Systemeigenschaften gewährleistet. Die Eigenschaften der modifizierten PBCA-Nanopartikel (Partikelgröße, Zetapotential, PDI) wurden direkt nach der Herstellung analysiert. Die Verabreichung der PBCA-Nanopartikel erfolgte meist einen Tag nach Herstellung, spätestens innerhalb von 5 Tagen nach Herstellung. Zur Stabilitätskontrolle wurden die Parameter über einen Zeitraum von 30 Tagen betrachtet und zur Analyse der Form und Struktur Rasterelektronenmikroskopaufnahmen ausgewertet.

Für die Versuche wurden gezielt PBCA-Nanopartikel mit unterschiedlichen Größen und Zetapotentialen (siehe Tabelle 07) hergestellt. Zur Testung des Einflusses von Größe und Zetapotential wurden Partikel von einer Bandbreite des mittleren Durchmesser von <100nm und >450nm mit positivem oder negativem Zetapotential hergestellt.

Zur Charakterisierung der PBCA-Nanopartikel wurde der Zetasizer Nano ZS (He-Ne-Laser $\lambda = 633 \text{ nm}$, Streuwinkel 173° , 25°C) der Firma Malvern genutzt und die Probe 1:25 verdünnt.

5.2 in vivo Studien

Zur Untersuchung des Potentials der PBCA-Nanopartikel als Arzneimittelträger wurde ein *in vivo* Rattenmodell genutzt. Dafür wurden männliche „Lister-hooded“ Ratten (Crl: LIS Stamm, Charles River, 8-9 Wochen bei Lieferung) unter Standardbedingungen, 2 Tiere pro Käfig, in einem 12 Stunden hell/dunkel Rhythmus bei einer Temperatur von $24\text{-}26^\circ\text{C}$ und einer Luftfeuchte von 50-60% gehalten. Futter und Wasser erhielten die Tiere ad libitum. Alle Prozeduren (Operationen, Verhaltenstests) wurden nach Genehmigung der zuständigen Behörde (Referat Verbraucherschutz, Veterinärangelegenheiten; Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Halle) durchgeführt und den ethischen Leitsätzen des Tierschutzes wurde entsprochen (Tierschutzgesetz vom 25.05.1998). Nach der Lieferung hatten die Ratten 1 Woche Adaptationszeit und wurden in dieser Woche gehandelt um sie an Menschen und Umgebung zu gewöhnen und dadurch den Stress zu minimieren.

5.2.1 Anästhesie und Nanopartikel-Applikation

Für die Untersuchungen am Confokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) und für chirurgische Eingriffe wurden die Ratten mit Ketavet (50mg/kg i.p.) und Rompun (10mg/kg i.p.) narkotisiert. Durch diesen Narkosecocktail wird eine tiefe Narkose von ca. 30-40min erzeugt. Zum Schutz der Tiere erfolgte die Narkosegabe höchstens alle 2 Tage.

Die Versuchstiere erhielten die Nanopartikel (0,1ml/100g KG) intravenös über einen Venenverweilkatheder in die Schwanzwurzelvene. Zur Verhinderung von Agglomeration wurden die PBCA-Nanopartikel vor Verabreichung einige Sekunden ins Ultraschallbad gestellt. Für die Experimente zum Verteilungsverhalten nach hyperosmotischer Öffnung der BRS wurden die NP über Butterflykatheder intraarteriell appliziert.

5.2.2 Chirurgische Eingriffe

Retrograde Markierung der Retinalen Ganglienzellen

Für die Analyse der Reaktion der Retinalen Ganglienzellen (RGZ) auf die PBCA-NP (Toxizitätsstudie) und für die Identifikation des Zelltyps, der durch die Nanopartikel angefärbt wird, wurden die Retinalen Ganglienzellen markiert. Zu diesem Zweck wurden 2µl Fluoreszenzfarbstoff durch eine stereotaktische Injektion in beide Colliculi Superior (Koordinaten: 6,9 mm posterior von Bregma, 1,2mm lateral, 4mm tief ab Dura (äußere Hirnhaut)) injiziert, um dann über retrograden axonalen Transport die Retinalen Ganglienzellen markiert. Nach der Öffnung der Kopfhaut mit Hilfe eines Skalpell und dem Bohren zweier Löcher an den gewünschten Koordinaten wurde von 4 mm Tiefe beginnend im Abstand von 0,5mm jeweils 0,5µl Farbstoff injiziert. An jeder Position wurde 20s gewartet um die Verteilung des Markers zu gewährleisten. Die Bohrlöcher wurden mit Knochenwachs verschlossen und die Kopfhaut geklammert (Wundklammern).

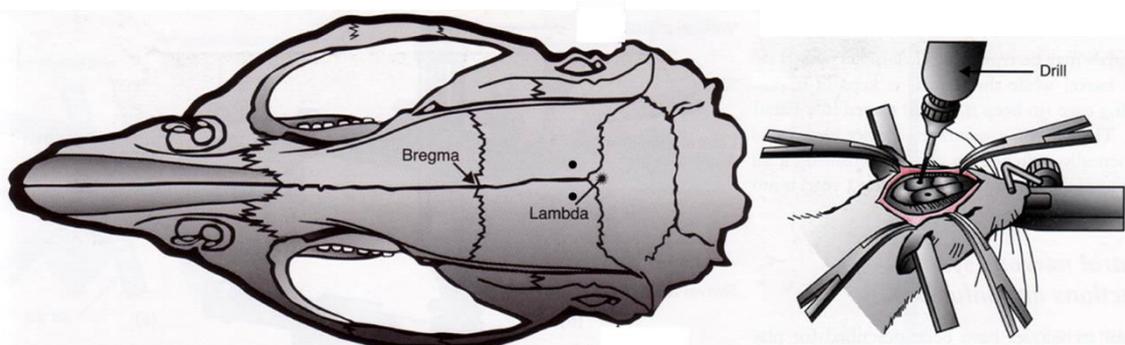


Abb. 28: Stereotaktische Operation (Modifiziert nach Krinke 2000). Die Schädelnahtkreuzungen Bregma und Lambda dienen zur Orientierung für das Bohren der Löcher um den Farbstoff in die Colliculi Superior zu injizieren

Schädigung/ Optic Nerve Crush (ONC)

Für die Schädigung der Retinalen Ganglienzellen wurde eine Sehnervquetschung (optic nerve crush, ONC, Duvdevani *et al.*, 1990) durchgeführt. Dazu wurde unter einem Operationsmikroskop ein Schnitt am Auge gemacht und sich dem *Nervus opticus* von der Orbita vorsichtig, ohne Blutgefäße zu beschädigen, genähert. Der *Nervus opticus* wurde dann mit Hilfe von Pinzetten freigelegt und im Abstand von 2-3mm vom Auge 30s mit einer kalibrierten selbstschließenden Pinzette 30s gequetscht. Der Abstand der Pinzettenchenkel an der Spitze im geschlossenen Zustand betrug 0,2mm. Frühere Arbeiten am Institut für Medizinische Psychologie belegen die Degeneration der Retinalen Ganglienzellen (Sautter & Sabel, 1993) nach ONC. Nach Beendigung der Sehnervquetschung wurde eine antibiotische Augensalbe (Aureomycin) auf den Schnitt aufgetragen. Diese Quetschung des Sehnervs dient beim *in vivo* Toxizitätstest der PBCA-Nanopartikel als negative Kontrolle, da dabei die Retinalen Ganglienzellen absterben.

Perfusion und Organentnahme

Für die Entnahme der Retina, der Leber und des Hirns wurden die Ratten mit einer Überdosis Chloralhydrat getötet und anschließend bei eröffnetem Brustkorb mit 0,9 % - Kochsalzlösung perfundiert. Das Gehirn und Teile der Leber wurden herauspräpariert, auf Trockeneis eingefroren und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, so dass die Proben für spätere Analysen verwendet werden können. Die Hirne und Teile der Leber wurden am Kryostat in 20 μm dicke Scheiben geschnitten und auf SuperFrost Objektträgern fixiert. Für die Präparation der Retinaflachpräparate wurden die Retinae aus dem mit Paraformaldehydlösung (PFA)fixierten Auge (4%-ige Lösung.) mit Hilfe zweier Pinzetten entnommen, wie ein Kleeblatt eingeschnitten und auf dem Objektträger mit Mowiol Einbettlösung fixiert oder für weitere Untersuchungen in Cryoprotektiver Lösung gelagert.

Hyperosmotische Öffnung der BHS

Bei der Hyperosmotische Öffnung der BHS wird eine Zuckerlösung ins Blut injiziert, welche die Tight Junctions der Endothelzellen öffnen und so einen intrazellulären Spalt freigeben, sodass Substanzen frei diffundieren können und die Barrierewirkung der BHS aufgehoben wird.

Für die hyperosmotische Öffnung der BHS wird eine Mannitol-Lösung mittels Katheder in die Arteria Carotis injiziert. Für die Arteria Carotis Katheterisierung wurde am vorderen Hals die Haut mit einem Skalpell 2cm eingeschnitten und mit 2 anatomischen Pinzetten die Muskelfasern bis zum Erreichen des Gefäßes vorsichtig gespalten. Der *Nervus vagus* wurde dann vorsichtig von der Arteria Carotis getrennt und das Gefäß abgebunden. Der Butterfly-Katheder wurde vorsichtig in die Arteria Carotis geschoben und mit einem Haltefaden fixiert. Es wurden zuerst 2ml Mannitol-Lösung (25%) und 10min später Rhodamin123 (0,36%) oder Lutrol-SDS-PBCA-NP injiziert.

Serumherstellung und NP-Inkubation

Zur Untersuchung der möglichen Änderung des Zetapotentials der PBCA-Nanopartikel nach intravenöser Verabreichung wurden die Nanopartikel in Serum inkubiert und anschließend vermessen. Die Entnahme des Rattenblutes erfolgte bei eröffnetem Brustkorb über Herzpunktion. Das Serum wurde durch Zentrifugation (2x 5min, 4000g) des geronnenen Blutes gewonnen. Anschließend wurden die NP für 5min bei 37°C inkubiert (1:2). Zur Reinigung wurde die Suspension zentrifugiert und das NP-Pellet mit Aqua bidest resuspendiert. Zur Kontrolle wurden die NP analog behandelt aber ohne Seruminkubation.

5.2.3 *in vivo* confocal neuroimaging

Zur Visualisierung wurde den anästhesierten Ratten Neosynephrine-POS 2,5% auf die Augen getropft um die Iris zu dilatieren. Außerdem wurde Vidisic Augengel als Immersionsmedium für die Kontaktlinse und zum Schutz vor Austrocknung auf das Auge aufgetragen. Die Ratten wurden mit Hilfe einer Schnauzenhalterung auf dem Objektisch unter dem LSM platziert. Eine Hruby style plankonkave Linse (-80dpt) wurde auf die Cornea aufgelegt. Für die Auswahl der zu untersuchenden Bereiche der Retina und zur Orientierung dienten die Blutgefäße.

5.2.4 Färbetechniken

Hämatoxylin-Eosin Färbung (H.E.) der Leberschnitte

Die Schnitte verblieben für 10min in Mayer`s Hämalaun Lösung, wurden dann abgespült mit Aqua bidest und durch 3-maliges Eintauchen in HCl-Alkohol differenziert. Anschließend wurden die Schnitte unter fließendem Wasser gebläut (10min) und für 3-5min in Eosinlösung gestellt. Nachdem die überflüssige Eosinlösung durch Verbleib der Schnitte in Aqua bidest für 2min entfernt wurde, wurden sie in eine Alkoholreihe (70-96%ig) für 2min und zum Abschluss 2x 5min in 100%igen Ethanol eingetaucht. Zur Entwässerung des Gewebes wurden die Schnitte 3x 5min in Xylol gestellt und nach der Trocknung mit Entellan eingedeckelt. Danach sind Zellkerne blau, Fasern und Membrane rot abgestuft.

Immunhistochemie (Antikörperfärbung)

Zur Identifizierung der zellulären Strukturen, in die Nanopartikel aufgenommen wurden, wurde eine Antikörperfärbung mit dem Gliamarker GFAP und dem Photorezep-

tormarker Recoverin durchgeführt. Dafür wurden die Retinapräparate 30min in PFA (4%) fixiert und im Anschluss 30min in 15%iger Sucrose gelagert. Über Nacht verblieben die Retinae in 30%iger Sucrose und wurden am nachfolgenden Tag 2h in 10mM PBS gewaschen und im Anschluss für 2h im Präinkubat gelagert. Der Erstantikörper verblieb dann für 4 Tage auf den Retinae. Vor und nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper Cy3 für 2 Tage wurden die Retinae 2h in 10mM PBS (Phosphatpufferlösung) gewaschen. Retinae wurden im Anschluss mit Aqua Immu Mount eingedeckelt (weitere Details zu den Antikörpern siehe Chemikalien und Reagenzien)

5.2.5 Verhaltenstest

In dieser Arbeit wurde Ratten Kyotorphin (Analgetikum welches nicht die BHS überwindet) gebunden (adsorbiert oder inkorporiert) an Tween80-PBCA-Nanopartikel verabreicht. Als Kontrolle diente Kyotorphin (10mg/kg) gelöst in Kochsalzlösung. Die Temperatur der Heizplatte betrug 57°C und die Messung wurde bei erster Schmerzreaktion gestoppt und die Tiere von der Platte entfernt. Die Ratten wurden wiederholt auf die Heizplatte gesetzt und die Zeit bis zur ersten Schmerzreaktion gemessen. Die erste Messung erfolgte 5min nach Verabreichung und die Folgemessungen wurden nach 15, 30, 45, 90, 120, 180 und 240 Minuten durchgeführt.

5.2.6 Toxizitätstest

Zellvitalitäts-Test (MTT-Test)

Je 40.000 Zellen HEK293 oder HeLa Zellen wurden in einer 96-Wellplatte mit Wachstumsmedium DMEM ausgesät und am folgenden Tag mit verschiedenen Nanopartikelverdünnungen (Feststoffgehalt 10µg/ml bis 100µg/ml, appliziertes Volumen 0,5µl/ml bis 5µl/ml in Medium) inkubiert. Nach weiteren 24h wurde die Partikelsuspension entfernt, das MTT-Salz (40µl pro Well, 0,5mg/ml) hinzu gegeben und für 4h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das gebildete Salz mit 100µl DMSO gelöst und in einem Plattenreader bei 560nm vermessen. Bei jeder Well-Platte wurden Positiv-Kontrollen (nur Medium) und Negativ-Kontrollen (Zellen abgetötet durch Ethanol) angelegt.

Die Anzucht der Zellen erfolgte in Kulturflaschen mit regelmäßiger Umsetzung alle 2-3 Tage.

In vivo Test

Zur Untersuchung der Effekte resultierend aus der Injektion der Nanopartikel wurden mögliche Zellveränderungen der Retinalen Ganglienzellen und Veränderungen der Leber (exemplarisch für Organe mit hohem Blutfluss) untersucht. Die Retinalen Ganglien-

zellen wurden durch retrograden Farbstofftransport nach einer stereotaktischen Injektion in die Superior Colliculi markiert. Einmal wöchentlich wurden dann Aufnahmen der Retina mit dem ICON gemacht, und im Anschluss erhielten je 4 Tiere eine Nanopartikelsuspension (Tween80- oder Tween80-SDS-PBCA-NP). Dieses Prozedere wurde insgesamt 4 Mal durchgeführt. Am Ende des Versuches wurden Abschlussaufnahmen der Retina gemacht und im Anschluss wurden die Tiere perfundiert, auf Tumore oder Defekte untersucht und die Leber entnommen. Bei jeder Behandlung wurden die Tiere auf auffällige Veränderungen wie Gewichtsverlust, Verhaltensauffälligkeiten und Fellverlust etc. überprüft. Zur Kontrolle gab es 2 Gruppen: die eine erhielt nach dem gleichen Schema wöchentlich Rho123 (n=5) anstatt der Nanopartikel, und die andere Gruppe erhielt keine Applikation einer Substanz sondern einmalig eine Sehnervquetschung (ONC) (n=5) nach den ersten Aufnahmen der Retina.

5.3 Varianzanalyse und Semiquantifizierung

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von SPSS Version 21 (Standard Version für Windows, SPSS Inc., USA) durchgeführt. Die Messgrößen wurden durch das Varianzanalyseverfahren One-way ANOVA in Verbindung mit einem posthoc Tukey t-Test analysiert. Dabei werden die Messgrößen miteinander verglichen und die Wahrscheinlichkeit bestimmt, dass die Messgröße durch Zufall derart zustande gekommen ist. Wenn der Schwellenwert (Unterschiedslevel) dabei unterschritten bleibt, kann davon ausgegangen werden, dass die Messgrößen unterschiedlich sind. Das Unterschiedslevel wurde auf $p < 0.05$ festgelegt (in Einzelfällen wurde eine Signifikanz von $p < 0.1$ betrachtet). In den Abbildungen wurde die Gruppen verglichen und durch * die Signifikanz ausgedrückt, dabei bedeutet * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ & *** $p < 0.001$.

Zur Quantifizierung der Nanopartikel-markierten zellulären Strukturen dienten definierte Zählrahmen (blind positioniert). Nur die innen liegenden Zellen wurden für die Auswertung herangezogen. Es wurden jeweils 3 Bilder pro Tier und 3 Tiere pro Gruppe analysiert.

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Charakterisierung der PBCA-Nanopartikel

Da die Charakterisierung, Langzeitstabilitätsuntersuchung und die Untersuchungen zum optimalen Mischungsverhältnis der PBCA-Nanopartikel von Frau Sarah Kockentiedt geb. Tschorn durchgeführt wurden soll hier nur kurz auf die Ergebnisse eingegangen werden. Partikelgrößenverteilung $Q_0(d)$, $Q_3(d)$ und $Q_6(d)$ sind im Anhang dargestellt.

6.1.1 Formanalyse mittels Rasterelektronenmikroskopie

Die Form- und Strukturanalyse mittels Rasterelektronenmikroskopie zeigte für alle verschiedenen PBCA-Nanopartikelmodifikationen deutlich runde kugelförmige Formen (ausschnittsweise dargestellt in Abb. 29).

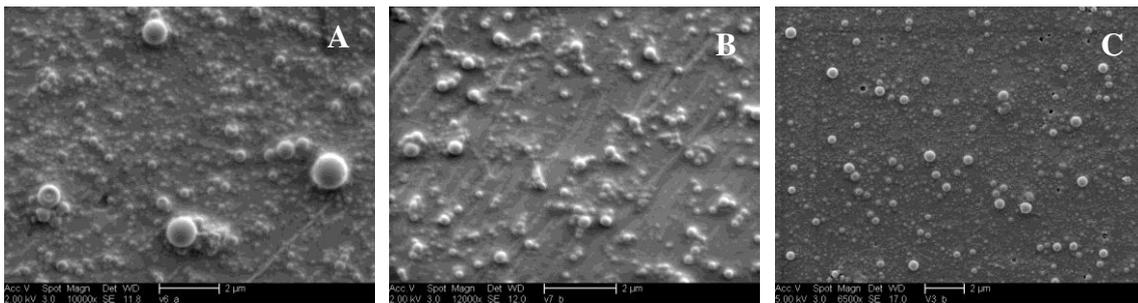


Abb. 29: Rasterelektronenaufnahmen der PBCA-NP. (A) DEAE Dextran-Lutrol-, (B) Lutrol-Dextran- und (C) Tween80-PBCA-Nanopartikel sind hier dargestellt.

6.1.2 Stabilität

Für die Stabilitätsanalyse der Nanopartikel gegenüber Alterungsprozessen und Agglomeration wurden die Partikeleigenschaften (Partikelgröße, Zetapotential, pH-Wert) über einen Zeitraum von 30 Tagen getestet.

Es konnte keine Änderung des pH-Werts und des Zetapotentials während der Betrachtungszeit festgestellt werden. Auch die mittlere Partikelgröße ändert sich kaum was in Abbildung verdeutlicht wird.

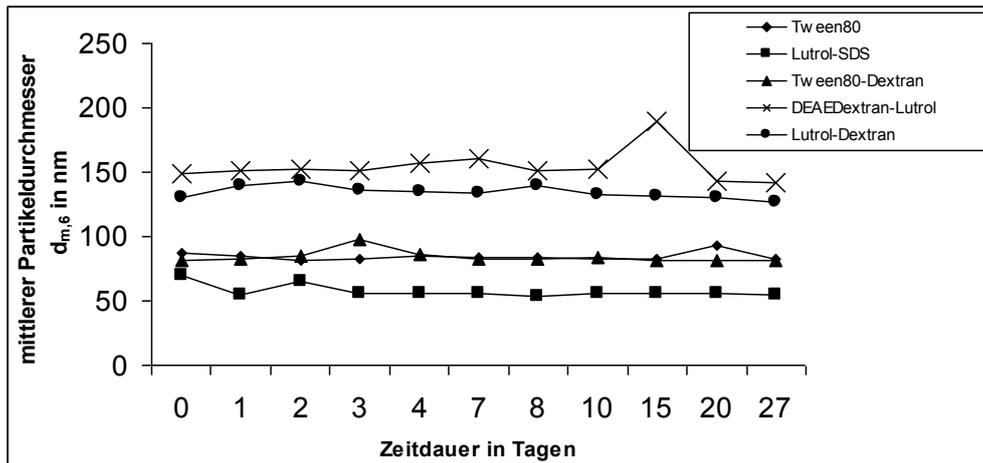


Abb. 30: Mittlerer Partikelgröße (Z-Mittel) $d_{m,6}$ der Langzeitstabilitätsanalyse von modifizierten PBCA-NP

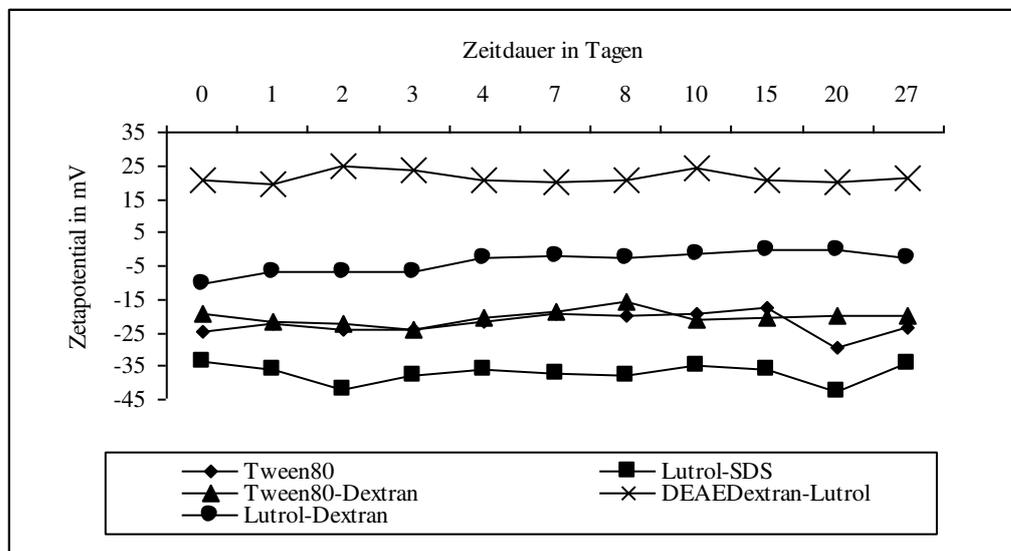


Abb. 31: Zetapotential der Langzeitstabilitätsanalyse von modifizierten PBCA-NP

6.1.3 Diskussion

Durch die Kooperation mit dem Lehrstuhl für Mechanischen Verfahrenstechnik konnten Daten zur Stabilität und Herstellungsoptimierung gewonnen werden. Diese Daten belegen die Langzeitstabilität der durch Miniemulsionspolymerisation hergestellten PBCA-Nanopartikel in Suspension bis zu 30 Tagen und verdeutlichen die optimierte Herstellung der verwendeten modifizierten Partikel in Hinblick auf Polymerisationszeit, Ultraschalldauer, Tensid-/Stabilisator-/Monomermenge und pH-Wert (Tschorn *et al.*, 2013). Auch die Morphologieanalyse der Partikel zeigte kugelförmige Partikel ohne Hinweise auf Agglomerate. Einer Nutzung für Experimente im Tier steht damit nichts entgegen.

6.2 Verteilung von PBCA-Nanopartikeln

6.2.1 Vergleich Blut-Retina-Schranke und Blut-Hirn-Schranke

Zur Untersuchung der Vergleichbarkeit von Blut-Retina-Schranke und Blut-Hirn-Schranke wurde den Versuchstieren Tween80- (3 Tiere), Tween80-SDS-PBCA-Nanopartikel (2 Tiere) und Rhodamin123 (3 Tiere, Kontrolle) injiziert und die Verteilung untersucht. Es wurde die Anzahl der fluoreszierenden Strukturen beim live imaging (ICON) mit den Quantifizierungen bei den Retina-Flachpräparate und den Hirnschnitten in einem definierten, beliebig gewählten Bereich von $400\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$ verglichen und ausgezählt (Abb. 32). Für die Auswertung wurden jeweils 3 Aufnahmen pro Bereich und Gruppe gemittelt.

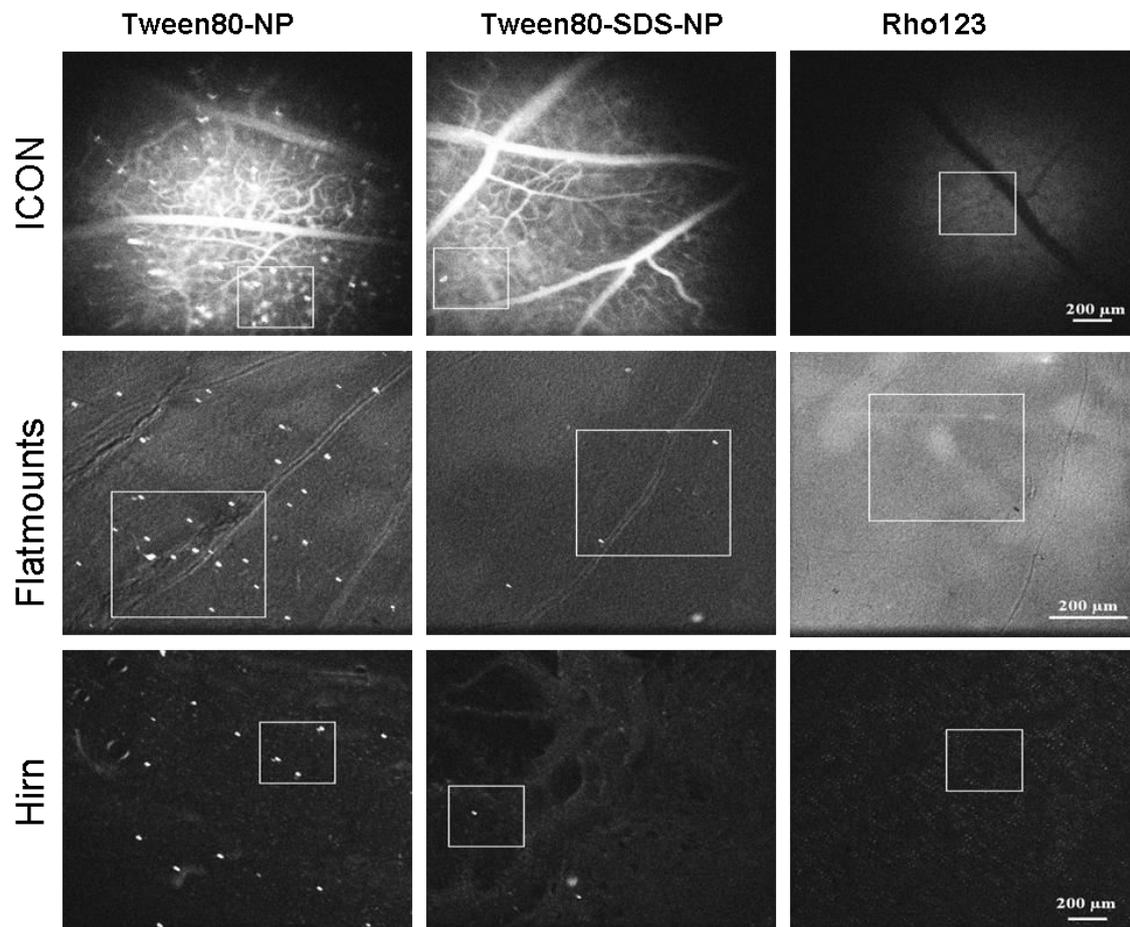


Abb. 32: Vergleich Blut-Hirn-Schranke und Blut-Retina-Schranke. Vergleich der fluoreszierenden Strukturen im Zählrahmen ($400\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$) zwischen Hirnschnitt, Retina-Flachpräparate und ICON. Man erkennt eine gute Übereinstimmung bei allen Techniken. Aufnahmen von ICON und Hirn 5x Vergrößerung und von Retina-Flachpräparate 10x Vergrößerung, Maßstab $200\mu\text{m}$

Die Quantifizierung der fluoreszierenden Strukturen ergab bei den 3 verschiedenen Auswerteverfahren jeweils analoge Ergebnisse bezüglich der unterschiedlichen applizierten Substanzen. Bei der Kontrollgruppe (Rho123) konnte mit keiner Analysetechnik

Strukturen gefunden werden, die mit Fluoreszenzfarbstoff markiert waren. (Rho123). Tween80-SDS-PBCA-NP zeigten wenige fluoreszierende Strukturen bei allen 3 Techniken. Wie erwartet, konnten mit allen 3 Auswerteverfahren nach Injektion von Tween80-PBCA-NP die meisten fluoreszierenden Strukturen gezählt werden. Nach der Injektion von Nanopartikeln war beim Vergleich der 3 Techniken (ICON, Retina-Flachpräparate, Hirnschnitte) immer die meiste Fluoreszenz in den Retina-Flachpräparaten zu sehen. Dies ist wahrscheinlich durch die größere Schnittdicke zu erklären (Tabelle 04).

Tabelle 04: Mittelwert der Anzahl fluoreszierender Strukturen im Zählrahmen

	Tween80- PBCA-NP	Tween80-SDS- PBCA-NP	Kontrolle (Rho123)
ICON	5,88	1,16	0
Retina-Flachpräparate	10,77	2	0
Hirnschnitte 20µm	5	1,16	0

6.2.2 Zelluläre Verteilung im Gewebe der Retina

Die Verteilung der PBCA-Nanopartikel im Gewebe wurde mit Hilfe von Doppelmarkierungen untersucht. Zuerst wurden die Retinalen Ganglienzellen (RGZ) intrazerebral (i.c.) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Mini Ruby (retrograde Markierung) markiert und nach 7 Tagen wurden den Tieren Nanopartikel injiziert während mit ICON Aufnahmen gemacht wurden. In der nachfolgenden Abbildung sind Überlappungen der neuronalen Fluoreszenzsignale mit der Fluoreszenz der NP bei den Ratten zu erkennen, denen Tween80-NP appliziert wurden (orange Zellen, Abb. 33A). Bei den Tieren, denen Lutrol-SDS-NP injiziert worden war, erkennt man nur die Einfachfärbung der Neurone durch den retrograden Marker Mini Ruby. Die Fluoreszenz der NP ist hier verstärkt in den Blutgefäßen sichtbar (Abb. 33B).

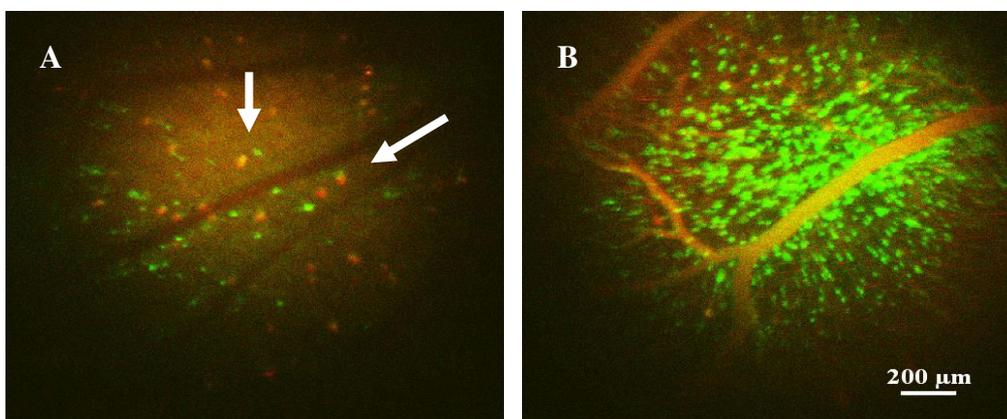


Abb. 33: Doppelmarkierung. Grün sind die retrograd markierten RGZ und rot die fluoreszierenden Zellstrukturen resultierend aus der Injektion von Tween80-PBCA-NP (A) oder Lutrol-SDS-PBCA-NP (B), Überlagerungen sind daher orange. Maßstab 200µm

In einem zweiten Versuch wurden die Retinalen Ganglienzellen (RGZ) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 594 wiederum über axonalen Transport retrograd markiert und ebenfalls Tween80-PBCA-Nanopartikel injiziert. Bei diesen Versuchen konnte deutlicher zwischen den Fluoreszenzsignalen der NP und der Markierung der retrograd angefärbten Zellen unterschieden werden. Obwohl es auch hier gelegentlich Überlagerungen gab, deuten die Bilder an, dass die NP-markierten Strukturen größer sind als die angefärbten Neurone (RGZ) und dass die gelbe Markierung (also rotes und grünes Signal) eher eine Überlagerung von Fluoreszenzsignalen von verschiedenen Ebenen ist, als eine echte Doppelfärbung identischer Zellen. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

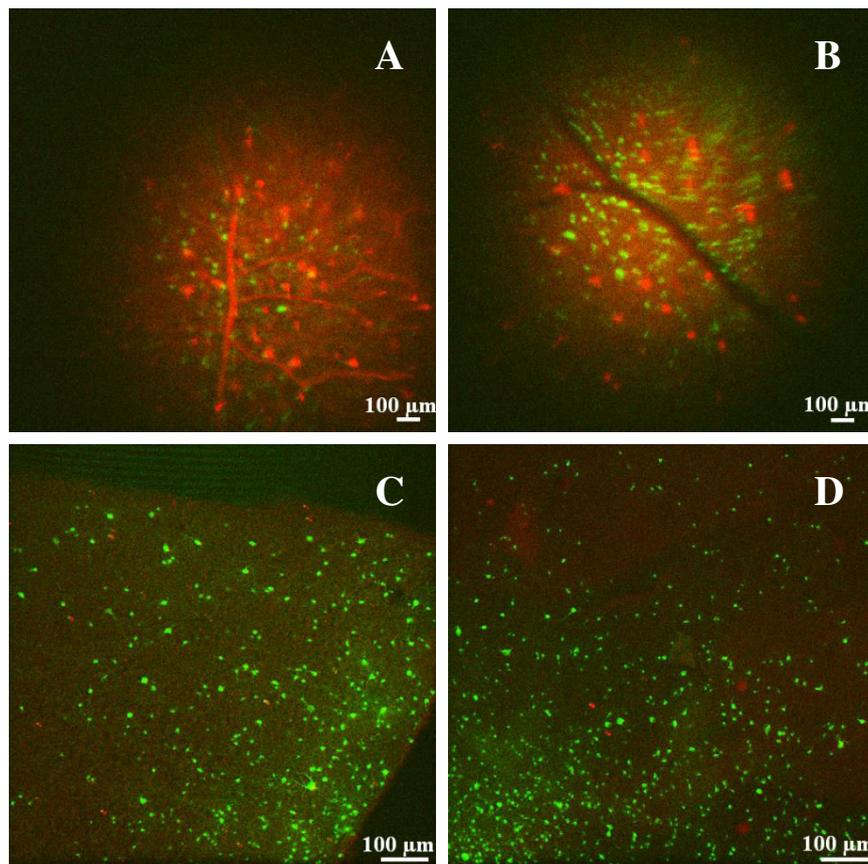


Abb. 34: Identifizierung zellulärer Strukturen. ICON-Aufnahmen (obere Reihe) und Retina-Flachpräparate (untere Reihe) nach der Injektion von Tween80-PBCA-NP (A, C) und SDS-PBCA-NP (B, D). Maßstab 100µm

Zur Identifizierung der zellulären Strukturen wurde eine immunhistochemische Retinafärbung (Antikörperfärbung) mit dem Gliamarker GFAP und dem Photorezeptormarker Recoverin durchgeführt. In Abbildung 35 sind grün die Zellen der Retina (Müller Zellen & Astrozyten [A, B] oder Photorezeptor & Bipolarzellen [C, D]) und in rot die Nanopartikel markierten Zellen zu sehen. Auch hier konnten keine eindeutigen Übereinstimmungen gefunden werden.

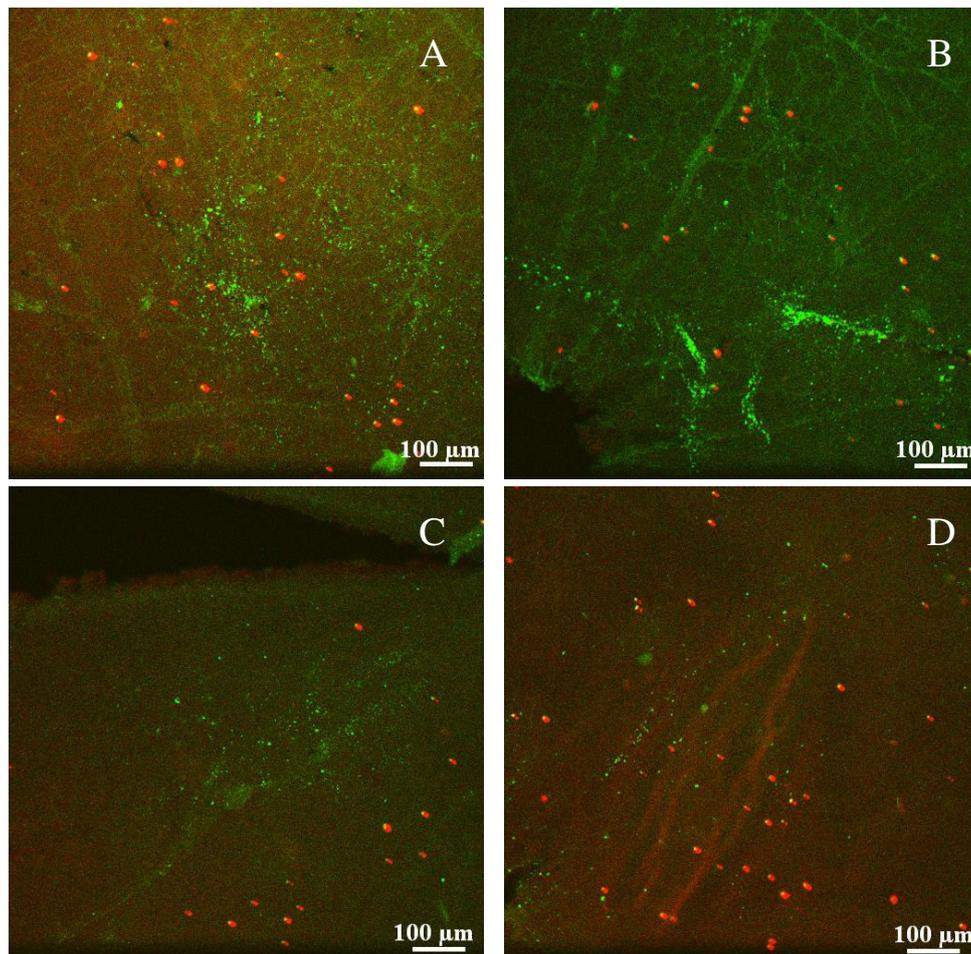


Abb. 35: Immunhistochemische Färbung von Retinapräparaten. Rot erscheinen Tween80-PBCA-NP markierte Zellen und grün sind die durch den Gliamarker GFAP markierte Astrozyten und Müllerzellen (A, B) oder durch Recoverin gefärbte Photorezeptoren und Bipolarzellen (C, D). Maßstab 100µm

6.2.3 Diskussion der Verteilung der PBCA-NP im Gewebe

Bei der Untersuchung der Verteilung von PBCA-NP im Gehirn diente die Blut-Retina-Schranke als Modell der Blut-Hirn-Schranke. Ontogenetisch haben sich die BHS und die BRS aus den Anlagen des ZNS entwickelt. Aus dieser Sicht ist die Retina somit ein Teil des Gehirns. Außerdem gibt es experimentelle Daten die eine Gleichheit im Aufbau und Funktion bescheinigen. Die Arbeitsgruppe um Steuer konnte 2004 zeigen, dass sich BRS und BHS identisch bezüglich des Übertritts von pharmakologischen Substanzen verhalten und dass die Tight Junctions und die typischen Effluxpumpen (P-glycoproteine und Multi resistant Proteine) identisch sind (Steuer *et al.*, 2005).

Diese Ausgangshypothese, dass die BRS ein geeignetes Modell der BHS ist, wurde mit der vorliegenden Arbeit bestätigt: die semi-quantitative Analyse der Anreicherung von PBCA-NP im Gehirngewebe zeigt keine prinzipiellen Unterschiede zwischen den mit ICON gewonnenen Daten (Verteilung der NP in der Retina) und der Auswertung der Gehirnschnitte nach klassischer *ex vivo* Histologie (Verteilung der NP in anderen Gehirnarealen). Somit ist die ICON Technik, die es erlaubt in Echtzeit die Verteilung der

Partikel zu verfolgen, ein ausgezeichnetes Werkzeug um mit Hilfe der BRS Modells die Partikelkinetik zu untersuchen. Da also keine Unterschiede zwischen BHS und BRS erkennbar waren, wird zur Vereinfachung im Weiteren nur der Terminus BHS verwendet.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig den Übertritt der Tween80- beschichteten PBCA-Nanopartikel aus dem Blut ins Gewebe der Retina bzw. ins Gehirngewebe (wie auch Kreuter *et al.*, 1997-2001; Schröder *et al.*, 1996-1998). Hingegen waren die Lutrol-SDS- beschichteten Partikel kaum im Gewebe erkennbar. Diese waren lange in den Blutgefäßen sichtbar (auch nach 12-14 min), was auf eine Anlagerung an den Endothelzellen hindeuten könnte. Bei der Untersuchung zur Identifikation der entstandenen fluoreszierenden zellulären Strukturen in der Retina nach der Injektion von Tween80-PBCA-NP wurden die wichtigsten Zelltypen untersucht. Ku zeigte 2010, dass Polymer-Nanopartikel nach Injektion in Neuronen lokalisiert sind (Ku *et al.*, 2010). Dies konnte hier nicht eindeutig bestätigt werden. Nach der retrograden Markierung der neuronalen Retinalen Ganglienzellen zeigten die *in vivo* Aufnahmen zwar eine vereinzelte gleichzeitige Anfärbung der Zellen mit NP aber keine komplette Doppelfärbung. Der Nachweis von Astrozyten & Müllerzellen oder Photorezeptoren & Bipolarzellen mittels immunohistochemischer Färbung führte aber auch zu keiner Doppelfärbung mit den fluoreszierenden Nanopartikeln (siehe Abb. 35). Bei der Analyse fällt jedoch auf, dass einige der rot-fluoreszierenden Strukturen mit Nanopartikeln teilweise mit den Zellen der Retina überlappen. Zur Lokalisierung der PBCA-Nanopartikel sind deshalb noch weitere Test notwendig um die entstanden Zellstrukturen einem Typ eindeutig zu zuordnen.

6.3 Determinanten für die Überwindung der Blut-Retina-Schranke

Zur Erforschung der entscheidenden Parameter der PBCA-Nanopartikel, die eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ermöglichen, wurden Partikelmodifikationen hinsichtlich der Größe, des Zetapotentials und des eingesetzten Tensides hergestellt und getestet. Die Notwendigkeit, einen stabilen Nanopartikel herzustellen bedingte allerdings, dass die verschiedenen Parameter nicht vollständig getrennt voneinander untersucht werden konnten. Die einzelnen Varianten der Partikel wurden in jeweils 3 Tieren getestet (Tabelle 07, Anhang).

6.3.1 Größe

In der Literatur gibt es verschiedene Thesen zur Verteilung und zum Transport der Nanopartikel, die meisten beschreiben dabei eine Limitierung der Größe der Partikel als vorteilhaft. Deshalb ist man bestrebt die Partikel so klein wie möglich herzustellen (<100nm), um so eine optimale Verteilung im Gewebe zu erzielen (Sarin *et al.*, 2008).

Zur Beurteilung des Einflusses der Größe auf die Verteilung wurden PBCA-Nanopartikel mit unterschiedlichen Größen (d.h. mittlere Partikelgröße) untersucht. So wurden z.B. kleine Partikel wie Lutrol-SDS-PBCA-NP (87nm) nach Injektion analysiert genau wie mittelgroße und sehr große DEAE-Dextran-Lutrol-PBCA-NP (190nm, 464nm). In der nachfolgenden Abbildung wird durch die ICON-Aufnahmen, die 5-6 min nach der Injektion gemacht wurden, deutlich, dass auch Nanopartikel mit einem sehr großen mittleren Partikeldurchmesser von 464nm die BRS überwinden. Die kleinen Lutrol-SDS-NP hingegen zeigten nur ganz vereinzelt fluoreszierende zelluläre Strukturen nach Injektion.

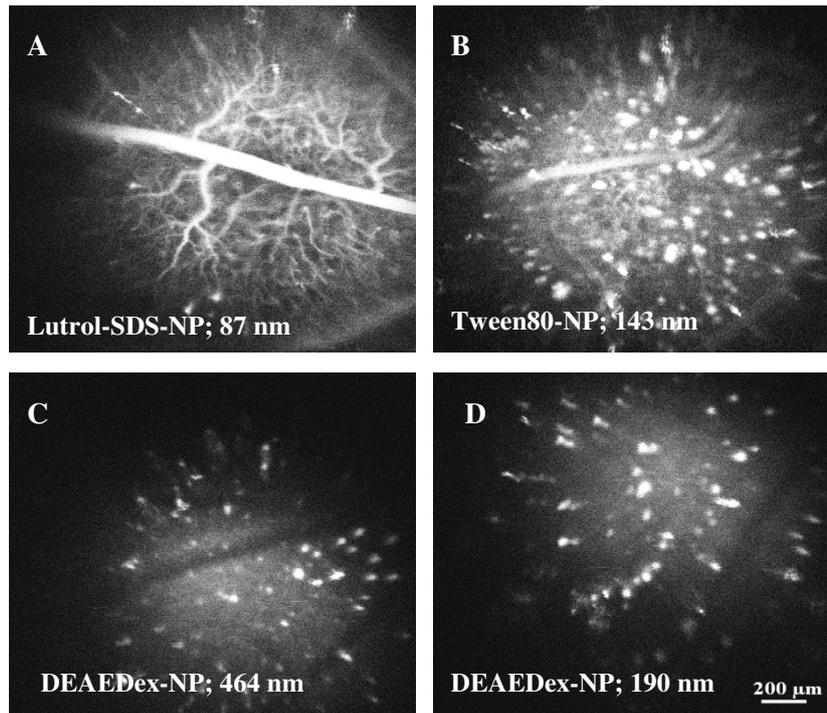


Abb. 36: Einfluss der Größe. ICON-Aufnahmen 5-6min nach Injektion von Nanopartikel verschiedener Größe. Maßstab 200µm

6.3.2 Zetapotential

Der Einfluss des Zetapotentials wurde getestet, indem Nanopartikel mit positivem und negativem Zetapotential hergestellt wurden und den Ratten unter dem ICON injiziert wurden. (Dabei spielte der Grad des positiven oder negativen Potentials eine untergeordnete Rolle). Den Tieren wurden negative Tween80- und Lutrol-Dextran-PBCA-NP und positive Tween80-Dextran- und DEAE-Dextran-Lutrol-PBCA-NP verabreicht. In allen Fällen wurden fluoreszierende zelluläre Strukturen festgestellt unabhängig von ihrem Zetapotential.

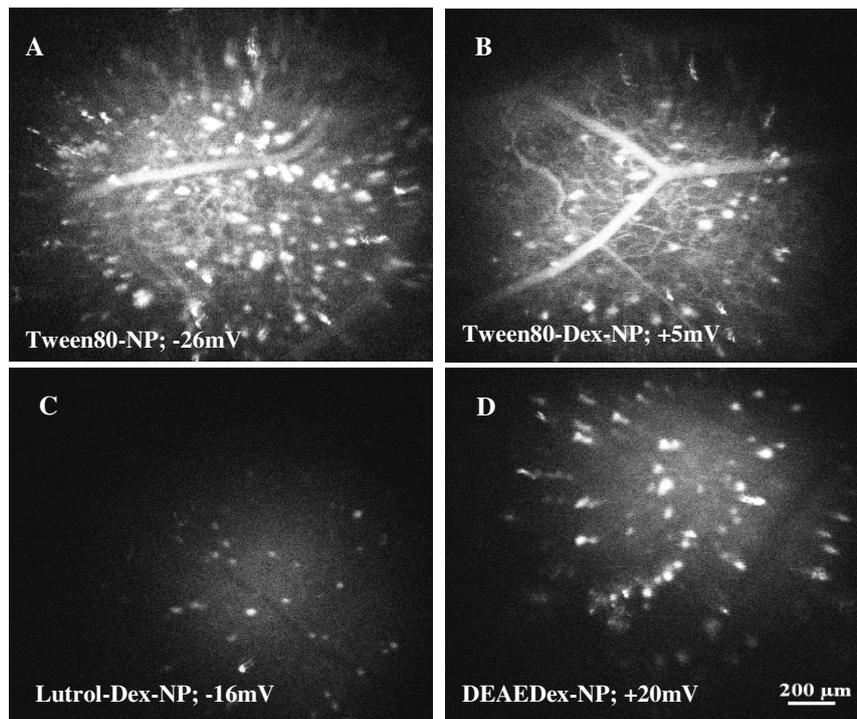


Abb. 37: Einfluss des Zetapotentials. Aufnahmen 5-6min nach Injektion von Nanopartikel mit positivem Zetapotential (B,D) und negativem Zetapotential (A,C). Maßstab 200µm

Nachdem keine Unterschiede in der Blut-Retina-Schrankengängigkeit zwischen NP mit positivem und negativem Zetapotential festgestellt werden konnte, wurde näher untersucht, ob das Zetapotential der NP durch den Kontakt mit physiologischen Flüssigkeiten (Blut) verändert wird. Hierfür wurden die NP mit Serum inkubiert, gewaschen und vermessen. Die Kontrollpartikel wurden nur in dest. Wasser inkubiert und anschließend gewaschen und vermessen. Die Tween80-PBCA-NP mit negativem Zetapotential blieben auch nach der Seruminkubation negativ, die positiven DEAE-Dextran-PBCA-NP waren dagegen nach Inkubation im Serum negativ. Bei den DEAE-Dextran-PBCA-NP wurde der Test wiederholt und das Ergebnis bestätigt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 05 dargestellt.

Tabelle 05: Zetapotential nach Seruminkubation

	Tween80	DEAE	DEAE	DEAE
Original	-14,5 mV	+24 mV	+16,6 mV	+16,6 mV
Kontrolle	-28,4 mV	+24 mV	+11,6 mV	+11,6 mV
Serum inkubiert	-38,4 mV	-5,5 mV	-8,6 mV	-16,5 mV

6.3.3 Tensid/Emulgator

Nachdem die Untersuchung der Größe und des Zetapotentials keine direkte Beeinflussung auf die Hirngängigkeit der PBCA-Nanopartikel zeigte, wurden der Einfluss der verwendeten Tenside und die damit verbundene Modifikation des Nanopartikels untersucht. Hierbei wurden verschiedene nichtionische und anionische Tenside, auch in Verbindung mit Dextran, hinsichtlich ihrer BHS-Gängigkeit getestet. Die kationischen Tenside konnten aufgrund von Herstellungsproblemen nicht erfolgreich im Tier getestet werden und wurden daher bei der Betrachtung nicht berücksichtigt.

Der Einfluss des verwendeten Tensides lässt sich in Abbildung 38 erkennen. Zwischen den nichtionischen Tensiden gab es kaum Unterschiede bezüglich der Hirngängigkeit. Bei allen NP, die mit Verbindungen dieser Gruppe hergestellt wurden, konnten fluoreszierende Zellstrukturen erkannt werden, allerdings mit unterschiedlicher Anzahl. Dies kann größtenteils durch den unterschiedlichen Partikelgehalt in der Suspension erklärt werden (Tabelle 07). Die Partikel mit Tween80 als Tensid sind auch nach 5min noch deutlich im Blutgefäß erkennbar. Interessanterweise konnten auch bei Nanopartikeln mit dem anionischen Tensid SDS fluoreszierende Strukturen festgestellt werden aber bei der Kopplung von SDS mit Lutrol oder Tween80 kam es zu einer drastischen Reduktion der erkennbaren fluoreszierenden Zellstrukturen auf 1-2 pro Bildausschnitt. Hier konnte eine längere Verweilzeit in den Blutgefäßen festgestellt werden was auf eine Akkumulation an den Gefäßwänden hindeutet.

Zur Quantifizierung der Übertrittseffizienz wurde die Anzahl der NP-markierten Zellen im Zählrahmen $500\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$ ausgewertet. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Nanopartikelmodifikationen (Feststoffgehalt $100\text{mg/ml} \pm 25$) und der Kontrolle (Rhodamin123). Auch zwischen den verschiedenen Partikeln sind Unterschiede erkennbar. So konnten bei Lutensol die meisten fluoreszierenden Strukturen erkannt werden und bei Brij35 und SDS die Wenigsten (Tabelle 06).

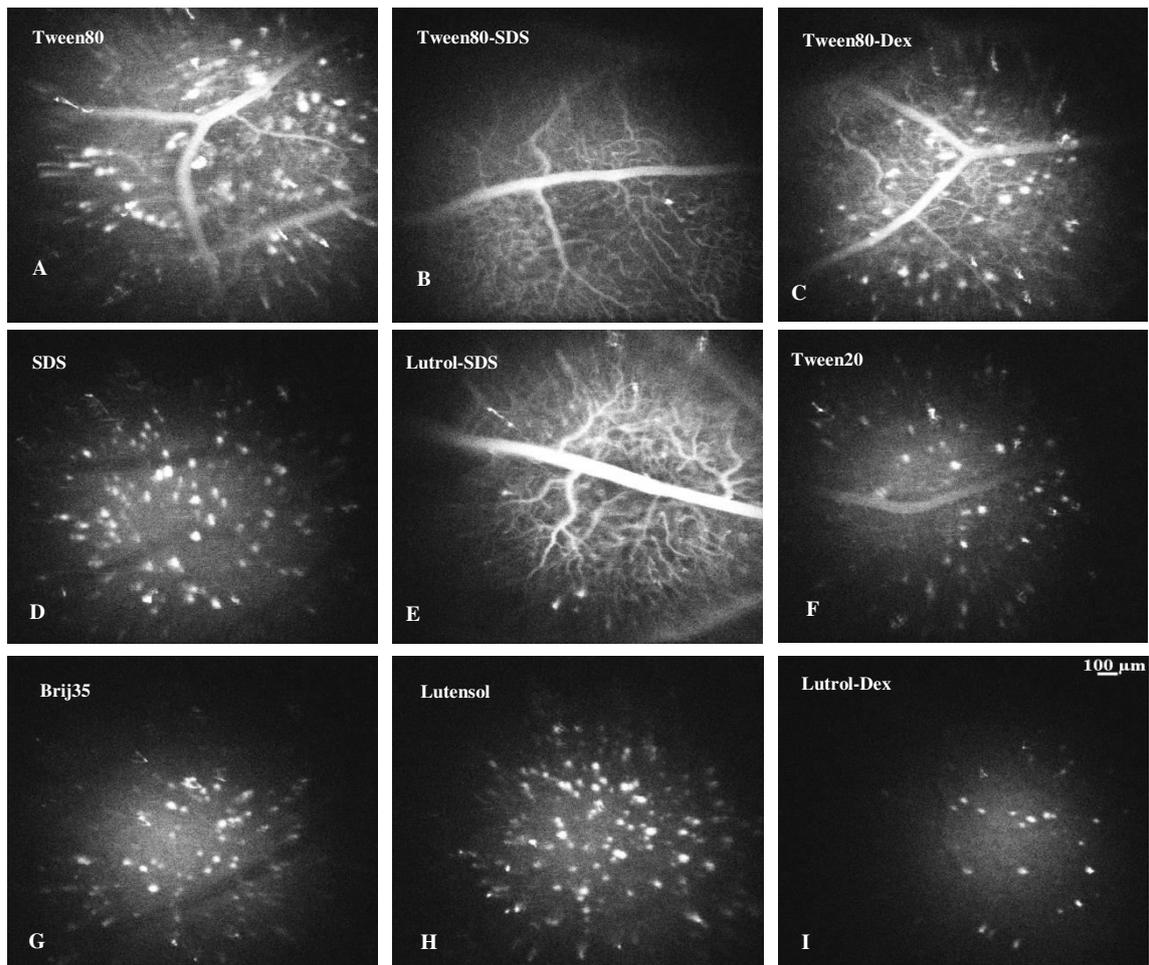


Abb.38: Einfluss des Tensides (Modifikation des Partikels). ICON Aufnahmen 5-6min nach Partikelinjektion. Die Nanopartikel mit Tensidkopplung, d.h. Tween80-SDS (B) und Lutrol-SDS (E), überwandern die BRS nur mit geringer Effizienz wo hingegen die anderen getesteten NP zahlreiche fluoreszierende Zellstrukturen erzeugten. Maßstab 100µm

Tabelle 06: Anzahl fluoreszierender Zellstrukturen im Zählrahmen

	Rho123	Tween80	SDS	Tween80-Dex	Brij35	Lutensol	Tween20
Anzahl NP-markierter Strukturen (Mittelwert)	0	5,11 ±2,57 ***	3,78 ±2,68 ***	3,67 ±2,12 ***	2 ± 2,00 **	8,22 ±2,95 ***	2 ±0,87 ***

Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle (Rho123) und Nanopartikelmodifikationen. (Durch den großen Unterschied im Feststoffgehalt fielen die Lutrol-SDS und Tween-SDS NP bei der Betrachtung heraus) (Varianzanalyse mittels One-way ANOVA mit posthoc Tukey t-Test; Unterschiedslevel ***p<0.001, **p<0.001)

6.3.4 Diskussion der Determinanten zur Überwindung der BHS

In der vorliegenden Arbeit wurden die spezifischen galenischen Eigenschaften der Nanopartikel in ursächlichen Zusammenhang gebracht mit ihrer Fähigkeit, die BHS zu überwinden. Auch Wohlfahrt *et al.* 2012 stellten die Hypothese auf, dass Größe, Ladung und Hydrophobizität die Aufnahme beeinflussen. Laut Fachliteratur ist die Größe der Partikel das wichtigste Kriterium für den Überwindung der BHS und aufgrund der Porengröße der extrazellulären Matrix ist die Bewegung im Zellzwischenraum auf Partikel mit einer Größe von $<100\mu\text{m}$ limitiert (Sarin *et al.*, 2008; Hülsemann *et al.*, 2009; Fung *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 1991; Lode *et al.*, 2001). Deshalb versuchen viele Forschergruppen ihre Partikel so klein wie möglich herzustellen (Nance *et al.*, 2012). Ein wichtiges Kriterium für die BHS-Passage kann aber auch die Ladung der Partikel sein, meist wird eine neutrale bis negative Ladung empfohlen (MacKay *et al.*, 2005; Thorne and Nicholson 2006).

Bei detaillierter Betrachtung dieser Faktoren konnte kein signifikanter Einfluss von Größe und Zetapotential auf die Anreicherung der NP im Gehirngewebe festgestellt werden. Es wurden bei sehr großen Lutensol- (422nm) und auch bei den großen positiven DEAE-Dextran-Lutrol- PBCA-NP (+8mV) zelluläre Strukturen erkannt. Daher kann die These „je kleiner desto besser“ hier nicht bestätigt werden. Nicht nur sehr kleine, negativ bis neutrale Partikel überwinden die BHS sondern auch große, positiv geladene Nanopartikel. Dies lässt den Schluss zu, dass Größe nicht das entscheidende Kriterium darstellt. Das Zetapotential fällt als wichtiges Einflusskriterium ebenfalls heraus, da gezeigt werden konnte, dass nach der Inkubation in Blutserum das Zetapotential in jedem Fall negativ ist.

Interessanterweise konnte eine Beeinflussung bei Verwendung unterschiedlicher Tenside festgestellt werden. Der Einsatz von nichtionischen Tensiden wie Tween80, Tween 20, Lutensol oder Brij35 führt zur Zellmarkierung in der Retina und somit zur Überwindung der Barriere. Bei der Kopplung von nichtionischen Tensiden mit dem anionischen Tensid SDS hingegen konnte die Effizienz des Übertritts im Vergleich zum ungekoppelten Einsatz der Tenside deutlich herabgesetzt werden. Ein Grund dafür könnte die Interaktion der Seitenketten der nichtionischen mit den anionischen sein. Dies könnte den Transport in dem Sinne beeinflussen, dass die Partikel mit den Endothelzellen interagieren, was die langanhaltende Färbung der Gefäße erklären würde. Die Kopplung von nichtionischen Tensiden mit Dextran zeigte keinen Einfluss auf die Blut-Hirn-Schrankengängigkeit. Bei der semiquantitativen Auswertung wurde deutlich, dass Tween80-, sowie auch Brij35-PBCA-NP zwar mit hoher Effizienz die BHS überwinden (wie auch von Kreuter *et al.*, 1997 berichtet) aber die Anzahl der Lutensol NP markierten Zellen sogar noch höher ist. Dies lässt die Hypothese zu, dass alle nichtionischen Tenside die gleiche physiologische Interaktion zulassen und ApoE aus dem Blut absorbieren und somit die BHS via spezifische Transportersysteme überwinden (Kreuter, 2001; Ren *et al.*, 2011; Kreuter *et al.*, 2002; Borchard and Kreuter, 1993).

Die getesteten Determinanten wie Größe und Zetapotential zeigten keinen direkten Einfluss auf die Blut-Hirn-Schrankengängigkeit. Einzig die bei der Herstellung der Partikel eingesetzten Tenside, die die Partikeloberfläche bestimmen, ließen eine Beeinflussung erkennen. Die nichtionischen Tenside und das getestete anionische Tensid SDS führen zur Aufnahme ins Gehirn, wohingegen eine Kopplung von nichtionischen und anionischen Tensiden dies behindert.

6.4 Transportmechanismen

Laut der Publikationen der Arbeitsgruppe um Prof. Kreuter (Kreuter *et al.*, 2002) erfolgt der Transport durch die BHS über die Rezeptorvermittelte Transzytose. Der Nanopartikel adsorbiert das Protein ApoE aus dem Blut. Mit dieser LDL Camouflage wird der Partikel an der Blut-Hirn-Schranke vom entsprechenden Rezeptor erkannt und über Transzytose über die BHS transportiert. Dies erfolgt aber vorrangig bei Tween80-beschichteten Nanopartikeln. Da kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Tensiden beim Übertritt über die BRS festgestellt werden konnten und auch nach der Injektion von Nanopartikeln ohne Tween viele zelluläre Strukturen im Gewebe sichtbar waren, wurde der Einstrom der Nanopartikel genauer betrachtet. Um die Frage zu klären was mit den Partikeln nach Injektion passiert, wurde das zelluläre Anfärben über die Zeit verfolgt.

6.4.1 Aufnahmemechanismus

Bei den PBCA-Nanopartikeln, die die BHS mit großer Effizienz überwinden, konnten erste fluoreszierende Zellstrukturen schon sehr schnell nach Injektion erkannt werden (Abb. 39): man kann sie schon nach ca. 1min nach dem Anfluten der Fluoreszenz in den Gefäßen erkennen. Interessanterweise sah man bei den sehr großen Partikeln wie DEAE-Dextran-Lutrol-PBCA-NP die ersten fluoreszierenden Zellstrukturen sogar schon kurz nach dem ersten Anfluten der Partikel in die Gefäße. Der Transport über die BHS erfolgte also sehr schnell.

Wie in Abbildung 39 dargestellt, geschieht die BHS-Passage der Nanopartikel innerhalb von Sekunden, was man eher einem schnellen Diffusionsvorgang zuordnen könnte als einem lang dauernden Transportmechanismus.

Es wurden daher Experimente zur Analyse einer möglichen Manipulation der Tight Junctions und Überwindung der BHS durchgeführt. Hierfür wurde die BRS durch eine hyperosmotische Lösung (Mannitol) geöffnet und nach 10min Nanopartikel mit geringerer BRS-Gängigkeit (Lutrol-SDS-PBCA-NP) i.a. appliziert und die Verteilung (Abb. 41) und die Größe der fluoreszierenden Zellstrukturen untersucht.

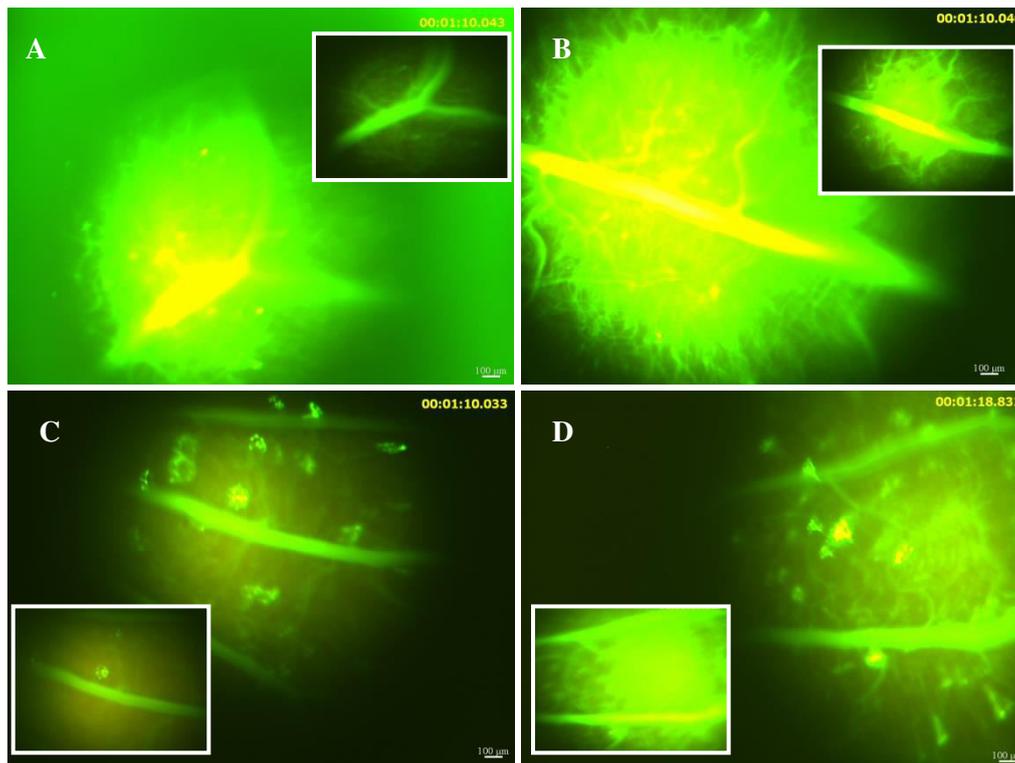


Abb. 39: Nanopartikeleinstrom. Die kleinen Rechtecke demonstrieren das erste Anfluten und die großen Bilder wurden ca. 1min nach ersten Anfluten aufgenommen. Bei Tween80-(A), DEAE-Dextran-(C) & SDS-(D) waren bei unter 1min schon deutliche fluoreszierende Strukturen zu erkennen und bei Lutrol-SDS-PBCA-NP (B) ist erwartungsgemäß die Fluoreszenz zum größten Teil in den Blutgefäßen erkennbar. Maßstab 100µm

Die durch hyperosmotische Öffnung in das Gewebe gelangten NP (Abb. 41A) zeigten eine Verteilung als große klumpige fluoreszierende Strukturen. Dazu im Vergleich wird der Farbstoff nach BHS-Öffnung ganz anders verteilt: man sah deutlich die Anlagerung an den Epithelzellen und die leichte nebelförmige Verteilung im Gewebe (Abb. 42C). Auch bei der Größenanalyse (Abb. 40) ergaben sich signifikante Unterschiede bei den fluoreszierenden Strukturen, je nachdem ob bei intakter oder bei Mannitol-kompromittierter BHS appliziert wurde. Die fluoreszierenden Strukturen der nach Mannitolapplikation injizierten Lutrol-SDS-PBCA-NP waren deutlich größer als die der Tween80- ($p < 0.05$ signifikant) und DEAE-Dextran-Lutrol-PBCA-NP ($p < 0.001$ hochsignifikant). Im Vergleich zu retrograd markierten RGZ (Mini Emerald & Mini Ruby, $p < 0.001$ hochsignifikant) waren alle fluoreszierenden Strukturen, die durch die Applikation von Nanopartikeln entstanden, signifikant größer.

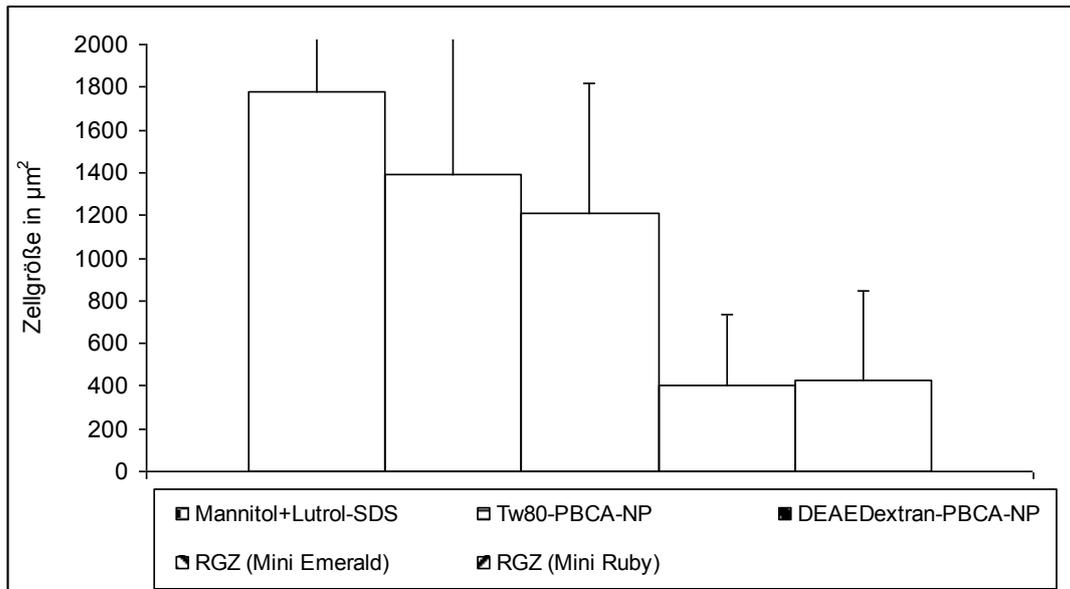


Abb.40: Größenunterschiede zwischen markierten Zellstrukturen. Deutliche Unterschiede zwischen retrograd markierten RGZ (Mini Emerald, Mini Ruby) und durch Nanopartikelinjektion entstandene fluoreszierende Zellstrukturen (Mittelwert). (Varianzanalyse mittels One-way ANOVA mit posthoc Turkey t-test) Signifikante Unterschiede zwischen RGZ & NP Strukturen ($p < 0.001$), genau wie zwischen Tween80-PBCA-NP & Mannitol+Lutrol-SDS-PBCA-NP ($p < 0.05$) und zwischen DEAE Dextran-Lutrol-PBCA-NP und Mannitol+Lutrol-SDS-PBCA-NP ($p < 0.001$) wurden festgestellt.

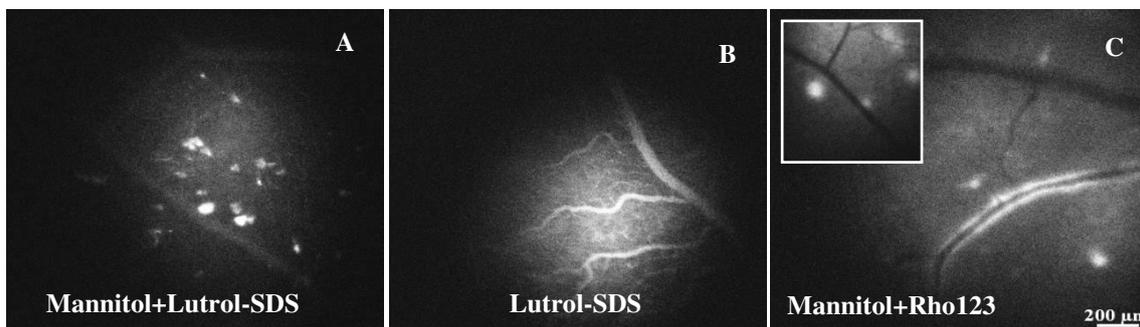


Abb. 41: Transportverhalten nach hyperosmotischer Öffnung der BRS. Durch hyperosmotische Öffnung der BRS erschienen fluoreszierende Zellstrukturen (A) nach Nanopartikelinjektion im Gegensatz zur Injektion von Rhodamin123 (C). Lutrol-SDS-NP ohne hyperosmotische Öffnung der BRS hingegen sind nur im Blutgefäß sichtbar (B). Maßstab 200µm

6.4.2 Zeitreihenversuche

Bei der Betrachtung der fluoreszierenden Zellstrukturen über eine Dauer von 3 Tagen konnte ein Rückgang der Anzahl markierter Strukturen festgestellt werden (Abb. 42).

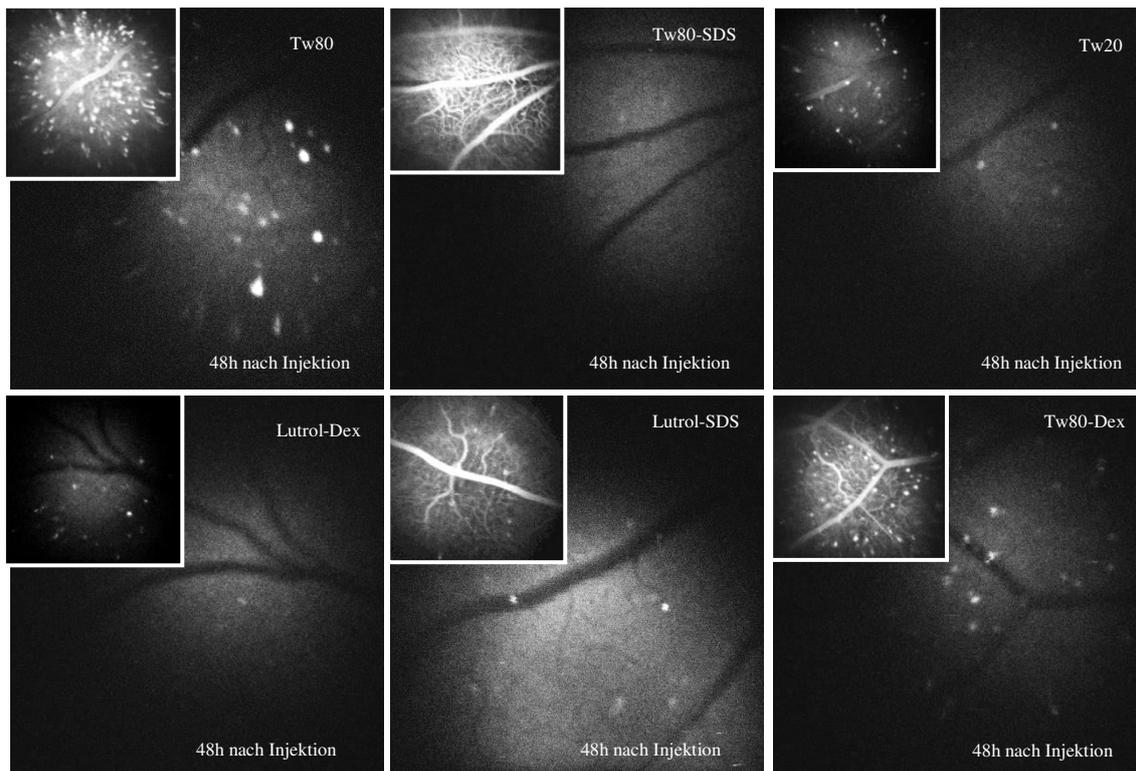


Abb. 42: Langzeitbeobachtung 48h nach Injektion. Rückgang der fluoreszierenden Zellstrukturen 48h nach Injektion. Bei Kopplung von 2 Tensiden (mittlere Reihe) erkennt man trotz kleinem Ausgangssignal immer noch gleiche Anzahl fluoreszierender Strukturen zum späten Zeitpunkt. Maßstab 200 μ m

Die kleinen Abbildungen in Abb. 42 zeigt die Verteilung 12-14min nach Injektion der Nanopartikel und zum Vergleich die Verteilung nach 48h. Die modifizierte Partikel mit 2 Tensiden, SDS mit Lutrol oder Tween verbleiben länger in den Blutgefäßen als die Partikel mit nur einem Tensid. Aber bei allen untersuchten Nanopartikeln waren nach 48h im Vergleich zu kurz nach der Injektion weniger fluoreszierende Zellstrukturen erkennbar. Bei den Tween80-PBCA-Nanopartikeln ist der Rückgang der Zellstrukturen deutlich geringer als bei Tween20-, Lutrol-Dextran- oder Tween80-Dextran-PBCA-NP. Die NP mit 2 Tensiden (Tween80-SDS & Lutrol-SDS) überwinden die BRS nur mit geringer Effizienz, aber die wenigen entstehenden fluoreszierenden Zellstrukturen bleiben auch nach 48h erhalten.

6.4.3 Diskussion des Transports von PBCA-Nanopartikel

Einige Forschergruppen haben Hinweise gefunden, dass PBCA-Nanopartikel ApoE aus dem Blut adsorbieren, so LDL nachahmen und durch die Rezeptorvermittelte Transzytose über die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden (Kreuter *et al.*, 2001-2002). Möglich wäre aber auch die passive Diffusion bei der sich der Partikel an die luminal Seite der Endothelzellen anlagert, die gebundene Substanz freigegeben wird, eigenständig durch die Endothelzellen diffundiert und sich im Gewebe verteilt. Weiterhin könnten die NP die Tight Junction öffnen oder beeinflussen, was zum Einstrom der Partikel führt.

Zur Klärung des Mechanismus wurde zunächst der Einstrom der Partikel betrachtet. Schon sehr schnell, d.h. 1min nach dem ersten Einstrom der Nanopartikelösung in die Gefäße, konnten fluoreszierende Zellstrukturen erkannt werden und innerhalb von 5-10 min war die Verteilung vollständig abgeschlossen. Aufgrund der sehr schnellen Verteilung wurde ein Experiment zur Untersuchung der Manipulation der Tight Junctions als möglicher Transportweg durchgeführt. Hierbei wurde die BHS durch die Injektion von Mannitol hyperosmotisch geöffnet und im Abstand von 10min Nanopartikel mit schlechter Blut-Hirn-Schrankengängigkeit injiziert. Mannitol bewirkt das Schrumpfen der Endothelzellen und somit die Öffnung der Tight Junction, sodass Substanzen unspezifisch hindurch diffundieren können (Rapoport, 1988; Friden, 1996). Hierbei konnte ein deutlicher Unterschied in der Verteilung zwischen NP, die mit und ohne hyperosmotische Öffnung die BHS überwinden, zur Kontrolle (nur Rhodamin) festgestellt werden. Durch die Öffnung der BHS entstanden nach der Injektion von NP mit schlechter Blut-Hirn-Schrankengängigkeit große zellähnliche runde Strukturen im Gewebe der Retina welche sich deutlich von der nebelartigen Verteilung des Farbstoffes im Gewebe nach hyperosmotischer Öffnung unterscheiden. Dies schließt eine Bindung der NP an Endothelzellen und die Trennung des Farbstoffes vom Partikel als Übertragungsweg aus. Bei der Analyse der Größen der fluoreszierenden Strukturen ergaben sich signifikante Unterschiede. Hierbei wurden als Vergleichsstandard Retinale Ganglienzellen retrograd markiert und vermessen. Die Analyse der Größe der entstandenen Zellstrukturen zeigte zwar signifikante Unterschiede zwischen den mit Nanopartikeln angefärbten Strukturen nach Öffnung der BHS und ohne Öffnung der BHS aber auch noch deutlichere Unterschiede zu den retrograd gefärbten Retinalen Ganglienzellen, welche signifikant kleiner waren als alle NP-gefärbten Strukturen. Eine plausible Erklärung für die Unterschiede zwischen den NP-angefärbten Strukturen mit und ohne BHS Manipulation könnte eine erhöhte unspezifische Durchlässigkeit der BHS und den damit verbundenen vermehrten Einstrom der Nanopartikel nach Öffnung der Tight Junctions durch Mannitol sein. Der fast 3fache Größenunterschied zwischen retrograd markierten und durch Nanopartikel markierten Zellen lässt sich auf die unterschiedlichen Wege der Markierung zurückzuführen und deutet nicht zwingend auf unterschiedliche Strukturen hin (allerdings zeigten die Versuche mit der Doppelfärbung keine vollständige Überlappung von NP Färbung und Retinalen Ganglienzellen). Bei der retrograden Markierung der Neurone wird der Farbstoff in den Superior Colliculi injiziert und von da aus über Axone in das Soma der Retinalen Ganglienzellen transportiert. Eine mögliche Erklärung für die deutlich geringere Größe dieser Zellen könnte der lange Weg und die begrenzte Menge an Farbstoff sein, welche zu einer Teilfärbung des Somas führen können. Nach diesen Ergebnissen ist es durchaus denkbar, dass die Nanopartikel im Ganzen, ohne Trennung vom Farbstoff durch gezielte Beeinflussung der Tight Junctions die BHS überwinden und sich zellulär verteilen. Aber auch schon Kettiger verdeutlichte in seiner Publikation (Kettiger *et al.*, 2013) über die möglichen Aufnahmewege von Nanopartikeln in einzelne Zellen, dass verschiedene Wege von den unterschiedlichen Partikeln genutzt werden. Und so ist es aufgrund der Komplexität der BHS durchaus vorstellbar, dass nur ein Zusammenspiel der verschiedenen Transportwege einen effizienten Transport

über die Blut-Hirn-Schranke ermöglichen und je nach Eigenschaften und Beschaffenheit der Nanopartikel einem speziellen Weg zugeordnet werden können.

Interessanterweise konnte bei der Betrachtung der mit fluoreszierenden NP gefärbten Strukturen über die Zeit ein Rückgang der Fluoreszenzintensität nach 48h beobachtet werden. Theoretisch sind 2 Optionen für den Weg nach BHS Überquerung für die NP denkbar: (i) die Nanopartikel werden aus den Zellen und später aus dem Gehirn über Effluxpumpen als Ganzes (mit Farbstoff) exportiert oder (ii) im Gehirn abgebaut und die Abbauprodukte einzeln über Effluxpumpen abtransportiert. Der Rückgang der angefärbten Strukturen deutet auf ein Ausschleusen der Nanopartikel aus der Zelle und auf den Abbau in anderen Zellen hin. Wenn man von der Tatsache ausgeht, dass der Abbau der Nanopartikel in den markierten Zellen selbst oder in anderen Zellen innerhalb des Gehirns stattfindet, müsste der Fluoreszenzfarbstoff in den Zellen auch nach 48h - wie auch in retrograd markierten Zellen - sichtbar sein (Roussou *et al.*, 1999). Da dies nicht eindeutig der Fall ist, kann spekuliert werden, dass Option (i) zutrifft und die Nanopartikel als Ganzes aus dem Gehirn exportiert werden. Um den Weg der Nanopartikel nach der BHS-Passage eindeutig zu klären, sind noch Tests notwendig. Grislain zeigte bereits 1983 an Hand von radioaktivmarkierten Isobutylcyanoacrylat Partikeln, dass nach intravenöser Gabe die Partikel schnell (innerhalb von 7 Tagen) in Geweben mit hoher Anzahl von Zellen des Retikuloendotheliales Systems (Leber, Milz & Knochenmark) angereichert werden (Grislain *et al.*, 1983). Auf dieser Basis könnten weitere Untersuchungen zum Abbau durch zeitnahe Nachverfolgung der Partikel nach BHS-Überquerung im Gehirn und später im Körper folgen.

6.5 Toxizität und toxische Effekte

Die Toxizität der PBCA-Nanopartikel wurde *in vitro* und *in vivo* bestimmt. Bei dem *in vitro* Test wurde die Vitalität der HEK293 und HeLa Zellen nach NP Zugabe mit Hilfe des MTT-Tests ermittelt. Da Experimente in der Zellkultur nicht vollständig übertragbar und somit nur bedingt aussagekräftig sind, wurden darüber hinaus *in vivo* Studien durchgeführt. Hierfür wurden den Ratten wiederholt NP verabreicht und die Auswirkung auf zellulärer und anatomischer Ebene und auf das allgemeine Verhalten untersucht. Zusätzlich wurde auch die Möglichkeit der Inhibition der Effluxpumpen durch die Nanopartikel und den sogenannten Door-opener Effekt genauer betrachtet.

6.5.1 MTT-Test

Der MTT-Test dient zur Bestimmung der Vitalität der Zellen nach Substanzverabreichung. Es wurden verschiedene Nanopartikelmodifikationen in verschiedenen Konzentrationen getestet. Der Test wurde an 2 Zelllinien den HEK293-Zellen und HeLa-Zellen zum Ausschluss möglicher Zelllinien-spezifischer Reaktionen durchgeführt.

Bei der Untersuchung der Nanopartikelsuspensionen (Tween80-, Lutrol-SDS-, Tween80-Dextran-, DEAEDextran-Lutrol- & Lutrol-Dextran-PBCA-NP 0,5µl/ml bis 5µl/ml) konnte eine konzentrationsabhängige Toxizität festgestellt werden. Dabei gab es signifikante Unterschiede zwischen den Nanopartikelmodifikationen (Abb. 44) in Abhängigkeit von der Konzentration und der jeweiligen Zelllinie. So lag die LD₅₀ bei Tween80 zum Beispiel bei HEK293 Zellen bei 1µl/ml und bei HeLa Zellen bei 1,5µl/ml. Bei Lutrol-SDS war der Unterschied noch größer. Ähnlich verhalten sich die Zelllinien bei DEAEDextran-Lutrol, wo der Unterschied zwischen den Zelllinien bei einer Konzentration von 1µl/ml liegt. Bei Lutrol-SDS ist der Unterschied noch größer. Die LD₅₀ liegt hier bei den HEK293 Zellen bei 2,5µl/ml und bei den HeLa Zellen erst bei 4,5µl/ml. Auch der Unterschied der LD₅₀ zwischen den Zelllinien beträgt bei den DEAEDextran-Lutrol- und Lutrol-Dextran-PBCA-NP 1µl/ml. Zur genaueren Betrachtung wurden daher nachfolgend die Nanopartikel bezogen auf ihren Feststoffgehalt (10µg/ml bis 100µg/ml) mit den Zellen kultiviert und die Vitalität bestimmt (Zellviabilität) (Abb. 43). Hierbei ergaben sich ebenfalls große Unterschiede zwischen den Zelllinien und auch konzentrationsabhängige zwischen den Nanopartikelmodifikationen.

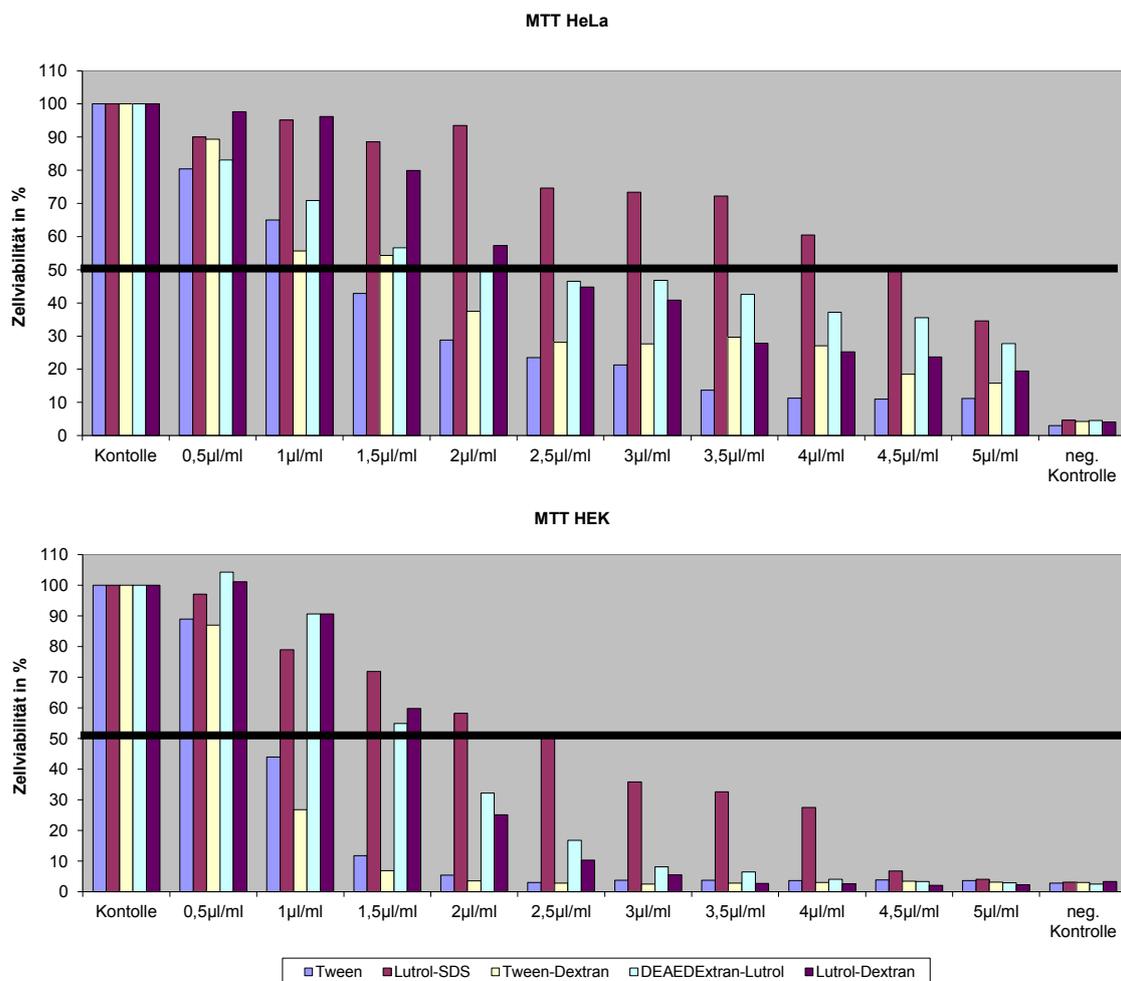


Abb. 43: Vorversuche zur konzentrationsabhängigen Toxizität der PBCA-NP. Toxizität der NP mit verschiedenen Tensiden im Vergleich zwischen HEK293 und HeLa Zellen. Tween80- (A), Lutrol-SDS- (B) & DEAEDextran-Lutrol-PBCA-NP (C)

So reagierten die HEK293 viel stärker auf die NP und zeigten schon bei 40µg/ml hoch signifikante Unterschiede ($p < 0.01$) zwischen den verschiedenen Nanopartikelmodifikationen. Indes konnten bei den HeLa Zellen höchst signifikante Unterschiede bei 60µg/ml detektiert werden ($p < 0.001$). Lutrol-SDS-PBCA-NP waren in beiden Zelllinien signifikant toxischer als die mit Dextran hergestellten Partikel (Tween80-Dextran- & Lutrol-Dextran-PBCA-NP). Die LD_{50} wurde für die Lutrol-SDS-Partikel bei den HeLa Zellen aber erst bei sehr hohen Konzentrationen (90-100µg/ml) erreicht und bei HEK Zellen bei einer Konzentration von 60µg/ml. Ein Rückgang der Zellviabilität unter 50% der mit Nanopartikel mit Dextrankombination inkubierten Zellen wurde bei HEK Zellen erst bei Konzentrationen von >80µg/ml entdeckt. Bei den HeLa Zellen hingegen konnte bei Tween-Dextran- oder Lutrol-Dextran-PBCA-NP innerhalb der getesteten Konzentration keine Zellviabilität von 50% oder kleiner detektiert werden. Bei beiden Zelllinien weisen die Nanopartikel, welche in Kombination mit Dextran (Tween80-Dextran & Lutrol-Dextran) produziert wurden sind, eine geringere Toxizität auf als die ohne Dextran (Tween80 & Lutrol-SDS). Die spezifischen Eigenschaften der Partikel wie Größe oder Zetapotential jedoch scheinen für die Toxizität irrelevant zu sein.

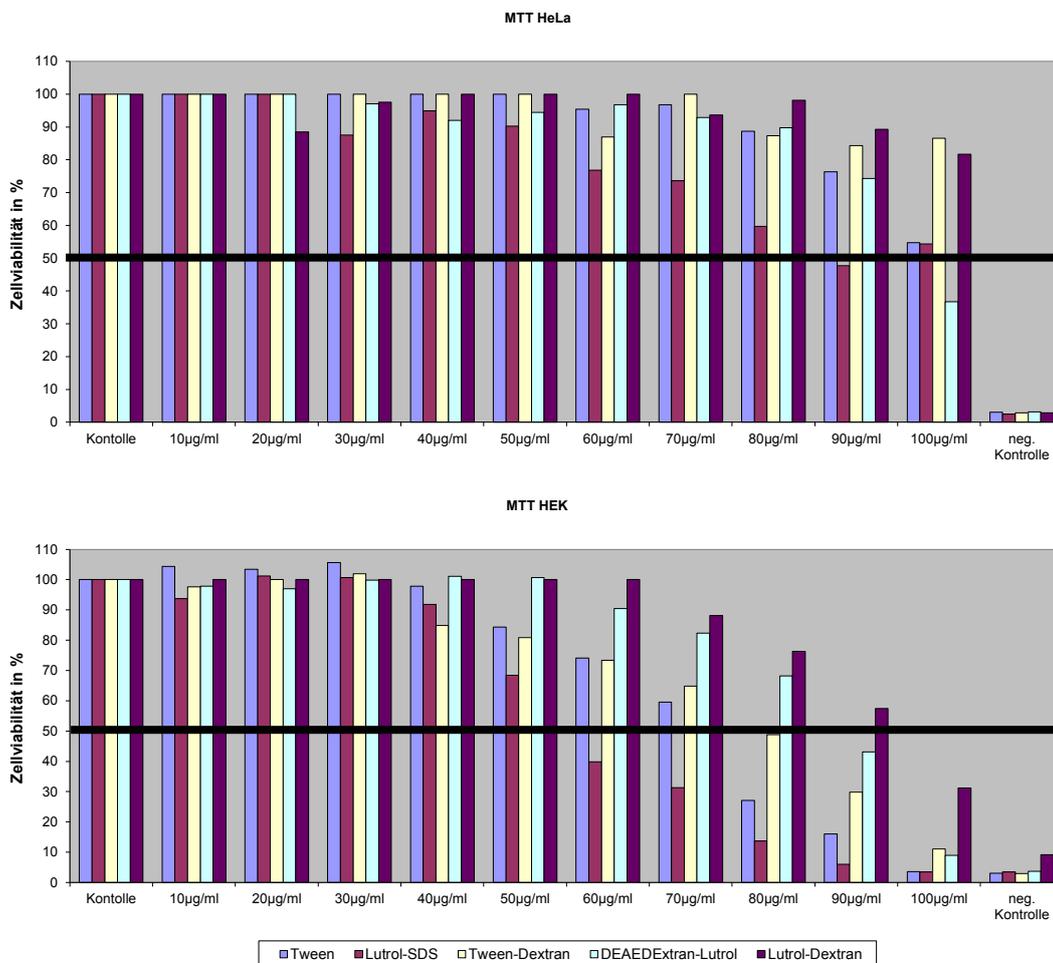


Abb. 44: *In vitro* Toxizitätstest (MTT-Test). Eine Toxizität der NP war bei sehr hohen Konzentrationen erkennbar. HEK 293 Zellen (unteres Diagramm) reagierten deutlich stärker auf die NP als HeLa Zellen (oberes Diagramm).

Zusammenfassend zeigte der *in vitro* Toxizitätstest, dass sich Unterschiede zwischen den Nanopartikelmodifikationen in Hinblick auf die Tensidmischung bei hohen Konzentrationen ergaben, die nicht in pharmakologisch relevanten Bereichen liegen. Deshalb folgte eine Langzeit *in vivo* Studie um mögliche toxische Effekt im Tier zu untersuchen.

6.5.2 *In vivo* Studie

Bei dem *in vivo* Test wurde die Reaktion der Retinalen Ganglienzellen nach Injektion der Nanopartikel (Tween80- & Tween80-SDS-PBCA-NP) untersucht. Die Tiere erhielten insgesamt 4 Dosen a 0,1ml/100g. Als Negativkontrolle diente die durch Sehnervquetschung (ONC) induzierte Schädigung der Retinalen Ganglienzellen, wodurch der langsame Zelltod verdeutlicht wurde. Als Schein-behandelte Kontrolle diente die Injektion des Fluoreszenzfarbstoffs Rho123 (keine NP). Wöchentlich wurde bei den Ratten das Gewicht, Verhalten (gesteigerte Aggressivität oder Angst), Gang und externe Veränderung überprüft. Am Ende wurden Leber, Niere, Herz und Hirn auf offensichtliche anatomische Veränderungen wie Tumore oder Korrosion untersucht.

Es konnten keine Auffälligkeiten oder Veränderungen beim Gewicht (Abb. 46), Verhalten, Gang oder andere externe Veränderungen wie Haarausfall bei den Ratten festgestellt werden. Auch die Organe wie Niere, Herz und Hirn wiesen keine äußeren Veränderungen auf. Bei der Betrachtung der Leber (2 Tiere pro Gruppe, Stichprobe) konnten ebenfalls morphologisch keine Auffälligkeiten festgestellt werden (Abb. 45).

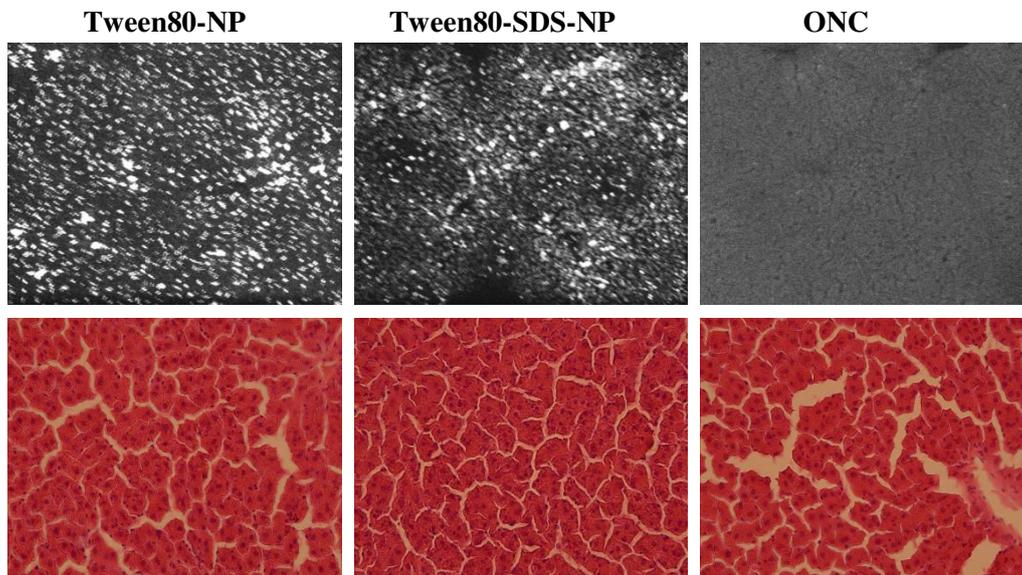


Abb. 45: Leberschnitte nach wiederholter NP-Applikation. Leberschnitte 20 μ m nach 4maligen Tween80- (1.Reihe), Tween80-SDS-PBCA-NP (2.Reihe) Verabreichung und Sehnervquetschung ONC (3.Reihe). Obere Reihe Laser-Scanning-Mikroskop Aufnahmen und untere Reihe histologische Färbung (H.E.)

Auch auf zellulärer Ebene kam es nicht zum Absterben der Retinalen Ganglienzellen wie nach einer Schädigung (ONC), die zu einer Sterberate von 81,67% führte, sondern die Anzahl der Retinalen Ganglienzellen blieb unverändert auch nach 5 Wochen bei 100% (Verlauf Abb. 47, Diagramm Abb. 48).

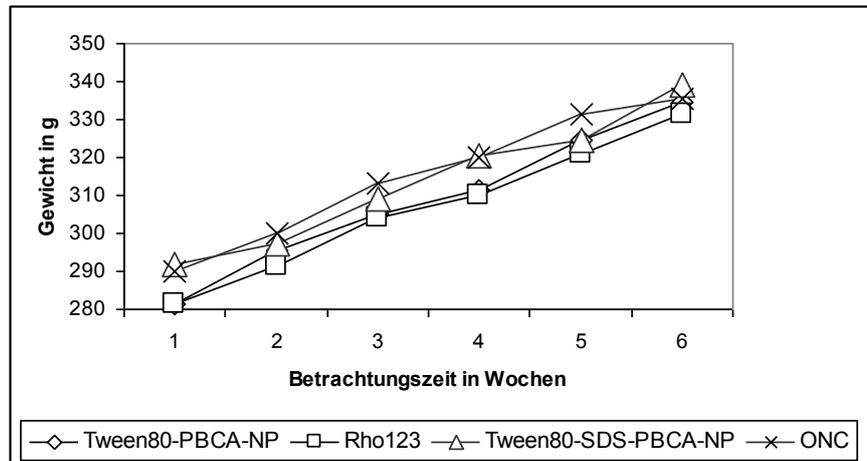


Abb. 46: Übersicht Gewichtszunahme der Ratten. Alle Gruppen nehmen ohne Auffälligkeiten im gleichen Maße zu.

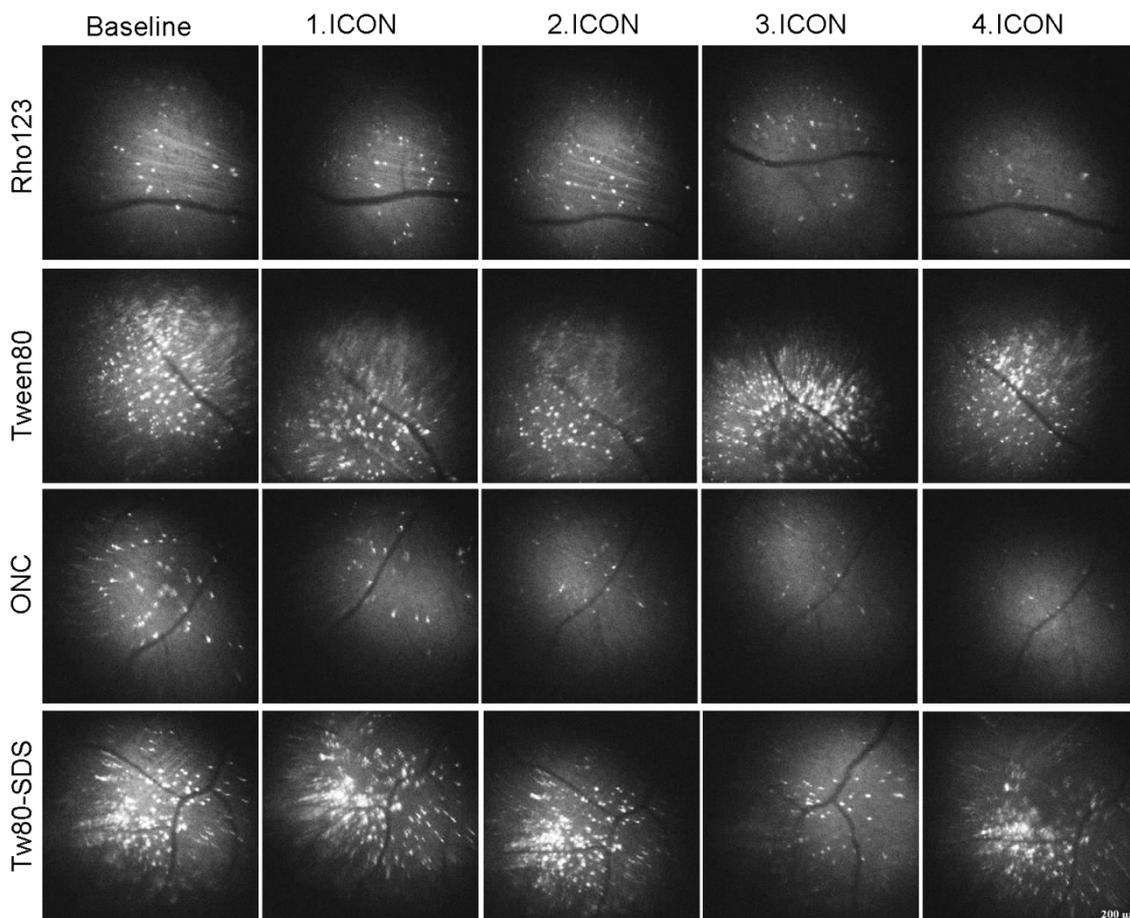


Abb. 47: ICON-Verlaufsaufnahmen der *in vivo* Toxizitätsstudie. Die Fotos demonstrieren die gleichbleibende Anzahl bei den Kontrolltieren und den Tieren denen PBCA-Nanopartikeln verabreicht wurden (Tween80- & Tween80-SDS-PBCA-NP). Bei den Tieren mit ONC (Sehnervquetschung) kam es zum Absterben von 81,67%. Maßstab 200µm

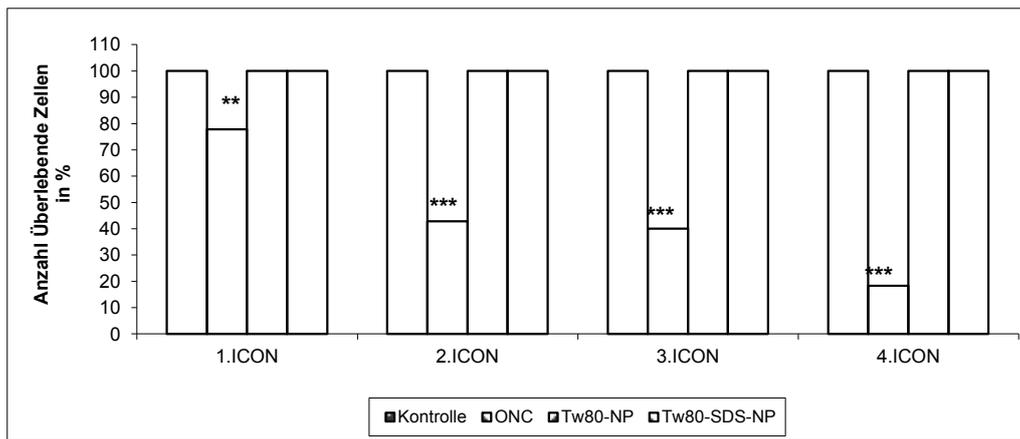


Abb. 48: Überlebensrate der Retinalen Ganglienzellen (RGZ). RGZ Anzahl nach Behandlung im Vergleich zur Erstaufnahme keine Unterschiede außer erwartungsgemäß einen signifikanter Rückgang der RGZ Anzahl nach ONC (Sehnervquetschung). (Varianzanalyse mittels One-way ANOVA mit posthoc Tukey t-Test; Unterschiedslevel ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$)

Bei der detaillierten Betrachtung der Somagröße (Abb.: 49) und Fluoreszenzintensität (Abb.: 50) relativ zum Ausgangswert konnten deutliche Unterschiede festgestellt werden, wobei die Tendenzen der Verläufe sich ähneln. Aus technischen Gründen standen keine Daten für das 4.ICON zur Verfügung. Außerdem gab es bei der Gruppe mit Sehnervquetschung (ONC-Gruppe) nicht genügend überlebende Neurone zur Quantifizierung der Größe und der Fluoreszenzintensität am 3ten ICON Messpunkt. In der Abbildung 50 wird der Rückgang der Somagröße für alle Gruppen verdeutlicht. Die Abnahme der Somagröße der ONC-Gruppe (neg. Kontrolle) verstärkt sich im Laufe der Zeit nach der Schädigung: sie war am 7.Tag war signifikant kleiner ($p < 0.05$) verglichen zum 2.ICON nach 14.Tagen. Das Schrumpfen der Zellen der Tween80-Gruppe war beim 2.ICON zwar marginal signifikant ($p < 0.1$) weniger im Vergleich zur ONC-Gruppe und über die Zeit des Experiments war sie unverändert auf gleichem Niveau. Die Zellen der Tween80-SDS-Gruppen erreichten am 3.ICON wieder ihre Ausgangsgröße, ganz im Gegensatz zur Kontrollgruppe mit axonalem Schaden, bei der die Neurone nach der Läsion degenerierten. In der positiven Kontrollgruppe (Tiere nur mit dem Farbstoff Rho123) und in der Tween80-Gruppe war - auch im Gegensatz zur ONC Gruppe mit signifikant schrumpfenden Neuronen - die Zellgröße über den betrachteten Zeitraum relativ konstant im Gegensatz zur ONC-Gruppe, wo die Neurone schrumpfen, oder zur Tween80-SDS-Gruppe, bei der die Zellen nach einem signifikanten Rückgang ($p < 0.05$) ihre Ausgangsgröße erreichen.

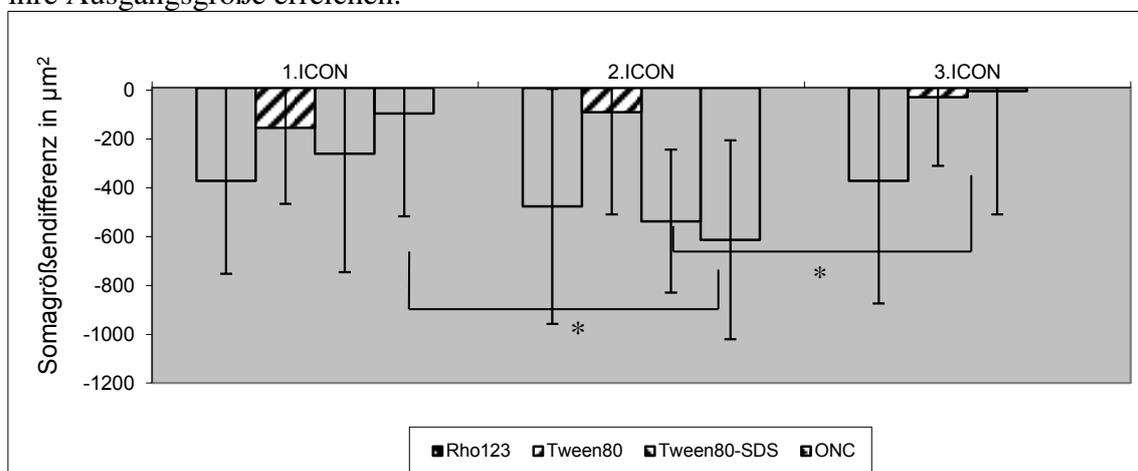
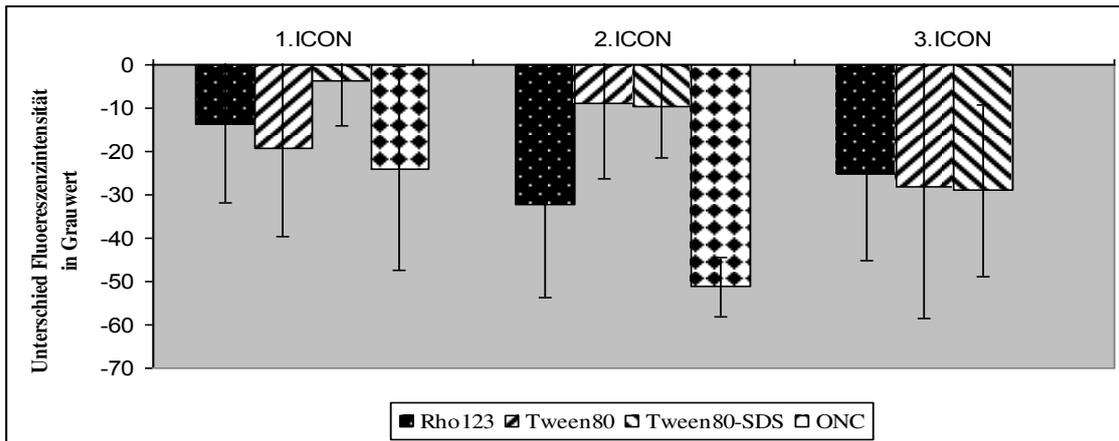


Abbildung 49: Mittelwert der Somagröße der RGZ relativ zum Ausgangswert. (One-way ANOVA mit posthoc Tukey t-Test; * $p < 0.05$,)

Interessanterweise ergab sich auch ein Rückgang der Fluoreszenzintensität (Abb.50) aller Gruppen über die Zeit. Die Kontrolltiere, welche nur den Fluoreszenzfarbstoff verabreicht bekamen, zeigten eine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität. Keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität gab es zwischen den Nanopartikel behandelten Tieren und den Kontrolltieren am 1ten und 3.ICON. Jedoch war die Entwicklung der Fluoreszenzintensität über die Betrachtungszeit dazwischen unterschiedlich: speziell am 2.ICON ist die Fluoreszenzintensität der Neurone der mit Nanopartikel behandelten Tiere signifikant höher als die der Kontrollen. Bei der Fluoreszenzintensität der Neurone der ONC-Gruppe ergab sich ein stetiger Rückgang, welcher am 2.ICON seinen Höhepunkt erhielt.



Statistik	Rho-Tw80	Rho-ONC	Rho-Tw80SDS	Tw80-Tw80SDS	Tw80-ONC	ONC-Tw80SDS
1. ICON						*
2. ICON	**		*		***	***
3. ICON						

Statistik	2.ICON-1.ICON	3.ICON-1.ICON	3.ICON-2.ICON
Rho123	*		
Tween80			
Tween80-SDS		***	*
ONC	**		

Abb. 50: Fluoreszenzintensität der Retinalen Ganglienzellen (RGZ) relativ zum Ausgangswert. (Varianzanalyse mittels One-way ANOVA mit posthoc Tukey t-Test; Unterschiedslevel *p<0.05, **p<0.01 und ***p<0.001)

6.5.3 Door-opener Effekt

Zur Prüfung des möglichen unkontrollierten Einstroms von Substanzen nach Partikelinjektion durch Inhibition der P-Glycoproteine wurden den Tieren zuerst Nanopartikel ohne Fluoreszenzfarbstoff injiziert und im Abstand von 5min Rhodamin123. Hierbei konnten keine bleibenden fluoreszierenden Strukturen bei Tween80- und Lutrol-SDS-PBCA-NP außerhalb des Blutes festgestellt werden (Abb. 51). Auch bei Injektion des Farbstoffes unmittelbar nach Partikelapplikation konnten ebenfalls keine angefärbten Zellstrukturen erkannt werden. Da kein Farbstoff außerhalb der Blutgefäße sichtbar war, kann von der These eines unspezifischen Eindringens von Substanzen nach Partikelinjektion und somit eines Hervorrufens von indirekten toxischen Effekten, Abstand genommen werden

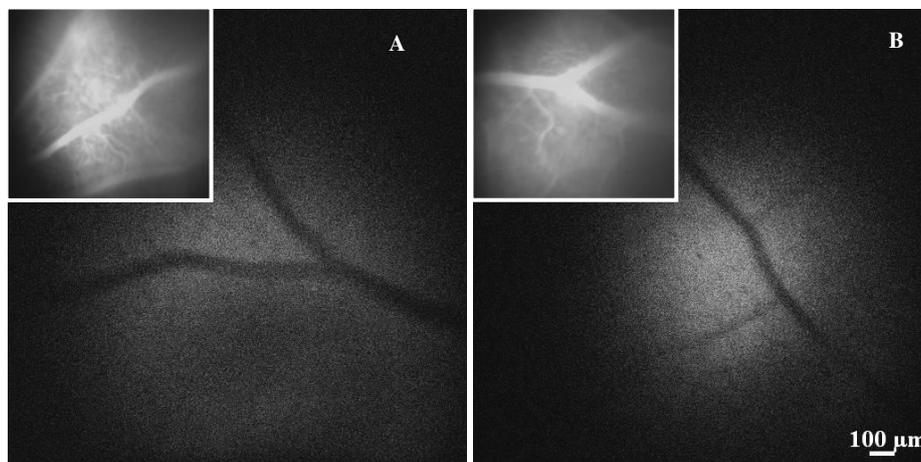


Abb. 51: ICON Bilder Door-opener Effekt. Zuerst Tween80- (A) oder Lutrol-SDS-PBCA-NP (B) und 5min später Rhodamin123. Maßstab 100µm

6.5.4 Diskussion zu Toxizität

Der Einsatz von PBCA-Nanopartikeln als Arzneimittelträger bei Patienten mit Erkrankungen des ZNS bedarf den Nachweis der Unbedenklichkeit und einer guten Verträglichkeit mit kaum bis gar keinen Nebenwirkungen. Die Klärung der Toxizität oder mögliche indirekte toxische Effekte sind daher essentiell.

Für eine erste Einschätzung der Toxizität von Nanopartikeln werden *in vitro* Testsysteme bevorzugt und der Zellviabilitäts-Test (MTT-Test) bietet einen allgemeinen Eindruck über die Toxizität (Hussain *et al.*, 2005). Bei den Untersuchungen zur akuten Toxizität in der Zellkultur mit Hilfe des MTT-Tests konnten zwar leichte Unterschiede zwischen PBCA-Nanopartikeln produziert mit Dextran und denen ohne festgestellt werden, diese wurden jedoch nur in sehr hoher Konzentration sichtbar. Es konnten außerdem Unterschiede in der Sensitivität der Zelllinien festgestellt werden. HeLa sind Zervixkarzinomzellen und von Hause aus robuster als die Leberzelllinie HEK293, was die Unter-

schiede in den Ergebnissen zwischen den Zelllinien erklärt. Die Resultate von beiden Testsystemen zeigen jedoch übereinstimmend, dass von einer dosisabhängigen Toxizität ausgegangen werden kann. Auch Hussain *et al.*, 2005 zeigten in der Zellkultur mit Hilfe vom MTT- und LDH-Test (Laktathydrogenaseaktivitätstest) einen dosisabhängig erhöhten Stresslevel durch Nanopartikelapplikation. Im Review von Suh 2009 werden detailliert die möglichen Bedrohungen, die von der Toxizität von verschiedenen Nanomaterialien ausgehen (Nanotubes oder Partikel) erläutert. Die meisten zitierten Autoren beschreiben ebenfalls eine dosisabhängige Toxizität (Wang *et al.*, 2007a; Sayes *et al.*, 2006; Hussain *et al.*, 2005; Son *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007). Einige bescheinigen den getesteten Materialien jedoch eine Non-Toxizität wie Rieter *et al.*, 2007a, b; Bottini *et al.*, 2007 und Brunner *et al.*, 2006. Vor allem die Hinweise auf Non-Toxizität unterstützen eine mögliche Anwendung der Nanopartikel als Träger von Pharmaka für therapeutische Anwendung.

In der vorliegenden Arbeit wurden über diese *in vitro* Tests hinaus *in vivo* Langzeituntersuchungen zur Toxizität durchgeführt. Bei diesen *in vivo* Studien zur chronischen Toxizität mit wiederholter Verabreichung von PBCA-Nanopartikeln zeigten die Tiere während der normalen, täglichen Versorgung keine offensichtlichen Auffälligkeiten wie Fellveränderungen, Änderungen der Mobilität oder aggressives Verhalten. Auch bei der späteren Untersuchung der Tiere konnten keine Veränderungen oder Wucherungen entdeckt werden, die auf Tumore oder ähnliche Abnormalitäten, welche durch die Applikation von Nanopartikeln verursacht worden sein könnten, hindeuten. Auch Lherm *et al.*, 1992 konnten nach der intravenösen Verabreichung von PBCA-Nanopartikeln bei Wistar-Ratten keine Veränderungen des Gewichts, der Serum-Parameter oder der Organe und Gewebe feststellen.

Eine eindeutig veränderte Reaktion der Retinalen Ganglienzellen aufgrund der Applikation der Nanopartikel wie ein erhöhtes Stresslevel, welches zum Absterben der Zellen führt, wie es in der negativen Kontrollgruppe (ONC-Gruppe) sichtbar war, konnte nicht erkannt werden. Bei der detaillierten Betrachtung der ICON- Daten der Retinalen Ganglienzellen zeigten sich zwar kleine Unterschiede bei der Somagröße und Fluoreszenzintensität zwischen den Kontrolltieren und denen mit Nanopartikel injizierten, aber viele der Änderungen waren tendenziell ähnlich. Die Somagröße der Zellen verringerte sich über die Betrachtungszeit bei allen Gruppen. Bei den positiven Kontrolltieren (nur Fluoreszenzfarbstoff Rho123 verabreicht) wurde die Somagröße zwar zu Anfang kleiner, was auf eine Aufnahme in intrazelluläre Kompartimente hindeuten könnte, blieb aber dann stabil über die Zeit. Die Neurone der Tiere mit Sehnervquetschung (ONC) sind kurz nach der Läsion erwartungsgemäß größer und schrumpfen am 2.ICON Messpunkt, bis sie dann verschwunden sind (3.ICON). Interessanterweise sind die Neurone der mit Nanopartikel behandelten Tiere im Vergleich zu denen ohne Nanopartikelapplikation größer (Mittelwert Somagröße). Ein Grund dafür könnte eine osmotische Dysregulation infolge des Zellstress oder eine Erhöhung der Aktivität des Lysosoms sein, welches laut Fröhlich (Fröhlich, 2012) eine Kolokalisierung der Nanopartikel darstellt und eine signifikante Ausdehnung zur Folge hat.

Die Resultate der Untersuchungen zur Fluoreszenzintensität der Neurone zeigen ebenfalls keine Veränderungen, die auf eine Toxizität der PBCA-Nanopartikel schließen lässt. Bei den Tieren mit Läsion nimmt die Fluoreszenzintensität über die Betrachtungszeit ab, was auf Membranschäden und langsames Absterben der Neurone hindeutet. Die Fluoreszenzintensität der Retinalen Ganglienzellen der Tiere, die nur Rho123 verabreicht bekamen nimmt zwar auch ab, aber weniger als bei den Tieren mit Läsion. Auch die Fluoreszenzintensität der Neurone der Tiere, die mit Nanopartikel behandelt wurden, ist signifikant höher als die der Tiere mit Läsion, und stimmt mit denen der Kontrolltiere am 3.ICON überein. Dies deutet auf keinerlei Beeinträchtigung der Membran oder Schädigung der Neurone durch die Verabreichung der Nanopartikel hin. Auch ein sogenannter „Door-opener“ Effekt bei dem die PBCA-Nanopartikel die Blut-Hirn-Schranke in dem Maße verändert, dass unkontrolliert Substanzen einströmen können, wie von Rempe *et al.*, 2011 und Ren *et al.*, 2010 beschrieben, konnte nicht festgestellt werden.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass *in vivo* PBCA-Nanopartikel keinen neuronalen Tod in pharmakologisch effektiven Konzentrationen hervorrufen, auch wenn bestimmte Beschichtungen der PBCA-Nanopartikel in der Zellkultur bei hohen pharmakologisch nicht relevanten Konzentrationen zur Reduktion der Viabilität führte.

6.6 Verhaltenstest

6.6.1 Hot plate Test

Für den Einsatz der Nanopartikel als Träger für Pharmaka zur Überwindung der BHS ist ein Verhaltenstest auf Basis der Schmerzreaktion ein sehr aussagekräftiges Instrument um die Effizienz zu testen. Bereits Schröder *et al.*, 1996-1998 konnten den Effekt von Tween80-beschichteten PBCA-NP als Trägersystem für Analgetika im Hot plate Test an Mäusen zeigen. Diese PBCA-NP unterscheiden sich im Herstellungsprozess (anionische Emulsionspolymerisation) und den verwendeten Reagenzien von denen in dieser Arbeit verwendeten Partikeln. Auch die von mir verwendeten Tween80-PBCA-Nanopartikel, hergestellt nach dem Miniemulsionspolymerisationsprozess, konnten den Wirkstoff Kyotorphin³ ins Gehirn transportieren und eine verminderte Schmerzreaktion im Vergleich zum nicht inkorporierten Wirkstoff hervorrufen (Abb. 52). Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren denen Kyotorphin alleine oder an Tween80-PBCA-Nanopartikel gebunden (inkorporiert) verabreicht wurden. Die Schmerzreaktionsschwelle der Ratten mit Tween80-Kyotorphin-PBCA-NP Behandlung ist im Vergleich zur Kontrolle (nur Kyotorphin) und zur Gruppe mit Kyotorphin adsorbiert an Tween80-PBCA-NP Behandlung 15min nach Injektion signifikant erhöht

³ (Tyr-D-Arg) kann die BHS aufgrund seiner Hydrophilie nicht überwinden (Takagi *et al.*, 1982)

($p < 0.05$). Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Ratten, die Kyotorphin am PBCA-Nanopartikel adsorbiert verabreicht bekamen, konnten nicht festgestellt werden. Die fehlenden Unterschiede lassen sich aufgrund der schlechten Bindung zwischen Nanopartikel und Wirkstoff erklären. Dies konnte auch bei der Bindung von Rhodamin123 an den Partikel mit Hilfe des ICONs demonstriert werden (Abb. 53). Mit fortschreitender Betrachtungszeit bis 4 Stunden nach Injektion konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen oder eine Erhöhung der Schmerzschwelle festgestellt werden.

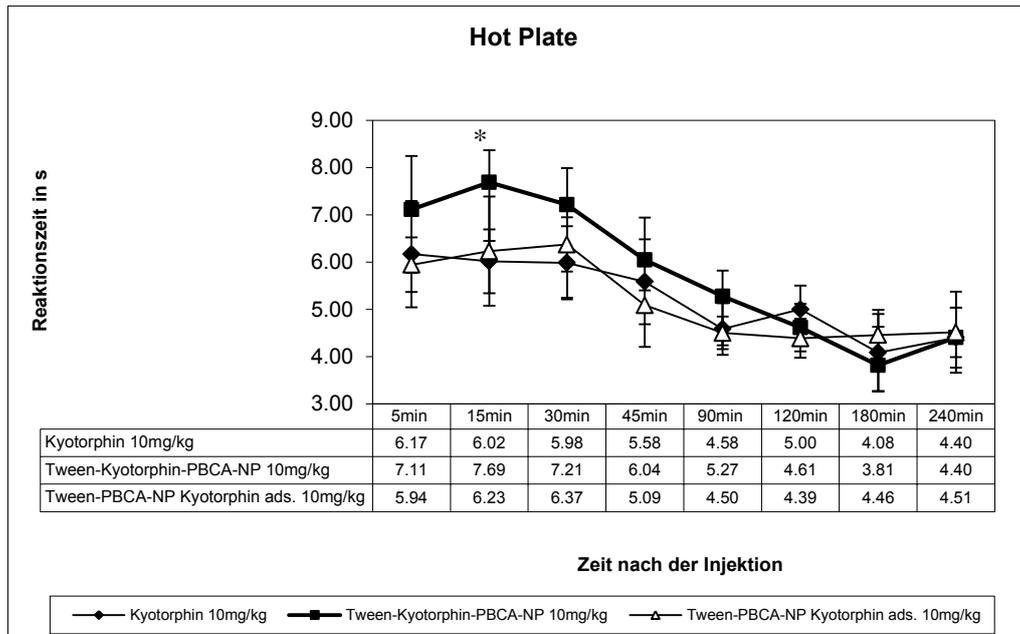


Abb. 52: Hot plate Test. Signifikante Unterschiede zwischen den Tween80-Kyotorphin-PBCA-NP und dem gelösten Kyotorphin und den PBCA-NP mit adsorbierten Kyotorphin. (Varianzanalyse mittels One-way ANOVA mit posthoc Tukey t-Test, Unterschiedslevel $*p < 0.05$)

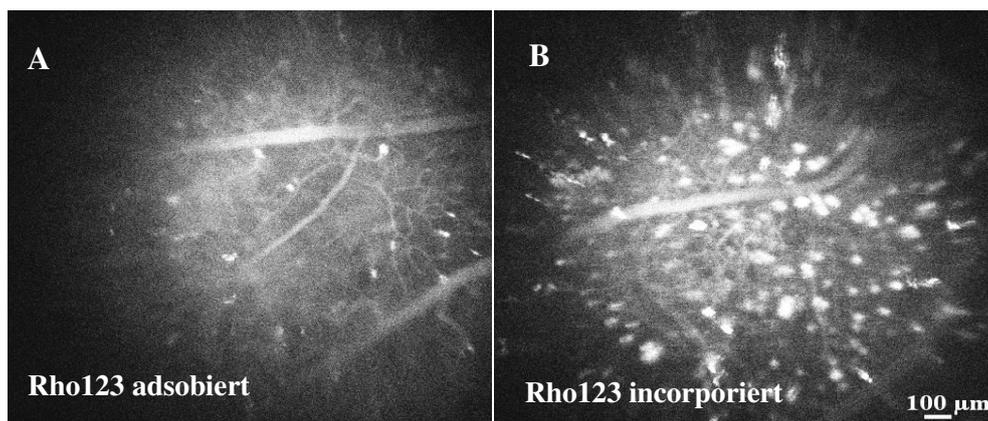


Abb. 53: Adsorption vs. Inkorporation. Vergleich zwischen Tween80-PBCA-NP mit adsorbierten (A) und inkorporiertem Rhodamin123 (B).

6.6.2 Diskussion des Verhaltenstest

Die Einsatzmöglichkeiten von Nanopartikeln als Arzneimittelträger sind vielfältig, aber im Einzelfall immer abhängig vom spezifischen Wirkstoff und seiner Bindung. Es wurde schon erfolgreich gezeigt, dass Pharmaka wie Dalargin (Alyautdin *et al.*, 1995; Schröder & Sabel, 1996; Ambruosi *et al.*, 2005; Pereverzeva *et al.*, 2008), Luperamid oder Tubocurarin (Alyautdin *et al.*, 1995; Kreuter *et al.*, 1995-1997) an Tween80 überzogenen PBCA-Nanopartikeln gebunden werden konnten und ins Gehirn transportiert werden konnten. Es bestehen zwei Möglichkeiten der Bindung: Inkorporation des Pharmaka im Nanopartikelinneren oder Adsorption an der Oberfläche des Partikels. Vor- und Nachteile gibt es bei beiden Bindungsarten. Inkorporiert ist der Wirkstoff besser geschützt, allerdings dauert die Freigabe länger. Wenn er adsorbiert ist, ist zwar die Freigabe erleichtert aber die Oberflächeneigenschaften des Partikels werden verändert, was zur verringerten Aufnahme ins Gehirn führen kann.

Zur Analyse der Einsatzmöglichkeiten von PBCA-Nanopartikeln als Arzneiträger wurde die analgetische Wirkung von gebundenem Kyotorphin⁴ an Tween80-PBCA-Nanopartikel mit Hilfe eines Hot plate Tests an Ratten untersucht. Im Verhaltenstest zeigte sich ein signifikanter analgetischer Effekt nach der Verabreichung von Tween80-PBCA-Nanopartikel mit inkorporiertem Kyotorphin nicht aber bei den NP mit adsorbiertem Kyotorphin. Denkbare Gründe dafür könnten die unzureichende Kopplung des Pharmakons an die Partikel oder der ungenügende Transport in Folge der veränderten Oberflächen sein. Auch die gewonnenen Ergebnisse aus den ICON-Versuchen zur Fluoreszenzfarbstoffadsorption und die damit verminderte BHS-Passage im Vergleich zu inkorporiertem Farbstoff bestätigen einen verminderten Transport von adsorbierten Substanzen. Auf den ersten Blick stellen diese Ergebnisse einen Kontrast zu den Publikationen der Arbeitsgruppe von Prof. Kreuter (Alyautdin *et al.*, 1995; Kreuter *et al.*, 1995) und Schröder (Schröder *et al.*, 1996) dar, die eine analgetische Wirkung von PBCA-Nanopartikeln mit adsorbierten Dalargin zeigte. Dieser Unterschied lässt sich durch die schlechte Bindung des Kyotophin an den PBCA-NP und das unterschiedliche Herstellungsprotokoll erklären. Die Herstellung der Partikel erfolgte bei den erwähnten Arbeitsgruppen mit Hilfe der anionischen Emulsionspolymerisation mit dem Einsatz von Dextran als Stabilisator und einer Polymerisationszeit von 4 Stunden. Diese Herstellungsform führt oft zu einer recht breiten Partikelgrößenverteilung und einem schlechten Tensid/Monomer-Verhältnis im Gegensatz zu der hier verwendeten Miniemulsionspolymerisation.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Bindung von analgetischen Pharmaka an PBCA-Nanopartikel zu einen signifikanten schmerzlindernden Effekt im Hot plate Test führte und NP somit als Trägersystem für Medikamente eingesetzt werden können.

⁴ neurophysiologisches Opioid Dipeptid mit analgetischer Wirkung; kann BHS nicht überwinden

7 Zusammenfassung

Seit dem 19. Jahrhundert, als Paul Ehrlichs Versuche den Nachweis der Blut-Hirn-Schranke erbrachte (Himmelweit *et al.*, 1956-1960), sind der spezielle Aufbau der Blutgefäßwände und ihre Barrierewirkung für Substanzen bekannt. Anders als die peripheren Kapillaren sind die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke über Tight Junctions verbunden (Pardridge, 1998-2002; Saunders *et al.*, 1999; Engelhardt and Sabel, 2003) welche eine nichtspezifische Diffusion von Molekülen verhindert. Dies stellt die Pharmaindustrie bei der Entwicklung von Medikamenten für ZNS-Erkrankungen vor ein großes Problem. Hier könnten Nanopartikel eine Lösung bringen. Laut Pardridge (Pardridge 1996) können die Strategien für Arzneistofftransport ins Gehirn in invasive, pharmakologische und physiologische Verfahren eingeteilt werden. Bei der invasiven Methode wird die BHS physikalisch durch Implantate oder Infusion hyperosmotische Lösungen umgangen (Gumerlock, 1992) oder die Durchflussrate gezielt erhöht (Unterberg *et al.*, 1984; Begley, 1996). Die physiologische Strategie macht sich die Kenntnisse über die spezifischen Transportsysteme an der BHS zu nutze und modifiziert dementsprechend pharmakologisch aktive Substanzen. So konnte durch die Änderung des Neurotransmitters Dopamin, welcher die BHS nicht überwindet, mit der Vorstufe L-Dopa ein Transport über die BHS mittels neuronaler Aminosäure-Carrier in die Zellen des Gehirns und dortige Umwandlung erreicht werden (Mutschler, 1996; Borchard and Kreuter, 1997). Die pharmakologische Technik umfasst den Einsatz von partikulären Trägern wie Liposomen oder Nanopartikel. Durch die Kopplung dieser Strategien wie die Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln mit Tween80 (Tröster *et al.*, 1990; Kreuter *et al.*, 1995, Alyautdin *et al.*, 1995) konnte eine gesteigerte Aufnahme ins Gehirn erzeugt werden.

Ziel dieser Arbeit war es das Potential von PBCA-Nanopartikeln als Arzneimittelträgersystem zu untersuchen, und zwar insbesondere unter den Aspekten (i) Beeinflussung der Blut-Hirn-Schrankengängigkeit durch galenische Faktoren und (ii) toxikologische Effekte. Für viele Fragestellungen wurde dabei die ICON-Technik eingesetzt (Prilloff *et al.*, 2010; Henrich-Noack *et al.*, 2012), die es ermöglicht „online“ im lebenden Tier die Effekte zu untersuchen und somit effizientere und anwendungsnähere Daten hinsichtlich der Nutzung am Menschen liefern. In den letzten Jahrzehnten ist das Interesse an der Nanopartikeltechnologie stetig gewachsen, vor allem wegen fehlender bzw. risikoreicher invasiver Therapiemethoden von ZNS-Erkrankungen aufgrund der Blut-Hirn-Schranke als Hürde für Medikamente. Deshalb ist es essentiell, die Frage nach den relevanten Einflussfaktoren für den BHS-Übertritt und für die toxischen Effekte von Nanopartikeln zu beantworten. Zur Analyse der Bedingungen für die erfolgreiche BHS-Passage von Nanopartikeln wurde der Einfluss der Größe, des Zetapotentials und der Oberflächenmodifikation durch Tenside mittels ICON untersucht. Dabei konnte die Kinetik der fluoreszierenden Partikel während und nach der Injektion mikroskopisch an Ratten sichtbar gemacht werden. Die Blut-Retina-Schranke diente hierbei als Modell für

die Blut-Hirn-Schranke. Die Eignung der Blut-Retina-Schranke als Modell stützt sich auf theoretische Fakten und experimentelle Ergebnisse (Steuer *et al.*, 2004-2005). Zusätzlich zu den Bedingungen, die einen Übertritt über die BHS begünstigen, wurde dabei auch die Frage des Transportmechanismus analysiert. Zur Klärung der Toxizität und somit zum Nachweis der Unbedenklichkeit von PBCA-Nanopartikeln wurde *in vitro* ein MTT-Zellviabilitätstest durchgeführt. Das Augenmerk lag hier besonders auf der Frage, in welchem Zusammenhang die Oberflächenmodifikation der NP und die toxischen Eigenschaften stehen. Darüber hinaus wurde *in vivo* untersucht, wie verschiedene PBCA-NP Modifikationen das Überleben und die Morphologie retrograd markierter Retinaler Ganglienzellen beeinflussen.

Mit Hilfe der „echtzeitfähigen“ Beobachtungstechnik ICON war es möglich den Übertritt der Nanopartikel über die Blut-Retina-Schranke als Vergleichsmodell der Blut-Hirn-Schranke in Echtzeit zu beobachten. Die ICON Methode bietet damit immense Vorteile gegenüber herkömmlichen Methoden und die gezeigten Daten demonstrieren, dass diese *in vivo* gewonnenen Ergebnisse mit denen von Dauerpräparaten übereinstimmen. Der Einsatz der Blut-Retina-Schranke als Modell kann nach den Publikationen von Steuer (Steuer *et al.*, 2001-2002) und den hier gezeigten Daten als validiert gelten. Die detaillierte Betrachtung der Determinanten, die den Übertritt der Nanopartikel über die BHS begünstigen zeigte, dass die Wahl des Tensides für die Modifikation des Partikels einen größeren Einfluss hat als Größe und Zetapotential. Nachdem die Nanopartikel ins Blut injiziert werden verändert sich das Zetapotential von positiv zu negativ. Daher ist das nach der Partikelherstellung gemessene Ausgangs-Zetapotential irrelevant. Auch sehr große Nanopartikel mit einem Mittleren Partikeldurchmesser ($d_{m,6}$) bis 450nm überquerten die Barriere. Die Beschichtung der Partikel mit verschiedenen nichtionischen Tensiden begünstigte den Übertritt der Partikel wohingegen eine Kopplung mit anionischen Tensiden dies behinderte. Einige Hinweise bezüglich des Transportvorgangs und der Verteilung der NP in Gewebestrukturen ergaben sich aus den beschriebenen Experimenten. In der Literatur wurde diskutiert, dass sich Nanopartikel in Neurone anlagern (Ku *et al.*, 2012), dies konnte aber durch die eingesetzte ICON-Technik nicht bestätigt werden. Hierzu wären weitere Tests mit einem *in vivo* Beobachtungsverfahren mit höherer Auflösung notwendig. Der Transport der Nanopartikel über die Blut-Hirn-Schranke geschieht sehr schnell. Als Mechanismen sind Manipulation der Tight Junctions oder eine Rezeptorvermittelte Transzytose (Kreuter, 2001) über den LDL Rezeptor oder einen anderen Lipoproteinrezeptor denkbar. Die Ergebnisse könnten aber als eine kurzfristige gezielte Veränderung der Tight Junctions durch die Nanopartikel interpretiert werden.

Bei der Toxizitätsstudie konnten keine Hinweise auf neuronale Störungen oder Zelltod nach wiederholter Verabreichung pharmakologisch relevanter Konzentrationen von Nanopartikeln bei Ratten festgestellt werden. Die Zellviabilität wurde zwar bei einigen Tensid-Beschichtungen im *in vitro* Test reduziert, aber dies geschah nur bei hohen, pharmakologisch nicht relevanten Konzentrationen.

Der Verhaltenstest belegt die Möglichkeit, Arzneistoffe an PBCA-Nanopartikel zu binden und gezielte analgetische Effekte hervorzurufen, welche ohne die Bindung des Schmerzmittels an NP nicht erreicht wurden. PBCA-Nanopartikel scheinen daher ein ideales Werkzeug für den Transport von Pharmaka ins Gehirn zu sein. Sie erfüllen die Merkmale, die ein effizientes Trägersystem haben muss: Sie sind nicht toxisch, gelangen schnell an den Wirkungsort und sind aufgrund des Miniemulsionsprozess unkompliziert herstellbar und bis zu 30 Tagen lagerbar. Für längere Lagerungen über 30 Tage wäre eine Gefriertrocknung der Partikel empfehlenswert.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten können aufgrund der Ähnlichkeit der Retina von Ratte und Mensch auf den Menschen übertragen werden und liefern so wertvolle Impulse für die klinische Behandlung von ZNS-Erkrankungen, deren Inzidenz durch den demographischen Wandel größer werden wird und somit entsprechenden Therapien immer wichtiger werden (Borchard and Kreuter, 1997).

8 Referenzen

- N.J. Abbott, L. Rönbäck, E. Hansson, Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain-barrier. *Nature Reviews Neuroscience* 7 (2006) 41-53
- N.J. Abbott, A. Patabendige, D. Dolman, S. Yusof, D. Begley, Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Diseases* 37 (2010) 13-25
- R.N. Alyautdin, D. Gothier, V.E. Petrov, D.A. Kharkevich, J. Kreuter, Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 44-48
- H. Ambruosi, H. Yamamoto, J. Kreuter, Body distribution of polysorbate-80 and doxorubicin-loaded [¹⁴C] poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles after i.v. administration in rats. *J. Drug Target.* 10 (2005) 535-542
- P. Ballabh, A. Braun, M. Nedergaard, The blood-brain barrier: an overview: Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Diseases* 16 (1) (2004) 1-13
- U. Baudisch, Kolloidchemische Untersuchungen im Rahmen der Entwicklung einer intravenös applizierbaren Polybutylcyanoacrylatformulierung: Synthese, Charakterisierung und Stabilität. Dissertation, Freie Universität Berlin (2001)
- D.J. Begley, The blood-brain barrier: principles for targeting peptides and drugs to the central nervous system. *J. Pharm. Pharmacol.* 48 (1996) 136-146
- G. Borchard, J. Kreuter, Interaction of serum components with poly(methylmethacrylate) nanoparticles and the resulting body distribution after intravenous injection in rats. *J. Drug Target.* 1 (1993) 15-19
- G. Borchard, in: R.H. Müller, G. Hildebrand (Hrsg.), *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, (1997) 291-296
- M. Bottini, F. Cerignoli, D.M. Mills, F. D'Annibale, M. Leone, N. Rosato, A. Magrini, M. Pellechia, A. Bergamschi, T. Mustelin, Luminescent silica nanobeads: characterization and evaluation as efficient cytoplasmatic transporters for T-lymphocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 7814- 7823
- T.J. Brunner, P. Wick, P. Manser, P. Spohn, R.N. Grass, L.K. Limbach, A. Bruinink, W. J. stark, *In vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particles solubility. *Environ. Sci. Tech.* 40 (2006) 4374-4381
- V.P. Chekhomin, A.V. Kabanov, Y.A. Zhikov, G.V. Morozov, Fatty acid acylated Fab-fragments of antibodies to neurospecific proteins as carriers for neuroleptic targeted delivery in brain. *FEBS Lett.* 287 (1996) 149-152

- P. Couvreur, B. Kante, M. Roland, P. Guiot, P. Bauduin, P. Speiser, Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers : preparation, morphological and sorptive properties. *J.Pharm. Pharmacol. Communications* 31 (1979) 331-332
- P. Couvreur, B. Kante, V. Lenaerts, V. Scailteur, M. Roland, P. Speiser, Tissue Distribution of Antitumor Drugs Associated with Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 69 (1980) 199-202
- P. Couvreur, B. Kante, L. Grislain, M. Roland, P. Speiser, Toxicity of Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles, II: Doxorubicin-Loaded Nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 71 (1982) 790-792
- S.J. Douglas, L. Illum, S.S. Davis, J.Kreuter, Particle size and size distribution of poly(butyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles. I. Influence of physicochemical factors. *J.Colloid Interface Sci.* 101 (1984) 149-158
- S.J. Douglas, L. Illum, S.S. Davis, Particle size and size distribution of poly(butyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles. II. Influence of physicochemical factors. *J.Colloid Interface Sci.* 103 (1985) 154-163
- R. Duvdevani, M. Rosner, M. Belkin, J. Sautter, B.A. Sabel, M. Schwartz, Graded crush of the rat optic nerve as a model : combining electrophysiological and behavioral outcome. *Restor. Neurol. Neurosci.* 2 (1990) 31-38
- B. Engelhardt, Development of blood-brain barrier. *Cell Tissue Res* 314 (2003) 119-129
- R. Engelmann, B.A. Sabel, *In vivo* imaging of mammalian central nervous system neurons with the *In Vivo* Confocal Imaging (ICON) technique. *Confocal Microscopy, Methods in Enzymology* 307 (1999) 563-570
- E. Farkas, P.G. Luiten, Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 64 (2001) 575-611
- P.M. Friden, Utilization of an endogenous cellular transport system for drug delivery of therapeutics across the blood-brain barrier. *J. Control. Rel.* 46 (1996) 117-128
- E. Fröhlich, The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 7 (2012) 5577-5591
- L.K. Fung, M.G. Ewend, A. Sills, E.P. Sipos, R. Thompson, M. Watts, O.M. Colvin, H. Brem, W. M. Saltzman, Pharmacokinetics of interstitial delivery of carmustine, 4-hydroperoxycyclophosphamide, and paclitaxel from a biodegradable polymer implant in the monkey brain. *Cancer Res.* 58 (1998) 672-684
- E.M. Gipps, P. Groscurth, J. Kreuter, P. Speiser, The effect of polycyanoalkylcyanoacrylate nanoparticles on human normal and malignant mesenchymal cell *in vitro*. *Int. J. Pharm.* 40 (1987) 23-31
- L. Grislain, P. Couvreur, V. Lenaerts, M. Roland, A. Deprez-Decampeneere, P. Speiser, Pharmacokinetics and distribution of biogradable drug carrier. *Int. J. Pharm.* 15 (1983) 335-345

- G. Gregoriadis, *Liposomes As Drug Carriers: Recent Trends and Progress*. Wiley (2005)
- A.E. Gulyaev, S.E. Gelperina, I.N. Skidan, A.S. Antropov, G.Y. Kivman, J. Kreuter, Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharm. Res.* 16, (1999) 1564-1569
- M.K. Gumerlock, E.A. Neuwalt, Therapeutic opening of the blood-brain barrier in man. *Physiology and pharmacology of the blood-brain barrier. Handbook of experimental pharmacology* (Bradbury, M.W.B., ed), pp. (1992) 525-542. Springer-Verlag, Berlin
- T. Günther, J. Jupesta, W. Hintz, J. Tomas, Analysis of the process parameters on the growth of silica particle precipitation. *Proceedings CHISA* (2006) Prag
- B.T. Hawkins, T.P. Davis, The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 57(2) (2005)173-85
- W. Hintz, J. Tomas, Influence of process parameters on particle size and morphology of nano-scaled magnetite particles. *Proceedings CHISA* (2012), Prag
- W. Hintz, T. Nikolov, V. Yordanova, J. Tomas, Synthesis and characterisation of titanium dioxide nanoparticles. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 3 (2003) 725-734
- W. Hintz, T. Günther, T. Nikolov, A. Petrova, J. Tomas, Production of nano-scaled silica, titania and barium sulphate particles – Experiments and modelling of particles formation micro-processes. *Proceedings CHISA* (2008) Prag, ISBN 978-80-02-02047-9
- W. Hintz, S. Antonyuk, W. Schubert, B. Ebenau, A. Haack, J. Tomas, Determination of physical properties of fine particles, nanoparticles and particle beds. E. Tsotsas (Eds.): *Modern Drying Technology, Vol. 2: Experimental Techniques*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2009)
- P. Henrich-Noack, S. Prilloff, N. Voigt, J. Jin, W. Hintz, J. Tomas, B.A. Sabel, *In vivo* visualisation of nanoparticle entry into central nervous system tissue. *Arch. Tox.* 86 (2012) 1099-1105
- F. Himmelweit, M. Marquardt, H. Dale, *The collected papers of Paul Ehrlich in four volumes including a complete bibliography*. Pergamon Press, London and New York (1956-1960)
- U. Hülsermann, M. M. Hoffmann, U. Massing, G. Fricker, Uptake of apolipoprotein E fragment coupled liposomes by cultured brain microvessel endothelial cells and intact brain capillaries. *J. Drug Target.* 17 (2009) 610-618
- S. M. Hussain, K.L. Hess, J.M. Gearhart, K.T. Geiss, J.J. Schlager, *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. In Vitro* 19 (2005) 975-983

- B. Kante, P. Couvreur, G. Dubois-Krack, C. De Meester, P. Guiot, M. Roland, M. Mercier und P. Speiser, Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 71 (1982) 786-790
- H. Kettiger, A. Schipanski, P. Wick, J. Huwyler, Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell organism. *International Journal of Nanomedicine* 2013, 8, 3255-3269
- J. Kreuter, P. Range, V. Petrov, S. Hamm, S.E. Gelperina, B. Engelhardt, R. Alyautdin, H. von Briesen, J.D. Begley, Direct evidence that polysorbate-80-coated poly (butyl cyano acrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *Pharm. Res.* 20 (2003) 409-415
- J. Kreuter, R.N Alyautdin, D. Kharkevich, A.A. Ivanov, Passage of peptide the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain Res.* 674 (1995), 171-174
- J. Kreuter, Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. III: materials, stability, toxicity, possibilities of targeting, and use. *Pharm. Acta Helv.* 58 (1983) 242-250
- J. Kreuter, D. Shamenkov, V. Petrov, P. Range, K. Cychutek, C. Koch-Brandt, R. Alyautdin, Apolipoprotein mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J. Drug. Target.* 10 (2002) 317-325
- J. Kreuter, Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 4 (2004) 484-488
- J. Kreuter, Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 65-81
- J. Kreuter, V.E. Petrov, D.A. Kharkevich, R.N. Alyautdin, Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after ist delivery across the blood-brain barrier using surfactant-coated nanoparticles. *J. Controlled Release* 49 (1997) 81-87
- G.J. Krinke, *The Handbook of Experimental Animals: The Laboratory Rat.* Academic Press (2000)
- S. Ku, F. Yan, Y. Wang, Y. Sun, N. Yang, L. Ye, The blood–brain barrier penetration and distribution of PEGylated fluorescein-doped magnetic silica nanoparticles in rat brain *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394 (2010) 871–876
- K. Landfester, Miniemulsionspolymerisation und Struktur von Polymer und Hybridnanopartikeln. *Angew. Chem.* (2009), 121, 4556 – 4576
- K. Landfester, The generation of nanoparticles in miniemulsions. *Adv. Mater.* Vol. 13 (10) (2001)

- K. Landfester, Recent developments in miniemulsions- formation and stability mechanisms. *Macromol. Symp.* 150 (2000) 171-178
- K. Landfester, N. Bechthold, S. Förster, M. Antonietti, Evidence for the presence of the particle identity in miniemulsion polymerization. *Macromol. Rapid Commun.* 20 (1999) 81-84
- G. Lagaly, O. Schultz, R. Zimehl, *Dispersionen und Emulsionen*. Steinkopff Verlag, Darmstadt (1997)
- V. Lenaerts, P. Couvreur, D. Christiaens-Leyh, E. Joiris, M. Roland, B. Rollman, P. Speiser, Degradation of poly (isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Biomaterials* 5 (1984) 65-68
- C. Lherm, R.H. Müller, J. Herbort, G. Brandes, Cytotoxicity of polyalicylcyanoacrylate particles of increasing chain length. *APGI-Kongreß, III* (1989) 81- 88
- C. Lherm, R.H. Müller, F. Puisieux, P. Couvreur, Alkylcyanoacrylate drug carriers: II. Cytotoxicity of cyanoacrylate nanoparticles with different alkyl chain length. *Int. J. Pharm.* 84 (1992) 13-22
- Y. S. Lin, Y. W. Huang, X. D. Zhou, Y. F. Ma, *In vitro* toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217 (2006a) 252-259
- J. Lode, I. Fichtner, J. Kreuter, A. Berndt, J.E. Diederichs, R. Rezka, Influence of surface-modifying surfactants on the pharmacokinetic behavior of 14C-poly(methylmethacrylate) nanoparticles in experimental tumor models. *Pharm. Res.* 18 (2001) 1613-1619
- P.R. Lockman, R.J. Mumper, M.A. Khan, D.D. Allen, *Nanoparticle Technology for drug Delivery Across the Blood-Brain Barrier*, Drug Development and Industrial Pharmacy 28-1 (2002) 1-13
- S. Lustig, S. Shapira, D. Kobilier (Eds.): *Blood-brain barrier: Drug delivery and Brain. Pathology*, Kluwer Academic Publisher, New York, (2001) 428 ff
- Malvern Instruments. *Dynamic light scattering: An introduction in 30minutes*. technical note, MRK656-01
- Malvern Instruments. *Zeta potential. An introduction in 30minutes*. Zetasizer nano series notes
- J.A. MacKay, D.F. Deen, F.C. Szoka. Distribution in brain of liposomes after convection enhanced delivery; modulation by particle charge, particle diameter and presence of steric coating. *Brain Research* 1035 (2) (2005) 139-153
- J.L. Madara: Tight junction dynamics: is paracellular transport regulated? *Cell* 53, (1988) 497-498
- R.H. Müller, *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1996)

- R.H. Müller, R. Schumann, Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1996)
- E. Mutschler, Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie 7 (1996), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- E.A. Nance, G.F. Woodworth, K.A. Sailor, T.Y. Shih, Q. Xu, G. Swaminathan, C. Eberhart, J. Hanes, A dense poly(ethylene glycol) coating improves penetration of large polymeric nanoparticles within brain tissue. *Sci. Transl. Med.* 4 (2012) 149
- M. Namdeo, W. Hintz, J. Tomas, Synthesis of cellulose coated magnetite silver nanoparticles (CCMS) and their application in water purification. *J. Bionanoscience* 3 (2009) 105-109
- J. Nicolas, P. Couvreur, Synthesis of poly-(alkylcyanoacrylate)-based colloidal nanomedices. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 1 (2009) 111-127
- J. Olivier, Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *NeuroRx* 2 (1) (2005)108-119
- J.C. Olivier, L. Fenart, R. Chauvet, C. Pariat, R. Cecchelli, W. Couet, Indirect evidence that drug brain targeting using polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity. *Pharm. Res.* 16 (1999)1836-1842
- W.M. Pardridge, Physiologic-based strategies for protein drug delivery to the brain. *Journal of Controlled Release* 39 (1996) 281-286
- W.M. Pardridge, Introduction to the blood-brain barrier: methodology, biology and pathology. University Press, Cambridge, UK (1998).
- W.M. Pardridge, Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horse. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 131-139
- E. Pereverzeva, I. Treschalin, D. Bodyagin, O. Maksimenko, J. Kreuter, S. Gelperina, Intravenous tolerance of a nanoparticle-based formulation of doxorubicin in healthy rats. *Toxicol. Lett.* 178 (2008) 9-19
- A. Peters, S. L. Palay, H.D. Webster, The fine structure of the nervous system. Oxford University Press, New York, USA (1991).
- A. Petrova, W. Hintz, J. Tomas, Investigation of the precipitation of barium sulphate nano-particles. *Chem. Eng. Technol.* 31 (2008) 604-608
- M. Pieper, S. Aman, W. Hintz, J. Tomas, Optimisation of a continuous precipitation process to produce nanoscale BaSO₄. *Chem. Eng. Technol.* 34 (2011) 1567-1574
- S. Prilloff, J. Fan, P. Henrich-Noack, B.A. Sabel. *In vivo* confocal neuroimaging (ICON): non-invasive, functional imaging of the mammalian CNS with cellular resolution. *Eur. J. Neurosci.* 31 (2010) 521-528

- S. Prilloff, M.I. Noblejas, V. Chedhomme, B.A. Sabel, Two faces of calcium activation after optic nerve trauma: life or death of retinal ganglion cells *in vivo* depends on calcium dynamics. *Eur. J. Neurosci.* 25 (2007) 3339-3346
- P. Range, J. Kreuter, B. Lemmer: Circadian phase-dependent antinociceptive reaction in mice determined by the hot-plate test and tail-flick test after intravenous injection of dalargin-loaded nanoparticles. *Chronobiol. Int.* 16 (1999) 767-777
- S.I. Rapoport, Osmotic opening of the blood-brain barrier. *Ann. Neurol.* 24 (1988) 677-684
- A. Reichel, D.J. Begley, N.J. Abott, The blood-brain-barrier: Biology and Research Protocols, Methods in Molecular Medicine, (Nag, S. Ed.) Humana Press, New York (2003) 309-326
- M. Reimold, D. Domke, J. Bender, C.A. Seyfried, H. E. Radunz, G. Fricker, Delivery of nanoparticles to the brain detected by fluorescence microscopy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 627-632.
- M. Reimold, Interaktionen verschiedener Formulierungen von Poly(nbutylcyanoacrylat) -Nanopartikel mit der Blut-Hirn-Schranke *in vivo* und *in vitro*. Dissertation, Universität Heidelberg (2010)
- R. Rempe, S. Cramer, H.J. Galla, Transport of poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles across the blood-brain barrier *in vitro* and their influence on barrier integrity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 406 (2011) 64-69
- F. Ren, R. Chen, Y. Wang, Y. Sun, Y. Jiang, G. Li, Paclitaxel-loaded poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticle delivery system to overcome multidrug resistance in ovarian cancer. *Pharm Res.* 28 (2011) 897-906
- J.A. Rhodin, T. Thomas, A vascular connection to Alzheimer's disease. *Microcirculation.* 8 (2001) 207-220
- W.J. Rieter, J.S. Kim, K.M.L. Taylor, H.Y. An, W.L. Lin, T. Tarrant, W.B. Lin, Hybrid silica nanoparticles for multimodal imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007a) 3680-3682
- W.J. Rieter, K.M.L. Taylor, W. Lin, Surface modification and functionalization of nanoscale metal organic frameworks for controlled release and luminescence sensing. *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007b) 9852-9853
- V. Rousseau, R. Engelmann, B.A. Sabel, Restoration of vision III: soma swelling dynamics predicts neuronal death or survival after optic nerve crush *in vivo*. *Neuroreport* 10 (1999) 3387-3391.
- V. Rousseau & B.A. Sabel. Restoration of vision IV: role of compensatory soma swelling of surviving retinal ganglion cells in recovery of vision after optic nerve crush. *Restor. Neurol. Neurosci.* 18 (2001) 177-189

- B.A. Sabel, R. Engelmann, M. F. Humphrey, *In vivo* confocal neuroimaging (ICON) of CNS neurons. *Nat. Med.* 3 (1997) 244-247
- H. Sarin, A.S. Kanevsky, H. Wu, K.R. Brimacombe, S.H. Fung, A.A. Sousa, S. Auh, C. M. Wilson, K. Sharma, M.A. Aronova, R.D. Leapman, G.L. Griffith, M.D. Hall, Effective transvascular delivery of nanoparticles across the blood-brain tumor barrier into malignant glioma cells. *J. Trans. Med.* 6 (2008) 80
- N.R. Saunders, M.D. Habgood, K.M. Dziegielewska, Barrier mechanisms in the brain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26 (1999)11-19
- J. Sautter, B.A. Sabel, Recovery of Brightness discrimination in adults despite progressive loss of retrogradely labeled retinal ganglion cells after controlled optic nerve crush. *European Journal of Neuroscience* 5 (1993) 680-690
- C.M. Sayes, R. Wahi, P.A. Kurian, Y.P. Liu, J.L. West, K.D. Ausman, D.B. Wahrheit, V.L. Calvin, Correlating nanoscale titanic structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol. Sci.* 92 (2006) 174-185
- T. Schneider, A. Becker, K. Ringe, R. Firsching, B. A. Sabel, Brain tumor treatment with combined vaccination and antisense-oligonucleotide delivery using nanoparticles. *J. Neuroimmunol.* 195 (2008) 21-27
- N. Schöler, Feste Lipidnanopartikel und Nanosuspensionen: In-vitro-Zytotoxizität und therapeutischer Ansatz am Modell der Reaktivierungstoxoplasmose der Maus. Der andere Verlag (2001) Dissertation
- U. Schroeder, B.A. Sabel, Nanoparticles, a drug carrier system to pass the blood-brain barrier, permit central analgetic effects of i.v. dalargin injections. *Brain Res.* 710 (1996) 121-124
- U. Schroeder, P. Sommerfeld, B.A. Sabel, Efficacy of oral dalargin-loaded nanoparticle delivery across the blood-brain barrier. *Peptides* 19 (1998) 770-778.
- U. Schroeder, P. Sommerfeld, S. Ulrich, B.A. Sabel, Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *J. Pharm. Sci.* 87 (1998a) 1305-1307
- G.N. Shah, A.D. Moorradian, Age related changes in the blood-brain barrier, *Exp. Gerontol.* 32 (1997) 501-519
- P. Sommerfeld, U. Schroeder, B.A. Sabel, Long-term stability of PBCA nanoparticle suspensions suggests clinical usefulness. *Int. J. Pharm.* 155 (1997) 201-207
- P. Sommerfeld, U. Schroeder, B.A. Sabel, Sterilization of unloaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 164 (1998) 113-118
- P. Sommerfeld, B.A. Sabel, U. Schroeder: Long-term stability of PBCA nanoparticle suspensions, *J. Mikroencapsulation* 17 (2000) 69-79

- S.J. Son, X. Bai, A. Nan, H. Ghandehari, S.B. Lee, Template synthesis of multifunctional nanotubes for controlled release. *J. Control. Release* 114 (2006) 143-152
- W.D. Stein, *Transport and Diffusion across Cell Membranes*. Academic Press Inc (1986)
- M. Stein, E. Hamacher, Degradation of polybutyl2-cyanoacrylate microparticles. *Int. J. Pharm.* 80 (1992) R11-R13
- H. Steuer, A. Jaworski, D. Stoll, B. Schlosshauer, *In vitro* model of the outer blood-retina barrier. *Brain Res. Protoc.* 13 (2004) 26-36.
- H. Steuer, A. Jaworski, B. Elger, M. Kaussmann, J. Keldenich, H. Schneider, D. Stoll, B. Schlosshauer, Functional characterization and comparison of the outer blood-retina barrier and the blood-brain barrier. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46 (2005) 1047-1053
- W.H. Suh, K.S. Suslick, G.D. Stucky, Y. Suh, Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in neurobiology* 87 (2009) 133-170
- R.G. Thorne, C. Nicholson, *In vivo* diffusion analysis with quantum dots and dextrans predicts the width of brain extracellular space. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 5567-5572
- H. Takagi, Y. Shiomi, H. Ueda, Analgesic depeptide L-Tyr-D-Arg(D-Kyotorphin) induced Met-enkephalin release from guinea-pig stratal sclices. *Experientia* 38 (1982) 1344-1345
- S.B. Tiwari, M.M. Amiji, A review of nanocarrier-based CNS delivery systems. *Curr. Drug Deliv.* 3 (2006) 219-232
- S.D Tröster, U. Müller, J. Kreuter, Modification of the body distribution of poly (methylmethacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants. *Int. J. Pharm.* 61, (1990) 85-100
- A. Unterberg, M. Wahl, A. Baethmann, Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels *in vivo*. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 4 (1984) 574-585
- W.R. Vezin, A.T. Florence, *In vitro* heterogeneous degradation of poly(nalkylalpha-cyanoacrylates). *J. Biomed. Mater. Res.* 14 (1980) 93-106
- J.J. Wang, B.J.S. Sanderson, H. Wang, Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 628 (2007a) 99-106
- C.K. Weiss, U. Ziener, K. Landfester, A route to nonfunctionalized and functionalized poly-(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles: preparation in miniemulsion. *Macromolecules* 40 (2007) 928-938

- B. Wilson, M.K. Samanta, K. Santhi, K.P.S. Kumar, N. Paramakrishnan, B. Suresh, Poly (n-butyl cyano acrylate coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain Research* 1200 (2008) 159-168
- B. Wilson, Brain targeting PBCA nanoparticles and the blood-brain barrier. *Nanomedicine* 4 (2009) 499-502
- S. Wohlfahrt, S. Gelperina, J. Kreuter, Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J. Cont. Release* 161 (2012) 264-273
- P.C. Wu, W.S. Wang, Y.T. Huang, H.S. Sheu, Y.W. Lo, T.L. Tsai, D.B. Shieh, C.S. Yeh, Porous iron oxid based nanorods developed as delievery nanocapsules. *Chem. Eur. J.* 13 (2007) 3878-3885
- G. Yordanov, Poly (alkyl cyanaoacrylate) nanoparticles as drug carriers: 33 years later. *Bulg. J. Chem.* 1 (2012) 61-73
- Q. Zhou, X. Sun, L. Zeng, J. Lui, Z. Zhang, A randomized multi-center phase II clinical trial of mitoxantrone-loeded nanoparticles in the treatment of 108 patients with unresected hepatocellular carcinoma. *Nanomedicine* 5 (2009) 419-423.

Internetressourcen:

- Analysebericht Landesanstalt für Umwelt, Messung und Naturschutz Baden-Württemberg : Anwendung von Nanopartikeln (2007) ,*abgerufen am 04.09.2013*
http://www.lubw.badenwuerttemberg.de/servlet/is/29829/anwendung_von_nanopartikel_n.pdf?command=downloadContent&filename=anwendung_von_nanopartikeln.pdf
- http://www.wissen-digital.de/lexikon/images/5/5f/Auge_retina.jpg Stand: 28.01.2009, *abgerufen am 09.10.2013*
- Sachverständigenrat für Umweltfragen (SRU), Vorsorgestrategien für Nanomaterialien. (2011) www.umweltrat.de, *abgerufen am 11.10.2013*

Anhang

Tabelle 07: Nanopartikelmodifikationen und ihre Eigenschaften

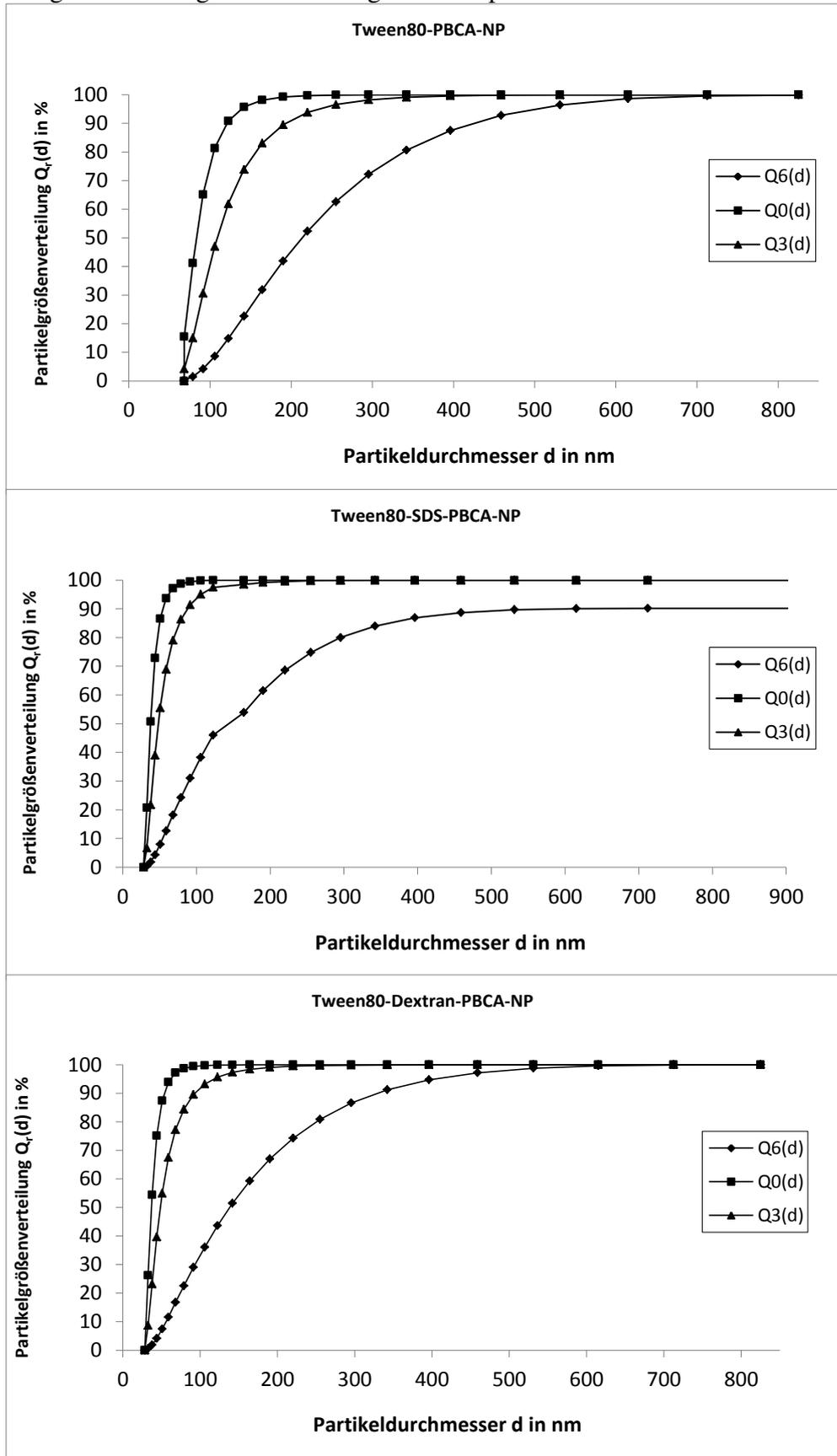
Nanopartikel-modifikationen	Chemische Kategorie	Größe $d_{m,6}$ in nm	Zetapotential in mV	BRS-Gängigkeit	PDI	Feststoffgehalt in mg/ml
Tween80 (ohne Rho)	nichtionisch	120	-10	o.A.	0,196	o.A.
Lutrol-SDS (ohne Rho)	nichtionisch + anionisch	64	-51	o.A.	0,267	o.A.
Tween80*	nichtionisch	143	-26	++	0,375	90-120
Tween80-Dextran	nichtionisch	130	5	++	0,279	100
Tween80-SDS*	nichtionisch + anionisch	132	-25	0	0,276	98-125
Tween80 (Rho adsorbiert)	nichtionisch	128	-5	+	0,188	o.A.
Tween20	nichtionisch	286	-7	+	0,366	125
Lutrol-SDS*	nichtionisch + anionisch	87	-40	0	0,267	50
Lutrol-Dextran	nichtionisch	420	-16	++	0,366	50
DEAE-Dextran-Lutrol	nichtionisch	(A) 464 (B) 190	(A) 8 (B) 20	++ ++	0,260	40 50
SDS	anionisch	164	-14	++	0,234	50
Brij35	nichtionisch	380	-2	++	0,300	100
Lutensol	nichtionisch	422	-1,5	++	0,259	100

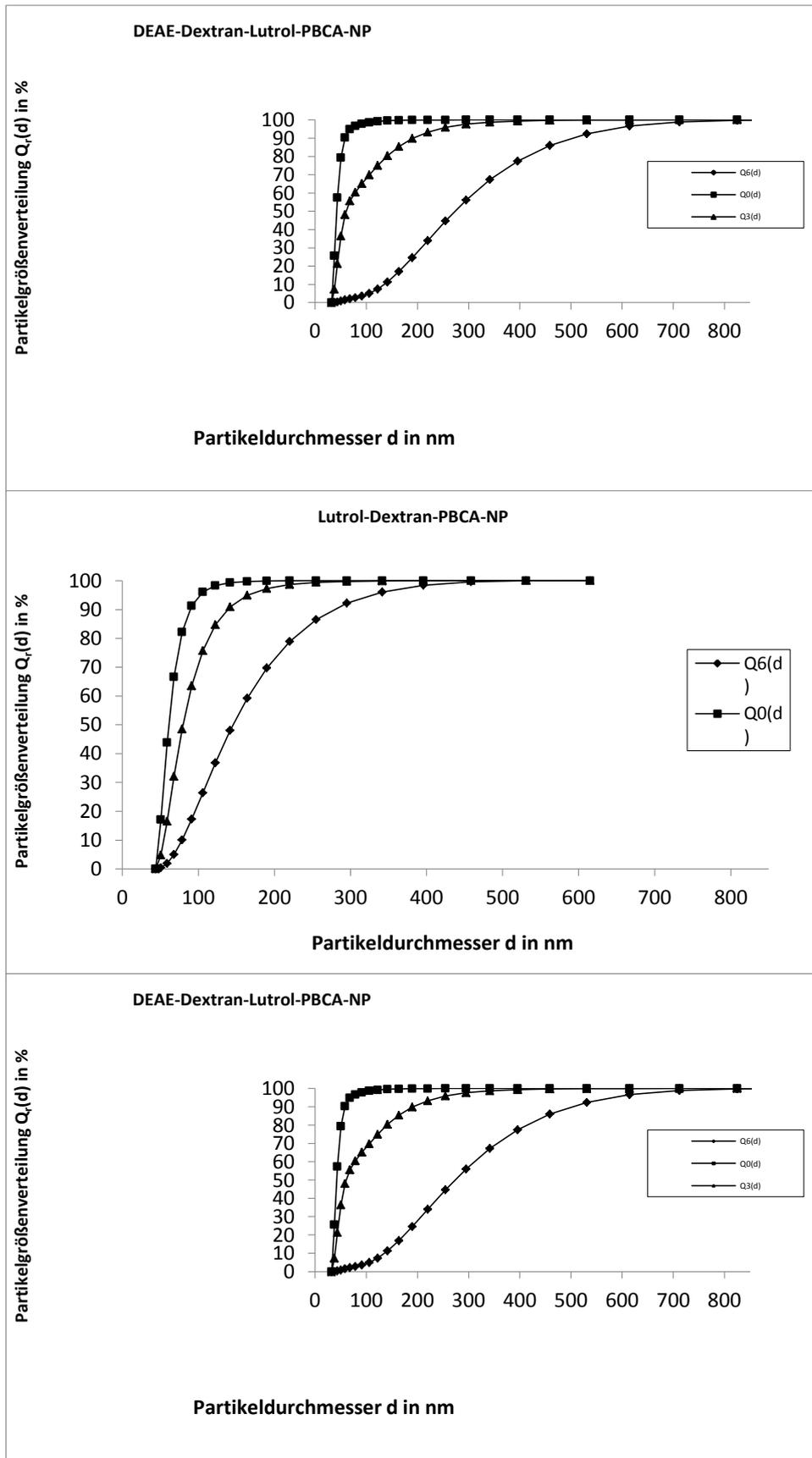
++ effizient, + weniger effizient, 0 nicht effizient; * mehrere Chargen; o.A. ohne Angabe

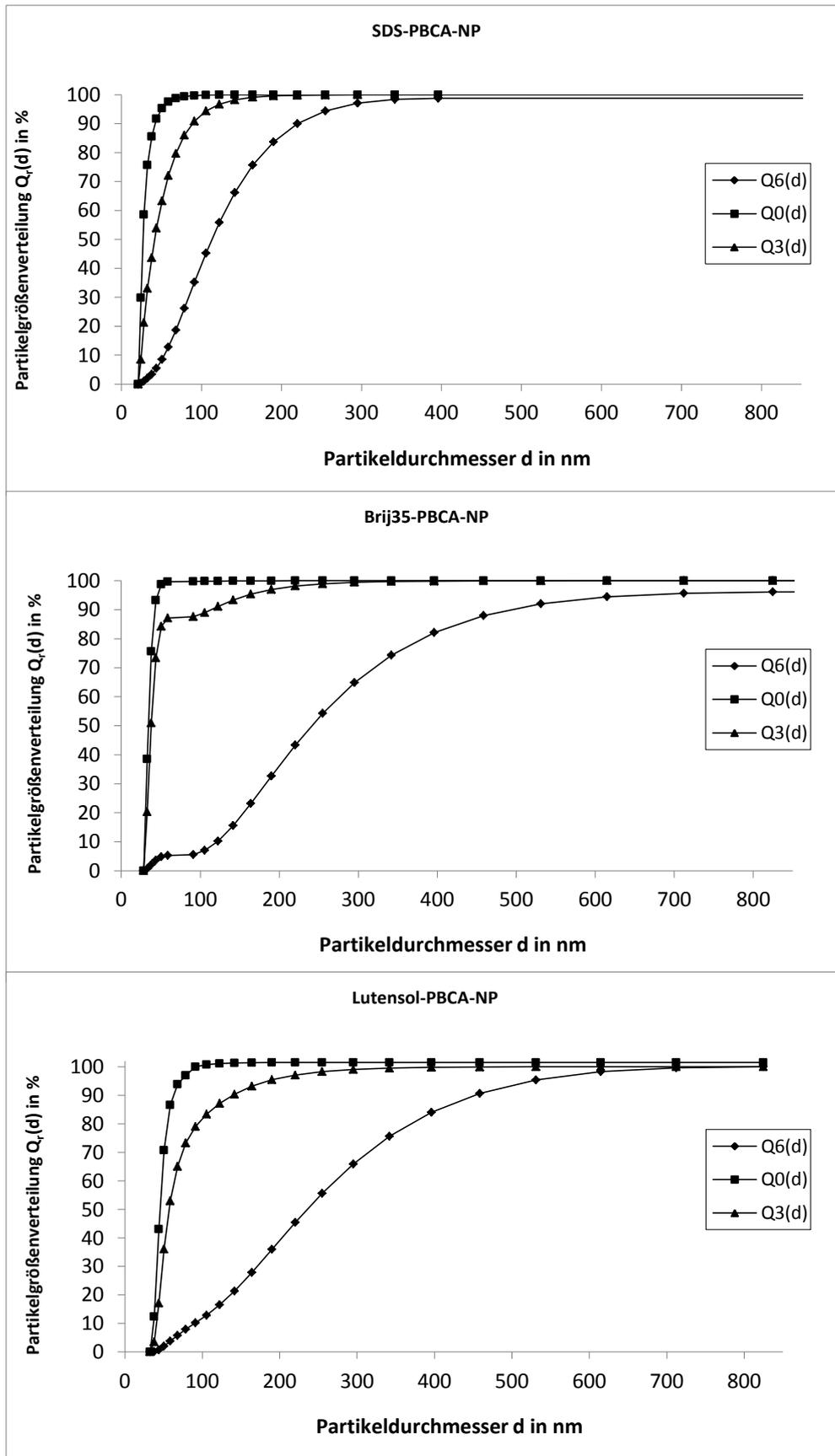
Tabelle 08: Herstellung und Zusammensetzung der PBCA-NP

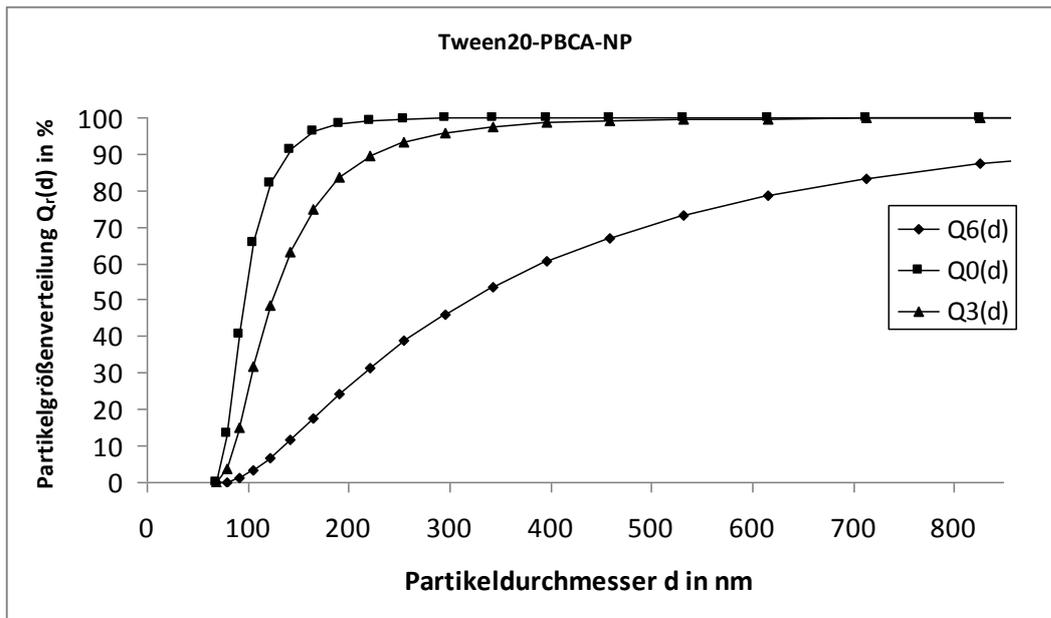
Tensid in mg	Co-Reagenz in mg	Rhodamin123 in mg	Phosphorsäure in ml	Sojaöl in mg	Monomere in g	Ammoniaklsg.
Tween80 513		33,75	9 (0,8M)	90	2,3	0,8M
Tween80 513	SDS 72	33,75	9 (0,8M)	90	2,3	0,8M
Tween80 513	Dextran 15	15	9 (0,8M)	90	2,3	0,8M
Tween20 513		33,75	9 (0,8M)	90	2,3	0,8M
Lutrol 60	SDS 24	18	4,8 (0,1M)	76	1,213	0,1M
Lutrol 397,5	DEAE 225	10	9 (0,1M)	67	1,125	0,1M
Lutrol 56	DEAE 5	10	9 (0,1M)	65	1,125	0,1M
Lutrol 397,5	Dextran 225	10	9 (0,1M)	67	1,125	0,1M
Brij35 256		10	9 (0,8M)	90	2,3	0,8M
Lutensol 256		10	9 (0,8M)	90	2,3	0,8M
SDS 24		10	9 (0,8M)	90	2,3	0,8M
Lutrol 60		10	4,8 (0,1M)	76	1,213	0,1M

Abbildung 54: Partikelgrößenverteilung der Nanopartikelmodifikationen







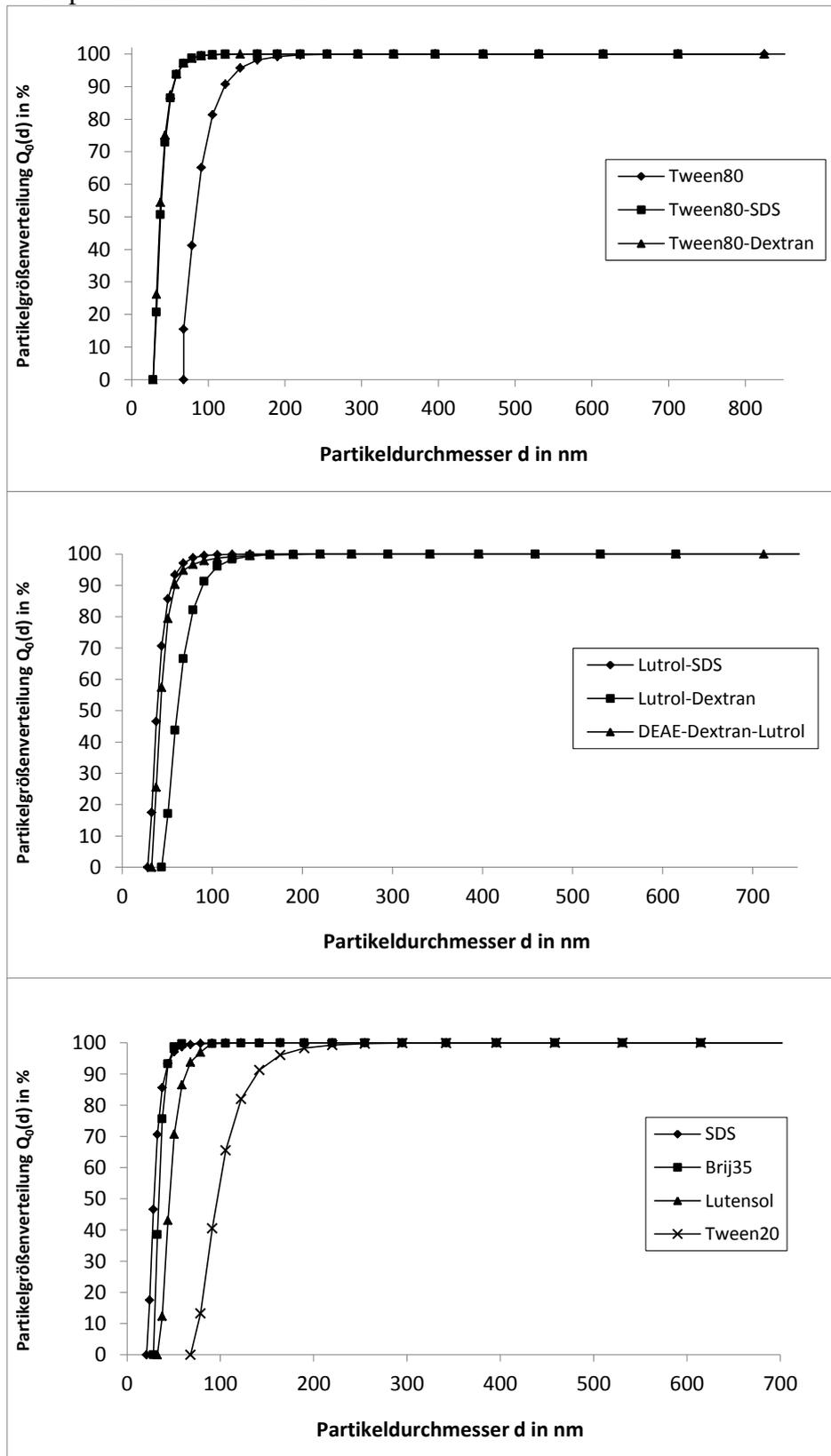


Partikelgrößenverteilung der Mengentart Anzahl $Q_0(d)$ und der Mengentart Masse (Volumen) $Q_3(d)$ wurden mit der Formel (12.3) aus der vom Zetasizer gemessenen Mengentart Intensität $Q_6(d)$ berechnet

Tabelle 09: Charakteristische Werte der Partikelgrößenverteilungen der PBCA-Nanopartikelmodifikationen

$d_{i,r}$ in nm	Tween80	Tween80-SDS	Tween80-Dextran	Lutrol-SDS	Lutrol-Dextran	DEAE-Dextran-Lutrol	Brij35	SDS	Lutensol	Tween20
$d_{10}(r=0)$	68	30	30	30	48	36	29	22	36	76
$d_{10}(r=3)$	75	33	33	32	52	40	30	24	40	85
$d_{10}(r=6)$	105	56	58	50	79	137	120	52	86	130
$d_{50}(r=0)$	85	38	38	38	62	43	34	27	45	96
$d_{50}(r=3)$	110	47	48	48	80	60	38	42	57	124
$d_{50}(r=6)$	210	140	138	115	146	272	240	112	235	320
$d_{90}(r=0)$	122	50	53	54	91	58	42	42	63	141
$d_{90}(r=3)$	220	85	90	88	141	190	115	90	142	220
$d_{90}(r=6)$	430	460	340	270	280	505	490	220	450	890

Abbildung 57: Partikelgrößenverteilung $Q_0(d)$ der verschiedenen PBCA-Nanopartikelmodifikationen



Darstellung der Partikelgrößenverteilung der Mengenangabe $Q_0(d)$. $Q_0(d)$ wurde mit der Formel (12.3) aus der vom Zetasizer gemessenen Mengenangabe Intensität $Q_6(d)$ berechnet

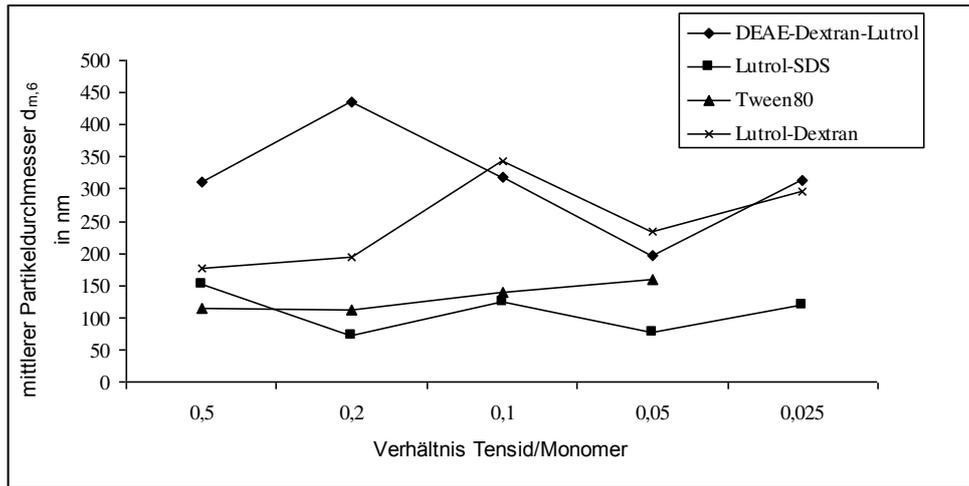


Abbildung 58: Abhängigkeit des mittleren Partikeldurchmesser $d_{m,6}$ vom Massenverhältnis Tensid/Monomer bei der Herstellung von Rhodamin123 markierten PBCA-Nanopartikelmodifikationen. Ein Verhältnis von Tensid/Monomer von 0,5 bzw 0,2 führt zu kleinen Nanopartikeln außer bei DEAE-Dextran-Lutrol. In diesem Fall sollte ein Verhältnis von 0,02 für die Erzeugung kleiner Partikel vorgezogen werden.

Geräte und Chemikalien

Geräteübersicht

Kalibrierte Crushpinzette	Martin Instruments, Tuttlingen, Deutschland
Butterfly Katheder	BD Adsyte Pro, 22 G, Heidelberg, Deutschland
Hot plate	Model DS 37 Socrel, Italien
96-Wellplatten	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Kulturflaschen	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Plattenreader	Opsys MR TM Thermo Labssystem
Image analysis systems	Q-500MC system, Leica, Bensheim, Deutschland AxioVision system, software release 4.8, Carl Zeiss GmbH, Jena, deutschland
Kontaktlinse	Hruby style -80 dioptrin plano-concave lens, KPC-013, Newport GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mikroskop Workstations	INDY, operating system IRIX 5.3, software "Intervision" version 1.4.1, Silicon Graphics, Grasbrunn, Deutschland FUJITSU SIEMENS Computers "CELSIUS", operating system WIN XP (Intel Pentium 4), software "LSM 5 PASCAL", basic software R2.8, version 3.2 SP2, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskope	LSM 5 Pascal, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland (Argon Laser 453-514 nm, Helium/Neon-Laser 543nm/633nm)
Objektive	N-Plan, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland Epiplan (442920), Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Operations-Mikroskop	Leica MS5, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Schnauzenhalterung	Narishige International Ltd., London, United Kingdom
Spritze für i.c	10 µl, Hamilton, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Stereotaktisches Gerät	Digital Lab Standard Stereotaxic System, Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
Venenverweilkatheder	BD Adsyte Pro, 22 G, Heidelberg, Deutschland
Kalibrierte Crushpinzette	Martin Instruments, Tuttlingen, Deutschland

Verwendete Geräte für die Partikelherstellung

Feinwaage	Sartorius Göttingen, Deutschland
Magnetrührer	Variomag Mono Direkt, Deutschland
pH-Meter	Windhaus, Deutschland
Ultraschallhomogenisator Sonoplus HD 2070	Bandelin Berlin, Deutschland
Ultraschallreinigungsgerät Elmasonic S 30	ATP Messtechnik Ettenheim, Deutschland
Vortexer 2	VWR International GmbH, Deutschland
Zetasizer Nano ZS (He-Ne- Laser $\lambda = 633$ nm, Streuwinkel 173° , 25°C)	Malvern Instruments GmbH Karlsruhe, Deutschland

Chemikalien

Aureomycin®	Lederle Arzneimittel GmbH, Wolfratshausen, Deutschland
Chloralhydrat	7 % solution, Fluka - Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DEAEDextran	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dextran70.000	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DMEM, High Glucose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Entellan	Merck Millipore KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	100 %, Universitätsklinikum Magdeburg A. ö. R., Zentralapotheke, Magdeburg, Deutschland
FKS fötales Kälberserum	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ketamin ("Ketavet")	"Ketavet", 100 mg/ml, Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland
Knochenwachs (W 30E)	ETHICON, Norderstedt, Deutschland
Kyotorphin (D-Arg ²)	Bachem, Deutschland
Liquifilm	Pharm-Allergan GmbH, Ettlingen, Deutschland
n-Butyl-2cyanoacrylate Monomer (BCA)	Henkel AG & Co.KG Düsseldorf, Deutschland
Neosynephrine	Neosynephrine-POS 2.5 %, Universitätsklinikum Magdeburg A. ö. R., Zentralapotheke, Magdeburg, Deutschland

	land
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
physiologische Kochsalz- lösung	Physiological, Sodium chloride infusion liquid 154, Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland
Proparacain	Proparacain-POS 0.5 %, Ursapharm Arzneimittel GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Rompun	20 mg/ml, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Sojaöl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin EDTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Vidisic optical gel	M. Pharma, Berlin, Deutschland
Alexa Fluor 594	Dextran, 10.000 MW, anionic, fixable (D22913), Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mini Emerald	Dextran, fluorescein and biotin, 10.000 MW, anionic, lysine fixable (D-7178), Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mini Ruby	Dextran, tetramethylrhodamine and biotin, 10.000 MW, lysine fixable (D-3312), Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Rhodamin 123	(>98%) Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Recoverin Primär-Antikörper	Anti-Recoverin Antikörper (polyclonal, Kanninchen) Merck Millipore KGaA, Darmstadt, Deutschland
GFAP Primär-Antikörper	Glial Fibrillary Acidic Protein (polyclonal, Kaninchen, IgG), Antikörper-online GmbH, Aachen, Deutschland
Cy3 Sekundär-Antikörper	Ziege anti-Kaninchen IgG Antikörper Cy3, Antikörper-online GmbH, Aachen, Deutschland
<u>Verwendete Tenside</u>	
Tween® 20, 80 (Polysorbat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Brij35	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Lutensol AT80	BASF Ludwigshafen, Deutschland
Lutrol F68 (Poloxamer 188)	BASF Ludwigshafen, Deutschland
Sodium dodecylsulfat SDS	(>99%) Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20, 80 (Polysorbat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Ansätze

4% PFA	20g Paraformaldehyd zu 500ml Phosphatpuffer
Alexa Fluor 594 Dextran	5mg Lösung in 50 µl Phosphatpuffer (10mM)
Chloralhydrate	7g Chloralhydrat in 100ml physiologische Kochsalzlösung
Cryoprotektive Lösung (500ml)	150ml 30% Ethylenglycol + 125ml 25% Glycerin + 225ml Phosphatpuffer (0,05M)
DMEM Vollmedium	500ml DMEM + 10ml Penicillin-Streptomycin + 50ml FKS
Eosinlösung	3ml Essigsäure in 270ml 70% EtOH + 30ml Eosinstamm- lösung (2,5g Eosin in 250ml Aqua bidest)
HCL-Alkohol	10ml Salzsäure (25%) in 500ml 70% EtOH
Mayer`s Hämalau	0,5g Hämatoxylin in 500ml in Aqua bidest + 0,1g NaJO ₃ + 25g Kalilalaun + 25g Chloralhydrat + 0,5g Zitronensäure
Mini Emerald	10mg Lösung in 100µl Phosphatpuffer (10mM) + 50µl Tween20
Mini Ruby	10mg Lösung in 100µl Phosphatpuffer (10mM) + 50µl Tween20
Mowiol	5g Mowiol in 20ml 0,2M PBS + 10ml Glycerin
Phosphatpuffer (0.1M, pH=7,4)	(A)13,6g KH ₂ PO ₄ auf 1000ml Aqua bidest (B)17,8g Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O in 1000ml Aqua bidest 2Teile (A) zu 8Teile (B)
Phosphatgepufferte Salzlösung (0.1M PBS)	0,9g NaCl auf 1l 0.1M Phosphatpuffer
Präinkubat	1000µl Triton X, 500µl Ziegenserum, 10ml 0.1M PBS
Recoverin 1.Antikörper	1:10 in Präinkubat
GFAP 1.Antikörper	1:10 in Präinkubat
Cy3 2.Antikörper	20µl Cy3, 100µl Ziegenserum, 10ml 0.1 M PBS

Veröffentlichungen

Paper

P. Henrich-Noack, S. Prilloff, N. **Voigt**, J. Jin, W. Hintz, J. Tomas, B.A. Sabel, *In vivo* visualisation of nanoparticle entry into the central nervous system tissue. Archives of Toxicology 86 (2012) 1099-1105

P. Henrich-Noack, S. Lazik, E. Sergeeva, S. Wagner, N. **Voigt**, S. Prilloff, A. Fedorov, B.A. Sabel, Transcorneal alternating current stimulation after severe axon damage in rats results in “long-term silent survivor” neurons. Brain Research Bulletin 95 (2013) 7-14

P. Henrich-Noack, N. **Voigt**, P. Prilloff, A. Fedorov, B.A. Sabel, Transcorneal electrical stimulation alters morphology and survival of retinal ganglion cell after axonal damage. Neuroscience Letters 543 (2013) 1-6

E.G. Sergeeva, M. Bola, S. Wagner, S. Lazik, N. **Voigt**, C. Mawrin, A.G. Gorkin, W.J. Waleszczyk, B.A. Sabel and P. Henrich-Noack, (2015), Repetitive transcorneal alternating current stimulation reduces brain idling state after long-term vision loss. Brain Stimulation 8:1065-1073.

N. **Voigt**, P. Henrich-Noack, S. Kockentiedt, W. Hintz, J. Tomas and B.A. Sabel, (2014), Surfactants, not size or zeta potential influence blood-brain barrier passage of polymeric nanoparticles. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 87(1): 19-29.

N. **Voigt**, P. Henrich-Noack, S. Kockentiedt, W. Hintz, J. Tomas and B.A. Sabel (2013), Toxicity of polymeric nanoparticles in vivo and in vitro. Journal of Nanoparticle Research 16: 2379.

P. Henrich-Noack, E.G. Sergeeva, T. Eber, Q. You, N. **Voigt**, J. Köhler, S. Wagner, S. Lazik, C. Mawrin, G. Xu, S. Biswas, S.A. Sabel & C.K.-S. Leung, (2017), Electrical brain stimulation induces dendritic stripping but improves survival of silent neurons after optic nerve damage. PM&R, Scientific Reports 7:627.

Konferenzbeiträge

- P. Henrich-Noack, **N. Voigt**, S. Prilloff, B.A. Sabel, Development of a pre-clinical model for repetitive transorbital alternating current stimulation for restoration of function after optic nerve crush. XXXII International Congress of Ophthalmology. (2011) Berlin, Deutschland.
- P. Henrich-Noack, **N. Voigt**, S. Prilloff, B.A. Sabel, Does transorbital alternating current stimulation enhance the survival of retinal ganglion cells? Meeting of the German Neuroscience Society. (2011) Göttingen, Deutschland
- P. Henrich-Noack, **N. Voigt**, S. Prilloff, B.A. Sabel: Transcorneal 20 Hz electrical stimulation reduces early trauma-induced cell death and changes pattern of retinal ganglion cell degeneration after optic nerve crush. IBIA 9th Annual World Congress (2012) in Edinburgh, UK
- P. Henrich-Noack, E. Sergeeva, S. Wagner, S. Lazik, **N. Voigt**, S. Prilloff, A. Fedorov, B. Sabel: Transcorneal alternating current stimulation increases long-term survival of neurons after severe axon damage. 7th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair 2012 in Potsdam
- P. Henrich-Noack, E. Sergeeva, S. Wagner, S. Lazik, **N. Voigt**, S. Prilloff, A. Fedorov, B. Sabel: Effects and Mechanisms of Transorbital Alternating Current in a Rodent Model of Axonal Trauma. hiVe workshop Berlin 2012 (Hyper Interaction Viability Experiments)
- N. Voigt**, P. Henrich-Noack, W. Hintz, A. Mauth, S. Tschorn, J. Tomas, B.A. Sabel, Influence of coating on blood-brain barrier passage of polybutylcyanoacrylat nanoparticles. Internationales Nanotechnology Symposium. (2012) Dresden, Deutschland
- S. Tschorn, P. Henrich-Noack, **N. Voigt**, W. Hintz, J. Tomas, B.A. Sabel, Entwicklung und Charakterisierung verschiedener Nanopartikelformulierungen und Testung im Hinblick auf die Blut-Hirn-Schrankgängigkeit. 6.Symposium Produktgestaltung in der Partikeltechnologie.(2013) Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
- N. Voigt**, P. Henrich-Noack, W. Hintz, S. Tschorn, J. Tomas, B.A. Sabel, Nanoparticle transfer into the brain: a matter of surface, not size. 15. Bad Herrenalber Transporter- und Barriere Tage. (2013) Bad Herrenalb, Deutschland
- S. Kockentiedt, P. Henrich-Noack, **N. Voigt**, W. Hintz, J. Tomas, B.A. Sabel, Functionalization of different PBCA nanoparticles for overcoming the blood-brain barrier. The 7th World Congress on Particle Technology. (2014) Peking, China
- S. Kockentiedt, P. Henrich-Noack, **N. Voigt**, W. Hintz, J. Tomas, B.A. Sabel, Development and characterisation of different PBCA nanoparticles with respect to the blood-brain barrier crossing. 21st International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA. (2014) Prag, Tschech. Republik

Buchbeiträge

S. Tschorn, P. Henrich-Noack, **N. Voigt**, W. Hintz, J. Tomas, B.A. Sabel, Entwicklung und Charakterisierung verschiedener Nanopartikel-Formulierungen und Testung im Hinblick auf die Blut-Hirn-Schrankengängigkeit, S. 149-171 in: U. Teipel, A. Weber (Hrsg.), Produktgestaltung in der Partikeltechnologie, Band 6, Fraunhofer-Verlag, Stuttgart, (2013)

Curriculum vitae

Nadine Voigt

geboren am 17.09.1984 in Zerbst.

Schulbildung

1995 – 2004 Gymnasium Franciscum Zerbst mit Abschluss der Hochschulreife (2.4)

Studium

10/2004 – 11/2010 Studium **Biosystemtechnik**
an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Abschluss **Dipl.-Ing. für Biosystemtechnik** (2.6)

Seit 10/2011 Promotionsstudent am Lehrstuhl für Verfahrenstechnik
an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Berufliche Tätigkeit

seit 08/2015 Prozessmanager für virale Humanimpfstoffe
IDT Biologika GmbH

03/2014 – 07/2015 Projektassistent für virale Humanimpfstoffe
IDT Biologika GmbH

10/2011 – 02/2014 wissenschaftlicher Mitarbeiter
Institut für Medizinische Psychologie
Direktor Prof. Dr. B.A. Sabel
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

04/2010 – 09/2011 wissenschaftliche Hilfskraft
Institut für Medizinische Psychologie
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Praktika

07/2009 – 11/2009 Öko-control GmbH Ingenieurbüro für Arbeitsplatz
und Umweltanalysen

04/2009 – 06/2009 Studienarbeit
Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Otto- von-
Guericke-Universität Magdeburg
Medizinische Fakultät

08/2006 – 09/2006 Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt
Bereich Arzneimittelprüfstelle

09/2005 – 10/2005 LUS GmbH Labor für Umweltschutz und chemische
Analytik

Auslandsaufenthalt

10/2012 – 11/2012 Chinese University of Hong Kong (CUHK)
Augenklinik Prof. C. Leung

Gehrden, 27.10.2017

