

Aus dem  
Institut für neurochirurgische Pathophysiologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Charakterisierung und zeitliche Kinetik der Aufnahme von  
mehreren bioabbaubaren und nicht-abbaubaren  
Nanopartikeln in Monokulturen von C6-Gliomazellen sowie  
zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen und Astrozyten  
aus dem Schweinehirn**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
vorgelegt von

Michaela Galley  
aus Heidelberg

Mainz, 2021

# Terminblatt

Wissenschaftlicher  
Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 06.07.2021

## Widmung

Für die Zukunft und die Vergangenheit.  
Für Manuel und Elisabeth.

*“Happiness can be found, even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light.”*

*— J.K.Rowling, Harry Potter and the Prisoner of Azkaban*

# Inhaltsverzeichnis

Terminblatt .....	II
Widmung .....	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis .....	1
1. Einleitung und Ziel der Dissertation.....	2
2. Stand der Wissenschaft .....	4
2.1. Blut-Hirn-Schranke .....	4
2.2. In-vitro BHS-Modelle .....	7
2.3. Nanomaterialien.....	10
3. Materialien.....	16
3.1. Verbrauchsmaterial .....	16
3.2. Chemikalien, Reagenzien und Lösungen.....	18
3.3. Kulturmedien .....	19
3.4. Geräte .....	21
3.5. Zellen .....	22
3.5.1. C6-Zellen Zellkultur.....	22
3.5.2. Primärzellen.....	22
3.6. Nanopartikel .....	24
3.7. Software .....	24
4. Methoden .....	25
4.1. Kultivierung der C6-Gliomzellen .....	26
4.2. Isolation und Kultivierung der Primärzellen .....	26

4.3.	Versuchsreihen für die Durchflusszytometrie-Messung .....	30
4.3.1.	Versuchsablauf in den verschiedenen Zelltypen.....	31
4.3.2.	Auswertung der Daten und Gating-Strategie .....	33
4.3.3.	Color Compensation .....	33
4.3.4.	Normierung der Ergebnisse .....	34
4.4.	Versuchsreihen für die Laser Scanningmikroskopie .....	36
4.5.	Statistische Betrachtung.....	39
5.	Ergebnisse .....	41
5.1.	Alle Nanopartikel in C6-Gliomzellen Durchflusszytometrie.....	41
5.2.	Zeitreihe mit C6-Gliomzellen - Durchflusszytometrie.....	44
5.3.	Zeitreihe mit Astrozyten - Durchflusszytometrie .....	52
5.4.	Zeitreihe mit Endothelzellen - Durchflusszytometrie .....	60
5.5.	Konfokale Laser Scanning- Mikroskopie .....	69
6.	Diskussion.....	71
6.1.	Modell und Methoden.....	71
6.1.1.	Ergebnisse Laser Scanningmikroskopie .....	75
6.2.	Ergebnisse Durchflusszytometrie .....	75
6.2.1.	C6-Gliomzellen .....	75
6.2.2.	Primärzellen.....	82
6.2.3.	Fazit hinsichtlich der Fragestellung .....	85
	Zusammenfassung.....	88
7.	Anhang.....	90
8.	Literaturverzeichnis .....	101
9.	Danksagung .....	110
10.	Tabellarischer Lebenslauf .....	111

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Blut-Hirn-Schranke mit den beteiligten Zelltypen (Abbott et al., 2010) .....	5
Abbildung 2: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von anti-CD31-angefärbten zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen .....	22
Abbildung 3: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von anti-GFAP-angefärbten primären Astrozyten .....	23
Abbildung 4: Geplanter Ablauf für Testung der NPs mittels Durchflusszytometrie ....	25
Abbildung 5: Relative Aufnahme der 7 in C6-Gliomzellen getesteter Nanopartikeln .	41
Abbildung 6: Toxizitätsdaten der 7 getesteten Nanopartikel in C6-Gliomzellen .....	42
Abbildung 7: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels SS-SDS in C6-Gliomzellen.....	44
Abbildung 8: Toxizitätsdaten zu Partikel SS-SDS in C6-Gliomzellen .....	45
Abbildung 9: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels PFDL-Tw in C6-Gliomzellen.....	46
Abbildung 10: Toxizitätsdaten zu Partikel PFDL-Tw in C6-Gliomzellen .....	47
Abbildung 11: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels PLLA-SDS in C6-Gliomzellen.....	48
Abbildung 12: Toxizitätsdaten zu Partikel PLLA-SDS in C6-Gliomzellen .....	49
Abbildung 13: Gemessene Leuchtintensität der C6-Gliomzellen ohne NP (Negativkontrollen) .....	50
Abbildung 14: Toxizitätsdaten zu den C6-Gliomzellen ohne NP (Negativkontrolle) ..	50
Abbildung 15: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels SS-SDS in Astrozyten .....	52
Abbildung 16: Toxizitätsdaten zu Partikel SS-SDS in Astrozyten.....	53
Abbildung 17: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels PFDL-Tw in Astrozyten .....	54
Abbildung 18: Toxizitätsdaten zu Partikel PFDL-Tw in Astrozyten .....	55

Abbildung 19: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels PLLA-SDS in Astrozyten .....	56
Abbildung 20: Toxizitätsdaten zu Partikel PLLA-SDS in Astrozyten.....	57
Abbildung 21: Gemessene Leuchtintensität der Astrozyten ohne NP (Negativkontrolle) .....	58
Abbildung 22: Toxizitätsdaten zu Astrozyten ohne Inkubation mit NP (Negativkontrolle) .....	59
Abbildung 23: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels SS-SDS in Endothelzellen.....	60
Abbildung 24: Toxizitätsdaten zu Partikel SS-SDS in Endothelzellen .....	61
Abbildung 25: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels PFDL-Tw in Endothelzellen.....	62
Abbildung 26: Toxizitätsdaten zu Partikel PFDL-Tw in Endothelzellen .....	63
Abbildung 27: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels PLLA-SDS in Endothelzellen.....	64
Abbildung 28: Toxizitätsdaten zu Partikel PLLA-SDS in Endothelzellen .....	66
Abbildung 29: Gemessene Leuchtintensität der Endothelzellen ohne NP (Negativkontrolle) .....	67
Abbildung 30 Toxizitätsdaten zu den Endothelzellen ohne NP (Negativkontrolle) ....	68
Abbildung 31: cLSM mit PLLA-Tw in C6-Zellen.....	69
Abbildung 32: cLSM mit SS-SDS in C6-Zellen.....	69
Abbildung 33: cLSM mit PLLA-Tw in Astrozyten .....	70

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verbrauchsmaterialien .....	17
Tabelle 2 Sonstige Chemikalien, Reagenzien und Lösungen .....	18
Tabelle 3 Verwendete Kulturmedien .....	19
Tabelle 4 Inhaltsstoffe der Kulturmedien .....	20
Tabelle 5 Geräte.....	21
Tabelle 6 Verwendete Nanopartikel .....	24
Tabelle 7 Software .....	24
Tabelle 8 Übersicht zu den Durchflusszytometrie-Messungen mit C6-Gliomzellen...	30
Tabelle 9 Durchflusszytometrie-Messungen Astrozyten.....	31
Tabelle 10 Durchflusszytometrie-Messungen Endothelzellen .....	31
Tabelle 11 LSM-Bilder C6-Gliomzellen .....	36
Tabelle 12 LSM-Bilder Astrozyten .....	36
Tabelle 13: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe für die cLSM .....	37



## Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Aminoactinomycin D
ANOVA	Analysis Of Variance – Varianzanalyse
BCEC	Brain Capillary Endothelial Cell (zerebrale mikrovaskuläre Endothelzelle)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECBM 2	Endothelial Cell Basal Medium 2
ECGM 2	Endothelial Cell Growth Medium 2
EPR-Effekt	enhanced Permeation and Retention Effekt
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter, Durchflusszytometrie
FCS	flow cytometrie, Durchflussscytometrie
FKS	Fetales Kälber-Serum, Fetal Bovine Serum
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
LSM	Laser Scanningmikroskopie
MEM	Minimum Essential Medium
NaCl	Natrium-Chlorid-Lösung
NK	Negativkontrolle
NVE	Neurovaskuläre Einheit
PBCA	Poly(butylcyanoacrylate)
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFDL	Perfluorodecylacrylat
PLGA	Poly(D,L-lactid-co-glycolid)
PLLA	Poly(L-Laktid)
PS	Polystyrol
PMI	N-(2,6-Diisopropylphenyl)-perylen-3,4-di- Carboximid (auch: Perylenmonoimid)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCD	Tissue Culture Dish
TEER	Transendothelial electrical resistance
Tw	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonooleat(Tween 80)
ZNS	zentrales Nervenmsystem

## 1. Einleitung und Ziel der Dissertation

Das moderne Gesundheitssystem und die Medizin des 21. Jahrhunderts stehen vor einer großen Herausforderung. Einer gestiegenen Lebenserwartung und -qualität der Menschen in den Industrienationen stehen gestiegene Anforderungen hinsichtlich Therapien und Therapierbarkeit von Erkrankungen gegenüber. Während deutliche Verbesserungen in der Behandlung von z.B. Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes oder des Herz-Kreislauf-Systems zu verzeichnen sind, stehen die Medizin und die Pharmazie immer noch vor einer schweren Aufgabe: der Entwicklung von Therapeutika, die erfolgreich das zentrale Nervensystem erreichen.

So stellen neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Parkinson, Tumorerkrankungen des Gehirns oder Schädel-Hirn-Traumata immer noch Erkrankungen dar, die nicht zufriedenstellend therapiert werden können. Diese Krankheiten haben jedoch häufig chronisch progrediente Verläufe und stellen durch die langen und fortschreitenden Krankheitsverläufe somit für das Gesundheitssystem eine erhebliche ökonomische Belastung dar (Ehret et al., 2009). So sind für diese Erkrankungen zwar häufig Wirkstoffe zur Behandlung vorhanden, diese können die Blut-Hirn-Schranke (BHS) aber nicht oder nur unzureichend überwinden und so nur geringfügig ins Gehirn verbracht werden (Wang et al., 2014). Gleichzeitig ist die Barrierefunktion der BHS aber essentiell für die physiologische Trennung zwischen Blutkreislauf und neuronalem Gewebe, um das empfindliche Hirngewebe vor toxischen Einflüssen zu schützen. Entsprechend wünschenswert wäre folglich die Entwicklung eines Wirkstoff-Träger-Systems, das die BHS effizient passieren kann, ohne dabei die Integrität dieser Barriere herabzusetzen. Hierfür muss ein Arzneistoff durch das Wirkstoff-Träger-System unbeschadet im Körper transportiert werden, spezifisch mit Rezeptoren auf der Endothelbarriere der BHS interagieren und dann internalisiert werden. Ein vielversprechender Ansatz für solch ein System scheint die Entwicklung von nanoskaligen Wirkstoffträgern zu sein, wie sie z.B. bereits bei der Tumorbehandlung eingesetzt werden (Sun et al., 2014). Nanopartikel (NP) bilden durch die Möglichkeit, sie mit einzigartigen physikochemischen Eigenschaften auszustatten, eine aussichtsreiche Chance zur Überwindung der BHS. Insbesondere polymere NPs, die mit Hilfe von Miniemulsionsverfahren hergestellt werden, bieten bei der Herstellung flexible Variationen hinsichtlich Polymer, Zusammensetzung, Größe, Oberflächenmodifizierung und Wirkstoffbeladung (Nicolas et al., 2013).

Da es jedoch eine Vielzahl an infrage kommender NP gibt, welche teilweise auch Nebenwirkungen haben könnten, ist es sinnvoll die NPs z.B. an Monokulturen vorzuselektionieren, bevor aufwendige Versuche mit 3D-in-vitro Modelle der BHS oder sogar in-vivo Versuche an krankheitsspezifischen Tiermodellen durchgeführt werden. Die vorliegende Arbeit ist eingebettet in ein BMBF Verbundprojekt (FKZ 13N13528) mit dem Teilziel, verschiedene NP in-vitro und in-vivo zu untersuchen, und beschäftigt sich speziell mit der Testung von verschiedenen polymeren Nanopartikeln an unterschiedlichen Zellarten, welche hirnspezifisch sind und daher als Modell für die am Aufbau der BHS beteiligten Zellen herangezogen werden. Gebildet wird die Blut-Hirnschranke durch ein Zusammenspiel von zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen einerseits, die eine besonders dichte Barriere aus Tight junctions bilden, und Astrozyten andererseits (Abbott et al., 2006). Die Basis zum Selektieren infrage kommender NPs liegt dabei auf einer Versuchsreihe mit C6-Gliomzellen, an denen zunächst alle zur Verfügung stehenden NPs getestet werden. Für eine Auswahl von Partikeln wird anschließend ebenfalls mit C6-Zellen eine Zeitreihe mit unterschiedlichen Inkubationszeiten realisiert. Mit Hilfe der dabei erfassten Daten sollen jene NPs identifiziert werden, von denen man sich eine erfolgreiche Aufnahme in die Primärzellen verbunden mit einer niedrigen Toxizitätsrate verspricht. Anschließend erfolgt die Testung der ausgewählten NPs an primären mikrovaskulären Endothelzellen und Astrozyten aus dem Schweinehirn. Der Fokus dieser Arbeit liegt folglich auf der Testung zehn spezifischer Nanopartikel hinsichtlich Aufnahme und Toxizität in Monozellkulturen als einfachstes Modell für die BHS. Ergänzend soll, soweit möglich, durch Laser Scanningmikroskopie die Aufnahme der Partikel in die Zellen nachgewiesen werden. Auf Grundlage der hiermit gewonnenen Erkenntnisse werden diese NPs anschließend in weiteren Doktorarbeiten in in-vitro- (Orben, 2020) und in-vivo-Modellen der BHS (Bechinger, 2020) getestet.

Es ergeben sich folgende Fragestellungen für diese Arbeit:

- I. Eignen sich C6-Gliomzellen zur Selektion von Blut-Hirnschranke-gängigen NP bezüglich Aufnahmekinetik und Toxizität?
- II. Zeigen sich bei Astrozyten und bei zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Schweinehirn vergleichbare Werte bezüglich zeitlicher Kinetik der Aufnahme und Toxizität vorselektionierter NPs wie bei C6-Gliomzellen?
- III. Unterscheiden sich die selektionierten und untersuchten NPs hinsichtlich ihrer Aufnahme und Toxizität?

## 2. Stand der Wissenschaft

### 2.1. Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke stellt eine der komplexesten und spezialisiertesten Barrieren im menschlichen Körper dar und bildet eine dichte Barriere zwischen Blutkreislauf und neuronalem Gewebe. Sie verhindert den Übertritt von neurotoxischen Substanzen wie Plasmabestandteilen, Blutzellen oder andere pathogene Substanzen und reguliert den kontrollierten Transport von Stoffwechselproteinen in und aus dem neuronalen Gewebe (Zlokovic, 2008). Eine wichtige Rolle für diese Barrierefunktion ist das Zusammenspiel von Kapillarendothel, Perizyten, Astrozyten, Mikroglia, der Basalmembran, Bestandteilen der extrazellulären Matrix und neuronalen Endigungen. Diese Strukturen werden auch als Neurovaskuläre Einheit (NVE) bezeichnet (Sweeney et al., 2019). Sie ist der essentielle Baustein für die Aufrechterhaltung der Homöostase des zentralen Nervensystems (ZNS). Die Bluthirnschranke ist zentraler Bestandteil dieser NVE und wird hauptsächlich durch kontinuierliches, nicht fenestriertes Endothel der zerebralen Kapillaren gebildet, welches durch Tight junctions (TJ) eine dichte Interzellularverbindung ausbildet. Eine wichtige Rolle für die Integrität der BHS spielen hierbei auch die anderen Komponenten der NVE, wie die Astrozytenfortsätze, Perizyten und neuronale Endigungen (Abbott et al., 2006, Sweeney et al., 2019). Die Barrierefunktion der BHS wird auf verschiedenen Ebenen erreicht. So wird durch die TJs eine „physikalische Barriere“ erreicht, indem der parazelluläre Transport weitgehend eingeschränkt wird. Durch spezifische Transportsysteme an der luminalen und abluminalen Seite wird eine Art „Transport-Barriere“ und durch ein komplexes System aus Enzymen eine „metabolische Barriere“ gebildet. Mit Hilfe dieser unterschiedlich wirkenden Barrieren wird im Gehirn eine deutlich niedrigere Transzytose- und Endozytoserate erzielt als im peripher gelegenen Endothel, sodass dieses System den Austausch von Molekülen vom peripheren Kreislauf ins neuronale Gewebe und umgekehrt reguliert und nur kleine lipophile Substanzen und Gase die BHS frei überwinden können (Abbott et al., 2006, Tsukita et al., 2001).

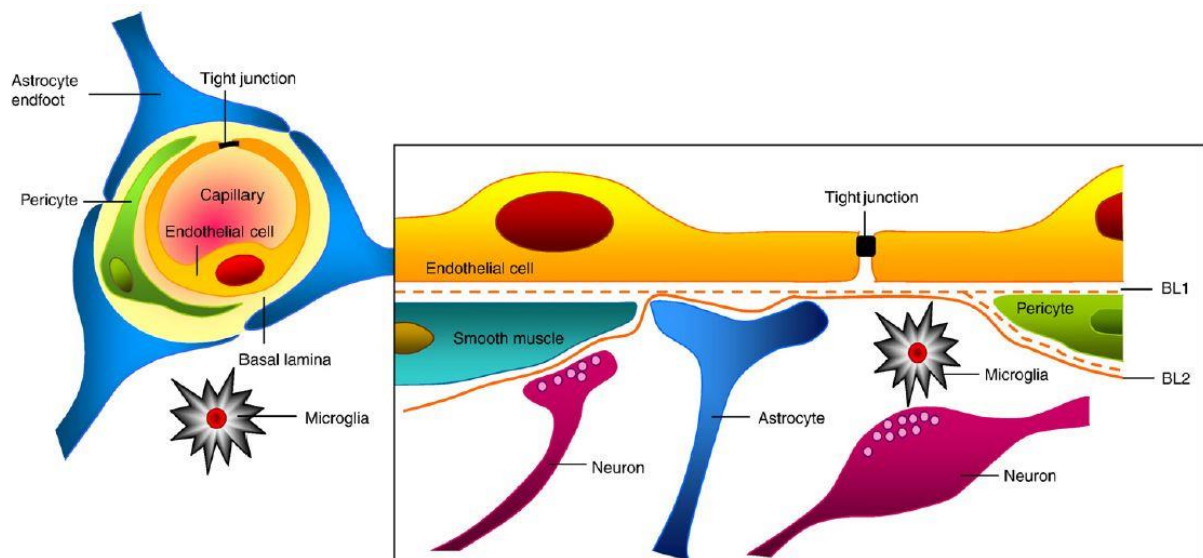


Abbildung 1: Aufbau der Blut-Hirn-Schranke mit den beteiligten Zelltypen (Abbott et al., 2010)

links: beteiligte Strukturen der Neurovaskuläre Einheit

rechts: Detail-Darstellung der NVE, welche den Aufbau der BHS skizziert. Dargestellt sind Endothelzellen, welche durch tight junctions die physikalische Barriere bilden, und die Einbettung der weiteren Zelltypen in die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran.

## Endothelzellen

Die mikrovaskulären Endothelzellen spielen, wie oben beschrieben, eine zentrale Rolle bei dem Aufbau und der Integrität der BHS. Im Allgemeinen bilden Endothelzellen einen festen Bestandteil im Wandaufbau von Blutgefäßen. Sie bilden als flacher Zellverband mit dichten Zellkontakten die innerste Schicht des Tunica Intima. Es handelt sich dabei um hochaktive Zellen, die eine große Rolle in den Bereichen der Angiogenese, der Blutgerinnung und der Vasodilatation/-kontraktion spielen. Von großer Relevanz für diese Arbeit ist ihre Beteiligung am Aufbau der BHS, in welcher sie durch ihre TJs eine besonders dichte Barriere ausbilden (Schiebler and Korf, 2007, Abbott et al., 2010).

## Astrozyten

Astrozyten gehören zu den sogenannten Gliazellen, welche einen wichtigen Teil des Nervensystems darstellen. Die Aufgaben der Astrozyten umfassen ein breites Spektrum, wie z.B. die Beteiligung am Transmitterstoffwechsel, Energiegewinnung für die Neuronen und Proliferation und Narbenbildung bei Verletzungen. Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist, dass Astrozyten lange Zellfortsätze ausbilden, welche auch als Astrozytenfüßchen bezeichnet werden. Diese Zellfortsätze enden an der Oberfläche von Kapillaren, wo sie eine dichte perikapilläre Membran ausbilden und damit ein wichtiger Bestandteil der BHS sind (Schiebler and Korf, 2007). Weiterhin

spielen Astrozyten eine wesentliche Rolle bzgl. der Integrität der BHS, woran unterschiedlichste Interaktionen mit den anderen Bestandteilen der NVE beteiligt sind. Besonders zu erwähnen ist hier die Sekretion von Sonic Hedgehog (SHH) durch Astrozyten, wodurch das Überwinden der BHS durch Immunzellen behindert, der parazelluläre Raum abgedichtet und die Diffusion durch diesen minimiert wird (Alvarez et al., 2011). Zudem haben Astrozyten Einfluss auf die Regulation des Gefäßtonus abhängig von der neuronalen Aktivität und sind durch das hohe Vorkommen von Aquaporin-4 an der Regulation des zerebralen Wasserhaushaltes beteiligt (Blanchette and Daneman, 2015). Bezüglich der Entwicklung der BHS konnte durch In-vitro-Untersuchung in Co-Kulturen von Endothelzellen und Astrozyten gezeigt werden, dass Astrozyten einen Beitrag bei der Entwicklung spezifischer Eigenschaften der BHS leisten (Abbott et al., 2006). Welches Ausmaß dieser Beitrag genau umfasst bzw. durch welche spezifischen Interaktionen und Umstände dieser entsteht, muss zukünftig noch genauer untersucht werden, da neuere Studien widersprüchliche Aussagen hierzu andeuteten. So konnte schon früh nachgewiesen werden, dass durch Kultivierung mit Astrozyten oder astrozyten-konditionierten Medium auch bei Endothelzellen nicht zerebralen Ursprungs BHS-spezifische Eigenschaften, wie z. B. die kontinuierliche Ausbildung von TJs, eine hohe TEER oder die Expression von ICAM-1, ausgelöst werden können (Kuchler-Bopp et al., 1999, Stewart and Wiley, 1981, Janzer and Raff, 1987). Neuere Untersuchungen bei Nagetieren zeigen, dass die Ausbildung der spezifischen Eigenschaften der BHS schon vor der Astrogliogenese beginnt (Blanchette and Daneman, 2015, Daneman et al., 2010). Wodurch sich die Frage stellt, ob Astrozyten die Bildung der BHs induzieren oder ob sie vor allem an der Aufrechterhaltung der BHS beteiligt sind. Eine endgültige Klärung des Sachverhaltes bleibt daher noch abzuwarten.

### Perizyten

Perizyten gehören zu den kontraktilen Zellen und finden sich an kapillaren Blutgefäßen, wo sie Kontakt zu Endothelzellen haben (Schiebler and Korf, 2007, Fernández Klett, 2013). Ihre Bedeutung, vor allem die Beteiligung an der BHS, ist in den letzten Jahren vermehrt erforscht worden. Dabei zeigte sich, dass sie eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und der Aufrechterhaltung der BHS haben. Dies erreichen sie vor allem durch die Inhibition von Mechanismen, die die Durchlässigkeit der BHS erhöhen (z.B. Transzytose) (Blanchette and Daneman, 2015). Zudem beeinflussen sie die korrekte Polarisation der Astrozyten-Endfüßchen und wirken

durch ihre kontraktilen Eigenschaften bei der Regulation des zerebralen Blutflusses durch die neuronale Kopplung mit (Hamilton et al., 2010, Armulik et al., 2010). Das steigende wissenschaftliche Interesse an Perizyten spiegelt sich auch in der vermehrten Berücksichtigung bei BHS-Modellen wider.

## 2.2. In-vitro BHS-Modelle

Mit Beginn der 1970er Jahre starteten erste Bemühungen, zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen (BCEC) aus zerebralen Kapillaren zu kultivieren (Brendel et al., 1974, Orłowski et al., 1974), und so erfolgte der erste Schritt zur Entwicklung von BHS-Modellen. Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden verschiedenste in-vitro Modelle der BHS entwickelt, charakterisiert und für unterschiedlichste Anwendungen etabliert. Dabei sind die Modelle grundsätzlich anhand der verwendeten Zellen zu unterscheiden. Es finden sich dabei Mono-Kulturen ausschließlich aus Endothelzellen (Bowman et al., 1981), Co-Kulturen aus den Kombinationen Endothelzellen/Astrozyten (Dehouck et al., 1990, Goldstein, 1988) oder Endothelzellen/Perizyten (Hayashi et al., 2004) und Tripel-Kulturen aus Endothelzellen/Astrozyten/Perizyten (Nakagawa et al., 2009, Thomsen et al., 2015). Als Quelle für die Isolation der Zellen dienen sehr häufig Mäuse, Ratten, Rinder oder Schweine (Helms et al., 2016). Teilweise werden auch Modelle mit immortalisierten humanen Endothelzellen oder humanen Stammzellen (häufig umbilikalen Ursprungs) verwendet (Cecchelli et al., 2014, Lippmann et al., 2012). Bei der Ergebnisbetrachtung aus Studien der verschiedenen Modelle ist zu beachten, dass es keine einheitliche Beschreibung der Modelle hinsichtlich der parazellulären Permeabilität, dem Transport kleiner/großer oder lipohiler/hydrophiler Moleküle und dem Vorhandensein spezifischer Proteine und Rezeptoren auf allen Ebenen von mRNA bis zur Bildung des Proteins gibt (Helms et al., 2016). Zur Charakterisierung der Dichtheit der Barriere-Modelle wird häufig der transendotheliale elektrische Widerstand (TEER) gemessen und sollte idealerweise kombiniert werden mit Untersuchungen zur passiven Permeabilität von definierten Substanzen, wie die oft verwendeten Sucrose und Mannitol, und dem immunochemischen Nachweis bestimmter Markerproteine, wie z.B. Occludin, Claudin-5 und ZO-1 für die Tight junctions der Endothelzellen (Wolff et al., 2015). Im Allgemeinen zeigt sich bei den Modellen, dass durch die Co-Kultivierung mit Astrozyten (mit oder ohne direktem Zellkontakt) eine deutliche Erhöhung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER) erreicht werden kann. So gibt es Ko-Kultur-Modelle aus Ratten-

Endothelzellen mit Astrozyten bei den TEER-Werte von  $TEER >600 \Omega \text{ cm}^2$  erreicht werden können (Abbott et al., 2012). Dieser Effekt fällt bei Co-Kulturen von Endothelzellen und Perizyten bzw. in Tripel-Kulturen im Verhältnis nicht so klar aus. Einerseits werden Modelle aus Rattenzellen beschrieben, in denen die Triple-Kultur mit Perizyten nochmals höhere TEER-Werte als die verglichene Co-Kultur aus Endothelzellen/Astrozyten aufwies. Hierbei sind Steigerungen der TEER-Werte bis auf das drei- bis vierfache ( $388 \pm 18.8 \Omega \text{ cm}^2$ ) im Vergleich zur Astrozyten/Endothelzell-Co-Kultur möglich waren (Nakagawa et al., 2007). Andererseits werden Modelle aus Mäusezellen beschrieben, in denen die TEER-Werte auf einem gleichen Niveau bleiben oder absinken ( $\sim 50 \Omega \text{ cm}^2$ ) (Deli et al., 2005). Insgesamt zeigen sich sehr unterschiedliche Werte hinsichtlich möglicher Permeabilitätsparameter sowohl zwischen bzw. innerhalb verschiedener Spezies als auch zwischen den unterschiedlichen Protokollen hinsichtlich Kultivierung und Aufbau (Wilhelm et al., 2011, Helms et al., 2016). Die Modelle haben sich aufgrund der jeweils unterschiedlichen Ausprägung einzelner Spezifikationen der BHS für unterschiedliche Anwendungsgebiete etabliert (Helms et al., 2016).

Modelle aus porcinen BCEC haben sich in den letzten Jahren in der BHS-Forschung bewährt und sind weit verbreitet. Dabei haben sich vor allem zwei Isolationsprotokolle durchgesetzt. Diese Protokolle sind beschrieben von Mischeck et al. (Mischeck et al., 1989) und Patabendige et al. (Patabendige et al., 2013a), wobei Letzteres auf ein Protokoll für bovine Zellen von L. L. Rubin (Rubin, 1991) zurückgeht. Beide Varianten beruhen im Wesentlichen auf unterschiedlichen Schritten der enzymatischen Verdauung, Filtration und Zentrifugation. Durch diese Protokolle können relativ verlässlich Modelle mit hohen TEER-Werten sowohl in der Monokultur von Endothelzellen als auch in der Co-Kultivierung von Endothelzellen und Astrozyten generiert werden. Dies geht mit der wiederholten Beschreibung von niedrigen Permeabilitätsraten für Sucrose und Mannitol einher. Zudem wurde die Expression von TJ-Proteinen, wie z.B. Claudin-5 und Occludin, mehrfach nachgewiesen. Diese Eigenschaften bewirken in der Summe einen niedrigen parazellulären Transport und damit die Eignung für Untersuchungen bezüglich der Permeabilität von Substanzen. Ebenso wurden für porcine BHS-Modelle die Expression von vielen weiteren BHS-spezifischen Transportern, Rezeptoren und Enzymen in unterschiedlichen Studien belegt (Nielsen et al., 2017, Helms et al., 2016). Durch das Aussäen auf collagenbeschichteten Flächen können die Zellen ihre polare Differenzierung



zwischen apikaler und basaler Zellmembran auch im Modell ausbilden, was bezüglich der Lokalisation von Rezeptoren von Relevanz ist (Franke et al., 2000). Gegenüber in-vitro-Modellen aus Nagetier-Endothelzellen haben porcine Modelle den Vorteil, dass die Zellausbeute pro Isolation deutlich höher ist, und diese somit weniger arbeitsintensiv sind. Zudem ähneln diese Modelle in Bezug auf Anatomie, Physiologie und Krankheitsentwicklung den humanen Gegebenheiten wesentlich stärker als andere etablierte Modelle tierischen Ursprungs (Nielsen et al., 2017). Aufgrund dieser Eigenschaften haben Modelle mit porcinem Zellursprung in den letzten Jahren an Bedeutung hinsichtlich Screening-Untersuchungen zur BHS-Permeabilität von Substanzen, wie potentiellen Therapeutika, gewonnen. (Patabendige et al., 2013a)

Neben einfachen Mono- oder Co-Kulturen in z.B. Petrischalen oder Kulturflaschen haben sich in der BHS-Forschung zahlreiche Modelle basierend auf sogenannten „Transwell-Platten“ durchgesetzt. Dabei werden Well-Platten verwendet, in die ein mikroporöser semipermeabler Träger als Einsatz gehängt wird. Auf diesen Träger, auch „transwell insert“ genannt, werden dann z.B. auf der Ober- bzw. Unterseite verschiedene Zelltypen ausgesät. Für BHS-Modelle werden hierbei oft Co-Kulturen mit Endothelzellen und Astrozyten realisiert, wobei die Endothelzellen auf der Oberseite und die Astrozyten auf der Unterseite des Trägers platziert werden. Diese Modelle eignen sich gut für eine einfache Beurteilung der Barriereintegrität mittels TEER und auch für Untersuchungen zu Permeabilitätsraten. Durch die einfache und sichere Anwendung sowie die gute Reproduzierbarkeit und die geringen Kosten haben sich die Transwell-Modelle in der Forschung bewährt. Allerdings handelt es sich hierbei um statische Modelle, welche die Gegebenheiten in-vivo nicht genau nachstellen können. Gerade Forschungen hinsichtlich des Einflusses von Scher-Stress oder auch die Beeinflussung der BHS-Eigenschaften durch direkte Zell-Zell-Interaktionen lassen sich hiermit nur schwer realisieren (Kaisar et al., 2019, Gastfriend et al., 2018). Aufgrund dessen hat das Interesse an der Entwicklung von fluiden Mikrosystemen nach dem „Model-on-a-Chip“-Prinzip sehr stark zugenommen. Hierbei ist es mittlerweile möglich, verschiedene Zelltypen der NVE einzubeziehen und auch den physiologischen Blutfluss mittels Scher-Stress zu imitieren (Campisi et al., 2018). Weiterhin können hiermit auch Zell-Zell-Kontakte zugelassen werden, wobei die Minimisierung des Systems das ganze Modell näher an die physiologischen Verhältnisse heranbringt (Gastfriend et al., 2018, Wolff et al., 2015), wie es auch in weiteren Teilprojekten im

Rahmen des den vorliegenden Versuchen zugrundeliegenden BMBF Verbundprojektes FKZ 13N13528 angestrebt wurde.

### C6-Gliomzellen als in-vitro-Modell der BHS

1968 wurde durch Benda et. al. eine Zellkulturlinie aus Astroglioma-Zellen etabliert, diese Zellen werden auch bezeichnet als C6-Gliomzellen. Isoliert wurde die Zelllinie aus soliden Rattenhirntumoren, welche durch N-Nitrosemethylharnstoff induziert wurden. Sie sind in der Zellkulturforschung weit verbreitet (Pfeiffer et al., 1977) und werden oftmals als Modell für Gliazellen, speziell primäre Astrozyten, herangezogen um bspw. die potentiellen Effekte von Testsubstanzen auf Astrozyten zu beurteilen (Davies and Vernadakis, 1986, Kempfski et al., 1988). Somit konnte für diese Zelllinie nachgewiesen werden, dass sie Astrozyten-spezifische Proteine wie GFAP oder das ZNS-spezifische Protein S-100 synthetisieren (Backhovens et al., 1987). C6-Gliomzellen sind in der Lage in Co-Kulturen mit Endothelzellen BHS-spezifische Eigenschaften der BHS auszubilden. Dies zeigt sich anhand erhöhter TEER-Werte durch die vermehrte TJ-Ausbildung, eine geringere  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität und eine niedrigere Pinozytose-Rate, was bspw. zu niedrigen Permeabilitätsraten für Sucrose und Dextran führt (Raub et al., 1992). Im Gegensatz zu den Astrozyten scheinen diese Effekte jedoch durch C6-Gliomzellen nur in einem geringeren Maß auslösbar zu sein (Boveri et al., 2005, Rubin et al., 1991). Jedoch sind sie vorteilhaft hinsichtlich der Handhabung der Kultivierung und des schnellen Wachstums der Zellpopulation, wodurch die schnelle Verfügbarkeit von hohen Zellzahlen für z.B. Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie gewährleistet wird (Kempfski et al., 1992).

## 2.3. Nanomaterialien

### Definition

Im Allgemeinen versteht man unter dem Präfix „nano“ („nanos“ altgriech. für „Zwerg“) ein Milliardstel einer Einheit. Bezogen auf die Längeneinheit Meter bewegen wir uns bei Nanometer (nm) also im Größenbereich von Atomen. Zu dem Begriff „Nanomaterial“, „Nanopartikel“ oder auch „Nanotechnologie“ kursieren in der Forschung verschiedenste Definitionen. Aufgrund dessen ziehen wir an dieser Stelle die von der EU im Jahr 2011 empfohlene Definition zur Hilfe heran:

*„Nanomaterial ist ein natürliches, bei Prozessen anfallendes oder hergestelltes Material, das Partikel in ungebundenem Zustand, als Aggregat oder als Agglomerat enthält, und bei dem mindestens 50 % der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 nm bis 100 nm haben.“* (EU-Kommission, 2011).

Diese Definition unterscheidet die Nanomaterialien hinsichtlich der Außendimensionen weiter in:

- Nanopartikel (3 Dimensionen <100nm)
- Nanostäbchen/Nanodrähte und Nanoröhrchen (2 Dimensionen <100nm)
- Nanoplättchen und -beschichtungen (1 Dimension <100nm)

Dies ist jedoch nur eine recht allgemein gehaltene Definition hinsichtlich der Größe und Verteilung, wobei gerade in der Forschung oftmals auch Größenmaße von 300nm genannt werden. Andere Definitionen, z.B. durch den Verband der Chemischen Industrie, beziehen ebenfalls die, von identischen Stoffen im makroskaligen Bereich, abweichenden Eigenschaften der Nanomaterialien mit ein (Roebben et al., 2014). Da gerade ihre neuartigen physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften, welche durch ihre nanoskalige Größe bedingt sind, doch ein markantes Merkmal von Nanomaterialien darstellen.

Weiterhin umreißen diese Definitionen nur ein recht allgemeines Verständnis von Nanomaterialien, während in der Forschung insbesondere die verschiedenen Formen der Nanomaterialien mit ihren unterschiedlichen Eigenschaften und den daraus resultierenden Vor- und Nachteilen von Bedeutung sind. Eine prägnante Übersicht über diese liefern Huang et al. (Huang et al., 2017), wonach man folgende Unterscheidungen treffen kann:

- Liposomen
- Mizellen
- Polymere Nanopartikel
- Kohlenstoffnanoröhrchen (engl. „carbon nanotube“ (CNT))
- Quantenpunkte (engl. „quantum dot“ (QT))
- Metallische Nanopartikel

## Synthese von Nanomaterialien

Zur Synthese von Nanopartikeln haben sich unterschiedliche Herstellungskonzepte etabliert: Top Down- und Bottom Up-Verfahren. Bei Top Down-Verfahren wird ein Ausgangsmaterial solange zerkleinert, bis Nanopartikel entstehen; ein Beispiel hierfür sind Mahlverfahren oder lithografische Verfahren. Bei den Bottom Up-Verfahren werden aus einzelnen Atomen und Molekülen nanoskalige Strukturen hergestellt, Beispiele hierfür sind Gasphasenmethoden und Flüssigphasensynthesen. Letztere sind an dieser Stelle hervorzuheben, da die für diese Arbeit verwendeten Nanopartikel durch die Miniemulsionspolymerisation synthetisiert wurden. Die Variante der Mikroemulsion bzw. Miniemulsion stellt eine zuverlässige Methode dar, um die Partikelgröße und das Agglomerationsverhalten effektiv zu kontrollieren. Zudem können die reaktiven Oberflächen direkt nach der Herstellung mit funktionalisierten organischen Substanzen, z.B. Tensiden oder Polymeren, stabilisiert werden (Goesmann and Feldmann, 2010, Schunck et al., 2016, Bomhard, 2019). Von besonderer Bedeutung hinsichtlich des Einsatzes bzw. der Verwendbarkeit von Nanopartikeln in der Medizin ist deren Biokompatibilität im menschlichen Organismus. Diese wird im Wesentlichen beeinflusst von der Form, der Oberflächenbeschaffenheit hinsichtlich Morphologie und Ladung, sowie der Größe der Partikel (Schunck et al., 2016, Craparo et al., 2011). Es zeigte sich auch, dass die sogenannte „Proteincorona“ wesentlichen Einfluss auf die Verteilung und Interaktion wie auch auf Internalisierung und Toxizitätseffekte der NPs im Körper hat. Diese Proteincorona (im Engl. gelegentlich auch biomolecular corona) bildet sich durch Proteine und andere Biomoleküle auf der Oberfläche von NPs, wenn diese in Kontakt mit biologischen Flüssigkeiten wie Blut kommen (Wang et al., 2018). Zeitgleich leitet sich aus diesen Erkenntnissen auch die Möglichkeit ab, diese Partikel durch gezielte Funktionalisierung für eine effiziente zielgerichtete Therapie („target therapy“) einzusetzen. Vor allem im Hinblick auf Therapien, bei denen spezifische Barrieren, wie die BHS, überwunden werden müssen, ermöglicht dies vielversprechende Ansätze. So kann z.B. nachgewiesen werden, dass lipide und polymere Nanopartikel durch Transzytose, Phagozytose, Endozytose und Diffusion in der Lage sind, die BHS und TJs zu passieren (Craparo et al., 2011, Zhang et al., 2015).

## Nanopartikel als Trägersysteme/Drug-Delivery-Systeme

Für die praktische Anwendung von Nanomaterialien in der medizinischen Forschung bzw. Diagnostik und Therapie sind vor allem sogenannte „Nanovektoren“ oder auch „Nanocarrier“ von Bedeutung. Dabei handelt es sich um partikuläre Wirkstoffsysteme, bei denen Nanomaterialien mit bioaktiven Teilchen, wie z.B. Wirkstoffen (Therapeutika) beladen sind. Diese Nanovektoren können grob in drei Generationen eingeteilt werden. Die erste Generation umfasst sogenannte „nontargeted delivery systems“, also Nanovektoren mit einem passiven Zuführungssystem, deren Wirkmechanismus im Wesentlichen auf einer, nur auf der Größe des Nanoteilchen basierenden, erhöhten Permeation und Retention im Zielgewebe beruht (EPR-Effekt). Bekannte Vertreter dieser Generation sind Liposomen, Metallnanoteilchen oder z.B. Albumin-Paclitaxel-Nanoteilchen, welche 2005 zur Behandlung von Brustkrebs zugelassen wurden (Riehemann et al., 2009, Gradishar, 2006). Nanovektoren der zweiten Generation sind durch spezifische molekulare Strukturen funktionalisierte Lipide oder andere Nanomaterialien. Oftmals verwendet werden dabei Antikörper, Liganden oder kleine Peptide, die dann spezifisch an Oberflächenmerkmale des Zielgewebes binden können. Ebenso gehören zu dieser Generation „responsive Systeme“, bei denen z.B. durch veränderte pH-Werte oder von außen eingebrachte Einflüsse die Nanovektoren aktiviert werden und Wirkstoffe freigesetzt werden können. Ein Beispiel hierfür sind Eisenoxid-beladene Partikel (Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles = SPIONs), die durch magnetische Wechselwirkungen aktiviert werden und ihre Wirkung entfalten. So können diese SPIONs erfolgreich in der medizinischen Bildgebung (MRT) eingesetzt werden, aber gewinnen auch Bedeutung im Rahmen der Tumortherapie im Sinne der Magnetic-guided targeting oder durch Nutzen der magnetischen Hyperthermie zur Tumorzerstörung (Riehemann et al., 2009, Hilger and Kaiser, 2011, Lübbe et al., 1996). Die dritte Generation bilden Nanovektoren, die einem Mehrstufensystem gleichen, bei denen im Grunde versucht wird, Nanovektoren der beiden vorherigen Stufen miteinander zu koppeln, um die Biokompatibilität zu verbessern, die unterschiedlichen Barrieren im Körper gezielter überwinden zu können und so letztlich eine höhere Wirkstoffkonzentration im Zielgebiet zu erreichen (Riehemann et al., 2009).

Anhand der aufgeführten Beispiele wird ersichtlich, dass Nanocarrier als Drug Delivery Systeme in der Diagnostik und Therapie von Krebserkrankungen schon seit geraumer Zeit von wissenschaftlichem Interesse sind und mittlerweile schon die erfolgreiche

Zulassung darauf beruhender Therapeutika gelungen ist. Zeitgleich konnte gezeigt werden, dass es mit diesen Systemen auch möglich ist, die BHS erfolgreich zu überwinden (Gao and Jiang, 2006). Sie sind daher eine vielversprechende Option, um auch effizientere Therapien für neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Chorea Huntington zu entwickeln.

Während erfolgreiche Überwindungen der BHS mit wirkstoffbeladenen (Dalargin) und Polysorbat80 beschichteten PBCA-Partikeln schon 1995 beschrieben wurden (Kreuter et al., 1995), folgten darauf zunächst Untersuchungen zu dem dabei zugrundeliegenden Aufnahmemechanismus. Es zeigte sich, dass Nanopartikel über vielfältige Mechanismen wie z.B. Endozytose in Zellen aufgenommen werden, aber immer noch nicht alle Aufnahmewege vollständig aufgeklärt sind (Zhang et al., 2015). Bekannte physiologische Transportmechanismen sind adsorptiv vermittelte Transzytose, aktiver Transport über Efflux-Pumpen, Transport über Carrierproteine, neue Ansätze mit Peptid-Vektoren, ein über Zellen vermittelter Transport (z.B. Monozyten und Makrophagen) und Rezeptor-vermittelte Endozytose. Vor allem Letztere bietet eine große Bandbreite. So sind Rezeptoren von entsprechendem Interesse z.B. der Transferrin-Rezeptor, Folat-Rezeptor, Lipoprotein-Rezeptoren, Interleukin-13 Rezeptor  $\alpha 2$  oder Insulin-Rezeptoren, über die eine Überwindung der Zellmembran möglich wird (Patel and Patel, 2017). Durch diese Erkenntnisse konnten in den letzten Jahren vielfältige Nanocarrier entwickelt und in-vitro wie auch in-vivo getestet werden, wobei hier auf Übersichtsarbeiten, wie z.B. durch Patel et al. oder andere (Patel and Patel, 2017, Alexander et al., 2019), verwiesen sei.

Polymere Nanopartikel bieten sich durch ihre Eigenschaften als aussichtsreiche Kandidaten für Nanocarrier zur Überwindung der BHS an. Sie sind stabil, können hinsichtlich oberflächenbindender Liganden angepasst werden, haben eine hohe Beladungskapazität mit unterschiedlichsten Substanzen und bieten eine gewisse Kontrolle hinsichtlich der Arzneistofffreisetzung (Patel et al., 2012). Die Wahl des Polymers ist dabei abhängig von dem gewünschten Einsatzgebiet; so sind bioabbaubare Polymere evtl. sinnvoll bei einer gewünschten Wirkstofffreisetzung, während z.B. Polystyrol nur langsam abbaubar ist und so für den Transport toxischer Substanzen genutzt werden könnte. Häufig (in der Literatur) verwendete Polymere sind dabei Poly(butylcyanoacrylate) (PBCA), Poly(L-Laktid) (PLLA), Polystyrol (PS) und Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA). Auch natürlich-vorkommende bioabbaubare

Substanzen wie Chitosan sind von entsprechendem Interesse (Kumari et al., 2010, Dausend, 2009).

Betrachtet man die bisherigen Untersuchungen von Nanopartikeln in verschiedenen Zelltypen, fällt auf, dass es oftmals entweder lediglich zur Testung bestimmter NPs in einem Zelltyp kommt oder direkt Co-Kulturen zum Einsatz kommen. Es stellt sich daher die Frage, ob sich spezifische Monokulturen als first-line-Screening-Tool für die Testung von Nanopartikeln eignen. Ein Vorteil von BHS-Modellen aus Monokulturen ist die deutlich einfachere Handhabung und die niedrigeren Kosten im Vergleich zu Co-Kultur-Modellen. Daher stellt sich die Frage, ob beispielsweise C6-Gliomzellen als Modell für aufwendigere Co-Kultur-Versuche mit Astrozyten und zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen infrage kommen oder sich deutliche Unterschiede zwischen diesen zeigen. Dies führt zu folgender Fragestellung, die mit dieser Arbeit beantwortet werden soll:

- I. Eignen sich C6-Gliomzellen zur Selektion von Blut-Hirnschranke-gängigen NP bezüglich Aufnahmekinetik und Toxizität?
- II. Zeigen sich bei Astrozyten und bei zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Schweinehirn vergleichbare Werte bezüglich zeitlicher Kinetik der Aufnahme und Toxizität vorselektionierter NPs wie bei C6-Gliomzellen?
- III. Unterscheiden sich die selektionierten und untersuchten NPs hinsichtlich ihrer Aufnahme und Toxizität?

### 3. Materialien

#### 3.1. Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Referenz	Hersteller
CellStar Polypropylen Röhrchen, 15ml	188261	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
CellStar Zellkulturflasche, 250ml	658170	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Coverglas Chamberslides 8er		
Einweghandschuhe, Sempercare premium	8237 81043	Semperit Technische Produkte GmbH, Austria
Einweg-Skapelle Cutfix®		B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Eppendorf tubes 5ml	0030119460	Eppendorf AG, Deutschland
Falcon konische Zentrifugenröhrchen 50ml	352070	Falcon by Corning Incorporated, USA
Kompressen, steril		
Nunc Cryo Tube Vials	375418	Thermo Fisher Scientific
Nunc Multidish 12 well Nunclon Delta Surface	150628	Thermo Fisher Scientific
Nylonfilter 100mikromm	16534K	Sartorius AG, Deutschland
Petrischalen (TCD) 20x100mm, steril	353003	Falcon by Corning Incorporated, USA
Pasteurpipette, Glas, 150mm	4518	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Pasteurpipette, Glas, 250mm	4522.1	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Pasteurpipette, Glas, 230mm	612-1702	VWR International GmbH, Deutschland
Pipette 5ml	606180	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Pipette 10ml	607180	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Pipette 25ml	760180	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Pipette 50ml	768180	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Pipettenspitzen 100. TipOne, Filter Tip	S1120-1840	StarLab International GmbH, Deutschland
Pipettenspitzen 1000. TipOne, Filter Tip	S1122-1830	StarLab International GmbH, Deutschland



<b>Bezeichnung</b>	<b>Referenz</b>	<b>Hersteller</b>
Präzisionsspitze, neo Tips, 200mikrol	7-1907	NeoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs- GmbH, Deutschland
PS-Röhrchen GLKL 5ml	115101	Greiner-Bio-One GmbH, Deutschland
Rotilabo Spritzenfilter, PES, steril	P668.1	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland

*Tabelle 1 Verbrauchsmaterialien*

### 3.2. Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Bezeichnung	Referenz	Hersteller
Accutase	ACC-1B	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund Deutschland
Aqua, steril	0082479E	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Aqua Resist	462-7000	VWR Chemicals International GmbH, Deutschland
Cellmask Orange	C10045	Gibco Life Technologies Corp., USA
Collagen I, Rat Tail	A10483-01	Gibco Life Technologies Corp., USA
Collagenase/Dispase	10269638001	Roche Applied Sciences, Deutschland
Deep red LysoTracker	L124992	Gibco Life Technologies Corp., USA
Dextran	D1537	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Dispase II	04942078001	Roche Applied Sciences, Deutschland
Dulbecco's PBS	D8537	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Easycoll Separating Solution	L 6145	Biochrom GmbH, Deutschland
Essigsäure 0,1%	3738.2	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Hoechst 33342		Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Na-Cl-Lösung 0,9%	1312813	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
NaCl-Lösung 0,9%	3570440	B. Braun Melsungen AG, Germany
Trypanblau (trypan blue stain), 0,4%	17-942E	Bio Whittaker by Lonza Walkersville Inc., USA
Trypsin-EDTA 0,5%	15400-054	Gibco Life Technologies Corp., USA
Trypsin-EDTA 0,5%	L11-004	PAA Laboratories GmbH, Austria
7AAD	51-68981E	BD Pharmigen, BD Biosciences, USA

Tabelle 2 Sonstige Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

### 3.3. Kulturmedien

Bezeichnung	Referenz	Verwendung
Einfriermedium	DMEM + 10% FCS + 10% DMSO	Kryokonservierung von C6-Zellen/Astrozyten
Endothellzellmedium (ohne Puromycin)	ECGM 2 + SupplementMix + 10%FCS + 1%Pen/Strep	Kultivierung Endothelzellen -Durchflusszytometrie- Experimente -LSM-Experimente
Endothellzellmedium (mit Puromycin)	ECGM 2 + SupplementMix + 10% FCS + 1% Pen/Strep + Puromycin 3µg/ml	Isolation Endothelzellen
Erhaltungsmedium (Wachstumsmedium)	DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep	Kultivierung C6-Zellen Kultivierung Astrozyten Durchflusszytometrie- Experimente C6- Zellen/Astrozyten
Durchflusszytometrie- Medium	DMEM ohne Zusätze	Durchflusszytometrie- Messung LSM-Bilder
Transportmedium	MEM + 50mM Hepes + 1% Pen/Strep + 1% Amphotericin B	Transport Schweinehirne Isolation Primärzellen

*Tabelle 3 Verwendete Kulturmedien*

Bezeichnung	Referenz	Hersteller
Amphotericin B		
DMEM	41965-039	Gibco, Life Technologies Corp., USA
DMSO	D8418	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
ECBM 2	C-22211	PromoCell GmbH, Heidelberg
FKS	A15-151	PAA Laboratories GmbH, Austria
HEPES Buffer Solution (1M)	15630-056	Gibco, Life Technologies Corp., USA
MEM	21090-022	Gibco, Life Technologies Corp., USA
Pen/Strep	15140-122	Gibco, Life Technologies Corp., USA
Puromycin	A11138-03	Gibco, Life Technologies Corp., USA
SupplementMix (ECGM 2)	C-39216	PromoCell GmbH, Heidelberg

*Tabelle 4 Inhaltsstoffe der Kulturmedien*

Den Wachstumsmedien wurde je 10% FCS hinzugefügt, um die Differenzierung und das Wachstum anzuregen. Die Zugabe von 1% Pen/Strep bei den Wachstumsmedien bzw. von 1% Amphotericin B beim Transportmedium diente der Infektionsprophylaxe.

### 3.4. Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Nunc GmbH, Wiesbaden-Deutschland
Durchflusszytometer BD Accuri C6	BD Biosciences, USA
Heißluftsterilisator	Heraeus Holding GmbH, Hanau-Deutschland
Konfokales Laser Scanning-Mikroskop Zeiss 710 NLO	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Mikroskop, invert, Telaval 3	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Nalgene Mr.Frosty, Cryo Container	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Neubauer Zählkammer	LO-Labor-Optik, UK
Pinzette, anatomisch	Aesculap, Tuttlingen
Pinzette, chirurgisch	Aesculap, Tuttlingen
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Pipetten (10 µl/100 µl/1000 µl)	Eppendorf Reference (Plus), Eppendorf AG, Deutschland
Schere, chirurgisch	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Sicherheitswerksbank	MDH Intermed GmbH
Sicherheitswerkbank Variolab Mobilien W90	Waldner Laboreinrichtungen GmbH + Co, Deutschland
Sorvall-Ultrazentrifuge	Sorvall, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Vortex-Genie II	Scientific Industries
Zentrifuge Labofuge 4000R	Heraeus Instruments GmbH, Deutschland
Waage Scaltec SBA 32	Scaltec Instruments GmbH, Deutschland
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Deutschland

Tabelle 5 Geräte

## 3.5. Zellen

### 3.5.1. C6-Zellen Zellkultur

C6-Zellen sind eine Zellkulturlinie, die 1968 (Benda et al., 1968) etabliert wurde. Sie stellen Astroglioma-Zellen dar, welche aus soliden, durch N-Nitrosomethylharnstoff induzierten, Rattenhirntumoren isoliert wurden. Die verwendeten Zellen stammen aus den institutseigenen Vorräten, welche für die spätere Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert wurden. Für die Versuchsreihen wurden die unterschiedlichsten Passagen verwendet.

### 3.5.2. Primärzellen

Die Primärzellen (Astrozyten und zerebralen mikrovaskuläre Endothelzellen) wurden im Rahmen dieser Arbeit und einer weiteren Doktorarbeit, die NP in einem in-vitro Trans-well-Modell der BHS untersucht, gemeinsam im institutseigenen Zelllabor aus frischen Schweinehirnen isoliert (Orben, 2020). Im Zuge dieses Projektes wurden durch Herrn Timo Orben, ebenfalls medizinischer Doktorand des Instituts, immunhistochemischen Färbungen zum spezifischen Nachweis der isolierten Zellen durchgeführt. Dabei wurden die isolierten Astrozyten erfolgreich mit GFAP sowie die isolierten Endothelzellen erfolgreich mit CD31 und Occludin angefärbt. Beispielhaft sind hier Bilder von einer CD31-Fluoreszenz-Färbung mit lichtmikroskopischen Bild bei Endothelzellen und einer GFAP-Fluoreszenz-Färbung mit lichtmikroskopischen Bild von Astrozyten aufgeführt.

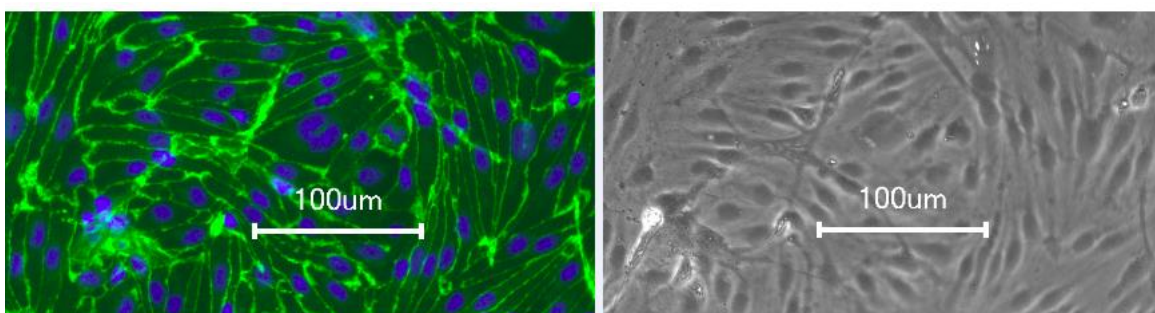


Abbildung 2: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von anti-CD31-angefärbten zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen

Vergrößerung 40x. Dargestellt werden zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen, bei welchen der Oberflächenmarker CD31 angefärbt wurde. Rechts sind die Zellen mittels Lichtmikroskopie dargestellt. Links sind die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie zu sehen, hierbei wird CD31 „grün dargestellt, die Zellkerne sind mittels Hoechst „blau“ angefärbt. CD31 ist auf der Oberfläche von Endothelzellen nachweisbar, wodurch hier die Zellart nachgewiesen wird. Quelle: Timo Orben (INcP) (Orben, 2020)

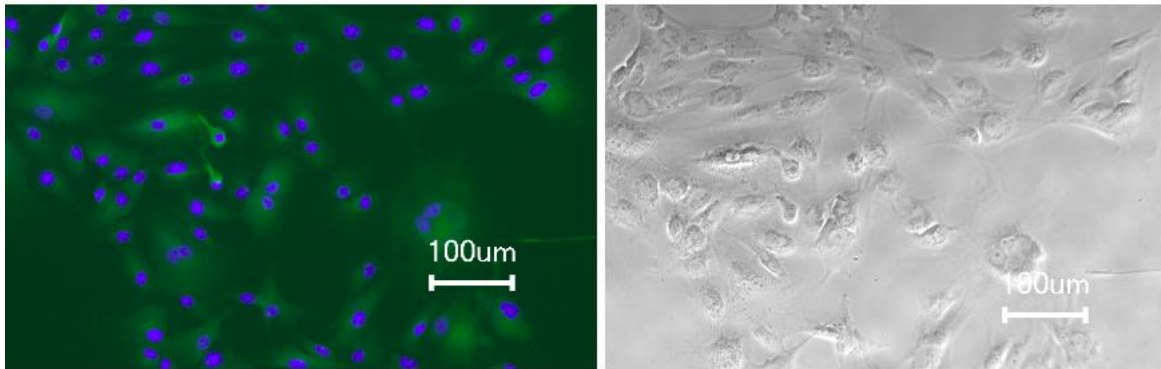


Abbildung 3: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von anti-GFAP-angefärbten primären Astrozyten

Vergrößerung 40x. Dargestellt werden primäre aus dem Schweinehirn gewonnene Astrozyten, welche mittels GFAP angefärbt wurden. Rechts sind die Zellen mittels Lichtmikroskopie dargestellt. Links sind die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie zu sehen, hierbei wird GFAP „grün“ dargestellt, die Zellkerne sind mittels Hoechst „blau“ angefärbt. GFAP ist spezifisch in den Zell-Zell-Kontakten der Astrozyten nachweisbar, wodurch hier die Zellart nachgewiesen wird. Quelle: Timo Orben (INcP) (Orben, 2020)

### 3.6. Nanopartikel

Bezeichnung	Tensid	Partikelmaterial	Fluoreszenzfarbstoff
SS-SDS	SDS	Polystyrol	PMI
SS-Tw	Tween80	Polystyrol	PMI
PFDL-SDS	SDS	Perfluorodecylacrylat	PMI
PFDL-Tw	Tween80	Perfluorodecylacrylat	PMI
PLLA-SDS	SDS	Poly(L-Lactid)	PMI
PLLA-Tw	Tween80	Poly(L-Lactid)	PMI
Chi-SDS	SDS	Chitosan	FITC
Chi-Tw	Tween80	Chitosan	FITC
PBCAOreg488- SDS	SDS	Polybutylcyanoacrylat	Oreg488
PBCA-SDS	SDS	Polybutylcyanoacrylat	
PBCA-Tw	Tween80	Polybutylcyanoacrylat	

*Tabelle 6 Verwendete Nanopartikel*

Sämtliche Partikel wurden vom Fraunhofer-Institut für Chemische Technologie Mainz, Institutsteil IMM, synthetisiert und für diese Doktorarbeit im Rahmen eines Verbundprojektes zur Verfügung gestellt. Dabei wurden dem Institut für neurochirurgische Pathophysiologie ebenfalls Daten zur Charakterisierung dieser Partikel, wie z.B. Feststoffgehalt, verwendete Tenside und Leuchtkraft, übermittelt.

### 3.7. Software

Bezeichnung	Hersteller
BD Accuri C6 Software	BD Biosciences
Endnote	Clarivate Analytics
Excel 2019	Microsoft Corporation
Sigmaplot 11.0	Systat Software
Word 2019	Microsoft Corporation
Zen 2009 Light Edition 5.5.285.0	Carl Zeiss MicroImaging GmbH

*Tabelle 7 Software*



## 4. Methoden

Die folgende Grafik verdeutlicht das geplante Vorgehen für die Testung der Nanopartikel mittels Durchflusszytometrie. Ergänzend dazu wurden von einigen NPs Bilder mittels Laser Scanningmikroskopie gemacht.

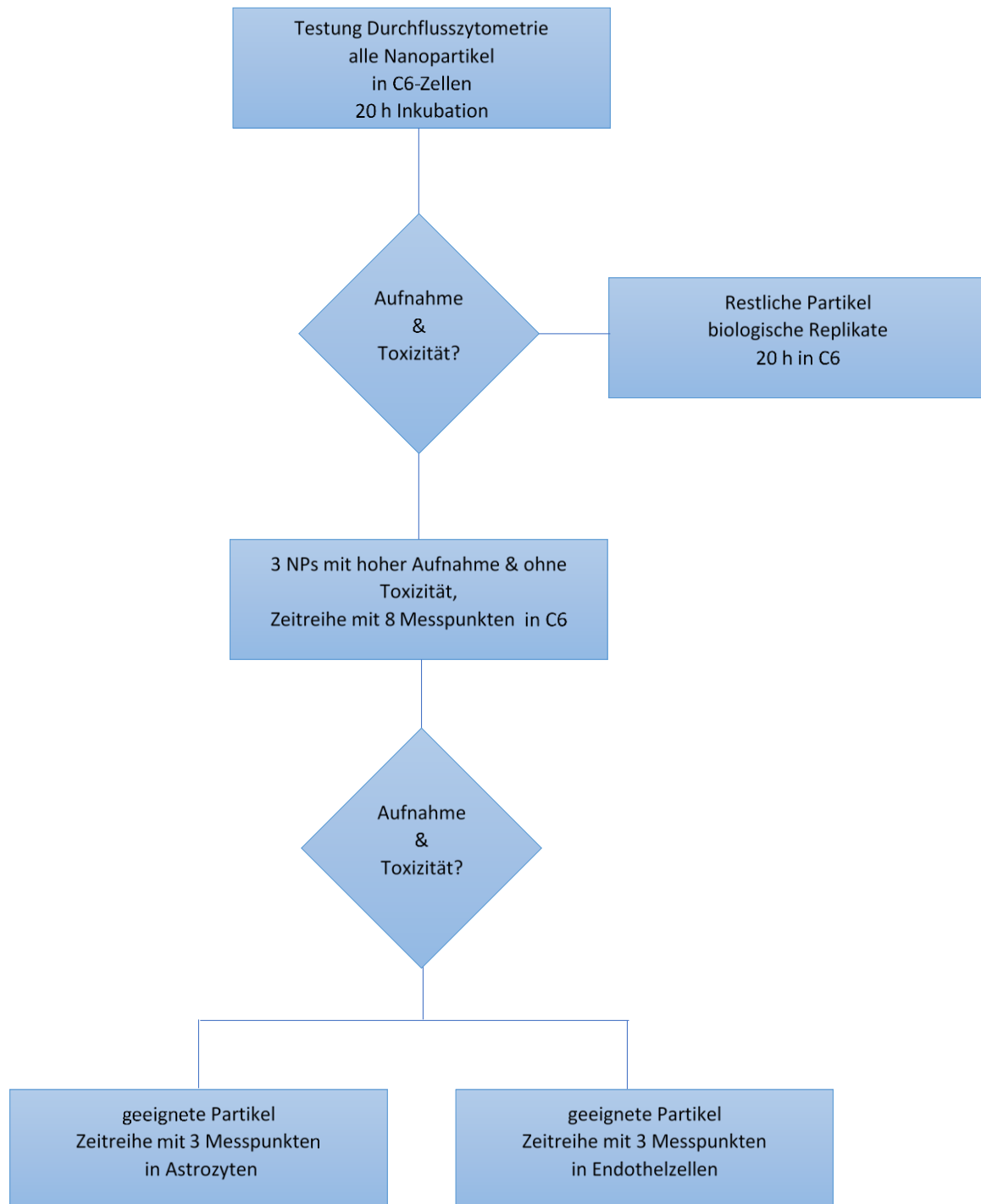


Abbildung 4: Geplanter Ablauf für Testung der NPs mittels Durchflusszytometrie

#### 4.1. Kultivierung der C6-Gliomzellen

Zunächst wurden die in DMEM (mit FCS und 10% DMSO) suspendierten C6-Gliomzellen, welche in flüssigem Stickstoff gelagert waren, im Wasserbad aufgetaut und anschließend in 100mm Petrischalen zusammen mit 37°C warmem Medium (bestehend aus DMEM mit 10% FCS, sowie 1% Pen/Strep) als Erhaltungskultur ausgesät. Sobald die Zellen in der 100mm-Petrischale (Falcon by Corning Incorporated, USA) konfluent gewachsen waren, wurde das Medium abgesaugt, diese dann einmalig mit 5ml NaCl-Lösung (B. Braun Melsungen AG, Germany) gewaschen und konnten anschließend passagiert werden. Dafür wurden die Petrischalen mit 1ml 5%-EDTA-Trypsin-Lösung (Gibco Life Technologies Corp., USA) die auf 37°C erwärmt wurde, inkubiert, so dass der Zellrasen komplett benetzt war. Sobald dieser begann sich zu lösen, wurde das Trypsin abgesaugt, die Zellen durch leichtes Anklopfen makroskopisch sichtbar gelöst und die Schalen mit 9ml Erhaltungsmedium (DMEM mit 10% und 1% Pen/Strep) ausgewaschen. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurden die Zellkontakte vollständig gelöst, sodass eine homogene Zellsuspension entstand. Diese Suspension wurde dann in neue 100mm-Petrischalen (Falcon by Corning Incorporated, USA) zu je 3ml ausgesät und mit weiteren 4,5ml Medium (DMEM mit 10% FCS und 1% Pen/Strep) versorgt. Sämtliche Chemikalien wurden hierbei vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Nach Bedarf konnte in den Folgetagen lediglich ein Mediumwechsel oder ein erneutes Passagieren der Zellen stattfinden. Die Zellkulturen wurden durchgängig in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### 4.2. Isolation und Kultivierung der Primärzellen

Die Isolation der Primärzellen erfolgte in einem gemeinsamen Projekt mit Timo Orben, ebenfalls medizinischer Doktorand am Institut für neurochirurgische Pathophysiologie, im Rahmen eines parallel laufenden Projektes (Orben, 2020), weshalb die Ausführungen zu diesem Teil des methodischen Vorgehens auch in seiner Arbeit im Detail beschrieben wurden. Die Schweinehirne wurden freundlicherweise durch die Metzgerei Lumb aus Ober-Olm zur Verfügung gestellt, wo sie frisch bei der Schlachtung gewonnen wurden.

## Astrozyten und zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen

Die primären Astrozyten und zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen für die Zellversuche wurden im institutseigenen Zelllabor aus frischen Schweinehirnen gewonnen, dabei wurde nach einer Modifikation der Methode von Bowman et al. (Bowman et al., 1983) vorgegangen.

Die Schweinehirne für die Isolation wurden morgens beim erzeugenden Metzger abgeholt und unmittelbar nach dem Auslösen aus der Schädelkalotte durch den Metzger in einen Transportbehälter mit Transportmedium (MEM + 50mM HEPES + 1% Amphotericin B + 1%Pen/Strep) überführt. Es wurden pro Isoliervorgang drei vollständige Hirne entnommen und auf direktem Wege eisgekühlt in das Zelllabor zur Aufbereitung verbracht.

Alle Arbeiten im Zelllabor wurden unter einer sterilen Werkbank und mit sterilen Materialien und sterilen bzw. sterilfiltrierten Lösungen und Medien durchgeführt.

Für die Isolation wurden die einzelnen Hemisphären in Petrischalen überführt, mit isotonischer 0,9%iger NaCl-Lösung gespült und die Meningen unter mikroskopischer Kontrolle mittels Pinzette entfernt. Hierbei musste darauf geachtet werden, den Cortex möglichst nicht zu verletzen, um eine schon frühe Zellverunreinigung des Versuchsansatzes zu vermeiden. Danach wurde ebenfalls unter einem Mikroskop die graue Substanz mit einem Skalpell abgetragen und in einem konischen Röhrchen mit circa 20ml eisgekühltem Transportmedium gesammelt. Nach Präparation aller sechs Hemisphären wurden die Gewebestückchen bei Bedarf noch weiter mechanisch durch eine Schere zerkleinert, anschließend bei 1500UpM und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und der entstehende Überstand verworfen. Es folgte für den Beginn der enzymatischen Isolierung die Resuspension der Gewebestückchen in 30ml einer Dispase-II-Lösung (Roche Applied Sciences, Deutschland) (37°C), um die Kapillaren von der restlichen Hirnsubstanz zu trennen. Der Verdau mit dieser Lösung erfolgte über 60 Minuten in einem konischen Röhrchen unter leichtem Schwenken im 37°C warmen Wasserbad.

Für die Isolation der Astrozytenkultur wurden aus der beschriebenen Suspension mit der Dispase-II-Lösung nach jeweils 10, 20 und 30 Minuten Inkubationszeit je 5ml Überstand abpipettiert und durch einen 100µm-Nylonfilter (Sartorius AG, Deutschland) in ein separates 50ml konisches Röhrchen überführt. Nach der dritten Entnahme von

dem Überstand nach Zentrifugierung wurde die restliche Suspension gründlich auf- und abpipettiert und unter den gleichen Bedingungen weiter inkubiert.

Das separate Röhrchen wurde bei 1500UpM für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der entstehende Überstand verworfen, anschließend das entstandene Pellet in Wachstumsmedium (DMEM + 10%FCS + 1%Pen/Strep) resuspendiert und in 100mm-Petrischalen ausgesät. Dabei wurden die Zellen von einem Hirn auf circa 30-50 cm<sup>2</sup> Fläche verteilt. Die Kultivierung der Astrozyten erfolgte mit DMEM als gleichem Erhaltungsmedium wie bei den C6-Gliomzellen (DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep).

Für die Isolierung der Endothelzellkultur wurde die Zellsuspension nach dem insgesamt 60-minütigen Verdau durch die Dispase-II-Lösung nochmals gründlich auf- und abpipettiert, bei 1500UpM und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand mit dem nicht benötigten Hirngewebe verworfen und anschließend das Pellet in Dextranlösung (s.u.) suspendiert. Diese Suspension wurde dann bei 4500UpM und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Dadurch konnte das nun oben aufschwimmende Myelin abgesaugt werden, der Überstand entfernt und das Pellet in 37°C warmer Collagenase/Dispase-Lösung (s.u.) resuspendiert werden. Auch mit dieser Lösung erfolgte ein 60-minütiger Verdau im 37°C warmen Wasserbad unter leichtem Schwenken. Auf den Verdau folgte eine erneute Zentrifugation bei 2500UpM und 4°C für 5 Minuten, die Entfernung des Überstandes, um anschließend das verbleibende Pellet in 1ml Medium (MEM + 50mM HEPES) suspendiert auf einen sogenannten Percoll-Dichtegradienten (s.u.) zu überführen. Dieser beladene Dichtegradient wurde bei 1000Upm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Dadurch konnten anschließend die gewünschten Kapillarfragmente bestehend aus den zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen durch Abpipettieren in einer als „grauen Wolke“ erkennbaren Schicht im unteren Drittel des Gradienten separiert und in 20ml Endothelzellmedium (ECGM + Supplement Mix + 10%FCS +1%Pen/Strep) resuspendiert werden. Nach einer abschließenden Zentrifugation dieser Resuspension bei 1500UpM für 5 Minuten und Raumtemperatur (RT) konnte das entstandene Pellet letztlich in Endothelzellmedium mit Puromycin (Gibco, Life Technologies Corp., USA) (ECGM + Supplement Mix + 10%FCS +1% Pen/Strep + 3µg/ml Puromycin) gelöst und auf Collagen-I-beschichteten 12er-Well-Platten (Thermo Fisher Scientific) ausgesät werden.

Die Kultivierung der Endothelzellen erfolgte für die ersten drei Tage mit Endothelzellmedium mit Puromycin (3µg/ml) sowie einem Mediumwechsel nach einem

Tag, um eine Verunreinigung der Endothelzellkultur mit gegebenenfalls vorhandenen anderen Zellarten zu verhindern, da deren Wachstum durch das Puromycin gehemmt wird. Die anschließende Kultivierung erfolgte dann mit reinem Endothelzellmedium (ECGM + Supplement Mix + 10% FCS + 1% Pen/Strep) ohne Puromycin.

Die 12er-Well-Platten für die Durchflusszytometrie-Messung und die Chamberslide für die Laser Scanningmikroskopie mussten vor Aussäen der Endothelzellen collageniert werden. Dafür wurde eine Collagenlösung, bestehend aus 0,1mg/ml Collagen in steriler 0,1% Essigsäure auf Eis angesetzt, die Wachstumsoberfläche mit 500µl (pro Well der 12er-Wellplatte) bzw. 200µl (pro Chamber bei den Chamberslides) dieser Lösung benetzt und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Collagenlösung entfernt, mit sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und die Oberflächen abschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) in der Sterilbank luftgetrocknet. Dies geschah immer parallel zur Isolierung der Primärzellen.

#### Herstellung der Enzymlösungen

Bei der verwendeten Dextranlösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) handelte es sich um eine Konzentration von 130mg/ml gelöst in MEM und 50mM HEPES, welche nach Herstellung sterilfiltriert wurde.

Die Dispase II (Roche Applied Sciences, Deutschland) war laut Herstellerprotokoll gelöst in 150mM NaCl und 50mM HEPES, welche dann zur Verwendung verdünnt wurde in MEM und 50mM HEPES, so dass eine Konzentration von 4mg/ml vorlag. Diese wurde ebenfalls sterilfiltriert.

Die Collagenase/Dispase (Roche Applied Sciences, Deutschland) war laut Herstellerprotokoll in H<sub>2</sub>O [100mg/ml] gelöst und verdünnt in PBS. Für die Isolation lag sie in einer Konzentration von 1mg/ml in PBS verdünnt vor und wurde sterilfiltriert.

#### Herstellung des Dichtegradienten

Zur Herstellung des Dichtegradienten wurden zunächst im Verhältnis 1:1 je 10ml von der Easycoll Trennlösung (Biochrom GmbH, Deutschland) und einer Lösung aus MEM+ 50mM HEPES in ein Röhrchen überführt. Anschließend wurde dieses Röhrchen mithilfe der Analysewaage exakt gewogen, um ein entsprechendes Tara-Röhrchen vorzubereiten. Der Gradient wurde dann in der Sorvall-Zentrifuge bei 14.750UpM für 50min bei festem Rotor und ohne Bremse zentrifugiert und konnte danach verwendet werden.

### 4.3. Versuchsreihen für die Durchflusszytometrie-Messung

Um eine Aussage über die Aufnahme von unterschiedlich funktionalisierten Nanopartikeln in spezifische Zellen treffen zu können, sowie um deren Toxizität zu überprüfen, wurden Versuche mittels Durchflusszytometrie (auch Fluorescence Activated Cell Sorter = FACS) durchgeführt. Für die Durchflusszytometrie-Versuche wurden alle drei Zellarten, also C6-Gliomzellen, porcine Astrozyten und zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen verwendet. Für jede Zellart mussten zellspezifische Änderungen im Protokoll vorgenommen werden, die im Folgenden einzeln erläutert werden.

Anhand der C6-Gliomzellen konnten alle zur Verfügung stehenden Nanopartikel getestet werden. Dabei wurden die Partikel Chi-SDS, Chi-Tw, PBCA-SDS und PBCA-Tw lediglich einmalig getestet, da es bei diesen NP zu Schwierigkeiten bei der Synthese kam. Alle übrigen sieben Partikel konnten dreimalig in C6-Gliomzellen getestet werden. Daraufhin konnte mithilfe der Ergebnisse eine Auswahl an drei Partikeln getroffen werden, welche durch eine umfangreichere Zeitreihe mit den C6-Gliomzellen weiter untersucht wurden und für Versuche mit Primärzellen infrage kamen. Eine Übersicht über die durchgeführten Durchflusszytometrie-Messungen bieten folgende Tabellen.

Durchflusszytometrie-Messung mit C6-Gliomzellen								
Partikel	Inkubationszeit							
	1h	2h	4h	8h	16h	20h	32h	48h
SS-SDS	X	X	X	X	X	X	X	X
SS-Tw						X		
PFDL-SDS						X		
PFDL-Tw	X	X	X	X	X	X	X	X
PLLA-SDS	X	X	X	X	X	X	X	X
PLLA-Tw						X		
Chi-SDS						X*		
Chi-Tw						X*		
PBCA-SDS						X*		
PBCA-Tw						X*		
PBCAOrig488-SDS						X		

X = 3 Durchgänge mit biologischen Replikaten, \*einmalige Messung

Tabelle 8 Übersicht zu den Durchflusszytometrie-Messungen mit C6-Gliomzellen

Durchflusszytometrie-Messung mit Astrozyten			
Partikel	Inkubationszeit		
	4h	20h	48h
SS-SDS	X	X	X
PFDL-Tw	X	X	X
PLLA-SDS	X	X	X
X = 3 Durchgänge mit biologischen Replikaten			

Tabelle 9 Durchflusszytometrie-Messungen Astrozyten

Durchflusszytometrie-Messung mit Endothelzellen			
Partikel	Inkubationszeit		
	4h	20h	48h
SS-SDS	X	X	X
PFDL-Tw	X	X	X
PLLA-SDS	X	X	X
X = 2 Durchgänge mit biologischen Replikaten			

Tabelle 10 Durchflusszytometrie-Messungen Endothelzellen

#### 4.3.1. Versuchsablauf in den verschiedenen Zelltypen

##### C6-Gliomzellen

Die in 100mm-Petrischalen kultivierten C6-Gliomzellen (siehe Kapitel 4.1) wurden vor Verwendung für die Durchflusszytometrie-Versuche unter dem Lichtmikroskop hinsichtlich Kontaminationen und konfluentem Wachstum überprüft. Die infrage kommenden Petrischalen wurden zunächst mit 5ml steriler NaCl-Lösung gespült, anschließend mit 1ml 5%-Trypsin-Lösung abgelöst und mit 10ml Erhaltungsmedium (DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep) resuspendiert. Aus dieser Suspension wurden 30µl entnommen und 1:1 mit 30µl Trypanblau (Bio Whittaker by Lonza Walkersville Inc., USA), als Avitalfarbstoff für die Zellen, gemischt. Nach einer Minute Einwirkzeit konnten dann mit Hilfe einer Neubauerzählkammer die Konzentration der vitalen Zellen in der Suspension ermittelt werden. Dadurch war es möglich, in jedes einzelne Well der 12er-Wellplatten die gleiche Anzahl Zellen, bei den C6-Gliomzellen je 400.000, zusammen mit 1,5ml Erhaltungsmedium (DMEM + 10%FCS + 1%Pen/Strep), auszusäen. Am Folgetag wurden in allen Wells ein Mediumwechsel (1,5ml Medium/Well) durchgeführt und die Wells anschließend mit unterschiedlichen Nanopartikeln in einer Konzentration von 150µg Nanopartikel pro Milliliter Medium inkubiert. Dabei wurden die 12er-Wellplatten immer in vier Einheiten zu je drei Wells aufgeteilt. Je ein Triplet bildete immer die Negativkontrolle und wurde nicht mit Nanopartikeln inkubiert. Die restlichen Triplets wurden mit je einem anderen Nanopartikel pro Triplet beimpft. Durch dieses Vorgehen entstanden innerhalb eines Versuchsaufbaus technische Replikate der Einzelmessung. Nach Ablauf der

Inkubationszeit musste die Inkubation mit den Partikeln abgestoppt werden. Hierfür wurde der Überstand eines jeden Wells abpipettiert und in ein separates 5ml-Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf AG, Deutschland), auch Eppendorf Tube genannt, überführt. Danach wurden die Wells mit je 1ml NaCl gespült und dieser Überstand wieder jeweils in das entsprechende Eppendorf Tube überführt. Zum vollständigen Ablösen der Zellen wurden auf die Wells jeweils 200µl 5%-Trypsin gegeben, die Platten kurz geschwenkt und die Reaktion dann mittels 1ml Erhaltungsmedium wieder abgestoppt. Damit konnten die Wells durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren ausgewaschen werden und die Suspension in das entsprechende Eppendorf Tube übertragen werden. Die Eppendorf Tubes wurden anschließend bei 2000UpM und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Darauffolgend wurde der Überstand der Eppendorf Tubes durch Dekantieren verworfen, das resultierende Zellpellet mit 300µl „Durchflusszytometrie-Medium“ (reines DMEM ohne jeglichen Zusatz) resuspendiert und in ein Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt. Jedem Durchflusszytometrie-Röhrchen wurden abschließend jeweils 5µl des Avitalfarbstoffes 7-Aminoactinomycin (7AAD) zugefügt. Nach einer Inkubationszeit des 7AAD (BD Pharmingen, BD Biosciences, USA) von 5 Minuten waren die Proben bereit zur Messung am Durchflusszytometer.

### Astrozyten

Da die Astrozyten andere Wachstumsspezifikationen sowie andere Empfindlichkeiten gegenüber Chemikalien haben, musste für die Durchflusszytometrie-Experimente das Protokoll angepasst werden. Von den Astrozyten wurden aufgrund der Zellgröße und des Zellwachstums lediglich 150.000 Zellen pro Well in den 12er-Wellplatten ausgesät. Zudem wurde statt 0,5%-igem Trypsin, ein geringer konzentriertes 0,25%-iges Trypsin (200µl pro Well) verwendet. Dabei mussten die Wellplatten nach Zugabe des 0,25%-igen Trypsins für zwei Minuten Inkubation in den Brutschrank. Danach wurde die Reaktion mit 1 ml Erhaltungsmedium (DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep) je Well abgestoppt. Die Zentrifugation der Astrozyten fand immer bei 1300UpM und 20°C für 5 Minuten statt.

### Endothelzellen

Bei den Endothelzellen war die Besonderheit zu beachten, dass die Zellen direkt bei Isolation aus den Hirnen, auf die vorher collagenierten 12er-Wellplatten ausgesät werden mussten. Daher richtete sich die Menge der ausgesäten Zellen nicht nach



einer auszählbaren festen Anzahl, sondern es wurden jeweils die bei der Isolation gewonnenen Zellen von 5 Hemisphären auf insgesamt 36 Wells (drei 12er-Wellplatten) verteilt. Dabei wurde für die Kultivierung über die ersten 3 Tage Endothelzellmedium mit Puromycin (3µg/ml) verwendet. Während der Behandlung mit den verschiedenen Nanopartikeln wurden die Zellen mit Endothelzellmedium ohne Puromycin kultiviert. Da Primärzellen, vor allem Endothelzellen, empfindlicher gegenüber potenziell toxischen Substanzen sind, wurde zum Ablösen der Zellen 200µl Accutase (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Deutschland) pro Well verwendet. Nach Zugabe der Accutase kamen die Wellplatten für 30 Minuten zur Inkubation in den Brutschrank, danach wurde die Reaktion mit Endothelzellmedium (ECGM + Supplement Mix + 10%FCS + 1%Pen/Strep) abgestoppt. Auch die Endothelzellen wurden, wie die Astrozyten, immer bei 1300UpM und 20°C für 5 Minuten zentrifugiert.

#### 4.3.2. Auswertung der Daten und Gating-Strategie

Die Auswertung der Durchflusszytometrie-Messung wurde mit der von BD Biosciences bereitgestellten und auf das Durchflusszytometer abgestimmten „BD Accuri C6 Software“ durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen mittels Laser mit Licht der Wellenlänge 488nm angeregt. In einem ersten Plot wurde dann der forward scatter (FSC) gegen den sideways scatter (SSC) aufgetragen und die jeweilige Zellpopulation durch ein Gate (Plot 1 „vitale Zellen“) gekennzeichnet. In einem zweiten Plot konnte dann durch Einschließen des gesetzten Gates eben jene Population isoliert betrachtet werden und durch Einsatz des Farbstoffes 7-AAD die Vitalität der Zellen beurteilt werden. Anschließend wurde in diesen zweiten Plot durch Vermessen des prozentualen Anteils der vitalen Zellen ein weiteres Gate gesetzt. In einem dritten Plot konnte abschließend isoliert die Fluoreszenzintensität der aufgenommenen Nanopartikel in den vitalen Zellen in Form des Medians (Median von Kanal FL1-H) betrachtet werden. Die Messungen wurden gestoppt, wenn mindestens 10.000 Zellen im Gate Plot 1 „vitale Zellen“ registriert wurden.

#### 4.3.3. Color Compensation

Bei jeder Messung mittels Durchflusszytometrie für diese Arbeit wurden jeweils zwei unterschiedliche Farbstoffe gemessen. In einem Kanal (FL3, Filter 670 nm long pass) immer der Farbstoff 7-AAD, um die Vitalität der Zellen zu beurteilen; in einem zweiten Kanal (FL1, Filter 533/30 nm) die Fluoreszenz der jeweilig verwendeten Nanopartikel, um die Aufnahme in die Zellen zu messen. Da sich diese Farbstoffe aber nicht ideal

verhalten, sondern sich ihre Absorptions- und Emissionsspektren überlappen können, ist es notwendig, eine Kompensation durchzuführen. Um die Fluoreszenzintensität und damit die Vitalität der Zellen korrekt beurteilen zu können, muss die Überlappung durch die Fluoreszenzintensität der in die Zellen aufgenommenen Nanopartikel herausgerechnet werden. Diese Kompensation konnte direkt bei Auswertung der Messung mittels der BD Accuri C6 Software durch eine prozentuale Korrektur, entsprechend der jeweiligen Erfordernisse für die verschiedenen Nanopartikel, durchgeführt werden. Hierbei wurden für die technischen Replikate innerhalb einer Versuchsreihe jeweils der gleiche Prozentsatz verwendet.

#### 4.3.4. Normierung der Ergebnisse

Da es bei der Synthese der Nanopartikel zu Unterschieden hinsichtlich des Gehalts an Fluoreszenzfarbstoff kommen kann, müssen die, mit Hilfe der Durchflusszytometrie gewonnenen Daten, normiert werden. Dazu muss zunächst die Fluoreszenzintensität der einzelnen Nanopartikel gemessen werden. Hierbei werden die Intensitäten von jeweils drei Proben eines jeden Partikels gemessen. Aus diesen wird der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Nun wird einem Partikel, vorzugsweise dem mit der stärksten Fluoreszenzintensität, der Wert „1“ bzw. „100%“ zugesprochen. In unserem Fall wurde dafür der Partikel SS-SDS gewählt. Nun kann mit der folgenden Formel die Leuchtkraft der einzelnen Nanopartikel bezogen auf den am stärksten fluoreszierenden Partikel bestimmt werden:

$$\begin{aligned} & \textit{Leuchtkraft bezogen auf den am stärksten fluoreszierenden Partikel} \\ & = \frac{\textit{Mittelwert des Partikels}}{\textit{Mittelwert des am stärksten fluoreszierenden Partikels}} \end{aligned}$$

Hieraus lässt sich der Faktor für die spätere Normierung, der bei den Zellversuchen gemessenen Fluoreszenzintensitäten bestimmen.

$$\textit{Faktor} = \frac{1}{\textit{Leuchtkraft des Partikels}}$$

Die Normierung der Ergebnisse der Zellversuche wird vorgenommen, indem die Mittelwerte der bei den Zellversuchen gemessenen Intensitäten mit dem jeweiligen Faktor multipliziert werden.

$$\text{Normierung} = \text{Mittelwert der Fluoreszenzintensität} \times \text{Faktor}$$

Um nun letztendlich die relative Partikelaufnahme in die Zellen zu bestimmen, wird der bei 20h Inkubationszeit gemessene Wert der Fluoreszenzintensität des Zellversuches mit dem Partikel SS-SDS wiederum gleich „1“ bzw. „100%“ gesetzt. Dann kann die relative Aufnahme durch folgende Formel bestimmt werden, bei der die normierte gemessene Fluoreszenzintensität durch die normierte Intensität des Partikels SS-SDS bei 20h bzw. 48h dividiert wird.

$$\text{relative Partikelaufnahme} = \frac{\text{Normierung}}{\text{Normierung am stärksten fluoreszierender Partikel}}$$

So erhält man die relative Partikelaufnahme bezogen auf die Aufnahme des Partikels SS-SDS bei 20h bzw. 48h Inkubationszeit.

#### 4.4. Versuchsreihen für die Laser Scanningmikroskopie

Für den Nachweis der intrazellulären Aufnahme der Nanopartikel bzw. den Aufnahmemechanismus und -ort wurden mit diversen Nanopartikeln Bilder mittels konfokaler Laser Scanningmikroskopie (LSM) gemacht. Hierfür wurden ebenfalls alle drei Zellarten, also C6-Gliomzellen, porcine Astrozyten und mikrovaskuläre Endothelzellen, im unterschiedlichen Umfang für die Experimente verwendet. Einen Überblick geben folgende Tabellen.

C6-Gliomzellen	
Partikel	20h Inkubationszeit
SS-SDS	X
PFDL-SDS	X
PFDL-Tw	X
Chi-FITC-SDS	X
Chi-FITC-Tw	X
PBCA-SDS	X
PBCA-Tw	X

Tabelle 11 LSM-Bilder C6-Gliomzellen

*x = einmalige Durchführung*

Astrozyten			
Partikel	48h Inkubationszeit	20h Inkubationszeit	4h Inkubationszeit
SS-SDS	X	X	X
PFDL-Tw	X	X	X
PLLA-SDS	X	X	X
SS-Tw		18h	
PLLA-Tw		18h	

Tabelle 12 LSM-Bilder Astrozyten

*x = einmalige Durchführung*

Die Experimente wurden im Rahmen dieser Arbeit jeweils einmalig durchgeführt.

#### C6-Zellen

Auch für diese Versuchsreihen wurden C6-Gliomzellen verwendet, welche vorher in 100mm-Petrischalen kultiviert und vor Verwendung für die Durchflusszytometrie-Versuche unter dem Lichtmikroskop hinsichtlich Kontaminationen und konfluentem Wachstum überprüft wurden. Die geeigneten Petrischalen wurden anschließend mit 5ml steriler NaCl-Lösung gespült, mit 1ml 5%-Trypsin-Lösung abgelöst und mit 10ml Erhaltungsmedium (DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep) resuspendiert. Aus dieser Suspension wurden zur Zählung der vitalen Zellen, analog dem Vorgehen für die Durchflusszytometrie-Experimente, 30µl entnommen und 1:1 mit 30µl Trypanblau als

Totfarbstoff gemischt. Nach einer Minute Einwirkzeit konnten dann mit Hilfe einer Neubauerzählkammer die Konzentration der vitalen Zellen in der Suspension ermittelt werden. Daraufhin konnten die Zellen in Chamberslide ausgesät werden, wobei in jedes Well 20.000 Zellen mit jeweils 0,5ml Erhaltungsmedium (DMEM + 10%FCS + 1% Pen/Strep) überführt wurden. Am Folgetag wurde eine visuelle Kontrolle hinsichtlich des Wachstums und der Viabilität unter dem Mikroskop und ein Mediumwechsel durchgeführt. Im Anschluss konnten die Wells mit den verschiedenen Nanopartikeln, mit einer Konzentration von 150µg Nanopartikel pro Milliliter Medium, inkubiert werden. Dabei wurden die acht Wells der Chamberslides in jeweils vier Einheiten à zwei Wells eingeteilt, wobei die zwei Wells einer Einheit mit demselben Nanopartikel inkubiert wurden. Dadurch wurde es später möglich, pro Nanopartikel zwei unterschiedliche Färbungen vorzunehmen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde erneut eine visuelle Kontrolle unter dem Mikroskop durchgeführt und anschließend zum Stoppen der Inkubation der Überstand der Wells abpipettiert und verworfen. Zusätzlich wurde jede Kammer nochmals mit 0,3ml NaCl-Lösung gespült, bevor anschließend 0,3ml frisches Medium (reines DMEM ohne jeglichen Zusatz) zugegeben wurde. In jedes Well wurden daraufhin 1µl einer 1:10 Verdünnung der HOECHST-Färbung (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), zur Anfärbung der Zellkerne, gegeben und zur Inkubation in den Brutschrank (bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>) gestellt. Nach Ablauf von 30 Minuten wurde der Überstand wieder entnommen und verworfen und 0,3ml frisches Medium (reines DMEM) pro Well zugegeben. Im letzten Schritt wurden dann in jeweils ein Well der Einheiten 1µl einer 1:100 Verdünnung eines Zellmembran-Farbstoffes (Cell Mask Orange Gibco Life Technologies Corp., USA) und in das andere Well der Einheit 1µl einer 1:100 Verdünnung eines Lysosomen-Farbstoffes (Lysotracker deep red, Gibco Life Technologies Corp., USA) zupipettiert. Dann waren die Proben bereit für die Laser Scanningmikroskopie.

Farbstoff	Angefärbter Bestandteil	Emittierende Farbe	Anregung [nm]	Emission [nm]
Hoechst 33342	Kern	blau	350	461
Cell Mask Orange	Zellmembran	rot	554	657
Lysotracker deep red	Lysosomen	rot	647	668

*Tabelle 13: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe für die cLSM*

## Astrozyten

Aufgrund der sich von den C6-Gliomzellen unterscheidenden Wachstumspezifikationen der Astrozyten musste für die LSM-Experimente mit eben jenen Astrozyten das Protokoll angepasst werden. Von den Astrozyten wurden aufgrund der Zellgröße und des Zellwachstums lediglich 10.000 Zellen pro Well in die Chamberslides ausgesät. Als Medium konnten dieselben Medien wie für die C6-Zellen verwendet werden. Ansonsten erfolgte dasselbe Vorgehen wie mit den C6-Zellen.

## Endothelzellen

Analog zu den Versuchsreihen für die Durchflusszytometrie musste auch bei den LSM-Experimenten das Protokoll für die porcinen Endothelzellen angepasst werden. Dabei wurden auch hier die Zellen direkt bei Isolation aus den Hirnen auf die vorher collagenierten Chamberslides (siehe Kapitel 4.1) ausgesät. Ebenso wurde für die Kultivierung über die ersten drei Tage Endothelzellmedium mit Puromycin (3µg/ml) und anschließend für die weitere Kultivierung Endothelzellmedium ohne Puromycin verwendet. Das heißt, für die Behandlung mit den Nanopartikeln sowie mit den Farbstoffen wurde Endothelzellmedium (ECGM + Supplement Mix + 10% FCS +1% Pen/Strep) verwendet. Lediglich für die Laser Scanningmikroskopie selbst wurde für die Vergleichbarkeit der Bilder auf reines DMEM ohne jegliche Zusätze zurückgegriffen.

## 4.5. Statistische Betrachtung

Die Auswertung der gewonnenen Daten wurde an den normierten Werten vorgenommen, damit eine Vergleichbarkeit gegeben ist (siehe Kapitel 4.3.4). Die normierten Messergebnisse der Durchflusszytometrie für alle Versuche wurden mittels Excel 2019 und SigmaPlot 11.0 verarbeitet und ausgewertet. Ebenso wurden mit diesen Programmen die verwendeten Grafiken erstellt. Bei den gemessenen Werten der Fluoreszenzintensität handelte es sich um die durch die „BD Accuri C6 Software“ ermittelten Mediane. Aus den drei technischen Replikaten eines Durchganges wurde ein Mittelwert gebildet, der ein biologisches Replikat darstellt, und dieser normiert. Die so ermittelten Werte für die einzelnen Durchgänge/biolog. Replikate wurden anschließend mittels Sigmaplot 11.0 verarbeitet und jeweils Mittelwerte und Standardfehler für jeden NP bei spezifischer Inkubationszeit ermittelt. Die Werte sind in den Ergebnissen angegeben als Mittelwerte und Standardfehler (SEM). Die statistische Beurteilung wurde auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  vorgenommen. Wurden bei der Testung die Voraussetzungen der Normalverteilung der abhängigen Variablen sowie die Varianzhomogenität für jeden Gruppenfaktor erfüllt, erfolgte die statistische Begutachtung der unabhängigen Stichproben mittels einfaktorierter Varianzanalyse (One-way-ANOVA). Stellte sich dabei ein signifikanter Unterschied zwischen zwei oder mehr Stichproben heraus, erfolgte ein paarweiser Vergleich zwischen den Stichproben mittels Holm-Sidak-Tests mit einem Gesamt-Signifikanz-Level von  $p < 0,05$  (post-hoc-Test). Wurden der Test auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test mit der Lilliefors-Berichtigung) oder auf Varianzhomogenität (durch Überprüfung der Variabilität der Gruppenmittelwerte) nicht bestanden, wurde eine statistische Beurteilung mittels Kruskal-Wallis-Test (ANOVA on ranks) durchgeführt. Wurde ein signifikanter Unterschied zwischen zwei oder mehr Stichproben nachgewiesen, erfolgte ein paarweiser Vergleich der Stichproben mittels Tukey-Tests bzw. Dunn-Test bei Vergleich mit den Endothelzellen als post-hoc-Test. Für die statistische Beurteilung der Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien bezüglich der Partikel SS-SDS, PFDL-Tw und PLLA-SDS wurde, anstelle der relativen Aufnahme bezogen auf die Fluoreszenzintensität von SS-SDS bei 48h Inkubationszeit der jeweiligen Zelllinie, die jeweils gemessenen und lediglich auf die Leuchtkraft von SS-SDS normierten Fluoreszenzintensitäten verwendet. Für den Vergleich der zeitlichen Kinetik wurden für alle Zelltypen und NP nur die Zeitpunkte 4, 20 und 48h in die Statistik aufgenommen, um die Vergleichbarkeit zwischen den Zelltypen zu

gewährleisten.



## 5. Ergebnisse

### 5.1. Alle Nanopartikel in C6-Gliomzellen Durchflusszytometrie

#### relative Aufnahme aller Nanopartikel in C6

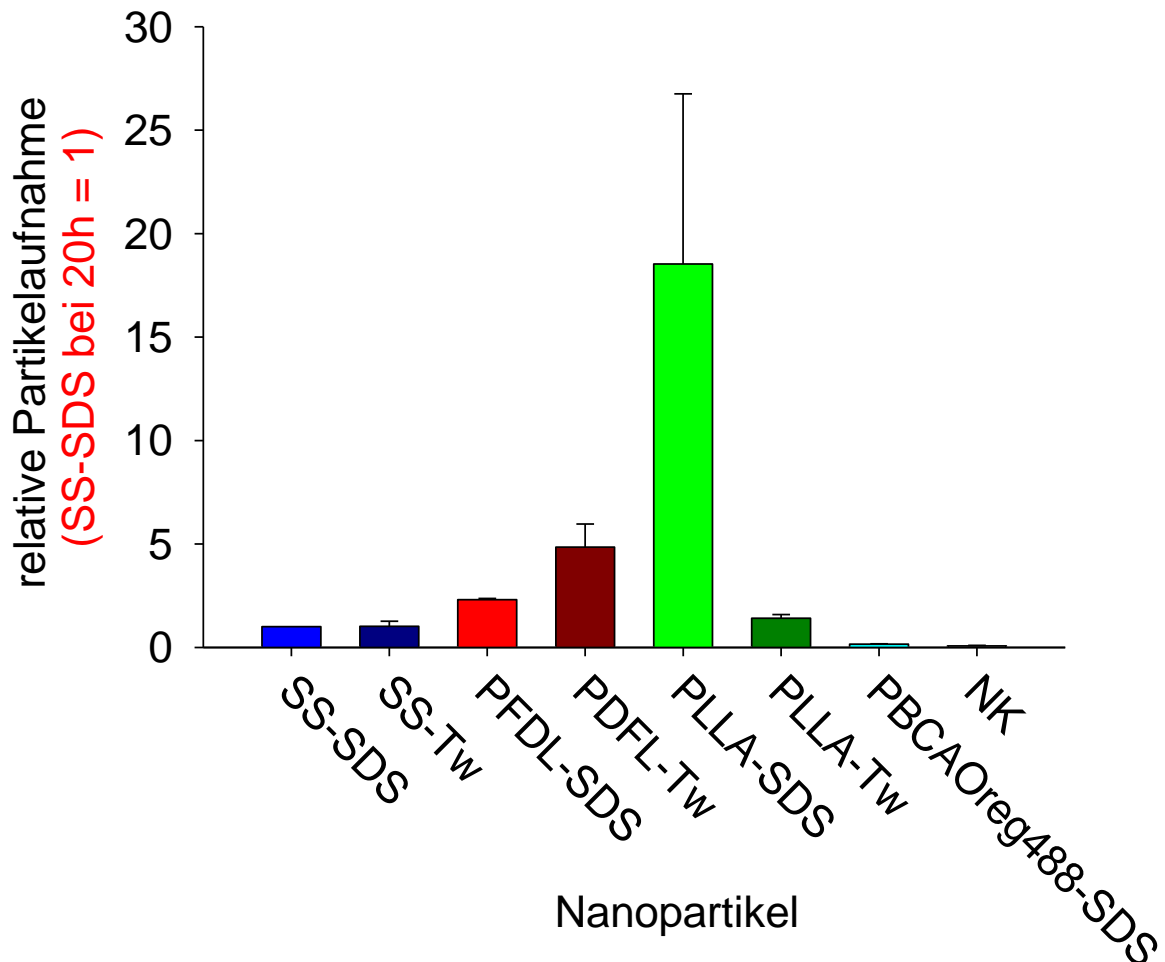


Abbildung 5: Relative Aufnahme der 7 in C6-Gliomzellen getesteter Nanopartikeln

Dargestellt ist die relative Partikelaufnahme von SS-SDS, SS-Tw, PFDL-SDS, PFDL-Tw, PLLA-SDS und PLLA-Tw, sowie die Leuchtintensität der Negativkontrollen (Zellen ohne NP), bei einer einheitlichen Inkubationszeit von 20h und jeweiligen Partikelkonzentration von 150µg/ml. Die relative Aufnahme ist hierbei jeweils bezogen auf den 20-h-Wert des Partikels SS-SDS und als Mittelwert + Standardfehler dargestellt. \*statist. Signifikanz bei NK vs. PFDL-SDS, NK vs. PFDL-Tw und NK vs. PLLA-SDS

Abbildung 5 zeigt die relative Partikelaufnahme aller dreimalig in C6-Gliomzellen getesteten Nanopartikel bei einer einheitlichen Inkubationszeit von 20h, wobei die 20-h-Werte für die Negativkontrollen ebenfalls mit aufgeführt sind. Die gemessenen Leuchtintensitäten wurden bei diesen Partikeln, abweichend zu den Ergebnissen hinsichtlich der zeitlichen Kinetik, auf die relative Aufnahme des Partikels SS-SDS in

C6-Zellen bei 20h Inkubationszeit ( $\pm 1$ ) bezogen. Dabei zeigt sich, dass der Wert für den Partikel PLLA-SDS mit  $18,53 \pm 8,22$  deutlich über dem Referenzwert von 1 bei SS-SDS liegt. Von den beiden Partikeln mit PFDL als Polymer präsentiert sich beim Partikel PFDL-Tw mit  $4,85 \pm 1,12$  die höhere relative Aufnahme als bei PFDL-SDS  $2,31 \pm 0,05$ . Bei dem Partikel PBCAOreg488-SDS  $0,167 \pm 0,02$  zeigte sich ein deutlich niedrigerer Wert als bei SS-SDS. Insgesamt kann folgenden aufsteigende Reihenfolge hinsichtlich der relativen Aufnahme der Partikel festgestellt werden: PBCAOreg488-SDS < SS-SDS < SS-Tw < PLLA-Tw < PFDL-SDS < PFDL-Tw < PLLA-SDS. Eine statistische Signifikanz ( $p > 0,05$ ) zwischen den Werten der relativen Aufnahme ist zwischen der Negativkontrollen und jeweils den Partikeln PFDL-SDS, PFDL-Tw und PLLA-SDS gegeben. Zwischen den anderen Partikeln zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ .

### Toxizität aller Nanopartikel in C6 bei 20h

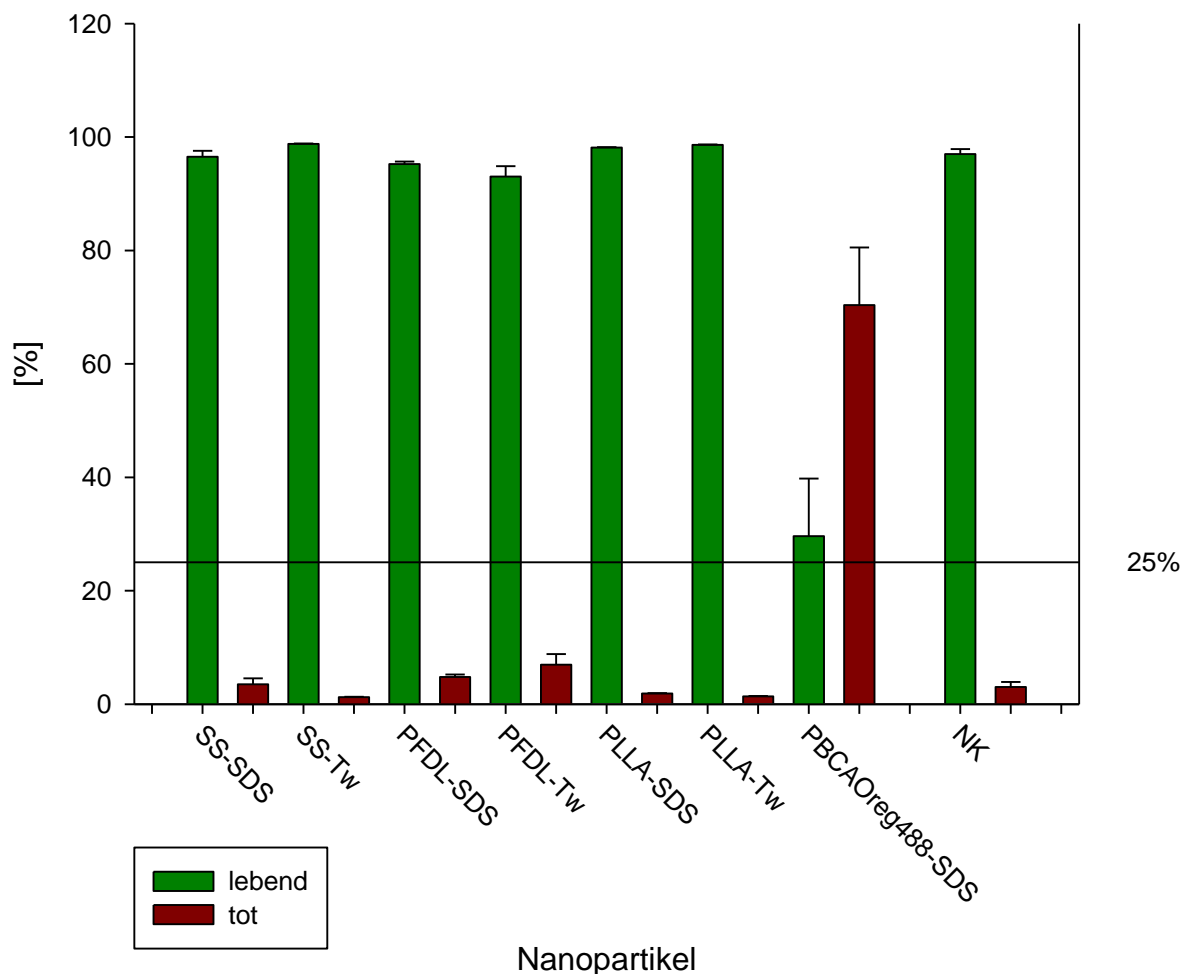


Abbildung 6: Toxizitätsdaten der 7 getesteten Nanopartikel in C6-Gliomzellen

*Die Grafik zeigt den Einfluss der dreimalig getesteten Partikel SS-SDS, SS-Tw, PFDL-SDS, PFDL-Tw, PLLA-SDS, PLLA-Tw und PBCAOreg488-SDS auf die C6-Gliomzellen, sowie die Negativkontrollen (Zellen ohne Partikel), bei einer einheitlichen Inkubationszeit von 20h. Die Werte wurden mittels Färbung mit dem Avitalfarbstoff 7-AAD ermittelt und sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler. Hierbei ist der prozentuale Anteil lebender Zellen „grün“ und der Anteil toter Zellen „rot“ dargestellt.*

Die Abbildung 6 zeigt die prozentualen Toxizitätsdaten der Versuche mit C6-Gliomzellen und den dreimalig getesteten Partikeln SS-SDS, SS-Tw, PFDL-SDS, PFDL-Tw, PLLA-SDS, PLLA-Tw und PBCAOreg488-SDS bei 20h Inkubationszeit, welche ebenfalls mittels dem Avitalfarbstoff 7AA-D ermittelt wurden. Als Referenz wurden die Werte für die Negativkontrollen mit aufgetragen. Die Toxizitätsdaten für den Partikel PBCAOreg488-SDS waren mit einem Anteil von  $29,63\% \pm 10,15\%$  vitaler Zellen deutlich abweichend von den restlichen Werten. Eine statistische Signifikanz dieser Werte war jedoch nur bei dem Vergleich zwischen SS-SDS und PBCAOreg488-SDS gegeben. Bei den anderen Partikeln lagen die Anteile vitaler Zellen im Bereich von  $93,03\% \pm 1,84\%$  bei PFDL-Tw bis  $98,77\% \pm 0,10\%$  bei SS-Tw, die Unterschiede zwischen den Partikeln waren hierbei nicht statistisch signifikant.

## 5.2. Zeitreihe mit C6-Gliomzellen - Durchflusszytometrie

### SS Aufnahme C6

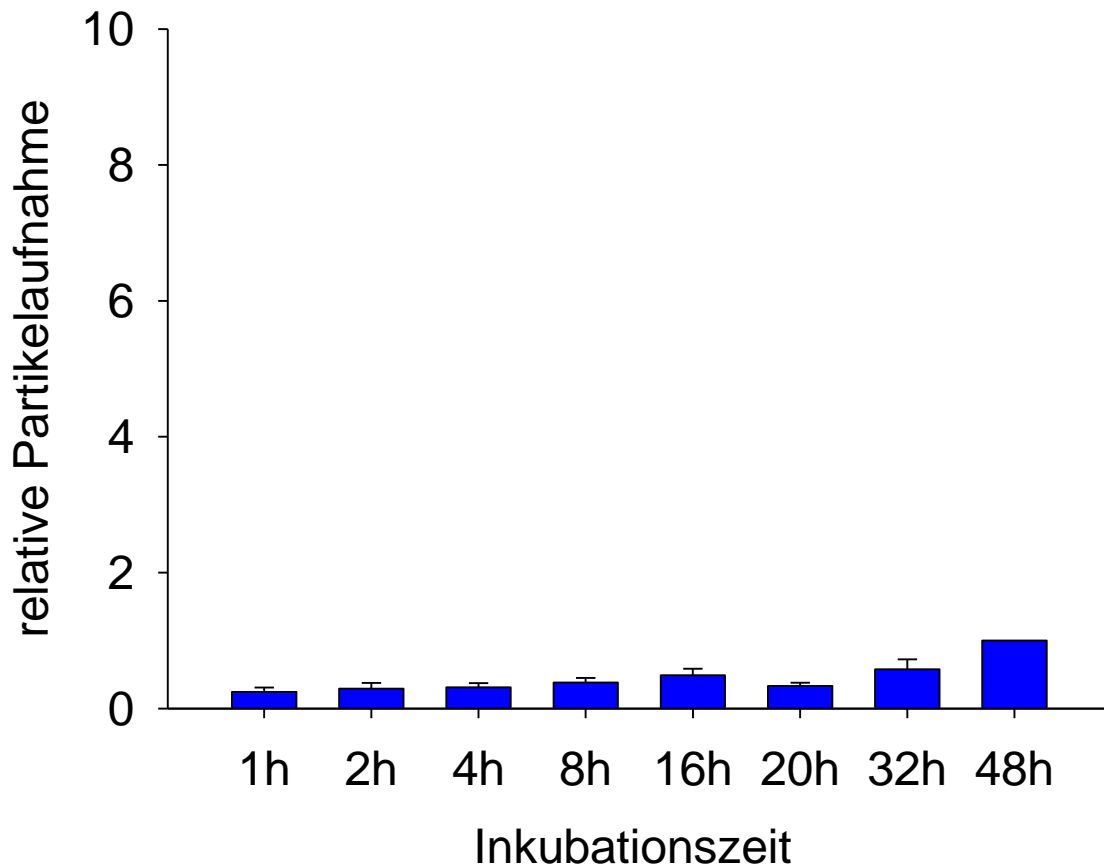


Abbildung 7: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels SS-SDS in C6-Gliomzellen

Dargestellt sind die Werte der relativen Aufnahme des Partikels SS-SDS in C6-Gliomzellen über einen Inkubationszeitraum von 1-48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von 150µg/ml. Die Werte wurden anhand der Leuchtintensität der biologischen Replikate ermittelt. Die Aufnahme ist normiert bezogen auf die Aufnahme dieses Partikels bei einer Inkubationszeit von 48h und die Werte sind aufgetragen als Mittelwerte + Standardfehler. \*statist. Signifikanz bei 4h vs. 48h und 20h vs. 48h

In Abbildung 7 ist die relative Partikelaufnahme der Versuche mit C6-Gliomzellen für den Partikel SS-SDS zu den acht unterschiedlichen Inkubationszeiten (1–48h) dargestellt. Es zeigte sich ein Anstieg der relativen Partikelaufnahme von  $0,25 \pm 0,06$  bei 1h Inkubationszeit bis zu 1,00 bei einer Inkubationszeit von 48h, der letztere Wert wurde festgesetzt als Aufnahme von 1 ( $\triangleq 100\%$ ). Eine Ausnahme hiervon bildet dabei der Wert  $0,33 \pm 0,05$  für die Inkubationszeit von 20h, der als einziger Wert unterhalb des vorherigen liegt. Der gemessene Wert für die Inkubationszeit von 48h mit diesem Nanopartikel stellte die Bezugsgröße zu den gemessenen Werten der weiteren Zeitreihen mit C6-Gliomzellen dar. Mittels ANOVA konnte jeweils zwischen den Werten für 4h gegen 48h und 20h gegen 48h ein statistisch signifikanter Unterschied

( $p < 0,05$ ) ermittelt werden. Zwischen den Werten für 4h gegen 20h zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,050$ ).

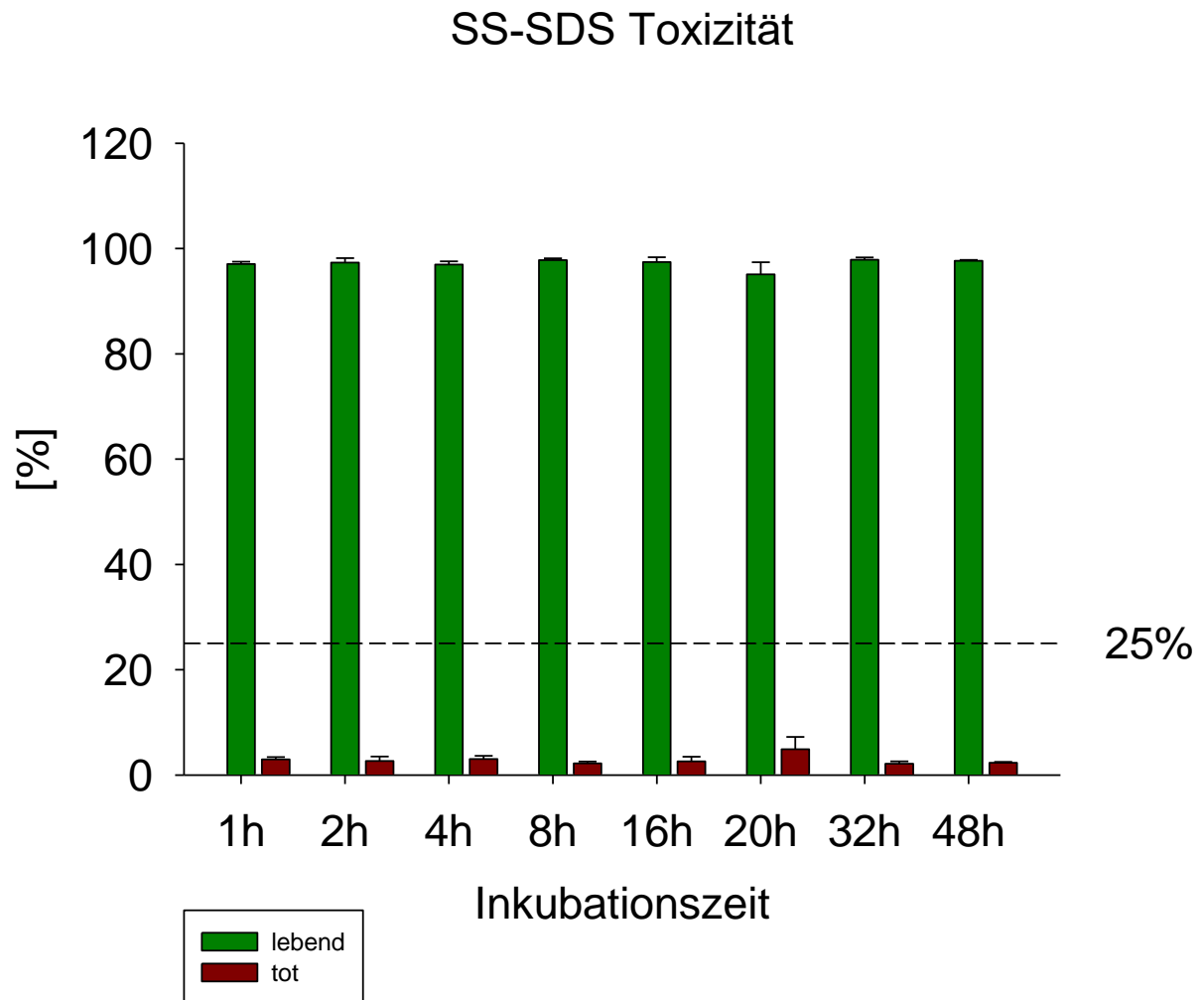


Abbildung 8: Toxizitätsdaten zu Partikel SS-SDS in C6-Gliomzellen

Die Abbildung zeigt den Einfluss des Partikel SS-SDS auf die C6-Gliomzellen, sowie die Negativkontrollen (Zellen ohne Partikel), über einen Inkubationszeitraum von 1-48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von  $150\mu\text{g/ml}$ . Die Werte wurden mittels Färbung mit dem Avitalfarbstoff 7-AAD ermittelt und sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler. Hierbei ist der prozentuale Anteil lebender Zellen „grün“ und der Anteil toter Zellen „rot“ dargestellt.

Grafik 8 zeigt die prozentualen Toxizitätsdaten der Versuche mit C6-Gliomzellen und dem Partikel SS-SDS zu allen acht Inkubationszeitpunkten. Dabei liegt der Anteil der lebenden Zellen bei allen Inkubationszeiten bei über 95%. Die Analyse der Zellvitalität mittels des Avitalfarbstoffs 7-AAD zeigte, dass zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Inkubation mit dem Partikel SS-SDS mehr als 95% der Zellen der C6-Gliomazellpopulation lebend waren (Abb. 8). Es zeigt sich dabei keine Tendenz hinsichtlich einer zeitlichen Kinetik. Die Unterschiede zwischen den Werten für 4h, 20h und 48h Inkubationszeit weisen dabei keine statistische Signifikanz auf ( $p \geq 0,05$ ).

## PFDL-Tw Aufnahme C6

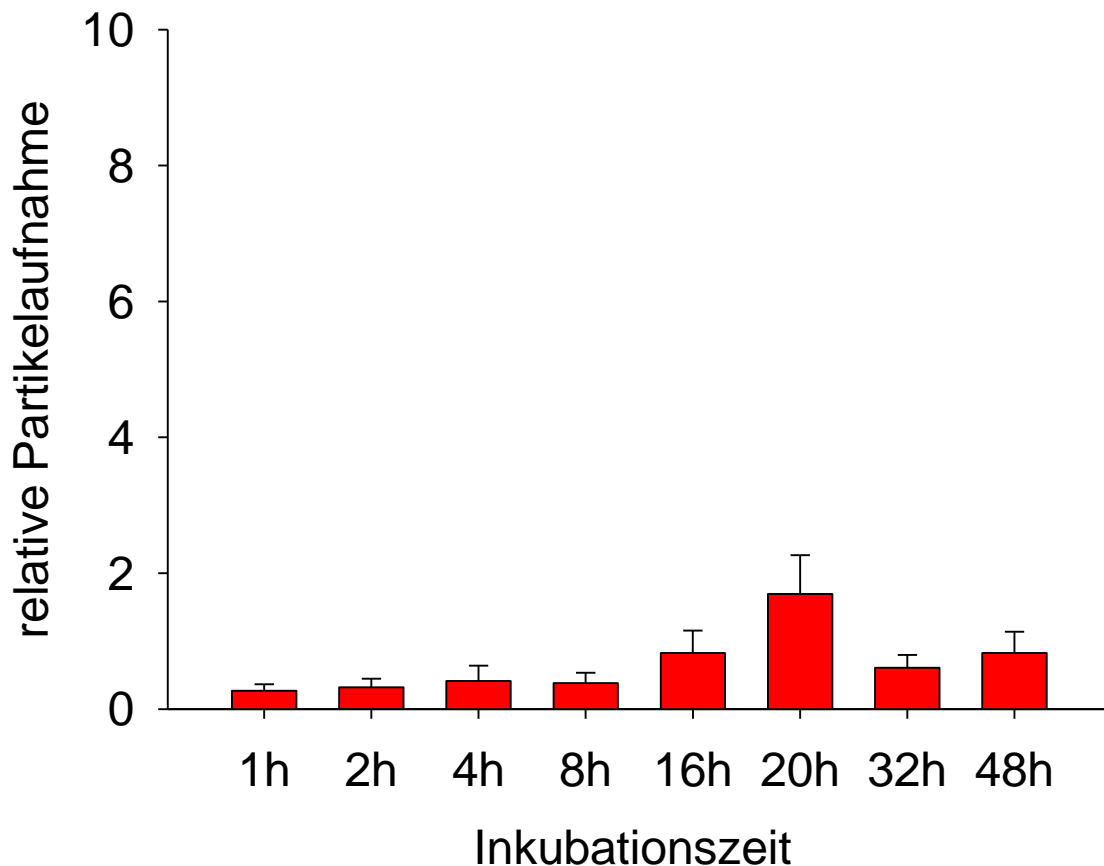


Abbildung 9: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels PFDL-Tw in C6-Gliomzellen

Dargestellt sind die Werte der relativen Aufnahme des Partikels PFDL-Tw in C6-Gliomzellen über einen Inkubationszeitraum von 1-48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von 150µg/ml. Die Werte wurde ermittelt anhand der Leuchtintensität der biologischen Replikate. Die Aufnahme ist bezogen auf die Aufnahme des Partikels SS-SDS bei einer Inkubationszeit von 48h in C6-Gliomzellen und die Werte sind aufgetragen als Mittelwerte + Standardfehler.

In Abbildung 9 ist die relative Aufnahme von PFDL-Tw in C6-Gliomzellen zu sehen. Bei den Versuchen zur zeitlichen Kinetik mit C6-Gliomzellen und dem Partikel PFDL-Tw stiegen die Werte für die relative Partikel Aufnahme von  $0,27 \pm 0,10$  bei 1h Inkubationszeit bis zu einer Inkubationszeit von 20h kontinuierlich an und erreichten dort mit  $1,69 \pm 0,57$  ihr Maximum. Danach fielen die Werte, mit  $0,60 \pm 0,19$  bei 32h und  $0,83 \pm 0,31$  bei 48h Inkubationszeit, wieder deutlich ab. Die festgestellten Unterschiede zwischen den Werten für 4h, 20h und 48h wiesen jedoch keine statistische Signifikanz auf ( $p \geq 0,05$ ). Insgesamt lagen die gemessenen Werte über dem Niveau der Werte für die C6-Zellversuche mit SS-SDS. Ein statistisch signifikanter Unterschied war zwischen den Partikel PFDL-Tw und SS-SDS weder bei 4h, 20h noch bei 48h Stunden mittels ANOVA bzw. Kruskal-Wallis-Test nachweisbar.

## PFDL-Tw Toxizität

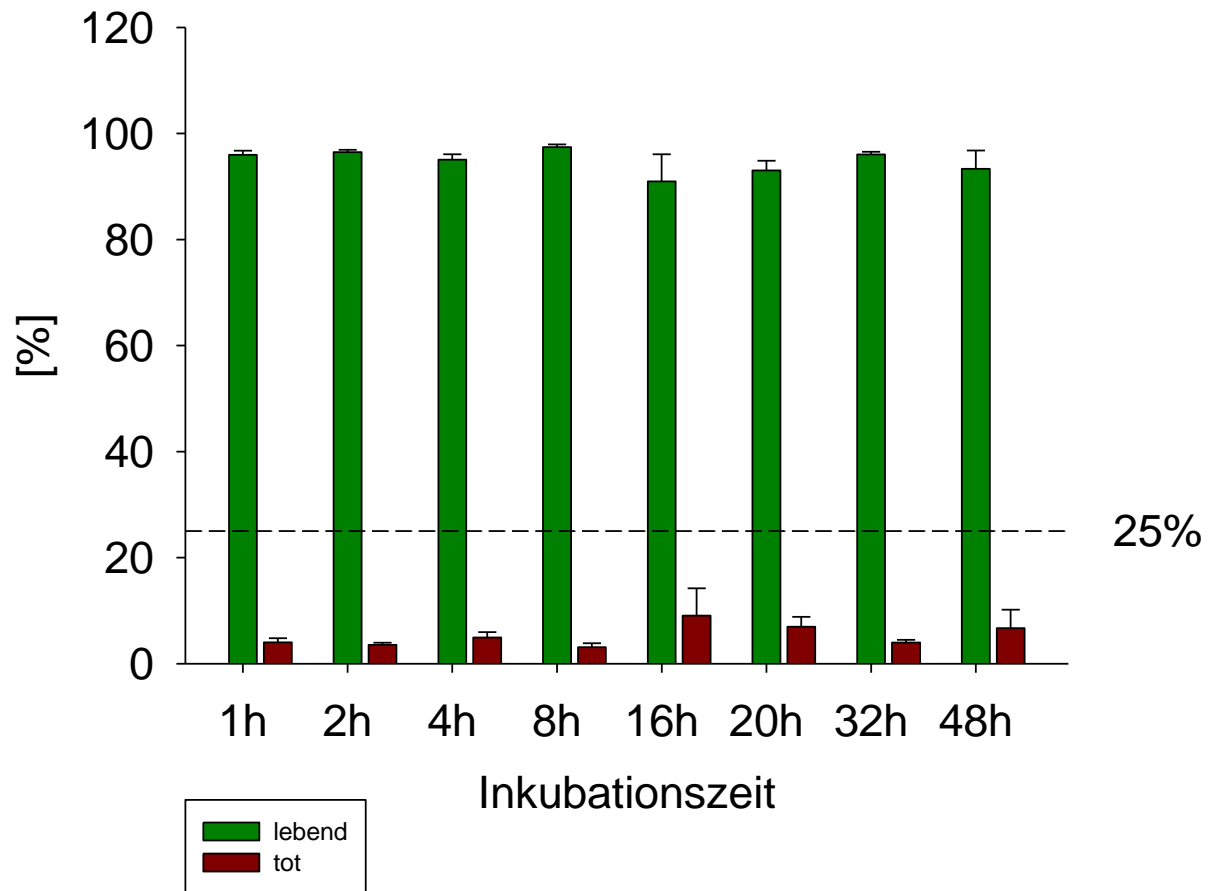


Abbildung 10: Toxizitätsdaten zu Partikel PFDL-Tw in C6-Gliomzellen

Die Abbildung zeigt den Einfluss des Partikel PFDL-Tw auf die C6-Gliomzellen, sowie die Negativkontrollen (Zellen ohne Partikel), über einen Inkubationszeitraum von 1-48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von 150µg/ml. Die Werte wurden mittels Färbung mit dem Avitalfarbstoff 7-AAD ermittelt und sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler. Hierbei ist der prozentuale Anteil lebender Zellen „grün“ und der Anteil toter Zellen „rot“ dargestellt.

Abbildung 10 zeigt die prozentualen Toxizitätsdaten der Versuche mit C6-Gliomzellen und dem Partikel PFDL-Tw zu allen acht Inkubationszeitpunkten. Die Werte für den Anteil lebender Zellen schwankten dabei leicht im Vergleich zu den C6-Versuchen mit SS-SDS. Sie blieben aber stets deutlich über der als kritisch betrachteten Grenze von 75%. Insgesamt zeigten sich Werte zwischen einem Anteil von 90,95% ± 5,14% bei 16h bis 97,44% ± 0,49% bei 8h Inkubationszeit. Für die Werte (4h, 20h, 48h) innerhalb der Versuchsreihe mit PFDL-Tw ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Auch im Vergleich mit den Partikeln SS-SDS und PLLA-SDS zeigten sich für diese Inkubationszeiten keine signifikanten Unterschiede.

## PLLA-SDS Aufnahme C6

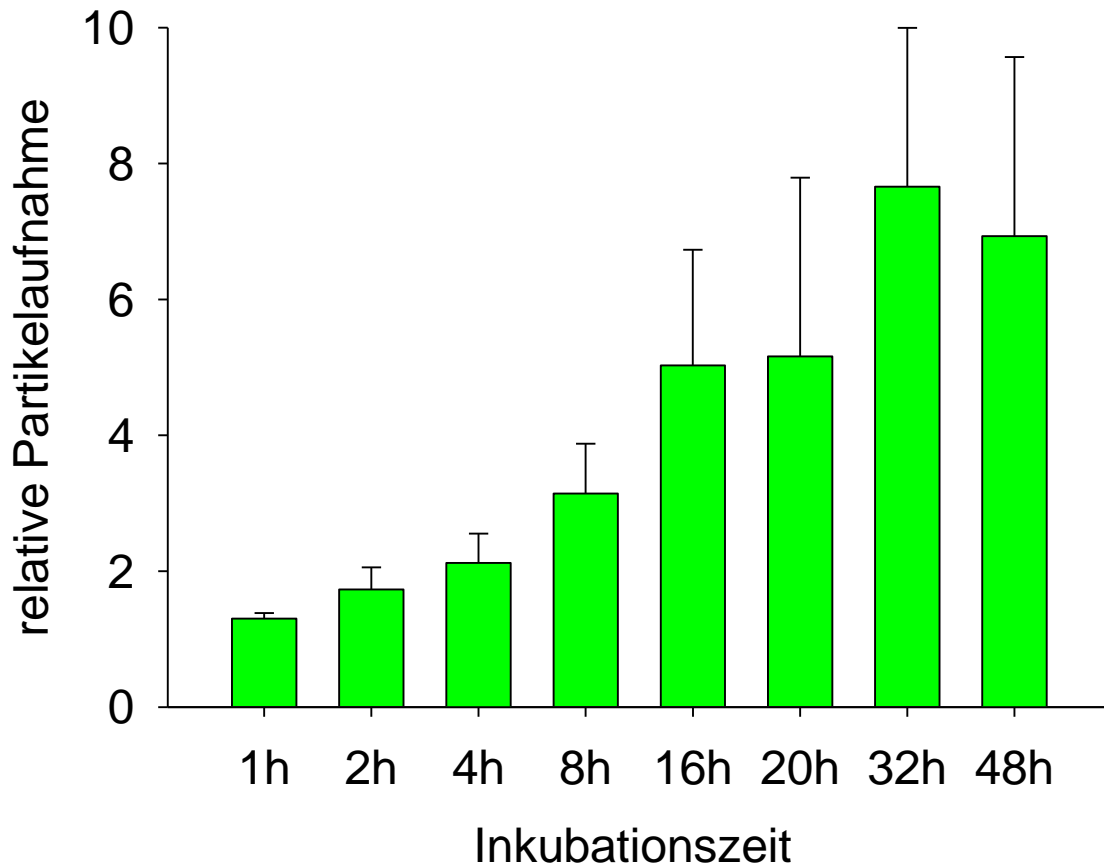


Abbildung 11: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels PLLA-SDS in C6-Gliomzellen

Dargestellt sind die Werte der relativen Aufnahme des Partikels PLLA-SDS in C6-Gliom-zellen über einen Inkubationszeitraum von 1-48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von 150µg/ml. Die Werte wurde ermittelt anhand der Leuchtintensität der biologischen Replikate. Die Aufnahme ist bezogen auf die Aufnahme des Partikels SS-SDS bei einer Inkubationszeit von 48h in C6-Gliomzellen und die Werte sind aufgetragen als Mittelwerte + Standardfehler.

Abbildung 11 zeigt die relative Aufnahme des Partikels PLLA-SDS in C6-Gliomzellen bei allen acht unterschiedlichen Inkubationszeiten. Die relative Aufnahme des Partikels PLLA-SDS steigt von  $1,30 \pm 0,08$  bei 1h Inkubationszeit bis auf ein Maximum von  $7,66 \pm 2,34$  bei einer Inkubationszeit von 32h stetig an. Der Wert bei einer Inkubationszeit von 48h lag mit  $6,93 \pm 2,64$  hingegen unterhalb des vorherigen. Auffallend bei diesem Partikel war, dass die Werte für die relative Aufnahme deutlich über dem Niveau der Partikel SS-SDS und PFDL-Tw lagen, wobei das Niveau der Standardfehler aber ebenfalls über denen der anderen Partikel lag. Dies spiegelt sich auch darin wider, dass hinsichtlich der zeitlichen Kinetik zwischen den Inkubationszeiten 4h, 20h und 48h kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisbar war. Beim Vergleich mit den Partikeln SS-SDS und PFDL-Tw zeigte sich jedoch ein statistisch signifikanter



Unterschied bei einer Inkubationszeit von 4h ( $p < 0,05$ ). Für 20h und 48h war dies nicht sicher nachweisbar ( $p \geq 0,05$ ).

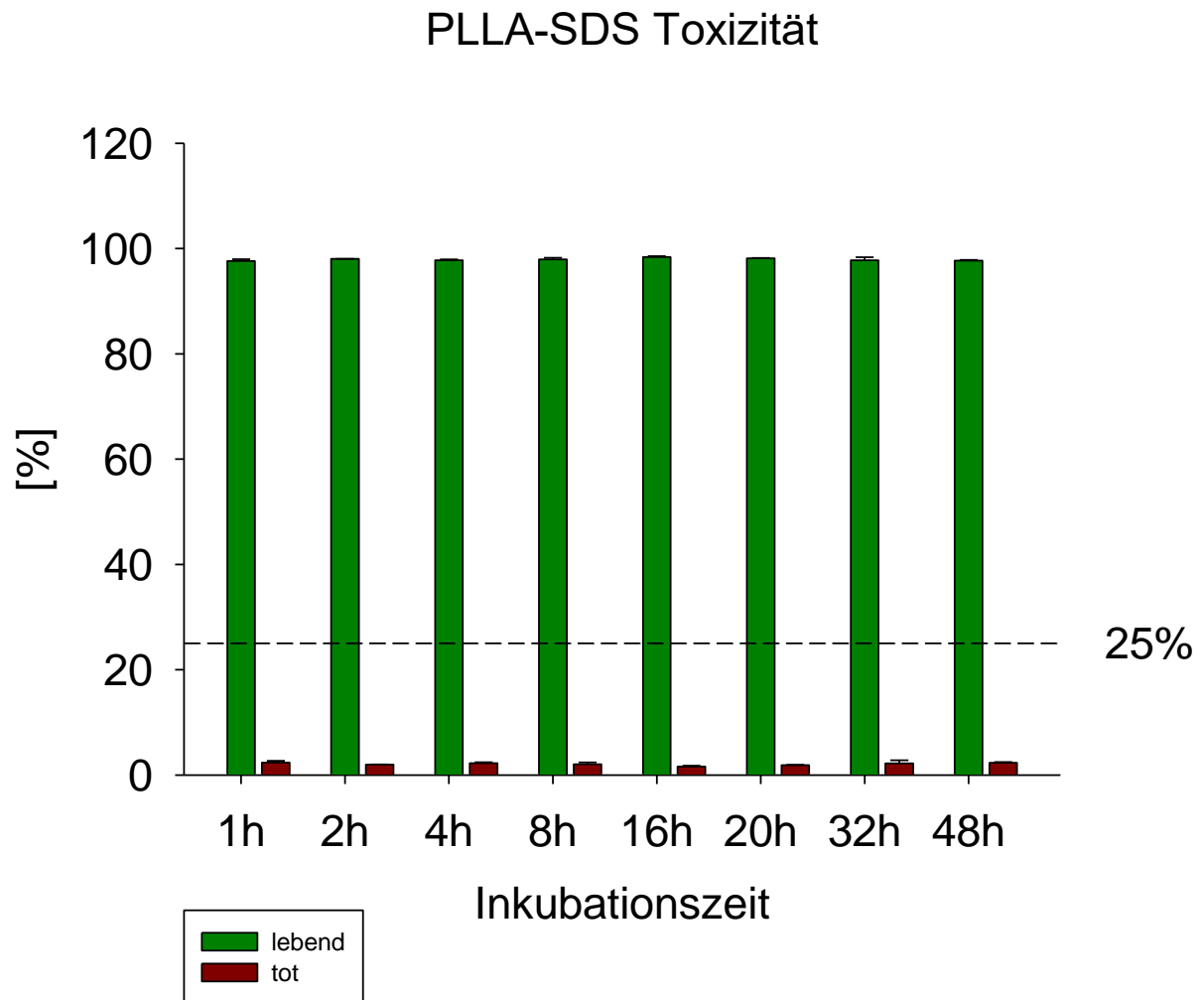


Abbildung 12: Toxizitätsdaten zu Partikel PLLA-SDS in C6-Gliomzellen

Die Abbildung zeigt den Einfluss des Partikel PLLA-SDS auf die C6-Gliomzellen, sowie die Negativkontrollen (Zellen ohne Partikel), über einen Inkubationszeitraum von 1-48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von 150µg/ml. Die Werte wurden mittels Färbung mit dem Avitalfarbstoff 7-AAD ermittelt und sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler. Hierbei ist der prozentuale Anteil lebender Zellen „grün“ und der Anteil toter Zellen „rot“ dargestellt.

Die Toxizitätsdaten der Versuche mit C6-Gliomzellen und dem Partikel PLLA-SDS zu allen acht Inkubationszeitpunkten werden in Abbildung 12 dargestellt. Dabei lag der Anteil lebender Zellen bei allen Inkubationszeitpunkten zwischen minimal 97,63% ± 0,32 bei 1h und maximal 98,38 ± 0,16 bei 16h Inkubationszeit. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied innerhalb der Zeitreihe noch im Vergleich zu den Partikeln SS-SDS, PFDL-Tw und PLLA-SDS (bei Inkubationszeiten von 4h, 20h und 48h).

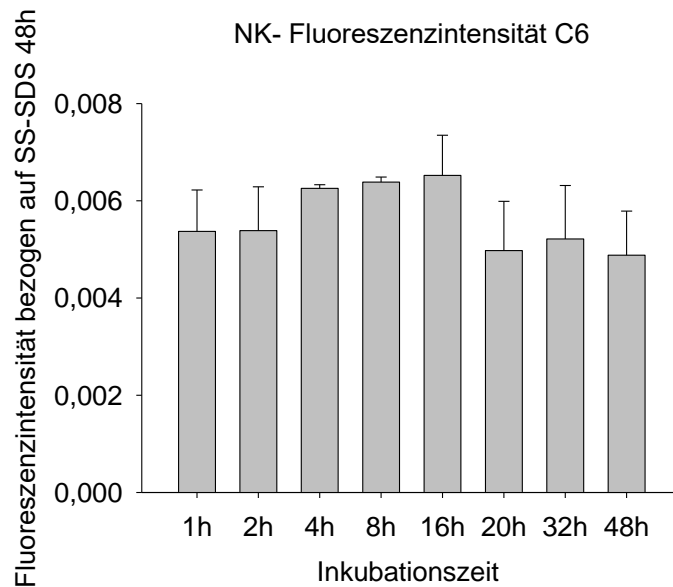


Abbildung 13: Gemessene Leuchtintensität der C6-Gliomzellen ohne NP (Negativkontrollen)

Dargestellt sind die Leuchtintensitäten der Negativkontrollen (Zellen ohne Partikel) über einen Inkubationszeitraum von 1-48h. Die Werte sind bezogen auf den 48h-Wert von Partikel SS-SDS in C6-Zellen und werden dargestellt als Mittelwert + Standardfehler

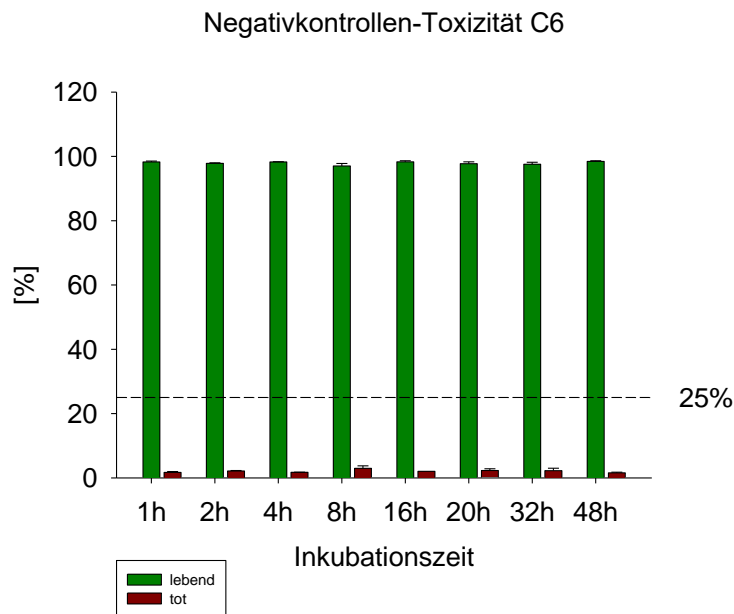


Abbildung 14: Toxizitätsdaten zu den C6-Gliomzellen ohne NP (Negativkontrolle)

Die Abbildung zeigt die prozentualen Anteile lebender („grün“ dargestellt) und toter („rot“ dargestellt) Zellen der C6-Gliomzellen ohne Inkubation mit NP (Negativkontrollen) über einen Inkubationszeitraum von 1-48h. Die Werte wurden mittels Färbung mit dem Avitalfarbstoff 7-AAD ermittelt und sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler.

Zum Vergleich wurden ebenfalls die Mittelwerte und Standardfehler für die gemessenen Werte der Negativkontrollen (C6-Gliomzellen) bestimmt, welche in

Abbildung 13 (relative Aufnahme) und Abbildung 14 (Toxizitätsdaten) dargestellt werden. Die gemessenen Werte der Fluoreszenzintensität waren dabei im Vergleich mit SS-SDS bei 48h immer  $\leq 6,52e-3 \pm 8,27e-4$ . Bei der Beurteilung der Toxizität zeigten sich stets Anteile von  $\geq 97,03\% \pm 0,78\%$ , hierbei waren weder innerhalb der Zeitreihe noch im Vergleich mit den Partikeln SS-SDS, PFDL-Tw und PLLA-SDS statistisch signifikante Unterschiede nachweisbar.

### 5.3. Zeitreihe mit Astrozyten - Durchflusszytometrie

#### SS Aufnahme Astrozyten

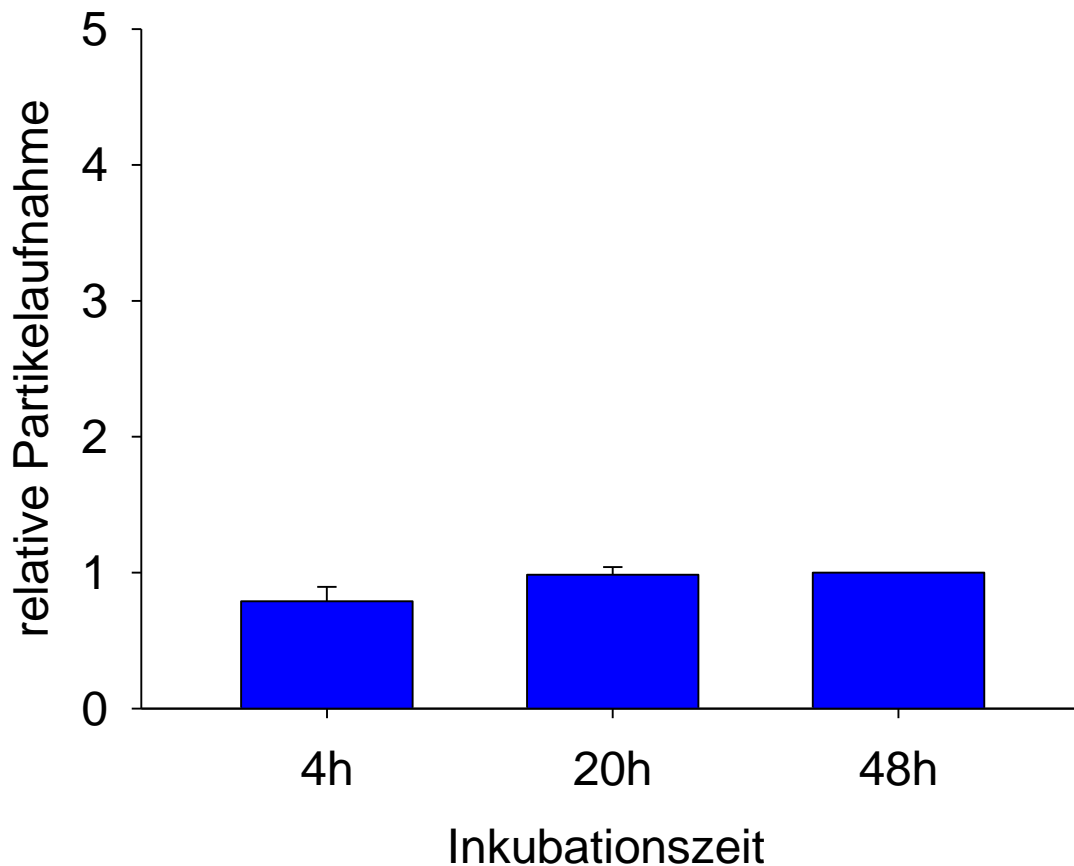


Abbildung 15: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels SS-SDS in Astrozyten

Dargestellt sind die Werte der relativen Aufnahme des Partikels SS-SDS in Astrozyten für Inkubationszeiten von 4, 20 und 48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von 150µg/ml. Die Werte wurden anhand der Leuchtintensität der biologischen Replikate ermittelt. Die Aufnahme ist bezogen auf die Aufnahme dieses Partikels bei einer Inkubationszeit von 48h und die Werte sind aufgetragen als Mittelwerte + Standardfehler.

Die relative Aufnahme für den Partikel SS-SDS in Astrozyten bei Inkubationszeiten von 4h, 20h und 48h ist in Abbildung 15 aufgetragen. Der Wert bei 4h Inkubationszeit lag mit  $0,79 \pm 0,11$  unterhalb der Werte für 20h und 48h. Die relative Aufnahme bei 20h Inkubationszeit lag mit  $0,98 \pm 0,06$  in etwa im gleichen Bereich wie die relative Aufnahme bei 48h, welche als 1 ( $\cong 100\%$ ) festgesetzt wurde. Es zeigte sich also keine stetige Zunahme der Werte wie bei den C6-Gliomzellen. Dies bestätigte sich auch mittels ANOVA, bei welcher kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Werten für die drei vorgenannten Inkubationszeiten zu beobachten war. Der gemessene Wert für die Inkubationszeit von 48h mit diesem Nanopartikel stellte die Bezugsgröße zu den gemessenen Werten der weiteren Zeitreihen, mit drei

unterschiedlichen Inkubationszeiten, mit Astrozyten dar. Ebenso ließen sich in einer separaten statistischen Testung keine signifikanten Unterschiede bei der Aufnahme des Partikels SS-SDS zwischen C6-Gliomzellen und Astrozyten feststellen.

## SS-SDS Toxizität

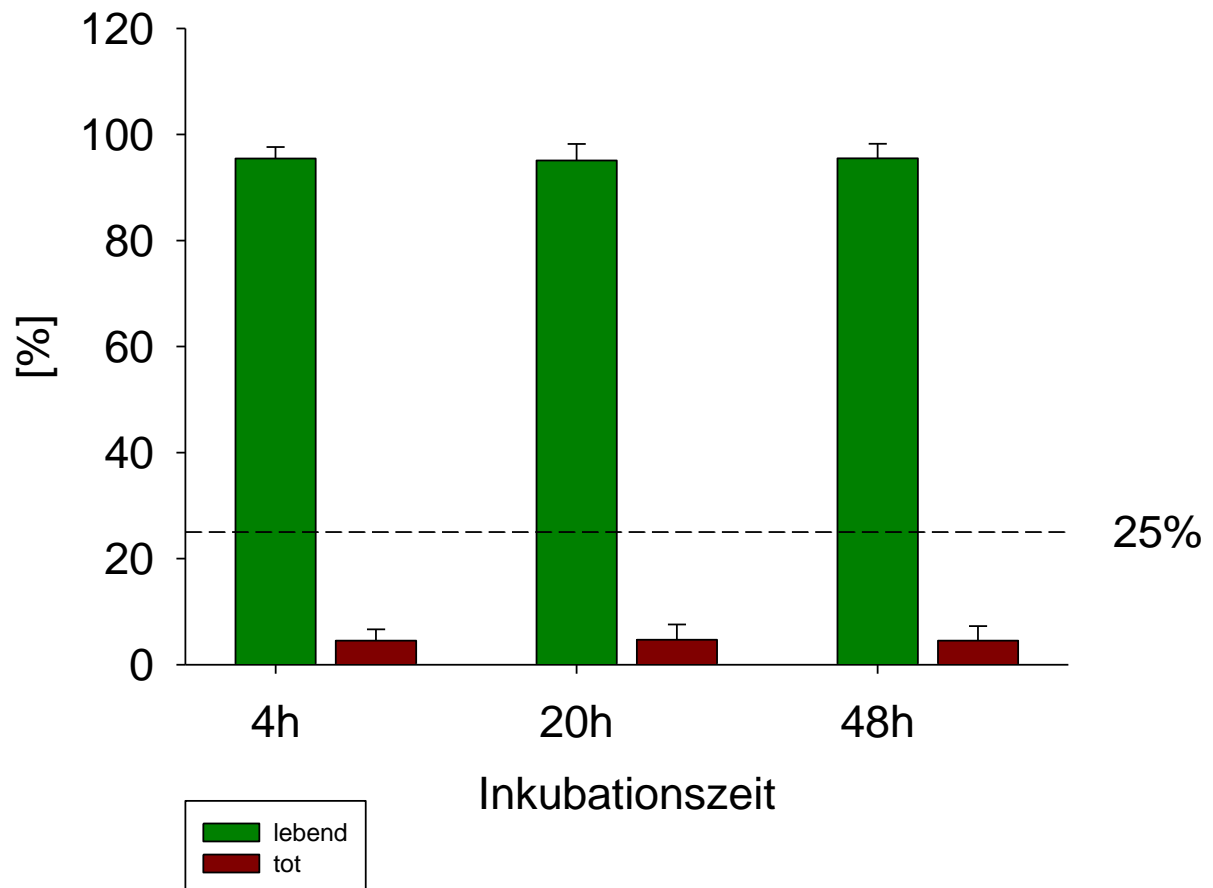


Abbildung 16: Toxizitätsdaten zu Partikel SS-SDS in Astrozyten

Die Abbildung zeigt den Einfluss des Partikel SS-SDS auf Astrozyten, sowie die Negativkontrollen (Zellen ohne Partikel), für Inkubationszeiten von 4, 20 und 48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von 150µg/ml. Die Werte wurden mittels Färbung mit dem Avitalfarbstoff 7-AAD ermittelt und sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler. Hierbei ist der prozentuale Anteil lebender Zellen „grün“ und der Anteil toter Zellen „rot“ dargestellt.

Abbildung 16 zeigt die prozentualen Toxizitätsdaten mit dem Partikel SS-SDS in Astrozyten zu allen drei Inkubationszeitpunkten. Dabei betrug der Anteil lebender Zellen bei allen Inkubationszeitpunkten konstant über 95%, wie es auch bei den Zeitreihe-Versuchen mit C6-Gliomzellen und diesem Partikel beobachtet wurde. Das Minimum lag bei 95,09% ±3,11% lebende Zellen bei 48h, das Maximum bei 95,49 ±2,76% lebenden Zellen bei 20h Inkubationszeit. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den gemessenen Werten konnte weder innerhalb der Zeitreihe

noch im Vergleich zu den Partikeln SS-SDS und PLLA-SDS in Astrozyten noch im Vergleich zu dem Partikel SS-SDS in C6-Gliomzellen festgestellt werden.

## PFDL-Tw Aufnahme Astrozyten

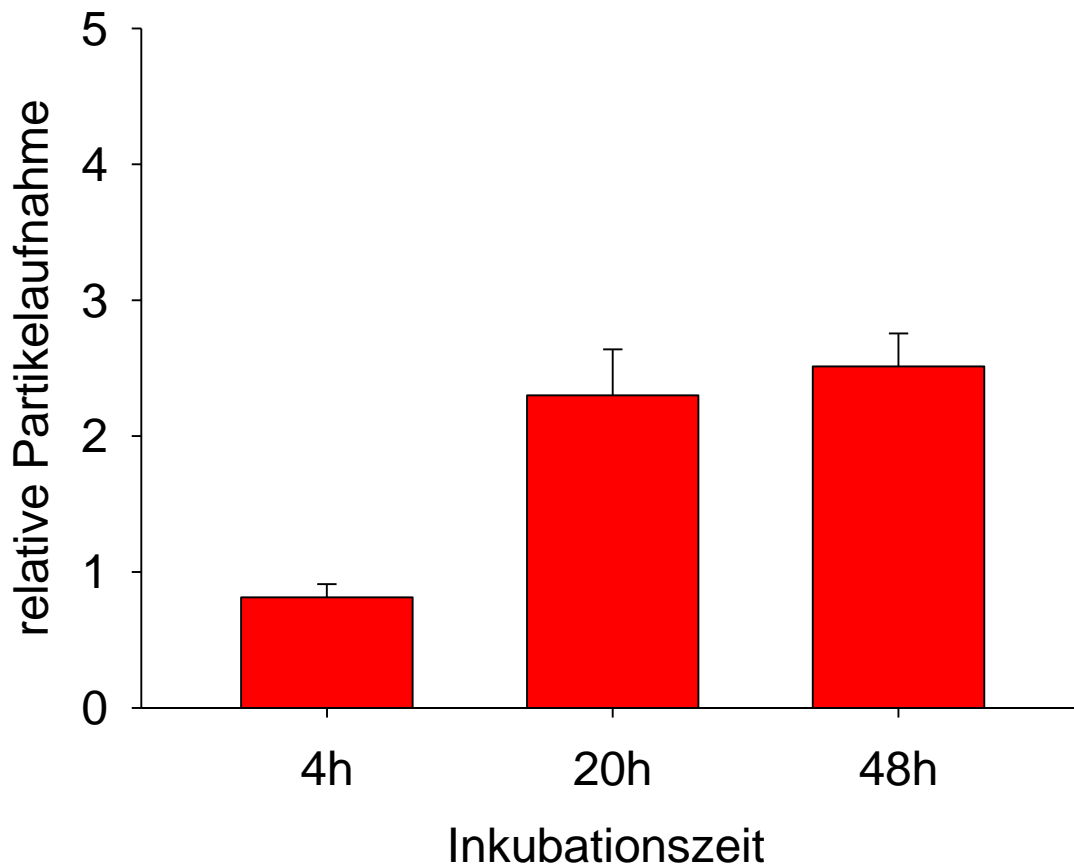


Abbildung 17: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels PFDL-Tw in Astrozyten

Dargestellt sind die Werte der relativen Aufnahme des Partikels PFDL-Tw in Astrozyten für Inkubationszeiten von 4, 20 und 48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von 150µg/ml. Die Werte wurden anhand der Leuchtintensität der biologischen Replikate ermittelt. Die Aufnahme ist bezogen auf die Aufnahme des Partikels SS-SDS in Astrozyten bei einer Inkubationszeit von 48h und die Werte sind aufgetragen als Mittelwerte + Standardfehler. \*statist. Signifikanz bei 4h vs. 20h und 4h vs. 48h

Die relative Aufnahme von PFDL-Tw in Astrozyten ist, bezogen auf Partikel SS-SDS, in Abbildung 17 zu sehen. Es zeigte sich insgesamt eine durchgängige Zunahme der Werte über alle drei Inkubationszeiten. Während sich bei 4h Inkubationszeit mit einer relativen Aufnahme von  $0,81 \pm 0,10$  ein ähnlicher Werte wie für den Partikel SS-SDS ( $0,79 \pm 0,11$ ) zeigte, lagen die Werte bei 20h mit  $2,30 \pm 0,34$  und 48h Inkubationszeit mit  $2,51 \pm 0,24$  deutlich über denen des Partikels SS-SDS in Astrozyten ( $48h \triangleq 1$ ). Dabei war der Unterschied zwischen den Werten bei 4h und 20h bzw. bei 4h und 48h jeweils statistisch signifikant. Zwischen den Werten für 20h und 48h Inkubationszeit

ließ sich kein signifikanter Unterschied zeigen. Ebenso ließen sich im Vergleich mit dem Partikel SS-SDS in Astrozyten signifikante Unterschiede bei den Inkubationszeiten von 20h und 48h nachweisen ( $p < 0,05$ ), bei 4h Inkubationszeit war dies jedoch nicht der Fall ( $p \geq 0,05$ ). Im Vergleich mit der C6-Gliom-Zelllinie und diesem Partikel waren keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der relativen Aufnahme zu verzeichnen.

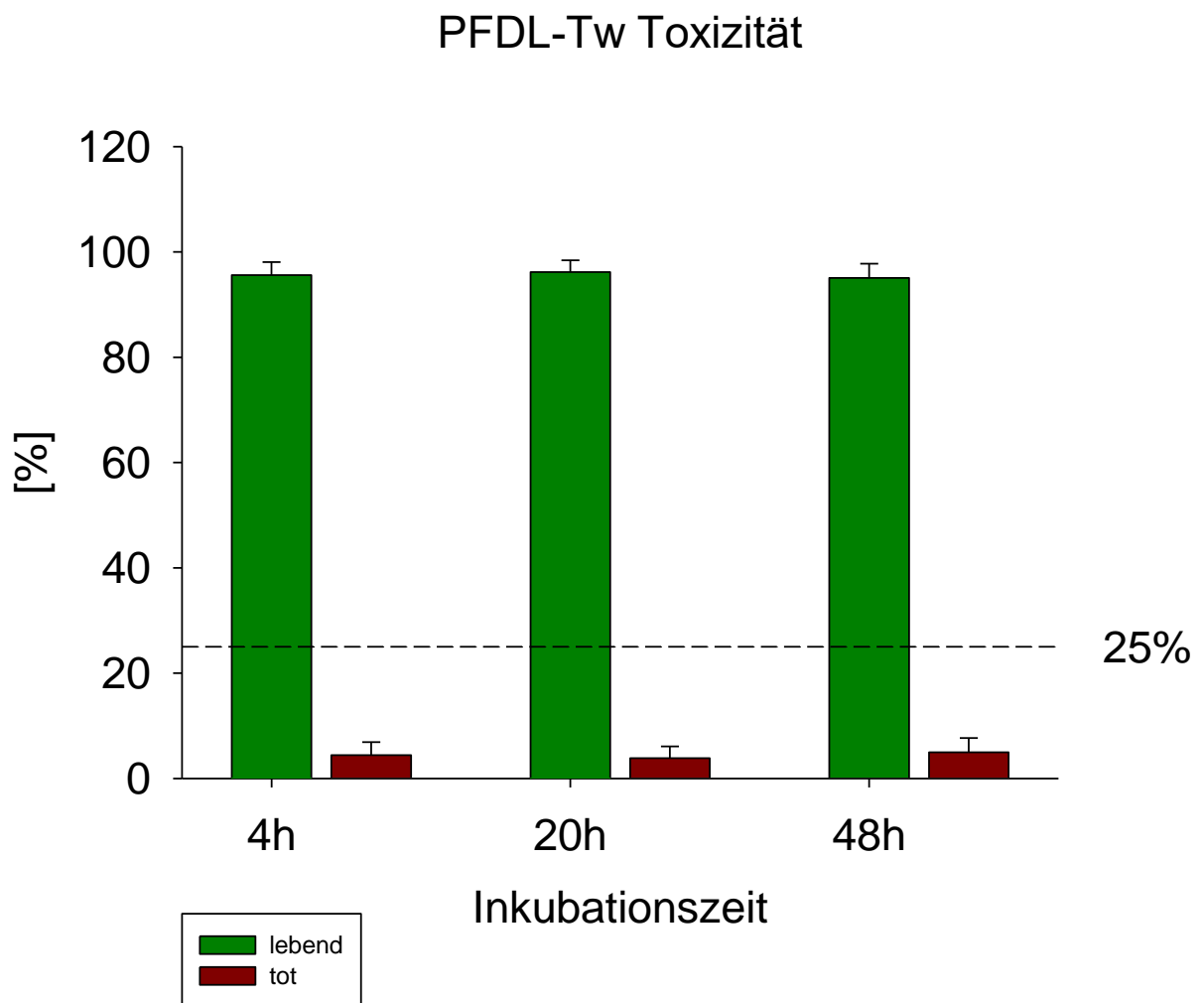


Abbildung 18: Toxizitätsdaten zu Partikel PFDL-Tw in Astrozyten

Die Abbildung zeigt den Einfluss des Partikel PFDL-Tw auf Astrozyten, sowie die Negativkontrollen (Zellen ohne Partikel), für Inkubationszeiten von 4, 20 und 48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von  $150\mu\text{g/ml}$ . Die Werte wurden mittels Färbung mit dem Avitalfarbstoff 7-AAD ermittelt und sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler. Hierbei ist der prozentuale Anteil lebender Zellen „grün“ und der Anteil toter Zellen „rot“ dargestellt.

Die prozentualen Toxizitätsdaten für den Partikel PFDL-Tw zu allen drei Inkubationszeitpunkten der Zeitreihe sind in Abbildung 18 dargestellt. Dabei betragen die Anteile der lebenden Zellen bei allen Inkubationszeitpunkten zwischen  $95,04 \pm$

2,73% bei 48h und  $96,17 \pm 2,24\%$  bei 20h Inkubationszeit und waren dabei insgesamt konstanter, als es bei den Zeitreihe-Versuchen mit C6-Gliomzellen und diesem Partikel beobachtet wurde. Zwischen den beiden genannten Zelllinien waren jedoch keine signifikanten Unterschiede nachweisbar ( $p \geq 0,05$ ). Innerhalb der Zeitreihe gab es keine zeitliche Tendenz der Werte, zwischen ihnen bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p \geq 0,05$ ). Auch im Vergleich mit dem Partikel SS-SDS in Astrozyten waren keine signifikanten Abweichungen zu beobachten ( $\geq 0,05$ ).

### PLLA-SDS Aufnahme Astrozyten

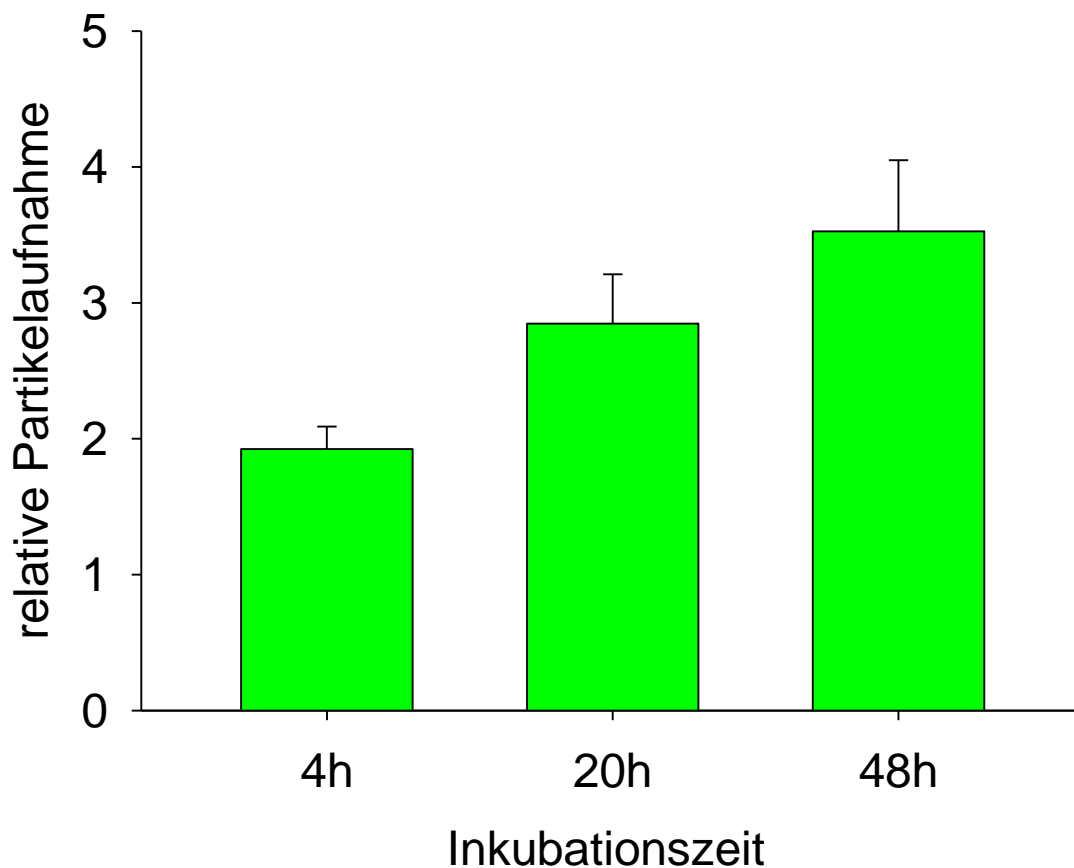


Abbildung 19: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels PLLA-SDS in Astrozyten

Dargestellt sind die Werte der relativen Aufnahme des Partikels PLLA-SDS in Astrozyten für Inkubationszeiten von 4, 20 und 48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von  $150\mu\text{g/ml}$ . Die Werte wurde ermittelt anhand der Leuchtintensität der biologischen Replikate. Die Aufnahme ist bezogen auf die Aufnahme des Partikels SS-SDS in Astrozyten bei einer Inkubationszeit von 48h und die Werte sind aufgetragen als Mittelwerte + Standardfehler.

Abbildung 19 präsentiert die relative Aufnahme des Partikels PLLA-SDS in Astrozyten für alle drei Inkubationszeiten der Zeitreihe. Es zeigte sich eine kontinuierliche



Zunahme der relativen Aufnahme über alle drei Inkubationszeiten beginnenden bei mit  $1,92 \pm 0,17$  bei 4h bis zum Erreichen des Maximums von  $3,53 \pm 0,52$  bei 48h. Die Unterschiede zwischen diesen Werten (innerhalb der Zeitreihe) wiesen jedoch keine statistische Signifikanz auf ( $p \geq 0,05$ ). Insgesamt lagen die Werte deutlich über dem Niveau der Werte der Versuche mit SS-SDS in Astrozyten, wie auch über den Werten mit PFDL-Tw in Astrozyten. Die gemessenen Unterschiede im Vergleich zu SS-SDS und PFDL-Tw in Astrozyten waren statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Zwischen den Zelllinien, also zwischen C6-Gliomzellen und Astrozyten bzw. zwischen Astrozyten und Endothelzellen, zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bei der relativen Partikelaufnahme.

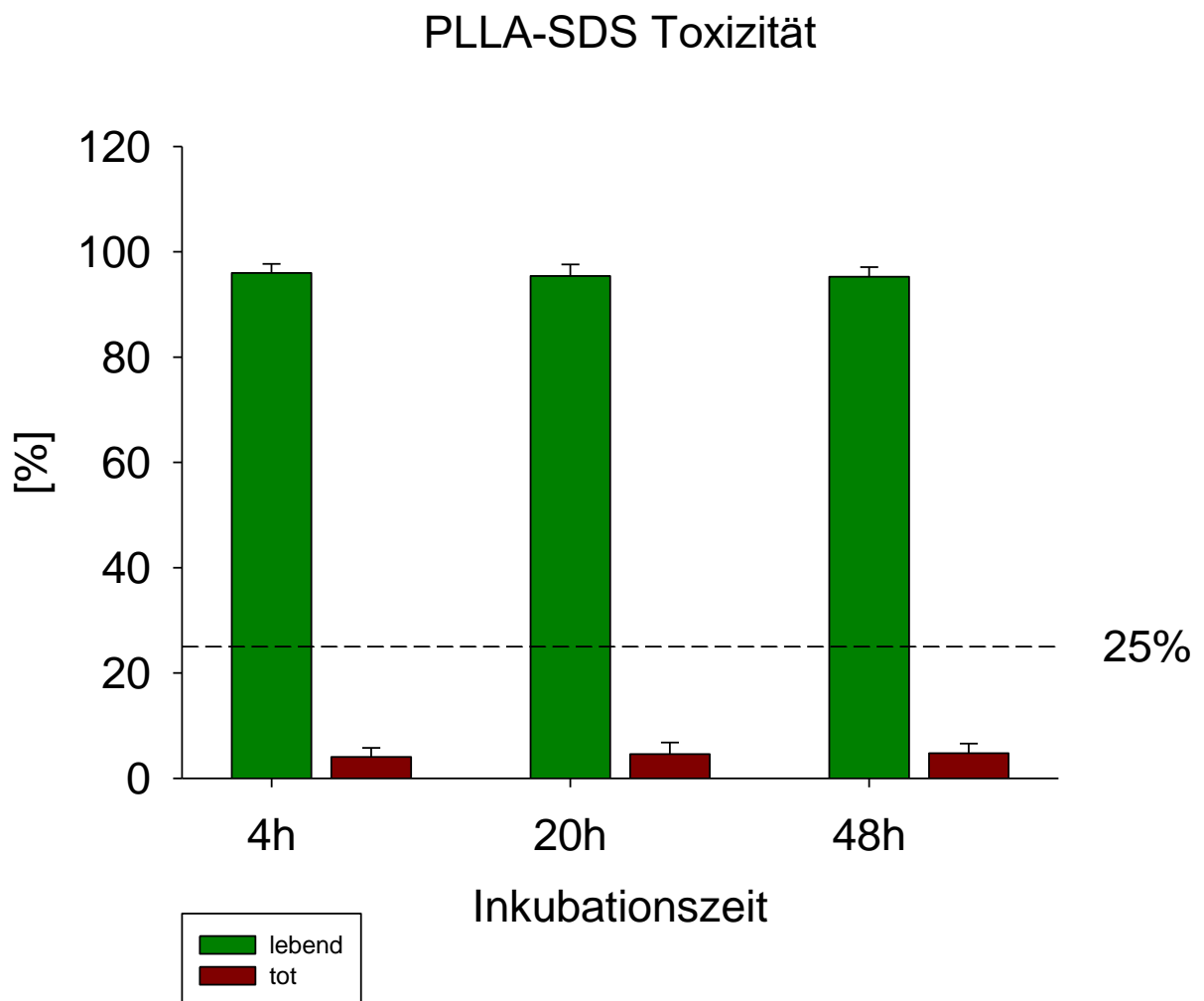


Abbildung 20: Toxizitätsdaten zu Partikel PLLA-SDS in Astrozyten

Die Abbildung zeigt den Einfluss des Partikel PLLA-SDS auf Astrozyten, sowie die Negativkontrollen (Zellen ohne Partikel), für Inkubationszeiten von 4, 20 und 48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von  $150 \mu\text{g/ml}$ . Die Werte wurden mittels Färbung mit dem Avitalfarbstoff 7-AAD

ermittelt und sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler. Hierbei ist der prozentuale Anteil lebender Zellen „grün“ und der Anteil toter Zellen „rot“ dargestellt.

Die Abbildung 20 zeigt die prozentualen Toxizitätsdaten zu den Versuchen mit dem Partikel PLLA-SDS in Astrozyten zu allen drei Inkubationszeitpunkten der Zeitreihe. Die Anteile der lebenden Zellen bewegte sich im Bereich von  $95,26\% \pm 1,84\%$  bei 48h Inkubationszeit bis zu  $95,96\% \pm 1,73\%$  bei 4h Inkubationszeit. Innerhalb dieser Zeitreihe ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Inkubationszeitpunkten ermitteln. Im Vergleich zu den Versuchen mit C6-Gliomzellen und diesem Partikel zeigte sich ebenfalls bei keiner der drei Inkubationszeiten ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p \geq 0,05$ ) hinsichtlich der Vitalität der Zellen.

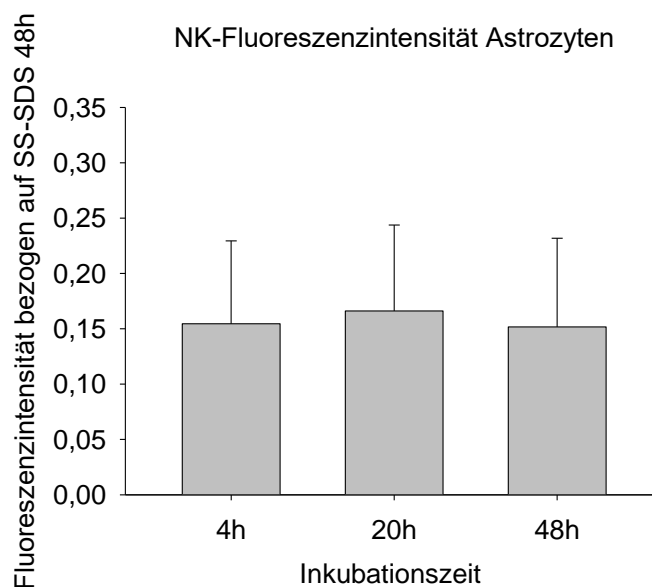


Abbildung 21: Gemessene Leuchtintensität der Astrozyten ohne NP (Negativkontrolle)

Dargestellt sind die Leuchtintensitäten der Negativkontrollen (Astrozyten ohne Inkubation mit NP) bei Inkubationszeiten von 4, 20 und 48h. Die Werte sind bezogen auf den 48h-Wert von Partikel SS-SDS in Astrozyten und werden dargestellt als Mittelwert + Standardfehler.

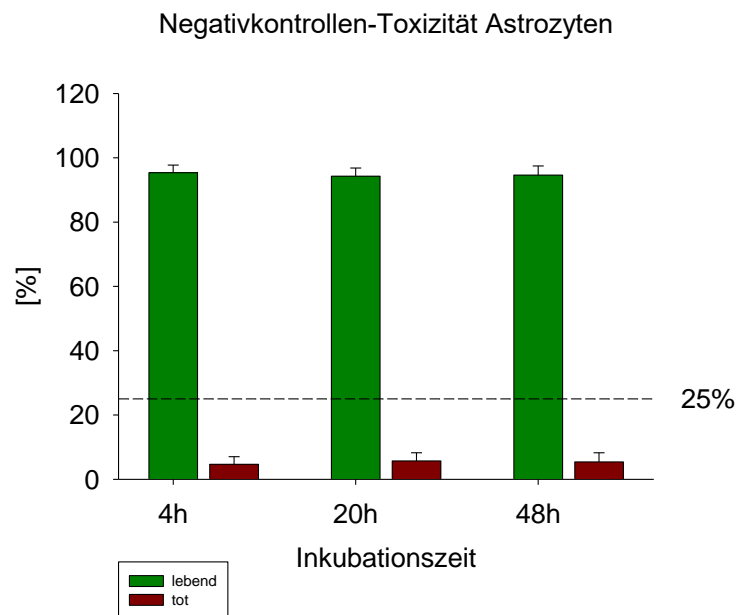


Abbildung 22: Toxizitätsdaten zu Astrozyten ohne Inkubation mit NP (Negativkontrolle)

Die Abbildung zeigt die prozentualen Anteile lebender („grün“ dargestellt) und toter („rot“ dargestellt) Zellen der Negativkontrollen (Astrozyten) bei Inkubationszeiten ohne NP von 4, 20 und 48h. Die Werte wurden mittels Färbung mit dem Avitalfarbstoff 7-AAD ermittelt und sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler.

Zum Vergleich wurden bei den Versuchen mit Astrozyten ebenfalls die Werte der Negativkontrollen (Astrozyten ohne NP) bestimmt, welche in Abbildung 21 (relative Aufnahme) und Abbildung 22 (Toxizitätsdaten) dargestellt werden. Die Werte für die Fluoreszenzintensität bezogen auf SS-SDS bei 48h lagen im Bereich von  $0,15 \pm 0,08$  bei 48h bis  $0,17 \pm 0,08$  bei 20h Inkubationszeit und damit deutlich unterhalb des Niveaus von SS-SDS in Astrozyten. Die Anteile lebender Zellen in den Negativkontrollen lagen minimal bei  $94,28\% \pm 2,54\%$ . Hinsichtlich der Vitalität zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den Versuchen mit den Partikeln SS-SDS, PFDL-Tw und PLLA-SDS in Astrozyten.

#### 5.4. Zeitreihe mit Endothelzellen - Durchflusszytometrie

### SS Aufnahme Endothelzellen

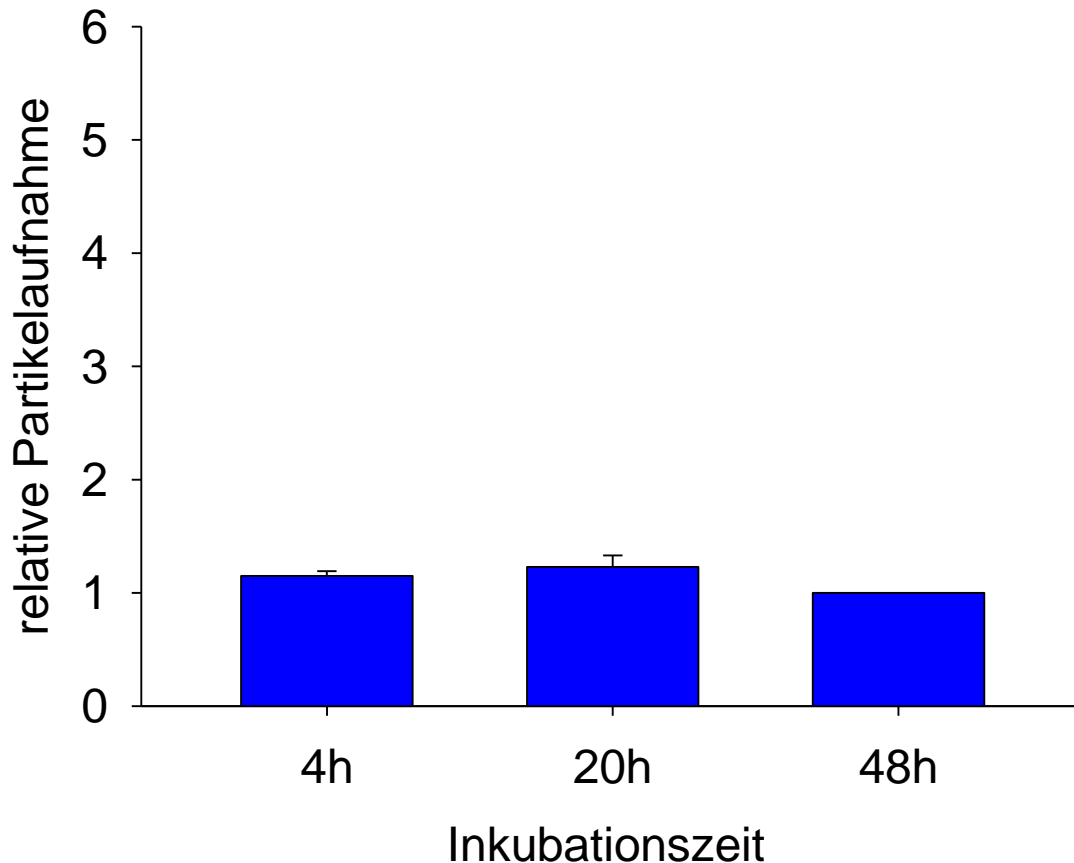


Abbildung 23: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels SS-SDS in Endothelzellen

Dargestellt sind die Werte der relativen Aufnahme des Partikels SS-SDS in zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen für Inkubationszeiten von 4, 20 und 48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von 150µg/ml. Die Werte wurden ermittelt anhand der Leuchtintensität der biologischen Replikate. Die Aufnahme ist bezogen auf die Aufnahme dieses Partikels bei einer Inkubationszeit von 48h und die Werte sind aufgetragen als Mittelwerte + Standardfehler.

In Abbildung 23 ist die relative Aufnahme für den Partikel SS-SDS in zerebralen mikrovaskuläre Endothelzellen bei Inkubationszeiten von 4h, 20h und 48h (Zeitreihe) dargestellt. Der für die Inkubationszeit von 48h gemessene Wert mit diesem NP stellte die Bezugsgröße für die anderen Werten der weiteren Zeitreihen mit Endothelzellen dar. Auffällig bei diesen Messungen war, dass sich der Wert bei 48h Inkubationszeit ( $1 \pm 100\%$ ), unterhalb der Werte für die Inkubationszeiten von 4h mit  $1,15 \pm 0,04$  und von 20h mit  $1,23 \pm 0,10$  befand. Es zeigte sich also keine stetige Zunahme der Werte wie bei den C6-Gliomzellen bzw. wie bei Astrozyten. Jedoch wiesen die Unterschiede

innerhalb der Zeitreihe mit Endothelzellen keine statistische Signifikanz auf ( $p \geq 0,05$ ). Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $p \geq 0,05$ ) zwischen den Zelllinien C6-Gliomzellen, Astrozyten und Endothelzellen für alle drei Inkubationszeiten bezogen auf die relative Aufnahme von SS-SDS in die Zellen.

### SS-SDS Toxizität Endothelzellen

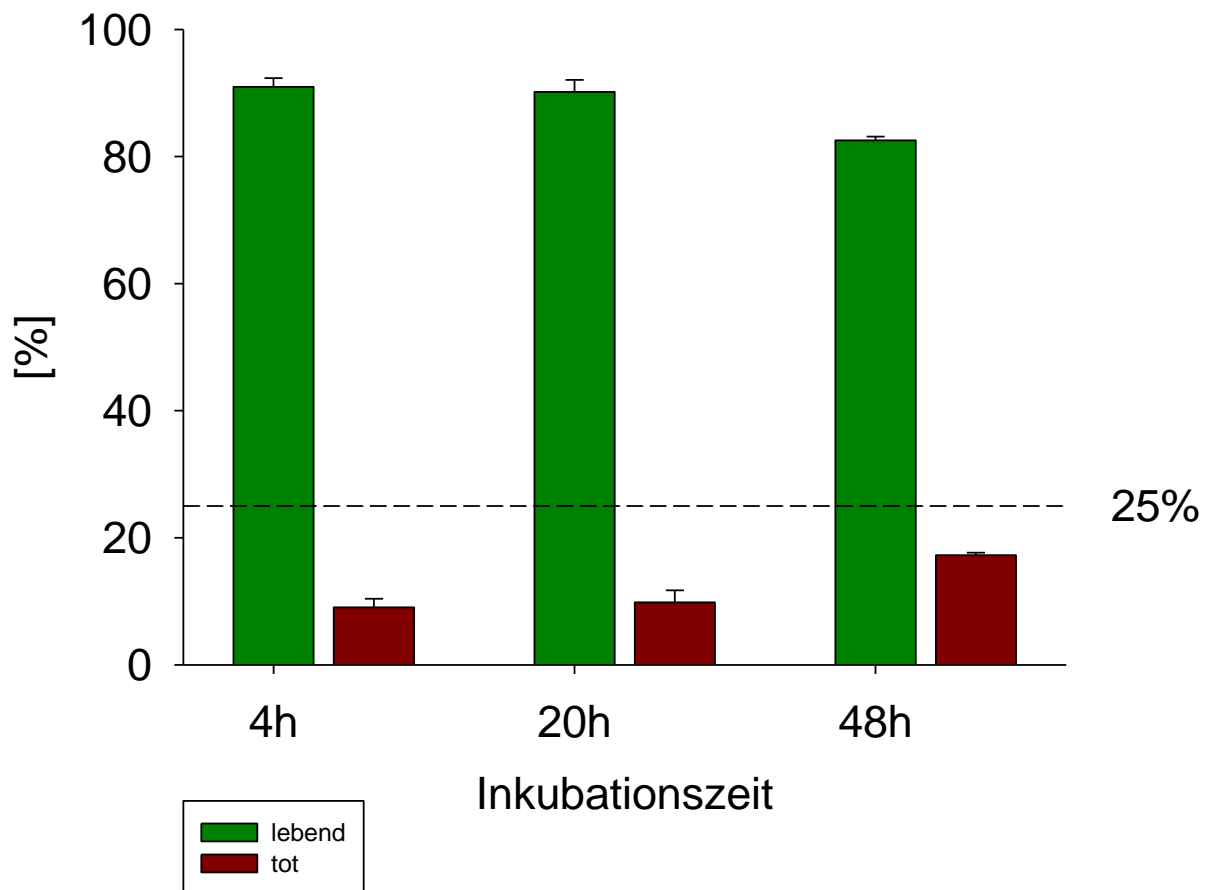


Abbildung 24: Toxizitätsdaten zu Partikel SS-SDS in Endothelzellen

Die Abbildung zeigt den Einfluss des Partikel SS-SDS auf zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen, sowie die Negativkontrollen (Zellen ohne Partikel), für Inkubationszeiten von 4, 20 und 48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von  $150 \mu\text{g/ml}$ . Die Werte wurden mittels Färbung mit dem Avitalfarbstoff 7-AAD ermittelt und sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler. Hierbei ist der prozentuale Anteil lebender Zellen „grün“ und der Anteil toter Zellen „rot“ dargestellt.

Die prozentualen Toxizitätsdaten für den Partikel SS-SDS in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen zu allen drei Inkubationszeitpunkten der Zeitreihe sind in Abbildung 24 zu sehen. Dabei betragen die Anteile der lebenden Zellen bei 4h ( $90,96\% \pm 1,37\%$ ) und bei 20h ( $90,17\% \pm 1,88\%$ ) Inkubationszeit ein annähernd gleiches Niveau. Bei 48h Inkubationszeit nahm der Anteil lebender Zellen ab und sank auf  $82,55\% \pm 0,57\%$ . Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant

( $p \geq 0,05$ ). Insgesamt lagen die Werte also unter denen der Zeitreihe-Versuche mit C6-Gliomzellen bzw. Astrozyten und diesem Partikel. Die Unterschiede hinsichtlich der Zellvitalität bei 48h Inkubationszeit war hierbei sowohl zwischen C6-Gliomzellen und Endothelzellen wie auch zwischen Astrozyten und Endothelzellen signifikant ( $p < 0,05$ ). Für die Inkubationszeiten 4h und 20h war jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien nachweisbar ( $p \geq 0,05$ ).

## PFDL-Tw Aufnahme Endothelzellen

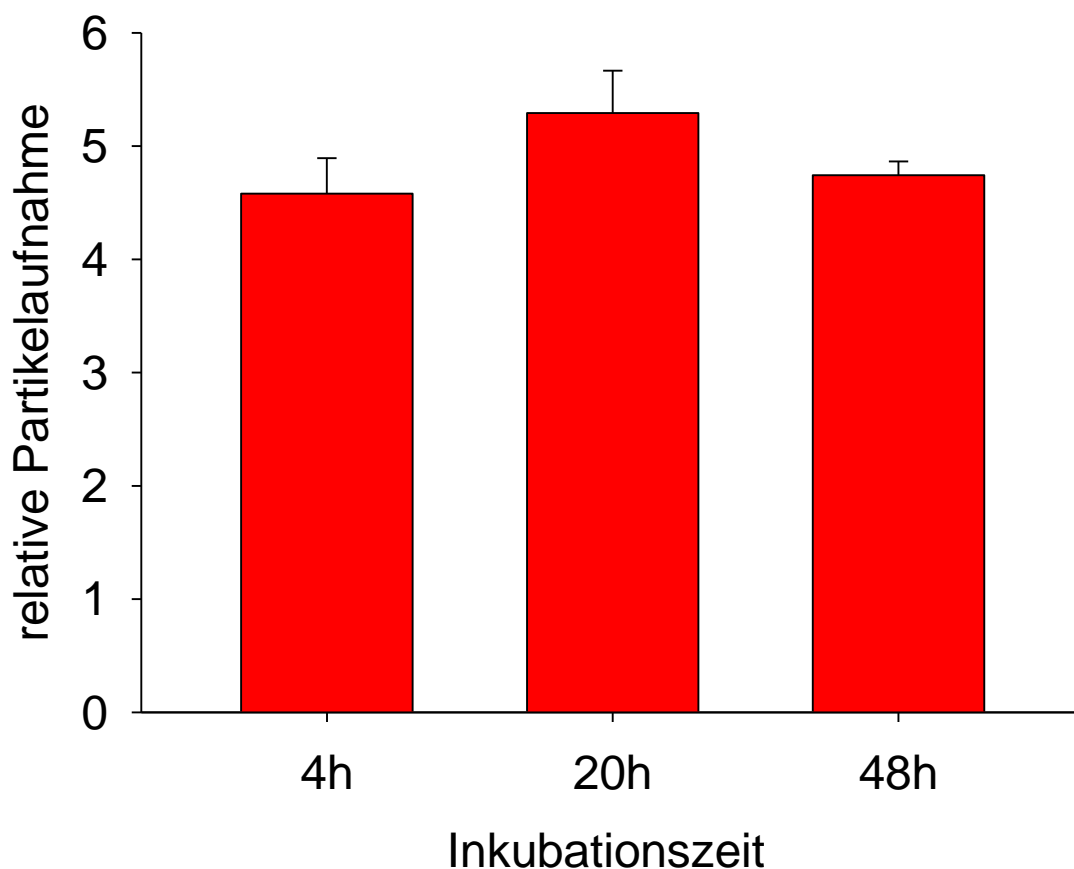


Abbildung 25: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels PFDL-Tw in Endothelzellen

Dargestellt sind die Werte der relativen Aufnahme des Partikels PFDL-Tw in zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen für Inkubationszeiten von 4, 20 und 48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von  $150 \mu\text{g/ml}$ . Die Werte wurden anhand der Leuchtintensität der biologischen Replikate ermittelt. Die Aufnahme ist bezogen auf die Aufnahme des Partikels SS-SDS in Endothelzellen bei einer Inkubationszeit von 48h und die Werte sind aufgetragen als Mittelwerte + Standardfehler.

Abbildung 25 zeigt die relative Aufnahme des Partikels PFDL-Tw in zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen. Das Maximum von  $5,29 \pm 0,37$  wurde bei einer Inkubationszeit von 20h erreicht, sowohl der Wert bei 4h Inkubationszeit ( $4,58 \pm 0,31$ )

wie auch bei 48h Inkubationszeit ( $4,74 \pm 0,12$ ) lag etwas unterhalb dieses Wertes. Diese Unterschiede innerhalb der Zeitreihe waren jedoch nicht statistisch signifikant. Mit durchgängig gemessenen Werten von über dem vierfachen des Referenzwertes (48h, SS-SDS), zeigten sich insgesamt deutlich höhere Werte als beim Partikel SS-SDS in dieser Zellart. Diese Unterschiede zu Partikel SS-SDS wiesen aber keine statistische Signifikanz auf ( $p \geq 0,05$ ). Bei dem Vergleich zwischen den Zelllinien C6-Gliomzellen, Astrozyten und Endothelzellen mit diesem Partikel war zu keiner der drei Inkubationszeiten ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der relativen Aufnahme zu verzeichnen ( $p \geq 0,05$ ).

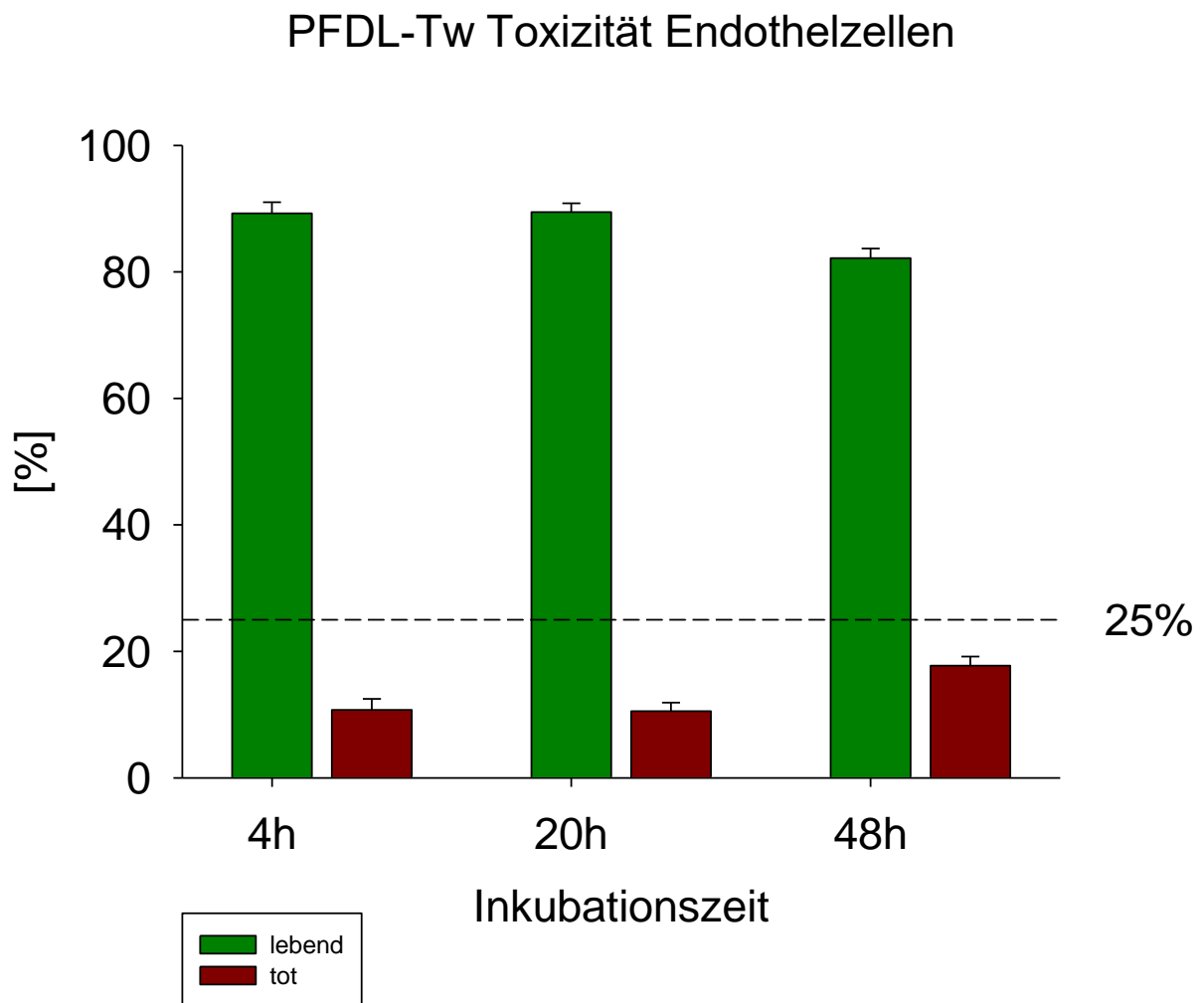


Abbildung 26: Toxizitätsdaten zu Partikel PFDL-Tw in Endothelzellen

Die Abbildung zeigt den Einfluss des Partikel PFDL-Tw auf zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen für Inkubationszeiten von 4, 20 und 48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von  $150 \mu\text{g/ml}$ . Die Werte wurden mittels Färbung mit dem Avitalfarbstoff 7-AAD ermittelt und sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler. Hierbei ist der prozentuale Anteil lebender Zellen „grün“ und der Anteil toter Zellen „rot“ dargestellt.

In Abbildung 26 sind die prozentualen Toxizitätsdaten für den Partikel PFDL-Tw in BCEC zu allen drei Inkubationszeitpunkten der kurzen Zeitreihe aufgetragen. Während bei Inkubationszeiten von 4h und 20h die Anteile der lebenden Zellen bei  $89,25\% \pm 1,75\%$  und  $89,47\% \pm 1,38\%$  lagen, waren bei 48h Inkubationszeit nur noch  $82,17\% \pm 1,53\%$  der Zellen lebend. Diese Unterschiede innerhalb der Zeitreihe waren nicht statistisch signifikant ( $p \geq 0,05$ ). Es zeigte sich folglich nicht die gleiche Konstanz der Werte wie bei den Versuchen mit Astrozyten und diesem Partikel, sondern ähnliche Schwankungen wie bei den Versuchen mit C6-Gliomzellen. Jedoch war beim Partikel PFDL-SDS kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zellvitalität zwischen den Versuchen mit C6-Gliomzellen bzw. Astrozyten und Endothelzellen nachweisbar ( $p \geq 0,05$ ). Im Vergleich zu Partikel SS-SDS in Endothelzellen ist ebenfalls kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen ( $p \geq 0,05$ ).

### PLLA-SDS Aufnahme Endothelzellen

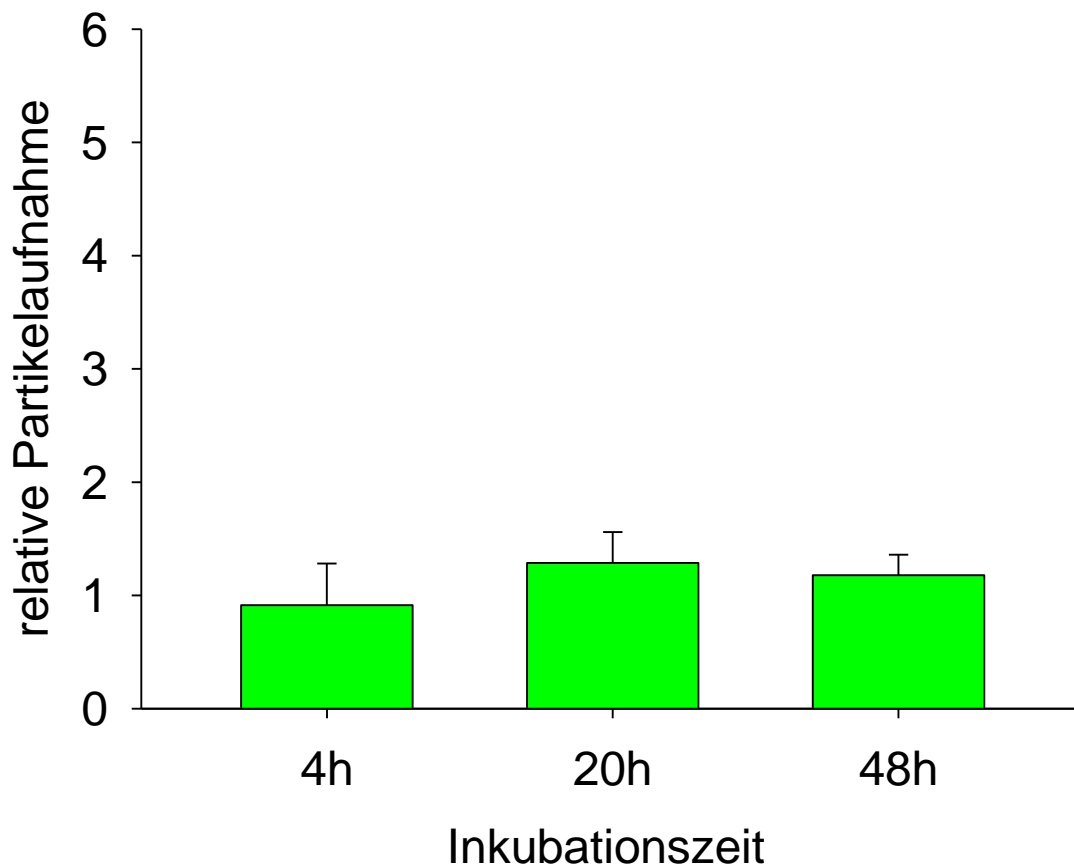


Abbildung 27: Zeitliche Kinetik der relativen Aufnahme des Partikels PLLA-SDS in Endothelzellen



*Dargestellt sind die Werte der relativen Aufnahme des Partikels PLLA-SDS in zerebralen mikrovaskulären für Inkubationszeiten von 4, 20 und 48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von 150µg/ml. Die Werte wurden anhand der Leuchtintensität der biologischen Replikate ermittelt. Die Aufnahme ist bezogen auf die Aufnahme des Partikels SS-SDS in Astrozyten bei einer Inkubationszeit von 48h und die Werte sind aufgetragen als Mittelwerte + Standardfehler.*

Die relative Aufnahme des Partikels PLLA-SDS in BCEC ist in Abbildung 27 für alle drei Inkubationszeiten der kurzen Zeitreihe dargestellt. Die relative Aufnahme des Partikels PLLA-SDS erreichte ihr Maximum mit  $1,29 \pm 0,27$  bei einer Inkubationszeit von 20h. Die Werte für eine Inkubationszeit von 4h ( $0,91 \pm 0,37$ ) und für 48h ( $1,18 \pm 0,18$ ) lagen unterhalb des Wertes für 20h. Zwischen ihnen besteht kein statistisch signifikanter Unterschied. Insgesamt bewegten sich die Werte dabei auf einem ähnlichen Niveau wie die des Partikels SS-SDS bei dieser Zellart. Es konnte also keine deutlich höhere Aufnahme im Vergleich zu SS-SDS, wie es die Versuche mit C6-Gliomzellen und Astrozyten zeigten, registriert werden. Im Vergleich mit den Partikeln SS-SDS und PFDL-Tw in Endothelzellen zu den drei Inkubationszeitpunkten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ( $p \geq 0,05$ ). Im Vergleich zwischen den Zelllinien war bei dem Partikel PLLA-SDS für eine Inkubationszeit von 4h ein signifikanter Unterschied zwischen C6-Gliomzellen und Endothelzellen nachweisbar ( $p < 0,05$ ). Für den Vergleich Astrozyten gegen Endothelzellen bei 4h Inkubationszeit und bei jeglicher Test-Kombination bei 20h und 48h Inkubationszeit war kein statistisch signifikanter Unterschied gegeben ( $p \geq 0,05$ ).

## PLLA-SDS Toxizität Endothelzellen

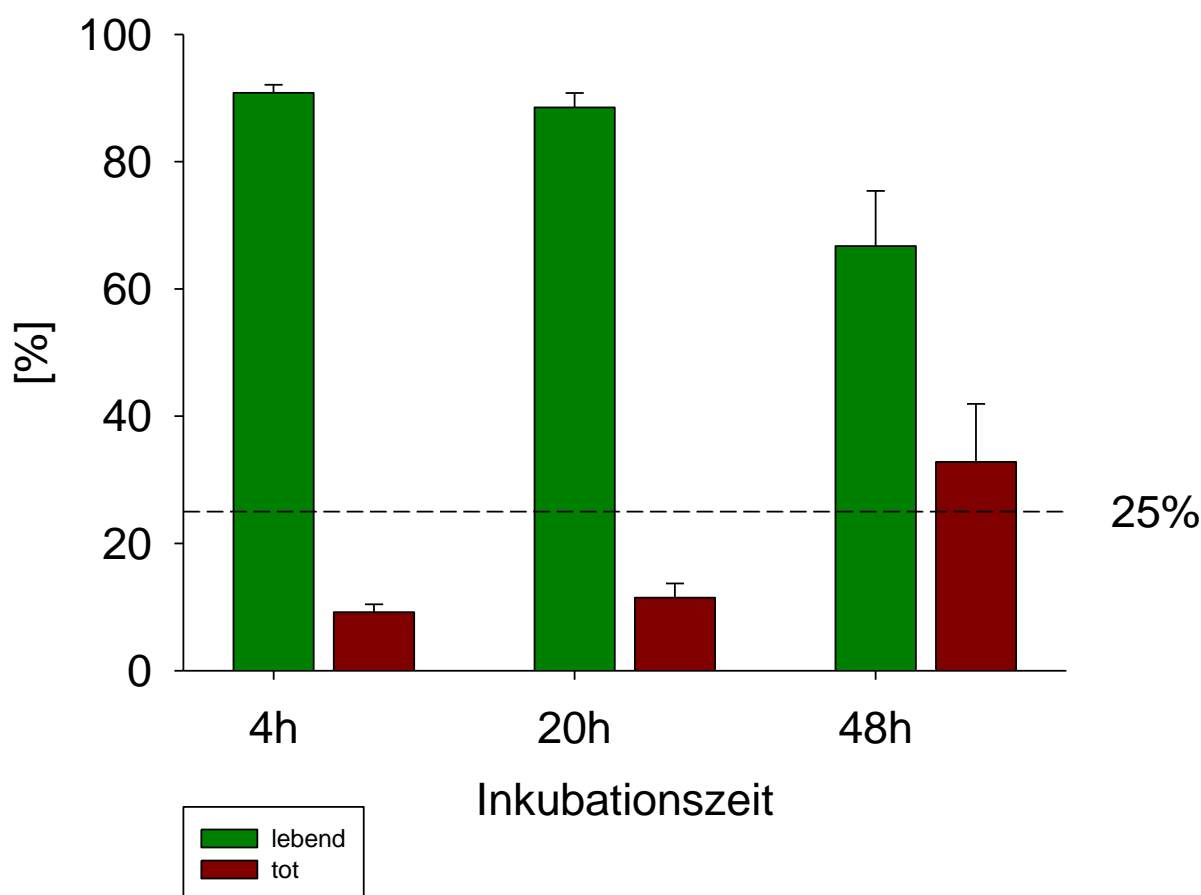


Abbildung 28: Toxizitätsdaten zu Partikel PLLA-SDS in Endothelzellen

Die Abbildung zeigt den Einfluss des Partikel PLLA-SDS auf zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen für Inkubationszeiten von 4, 20 und 48h bei einer einheitlichen Partikelkonzentration von 150µg/ml. Die Werte wurden mittels Färbung mit dem Avitalfarbstoff 7-AAD ermittelt und sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler. Hierbei ist der prozentuale Anteil lebender Zellen „grün“ und der Anteil toter Zellen „rot“ dargestellt.

Die Abbildung 28 stellt die prozentualen Toxizitätsdaten für den Partikel PLLA-SDS zu allen drei Inkubationszeitpunkten der Zeitreihe dar. Der Anteil lebender Zellen nahm insgesamt mit steigender Inkubationszeit ab, wobei der Wert für 48h Inkubationszeit die als kritisch betrachtete Grenze von 75% vitale Zellen unterschritt. Während der Anteil lebender Zellen bei Inkubationszeiten von 4h bei 90,83% ± 1,24% und von 20h bei 88,54% ± 2,24% lag, sank dieser Wert bei einer Inkubationszeit von 48h auf ein Minimum von 66,73% ± 8,67 ab. Dieser Abfall der Werte innerhalb der Zeitreihe wies jedoch keine statistische Signifikanz auf ( $p \geq 0,05$ ). Der gemessene Wert von 66,73% ± 8,67 lag deutlich unter den Werten der Partikel SS-SDS und PFDL-Tw bei 48h Inkubation mit dieser Zellart. Auch hier zeigte sich keine statistische Signifikanz ( $p \geq 0,05$ ). Insgesamt bewegten sich die Werte auch unterhalb der beobachteten Werte

bei C6-Gliomzellen (statistisch signifikant,  $p < 0,05$ ) und Astrozyten (statistisch nicht signifikant,  $p \geq 0,05$ ) mit diesem Partikel.

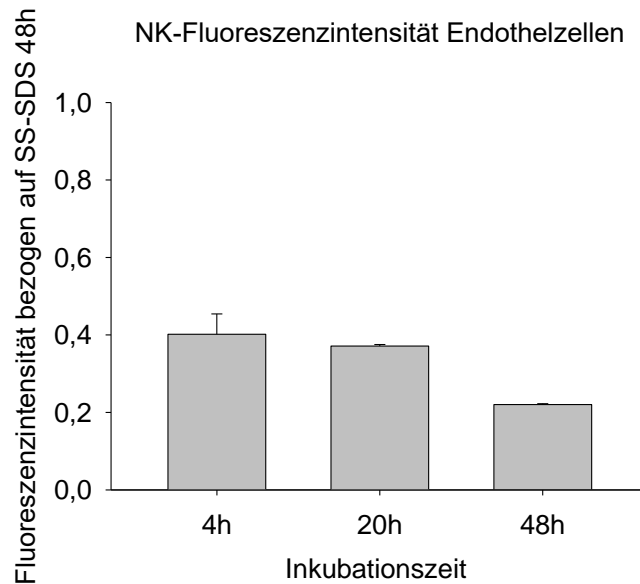


Abbildung 29: Gemessene Leuchtintensität der Endothelzellen ohne NP (Negativkontrolle)

Dargestellt sind die Leuchtintensitäten der Endothelzellen ohne Inkubation mit NP (Negativkontrollen) bei Inkubationszeiten von 4, 20 und 48h. Die Werte sind bezogen auf den 48h-Wert von Partikel SS-SDS in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen und werden dargestellt als Mittelwert + Standardfehler.

### Negativkontrollen-Toxizität Endothelzellen

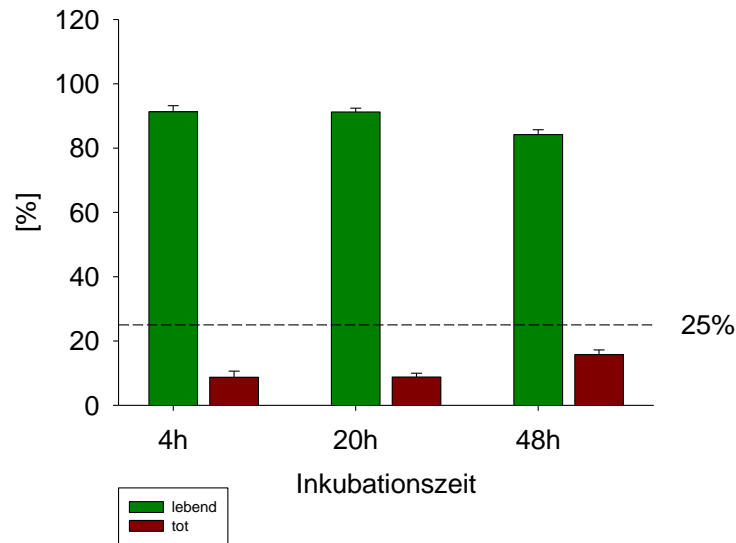


Abbildung 30 Toxizitätsdaten zu den Endothelzellen ohne NP (Negativkontrolle)

Die Abbildung zeigt die prozentualen Anteile lebender („grün“ dargestellt) und toter („rot“ dargestellt) Zellen der zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen ohne Inkubation mit NP (Negativkontrolle) bei Inkubationszeiten von 4, 20 und 48h. Die Werte wurden mittels Färbung mit dem Avitalfarbstoff 7-AAD ermittelt und sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler.

Ebenso wie bei den anderen Zellarten wurden auch bei der Endothelzell-Versuchsreihe die Mittelwerte und Standardfehler für die gemessenen Werte der Negativkontrollen (Endothelzellen ohne NP) bestimmt, welche in Abbildung 29 (relative Aufnahme) und Abbildung 30 (Toxizitätsdaten) dargestellt werden. Die Werte für die Fluoreszenzintensität, bezogen auf SS-SDS bei 48h in Endothelzellen, bewegten sich zwischen  $0,22 \pm 2,15e-3$  bei 48h und  $0,40 \pm 0,05$  bei 4h Inkubationszeit und lagen damit deutlich unterhalb der Referenzwerte von SS-SDS in Endothelzellen. Bei den Daten zur Toxizität konnte beobachtet werden, dass auch bei den Negativkontrollen der Anteil lebender Zellen bei 4h ( $91,28\% \pm 1,90\%$ ) und bei 20h ( $91,22\% \pm 1,20\%$ ) Inkubationszeit zunächst auf einem ähnlichen Niveau lag und bei einer Inkubationszeit von 48h auf  $84,20\% (\pm 1,50\%)$  sank. Die Werte bewegten sich also in ähnlichen Bereichen wie bei den Partikeln SS-SDS und PFDL-Tw in dieser Zellart. Insgesamt war bei allen Inkubationszeitpunkten kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Negativkontrollen und den Partikeln SS-SDS, PFDL-Tw und PLLA-SDS in diesem Zelltyp nachweisbar ( $p \geq 0,05$ ).

## 5.5. Konfokale Laser Scanning- Mikroskopie

Mittels konfokaler Laser Scanningmikroskopie wurden, ergänzend zur Durchflusszytometrie, Bilder mit einigen Nanopartikeln zum Nachweis der intrazellulären Lokalisation der Partikel gemacht. Verwertbare Aufnahmen konnten dabei von folgenden Partikeln gewonnen werden: SS-SDS, PFDL-SDS, PFDL-Tw, Chi-SDS, Chi-Tw, PBCA-SDS und PBCA-Tw in C6-Zellen sowie PLLA-SDS und SS-Tw in Astrozyten. Exemplarisch sind hier Bilder der Partikel SS-SDS und PFDL-Tw in C6-Zellen und PLLA-Tw in Astrozyten, jeweils bei 20h Inkubationszeit, aufgeführt.

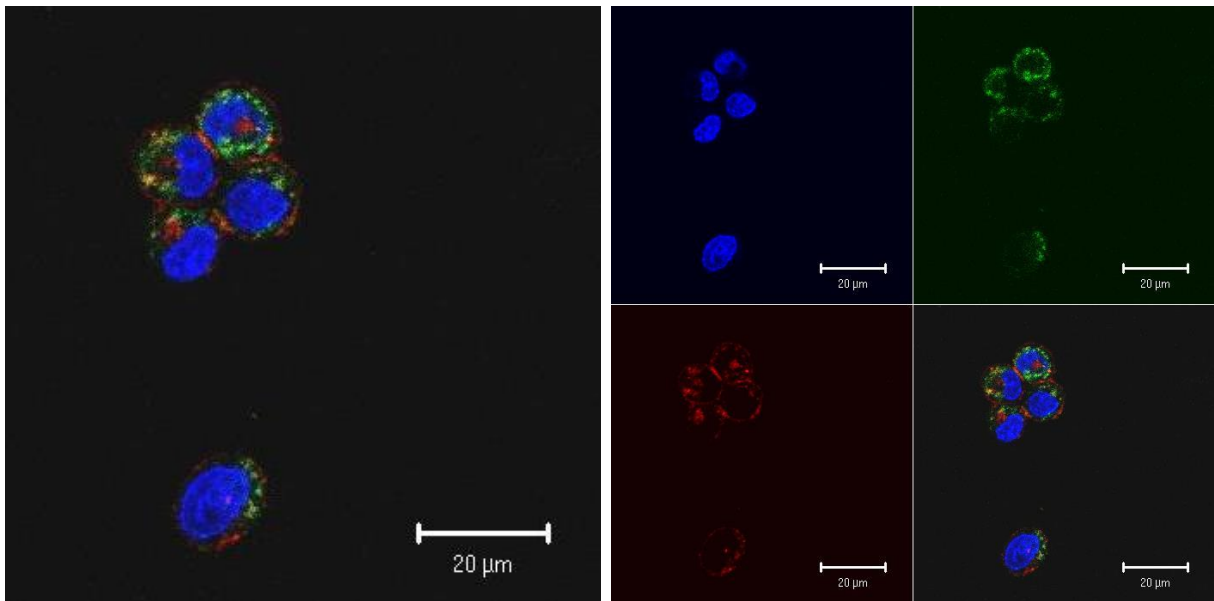


Abbildung 31: cLSM mit PLLA-Tw in C6-Zellen

Die C6-Gliomzellen sind angefärbt mit Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) und CellMaskOrange (Gibco Life Technologies Corp., USA). Die Nanopartikel enthalten PMI. Dargestellt sind der Zellkern (blau), Nanopartikel (grün) und die Zellmembran (rot); Quelle: Fraunhofer ICT-IMM & INcP Universitätsmedizin Mainz

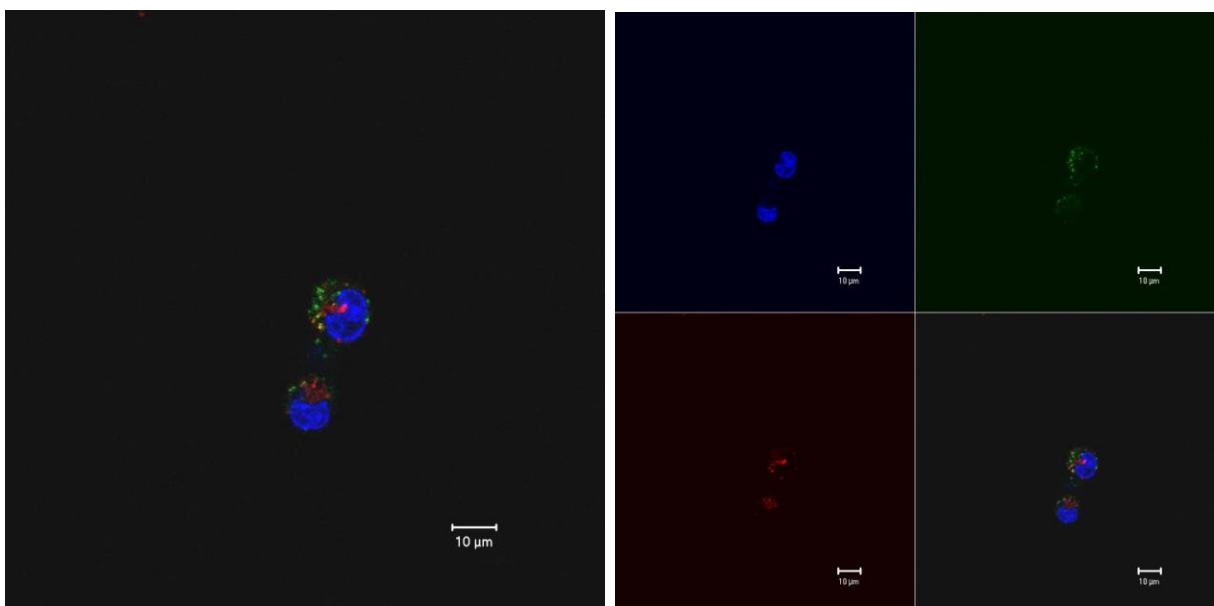


Abbildung 32: cLSM mit SS-SDS in C6-Zellen

Die C6-Gliomzellen sind angefärbt mit Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) und CellMaskOrange (Gibco Life Technologies Corp., USA). Die Nanopartikel enthalten PMI. Dargestellt sind der Zellkern (blau), Nanopartikel (grün) und die Zellmembran (rot); Quelle: Fraunhofer ICT-IMM & INcP Universitätsmedizin Mainz

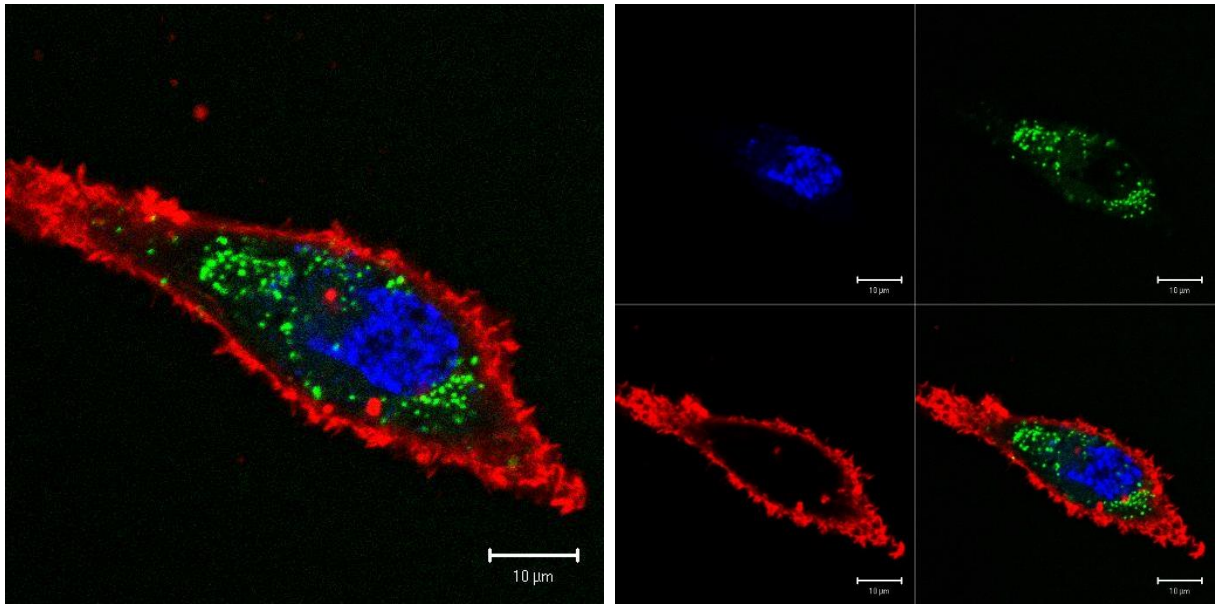


Abbildung 33: cLSM mit PLLA-Tw in Astrozyten

Die Astrozyten sind angefärbt mit Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) und CellMaskOrange (Gibco Life Technologies Corp., USA). Die Nanopartikel enthalten PMI. Dargestellt sind der Zellkern (blau), Nanopartikel (grün) und die Zellmembran (rot); Quelle: Fraunhofer ICT-IMM & INcP Universitätsmedizin Mainz

Bei allen drei Aufnahmen ist zu sehen, dass die grün dargestellten Nanopartikel innerhalb der, in rot dargestellten, Zellmembran liegen. Sie liegen folglich intrazellulär vor.

## 6. Diskussion

### 6.1. Modell und Methoden

#### In-vitro-Modell

Für die in-vitro Testung der Nanopartikel im Rahmen dieser Arbeit fiel die Wahl auf die Verwendung von Monokulturen unterschiedlicher Zelltypen, welche auch Teil der natürlichen BHS sind. Die Verwendung von Zellkulturen als in-vitro-Modell ist im Rahmen pharmakologischer Forschung ein weit verbreitetes Verfahren zum Screening neuer oder potentieller ZNS-Therapeutika und bietet dabei mehrere Vorteile (Helms et al., 2016, Deli et al., 2005). Zum einen lässt sich so ein gut reproduzierbares Modell etablieren, welches sich auch in größeren Wiederholungszahlen deutlich kostengünstiger und weniger arbeitsintensiv als in-vivo-Modelle zeigt (Patabendige et al., 2013b). Zum anderen sollen die Nanopartikel auf mögliche Nebenwirkungen und z.B. eine Toxizität hin getestet werden, weshalb es auch aus ethischen Gesichtspunkten geboten ist zunächst in-vitro zu testen, um die Anzahl evtl. in Zukunft benötigter Versuchstiere gering zu halten und mögliches Leiden und negative Auswirkungen auf diese weitestgehend zu minimieren. Ein wesentlicher Nachteil von in-vitro-Modellen ist jedoch, dass diese nicht solch umfangreiche Informationen, wie in-vivo-Modelle zu Physiologie und Pathologie der BHS oder auch zur Biodistribution getesteter Substanzen im gesamten Organismus geben können. Unterschiedliche Modelle aus Primärzellen porcinen Ursprungs haben sich in der Forschung zu BHS-Permeabilitätsstudien von Substanzen bewährt (Nielsen et al., 2017). Aufgrund wesentlicher Vorteile dieser Zellen gegenüber Modellen mit anderem tierischem Ursprung ist die Wahl dieses Modells gerechtfertigt. So ist die deutliche Expression von TJs, verbunden mit verlässlich hohen TEER-Werten, niedrigen Permeabilitätsraten (z.B. für Sucrose) und der nachgewiesenen Expression BHS-spezifischer Proteine, Rezeptoren und Transporter, ein bedeutender Vorteil eines Modells mit Zellen aus der BHS von Schweinen hinsichtlich des „Drug-Screenings“ (Patabendige et al., 2013a, Skinner et al., 2009, Smith et al., 2007). Ein weiterer Aspekt, der für porcine Modelle spricht, bezieht sich auf die Kontamination des Modells/Endothel-Layers mit Perizyten, welche sich durch eine Behandlung mit Puromycin deutlich reduzieren, jedoch nicht vollständig vermeiden lässt (Perrière et al., 2005). Bei porcinen Modellen wachsen diese oberhalb des Endothel-Layers, so dass die Barriere durchgängig bleibt (Abbott et al., 1997), während bei Ratten die Perizyten innerhalb des Endothelzell-Layers wachsen und so die Barriere

unterbrochen wird (Parkinson and Hacking, 2005). Zudem spiegeln porcine Zellen die Anatomie, Physiologie und Krankheitsentwicklung in einem höheren Maße wider, als es durch z.B. Nagetier-Modelle möglich ist (Walters et al., 2011). Ein markanter Vorteil gegenüber Nagetier-Modellen ist auch die deutlich höhere Zellausbeute pro durchgeführte Isolation bzw. pro Hirn sowie die gute Verfügbarkeit, da es sich um ein Nebenprodukt der Fleischindustrie handelt. Diese beiden letztgenannten Punkte begünstigen dieses Modell vor allem hinsichtlich ethischer Aspekte. Nachteilig ist jedoch festzuhalten, dass eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf in-vivo-Modelle schwierig sein kann. Grund hierfür ist, dass für in-vivo-Versuche, insbesondere zu Beginn präklinischer Tests z.B. aus Kosten und Tierhaltungsgründen, oftmals auf Nagetiere (Ratten) zurückgegriffen wird. Bezüglich der in-vitro-/in-vivo-Korrelation ist ein Modell aus Rattenzellen folglich vorzuziehen (Molino et al., 2014). Ebenso kam es im Rahmen des Projektes im INcP, in dem diese Arbeit entstand, bei der weiteren in-vivo-Testung von Nanopartikeln zur Verwendung von Ratten als Modellspezies. Mehrfach wissenschaftlich belegt ist die Überlegenheit von in-vitro-BHS-Modellen, die auf Co-Kultivierung von Endothelzellen mit Astrozyten, gelegentlich auch mit Perizyten, beruhen. Gegenüber Mono-Kulturen der gleichen Zelltypen weisen sie in Bezug auf die Ausprägung des BHS-spezifischen Phänotyps und der Barriereigenschaften, wie z.B. mittels TEER-Wert messbar, deutlich bessere Resultate auf (Abbott et al., 2012, Malina et al., 2009). Dennoch wurde bei dieser Arbeit bewusst auf Monokulturen zurückgegriffen, da die Nanopartikel hinsichtlich Aufnahme und Toxizität bei verschiedenen Zelltypen getestet werden sollten. Rückschlüsse auf Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen lassen sich letztlich besser ziehen, wenn diese separat untersucht werden.

Das für diese Arbeit verwendete Protokoll zur Isolation der porcinen Primärzellen beruht im Wesentlichen auf einer von Bowman et. al. (Bowman et al., 1983) beschriebenen Methoden, welche über Jahre modifiziert und etabliert wurde (Helms et al., 2016). Die erfolgreiche Isolation mit entsprechender Spezifität der Zellen konnte durch die Immunfluoreszenzfärbungen mit CD31, Occludin und GFAP durch Herrn Timo Orben nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.5.2. Primärzellen und (Orben, 2020)). Ferner ist darauf hinzuweisen, dass die Zellen einer Isolation immer aus den Hirnen mehrerer Tiere gewonnen wurden und es daher zwischen den Isolationen zu Unterschieden in der Ausprägung der spezifischen Eigenschaften und Morphologie der Primärzellen kommen konnte. Bei den verwendeten C6- Zellen handelt es sich, wie bereits im Stand der Forschung beschrieben, um eine Glioblastom-Zelllinie, die



aus Ratten stammt, welche N,N-Methylnitrosamid ausgesetzt wurden. N,N-Methylnitrosamid führte zu einer Entartung der Astrozyten und der Ausbildung eines Glioblastom. Diese Zelllinie findet in der Forschung bezüglich des ZNS und der BHS häufig Verwendung, da ihre Morphologie denen von Astrozyten ähnelt sowie Astrozyten-spezifische Zellmarker wie GFAP und S-100 nachgewiesen sind (San-Galli et al., 1989). Zudem ist belegt, dass C6-Zellen in der Lage sind, die Barriereintegrität z.B. durch verbesserte Ausbildung von TJs zu erhöhen, wie es durch Astrozyten oder Astrozyten-konditioniertes Medium möglich ist (Raub et al., 1992, Orben, 2020), wobei die Effekte geringer ausfallen können als durch Astrozyten selbst (Boveri et al., 2005). Ein wesentlicher Vorteil dieser Zelllinie stellt jedoch ihre leichte Handhabung hinsichtlich Kultivierung, z.B. durch deutlich erniedrigte Kultivierungszeit gegenüber Primärzellen, und Kryokonservierung dar, welche langjährig erprobt ist, und somit eine gute Verfügbarkeit der Zellen gewährleistet. Sie bieten sich daher an, um als Screening-Tool für Substrate zu dienen, wie es in dieser Arbeit mit Testung aller Nanopartikeln geschehen ist.

Folglich kann die Auswahl der Monokulturen aus porcinen Primärzellen und die Wahl der C6-Zelllinie als Screening-Mittel für diese Arbeit zusammenfassend als geeignet erachtet werden, auch wenn sie die oben erwähnte Schwächen – vor allem bezüglich der Übertragbarkeit auf andere Zellarten und eine schwierige Korrelation zu in-vivo-Versuchen - aufweisen.

### Apparative Messungen

Bei der Analyse mittels Durchflusszytometrie (engl. flow cytometrie (FCM), gelegentlich auch „fluorescence-activated cell scanning“) handelt es sich um ein weit verbreitetes und gut etabliertes Mittel zur Detektion von Zelltypen und fluoreszenzmarkierter Substrate. Diese Methode zur Untersuchung von Einzelzellen in Suspension basiert auf der Analyse von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften, wobei mittels Vorwärtsstreulicht (FCS=Forward Scatter) das Volumen/die Größe und mit Seitwärtsstreulicht (SSC=Side Scatter) die Granularität von Zellen gemessen werden kann. Zeitgleich mit dem Streulicht können dabei auch die Intensitäten von Fluoreszenzfarben (relative Fluoreszenzintensität) detektiert werden (Luttmann et al., 2014). Vorteil dieser Methoden ist die hohe Anzahl gemessener Events pro Durchgang, was zu statistischer Validität führt, zumeist verbunden mit einem niedrigen Zeitansatz. Zudem ist die Eignung zur Beurteilung der Aufnahme und Toxizität von

Nanopartikeln in Zellen mehrfach belegt (Kumar et al., 2011, Ibuki and Toyooka, 2012). Zu Bedenken bei der FCM ist, dass keine eindeutige Identifizierung der Zellen möglich ist, und es bei biologischen Replikaten zu Unterschieden in der Zellmorphologie kommen kann, was bei der Gating-Strategie berücksichtigt werden sollte. Ebenso zeigt sich, dass die Auswertung der Daten stark von der Erfahrung und Ausbildung des Anwenders abhängt und es zu großen interindividuellen Unterschieden kommt, weshalb es Bestrebungen zur Entwicklung standardisierter Protokolle gibt. Zudem kommt es zur Überlappung der Emissionsspektren der Fluorochrome, weshalb bei simultaner Messung von Fluoreszenzen unbedingt eine Kompensation (Color Compensation, siehe Kapitel 4.3.5.) durchzuführen ist und eine entsprechende Wahl der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgen sollte, um die spektrale Überlappung zu korrigieren bzw. zu minimieren (Luttmann et al., 2014). Durch den verwendeten und etablierten Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD, der mit der DNA von apoptotischen oder toten Zellen interkaliert (Höcherl, 2012), können Aussagen zu Effekten der NP auf die Zellvitalität getroffen werden.

Die Konfokale Laser Scannung-Mikroskopie wurde für diese Arbeit als ergänzende Untersuchung für den Nachweis des intrazellulären Vorliegens der NPs gewählt. Es handelt sich dabei um ein weit verbreitetes Verfahren zum Nachweis und zur Darstellung von Zellen sowie der Lokalisation internalisierter Substanzen. Dabei werden Fluoreszenzfarbstoffe mittels Laser mit festgelegter Wellenlänge angeregt, wonach die Emission des Farbstoffes anschließend mit einem Photoverstärker detektiert werden kann. Da es hierdurch möglich ist, die Zellen Ebene für Ebene dreidimensional darzustellen, können intrazelluläre liegende Strukturen erfasst und damit Rückschlüsse auf die Lokalisation des Fluoreszenzfarbstoffes bzw. fluoreszierender Nanopartikel geschlossen werden (Dass, 2010). Als Färbungen wurden für die Zellkerne „Hoechst 33342“ (Thermo Fisher), für die Zellmembran „CellMask Orange“ (life technologies) und für die Lysosomen/Endosomen „Lysotracker deep red“ (life technologies) verwendet, welche sich in vielen Untersuchungen bewährt haben; beispielhaft sei hier auf Hofmann (Hofmann, 2014) verwiesen.

Bei beiden apparativen Untersuchungsmethoden ist abschließend noch darauf hinzuweisen, dass es, auch bei Vorliegen von bewährten Protokollen, immer zu individuellen Fehlern bei Handhabung und Probenvorbereitung kommen kann und die Ergebnisse Untersucher-abhängig sein können. Zudem waren die Stichprobengrößen bei dieser Arbeit sehr gering, wodurch der Nachweis von Signifikanzen relativ schwer

ist und so die Validität der Daten nicht für alle Versuchsansätze nachgewiesen werden kann.

### 6.1.1. Ergebnisse Laser Scanningmikroskopie

Bei der Darstellung der Zellen mittels konfokaler Laser Scanningmikroskopie kam es zu widersprüchlichen Ergebnissen. So konnten mit einem Teil der Partikel in C6 und Astrozyten gut verwertbare Aufnahmen gewonnen werden: so wurde z.B. für die Partikel SS-SDS, PFDL-SDS und PFDL-Tw die intrazelluläre Lokalisation der Nanopartikel in C6 Zellen und für die Partikel PLLA-SDS und SS-Tw die intrazelluläre Lokalisation in Astrozyten sicher nachgewiesen. Die Bilder der Chitosan-Partikel in C6 zeigen im Vergleich zu den anderen Partikeln auffallend mehr tote Zellen in den Ansätzen, was die Ergebnisse der Durchflusszytometrie bezüglich eines möglichen zytotoxischen Effekts stützt. Andererseits wurden auch Bilder der Partikel SS-SDS, PFDL-Tw und PLLA-SDS in Astrozyten und Endothelzellen bei Inkubationszeiten von 4h, 20h und 48h gemacht. Diese Bilder mit Primärzellen stellten sich jedoch als nicht verwertbar heraus. Bei den Astrozyten können zum Teil zwar Zellen nachgewiesen werden, jedoch ist die Qualität der Bilder und dargestellten Fluoreszenzen so schlecht, dass damit keine validen Aussagen getroffen werden können. Ein Anwenderfehler bei der Bedingung des cLSM ist dabei weitestgehend auszuschließen, da die Aufnahmen mit erfahrenerem und geschultem Personal (Dr. Dennis Strand, Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt wurden. Die Versuchsansätze mit porcinen Endothelzellen sind ebenfalls unbrauchbar, da sich bei diesen Aufnahmen lediglich Zelltrümmer nachweisen lassen und sogar Kontaminationen vorlagen. Die Ursache hierfür konnte leider nicht identifiziert werden, und eine Wiederholung der Versuche war aus organisatorischen Gründen nicht möglich. Bei weiterer Verwendung der Partikel für Forschungs- und Entwicklungszwecke wäre folglich eine Verifizierung der intrazellulären Lokalisation in den Primärzellen wünschenswert, ebenso eine Komplementierung bei den C6-Zellen.

## 6.2. Ergebnisse Durchflusszytometrie

### 6.2.1. C6-Gliomzellen

Wie oben bereits beschrieben, handelt es sich bei der Durchflusszytometrie um ein etabliertes und geeignetes Verfahren, um Aussagen zur quantitativen Aufnahme und

Toxizität der Nanopartikel in Zellen zu machen. Bei der zunächst erfolgten Testung bei einer Inkubationszeit von 20h aller zur Verfügung gestellten Nanopartikel an den C6-Zellen zeigt sich ein deutlicher Anstieg der gemessenen Fluoreszenzintensitäten gegenüber den Negativkontrollen. Dabei lassen sich jedoch schon bei Betrachtung dieser einzelnen Inkubationszeit erhebliche Unterschiede bei den Partikeln feststellen, weshalb die NPs nachfolgend im Einzelnen besprochen werden.

### Polystyrol-Nanopartikel

Die beiden getesteten Polystyrol-Partikel zeigen in den C6-Zellen eine gute relative Partikelaufnahme. Die gemessenen Werte liegen dabei für beide Tensid-Variationen des Partikels zwar auf einem ähnlichen Niveau, jedoch zeigt sich bei dem Partikel SS-Tw eine breitere Streuung der Werte als beim Partikel NP SS-SDS, wie die entsprechenden Standardfehler widerspiegeln. Ebenso weisen beide Partikel durch die sehr niedrigen Anteile toter Zellen in den Messungen eine sehr geringe Zytotoxizität auf. Dies deckt sich auch mit Beobachtungen aus anderen Studien (Schunck et al., 2016, Loos et al., 2014, Cabeza et al., 2015). Die Partikel weisen bei der Herstellung sehr gut reproduzierbare Eigenschaften auf und sind auch über längere Zeiträume sehr stabil. Ein weiterer Vorteil ist, dass Frau Dr. Musyanovych, welche die Partikel herstellt, schon seit Jahren mit Polystyrol-NPs arbeitet und entsprechend fest etablierte Protokolle und Erfahrung zu deren Herstellung aufweist, wodurch große Variationen minimiert werden (Musyanovych et al., 2011). Polystyrol-NP sind nicht biologisch abbaubar und können in den Zellen akkumulieren (Fröhlich et al., 2012). In zahlreichen Studien zu diesem Partikel konnte gezeigt werden, dass Polystyrol-NP erfolgreich von Zellen aufgenommen werden, beispielsweise humane Colon-Epithelzellen, und kleine Moleküle in Zellen transportieren kann (Cabeza et al., 2015). Hierbei ist die Aufnahme abhängig von der Zellart, der Partikelgröße, der Form sowie von der Oberflächenbeschaffenheit der NP und deren Hydrophobie (Varela et al., 2012). Die Aufnahme in Lysosomen konnte in Studien nachgewiesen werden, jedoch ist der dahinter liegende Mechanismus nicht vollständig geklärt (Varela et al., 2012, Dos Santos et al., 2011). Aus diesen Gründen bietet sich der Partikel SS-SDS als Referenz-Partikel für diese Arbeit an und wurde entsprechend als solcher für alle Zellversuche genutzt. Der SDS-stabilisierten Polystyrol-Partikel wurde in dieser Arbeit der Tween80-stabilisierten Variante vorgezogen, da sich dieser in anderen Untersuchungen dieser Partikel in C6-Zellen durch unseren Kooperationspartner (Fraunhofer ICT-IMM, Mainz) als leicht überlegen hinsichtlich der Partikelaufnahme

zeigt (Schunck et al., 2016). Dies konnte auch in der ersten für diese Arbeit durchgeführten Messung mit beiden Partikeln beobachtet werden, verdeutlichte sich im Laufe dieser Arbeit (biologische Replikate) jedoch nicht. Zudem konnte in anderen Untersuchungen mit humanen Glioblastomzellen (U-251 MG) gezeigt werden, dass der Partikel SS-SDS im Gegensatz zu SS-Tw nicht zur Aggregation neigt (Onyema, 2016). Daher wurde der NP SS-SDS auch für die Zeitreihe-Versuche in C6-Zellen ausgewählt. Bei der Betrachtung der relativen Aufnahme über alle Inkubationszeiten (Zeitreihe) kann eine kontinuierliche Steigerung der Fluoreszenzintensität, wenn der 20h-Wert vernachlässigt wird, beobachtet werden. Dies deutet an, dass es zu einer anhaltenden Aufnahme der Partikel kommt, deren Rate über einer evtl. stattfinden Ausschleusung liegt. Weiterhin sind über alle Zeitpunkte hinweg gleichbleibend hohe Anteile lebender Zellen nachweisbar, was für die geringe Zytotoxizität des Partikels in diesem Zelltyp spricht. Interessanterweise zeigt sich dieser im Verhältnis niedrigere Wert bei 20h in Versuchen mit dem gleichen Partikel in humanen Glioblastomzellen (U-251 MG) nicht, sondern die Fluoreszenzintensität nach Partikelaufnahme steigt kontinuierlich bis zu einer Inkubationszeit von 20h und erreicht dort ein Plateau (Onyema, 2016).

#### PFDL-Partikel

Bisher gibt es wenig veröffentlichten zu perfluorierten Nanopartikeln, die bezüglich einer Überwindung der BHS getestet wurden. Die Herstellung fluorierter Nanopartikel unterliegt aufgrund der chemischen Eigenschaften der verwendeten Stoffe einigen Schwierigkeiten, jedoch konnten die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PFDL-Partikel erfolgreich mittels Miniemulsionspolymerisation in Anlehnung an eine von Wagner beschriebenen Methode hergestellt werden (Wagner, 2011). Fluorierte wässrige Dispersionen finden in der Textilveredlung zur Herstellung von Schmutzwasser und Ölabweisenden Beschichtungen schon lange Verwendung (Schmidt et al., 1994). Auch in der Medizin kamen fluoridierte Kohlenwasserstoffe aufgrund ihrer Inertheit und Biokompatibilität zum Einsatz (Wagner, 2011). Ein Anwendungsbeispiel hierfür ist Fluosol-DA, welches durch die amerikanische Gesundheitsbehörde FDA für die Gewebeoxygenierung bei perkutanen transluminalen Koronarangioplastien zugelassen ist, sich jedoch im medizinischen Alltag nicht durchsetzen konnte (Bauer, 2013). Für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten PFDL-Partikel, wurde 1H,1H,2H,2H-Perfluorodecylacrylat als Monomer verwendet, die Partikel sind nicht biologisch abbaubar (Quelle: Dr. Musyanovych, Herstellerin der Partikel). Für beide

Variationen des PFDL-Partikels zeigen die Messungen mittels Durchflusszytometrie wesentlich höhere Fluoreszenzintensitäten, im Vergleich zu den Negativkontrollen, insbesondere statistisch signifikant bei 20h Inkubationszeit, wodurch die Aufnahme in die Zellen belegt wird. Ferner liegen die gemessenen relativen Intensitäten vor allem bei 20h Inkubationszeit höher als bei SS-SDS. Dabei deutet sich bei den Versuchsdurchgängen mit diesen Partikeln in C6-Zellen beim Partikel PFDL-Tw bei 20h Inkubation gegenüber der SDS-stabilisierten Variante (PFDL-SDS) eine Überlegenheit an, wobei sich allerdings keine statistische Signifikanz zeigte. Die relative Aufnahme lag hierbei für PFDL-Tw bei ca. dem 4,8-fachen des Referenzwertes (SS-SDS), bei PFDL-SDS lag der Wert bei ca. dem 2,3-fachen. Bei anderen in Untersuchungen mit dem gleichen Partikel in humanen U-251 MG- Zellen zeigen sich Hinweise für Aggregationen dieser NP ähnlich zu dem Partikel SS-Tw, welche bei PFDL-Tw aber nicht nachzuweisen waren (Onyema, 2016). Ebenso interessant ist die Beobachtung bei der Zeitreihe mit PFDL-Tw, dass bei Inkubationszeiten von 32h und 48h ein Rückgang der gemessenen Leuchtintensität zu verzeichnen ist. Dieser Rückgang ist jedoch nicht statistisch signifikant, was eventuell durch die relativ geringe Stickprobengröße bedingt ist. Da der Anteil lebender Zellen aber über alle Inkubationszeiten hinweg konstant bleibt, stellt sich die Frage, wie dieser Abfall zu erklären ist. Denkbar wäre, dass es entweder zu einem Ausschleusen der Partikel aus den Zellen kommt, wie es bei U 251 MG-Zellen für den Partikel PFDL-Tw gezeigt werden konnte (Onyema, 2016). Aufgrund der dreimaligen Durchführung der Versuchsreihe, wobei auch unterschiedliche Chargen des Partikels verwendet wurden, ist nicht von einer zufälligen Beobachtung auszugehen. Ebenso konnte für vergleichbare Partikel eine Aufnahme in HeLa und MSC- Zellen nachgewiesen werden. Auch hier waren keine toxischen Effekte auf die Zellen nachweisbar (Wagner, 2011).

### PLLA-Partikel

Es wurden ebenfalls zwei biologisch abbaubare Partikel mit dem Polymer Poly(L-Lactid) getestet, einer mit SDS und der andere mit Tween80 stabilisiert. Der Anteil toter Zellen, und damit die Toxizität, beider Partikel ist auf einem ähnlich geringen Niveau wie bei SS-SDS und den Negativkontrollen. Beide Partikel zeigen höhere Leuchtintensitäten bei 20h als die Negativkontrollen und Partikel SS-SDS, was für eine Internalisierung der PLLA-Partikel in die Zellen spricht. Insbesondere der Partikel PLLA-SDS zeigt hierbei mit ca. dem 18-fachen massiv höhere Werte als SS-SDS (=1)

oder als PLLA-Tw mit ca. dem 1,4-fachen Wert für die relative Aufnahme. Aufgrund dessen wurde dieser Partikel für die Zeitreihen ausgewählt. Es zeigt sich für diesen Partikel, dass die Aufnahme bis zu Inkubationszeiten von 32h kontinuierlich ansteigt. Ein Abfall der gemessenen Fluoreszenzintensität ist lediglich bei einer Inkubationszeit von 48h zu beobachten, wobei die Toxizität über alle Zeitansätze konstant niedrig bleibt. Hier stellt sich folglich - ebenso wie bei PFDL-Tw - die Frage, ob die Partikel wieder aus der Zelle herausgeschleust werden. Auffällig beim Partikel PLLA-SDS ist, dass bei den Messergebnissen eine markant höhere Streuung der Werte auftritt als bei allen anderen Partikeln. Dieser Effekt scheint zudem mit wachsender Inkubationszeit zu-zunehmen. Poly-(L-Lactid) ist in der Forschung seit Jahren gerade wegen seiner Bioabbaubarkeit und Biokompatibilität (Mehta et al., 1994) von Interesse und zeigt bei in-vitro wie auch in-vivo Versuchen durchaus positive Ergebnisse, wie bspw. den erfolgreichen Transport von Loperamid-beladenen PLLA-Partikeln über die BHS in Mäusen (Fornaguera et al., 2015). PLLA wird abgebaut zu L-Milchsäure (L-lactid-acid), ein physiologisch anfallendes Abbauprodukt im menschlichen Körper. Es wird vermutet, dass diese dann über den Citratzyklus zu Wasser und CO<sub>2</sub> abgebaut wird, hierbei scheinen größere Objekte aus PLLA schneller abgebaut zu werden als kleinere Objekte mit einer verhältnismäßig größeren Oberfläche zum Volumen (Barthel et al., 2014). Für die Aufnahme von PLLA-NP scheint das verwendete Tensid von größerer Bedeutung zu sein als das Molekulargewicht wie in HeLa- und Jukat-Zellen gezeigt werden konnte. Dabei zeigt sich eine bessere Aufnahme in die Zellen, wenn SDS als Tensid verwendet wurde. Zeitgleich scheinen mit SDS stabilisierte Partikel aber schnelleren Abbau des Polymers zu führen (Musyanovych et al., 2008). Interessanterweise zeigen sich bei Untersuchungen mit den gleichen Partikeln in humanen Glioblastomzellen eine niedrigere relative Aufnahme als bei den PFDL-Partikeln, die Beobachtungen bei den PFDL- und den PLLA-Partikeln waren hier genau konträr (Onyema, 2016). Es wäre daher zu überlegen, ob die Schwankungen bei den Fluoreszenzintensitäten durch einen vorzeitigen Abbau der Partikel sowohl vor den Experimenten (Lagerung) oder auch währenddessen (Zellen) erklärt werden können. Da aber die Durchflusszytometrie sehr gute Werte bezüglich der Partikelaufnahme und -toxizität zeigt, steht dies dennoch im Einklang mit den positiven Erfahrungen der oben genannten anderen Untersuchungen, vor allem weil dieser Effekt bei den Primärzellversuchen so nicht beobachtet werden konnte.

## PBCAOreg488-SDS

Da es Probleme bei der Synthese der zuerst zur Verfügung gestellten PBCA-Partikel (als PBCA-SDS und PBCA-Tw bezeichnet) gab, wurden diese durch den Partikel PBCAOreg488-SDS ersetzt, um auch ein auf diesem Polymer basierendes Partikel untersuchen zu können. PBCA ist hinsichtlich der Entwicklung von Wirkstoffträgersysteme zur Überwindung der BHS in der Forschung von großen Interesse (Dausend, 2009). Zudem finden Poly(cyanoacrylat) schon länger in der Medizin Anwendung als Klebstoffe vor allem in der Versorgung von Schnitt- oder Kopfplatzwunden (Vauthier et al., 2003, Lang, 2011). Generell ist PBCA ein bioabbaubares Polymer, welches selbst nicht toxisch ist, dessen Abbauprodukte n-Butanol und Polycyanacrylsäure jedoch toxische Effekte haben (Dausend, 2009, Weiss et al., 2007). Dabei scheint die Toxizitätsrate von der Länge der Polymerkette und damit des Molekulargewichtes abhängig zu sein, da die Hydrophilie und damit die Abbaurrate von PBCA mit Abnahme der Kettenlänge steigt wie in Jurkat- und HeLa-Zellen gezeigt wurde (Weiss et al., 2007). Die intrazelluläre Aufnahme von PBCA, die Nutzung als Trägersystem und ein intrazellulärer Abbau wurden vielfältig nachgewiesen (Kreuter et al., 1995, Tomcin, 2014). Zum einen zeigt sich für den Partikel PBCAOreg488-SDS bei 20h Inkubation nur eine sehr geringe relative Aufnahme von 15% im Vergleich zu SS-SDS, jedoch ohne statistische Signifikanz. Zum anderen lag der Anteil lebender Zellen dabei lediglich bei ca. 30%. Dies lässt auf einen augenscheinlichen zytotoxischen Effekt dieser Partikel auf C6-Zellen schließen, auch wenn sich eine statistische Signifikanz dieses Effektes nur bei einem Vergleich mit dem Partikel SS-Tw nachweisen lässt. Auch in der Literatur finden sich sehr unterschiedliche Ergebnisse mit PBCA-Partikeln, weshalb dies eine interessante Beobachtung ist. So gibt es einerseits Versuchsreihen, bei denen sich keine zytotoxischen Effekte und eine gute Aufnahme in die HeLa-, MSC- und MFC-7-Zellen zeigte (Kreuter et al., 1995, Tomcin, 2014), andererseits werden genau solche toxischen Effekte, wobei es auch Unterschiede bei verschiedenen Zelllinien gibt, beobachtet (Olivier et al., 1999, Voigt et al., 2014). Dies veranschaulicht dennoch, wie wichtig die spezifische Testung jedes einzelnen Partikels ist, der für weitere Forschung und Entwicklung hinsichtlich neuer Pharmaka infrage kommt, da die Modifikationen polymerer Partikel zu massiven Variationen führen können. Aufgrund der geringen Aufnahme und der offensichtlichen Toxizität von PBCAOreg488-SDS wurde dieser nicht für weitere Versuche mit C6-Zellen und Primärzellen berücksichtigt.



## Chitosan-Partikel

Chitosan ist ein bioabbaubares Polymer, für welche eine niedrige Toxizität beschrieben wird. Aufgrund seiner Biokompatibilität ist es in der medizinischen Forschung hinsichtlich der Nutzung als Wirkstoffträgersystem von großem Interesse und eine intrazelluläre Aufnahme durch Endozytose ist nachgewiesen (Jiang et al., 2017). Die Toxizität von Chitosan ist abhängig vom Molekulargewicht und dem Grad der Deacetylation, da diese das  $\zeta$ -Potential beeinflussen wie in Versuchen mit A549-Zellen gezeigt werden konnte (Huang et al., 2004). Ein Abbau findet in Lysosomen und späten Endosomen statt (Jiang et al., 2017). Die Partikel Chi-SDS und Chi-Tw wurden beide einmalig mittels Durchflusszytometrie bei einer Inkubationszeit von 20h getestet. Da sie dabei aber nur eine sehr geringe relative Aufnahme im Vergleich zu SS-SDS sowie leicht erhöhte Anteile toter Zellen zeigen und es auch hier bei der Synthese zu Engpässen kam, wurden diese Partikel von weiteren Versuchen ausgeschlossen. Interessanterweise zeigten sich in anderen Versuchen mit Monokulturen aus MDCKII-MDR1 und C6-Gliomzellen, dass die dort verwendeten Chitosan-Nanopartikel zwar in die Zellen, vor allem MDCKII-MDR1, aufgenommen werden und dort Wirkstoffe (Methotrexat) freisetzen können, jedoch zeigten sich hier zytotoxische Effekte der unbeladenen Chitosan-NP auf C6-Gliomzellen (Trapani et al., 2011). Trapani et al. vermuten als Ursache hierfür Wechselwirkungen mit negativ geladenen Komponenten der Zellmembran. Andererseits wurden in vielfältigen Studien die erfolgreiche Verwendung, hinsichtlich intrazellulärer Aufnahme und niedriger Toxizität, von auf Chitosan basierenden Nanopartikel in unterschiedlichsten Zelllinien in vitro und bei in-vivo-Versuchen, darunter auch C6-Gliomzellen und Gliome bei Ratten, nachgewiesen (Gao et al., 2013, Ma and Lim, 2003, Xu et al., 2017, Aderibigbe and Naki, 2019). Daher sind die hier beschriebenen Beobachtungen überraschend und sollten in weiteren Untersuchungen reevaluiert werden.

Da die drei Partikel SS-SDS, PFDL-Tw und PLLA-SDS auch in den Zeitreihen mit C6-Zellen sehr gute Werte bezüglich der Aufnahme in die Zellen zeigten, wurden alle drei als geeignet betrachtet, um in den Primärzellen getestet zu werden. Nichtsdestotrotz ist darauf hinzuweisen, dass sich auch der Partikel PFDL-SDS, aufgrund der bei den biologischen Replikaten beobachteten leichten Überlegenheit gegenüber PFDL-Tw durchaus für weitere Testungen anbietet. Ebenso zeigte der Partikel PLLA-Tw, auch wenn seine Werte unterhalb der von PLLA-SDS lagen, dass er ebenfalls Potential für

weitere Versuche birgt, da seine relative Aufnahme auch oberhalb der von SS-SDS lag und er gleichzeitig eine niedrige Toxizität aufwies.

### 6.2.2. Primärzellen

Die Testung der Partikel SS-SDS, PFDL-Tw und PLLA-SDS erfolgte unter möglichst gleichwertigen Bedingungen wie bei den C6-Zellen. Modifikationen, die auf Zellkulturbedingten Notwendigkeiten beruhen (bspw. die Verwendung eines anderen Kulturmediums bei den Endothelzellen), wurden möglichst geringgehalten, um systematische Fehler zu minimieren und eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Die Limitierung auf lediglich drei verschiedene Inkubationszeiten ist der schlechteren Zellverfügbarkeit (als bei C6-Zellen) zu verschulden, da durch die zeit- und arbeitsintensive Isolation immer nur eine begrenzte Anzahl an Zellen bereitgestellt werden konnte.

#### SS-SDS

Bei den Astrozyten zeigt sich für den Partikel SS-SDS, dass deutlich höhere Fluoreszenzintensitäten messbar sind als in den Negativkontrollen (NKs), weshalb von einer Aufnahme in die Zellen ausgegangen werden kann. Zudem zeigen sich durchgängig Anteile lebender Zellen auf einem gleichwertigen Niveau zu den NKs, was gegen eine zytotoxische Wirkung des Partikels auf die Astrozyten spricht. Während bei der relativen Aufnahme bei der Inkubationszeit von 20h im Vergleich zu 4h noch eine Steigerung zu verzeichnen ist, scheint der Wert bei längerer Inkubation (48h) jedoch auf dem 20h-Niveau zu stagnieren. Hier lassen sich Parallelen zu den Ergebnissen mit diesem Partikel in humanen Glioblastomzellen (U-251 MG) ziehen, wo ebenfalls nach 20h ein Plateau erreicht wird (Onyema, 2016). Jedoch zeigen sich innerhalb der Zeitreihe zwischen den gemessenen Fluoreszenzintensitäten keine statistisch signifikanten Unterschiede. Für 4h Inkubationszeit lässt sich jedoch ein Unterschied zu den Negativkontrollen nachweisen. Ebenso zeigt sich, dass es bei den Astrozyten signifikant schneller zum Erreichen der maximalen gemessenen Fluoreszenzintensität kommt, was die höheren relativen Aufnahme bei Astrozyten bei 4h und 20h Inkubationszeit widerspiegelt. Bei den Endothelzellen liegen die Werte der relativen Aufnahmen bei Inkubationszeiten von 4h und 20h auf einem ähnlichen Level. Bei einer Inkubationszeit von 48h deutet sich sogar ein leichter Rückgang der gemessenen Leuchtintensitäten an. Der Anteil der lebenden Endothelzellen bleibt bei allen drei Messpunkten ähnlich wie bei den Negativkontrollen. Zu erwähnen ist, dass

bei den Endothelzellen der Anteil toter Zellen bei 48h Inkubationszeit leicht zunimmt - dies ist jedoch in allen Versuchen mit dieser Zellart (auch den NKs) zu beobachten. Im Vergleich zu den C6-Zellen scheinen die relative Aufnahme von SS-SDS in den Primärzellen früher ihr Maximum zu erreichen. Im Falle der Endothelzellen deutet sich sogar ein leichter Rückgang der Leuchtintensität an, was für eine Ausschleusung der Partikel aus den Zellen bei langer Inkubation sprechen kann, wie sie auch durch Onyema in U-251-MG-Zellen beschrieben werden (Onyema, 2016). Allerdings müssten für valide Aussagen diesbezüglich weitere Wiederholungen und womöglich Tests mit noch längeren Inkubationszeiten für diesen Partikel durchgeführt werden, da sich lediglich im Vergleich zwischen den Zellreihen signifikante Unterschiede nachweisen lassen, was innerhalb der Zeitreihe mit Endothelzellen nicht möglich ist.

#### PFDL-Tw

Beim Partikel PFDL-Tw zeigt sich bei allen drei Inkubationszeiten durch signifikant höhere Werte als bei den Negativkontrollen, dass der Partikel sowohl in Astrozyten als auch in Endothelzellen aufgenommen wird und keine Anzeichen für zytotoxische Effekte erkennen lässt. Interessant ist, dass sich das Aufnahmeverhalten der Zellen jedoch unterscheidet. Die relative Aufnahme in Astrozyten nach 4h Inkubation liegt auf einem vergleichbaren Niveau mit dem Partikel SS-SDS. Bei einer Inkubation von 20h und 48h zeigt sich mit über 200% jedoch eine deutliche Zunahme aufgenommener Partikel im Verhältnis zu SS-SDS. Anders stellt sich die Aufnahme in Endothelzellen dar. Während hier bereits nach 4h eine relative Aufnahme von >400% zu sehen ist, welche bei 20h sogar auf >500% steigt, deutet sich auch hier wie bei SS-SDS bei einer Inkubationszeit von 48h ein leichter Rückgang der gemessenen Leuchtintensität an, wobei die Toxizitätswerte stabil bleiben. Im Gegensatz zu den Werten bei Astrozyten lassen sich für diese Unterschiede innerhalb der Zeitreihe bei den Endothelzellen jedoch keine statistischen Signifikanzen nachweisen, sie sind folglich nur als Tendenz zu werten. Diese Unterschiede bei den beiden Zelltypen können, entsprechende Bestätigung vorausgesetzt, von großem Interesse in weiteren Untersuchungen sein. So wäre es denkbar, dies bei der Entwicklung von pharmakologischen Nanoträgern zu nutzen, wenn eine stärkere Aufnahme des Wirkstoffes in Endothelzellen gewünscht ist. Vor allem scheint der Partikel in unserem Modell gut biokompatibel zu sein und zeigt die höchste relative Aufnahme in Endothelzellen bei ebenfalls hoher Aufnahme in Astrozyten.

## PLLA-SDS

Auch für den Partikel PLLA-SDS kann eine Aufnahme in beide Primärzellarten gezeigt werden. Bei den Astrozyten ist eine kontinuierliche Steigerung mit zunehmender Inkubationszeit zu sehen. Das Niveau liegt dabei schon nach nur 4h fast doppelt so hoch wie bei SS-SDS und steigt bei 48h auf ein Maximum von über 350%. Jedoch lassen sich bedingt durch die großen Messwert-Streuung bei diesem Partikel innerhalb der Zeitreihe nur schwer statistische Signifikanzen nachweisen, während dies zwischen den Partikeln und zwischen den Zellarten durchaus möglich ist. Zudem bleibt der Anteil toter Zellen in den Versuchsansätzen auf einem konstant niedrigen Level vergleichbar den Negativkontrollen. Es gibt folglich keine Hinweise auf zytotoxische Effekte des Partikels auf die Astrozyten bei gleichzeitig höchster relativer Aufnahme aller drei Partikel in diesen Zelltyp. Anders verhält es sich mit den Endothelzellen. Hier zeigt sich ein ähnlicher Verlauf mit den Zeitreihen-Messwerten wie bei SS-SDS in diesem Zelltyp bei Werten, die zudem in einem ähnlichen Rahmen liegen wie bei SS-SDS. Folglich ist hier bei einer Inkubationszeit von 48h ebenso ein leichter Rückgang der gemessenen Fluoreszenzintensität zu beobachten. Im Gegensatz zum Partikel SS-SDS ist aber für diesen Zeitansatz eine Zunahme auf über 25% an toten Zellen in der Population zu verzeichnen, wobei die Streuung der Werte jedoch höher ausfällt als bei SS-SDS. Dies lässt vermuten, dass PLLA-SDS toxische Effekte auf die verwendeten Endothelzellen haben könnte. Aber auch ein intrazellulärer Abbau der Zellen ist möglich, da Polylaktid durch enzymatische Spaltung abgebaut werden kann. Als Pendant zu PFDL-Tw in Endothelzellen könnte PLLA-SDS genutzt werden, wenn eine stärkere Partikelaufnahme in Astrozyten gewünscht ist.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Partikel PFDL-Tw und PLLA-SDS eine höhere Aufnahme in Primärzellen aufweisen als SS-SDS. Daher bieten sich diese beiden Partikel für weitere Testungen z.B. an Ko-Kultur-Modellen der BHS oder auch für in-vivo-Versuche an, um ihr Potential als Nanoträger zur Überwindung dieser Barriere weiter zu eruieren (Bechinger, 2020, Orben, 2020).

Bei Betrachtung der Ergebnisse wird deutlich, wie wichtig die Testung der einzelnen Partikel an den verschiedenen Zelltypen ist, ebenso wie die Wahl der Modell-Zellen von Bedeutung ist, wenn man zytotoxische Effekte durch individuelle Unterschiede der Partikel beim Menschen verhindern möchte. Hierbei scheint es auch eine Rolle zu spielen, für welches Tensid man sich entscheidet, wie die von Schunck et al.

beschriebenen Unterschiede zwischen SDS- und Tween80-stabilisierten NPs in C6-Gliomzellen und humanen U251-MG-Zellen zeigen. Bei diesen Experimenten wurden Unterschiede zwischen dem tierischen Ursprung der Zellen auffällig, da SDS-stabilisierte NP von C6-Gliomzellen und Tween80-stabilisierte NP von den U251-MG-Zellen besser aufgenommen (Schunck et al., 2016). Daher bestätigt sich auch hier, dass die Wahl von porcinen Zellen aufgrund der physiologischen Nähe zum Menschen vorteilhaft ist.

### 6.2.3. Fazit hinsichtlich der Fragestellung

Nach Betrachtung der gewonnenen Daten und deren Bewertung in Zusammenschau können die eingangs aufgetretenen Fragestellungen wie folgt beantwortet werden:

- I. Eignen sich C6-Gliomzellen zur Selektion von Blut-Hirnschranke-gängigen NP bezüglich Aufnahmekinetik und Toxizität?

Die C6-Zellen eignen sich durchaus, um eine Vorauswahl an Partikeln für eine weitere Testung an Primärzellen zu treffen. Es werden alle drei ausgewählten Partikel in beide Primärzelltypen aufgenommen. Hinsichtlich der Toxizität der Partikel in den verschiedenen Zelltypen zeigen sich Unterschiede insbesondere bei PLLA-SDS, auch wenn diese nicht statistisch signifikant sind. Dieser führte bei den Endothelzellen zu einem deutlich höheren Anteil toter Zellen als bei C6-Gliomzellen und Astrozyten. Bei der relativen Aufnahme zeigten sich ebenfalls deutliche Unterschiede. So entsprachen die Verläufe der Aufnahmekinetik bei Astrozyten weitestgehend denen bei C6-Gliomzellen. Nicht so jedoch bei den Endothelzellen. Hier verhalten sich die Partikel PFDL-Tw und PLLA-SDS gegensätzlich zu den Versuchen mit C6-Gliomzellen und Astrozyten. In Endothelzellen wurde der Partikel PFDL-Tw in ähnlichem Maße wie in Astrozyten aufgenommen, lag mit der relativen Aufnahme jedoch über PLLA-SDS, welcher deutlich unter dem Niveau von den Versuchen mit PLLA-SDS in C6-Gliomzellen und Astrozyten lag. Vor allem konnte hierbei auch zwischen der relativen Aufnahme von PLLA-SDS in die C6-Gliomzellen und in die Endothelzellen eine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Daher kann man schlussfolgern, dass sich die C6-Gliomzellen als first-line Screening-Tool für Astrozyten eignen. Für Endothelzellen scheint es nur eine bedingte Eignung aufzuweisen. Wobei eine generelle Aufnahme in die Partikel nachgewiesen werden konnte, die sich lediglich in

ihrer Ausprägung unterscheidet, und es lediglich bei einem von drei getesteten NP zu Differenzen bezüglich der Toxizität bei langen Inkubationszeiten (48h) kam.

- II. Zeigen sich bei Astrozyten und bei zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Schweinehirn vergleichbare Werte bezüglich zeitlicher Kinetik der Aufnahme und Toxizität der vorselektionierten NPs wie bei C6-Gliomzellen?

Für alle drei Partikel konnte die Aufnahme sowohl in Endothelzellen als auch in Astrozyten in biologischen Replikaten nachgewiesen werden. Jedoch weisen die Partikel in den verschiedenen Zelllinien teilweise unterschiedliche zeitliche Kinetiken bezüglich der Aufnahme auf. Dies lässt sich vor allem an den Partikeln PFDL-Tw und PLLA-SDS veranschaulichen. Erster zeigt in C6-Zellen und Astrozyten einen vergleichbaren zeitlichen Verlauf auf einem ähnlichen Niveau der Werte, während die Werte in Endothelzellen (im Vergleich zum Referenzpartikel) deutlich höher liegen. Zweiterer präsentiert sowohl in C6 wie auch in Astrozyten die jeweils höchste relative Aufnahme der drei getesteten Partikel, jedoch in Astrozyten auf einem leicht niedrigeren Niveau, welches letztlich bei Endothelzellen noch weiter sinkt. Insgesamt zeigen sich hierbei für die Partikel keine signifikanten Abweichungen bezüglich der Toxizität. Lediglich bei dem Partikel PLLA-SDS in Endothelzellen sollte dies für lange Inkubationszeiten ( $\geq 48h$ ) nochmals überprüft werden. Es konnte folglich reproduzierbar eine Zellverträglichkeit der Partikel demonstriert werden, und sie bieten sich daher für weitere Forschungen an der BHS an. Dennoch sollte auch eine Testung an Astrozyten und Endothelzellen erfolgen, um aufgrund der Unterschiede bei der Aufnahme der Partikel, diese optimal einsetzen zu können.

- III. Unterscheiden sich die selektionierten und untersuchten NPs hinsichtlich ihrer Aufnahme und Toxizität?

Die Nanopartikel unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Aufnahme und Toxizität. Bereits in den Versuchen zur Selektion der NPs mittels Testung in C6-Gliomzellen zeigen sich deutliche Unterschiede der verschiedenen Partikel sowohl bei der Aufnahme wie auch der Toxizität. Als markanteste Beispiele aus den Versuchen seien hier zum einen die PBCA-Partikel erwähnt, welche deutliche toxische Effekte auf die C6-Zellen zeigen, und zum anderen die Chitosan-Partikel, welche bezüglich der Aufnahme eine schlechte Performance präsentieren. Dabei scheinen nicht nur die verwendeten Polymere, sondern auch die verwendeten stabilisierenden Tenside Einfluss zu

nehmen. Dies wird sehr eindrücklich bei den PLLA-Partikeln demonstriert, wo die Twen80-stabilisierte Variante eine deutlich niedrigere Aufnahme in die Zellen zeigt als die SDS-stabilisierte Variante. Aufgrund der langjährigen Erfahrung und der nachgewiesenen Aufnahme wurde der Partikel SS-SDS als Referenz gewählt und entsprechend auch in den Primärzellen getestet. Die Partikel PFDL-Tw und PLLA-SDS zeigen eine sehr gute relative Aufnahme in C6-Zellen bei gleichzeitigem Fehlen von Zytotoxizität. Daher wurden auch sie als geeignet zur Testung in Astrozyten und Endothelzellen angesehen. Im Vergleich der drei NP in den drei Zellarten werden Unterschiede in der Aufnahmekinetik aufgedeckt, während sich bezüglich der Toxizität keine signifikanten Unterschiede beschreiben lassen. So scheinen PFDL-Tw und PLLA-SDS generell eine bessere Aufnahme in die Primärzellen aufzuweisen als SS-SDS, zwischen Endothelzellen und Astrozyten zeigen sich jedoch Differenzen. So liefert PLLA-SDS die beste relative Aufnahme in Astrozyten, ähnlich wie es in C6-Gliomzellen der Fall war. PFDL-Tw präsentiert in den zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen jedoch die besseren Werte und scheint hier überlegen zu sein. Insgesamt erweisen sich SS-SDS, PFDL-Tw und PLLA-SDS als geeignet für Versuche an den Primärzellen und bieten sich zur Verwendung für weitere Forschung an der BHS an. Sollten sich insbesondere für PFDL-Tw und PLLA-SDS z.B. bei Versuchen in Ko-Kulturmodellen oder in-vivo-Versuchen zur Biodistribution weiterhin positive Ergebnisse zeigen, wären diese beiden Partikel geeignete Kandidaten bei der Entwicklung von Wirkstoff-Nanoträgern zur Überwindung der BHS und könnten damit in der Pharmakotherapie beispielsweise neurodegenerativer Erkrankungen Verwendung finden. Zudem könnten auch die Partikel SS-Tw, PFDL-SDS und PLLA-Tw ausführlicher getestet werden, da sich auch bei ihnen keine massiven toxischen Effekte in C6-Gliomzellen zeigen und z.B. die Ergebnisse von PFDL-Tw zeigen, dass sich ihre Aufnahme in Astrozyten und Endothelzellzellen durchaus besser sein kann als in C6-Gliomzellen.

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene polymere Nanopartikel-Variationen hinsichtlich ihrer Aufnahme und möglicher toxischer Effekte an C6-Gliomzellen sowie porcinen Astrozyten und zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen getestet. Ziel hierbei war es, jene Partikel zu identifizieren, die sich für weitere Untersuchungen im Bereich von BHS-Modellen und eine mögliche Entwicklung von pharmakologischen Wirkstoff-Trägersystemen anbieten. Hierfür wurden insgesamt sieben Partikel mit den Polymeren Polystyrol, Perfluorodecylacrylat, Poly(L-Laktid) und Poly(butylcyanoacrylate), die entweder mit dem Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Tween 80 (Tw) stabilisiert wurden, ausführlich untersucht. Es erfolgte dabei zunächst eine Bewertung aller Partikel in Monokulturen von C6-Gliomzellen mittels Durchflusszytometrie. Teilweise erfolgte ergänzend eine Untersuchung mittels konfokaler Laser Scanningmikroskopie (cLSM). Dabei konnten die Partikel SS-SDS, PFDL-Tw und PLLA-SDS identifiziert werden, die aufgrund ihrer guten Aufnahme in die C6-Gliomzellen und dem Fehlen jeglicher Hinweise auf Toxizität als aussichtsreiche Kandidaten zur Testung an porcinen Primärzellen angesehen wurden. Die Versuche an Primärzellen wurden ebenfalls in separaten Monokulturen von Astrozyten und zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen durchgeführt und durchflusszytometrisch beurteilt. Auch hier erfolgte ergänzend eine Beurteilung der Partikelaufnahme mittels Aufnahmen am cLSM, welche jedoch leider nur sehr bedingt auswertbar waren. Trotzdem zeigte sich anhand der durchflusszytometrischen Daten, dass alle drei NP in die Primärzelltypen aufgenommen werden, und es keine Hinweise auf massive toxische Effekte gibt. Lediglich bei PLLA-SDS in Endothelzellen zeigte sich eine steigende Toxizität bei langer Inkubationszeit (48h). Ebenso gab es Abweichungen der Aufnahmekinetik in Endothelzellen mit allen 3 NP gegenüber den Werten bei C6-Gliomzellen. Folglich eignen sich C6-Gliomzellen vor allem als Modell für die Astrozyten, während sie als first-line Screening-Tool für Endothelzellen bedingt geeignet sind. Insgesamt können sie jedoch als geeignet für die Selektion von NP betrachtet werden. Bei der Aufnahmekinetik zeigen sich Unterschiede zwischen den Zellarten und den Partikeln, alle drei selektionierten NP werden aber auch von Astrozyten und zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen aufgenommen. Dabei zeigten PFDL-Tw und PLLA-SDS gegenüber dem SS-SDS deutliche höhere Aufnahmeraten in die Zellen. PFDL-Tw scheint hierbei für Endothelzellen als Zielstruktur und PLLA-SDS für Astrozyten als Zielstruktur überlegen zu sein, wobei



gleichzeitig auch die Aufnahme in die jeweils andere Zellart gegeben ist. Diese beiden bieten sich also für weitere Untersuchungen an. Denkbar wären hier sowohl Studien zu BHS-Modellen (z.B. Transwell-Co-Kultur-Modellen) (Orben, 2020), da eine Aufnahme in porcine Primärzellen nachgewiesen ist, als auch für in-vivo-Versuche, um genauere Aussagen zu ihrer Biodistribution treffen zu können (Bechinger, 2020).

## 7. Anhang

Im Anhang sind die für die Ergebnisdarstellung ermittelten Daten in Form von Tabellen mit der deskriptiven Statistik dargestellt. Aus ihnen können die verwendeten Mittelwerte und Standardfehler entnommen werden.

1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Partikel	7-SS-SDS	8-SS-Tw	9-PFDL-SDS	10-PFDL-Tw	11-PLLA-SDS	12-PLLA-Tw	13-PBCAOrig488-SD	14	15-NK
Mean	--	--	--	--	Mean	1,0000	1,0184	2,3114	4,8778	Mean	18,5326	1,4081	0,1570	0,0752
Median	--	--	--	--	Median	1,0000	1,2649	2,3649	5,9422	Median	25,6439	1,5895	0,1623	0,0678
Std.Dev	--	--	--	--	Std.Dev	0,0000	0,4100	0,0946	1,9317	Std.Dev	14,2306	0,3146	0,0303	Indefinite
95% Conf	--	--	--	--	Std.Err	0,0000	0,2483	0,0546	1,1152	Std.Err	8,2160	0,1317	0,0175	0,0000
99% Conf	--	--	--	--	95% Conf	0,0000	1,0660	0,2345	4,7885	95% Conf	35,2767	0,7799	0,0751	0,0648
Size	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	99% Conf	0,0000	2,4383	0,5342	10,9081	99% Conf	80,3600	1,7767	0,1711	0,1016
Total	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Total	6,0000	3,0951	6,9342	14,5433	Total	55,5979	4,2443	0,4711	6,0000
Min					Min	1,0000	0,5218	2,2022	2,1674	Min	2,1481	1,0488	0,1244	0,0000
Max					Max	1,0000	1,2684	2,3671	5,9837	Max	27,8059	1,5900	0,1843	0,0000
Min.Pos					Min.Pos	1,0000	0,5218	2,2022	2,1674	Min.Pos	2,1481	1,0488	0,1244	0,0000
Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	Other	8,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Other	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zur Aufnahme von SS-SDS, SS-Tw, PFDL-SDS, PLLA-SDS, PLLA-Tw und PBCAOrig488-SDS in C6-Gliomzellen bei 20 h Inkubationszeit

1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-1h	8-2h	9-4h	10-8h	11-16h	12-20h	13-32h	14-48h
Mean	--	--	--	--	Mean	0,2451	0,2921	0,3115	0,3516	Mean	0,4899	0,3303	0,5782
Median	--	--	--	--	Median	0,2119	0,2628	0,3656	0,4513	Median	0,5442	0,3615	0,5459
Std.Dev	--	--	--	--	Std.Dev	0,1106	0,1465	0,1035	0,1209	Std.Dev	0,1682	0,0867	0,2504
95% Conf	--	--	--	--	Std.Err	0,0639	0,0846	0,0632	0,0698	Std.Err	0,0971	0,0500	0,1446
99% Conf	--	--	--	--	95% Conf	0,2743	0,3831	0,2714	0,2596	95% Conf	0,4170	0,2149	0,6207
Size	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	99% Conf	0,6248	0,8272	0,6183	0,6525	99% Conf	0,9499	0,4955	1,4140
Total	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Total	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	Total	3,0000	3,0000	3,0000
Min					Min	0,7354	0,8764	0,9346	1,1449	Min	1,4698	0,9908	1,7346
Max					Max	0,1549	0,1626	0,1853	0,2421	Max	0,3013	0,2323	0,3455
Min.Pos					Min.Pos	0,3686	0,4511	0,3807	0,4515	Min.Pos	0,6243	0,3970	0,6432
Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Missing	0,1549	0,1626	0,1853	0,2421	Missing	0,3013	0,2323	0,3455
Other	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	Other	8,0000	8,0000	8,0000	8,0000	Other	0,0000	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zur Aufnahme von SS-SDS in C6-Gliomzellen zu allen 8 Inkubationszeiten

1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-1h	8-2h	9-4h	10-8h	11-16h	12-20h	13-32h	14-48h
Mean	--	--	--	--	Mean	0,2687	0,3200	0,4138	0,3811	Mean	0,6267	0,6947	0,8250
Median	--	--	--	--	Median	0,2733	0,3072	0,2730	0,3073	Median	0,8990	2,1499	1,1369
Std.Dev	--	--	--	--	Std.Dev	0,1680	0,2327	0,3912	0,2686	Std.Dev	0,5723	0,9901	0,3389
95% Conf	--	--	--	--	Std.Err	0,0970	0,1286	0,2288	0,1551	Std.Err	0,3304	0,5716	0,1899
99% Conf	--	--	--	--	95% Conf	0,4164	0,5521	0,9697	0,6668	95% Conf	1,4186	2,4545	0,8152
Size	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	99% Conf	0,9485	1,2576	2,2089	1,5166	99% Conf	3,2317	5,5912	1,8571
Total	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Total	8,0000	3,0000	3,0000	3,0000	Total	3,0000	3,0000	3,0000
Min					Min	0,8051	0,9601	1,2415	1,1432	Min	2,4800	5,0842	1,8333
Max					Max	0,0985	0,1040	0,1126	0,1571	Max	0,2216	0,5589	0,2344
Min.Pos					Min.Pos	0,4343	0,5489	0,8559	0,6788	Min.Pos	1,3593	2,3754	0,8544
Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Missing	0,0985	0,1040	0,1126	0,1571	Missing	0,0000	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	Other	8,0000	8,0000	8,0000	8,0000	Other	0,0000	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zur Aufnahme von PFDL-Tw in C6-Gliomzellen zu allen 8 Inkubationszeiten

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-1h	8-2h	9-4h	10-8h	11-16h	12-20h	13-22h	14-48h
Mean	**	**				Mean	1.3036	1.7309	2.1200	3.1416	5.0292	5.1501	7.6578	6.9309
Median	**	**				Median	1.3252	1.7034	2.2158	3.6049	5.9594	5.9373	5.7034	5.1525
Std.Dev	**	**				Std.Dev	0.1430	0.5625	0.7518	1.2718	2.9448	4.5566	4.9485	4.5660
Std.Err	**	**				Std.Err	0.0620	0.3247	0.4341	0.7343	1.7002	2.6308	2.3374	2.6582
95% Conf	**	**				95% Conf	0.3521	1.3943	1.8637	3.1828	7.3000	11.2956	10.0361	11.3189
99% Conf	**	**				99% Conf	0.8021	3.1763	4.2454	7.1821	16.6293	25.7312	22.8621	25.7943
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000
Total	0,0000	0,0000				Total	3,9109	5,1926	6,3599	9,4248	15,0876	15,4802	22,9734	20,7928
Min						Min	1,1520	1,1926	1,3248	1,7030	1,7319	0,2648	4,9572	3,2425
Max						Max	1,4337	2,3066	2,8193	4,1168	7,3973	9,2781	12,3128	12,0378
Min.Pos						Min.Pos	1,1520	1,1926	1,3248	1,7030	1,7319	0,2648	4,9572	3,2425
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000				Other	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zur Aufnahme von PLA-SDS in C6-Gliomzellen zu allen 8 Inkubationszeiten

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-1h	8-2h	9-4h	10-8h	11-16h	12-20h	13-22h	14-48h
Mean	**	**				Mean	5.3706e-3	5.3866e-3	6.2566e-3	6.3836e-3	6.5214e-3	4.9755e-3	5.2177e-3	4.8806e-3
Median	**	**				Median	6.1074e-3	6.0615e-3	6.2566e-3	6.3836e-3	6.5214e-3	5.8999e-3	6.2613e-3	5.1323e-3
Std.Dev	**	**				Std.Dev	1.4740e-3	1.5832e-3	1.0290e-4	1.4801e-4	1.1695e-3	1.7866e-3	1.9048e-3	1.5740e-3
Std.Err	**	**				Std.Err	8.5100e-4	8.9663e-4	7.2762e-5	1.0466e-4	8.2696e-4	1.0142e-3	1.0957e-3	9.0876e-4
95% Conf	**	**				95% Conf	3.6539e-3	3.8627e-3	8.7562e-4	1.2594e-3	0.0100	4.3545e-3	4.7219e-3	3.9019e-3
99% Conf	**	**				99% Conf	8.3236e-3	8.7992e-3	3.5655e-3	5.1284e-3	0.0405	9.9194e-3	0.0108	8.8844e-3
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000
Total	0,0000	0,0000				Total	0,0161	0,0162	0,0125	0,0128	0,0130	0,0149	0,0156	0,0146
Min						Min	3,6735e-3	3,6477e-3	6,1839e-3	6,2790e-3	5,6944e-3	2,9497e-3	3,0171e-3	3,1960e-3
Max						Max	6,3310e-3	6,4935e-3	6,3294e-3	6,4883e-3	7,3404e-3	6,0768e-3	6,3687e-3	6,3136e-3
Min.Pos						Min.Pos	3,6735e-3	3,6477e-3	6,1839e-3	6,2790e-3	5,6944e-3	2,9497e-3	3,0171e-3	3,1960e-3
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000				Other	8,0000	0,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zur Leuchtintensität der Negativkontrollen der C6-Gliomzellen zu allen 8 Inkubationszeiten

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Nanopartikel	7-SS-SDS	8-tot	9-SS-Tw	10-tot	11-PFDL-SDS-leberk	12-PFDL-SDS tot	13-PFDL-Tw	14-tot	15-PLLA-SDS
Mean						Mean	96,4996	3,4910	96,7652	1,2159	95,2211	4,7789	93,0263	6,9737	96,1309
Median						Median	97,2514	2,7496	96,7202	1,2798	94,7823	5,2177	92,8920	7,1080	96,1154
Std.Dev						Std.Dev	3,0143	0,1645	0,0950	0,0848	0,7959	0,4595	3,1887	3,1887	0,1563
Std.Err						Std.Err	1,0626	0,0657	0,0488	0,0292	0,2512	0,1468	0,2512	0,2512	0,0502
95% Conf						95% Conf	2,5127	2,5200	0,4078	0,3640	1,9730	1,9730	1,9730	1,9730	0,3874
99% Conf						99% Conf	3,7188	3,7297	0,8250	0,8253	4,4946	4,4946	4,4946	4,4946	0,8824
Size	1,0000	1,0000				Size	8,0000	8,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000
Total	0,0000	0,0000				Total	771,9972	27,9251	296,2955	3,6596	285,6652	14,1388	89,9069	20,9211	294,1928
Min						Min	90,7667	0,8200	96,6278	1,0526	94,7411	3,8602	89,9069	3,7199	97,9775
Max						Max	90,1800	9,2333	96,9474	1,3273	96,1398	5,2589	96,1398	10,0931	98,2988
Min.Pos						Min.Pos	90,7667	0,8200	96,6278	1,0526	94,7411	3,8602	89,9069	3,7199	97,9775
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000				Other	17,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

	16-tot	17-PLLA-Tw	18-tot	19-PBCaOreg488	20	21	22-NK	23
Mean	1,8691	98,6168	1,8832	29,6340	70,3660	Mean	96,8951	3,0149
Median	1,8746	98,6110	1,8890	26,3706	73,6294	Median	98,3014	1,6986
Std.Dev	0,1563	0,1121	0,1121	17,5845	17,5845	Std.Dev	2,8623	2,8623
Std.Err	0,0802	0,0647	0,0647	10,1524	10,1524	Std.Err	0,8932	0,8932
95% Conf	0,3874	0,2779	0,2779	43,5910	43,5910	95% Conf	1,9901	1,9901
99% Conf	0,8824	0,6332	0,6332	99,2998	99,2998	99% Conf	2,8309	2,8309
Size	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	Size	11,0000	11,0000
Total	5,6072	295,8503	4,1497	88,9021	211,0979	Total	1066,8357	33,1643
Min	1,7102	98,5077	1,2683	13,9098	51,3783	Min	88,8321	1,0683
Max	2,0235	98,7317	1,4923	48,6217	86,0902	Max	98,9317	11,1679
Min.Pos	1,7102	98,5077	1,2683	13,9098	51,3783	Min.Pos	88,8321	1,0683
Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Missing	0,0000	0,0000
Other	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Other	0,0000	0,0000

### Deskriptive Statistik für Toxizitätsdaten SS-SDS, SS-Tw, PFDL-SDS, PFDL-Tw, PLLA-SDS, PLLA-Tw und PBCAOreg488-SDS in C6-Gliomzellen bei 20 h Inkubationszeit

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-1h-leberk	8-1h-tot	9	10-2h-leberk	11-2h-tot	12	13-4h-leberk	14-4h-tot	15
Mean						Mean	97,0450	2,9550		97,3119	2,8531	96,9574	96,9574	3,0426	
Median						Median	97,4943	2,5457		97,9097	2,0903	97,5901	97,5901	2,4499	
Std.Dev						Std.Dev	0,7912	0,7912		1,4919	1,4477	1,0351	1,0351	1,0351	
Std.Err						Std.Err	0,4568	0,4568		0,8614	0,8358	0,8358	0,8358	0,8358	
95% Conf						95% Conf	1,9613	1,9613		3,6984	3,5898	2,5659	2,5659	2,5659	
99% Conf						99% Conf	4,4679	4,4679		8,4250	8,1753	5,8451	5,8451	5,8451	
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	3,0000		3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	
Total	0,0000	0,0000				Total	291,1349	8,8651		291,9357	7,9953	290,8722	290,8722	9,1278	
Min						Min	96,1330	2,4524		96,6138	1,5713	95,7622	95,7622	2,4401	
Max						Max	97,5476	3,8670		98,4123	4,3977	97,5599	97,5599	4,2378	
Min.Pos						Min.Pos	96,1330	2,4524		96,6138	1,5713	95,7622	95,7622	2,4401	
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
Other	1,0000	1,0000				Other	8,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	

	16-8h-leberk	17-8h-tot	18	19-16h-leberk	20-16h-tot	21	22-20h-leberk	23-20h-tot	24	25-32h-leberk	26-32h-tot	27	28-48h-leberk	29-48h-tot
Mean	97,7947	2,2053	97,4239	2,5761	95,0898	Mean	97,9651	4,9102		97,9651	2,1349	97,5202	97,5202	2,2554
Median	96,1132	1,8768	97,8325	2,1675	95,8468	Median	98,1514	4,1514		97,7700	2,2300	97,5202	97,5202	2,4798
Std.Dev	0,6110	0,1121	0,6110	1,5634	3,9881	Std.Dev	0,7921	0,7921		0,7921	0,7921	0,2767	0,2767	0,1598
Std.Err	0,3528	0,3528	0,9027	0,3083	2,3083	Std.Err	0,4573	0,4573		0,4573	0,4573	0,1598	0,1598	0,1598
95% Conf	1,5146	1,5146	3,8757	3,8757	9,9110	95% Conf	1,9635	1,9635		1,9635	1,9635	0,6860	0,6860	
99% Conf	3,4502	3,4502	8,8288	8,8288	23,5771	99% Conf	4,4729	4,4729		4,4729	4,4729	1,5636	1,5636	
Size	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	Size	3,0000	3,0000		3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	
Total	293,3840	6,6160	292,2718	7,7282	285,2895	Total	285,2895	14,7305		285,2895	6,4046	283,0237	283,0237	6,9763
Min	97,0897	1,8289	95,6968	1,2575	90,7667	Min	90,7667	1,3459		97,1249	1,2995	97,5095	97,5095	2,0060
Max	98,1711	2,9103	98,7435	4,3032	96,6541	Max	98,7435	9,2333		98,7005	2,8751	97,9940	97,9940	4,9050
Min.Pos	97,0897	1,8289	95,6968	1,2575	90,7667	Min.Pos	90,7667	1,3459		97,1249	1,2995	97,5095	97,5095	2,0060
Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Missing	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Other	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Other	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

### Deskriptive Statistik Toxizitätsdaten zu SS-SDS in C6-Gliomzellen alle 8 Inkubationszeiten

1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-1h lebend	8-1h tot	9	10-2h lebend	11-2h tot	12	13-4h lebend	14-4h tot	15
Mean	--	--	--	--	Mean	95,9794	4,0206		96,4771			95,0674	4,9258	
Median	--	--	--	--	Median	96,2600	3,7400		96,6458			95,7860	4,2140	
Std.Dev	--	--	--	--	Std.Dev	1,3182	0,7381		0,7381			1,7474	1,0089	
Std.Err	--	--	--	--	Std.Err	0,7611	0,7611		0,4262			1,0089	1,0089	
95% Conf	--	--	--	--	95% Conf	3,6277	1,8297		1,8297			4,3317	4,3317	
99% Conf	--	--	--	--	99% Conf	7,4437	7,4437		4,1661			9,6875	9,6875	
Size	1,0000	1,0000			Size	3,0000	3,0000		3,0000			3,0000	3,0000	
Total	0,0000	0,0000			Total	289,5313	12,0619		10,5687			285,2023	14,7977	
Min	0,0000	0,0000			Min	94,5435	2,8654		95,6693			93,0753	3,6891	
Max	0,0000	0,0000			Max	97,1346	5,4565		97,1163			96,3409	6,9247	
Min.Pos	0,0000	0,0000			Min.Pos	94,5435	2,8654		95,6693			93,0753	3,6891	
Missing	0,0000	0,0000			Missing	0,0000	0,0000		0,0000			0,0000	0,0000	
Other	1,0000	1,0000			Other	0,0000	0,0000		0,0000			0,0000	0,0000	

16-8h lebend	17-8h tot	18	19-16h lebend	20-16h tot	21	22-20h lebend	23-20h tot	24	25-32h lebend	26-32h tot	27	28-48h lebend	29-48h tot
Mean	3,0822	3,0822	90,9458	9,0531	Mean	93,0263	6,9737		95,0251			93,3157	6,6843
Median	3,3360	3,3360	86,0618	3,9348	Median	92,8920	7,1080		95,7900			95,8440	4,1160
Std.Dev	0,8417	1,3164	8,9034	8,9044	Std.Dev	3,1887	3,1887		0,8770			6,0247	6,0247
Std.Err	0,4860	0,7600	5,1404	5,1409	Std.Err	1,8410	1,8410		0,5063			3,4783	3,4783
95% Conf	2,0566	3,2632	22,0710	22,0734	95% Conf	7,9047	7,9047		2,1739			14,9348	14,9348
99% Conf	4,7532	7,4536	50,2775	50,2829	99% Conf	18,0067	18,0067		4,8521			34,0213	34,0213
Size	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	Size	3,0000	3,0000		3,0000			3,0000	3,0000
Total	292,3170	9,2845	272,8374	271,993	Total	279,0789	20,9211		288,0753			279,9470	20,0530
Min	96,6540	1,6650	80,6851	3,8895	Min	89,9069	3,7199		96,3897			86,4388	2,3358
Max	98,3345	4,2630	96,1105	19,3349	Max	96,2801	10,0931		97,6642			97,6642	13,5642
Min.Pos	96,6540	1,6650	80,6851	3,8895	Min.Pos	89,9069	3,7199		96,3897			86,4388	2,3358
Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Missing	0,0000	0,0000		0,0000			0,0000	0,0000
Other	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Other	0,0000	0,0000		0,0000			0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zu Toxizitätsdaten von PFDL-Tw in C6-Gliomzellen zu allen 8 Inkubationszeiten

1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-1h lebend	8-1h tot	9	10-2h lebend	11-2h tot	12	13-4h lebend	14-4h tot
Mean	--	--	--	--	Mean	97,6342	2,3858		98,0213			97,7635	2,2365
Median	--	--	--	--	Median	97,4449	2,5551		98,0383			97,6845	2,3155
Std.Dev	--	--	--	--	Std.Dev	0,5515	0,5515		0,0314			0,2975	0,2975
Std.Err	--	--	--	--	Std.Err	0,3184	0,3184		0,0181			0,1718	0,1718
95% Conf	--	--	--	--	95% Conf	1,8571	1,8571		0,0778			0,7376	0,7376
99% Conf	--	--	--	--	99% Conf	3,1141	3,1141		0,1772			1,6803	1,6803
Size	1,0000	1,0000			Size	3,0000	3,0000		3,0000			3,0000	3,0000
Total	0,0000	0,0000			Total	294,9027	7,0973		294,0639			283,2904	6,7096
Min	0,0000	0,0000			Min	97,2024	1,7446		97,9851			97,5133	1,9075
Max	0,0000	0,0000			Max	98,2554	2,7976		98,0405			98,0925	2,4867
Min.Pos	0,0000	0,0000			Min.Pos	97,2024	1,7446		97,9851			97,5133	1,9075
Missing	0,0000	0,0000			Missing	0,0000	0,0000		0,0000			0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000			Other	0,0000	0,0000		0,0000			0,0000	0,0000

16-8h lebend	17-8h tot	18	19-16h lebend	20-16h tot	21	22-20h lebend	23-20h tot	24	25-32h lebend	26-32h tot	27	28-48h lebend	29-48h tot
Mean	2,0626	2,0626	98,3773	1,6222	Mean	98,1309	1,8691		97,7761			97,6828	2,3166
Median	1,7583	1,7583	98,5121	1,4863	Median	98,1254	1,8746		97,2867			97,5960	2,4040
Std.Dev	0,5360	0,2762	0,2758	0,2762	Std.Dev	0,1563	0,1563		0,8849			0,2553	0,2553
Std.Err	0,3095	0,3095	0,1992	0,1995	Std.Err	0,0902	0,0902		0,5686			0,1474	0,1474
95% Conf	1,3387	1,3387	0,6837	0,6847	95% Conf	0,3874	0,3874		2,4416			0,6330	0,6330
99% Conf	3,0268	3,0268	1,5574	1,5597	99% Conf	0,8824	0,8824		5,5619			1,4419	1,4472
Size	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	Size	3,0000	3,0000		3,0000			3,0000	3,0000
Total	293,8122	6,1878	295,1318	4,8666	Total	294,3928	5,6072		283,2382			283,0454	6,9499
Min	97,3185	1,7480	98,0600	1,4403	Min	97,9775	1,7102		97,1317			97,4822	2,0281
Max	98,2520	2,6615	98,5597	1,9400	Max	98,3988	2,0225		98,9098			97,9702	2,5178
Min.Pos	97,3185	1,7480	98,0600	1,4403	Min.Pos	97,9775	1,7102		97,1317			97,4822	2,0281
Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Missing	0,0000	0,0000		0,0000			0,0000	0,0000
Other	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Other	0,0000	0,0000		0,0000			0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zu Toxizitätsdaten von PLLA-SDS in C6-Gliomzellen bei allen 8 Inkubationszeiten

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-1h lebend	8-1h tot	9	10-2h lebend	11-2h tot	12	13-4h lebend	14-4h tot	15
Mean	--	--				Mean	98,2569	1,7250	97,8488	Mean	2,1625		98,2700	1,7300	
Median	--	--				Median	98,4179	1,5821	97,8817	Median	2,1183		98,2700	1,7300	
Std.Dev	--	--				Std.Dev	0,4737	0,4480	0,2468	Std.Dev	0,2382		0,0848	0,0848	
Std.Err	--	--				Std.Err	0,2735	0,2587	0,1425	Std.Err	0,1318		0,0600	0,0600	
95% Conf	--	--				95% Conf	1,1744	1,1106	0,6118	95% Conf	0,5658		0,7216	0,7216	
99% Conf	--	--				99% Conf	2,6752	2,5300	1,3938	99% Conf	1,2888		2,9384	2,9384	
Size	1,0000	1,0000				Size	8,0000	3,0000	3,0000	Size	3,0000		2,0000	2,0000	
Total	0,0000	0,0000				Total	294,7706	5,1750	293,5464	Total	6,4874		196,5399	3,4601	
Min						Min	97,7236	1,3658	96,0775	Min	1,9595		98,2100	1,6701	
Max						Max	98,6292	2,2270	98,0775	Max	2,4095		98,3299	1,7900	
Min.Pos						Min.Pos	97,7236	1,3658	97,5872	Min.Pos	1,9595		98,2100	1,6701	
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000	Missing	0,0000		0,0000	0,0000	
Other	1,0000	1,0000				Other	8,0000	0,0000	0,0000	Other	0,0000		0,0000	0,0000	

	16-8h lebend	17-8h tot	18	19-16h lebend	20-16h tot	21	22-20h lebend	23-20h tot	24	25-32h lebend	26-32h tot	27	28-48h lebend	29-48h tot
Mean	97,0349	2,9651	98,3028	98,3028	2,0508	Mean	97,7268	2,2732	97,5586	Mean	2,2649		98,4446	1,5665
Median	97,0349	2,9651	98,3028	98,3028	2,0508	Median	98,2896	1,7104	98,1150	Median	1,7533		98,3001	1,6999
Std.Dev	1,0982	1,0982	0,4835	0,4835	0,0000	Std.Dev	0,9850	0,9850	1,0798	Std.Dev	1,2467		0,3382	0,3504
Std.Err	0,7766	0,7766	0,3419	0,3419	0,0000	Std.Err	0,5687	0,5687	0,6234	Std.Err	0,7198		0,1952	0,2023
95% Conf	9,3451	9,3451	4,1141	4,1141	0,0000	95% Conf	2,4418	2,4418	2,6767	95% Conf	3,0904		0,6383	0,6687
99% Conf	38,0530	38,0530	16,7527	16,7527	0,0000	99% Conf	5,5625	5,5625	6,0975	99% Conf	7,0399		1,5096	1,9790
Size	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	Size	3,0000	3,0000	3,0000	Size	3,0000		3,0000	3,0000
Total	194,0698	5,9302	196,6056	196,6056	4,1015	Total	293,1804	6,8196	292,6757	Total	6,7946		285,3338	4,6996
Min	96,2583	2,1885	97,8609	97,8609	2,0508	Min	96,5894	1,6986	96,3141	Min	1,3553		98,2027	1,1690
Max	97,8115	3,7417	98,6447	98,6447	2,0508	Max	98,3014	3,4106	98,2467	Max	3,6859		98,8310	1,8307
Min.Pos	96,2583	2,1885	97,8609	97,8609	2,0508	Min.Pos	96,5894	1,6986	96,3141	Min.Pos	1,3553		98,2027	1,1690
Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Missing	0,0000	0,0000	0,0000	Missing	0,0000		0,0000	0,0000
Other	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Other	0,0000	0,0000	0,0000	Other	0,0000		0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zu Toxizitätsdaten der Negativkontrollen der C6-Gliomzellen zu allen 8 Inkubationszeiten

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-4h	8-20h	9-48h
Mean	--	--				Mean	0,7896	0,9842	1,0000
Median	--	--				Median	0,7053	1,0244	1,0000
Std.Dev	--	--				Std.Dev	0,1833	0,0981	0,0000
Std.Err	--	--				Std.Err	0,1058	0,0567	0,0000
95% Conf	--	--				95% Conf	0,4544	0,2433	0,0000
99% Conf	--	--				99% Conf	1,0350	0,5542	0,0000
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	3,0000	3,0000
Total	0,0000	0,0000				Total	2,3688	2,9525	3,0000
Min						Min	0,6636	0,8723	1,0000
Max						Max	0,9999	1,0558	1,0000
Min.Pos						Min.Pos	0,6636	0,8723	1,0000
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000				Other	3,0000	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zur Aufnahme von SS-SDS in Astrozyten bei 4, 20 und 48 h Inkubationszeit

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-4h	8-20h	9-48h
Mean	**	**				Mean	0,5137	2,2993	2,5123
Median	**	**				Median	0,6256	2,6045	2,5453
Std.Dev	**	**				Std.Dev	0,1696	0,5976	0,4202
Std.Err	**	**				Std.Err	0,0979	0,3392	0,2426
95% Conf						95% Conf	0,4203	1,4566	1,0416
99% Conf						99% Conf	0,5875	3,3180	2,3727
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	3,0000	3,0000
Total	0,0000	0,0000				Total	2,4410	6,8979	7,5366
Min						Min	0,6394	1,6219	2,0765
Max						Max	0,9769	2,6715	2,9149
Min.Pos						Min.Pos	0,6394	1,6219	2,0765
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000				Other	3,0000	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zur Aufnahme von PFDL-Tw in Astrozyten bei 4, 20 und 48 h Inkubationszeit

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-4h	8-20h	9-48h
Mean	**	**				Mean	1,9236	2,8477	3,5258
Median	**	**				Median	1,9345	3,0557	3,9726
Std.Dev	**	**				Std.Dev	0,2871	0,6582	0,9075
Std.Err	**	**				Std.Err	0,1658	0,3627	0,5239
95% Conf						95% Conf	0,7117	1,5572	2,2496
99% Conf						99% Conf	1,6213	3,5472	5,1246
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	3,0000	3,0000
Total	0,0000	0,0000				Total	5,7708	8,5431	10,5774
Min						Min	1,6312	2,1419	2,4815
Max						Max	2,2051	3,3455	4,1232
Min.Pos						Min.Pos	1,6312	2,1419	2,4815
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000				Other	3,0000	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zur Aufnahme von PLLA-SDS in Astrozyten bei 4, 20 und 48 h Inkubationszeit

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-4h	8-20h	9-48h
Mean	**	**				Mean	0,1545	0,1661	0,1517
Median	**	**				Median	0,1145	0,1164	0,0756
Std.Dev	**	**				Std.Dev	0,1298	0,1345	0,1367
Std.Err	**	**				Std.Err	0,0749	0,0776	0,0801
95% Conf						95% Conf	0,3218	0,3334	0,3439
99% Conf						99% Conf	0,7330	0,7594	0,7835
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	3,0000	3,0000
Total	0,0000	0,0000				Total	0,4635	0,4993	0,4551
Min						Min	0,0494	0,0636	0,0676
Max						Max	0,2996	0,3184	0,3118
Min.Pos						Min.Pos	0,0494	0,0636	0,0676
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000				Other	3,0000	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zur Leuchtintensität der Negativkontrollen der Astrozyten bei 4, 20 und 48 h Inkubationszeit



	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-4h lebend	8-4h tot	9	10-20h lebend	11-20h tot	12	13-48h lebend	14-48h tot
Mean	--	--	--	--	--	Mean	95,4748	4,5252	4,5252	95,0925	4,6838	12	95,4867	4,5133
Median	--	--	--	--	--	Median	97,4765	2,5235	2,5235	97,6946	1,8932	12	98,1067	1,8933
Std.Dev	--	--	--	--	--	Std.Dev	3,7049	3,7049	3,7049	5,3813	4,9955	12	4,7850	4,7850
Std.Err	--	--	--	--	--	Std.Err	2,1390	2,1390	2,1390	3,1069	2,8842	12	2,7626	2,7626
95% Conf	--	--	--	--	--	95% Conf	9,1841	20,9213	20,9213	13,3999	12,3856	12	11,8616	11,8616
99% Conf	--	--	--	--	--	99% Conf	3,0000	3,0000	3,0000	30,3882	28,2097	12	27,0207	27,0207
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	12	3,0000	3,0000
Total	0,0000	0,0000				Total	285,4244	13,5756	13,5756	285,2774	14,0514	12	286,4600	13,5400
Min						Min	91,1997	2,2518	2,2518	88,9046	1,9221	12	89,9639	1,6106
Max						Max	97,7482	8,8003	8,8003	98,6779	10,4441	12	98,3894	10,0361
Min.Pos						Min.Pos	91,1997	2,2518	2,2518	88,9046	1,9221	12	89,9639	1,6106
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	12	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000				Other	3,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	12	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zu Toxizitätsdaten von SS-SDS in Astrozyten bei 4, 20 und 48 h Inkubationszeit

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-4h lebend	8-4h tot	9	10-20h lebend	11-20h tot	12	13-48h lebend	14-48h tot
Mean	--	--	--	--	--	Mean	95,5944	4,4156	4,4156	96,1708	3,8292	12	95,0417	4,9853
Median	--	--	--	--	--	Median	98,0023	1,9977	1,9977	98,1138	1,8862	12	97,6795	2,3205
Std.Dev	--	--	--	--	--	Std.Dev	4,3001	4,3001	4,3001	3,8819	3,8819	12	4,7275	4,7275
Std.Err	--	--	--	--	--	Std.Err	2,4827	2,4827	2,4827	2,4412	2,4412	12	2,7294	2,7294
95% Conf	--	--	--	--	--	95% Conf	10,6598	10,6598	10,6598	9,6230	9,6230	12	11,7192	11,7192
99% Conf	--	--	--	--	--	99% Conf	24,2828	24,2828	24,2828	21,9212	21,9212	12	26,6863	26,6863
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	12	3,0000	3,0000
Total	0,0000	0,0000				Total	286,7532	13,2468	13,2468	285,5125	11,4975	12	285,1250	14,8750
Min						Min	90,6196	1,8667	1,8667	91,7011	1,3024	12	89,5838	2,1383
Max						Max	98,1313	9,3804	9,3804	98,6976	8,2989	12	97,8617	10,4162
Min.Pos						Min.Pos	90,6196	1,8667	1,8667	91,7011	1,3024	12	89,5838	2,1383
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	12	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000				Other	3,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	12	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zu Toxizitätsdaten von PFDL-Tw in Astrozyten bei 4, 20 und 48 h Inkubationszeit

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-4h lebend	8-4h tot	9	10-20h lebend	11-20h tot	12	13-48h lebend	14-48h tot
Mean	--	--	--	--	--	Mean	95,9546	4,0343	4,0343	95,4074	4,5526	12	95,2558	4,7436
Median	--	--	--	--	--	Median	97,4350	2,5633	2,5633	96,9833	3,0167	12	95,9698	4,0285
Std.Dev	--	--	--	--	--	Std.Dev	3,0009	3,0004	3,0004	3,7987	3,7987	12	3,1835	3,1837
Std.Err	--	--	--	--	--	Std.Err	1,7326	1,7323	1,7323	2,1932	2,1932	12	1,8380	1,8381
95% Conf	--	--	--	--	--	95% Conf	7,4391	7,4377	7,4377	9,4166	9,4166	12	7,8916	7,8921
99% Conf	--	--	--	--	--	99% Conf	16,9462	16,9431	16,9431	21,4510	21,4510	12	17,9770	17,9781
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	12	3,0000	3,0000
Total	0,0000	0,0000				Total	387,8897	12,1030	12,1030	385,2223	13,7777	12	385,7674	14,2309
Min						Min	92,5120	2,0533	2,0533	91,0745	1,8355	12	91,7760	1,9783
Max						Max	97,9467	7,4863	7,4863	98,1645	8,9255	12	98,0217	8,2240
Min.Pos						Min.Pos	92,5120	2,0533	2,0533	91,0745	1,8355	12	91,7760	1,9783
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	12	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000				Other	3,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	12	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zu Toxizitätsdaten von PLLA-SDS in Astrozyten bei 4, 20 und 48 h Inkubationszeit

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-4h lebend	8-4h tot	9	10-20h lebend	11-20h tot	12	13-48h lebend	14-48h tot
Mean	--	--	--	--	--	Mean	95,3500	4,6500	4,6500	94,2846	5,7154	11-20h tot	94,6057	5,3943
Median	--	--	--	--	--	Median	97,0494	2,9506	2,9506	95,8730	4,1270	12	97,3590	2,6410
Std.Dev	--	--	--	--	--	Std.Dev	4,1478	4,1478	4,1478	4,937	4,937	13-48h lebend	4,9454	4,9454
Std.Err	--	--	--	--	--	Std.Err	2,3947	2,3947	2,3947	2,5367	2,5367	14-48h tot	2,8552	2,8552
95% Conf	--	--	--	--	--	95% Conf	10,2821	23,4225	23,4225	10,8917	10,8917	15-48h tot	12,2594	12,2594
99% Conf	--	--	--	--	--	99% Conf	3,0000	0,0000	0,0000	24,8112	24,8112	16-48h tot	27,9267	27,9267
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000	17-48h tot	3,0000	3,0000
Total	0,0000	0,0000				Total	286,0500	13,9500	13,9500	282,8529	17,1461	18-48h tot	283,9171	16,1829
Min						Min	90,6224	1,6218	1,6218	89,3176	2,3367	19-48h tot	88,5964	2,4383
Max						Max	98,3782	9,3776	9,3776	97,6633	10,6824	20-48h tot	97,5617	11,1036
Min.Pos						Min.Pos	90,6224	1,6218	1,6218	89,3176	2,3367	21-48h tot	88,5964	2,4383
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	22-48h tot	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000				Other	3,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	23-48h tot	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zu Toxizitätsdaten der Negativkontrollen der Astrozyten bei 4, 20 und 48 h Inkubationszeit

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-4h	8-20h	9-48h
Mean	--	--	--	--	--	Mean	1,1494	1,2282	1,0000
Median	--	--	--	--	--	Median	1,1494	1,2282	1,0000
Std.Dev	--	--	--	--	--	Std.Dev	0,0588	0,1438	0,0000
Std.Err	--	--	--	--	--	Std.Err	0,0416	0,1017	0,0000
95% Conf	--	--	--	--	--	95% Conf	0,5007	1,2238	0,0000
99% Conf	--	--	--	--	--	99% Conf	2,0387	4,8934	0,0000
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	2,0000	2,0000
Total	0,0000	0,0000				Total	0,0000	2,4564	2,0000
Min						Min	1,1078	1,1265	1,0000
Max						Max	1,1910	1,3259	1,0000
Min.Pos						Min.Pos	1,1078	1,1265	1,0000
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000				Other	3,0000	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zur Aufnahme von SS-SDS in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen bei 4, 20 und 48 h Inkubationszeit

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-4h	8-20h	9-48h
Mean	--	--	--	--	--	Mean	4,5805	5,2916	4,7433
Median	--	--	--	--	--	Median	4,5805	5,2916	4,7433
Std.Dev	--	--	--	--	--	Std.Dev	0,4420	0,5296	0,1712
Std.Err	--	--	--	--	--	Std.Err	0,3125	0,3745	0,1211
95% Conf	--	--	--	--	--	95% Conf	3,7608	4,5062	1,4572
99% Conf	--	--	--	--	--	99% Conf	15,3140	18,3491	5,9337
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	2,0000	2,0000
Total	0,0000	0,0000				Total	0,0000	10,5832	9,4866
Min						Min	4,2680	4,9171	4,6222
Max						Max	4,8930	5,6660	4,9644
Min.Pos						Min.Pos	4,2680	4,9171	4,6222
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000				Other	3,0000	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zur Aufnahme von PFDL-Tw in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen bei 4, 20 und 48 h Inkubationszeit

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-4h	8-20h	9-48h
Mean	--	--	--	--	--	Mean	0,9137	1,2859	1,1786
Median	--	--	--	--	--	Median	0,9137	1,2859	1,1786
Std.Dev	--	--	--	--	--	Std.Dev	0,5187	0,3867	0,2542
Std.Err	--	--	--	--	--	Std.Err	0,3668	0,2734	0,1798
95% Conf	--	--	--	--	--	95% Conf	4,4137	3,2904	2,1633
99% Conf	--	--	--	--	--	99% Conf	17,9726	13,3986	8,8087
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	2,0000	2,0000
Total	0,0000	0,0000				Total	1,8274	2,5718	2,3573
Min						Min	0,5469	1,0124	0,9989
Max						Max	1,2805	1,5593	1,3584
Min.Pos						Min.Pos	0,5469	1,0124	0,9589
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000				Other	3,0000	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zur Aufnahme von PLLA-SDS in in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen bei 4, 20 und 48 h Inkubationszeit

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-4h	8-20h	9-48h
Mean	--	--	--	--	--	Mean	0,4018	0,3713	0,2204
Median	--	--	--	--	--	Median	0,4018	0,3713	0,2204
Std.Dev	--	--	--	--	--	Std.Dev	0,0744	5,6697e-3	3,0449e-3
Std.Err	--	--	--	--	--	Std.Err	0,0526	4,0092e-3	2,1531e-3
95% Conf	--	--	--	--	--	95% Conf	0,6331	0,0482	0,0259
99% Conf	--	--	--	--	--	99% Conf	2,5781	0,1965	0,1055
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	2,0000	2,0000
Total	0,0000	0,0000				Total	0,8036	0,7426	0,4408
Min						Min	0,3492	0,3673	0,2182
Max						Max	0,4544	0,3753	0,2225
Min.Pos						Min.Pos	0,3482	0,3673	0,2182
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000				Other	3,0000	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zu den Leuchtintensitäten der Negativkontrollen der zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen bei 4, 20 und 48 h Inkubationszeit

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-4h lebend	8-4h tot	9	10-20h lebend	11-20h tot	12	13-48h lebend	14-48h tot
Mean	--	--	--	--	--	Mean	90,9613	9,0387	9,0387	90,1680	9,8320	9,8320	82,5523	17,2601
Median	--	--	--	--	--	Median	90,9613	9,0387	9,0387	90,1680	9,8320	9,8320	82,5523	17,2601
Std.Dev	--	--	--	--	--	Std.Dev	1,9335	1,9335	1,9335	2,6650	2,6650	2,6650	0,8124	0,5470
Std.Err	--	--	--	--	--	Std.Err	1,3672	1,3672	1,3672	1,8845	1,8845	1,8845	0,5744	0,3868
95% Conf	--	--	--	--	--	95% Conf	16,4829	16,4829	16,4829	22,6777	22,6777	22,6777	6,9125	4,6546
99% Conf	--	--	--	--	--	99% Conf	66,9956	66,9956	66,9956	92,3426	92,3426	92,3426	28,1476	18,9532
Size	1,0000	1,0000				Size	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000
Total	0,0000	0,0000				Total	181,9226	18,0774	18,0774	180,3361	19,6639	19,6639	165,1046	34,5201
Min						Min	89,5941	7,6715	7,6715	88,2836	7,9475	7,9475	81,9779	16,8733
Max						Max	92,3285	10,4059	10,4059	92,0525	11,7164	11,7164	83,1267	17,6468
Min.Pos						Min.Pos	89,5941	7,6715	7,6715	86,2836	7,9475	7,9475	81,9779	16,8733
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Other	1,0000	1,0000				Other	3,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Deskriptive Statistik zu Toxizitätsdaten von SS-SDS in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen bei 4, 20 und 48 h Inkubationszeit

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-4h lebend	8-4h tot	9	10-20h lebend	11-20h tot	12	13-48h lebend	14-48h tot
Mean	--	--				Mean	89,2516	10,7484	89,4715	10,5285	82,1651	17,7407		
Median	--	--				Median	89,2516	10,7484	89,4715	10,5285	82,1651	17,7407		
Std.Dev	--	--				Std.Dev	2,4713	2,4713	1,9471	1,9471	2,1566	2,0235		
Std.Err	--	--				Std.Err	1,7474	1,7474	1,3768	1,3768	1,5250	1,4308		
95% Conf	--	--				95% Conf	21,0287	21,0287	16,5682	16,5682	18,3514	17,2182		
99% Conf	--	--				99% Conf	85,6282	85,6282	67,4652	67,4652	74,7262	70,1118		
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000		
Total	0,0000	0,0000				Total	178,5031	21,4969	178,5031	21,0570	164,3302	35,4615		
Min						Min	87,5041	9,0010	88,0947	9,1517	80,6401	16,3099		
Max						Max	90,9990	12,4959	90,6483	11,9083	83,6901	19,1715		
Min.Pos						Min.Pos	87,5041	9,0010	88,0947	9,1517	80,6401	16,3099		
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		
Other	1,0000	1,0000				Other	3,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		

Deskriptive Statistik zu Toxizitätsdaten von PFDL-Tw in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen bei 4, 20 und 48 h Inkubationszeit

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-4h lebend	8-4h tot	9	10-20h lebend	11-20h tot	12	13-48h lebend	14-48h tot
Mean	--	--				Mean	90,8263	9,1737	88,5377	11,4623	66,7262	32,8097		
Median	--	--				Median	90,8263	9,1737	88,5377	11,4623	66,7262	32,8097		
Std.Dev	--	--				Std.Dev	1,7577	1,7577	3,1745	3,1745	12,2549	12,9113		
Std.Err	--	--				Std.Err	1,2429	1,2429	2,2447	2,2447	8,6655	9,1297		
95% Conf	--	--				95% Conf	14,9571	14,9571	27,0125	27,0125	104,2802	109,9660		
99% Conf	--	--				99% Conf	60,9046	60,9046	109,9937	109,9937	424,6254	447,3704		
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000		
Total	0,0000	0,0000				Total	181,6526	18,3474	177,0754	22,9246	133,4523	65,6193		
Min						Min	89,5834	7,9308	86,2930	9,2176	58,0607	23,6800		
Max						Max	92,0692	10,4166	90,7824	13,7070	75,3517	41,9393		
Min.Pos						Min.Pos	89,5834	7,9308	86,2930	9,2176	58,0607	23,6800		
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		
Other	1,0000	1,0000				Other	3,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		

Deskriptive Statistik zu Toxizitätsdaten von PLLA-SDS in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen bei 4, 20 und 48 h Inkubationszeit

	1-Zelltyp	2-Messung	3	4	5	6-Inkubationszeit	7-4h lebend	8-4h tot	9	10-20h lebend	11-20h tot	12	13-48h lebend	14-48h tot
Mean	--	--				Mean	91,2003	8,7197	91,2209	8,7791	84,1957	15,7574		
Median	--	--				Median	91,2003	8,7197	91,2209	8,7791	84,1957	15,7574		
Std.Dev	--	--				Std.Dev	2,6805	2,6805	1,6899	1,6899	2,1158	2,0494		
Std.Err	--	--				Std.Err	1,8954	1,8954	1,1950	1,1950	1,4961	1,4961		
95% Conf	--	--				95% Conf	22,8093	22,8093	14,3802	14,3802	18,0042	17,4392		
99% Conf	--	--				99% Conf	92,8787	92,8787	58,5556	58,5556	73,3123	71,0117		
Size	1,0000	1,0000				Size	3,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000		
Total	0,0000	0,0000				Total	182,5606	17,4394	182,4418	17,5582	166,3913	31,5148		
Min						Min	89,3849	6,8243	90,0259	7,5841	82,6995	14,3062		
Max						Max	93,1757	10,6151	92,4159	9,9741	85,6918	17,2066		
Min.Pos						Min.Pos	89,3849	6,8243	90,0259	7,5841	82,6995	14,3062		
Missing	0,0000	0,0000				Missing	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		
Other	1,0000	1,0000				Other	3,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		

Deskriptive Statistik zu Toxizitätsdaten der Negativkontrollen der in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen bei 4, 20 und 48 h Inkubationszeit

## 8. Literaturverzeichnis

- ABBOTT, N., REVEST, P., GREENWOOD, J., ROMERO, I., NOBLES, M., RIST, R., REEVE-CHEN, Z. & CHAN, M. 1997. Preparation of primary rat brain endothelial cell culture. Modified method of CCW Hughes. *Drug transport across the blood-brain barrier: in vitro and in vivo techniques*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- ABBOTT, N. J., DOLMAN, D. E., DRNDARSKI, S. & FREDRIKSSON, S. M. 2012. An improved in vitro blood–brain barrier model: rat brain endothelial cells co-cultured with astrocytes. *Astrocytes*. Springer.
- ABBOTT, N. J., PATABENDIGE, A. A., DOLMAN, D. E., YUSOF, S. R. & BEGLEY, D. J. 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*, 37, 13-25.
- ABBOTT, N. J., RONNBACK, L. & HANSSON, E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 7, 41-53.
- ADERIBIGBE, B. A. & NAKI, T. 2019. Chitosan-Based Nanocarriers for Nose to Brain Delivery. *Applied Sciences*, 9, 2219.
- ALEXANDER, A., AGRAWAL, M., UDDIN, A., SIDDIQUE, S., SHEHATA, A. M., SHAKER, M. A., ATA UR RAHMAN, S., ABDUL, M. I. M. & SHAKER, M. A. 2019. Recent expansions of novel strategies towards the drug targeting into the brain. *Int J Nanomedicine*, 14, 5895-5909.
- ALVAREZ, J. I., DODELET-DEVILLERS, A., KEBIR, H., IFERGAN, I., FABRE, P. J., TEROUZ, S., SABBAGH, M., WOSIK, K., BOURBONNIÈRE, L. & BERNARD, M. 2011. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science*, 334, 1727-1731.
- ARMULIK, A., GENOVE, G., MAE, M., NISANCIOGLU, M. H., WALLGARD, E., NIAUDET, C., HE, L., NORLIN, J., LINDBLOM, P., STRITTMATTER, K., JOHANSSON, B. R. & BETSHOLTZ, C. 2010. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*, 468, 557-61.
- BACKHOVENS, H., GHEUENS, J. & SIEGERS, H. 1987. Expression of glial fibrillary acidic protein in rat C6 glioma relates to vimentin and is independent of cell-cell contact. *Journal of neurochemistry*, 49, 348-354.
- BARTHEL, A.-K., DASS, M., DRÖGE, M., CRAMER, J.-M., BAUMANN, D., URBAN, M., LANDFESTER, K., MAILÄNDER, V. & LIEBERWIRTH, I. 2014. Imaging the intracellular degradation of biodegradable polymer nanoparticles. *Beilstein journal of nanotechnology*, 5, 1905-1917.
- BAUER, J. 2013. Perfluorcarbon-Nanokapseln als Sauerstoffträger für künstlichen Blutersatz.
- BECHINGER, P. 2020. *Nanopartikel als Transportsysteme zur Therapie des Schädel-Hirn-Traumas: in-vivo Analyse der zeitlichen Aufnahme in Organe, Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und Entzündungsreaktion von vier unterschiedlich funktionalisierten Poly(L)-lactid und Poly(perfluorodecylacrylat)-Nanopartikeln in der Ratte*.
- BENDA, P., LIGHTBODY, J., SATO, G., LEVINE, L. & SWEET, W. 1968. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, 161, 370-1.

- BLANCHETTE, M. & DANEMAN, R. 2015. Formation and maintenance of the BBB. *Mech Dev*, 138 Pt 1, 8-16.
- BOMHARD, S. V. 2019. Kontinuierliche Herstellung und Aufarbeitung polymerbasierter Nanopartikel sowie Verkapselung hydrophober Substanzen.
- BOVERI, M., BEREZOWSKI, V., PRICE, A., SLUPEK, S., LENFANT, A.-M., BENAUD, C., HARTUNG, T., CECHELLI, R., PRIETO, P. & DEHOUCK, M.-P. 2005. Induction of blood-brain barrier properties in cultured brain capillary endothelial cells: Comparison between primary glial cells and C6 cell line. *Glia*, 51, 187-198.
- BOWMAN, P. D., BETZ, A. L., WOLINSKY, J. S., PENNEY, J. B., SHIVERS, R. R. & GOLDSTEIN, G. W. 1981. Primary culture of capillary endothelium from rat brain. *In vitro*, 17, 353-362.
- BOWMAN, P. D., ENNIS, S. R., RAREY, K. E., LORRIS BETZ, A. & GOLDSTEIN, G. W. 1983. Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: A model for study of blood-brain barrier permeability. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 14, 396-402.
- BRENDEL, K., MEEZAN, E. & CARLSON, E. C. 1974. Isolated brain microvessels: a purified, metabolically active preparation from bovine cerebral cortex. *Science*, 185, 953-955.
- CABEZA, L., CANO-CORTÉS, V., RODRÍGUEZ, M. J., VÉLEZ, C., MELGUIZO, C., SÁNCHEZ-MARTÍN, R. M. & PRADOS, J. 2015. Polystyrene nanoparticles facilitate the internalization of impermeable biomolecules in non-tumour and tumour cells from colon epithelium. *Journal of Nanoparticle Research*, 17, 37.
- CAMPISI, M., SHIN, Y., OSAKI, T., HAJAL, C., CHIONO, V. & KAMM, R. D. 2018. 3D self-organized microvascular model of the human blood-brain barrier with endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Biomaterials*, 180, 117-129.
- CECHELLI, R., ADAY, S., SEVIN, E., ALMEIDA, C., CULOT, M., DEHOUCK, L., COISNE, C., ENGELHARDT, B., DEHOUCK, M.-P. & FERREIRA, L. 2014. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PloS one*, 9.
- CRAPARO, E. F., BONDÌ, M. L., PITARRESI, G. & CAVALLARO, G. 2011. Nanoparticulate Systems for Drug Delivery and Targeting to the Central Nervous System. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 17, 670-677.
- DANEMAN, R., ZHOU, L., KEBEDE, A. A. & BARRES, B. A. 2010. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, 468, 562-566.
- DASS, M. 2010. *Elektronenmikroskopische Studien über polymere Nanopartikel und ihr Potenzial für biomedizinische Anwendungen*. Verlag nicht ermittelbar.
- DAUSEND, J. 2009. *Aufnahmemechanismus und Wirkung chemotherapeutisch beladener Miniemulsions-Nanopartikel in Tumorzellen*. Verlag nicht ermittelbar.
- DAVIES, D. L. & VERNADAKIS, A. 1986. Responses in astrocytic C6 glioma cells to ethanol and dibutyl cyclic AMP. *Developmental Brain Research*, 24, 253-260.

- DEHOUCK, M.-P., MÉRESSE, S., DELORME, P., FRUCHART, J.-C. & CECHELLI, R. 1990. An Easier, Reproducible, and Mass-Production Method to Study the Blood–Brain Barrier In Vitro. *Journal of Neurochemistry*, 54, 1798-1801.
- DELI, M. A., ÁBRAHÁM, C. S., KATAOKA, Y. & NIWA, M. 2005. Permeability Studies on In Vitro Blood–Brain Barrier Models: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25, 59-127.
- DOS SANTOS, T., VARELA, J., LYNCH, I., SALVATI, A. & DAWSON, K. A. 2011. Effects of transport inhibitors on the cellular uptake of carboxylated polystyrene nanoparticles in different cell lines. *PloS one*, 6.
- EHRET, R., BALZER-GELDSETZER, M., REESE, J. P., DODEL, I., BECKER, E., CHRISTOPHER, A., FRIEDRICH, H., KRAEMER, S., LÜER, W., MÜNGERSDORF, M., PUZICH, R., ROHR †, A., SCHULTES-PLATZEK, I., SIEFJEDIERS, V., TIEL-WILCK, K., OERTEL, W. H. & DODEL, R. 2009. Direkte Kosten der Parkinson-Behandlung. *Der Nervenarzt*, 80, 452-458.
- EU-KOMMISSION, D. 2011. Empfehlung der Kommission vom 18. Oktober 2011 zur Definition von Nanomaterialien (2011/696/EU). *Amtsblatt der Europäischen Union*, L 275, 38-40.
- FERNÁNDEZ KLETT, F. 2013. *Rolle der Perizyten in der Modulation des kapillären Blutflusses im zerebralen Kortex der Maus*.
- FORNAGUERA, C., DOLS-PEREZ, A., CALDERÓ, G., GARCÍA-CELMA, M. J., CAMARASA, J. & SOLANS, C. 2015. PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating using low-energy methods as efficient nanocarriers for drug delivery across the blood–brain barrier. *Journal of Controlled Release*, 211, 134-143.
- FRANKE, H., GALLA, H.-J. & BEUCKMANN, C. T. 2000. Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood–brain barrier in vitro. *Brain Research Protocols*, 5, 248-256.
- FRÖHLICH, E., MEINDL, C., ROBLEGG, E., EBNER, B., ABSENGER, M. & PIEBER, T. R. 2012. Action of polystyrene nanoparticles of different sizes on lysosomal function and integrity. *Particle and Fibre Toxicology*, 9, 26.
- GAO, H., YANG, Z., ZHANG, S., CAO, S., SHEN, S., PANG, Z. & JIANG, X. 2013. Ligand modified nanoparticles increases cell uptake, alters endocytosis and elevates glioma distribution and internalization. *Scientific reports*, 3, 2534.
- GAO, K. & JIANG, X. 2006. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 310, 213-219.
- GASTFRIEND, B. D., PALECEK, S. P. & SHUSTA, E. V. 2018. Modeling the blood-brain barrier: Beyond the endothelial cells. *Current opinion in biomedical engineering*, 5, 6-12.
- GOESMANN, H. & FELDMANN, C. 2010. Nanopartikel-Funktionsmaterialien. *Angewandte Chemie*, 122, 1402-1437.
- GOLDSTEIN, G. W. 1988. Endothelial cell-astrocyte interactions. A cellular model of the blood-brain barrier. *Ann N Y Acad Sci*, 529, 31-9.
- GRADISHAR, W. J. 2006. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 7, 1041-1053.

- HAMILTON, N. B., ATTWELL, D. & HALL, C. N. 2010. Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front Neuroenergetics*, 2.
- HAYASHI, K., NAKAO, S., NAKAOKE, R., NAKAGAWA, S., KITAGAWA, N. & NIWA, M. 2004. Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood–brain barrier. *Regulatory Peptides*, 123, 77-83.
- HELMS, H. C., ABBOTT, N. J., BUREK, M., CECHELLI, R., COURAUD, P. O., DELI, M. A., FORSTER, C., GALLA, H. J., ROMERO, I. A., SHUSTA, E. V., STEBBINS, M. J., VANDENHAUTE, E., WEKSLER, B. & BRODIN, B. 2016. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab*, 36, 862-90.
- HILGER, I. & KAISER, W. A. 2011. Parameters influencing the efficacy of magnetic heating of small breast tumors. *Nanomedicine-Basic and Clinical Applications in Diagnostics and Therapy*. Karger Publishers.
- HÖCHERL, A. 2012. *Qualitative and absolute quantitative studies of the cell-nanoparticle interaction*. Universitätsbibliothek Mainz.
- HOFMANN, D. 2014. *Drug delivery, entry and intracellular trafficking of polymeric nanoparticles*. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- HUANG, L., HU, J., HUANG, S., WANG, B., SIAW-DEBRAH, F., NYANZU, M., ZHANG, Y. & ZHUGE, Q. 2017. Nanomaterial applications for neurological diseases and central nervous system injury. *Progress in Neurobiology*, 157, 29-48.
- HUANG, M., KHOR, E. & LIM, L.-Y. 2004. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharmaceutical research*, 21, 344-353.
- IBUKI, Y. & TOYOOKA, T. 2012. Nanoparticle Uptake Measured by Flow Cytometry. In: REINEKE, J. (ed.) *Nanotoxicity: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press.
- JANZER, R. C. & RAFF, M. C. 1987. Astrocytes induce blood–brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 325, 253-257.
- JIANG, L. Q., WANG, T. Y., WEBSTER, T. J., DUAN, H.-J., QIU, J. Y., ZHAO, Z. M., YIN, X. X. & ZHENG, C. L. 2017. Intracellular disposition of chitosan nanoparticles in macrophages: intracellular uptake, exocytosis, and intercellular transport. *International journal of nanomedicine*, 12, 6383.
- KAISAR, M. A., ABHYANKAR, V. V. & CUCULLO, L. 2019. In Vitro BBB Models: Working with Static Platforms and Microfluidic Systems. In: BARICHELLO, T. (ed.) *Blood-Brain Barrier*. New York, NY: Springer New York.
- KEMPSKI, O., STAUB, F., JANSEN, M., SCHÖDEL, F. & BAETHMANN, A. 1988. Glial swelling during extracellular acidosis in vitro. *Stroke*, 19, 385-392.
- KEMPSKI, O., STAUB, F., SCHNEIDER, G. H., WEIGT, H. & BAETHMANN, A. 1992. Chapter 6: Swelling of C6 glioma cells and astrocytes from glutamate, high K<sup>+</sup> concentrations or acidosis. In: YU, A. C. H., HERTZ, L., NORENBERG, M. D., SYKOVÁ, E. & WAXMAN, S. G. (eds.) *Progress in Brain Research*. Elsevier.



- KREUTER, J., ALYAUTDIN, R. N., KHARKEVICH, D. A. & IVANOV, A. A. 1995. Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain Research*, 674, 171-174.
- KUCHLER-BOPP, S., DELAUNOY, J.-P., ARTAULT, J.-C., ZAEPFEL, M. & DIETRICH, J.-B. 1999. Astrocytes induce several blood–brain barrier properties in non-neural endothelial cells. *NeuroReport*, 10, 1347-1353.
- KUMAR, A., PANDEY, A. K., SINGH, S. S., SHANKER, R. & DHAWAN, A. 2011. A flow cytometric method to assess nanoparticle uptake in bacteria. *Cytometry Part A*, 79A, 707-712.
- KUMARI, A., YADAV, S. K. & YADAV, S. C. 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18.
- LANG, C. F. 2011. Primärer Wundverschluss von Kopfplatzwunden durch Verkleben der Haare mit Cyanoacrylat (HAT). *Notfall + Rettungsmedizin*, 14, 125-127.
- LIPPMANN, E. S., AZARIN, S. M., KAY, J. E., NESSLER, R. A., WILSON, H. K., AL-AHMAD, A., PALECEK, S. P. & SHUSTA, E. V. 2012. Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 30, 783-791.
- LOOS, C., SYROVETS, T., MUSYANOVYCH, A., MAILÄNDER, V., LANDFESTER, K., NIENHAUS, G. U. & SIMMET, T. 2014. Functionalized polystyrene nanoparticles as a platform for studying bio–nano interactions. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 5, 2403-2412.
- LÜBBE, A. S., BERGEMANN, C., RIESS, H., SCHRIEVER, F., REICHARDT, P., POSSINGER, K., MATTHIAS, M., DÖRKEN, B., HERRMANN, F. & GÜRTLER, R. 1996. Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer research*, 56, 4686-4693.
- LUTTMANN, W., BRATKE, K., KÜPPER, M. & MYRTEK, D. 2014. Durchflusscytometrie. *Der Experimentator: Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- MA, Z. & LIM, L.-Y. 2003. Uptake of Chitosan and Associated Insulin in Caco-2 Cell Monolayers: A Comparison Between Chitosan Molecules and Chitosan Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 20, 1812-1819.
- MALINA, K. C.-K., COOPER, I. & TEICHBERG, V. I. 2009. Closing the gap between the in-vivo and in-vitro blood–brain barrier tightness. *Brain Research*, 1284, 12-21.
- MEHTA, R. C., JEYANTHI, R., CALLS, S., THANOO, B. C., BURTON, K. W. & DELUCA, P. P. 1994. Biodegradable microspheres as depot system for parenteral delivery of peptide drugs. *Journal of Controlled Release*, 29, 375-384.
- MISCHECK, U., MEYER, J. & GALLA, H.-J. 1989. Characterization of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity of cultured endothelial cells from porcine brain capillaries. *Cell and Tissue Research*, 256, 221-226.
- MOLINO, Y., JABÈS, F., LACASSAGNE, E., GAUDIN, N. & KHRESTCHATISKY, M. 2014. Setting-up an In Vitro Model of Rat Blood-brain Barrier (BBB): A Focus on BBB Impermeability and Receptor-mediated Transport. *JoVE*, e51278.

- MUSYANOVYCH, A., DAUSEND, J., DASS, M., WALTHER, P., MAILÄNDER, V. & LANDFESTER, K. 2011. Criteria impacting the cellular uptake of nanoparticles: A study emphasizing polymer type and surfactant effects. *Acta Biomaterialia*, 7, 4160-4168.
- MUSYANOVYCH, A., SCHMITZ-WIENKE, J., MAILÄNDER, V., WALTHER, P. & LANDFESTER, K. 2008. Preparation of Biodegradable Polymer Nanoparticles by Miniemulsion Technique and Their Cell Interactions. *Macromolecular Bioscience*, 8, 127-139.
- NAKAGAWA, S., DELI, M. A., KAWAGUCHI, H., SHIMIZUDANI, T., SHIMONO, T., KITTEL, A., TANAKA, K. & NIWA, M. 2009. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int*, 54, 253-63.
- NAKAGAWA, S., DELI, M. A., NAKAO, S., HONDA, M., HAYASHI, K., NAKAOKE, R., KATAOKA, Y. & NIWA, M. 2007. Pericytes from Brain Microvessels Strengthen the Barrier Integrity in Primary Cultures of Rat Brain Endothelial Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 27, 687-694.
- NICOLAS, J., MURA, S., BRAMBILLA, D., MACKIEWICZ, N. & COUVREUR, P. 2013. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chemical Society Reviews*, 42, 1147-1235.
- NIELSEN, S. S. E., SIUPKA, P., GEORGIAN, A., PRESTON, J. E., TOTH, A. E., YUSOF, S. R., ABBOTT, N. J. & NIELSEN, M. S. 2017. Improved Method for the Establishment of an In Vitro Blood-Brain Barrier Model Based on Porcine Brain Endothelial Cells. *J Vis Exp*.
- OLIVIER, J.-C., FENART, L., CHAUVET, R., PARIAT, C., CECHELLI, R. & COUET, W. 1999. Indirect Evidence that Drug Brain Targeting Using Polysorbate 80-Coated Polybutylcyanoacrylate Nanoparticles Is Related to Toxicity. *Pharmaceutical Research*, 16, 1836-1842.
- ONYEMA, H. N. 2016. Aufnahme von Nanopartikel in einem statischen und dynamischen in vitro-Modell der Blut-Hirn-Schranke.
- ORBEN, T. 2020. *In-vitro Untersuchungen zur zellulären Aufnahme, Toxizität und Schrankenstörung eines bioabbaubaren Poly(L)-Laktid und eines nicht-bioabbaubaren Poly(perfluorodecylacrylat)-Nanopartikels an einem in-vitro Bluthirnschrankenmodell aus zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen und Astrozyten aus dem Schweinehirn.*
- ORLOWSKI, M., SESSA, G. & GREEN, J. P. 1974.  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase in brain capillaries: possible site of a blood-brain barrier for amino acids. *Science*, 184, 66-68.
- PARKINSON, F. E. & HACKING, C. 2005. Pericyte abundance affects sucrose permeability in cultures of rat brain microvascular endothelial cells. *Brain Research*, 1049, 8-14.
- PATABENDIGE, A., SKINNER, R. A. & ABBOTT, N. J. 2013a. Establishment of a simplified in vitro porcine blood-brain barrier model with high transendothelial electrical resistance. *Brain Research*, 1521, 1-15.
- PATABENDIGE, A., SKINNER, R. A., MORGAN, L. & ABBOTT, N. J. 2013b. A detailed method for preparation of a functional and flexible blood-brain barrier model using porcine brain endothelial cells. *Brain Res*, 1521, 16-30.

- PATEL, M. M. & PATEL, B. M. 2017. Crossing the Blood-Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain. *CNS Drugs*, 31, 109-133.
- PATEL, T., ZHOU, J., PIEPMEIER, J. M. & SALTZMAN, W. M. 2012. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 701-705.
- PERRIÈRE, N., DEMEUSE, P., GARCIA, E., REGINA, A., DEBRAY, M., ANDREUX, J.-P., COUVREUR, P., SCHERRMANN, J.-M., TEMSAMANI, J., COURAUD, P.-O., DELI, M. A. & ROUX, F. 2005. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood–brain barrier-specific properties. *Journal of Neurochemistry*, 93, 279-289.
- PFEIFFER, S., BETSCHAT, B., COOK, J., MANCINI, P. & MORRIS, R. 1977. *Glial cell lines*, Academic Press, New York.
- RAUB, T. J., KUENTZEL, S. L. & SAWADA, G. A. 1992. Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro: Barrier tightening by a factor released from astrogloma cells. *Experimental Cell Research*, 199, 330-340.
- RIEHMANN, K., SCHNEIDER, S. W., LUGER, T. A., GODIN, B., FERRARI, M. & FUCHS, H. 2009. Nanomedicine--challenge and perspectives. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48, 872-97.
- ROEBBEN, G., RAUSCHER, H., AMENTA, V., ASCHBERGER, K., SANFELIU, A. B., CALZOLAI, L., EMONS, H., GAILLARD, C., GIBSON, N. & HOLZWARTH, U. 2014. Towards a review of the EC Recommendation for a definition of the term "nanomaterial. Part.
- RUBIN, L. 1991. The blood-brain barrier in and out of cell culture. *Current opinion in neurobiology*, 1, 360.
- RUBIN, L., HALL, D., PORTER, S., BARBU, K., CANNON, C., HORNER, H., JANATPOUR, M., LIAW, C., MANNING, K. & MORALES, J. 1991. A cell culture model of the blood-brain barrier. *The Journal of cell biology*, 115, 1725-1735.
- SAN-GALLI, F., VRIGNAUD, P., ROBERT, J., COINDRE, J. & COHADON, F. 1989. Assessment of the experimental model of transplanted C6 glioblastoma in Wistar rats. *Journal of neuro-oncology*, 7, 299-304.
- SCHIEBLER, T. H. & KORF, H.-W. 2007. *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*, Springer-Verlag.
- SCHMIDT, D. L., COBURN, C. E., DEKOVEN, B. M., POTTER, G. E., MEYERS, G. F. & FISCHER, D. A. 1994. Water-based non-stick hydrophobic coatings. *Nature*, 368, 39-41.
- SCHUNCK, T., ONYEMA, H., ZUPKE, O. & MUSYANOVYCH, A. 2016. Welche Eigenschaften von Nanopartikeln bestimmen deren Aufnahme in Zellen? *BIOspektrum*, 22, 762-764.
- SKINNER, R., GIBSON, R., ROTHWELL, N., PINTEAUX, E. & PENNY, J. 2009. Transport of interleukin-1 across cerebromicrovascular endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*, 156, 1115-1123.
- SMITH, M., OMIDI, Y. & GUMBLETON, M. 2007. Primary porcine brain microvascular endothelial cells: Biochemical and functional characterisation as

- a model for drug transport and targeting. *Journal of Drug Targeting*, 15, 253-268.
- STEWART, P. & WILEY, M. 1981. Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras. *Developmental biology*, 84, 183-192.
- SUN, T., ZHANG, Y. S., PANG, B., HYUN, D. C., YANG, M. & XIA, Y. 2014. Maßgeschneiderte Nanopartikel für den Wirkstofftransport in der Krebstherapie. *Angewandte Chemie*, 126, 12520-12568.
- SWEENEY, M. D., ZHAO, Z., MONTAGNE, A., NELSON, A. R. & ZLOKOVIC, B. V. 2019. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev*, 99, 21-78.
- THOMSEN, L. B., BURKHART, A. & MOOS, T. 2015. A Triple Culture Model of the Blood-Brain Barrier Using Porcine Brain Endothelial cells, Astrocytes and Pericytes. *PLoS one*, 10, e0134765-e0134765.
- TOMCIN, S. 2014. *Analyse der intrazellulären Freisetzung von Wirkstoffmodellen via Konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie*. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- TRAPANI, A., DENORA, N., IACOBELLIS, G., SITTERBERG, J., BAKOWSKY, U. & KISSEL, T. 2011. Methotrexate-Loaded Chitosan- and Glycolchitosan-Based Nanoparticles: A Promising Strategy for the Administration of the Anticancer Drug to Brain Tumors. *AAPS PharmSciTech*, 12, 1302-1311.
- TSUKITA, S., FURUSE, M. & ITOH, M. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 285-93.
- VARELA, J. A., BEXIGA, M. G., ÅBERG, C., SIMPSON, J. C. & DAWSON, K. A. 2012. Quantifying size-dependent interactions between fluorescently labeled polystyrene nanoparticles and mammalian cells. *Journal of Nanobiotechnology*, 10, 39.
- VAUTHIER, C., DUBERNET, C., FATTAL, E., PINTO-ALPHANDARY, H. & COUVREUR, P. 2003. Poly (alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 55, 519-548.
- VOIGT, N., HENRICH-NOACK, P., KOCKENTIEDT, S., HINTZ, W., TOMAS, J. & SABEL, B. A. 2014. Toxicity of polymeric nanoparticles in vivo and in vitro. *Journal of Nanoparticle Research*, 16, 2379.
- WAGNER, C. 2011. *Synthese und Charakterisierung von Polymethylmethacrylat (PMMA)-Silika-Komposit-Partikeln und fluorierten Nanopartikeln unter Verwendung des Miniemulsionsprozesses*. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- WALTERS, E. M., AGCA, Y., GANJAM, V. & EVANS, T. 2011. Animal models got you puzzled?: think pig. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1245, 63-64.
- WANG, H., LIN, Y., NIENHAUS, K. & NIENHAUS, G. U. 2018. The protein corona on nanoparticles as viewed from a nanoparticle-sizing perspective. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 10, e1500.
- WANG, Z., SUN, H. & SEBASTIAN YAKISICH, J. 2014. Overcoming the blood-brain barrier for chemotherapy: limitations, challenges and rising problems. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 14, 1085-1093.

- WEISS, C. K., LORENZ, M. R., LANDFESTER, K. & MAILÄNDER, V. 2007. Cellular Uptake Behavior of Unfunctionalized and Functionalized PBCA Particles Prepared in a Miniemulsion. *Macromolecular Bioscience*, 7, 883-896.
- WILHELM, I., FAZAKAS, C. & KRIZBAI, I. A. 2011. In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 71, 113-28.
- WOLFF, A., ANTFOLK, M., BRODIN, B. & TENJE, M. 2015. In Vitro Blood–Brain Barrier Models—An Overview of Established Models and New Microfluidic Approaches. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104, 2727-2746.
- XU, Y., ASGHAR, S., YANG, L., LI, H., WANG, Z., PING, Q. & XIAO, Y. 2017. Lactoferrin-coated polysaccharide nanoparticles based on chitosan hydrochloride/hyaluronic acid/PEG for treating brain glioma. *Carbohydrate Polymers*, 157, 419-428.
- ZHANG, S., GAO, H. & BAO, G. 2015. Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. *ACS Nano*, 9, 8655-8671.
- ZLOKOVIC, B. V. 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57, 178-201.

## 9. Danksagung

## 10. Tabellarischer Lebenslauf