

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

**In-vitro Untersuchungen zur zellulären Aufnahme, Toxizität und
Schrankenstörung eines bioabbaubaren Poly(L)-Laktid und eines
nicht-bioabbaubaren Perfluorodecylacrylat-Nanopartikels an einem
in-vitro Bluthirnschrankenmodell aus zerebralen mikrovaskulären
Endothelzellen und Astrozyten aus dem Schweinehirn**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Universitätsmedizin

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Timo Orben aus Bad Kreuznach

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

06.07.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	3
2	Stand der Forschung.....	5
2.1	Aufgabe der Blut-Hirn-Schranke.....	5
2.2	Endothelzelle.....	6
2.3	Astrozyt und Perizyt.....	7
2.4	Problematik der BHS in der Pharmakotherapie.....	9
2.5	<i>In-vivo</i> Blut-Hirn-Schrankenmodelle.....	9
2.6	<i>In-vitro</i> Blut-Hirn-Schrankenmodelle.....	10
2.7	Nanopartikel.....	12
2.7.1	Einsatzgebiete der Nanopartikel.....	12
2.7.2	Hürden und Chancen in der Anwendung der Nanopartikel.....	14
2.7.3	Herstellung der Nanopartikel.....	15
2.8	Fragestellung.....	16
3	Material und Methoden.....	17
3.1	Material.....	17
3.1.1	Geräte.....	17
3.1.2	Mikroskope.....	17
3.1.3	Verbrauchsmaterial.....	18
3.1.4	Medien.....	19
3.1.5	Enzymlösungen.....	20
3.1.6	Antikörper.....	21
3.1.7	Software.....	21
3.1.8	Nanopartikel.....	22
3.1.9	LDH Toxizitätstest.....	23
3.1.10	CCK8 Toxizitätstest.....	23
3.2	Methoden.....	24

3.2.1	Schematische Darstellung der Versuchsabläufe.....	24
3.2.2	Isolation der Primärzellen	25
3.2.3	Kultivierung der Primärzellen	27
3.2.4	Zellaussaat auf Transwellsystem	28
3.2.5	Kollagenierung der Transwellsysteme	30
3.2.6	Zellcharakterisierung.....	30
3.2.7	Transendotheliale elektrische Widerstandsmessung (TEER)	32
3.2.8	Analyse mittels Durchflusszytometrie	33
3.2.9	Toxizitätstests Astrozyten und zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen	34
3.2.9.1	LDH Toxizitätstest.....	34
3.2.9.2	CCK-8 Toxizitätstest	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Charakterisierung der Primärzellen	37
4.2	Etablierung eines reproduzierbaren BHS-Modells.....	39
4.2.1	Puromycineffekt auf das Blut-Hirn-Schranken-Modell.....	40
4.3	Vergleich der Astrozytenaussaat zur Verbesserung der Barriere.....	41
4.4	Einfluss der NP auf die BHS.....	42
4.5	Ergebnisse Durchflusszytometrie	43
4.6	Toxizität der NP in verschiedenen Konzentrationen.....	47
4.6.1	LDH-Toxizitätstest.....	47
4.6.2	CCK8-Toxizitätstest an Monokulturen.....	48
5	Diskussion	50
5.1	Diskussion der Methode	50
5.1.1	Isolation, Kultivierung und Charakterisierung der Primärzellen.....	50
5.1.2	Methodik der Widerstandsmessung	51
5.1.3	Diskussion der FACS-Analyse	52

5.1.4	Diskussion der Toxizitätstests.....	53
5.2	Diskussion der Ergebnisse	54
5.2.1	Beurteilung des BHS-Modells	54
5.2.2	Einfluss des Puromycins und des Mediumwechsels auf die Barriereintegrität.....	55
5.2.3	Beurteilung der FACS-Analysen	56
5.2.4	Beurteilung des Toxizitätstests mit LDH	57
5.2.5	Beurteilung des Toxizitätstests mit Cell Counting Kit-8.....	58
5.2.6	Vergleich Ergebnisse TEER-Messung mit FACS-Messung.....	60
5.2.7	Beurteilung der Nanopartikel	60
6	Zusammenfassung	62
7	Anhang.....	64
8	Literaturverzeichnis	66
	Lebenslauf.....	77
	Erklärung	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Bluthirnschranke (Wilhelm et al. 2011)	5
Abbildung 2: Mechanismen der passiven Nanopartikelanreicherung	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Versuchsabläufe	24
Abbildung 4: Schematische Darstellung des statischen BHS-Modells	29
Abbildung 5: Skizze einer TEER-Messung in einer Monokultur	32
Abbildung 6: Belegung einer 96-Wellplatte, M: Medium, E: Endothelzellen	35
Abbildung 7: Endothelzellen Fluoreszenzmikroskopie	37
Abbildung 8: Endothelzellen: lichtmikroskopie (links) und fluoreszenzmikroskopische (rechts) Aufnahme von anti-CD31 angefärbten zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen	38
Abbildung 9: Astrozyten: Lichtmikroskopische (links) und fluoreszenzmikroskopische (rechts) Aufnahme	38
Abbildung 10: Querschnitt durch eine Membran mit zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen apikal und Astrozyten basal; HE-Färbung, erstellt von Dr. Verena Grützner	39
Abbildung 11: Effekt von Puromycin auf die Endothelzellbarriere	40
Abbildung 12: Entwicklung der TEER-Werte (Mittelwerte) unter verschiedener Kulturbedingungen	42
Abbildung 13: Entwicklung der TEER Werte unter 20-stündiger Inkubation mit Nanopartikeln	43
Abbildung 14: Fluoreszenzintensität nach 20-stündiger PFDL-SDS Inkubation der indirekten Kokulturen mit Konzentrationen von 150 µg/ml, 300 µg/ml und 1500 µg/ml	44
Abbildung 15: Fluoreszenzintensität nach 20-stündiger PLLA-SDS Inkubation der indirekten Kokulturen mit von 150 µg/ml, 300 µg/ml und 1500 µg/ml	45
Abbildung 16: Fluoreszenzintensität des PFDL-SDS Partikels und des PLLA-SDS Partikels	45
Abbildung 17: Prozentualer Anteil lebender und toter Endothelzellen nach 20-stündiger Inkubation mit PFDL-SDS	46
Abbildung 18: Prozentualer Anteil lebender und toter Endothelzellen nach 20-stündiger Inkubation mit PLLA-SDS	46
Abbildung 19: LDH-Toxizitätstest	47
Abbildung 20: Test der mitochondrialen Funktion	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	17
Tabelle 2: Mikroskope	17
Tabelle 3: Verbrauchsmaterial.....	18
Tabelle 4: Medien.....	19
Tabelle 5: Enzymlösung und Zusätze.....	20
Tabelle 6: Antikörper	21
Tabelle 7: Software	21
Tabelle 8: Nanopartikel.....	22
Tabelle 9: Inkubationszeit und Verdünnung Antikörper.....	31
Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichung zu Abbildung 11	64
Tabelle 11: Mittelwerte und Standardabweichung zu Abbildung 12	64
Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichung zu Abbildung 13	65
Tabelle 13: Mittelwert und Standardabweichung zu Abbildung 16	65
Tabelle 14: Mittelwerte und Standardabweichung zu Abbildung 17 und 18	65

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
7-AAD	7-Aminoactinomycin
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	arbitrary unit
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CCK	Cell Counting Kit
CD	Cluster of Differentiation
CMEC	cerebral microvascular endothelial cell
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECGM	Endothelial cell growth medium
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	fluorescence-activated cell scanning
FKS	Fetales Kälberserum
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
LDH	Laktatdehydrogenase
m	Milli
M	Molar
MDR	Multi-Drug-Resistance
MEM	Minimum essential medium
MRT	Magnetresonanztomografie

n	Nano
NPA	nitro propion acid
NVE	Neurovaskuläre Einheit
PBS	phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PFDL	Perfluorodecylacrylat
PLLA	Poly(L-Laktid)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PMI	N-(2,6-Diisopropylphenyl)-perylen-3,4-di
SDH	Succinatdehydrogenase
SDS	Sodiumdoceylsulfat
SS	Polystyrol
TC	Tissue culture
TEER	Transendothelial electrical resistance
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TJ	Tight junction
Tw	Tween
WST	water soluble tetrazolium

1 Einleitung

Die Medizin im 21. Jahrhundert entwickelt sich rasant. Die Pharmakotherapie schwer therapierbarer Erkrankungen, insbesondere Tumorerkrankungen stehen dabei im Mittelpunkt der Forschung. Während die Überlebenszeit und Überlebensqualität in den letzten Jahren in der Tumorthherapie deutlich gestiegen sind, stellen in der Therapie von Erkrankungen des zentralen Nervensystems die *Pharmakodynamik* und *Pharmakokinetik* eine besondere Herausforderung dar (Wang et al. 2014). Die bisher ungenügende und ineffiziente Erreichbarkeit des erwünschten Zielortes im zentralen Nervensystem könnte mit einem geeigneten Transportmechanismus für zahlreiche Patienten eine deutliche Verbesserung ihres meist chronisch progredienten Krankheitsverlaufes und die Etablierung bereits bekannter und neuer Wirkstoffe bedeuten.

Die Schwierigkeit hierbei wird vom menschlichen Organismus gebildet. Es handelt sich um eine zelluläre und interzelluläre Barriere, die *Blut-Hirn-Schranke (BHS)*. Daher nehmen Mechanismen zur Überwindung dieser Barriere in aktuellen Forschungen eine besondere Rolle ein, da man mit diesen zum einen den Patienten eine deutliche Erhöhung der Lebensqualität sowie -quantität ermöglichen und zum anderen somit auch die volkswirtschaftlichen Belastungen in Zukunft deutlich reduzieren könnte.

Aus diesem Grund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Erforschung eines Modells der Blut-Hirn-Schranke als Barriere, sowie deren Permeation mittels Trägersubstanzen. Es werden verschieden präklinische in-vitro Ansätze hierzu durchgeführt und untersucht, um sie in weiteren Forschungsarbeiten in-vivo weiter zu etablieren.

Zunächst soll in einem ersten Schritt ein geeignetes in-vitro Modell einer Blut-Hirn-Schranke etabliert werden, welches aus primären cerebrale mikrovaskulären Endothelzellen, im Folgenden als Endothelzellen oder CMEC (cerebral microvascular endothelial cell) genannt, und Astrozyten besteht, die aus Schweinegehirnen isoliert werden und bei dem reproduzierbar eine ausreichend gute Barrierefunktion messbar ist. Als Hauptziel werden hieran verschiedene Nanopartikel, die im Rahmen eines BMBF Verbundprojektes an Monokulturen auf ihre Aufnahme und Effekte auf die Zellvitalität überprüft und für weitere Untersuchungen selektioniert wurden, hinsichtlich ihres Vermögens die Barriere zu überwinden und im Hinblick auf eine mögliche toxische Interaktion mit Zellen der Bluthirnschranke getestet.

Hieraus ergeben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

- (I) Lässt sich mit Astrozyten und zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Schweinehirn eine stabile in-vitro Blut-Hirnschranke herstellen?
- (II) Werden bioabbaubare Poly(L)-Laktid und nicht-bioabbaubare Perfluorodecylacrylat Nanopartikel unterschiedlich in die zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen aufgenommen?
- (III) Gibt es eine konzentrationsabhängige Toxizität und Störung der BHS mit den verwendeten NP?

2 Stand der Forschung

2.1 Aufgabe der Blut-Hirn-Schranke

Die Bezeichnung *Blut-Hirn-Schranke* verdeutlicht bereits das herausragende anatomische Merkmal dieser funktionellen Einheit des Körpers als besonders undurchlässige Barriere zwischen dem vaskulären System einerseits und dem Extrazellularraum des zentralen Nervensystems andererseits. Diese Barriere besteht im Wesentlichen aus drei zellulären Bestandteilen. Hierbei kommt den Endothelzellen durch eine besonders dichte interzelluläre Konnektion, insbesondere mittels Tight-Junctions, die primäre Funktion zu (Greene und Campbell 2016). Bei der Ausbildung und Induktion des Zellwachstums und der Adhäsionsverbindungen sind Astrozyten und Perizyten beteiligt (Alvarez et al. 2013).

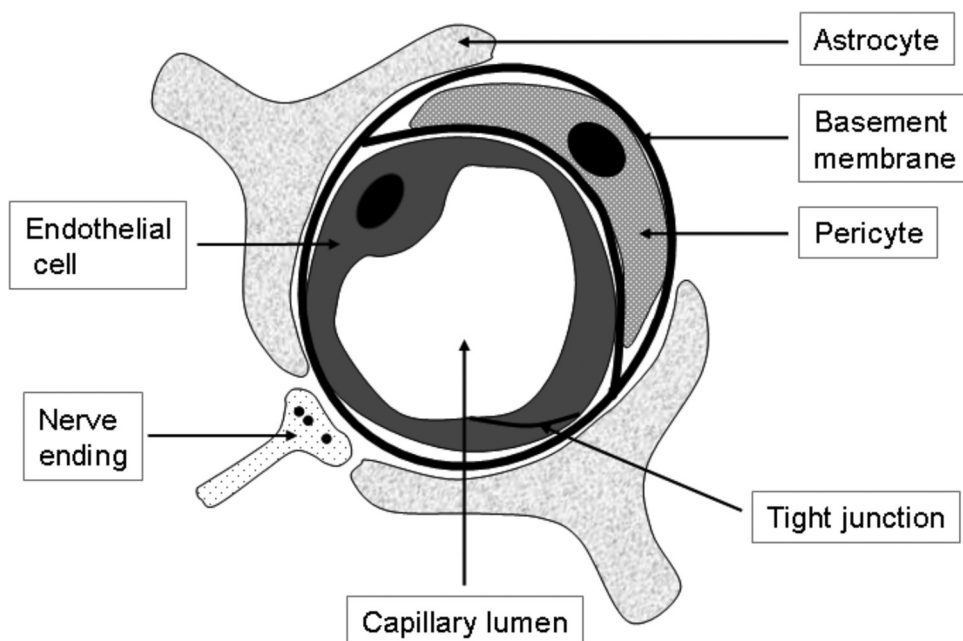


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Bluthirnschranke (Wilhelm et al. 2011) , gezeigt ist das Gefäßlumen einer cerebralen Kapillare, ausgekleidet durch eine cerebrale mikrovaskuläre Endothelzelle (CMEC), diese interagiert mit zahlreichen weiteren Zellen des ZNS, so mit Nervenendigungen, Astrozyten und Perizyten, für die Dichtigkeit der Kapillare sind u.a. die Basalmembran, sowie die tight junctions (TJ) maßgeblich beteiligt

Die Aufgabe der Blut-Hirn-Schranke besteht in der Homöostase der Bedingungen im zentralen Nervensystem, weshalb das gesamte Gefäßsystem von Gehirn und Rückenmark mit dieser Barriere versehen ist. Kein anderes Organ des Körpers hat eine derart hohe Stoffwechsellistung wie das ZNS. Es hat einen Massenanteil von circa zwei Prozent des Körpers, wohingegen der Nährstoffbedarf bei etwa 20 Prozent in Ruhe liegt (Wolf et al. 1996). Daher ist eine selektive Aufnahme von Stoffen zur Versorgung der Nervenzellen genauso wichtig, wie eine Entsorgung von Abbau- und Stoffwechselprodukten. Die Aufrechterhaltung des pH-Wertes, sowie die Regulierung der Konzentrationen von Natrium- und Kalium-Elektrolyten ist für die dichte Ansammlung von Nervenzellen von besonderer Bedeutung und dient der präzisen Einstellung der Ruhemembranpotentiale der Nervenzellen. Weiterhin schützt die Blut-Hirn-Schranke vor Erregern, Toxinen und vielen anderen Pathogenen, sowie Zellen des Immunsystems, die ebenfalls empfindlich die neuronalen Prozesse stören würden. Somit ist die Blut-Hirn-Schranke ebenfalls eine immunologische Barriere (Risau et al. 1990).

Unter pathologischen Bedingungen kann die Permeabilität der Barriere massiv gestört sein. Die Ausschüttung verschiedener Mediatoren wie Histamin, Bradykinin oder Tumornekrosefaktor α (TNF α) können diese massiv erhöhen. Zu diesen Erkrankungen gehören Gehirntumore, Ischämien, septische Enzephalopathien, multiple Sklerose oder die Alzheimer Demenz (Ballabh et al. 2004).

2.2 Endothelzelle

Der Name *Endothelzelle* leitet sich aus dem lateinischen „endothelium“ ab und bedeutet so viel wie „nach innen gerichtet“. Endothelzellen kleiden Blutgefäße aus und bilden damit Funktionseinheiten. Histologisch sind sie charakteristisch flache, einschichtige Plattenepithelien. Embryologisch differenzieren sie sich aus Angioblasten bzw. Hämangioblasten, womit sie mesodermalen Ursprungs sind (Ulfig und Brand-Saberi 2017).

Funktionell unterscheidet man je nach Lokalisation zwischen kontinuierlichem, diskontinuierlichem Endothel, wie man es in der Leber findet, und fenestriertem Endothel, wie es für die Filterfunktion der Niere benötigt wird. Im Gefäßsystem des zentralen Nervensystems findet man ausschließlich kontinuierliches Endothel, da hier die interzelluläre Schutzfunktion im Vordergrund steht. Der Stoffaustausch findet stark limitiert

durch unterschiedliche Transportmechanismen, wie z.B. durch rezeptorvermittelte Transzytose mittels Vesikel, statt (Welsch 2006).

Der Schutzmechanismus der CMEC wird insbesondere durch besonders Dichte Zell-Zell-Kontakte, den TJs gebildet. Histologisch handelt es sich bei diesen um schmale Stränge, welche aus Claudin und Occludin bestehen. Die extrazellulären Domänen dieser Proteine konnektieren und bilden so die Barriere aus, während die intrazellulären Domänen im Zytoskelett der Endothelzellen verankert sind (Tsukita et al. 2001). Somit wird ein Stoffaustausch an den Zellen vorbei, ein parazellulärer Transport, nahezu unmöglich. Ein Stoffaustausch ist nur durch spezifische Transportmechanismen durch die Zelle als transzellulärer Transport möglich. Diese Barriere bestehend aus TJs des nicht fenestrierten Endothels zusammen mit Basalmembran, Astrozytenfortsätzen, Perizyten, Mikroglia und neuronalen Endigungen fasst man unter dem Begriff Neurovaskuläre Einheit (NVE) zusammen (Zlokovic 2008; Sweeney et al. 2019).

Eine weitere wichtige Funktion der Endothelzellen ist deren Beteiligung an der Regulation der Blutgerinnung. So übernehmen sie die Produktion von gerinnungshemmenden Faktoren wie Heparin und Prostaglandin I₂, welches die Thrombozytenaktivierung hemmt. Darüber hinaus produzieren sie Gewebsplasminogenaktivator zur Aktivierung der Fibrinolyse durch hydrolytische Spaltung von Plasminogen zu Plasmin und regulieren somit die Auflösung von Thromben.

Auch in der physiologischen Regulation des Blutdrucks haben Endothelzellen in kleinen Arterien und Arteriolen eine wichtige Aufgabe. Bei erhöhter Schubspannung durch ansteigenden Druck und Volumen setzen die Zellen Stickstoffmonoxid frei, das vasodilatativ wirkt und somit zur Senkung des Blutdrucks beiträgt. (Welsch 2006)

2.3 Astrozyt und Perizyt

Der *Astrozyt* (von griechisch *astros* - Stern) verdankt seinen Namen seiner typischen sternförmigen Morphologie. Astrozyten gehören zu den Gliazellen (griechisch für Kitt) des zentralen Nervensystems und erfüllen dort eine Vielzahl von Aufgaben. Zusammen mit anderen Gliazellen bilden sie die Stütze der Neuronen und machen zusammen mehr als 90% der Zellen im ZNS aus (Zink und Pschyrembel). Daneben sind sie am Stoffaustausch zwischen Neuronen und Blut beteiligt, ebenso wie an der Umhül-

lung von Synapsen, der Modulation des zerebralen Blutflusses durch kontraktile Proteinie, die den Kapillardurchmesser je nach cerebralem Glukoseverbrauch verändern (Hamilton et al. 2010). Dieser Mechanismus wird als neurovaskuläre Kopplung bezeichnet (Attwell et al. 2010). Eine weitere wichtige Funktion ist die Regulation des Wasserhaushaltes des Gehirns. Hierzu haben die Astrozyten Aquaporin 4 Kanäle in den perivaskulären Endigungen (Iliff et al. 2012). Hierdurch kann auch die Kaliumionenkonzentration des Extrazellularraums beeinflusst werden. Weiterhin sind sie an der Cholesterin- und Apolipoprotein-E-Versorgung der Nervenzellen und nicht zuletzt an der Ausbildung der Bluthirnschranke. Hierbei spielen Wachstumsfaktoren wie BDNF und GDNF eine wichtige Rolle. Die Astrozyten induzieren über den sogenannten Hedgehog Pathway die Ausbildung von Proteinen der TJs, sowie die Ausbildung von Claudin-5 (Alvarez et al. 2011).

Astrozyten werden nach ihrer Morphologie weiter differenziert in fibrilläre Astrozyten und protoplasmatische Astrozyten. Fibrilläre Astrozyten haben typischerweise wenige lange Zytoplasmafortsätze und kommen vorwiegend in der weißen Substanz (substantia alba) vor, während die protoplasmatischen Astrozyten viele kaliberstarke Fortsätze ausbilden. Sie kommen vorwiegend in der grauen Substanz (substantia grisea) vor und werden in der vorliegenden Arbeit für den experimentellen Teil verwendet. Es kommen auch Mischtypen vor, die plasmato-fibrillären Astrozyten. Man findet sie beispielsweise am Übergang von substantia grisea zu substantia alba. Eine morphologische Veränderung zwischen den Typen ist möglich.

Im Rahmen von zytologischen Untersuchungen nimmt das saure Gliafaserprotein eine gesonderte Stelle ein. Die Funktion ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Vermutlich kontrolliert es die Zellform und ermöglicht die Beweglichkeit der Astrozyten (Papa et al. 2015). Es dient in der Tumorthherapie als Tumormarker für Astrozytome und in der Zytologie dem Nachweis der Zelle mittels Immunfärbung und ist damit einer der bedeutendsten Biomarker der ZNS-Forschung.

Perizyten stellen eine wenig differenzierte Gruppe kontraktiler Bindegewebszellen dar, die zusammen mit den Endothelzellen die Kapillaren bilden. Ihre Aufgaben sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Sie sind an der Endothelproliferation und Differenzierung der Endothelzellen, der Regulation des Kapillardurchmessers sowie der Synthese von Bestandteilen der extrazellulären Matrix und der Basalmembran beteiligt (Welsch 2006).

2.4 Problematik der BHS in der Pharmakotherapie

Die ausgesprochen selektive Durchlässigkeit der BHS stellt ein besonders präzise eingestelltes Milieu für das ZNS her. Diese Selektivität wird bewirkt durch die spezifische Aufnahme von Ionen und Molekülen ebenso wie durch Fernhalten aller potenziell schädlichen Substanzen einschließlich pharmakologischer Wirkstoffe. Erkrankungen, die direkt auf eine Dysfunktion der BHS zurückzuführen sind, sind aktuell ebenso Mittelpunkt der neurobiologischen Forschung, wie solche bei denen die Ursache intrazerebral vermutet wird. Bei hohem Leidensdruck von chronischen, zerebralen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Parkinson und Multiple Sklerose, besteht daher die besondere Dringlichkeit eben diese Barriere pharmakokinetisch in der Phase der Distribution zu erreichen, zu permeieren und zu überwinden. Dies wird in den letzten Jahren intensiv erforscht (Patel und Patel 2017). Hierbei ergeben sich, neben den Neuronen als Zielzellen der Pharmakokinetik, zum Teil neue Zielstrukturen wie die Bestandteile der BHS, also die Endothelzellen oder auch die Astrozyten. Ein Beispiel, bei dem die BHS selbst von der Erkrankung betroffen sein kann, ist die Multiple Sklerose. So kann bei der besonders aggressiven schubförmig remittierenden Multiplen Sklerose mittels MRT mit einem paramagnetischen Kontrastmittel sehr sensitiv eine Störung der BHS-Integrität nachgewiesen werden (McQuaid et al. 2009). Somit ist hier die BHS die primäre Zielstruktur der pharmakologischen Therapie.

2.5 *In-vivo* Blut-Hirn-Schrankenmodelle

Der Aufbau der BHS ist bei den meisten Säugetieren ähnlich, sodass sich Resultate aus *in-vivo* Versuchen gut eignen, um sie anschließend in klinischen Studien am Menschen weiter zu spezifizieren. Hierzu eignen sich besonders Schweine und Ratten zur Erforschung. Die Vorteile sind eine realistische Testung am lebenden Objekt, die in *in-vitro* Versuchen nicht erreicht werden kann.

Für die zunehmende Forschung hinsichtlich Permeation der BHS werden aber auch immer mehr Versuchstiere benötigt. Hierfür sind hohe Kapazitäten zur Haltung, sowie finanzielle Ressourcen zur Beschaffung der Tiere nötig. Weiterhin werden durch hohe ethische und formale Anforderungen die Versuche teuer und aufwendig. Daher ist es dringend erforderlich, mit anderen Verfahren eine Vorauswahl an Experimenten zu treffen, die erst im nächsten Schritt deutlich limitiert einer *in-vivo* Testung unterzogen

werden. Hierzu stehen mittlerweile *in-silico* Verfahren, sowie *in-vitro* Verfahren zur Verfügung. Bei *in-silico* Verfahren handelt es sich um ein Simulationsverfahren, um einen passiven Transport mittels Ladung, Lipophilie und Größe zu berechnen (Bickel 2005). Für eine Testung von Transportmöglichkeiten über bzw. in die Blut-Hirn-Schranke kommen seit einigen Jahren vermehrt *in-vitro* Modelle zum Einsatz. Auf diese wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

2.6 *In-vitro* Blut-Hirn-Schrankenmodelle

Seit den frühen 1980er Jahren existieren bereits Modellansätze zur Kultivierung von *in-vitro* Blut-Hirn-Schrankenmodellen, die in den vergangenen Jahren deutlich zugenommen haben (Bobilya 2010, 2012; Zhang et al. 2006; Smith et al. 2007a; Cohen-Kashi Malina et al. 2009b). Die Voraussetzung für die Kultivierung und Testung von Primärzellen sind ein noch aktiver Metabolismus. Dieser besteht auch nach vollständigem Aufbrauchen des ATP-Vorrates vorerst in der Zelle weiter (Lasbennes und Gayet 1984). Die Vorteile sind eine deutlich kostengünstigere Alternative zur direkten *in-vivo* Testung. Zudem ist eine nahezu unbegrenzte Reproduzierbarkeit gegeben, die dafür benötigten Primärzellen fallen meist als Abfallprodukt in der Fleischindustrie in großer Menge an oder können aus chirurgischen Eingriffen gewonnen werden. Hierzu zählen Stammzellen aus humanen Nabelschnüren (Volgina et al. 2012).

Es gibt zahlreiche Modelle zur Kultivierung von *in-vitro* Kulturen aus verschiedenen Primärzellen, etablierten Zelllinien, sowie verschiedenen Ansätzen in Monokulturen und Cokulturen. So verwendet Goldstein ein Modell aus Endothelzellmonokulturen noch metabolisch aktive Zellen aus Rattenkapillaren (Goldstein et al. 1975). Weiterhin beschreiben bereits Franke und Galle im Jahr 2000 ein Modell aus Schweineendothelzellen, an denen sie die Barriereintegrität durch die Aufnahme von ^{14}C -, ^3H -Retinsäure, ^3H -Retinol, ^3H -Inulin und ^3H -Succrose an einer Monokultur aus Endothelzellen testeten und daraus die Dichtigkeit in niedrig, hoch klassifizierten (Franke et al. 2000). Als größten Vorteil beschreiben sie die einfache Gewinnung und Reproduzierbarkeit des Modells. Ein Vergleich verschiedener Spezies zeigt, dass der *in-vivo* Phänotyp der Endothelzellen bei Schweineendothelzellen besser erhalten bleiben als bei anderen Spezies wie der Ratte (Patabendige und Abbott 2014).

Ein weiteres Modell aus dem Jahr 2003 beschreibt die Aussaat einer Cokultur erstmals aus verschiedenen alten Individuen im Alter von 3-4 Monaten und 10-20kg Gewicht und einer zweifachen Passage der Astrozyten aus Schweinehirnzellen (Jeliazkova-Mecheva und Bobilya 2003). Hierbei wurde die Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis des GFAP verwendet, welche die Astrozyten spezifisch identifiziert. Die Beurteilung der Barriere erfolgte auch bei dieser Untersuchung mittels Messung des transendothelialen Widerstandes (TEER) als Wert zur Beurteilung der Barriereintegrität. Hierzu gibt es sowohl in-vitro als auch in-vivo verschiedene Modelle. Das Modell, welches auch in dieser Arbeit verwendet wurde, beruht auf der Messung des Widerstandes zwischen zwei Elektroden, jeweils eine oberhalb und eine unterhalb, der Endothelzellen. Diese Methode wurde im Jahr 1999 von Franke und Galla verwendet, um eine porcine Endothelzellmonokultur zu untersuchen im Hinblick auf die Durchlässigkeit von Retinsäure, Succrose und Haloperidol (Franke et al. 1999). Hierbei konnten sie TEER-Werte zwischen 400 und 600 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ erzielen (Srinivasan et al. 2015).

Ein in-vitro Modell aus humanen Stammzellen, das zur Differenzierung unter anderem Retinsäure benötigt, wurde mit Astrozyten, Perizyten und Neuronen kultiviert und konnte so Widerstandswerte bis zu 4000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ generieren. Aktuelle Projekte zeigen besonders hohe TEER-Werte bei Behandlung der porcinen Kulturen mit Hydrocortison und einem Phosphodiesterasehemmers. (Nielsen et al. 2017). Hier konnten TEER-Werte bis über 1200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ gemessen werden. *In-vivo* geht man zum Vergleich von Widerstandswerten von 1500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ bis 2000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ aus (Butt et al. 1990).

2.7 Nanopartikel

Nanopartikel sind kleinste Teilchen von wenigen Nanometern bis etwa 0,5 µm Größe, die aufgrund ihrer speziellen physikalischen und strukturellen Eigenschaften aktuell im Mittelpunkt wissenschaftlicher Forschungen stehen. Die Besonderheiten liegen unter anderem in der präzisen, kontrollierbaren Freisetzung der Nanopartikel, hoher Stabilität im Organismus und teilweise geringer Toxizität. Ein wesentliches Merkmal ist, dass es möglich ist, sie als Trägersystem mit Wirkstoffen zu beladen und ihre Oberfläche modifiziert werden kann.

2.7.1 Einsatzgebiete der Nanopartikel

Ein Einsatzgebiet ist zum Beispiel in der Therapie von soliden und nicht soliden Tumoren, um diese gezielter zu erreichen als dies mit konventionellen Medikamenten bisher möglich ist (Swain et al. 2016). Hierbei gibt es neben der Wirksamkeit in *in-vitro* und *in-vivo* Versuchen gesetzliche Vorgaben bei der Verwendung/Zulassung, um epidemiologischen Auswirkungen vom Einsatz der Nanomaterialien zu erfassen. Denn Nanopartikel kommen nicht nur in der medizinischen Forschung vor, sondern werden bspw. auch Kosmetika und Waschmitteln zugesetzt und können in kumulativer Wirkung Einfluss auf die Gesundheit der Gesamtbevölkerung nehmen (Steinbach).

Von großer Relevanz sind Nanopartikel in der medizinischen Forschung, was auch in dieser Arbeit betrachtet wird. Hier bestehen große Hoffnung z.B. in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, bei denen eine orale, topische Anreicherung im entzündeten Darmgewebe mittels Nanoapplikationen deutlich besser möglich ist als mit der bisherigen Erstlinienmedikation mit Budesonid und Mesalazin. Diese werden durch die begleitenden Diarrhöen zum größten Teil ohne Wirkung wieder ausgeschieden (Collnot 2011). Mögliche Mechanismen, die zu einer besseren Akkumulation beitragen, sind eine erhöhte Permeabilität der Mukosaschleimhaut und eine Aufnahme durch Makrophagen im entzündeten Gewebe, die für einen spezifischen und effektiven Transport sorgen. Somit könnte eine niedrigere Dosierung mit einer höheren Aufnahme einhergehen und so eine erhöhte Wirksamkeit erreichen.

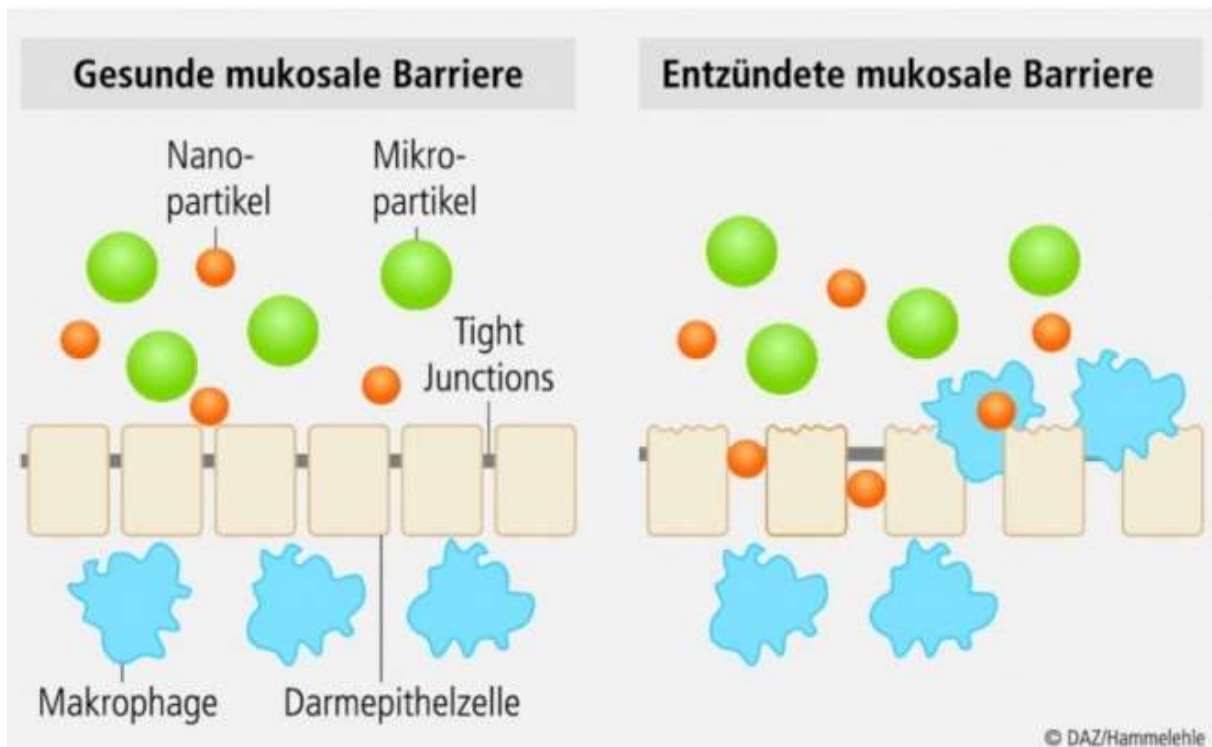


Abbildung 2: Mechanismen der passiven Nanopartikelanreicherung, dargestellt ist links eine intakte Darmbarriere mit tight junctions, die eine Aufnahme der Mikropartikel (grün) und Nanopartikel (orange) verhindert; in der rechten Abbildung können diese parazellulär in das entzündete Gewebe eindringen, dieser Vorgang wird durch Makrophagen begünstigt; Quelle: Deutsche Apothekerzeitung 27/2011

Noch schwieriger zu erreichen als die entzündete Mukosa im Darm ist das neuronale Gewebe des ZNS, das durch die Blut-Hirn-Schranke besonders geschützt ist (siehe 2.4 Problematik der BHS in der Pharmakotherapie). Hier stellen die Nanopartikel einen besonders wichtigen Ansatz für die zukünftige Therapie. Wegen ihrer geringen Größe können sie gut als wässrige Dispersion parenteral appliziert werden. Gekoppelt mit einem Wirkstoff können sie gezielt so hergestellt werden, dass sie sich in bestimmten Organen anreichern. Diesen Mechanismus nennt man Drug Targeting (Langer 2011). Hierzu werden die Nanopartikel so mit Liganden angepasst, dass sie an die spezifischen Transportsysteme der Blut-Hirn-Schranke adressiert werden und so spezifisch aufgenommen werden (siehe auch 2.3 Astrozyt und Perizyt). Entsprechend finden sich in der Literatur viele Beispiele an kolloidalen Arzneistoffträgern wie Nanopartikel und Liposomen, die solche Zielstrukturen gebunden aufweisen (Abbott et al. 2010; Michaelis et al. 2006; Huwlyer et al. 1996; Zensi et al. 2010; Zensi et al. 2009).

2.7.2 Hürden und Chancen in der Anwendung der Nanopartikel

Dem Drug Targeting und somit der gezielten Aufnahme gegenüber stehen Efflux-Transporter wie das P-Glykoprotein und die Multi-Drug-Resistance (MDR)-Proteine, die Fremdstoffe und somit auch die Nanoträgersysteme aktiv aus dem ZNS fernhalten. Diese, sowie das Toxizitätspotential, stellen die Problemfelder bei der Aufnahme in die Zielzellen dar (Adjei et al. 2014). Die Permeation hängt maßgeblich von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Nanopartikel ab, die durch Größe, Form und Ladung bestimmt wird (Schunck et al. 2016). Die Aufnahme der Nanopartikel in die Zielgewebe werden neben den spezifischen Transportmechanismen durch Phagozytose, die Translokation oder die unspezifische Aufnahme durch Diffusion ermöglicht. Spezifischer können sie je nach Eigenschaft Caveolin oder Clathrin vermittelt aufgenommen werden (Zhang et al. 2015). Die primäre Aufnahme erfolgt rezeptorvermittelt und adsorptionsvermittelt (Mukherjee et al. 1997). Diese spezifischen Mechanismen stellen auf der einen Seite eine Hürde dar, auf der anderen Seite sind sie auch die große Chance der Nanoforschung, selektiv und damit nebenwirkungsarm zum Zielort zu gelangen. Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Aufnahme maßgeblich beeinflusst, ist die Ladung der Nanopartikel, das sogenannte Zetapotential. Dieses unterscheidet sich zum Teil erheblich voneinander. Die Partikel können ein positives aber auch ein negatives Zetapotential aufweisen. In in-vivo Versuchen konnte hierbei gezeigt werden, dass Partikel mit einem negativen Zetapotential besser in das zentrale Nervensystem aufgenommen werden als weniger negativ geladenen Partikel oder positiv geladenen Nanopartikel (Roser et al. 1998; Owens und Peppas 2006). So haben auch die in dieser Arbeit verwendeten Partikel PFDL-SDS mit $-58\pm 3\text{mV}$ und PLLA-SDS mit $61\pm 4\text{mV}$ ein deutlich negativeres Potential als die gleichen Partikel, die Tween als Tensid haben (PFDL-Tween: $-7\pm 4\text{mV}$; PLLA-Tween: $-31\pm 3\text{mV}$).

2.7.3 Herstellung der Nanopartikel

Die Herstellung der Nanopartikel erfolgt auf unterschiedliche Weise. Exemplarisch wird hier die Herstellung eines Polystyrol- und eines PLLA-Partikels mittels Miniemulsionsverfahren beschrieben, da dieses auch für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Partikel zutrifft. Die Polystyrol-Partikel werden mittels Miniemulsionspolymerisation hergestellt. Dispersion und kontinuierliche Phase werden gemischt und mittels Ultraschalles homogenisiert. Dabei entstehen kleinste Tropfen, Nanotropfen, welche durch freie radikalische Polymerisation bei 72 Grad Celsius in feste Polystyrol-Nanopartikel umgewandelt werden. Die disperse Phase enthält neben dem Styrol einen Fluoreszenzfarbstoff und einen Initiator der Reaktion. Die kontinuierliche Phase besteht aus dem zu verwendeten Tensid und Wasser (Schunck et al. 2016). Die Größe des so entstandenen Partikels liegt bei $115 \text{ nm} \pm 19 \text{ nm}$. Es handelt sich um einen nicht-bio-abbaubaren Partikel, der intrazellulär verbleibt und nicht durch enzymatische Spaltung deaktiviert wird. Somit ist eine längere Wirkung vor Ort möglich. Gleichzeitig stellt dies allerdings auf eine Gefährdung für den Organismus dar, denn sollte sich der Partikel als toxisch erweisen, bedeutet dies eine längere toxische Wirkung vor Ort als bei bio-abbaubaren Partikeln.

Im Falle des PLLA-Partikels besteht die disperse Phase aus Poly(L-Laktid), einem Fluoreszenzfarbstoff und Chloroform. Die kontinuierliche Phase besteht ebenfalls aus Wasser und einem Tensid. Auch in diesem Ansatz erfolgt eine Homogenisierung durch Ultraschall. Anschließend wird das Chloroform bei 40 Grad Celsius verdampft, bis die PLLA-Kügelchen zu Ketten polymerisieren. Es entstehen Partikel mit einem Durchmesser von $125 \text{ nm} \pm 12 \text{ nm}$, Nanopartikel (Schunck et al. 2016)

Die Polylaktid-Partikel bleiben in der Blutbahn stabil. Dort interagieren sie mit Proteinen und bilden eine sogenannte Proteinkorona (Tenzer et al. 2013). Intrazellulär können sie enzymatisch gespalten werden. Somit können sie als Wirkstoffträger verwendet werden, indem der Wirkstoff so an den Zielort verbracht und dann entsprechend freigesetzt wird (Schunck et al. 2016).

2.8 Fragestellung

Eine in-vitro Testung verschiedener Nanopartikel und verschiedener Träger erfolgte im Verbundprojekt durch Frau Michaela Galley in der Arbeit „Charakterisierung und zeitliche Kinetik der Aufnahme von Nanopartikeln in C6-Gliomzellen, Astrozyten und zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen“ (Galley 2020). Die weitere in-vivo Testung erfolgte durch Herrn Patrick Bechinger in der Arbeit „Nanopartikel als Transportsysteme zur Therapie des Schädel-Hirn-Traumas: Analyse der zeitlichen Aufnahme in Organe und Überwindung der Blut-Hirn-Schranke von vier unterschiedlich funktionalisierten Poly(L-lactid) und Poly(perfluorodecylacrylat)-NP in der Ratte“ (Bechinger 2020).

Aus den vorangehenden Ausführungen in Zusammenhang mit den weiteren Arbeiten ergeben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen:

- (I) Lässt sich mit Astrozyten und zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Schweinehirn eine stabile in-vitro Blut-Hirnschranke herstellen?
- (II) Werden bioabbaubare Poly(L)-Laktid und nicht-bioabbaubare Perfluorodecylacrylat Nanopartikel unterschiedlich in die zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen aufgenommen?
- (III) Gibt es eine konzentrationsabhängige Toxizität und Störung der BHS mit den verwendeten NP?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Typ	Firma
ELISA-Reader	Tecam	Sunrise Remote Control
Heißluftsterilisator	Kendro	Kendro Laboratory Products
Sterilbank	Intermed	Nunc GmbH Wiesbaden
TEER-Messgerät	EVOMX	World Precision Instruments, Sarasota USA
Ultrazentrifuge	Sorvall	Thermo Scientific
Zentrifuge	Laborfuge 400R	Heraeus Instruments

3.1.2 Mikroskope

Tabelle 2: Mikroskope

Gerät	Typ	Firma
Phasenkontrastmikroskop	Telaval 3	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Konfokales Laser Scanning- Mikroskop Zeiss	710 NLO	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Keyence	Keyence

3.1.3 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Referenz	Firma, Ort
96-Well-Platte 100*20mm style		Corning Incorporated, Corning NY, USA
CellStar Zellkulturflasche, 250ml	658170	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Chamber Slide Lab-Tec II		Nunc, Rochester NY USA
Einweg-Skappelle Cutfix®		B.Braun Melsungen AG, Deutschland
Falcon konische Zentrifugenröhrchen 50ml	352070	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
Transwellplatten Costar		Corning Incorporated, Kennebunk USA

3.1.4 Medien

Tabelle 4: Medien

Abkürzung	Referenz	Medium	Zusätze	Hersteller
DMEM	41965-039	Dulbeccos modified eagle medium	DMEM + 10 FCS + 1% Penicillin/Streptomycin	Gibco, Carlsbad, Californien, USA
ECGM	C-22211	Endothelial cell basal medium	ECGM + 10% FCS + Supplementmix	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
MEM	21090-022	Minimum essential medium	MEM + 20mM HEPES buffer solution + 1% Penicillin/Streptomycin	Gibco, Carlsbad, Californien, USA
Aqua		Ecotrainer Aqua B. Braun		Braun, Melsingen Deutschland
Easycoll	L 6145	Easycoll Separation Solution		Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

3.1.5 Enzymlösungen

Tabelle 5: Enzymlösung und Zusätze

Enzym	Referenz	Hersteller
7AAD	51-68981E	BD Pharmigen, BD Biosciences
Accutase	ACC-18	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund Deutschland
Collagenase/Dispase I	10269638001	Roche Applied Sciences, Deutschland
Dispase II	04942078001	Roche Applied Sciences, Deutschland
Trypsin	L11-004	PAA Laboratories GmbH, Austria
Pen/Strep	15140-122	Gibco, Carlsbad, Californien, USA
Puromycin	A11138-03	Gibco, Carlsbad, Californien, USA
Supplementmix	C-39216	Promocell, Heidelberg, Deutschland

3.1.6 Antikörper

Tabelle 6: Antikörper

	Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper	GFAP	1:500	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Primärantikörper	CD31	1:50	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Primärantikörper	Occludin	1:500	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Sekundärantikörper	Alexa Fluor 488 anti rabbit	1:500-1:1.000	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Kernfärbung	Hoechst	1:10.000 in PBS	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Kernfärbung	NucRed	2 Tropfen pro ml PBS	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

3.1.7 Software

Tabelle 7: Software

Bezeichnung	Hersteller
BD Accuri C6 Software	BD Biosciences
Citavi	Swiss Academic Software
Excel 2019	Microsoft Corporation
Word 2019	Microsoft Corporation
Zen 2009 Light Edition 5.5.285.0	Carl Zeiss MicroImaging GmbH

3.1.8 Nanopartikel

Tabelle 8: Nanopartikel

Partikel	Tensid	Partikelmaterial	Farbstoff
PFDL-SDS	SDS	Perfluorodecylacrylat	PMI
PLLA-SDS	SDS	Poly(L-Lactid)	PMI
SS-SDS	SDS	Polystyrol	PMI
PFDL-Tw	Tween80	Perfluorodecylacrylat	PMI
PLLA-Tw	Tween80	Poly(L-Lactid)	PMI
SS-Tw	Tween80	Polystyrol	PMI

Die Nanopartikel wurden im Rahmen eines BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) Verbundprojektes (NanoBBB, FKZ 13N13258) freundlicherweise vom Fraunhofer-Institut für Mikrotechnik und Mikrosysteme hergestellt. Sie stellten ebenso Daten zu den Partikeln zur Verfügung. Nach einer Vorauswahl an Partikeln durch Versuche an Monokulturen von C6-Gliomzellen, Astrozyten und zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen, durchgeführt durch Frau Michaela Galley (Galley 2020), wurden die Nanopartikelversuche dieser Arbeit (3.2.7 Transendotheliale elektrische Widerstandsmessung (TEER), 3.2.8 Analyse mittels Durchflusszytometrie, 3.2.9 Toxizitätstests Astrozyten und zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen) auf zwei erfolgversprechende Partikel beschränkt. Hierbei handelt es sich um die beiden Partikel PLLA-SDS und PFDL-SDS.

3.1.9 LDH Toxizitätstest

Für den LDH-Toxizitätstest wird das CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay von Promega verwendet (G1780). Es beinhaltet einen fünf Fläschen Substrat Mix, 60ml Probenpuffer (Assay Buffer), 25µl LDH positiv Kontrolle, zehn Mal 5 ml Lyselösung (lysis solution) und 65 ml Stopplösung (Stop Solution).

Der Test basiert auf dem sensitiven Nachweis des Enzyms Laktat-Dehydrogenase (LDH) aus avitalen Zellen. Dieses oxidiert Laktat zu Pyruvat. Dabei wird NAD zu NADH reduziert. Dieses dient als Reduktionsmittel für das zugesetzte Substrat, welches durch Reduktasen zu Luziferin reagiert. Luziferin reagiert mit zugesetzter Luziferase und ATP zu einem Farbstoff, der mittels Photometrie in einem ELISA-Reader (Typ Tecam, Sunrise Remote Control) gemessen wurde. Das Assay wurde nach Vorgaben des Herstellers verwendet.

3.1.10 CCK8 Toxizitätstest

Für die Vitalitätstests wird das CCK-8 Assay der Firma Sigma Aldrich verwendet. Dieses beinhaltet den Farbstoff WST-8 (water soluble tetrazolium). Dieser wird durch freigesetzte Dehydrogenasen aus vitalen Zellen reduziert und sorgt so für eine kalorimetrische Veränderung der Lösung. Auch diese kann im Anschluss an die Reaktion photometrisch im ELISA-Reader bestimmt werden. Das Assay wurde nach Vorgaben des Herstellers verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Schematische Darstellung der Versuchsabläufe

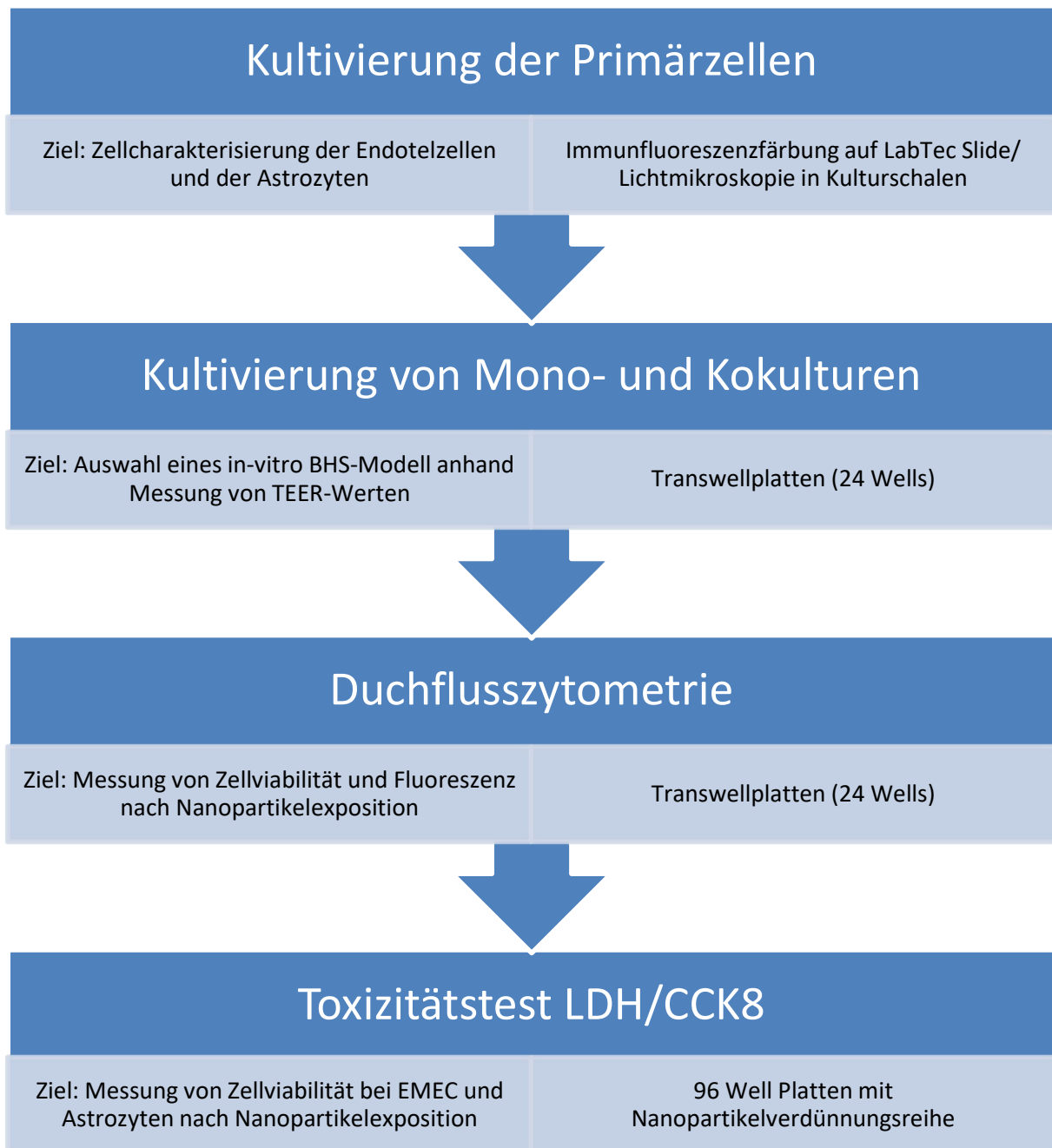


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Versuchsabläufe, gezeigt wird der zeitliche Ablauf in dem die Versuche durchgeführt wurden, unten links steht jeweils das Ziel der Versuchsreihe, unten rechts ist zu sehen, wie die Primärzellen kultiviert wurden, jeder Versuch wurde in mindestens 3 Replikaten durchgeführt

3.2.2 Isolation der Primärzellen

Die Gewinnung der primären Endothelzellen und Astrozyten erfolgte aus Schweinegehirnen, die unmittelbar nach der Schlachtung in das Transportmedium überführt wurden und in das Zelllabor befördert wurden. Hierbei lag der klinische Tod der Schweine erst wenige Minuten zurück, sodass der biologische Tod der zu isolierenden Zellen noch nicht eingetreten war. Die Hirne werden freundlicherweise von der Metzgerei Lumb in Ober-Olm zur Verfügung gestellt.

Unmittelbar nach Entfernung der Eingeweide durch den Metzger bei der Schlachtung, wird der Schädel zerteilt und die beiden Hirnhemisphären mit Handschuhen entnommen. Unverzüglich wurden diese in das Transportmedium MEM mit 50 mM HEPES, sowie je einprozentigem Amphotericin B und Penicillin/Streptomycin überführt. Das Transportgefäß war zuvor autoklaviert worden. Von diesem Schritt an erfolgte eine nahezu sterile Weiterverarbeitung, hierzu wurden die Hemisphären gekühlt in das Labor transportiert. Die Zeit von der Schlachtung bis zur Weiterverarbeitung betrug etwa 60 Minuten.

Alle weiteren Schritte erfolgten mit Handschuhen unter einer Werkbank mit Sterilabzug, um Kontaminationen vorzubeugen. Die Hemisphären wurden nacheinander in eine sterile Petrischale überführt und dort unter lichtmikroskopischer Kontrolle zunächst von den Meningen getrennt. Diese wurden mittels zweier steriler Pinzetten vorsichtig entfernt und entsorgt. Anschließend wurde mit Hilfe eines Skalpell vorsichtig die Substantia Grisea schichtweise abpräpariert und in ein auf Eis stehendes konisches Röhrchen im Weiteren „Falcon“ (Falcon by Corning Incorporated, USA) überführt, welches 20 ml MEM mit 50 mM HEPES, sowie einprozentig Amphotericin B und Pen/Strep enthielt.

Nach Präparation aller Hemisphären, in der Regel sechs an der Zahl, mit einem Gesamtvolumen von circa 15 ml grauer Substanz, wurde das Falcon bei 1500 Umdrehungen pro Minute (UpM) 5 Minuten bei vier Grad Celsius zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand des Mediums mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Nun wurden die Gewebestücke in 37°C warmer vorgefertigter Dispase II Lösung mindestens zehnfach resuspendiert, um eine homogene Suspension zu erhalten. Das Falcon wurde verschlossen, mit Parafilm nochmals abgedichtet und in liegender Position unter leichten Schwenken zum Verdau in ein 37 Grad warmes Wasserbad gelegt. Nach je 10, 20 und 30 Minuten wurde das Falcon kurz entnommen und ruhen gelassen, sodass die

Gewebestücke sedimentieren können und jeweils fünf Milliliter des Überstandes wurden abgenommen. Das Falcon mit der grauen Substanz wurde zum weiteren Verdau nach gründlicher Resuspension wieder in das Wasserbad gelegt. Die drei Überstände wurden durch einen 100 µm Nylonfilter in ein separates Falcon überführt. Dieses Falcon wurde nun bei 1500 UpM für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet enthielt dann die primären Astrozyten und wird nach Entfernung des Überstandes in Astrozytenmedium resuspendiert. Hierbei handelte es sich um DMEM (Hersteller Gibco), das mit zehnpotentigem fetalen Kälberserum (FKS) und einprozentig Pen/Strep versetzt wurde. Pro Hemisphäre wurden etwa vier Milliliter Medium verwendet. Anschließend erfolgte die Aussaat auf TC-Plastikschalen. Pro Schale (50 cm² Oberfläche) wurden zwei Hemisphären ausgesät. Dies ist gleichbedeutend mit einem Volumen von acht Millilitern der Astrozytensuspension. Die Schalen wurden danach in einem Brutschrank bei 37°C und fünf Prozent CO₂-Gehalt kultiviert.

Zur Endothelzellisolation wurde das Falcon, das sich noch im Wasserbad befand nach frühestens 60 Minuten Verdauzeit aus dem Wasserbad entnommen, nochmals mittels Pipette homogenisiert und bei 1500 UpM 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und verworfen. Zur Entfernung des Myelins, wurde das Pellet in 20 ml vorgefertigter 7°C kalter Dextranlösung (130mg/ml Dextran in MEM mit 50mM HEPES, sterilfiltriert) aufgelöst und anschließend bei 4500 UpM 10 Minuten zentrifugiert. Das nun oben aufschwimmende Myelin, sowie der sich darunter befindliche Überstand wurden abgenommen und verworfen. Das am Boden befindliche Pellet wurde in 10 ml 37°C warmer vorgefertigter Collagenase/Dispase-Lösung resuspendiert und erneut abgedichtet zum Verdau für 60 Minuten in das 37 Grad warme Wasserbad überführt.

In der Verdauzeit wurde der für den nächsten Schritt benötigte Dichtegradient erstellt. Hierzu wurden je 10 ml EasyColl Trennlösung (Easy Coll Separation Solution, Density 1,124g/ml, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) und 10 ml MEM versetzt mit 50 mM HEPES-Pufferlösung in ein autoklaviertes Sorvall-Zentrifugenröhrchen gegeben und steril verschlossen. Ein Tararöhrchen wurde mit Hilfe der Analysenwaage entsprechend vorbereitet. Nun erfolgte die Zentrifugation in einer Ultrazentrifuge bei 14750 UpM, 50 Minuten lang mit festem Rotor und ohne Bremse.

Nach der Verdauzeit von 60 Minuten wurde die Lösung bei 2500 UpM 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Das übriggebliebene Pellet wurde nun in 1 ml MEM, versetzt mit 50 mM HEPES, mehrfach resuspendiert und vorsichtig auf den vorbereiteten Dichtegradienten (10 ml EasyColl Trennlösung [Easy Coll Separation Solution, Density 1,124g/ml, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland] und 10 ml MEM, 50 mM HEPES-Pufferlösung) überführt. Anschließend wird der Gradient bei 1000 UpM 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Es bildet sich im oberen Drittel des Röhrchens eine dünne graue Wolke, in der die zerebralen, mikrovaskulären Endothelzellen enthalten sind. Diese wird vorsichtig mit einer Pipette entnommen und in ein neues Falcon mit 20 ml PBS-Pufferlösung überführt. Nach gründlicher Durchmischung wird die Lösung bei 1500 UpM 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand wieder vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Das Pellet wird noch einmal in 5 ml PBS resuspendiert und unter gleichen Bedingungen wie zuvor abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die verbliebenen cerebralen Gefäßfragmente wurden in Endothelzellmedium (ECGM mit Supplement Mix, 10% FCS, sowie einprozentig Pen/Strep) resuspendiert und auf Collagen-I-beschichteten Oberflächen ausgesät. Hierbei werden die mikrovaskulären Endothelzellen dreier Hirne auf ca. 50 cm² Oberfläche ausgesät. Dies bedeutet für die Versuche im Transwellsystem (Costar Corning Incorporated, Kennebruk USA) etwa das Volumen einer Hemisphäre auf 24 Wells (24·0,33cm²).

3.2.3 Kultivierung der Primärzellen

Am ersten Tag nach der Aussaat der Astrozyten auf Tissue Culture-Plastik Schalen (TC-Schalen), wurden diese mit jeweils 4ml PBS-Lösung gewaschen. Dazu wurde vorher das Medium bzw. beim zweiten und dritten Mal die PBS-Lösung abgesaugt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, anschließend wurden je 8ml frisches auf 37 Grad vorgewärmtes DMEM +10% FKS + 1% Pen/Strep hinzugegeben. Analog dazu erfolgte der nächste Mediumwechsel am dritten Tag nach Aussaat und danach alle drei Tage bis die Astrozyten konfluent gewachsen waren.

Um eine höhere Anzahl an Zellen zu generieren, können die Astrozytenkulturen gesplittet werden. Auch hierzu werden die Kulturen zunächst drei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wird pro 50 cm² Schale 1 ml 0,25%iges Trypsin pipettiert und

durch Schwenken der Schale auf der Kultur verteilt. Zur besseren enzymatischen Aktivierung werden die Schalen 60-90 Sekunden bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Die vollständige Ablösung der Zellen von der Platte, sowie voneinander, kann lichtmikroskopisch kontrolliert werden. Nach Einwirken des Trypsins wird die Reaktion durch Zugabe von 10ml DMEM beendet. Die Zell-Medium-Suspension wird in ein Falcon überführt und auf 24ml Volumen pro abgelöster Astrozytenkultur mit DMEM aufgefüllt. Im Anschluss werden jeweils 8ml pro Schale ausgesät, sodass sich ein Verhältnis von 1:3 bei der Astrozytenanzahl im Vergleich mit der konfluent gewachsenen Kultur ergibt. Die Kultivierung erfolgt nun wieder gemäß der Kultivierung der primären Aussaat. Vor jedem Mediumwechsel erfolgt eine lichtmikroskopische Kontrolle der Zellen im Hinblick auf Kontamination, Größe, Morphologie und Dichte des Wachstums.

Die Kultivierung der zerebralen, mikrovaskulären Endothelzellen erfolgt im Unterschied zu den Astrozyten auf Kollagen-I beschichteten Schalen. Das Medium ist hierbei ECGM mit 10% FKS und Supplementmix. Der Mediumwechsel erfolgt an den gleichen Tagen wie bei den Astrozyten, ebenfalls nach waschen der Kulturen mit PBS. In der lichtmikroskopischen Kontrolle sieht man nach kurzer Zeit bereits die beginnende Aussprossung der Endothelzellen aus den Kapillarfragmenten.

3.2.4 Zellaussaat auf Transwellsystem

Zur Vorbereitung der Zellaussaat erfolgt eine Kultivierung von Astrozyten, sowie eine Isolation von Endothelzellen aus Schweinegehirnen. Die Astrozyten stammen immer aus einer vorangegangenen Isolation, da die parallel zu den Endothelzellen gewonnenen Astrozyten deutlich länger zum Ausbilden ihrer typischen Morphologie benötigen als die Endothelzellen. Parallel zur Isolation der Endothelzellen erfolgt eine Kollagenierung der dünnen Membranen der Wellinserts (3.2.5 Kollagenierung der Transwellsysteme). Dies dient der besseren Adhäsion, sowie der apikal-basalen Differenzierung der Endothelzellen. Im Anschluss hieran erfolgt je nach Versuchsanordnung von Astrozyten zu Endothelzellen ein unterschiedliches Vorgehen. Hierbei werden für die indirekten Cokulturen die Astrozyten aus den Kulturschalen mit Trypsin abgelöst und in DMEM resuspendiert. Es erfolgt eine Zählung der Astrozyten in der Neubauer-Zählkammer. Aus der ermittelten Zellzahl pro Milliliter wird eine Verdünnung hergestellt, sodass sich 45.000 Astrozyten pro Milliliter befinden. Hiervon wird je 1 ml in jedes Well

pipettiert und für 3 Tage bebrütet dabei wird am Tag nach der Aussaat zur Entfernung der Trypsinreste ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei der indirekten Cokultur erfolgt am dritten Tag nach Aussaat die Zusammensetzung des Inserts in das Well mit den Astrozyten. Dort wird das Medium von DMEM auf ECGM gewechselt. Eine Zugabe von Puromycin erfolgt ab dann nicht mehr, da dieses einen toxischen Effekt auf die Astrozyten hat. Der Effekt von Puromycin auf die Zellen wird in Kapitel 5.2.2 Einfluss des Puromycins und des Mediumwechsels auf die Barriereintegrität beschrieben.

Die Herstellung einer direkten Cokultur ist durch die Anordnung der Astrozyten auf der Unterseite der Membran erschwert. Hierzu werden die Einsätze der Wells steril mit einer Pinzette in einer zuvor autoklavierter Aluminiumbox umgedreht. Anschließend erfolgt eine Verdünnung der vorbereiteten Astrozytensuspension auf 300 Astrozyten pro Mikroliter. Hiervon werden jeweils 50 µl auf jede Unterseite pipettiert und ca. 15.000 Astrozyten durch vorsichtiges seitliches Bewegen der Einsätze auf der gesamten Membran verteilt. Der Ansatz wird so für eine Stunde in den Brutschrank gestellt. Hiernach wird das überschüssige Medium abgesaugt, die Astrozyten sind zum Teil bereits adhärent an der Membran und das Insert wird wieder in das Well eingesetzt. Das untere Kompartiment wird mit ECGM ohne Puromycin gefüllt. Die Oberseite wird in beiden Versuchsansätzen mit jeweils 50 µl Endothelzellsuspension gefüllt. Hierbei wird das gewonnene Endothel einer Schweinegehirnhemisphäre auf 24 Wells verteilt.

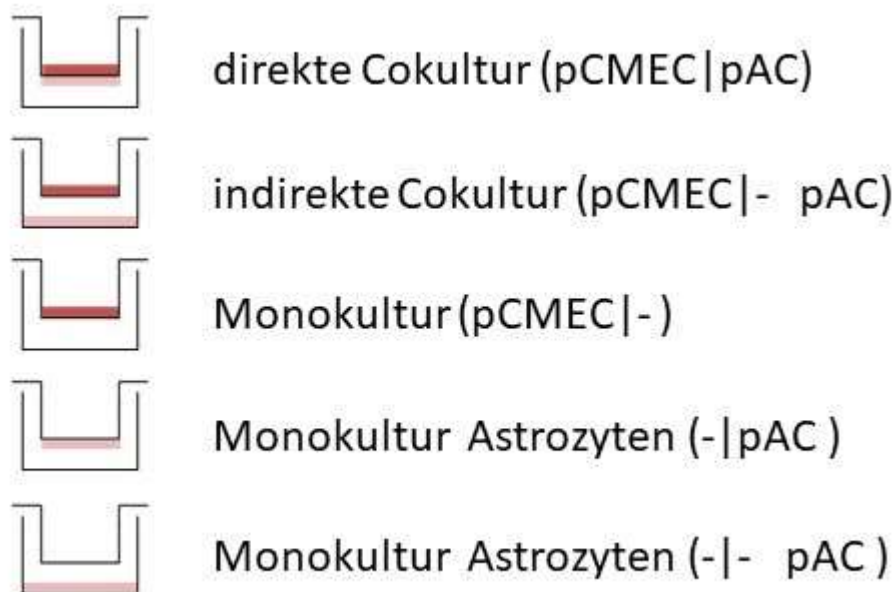


Abbildung 4: Schematische Darstellung des statischen BHS-Modells, zu sehen sind die Anordnungen der Endothelzellen (CMEC) in dunkelbraun und die Astrozyten in hellbraun, Abbildung von Dr. Verena Grützner

3.2.5 Kollagenierung der Transwellsysteme

Die Kollagenierung der Transwellsysteme erfolgt vor der Aussaat der Endothelzellen und der Astrozyten. Dazu wird eine Kollagen-I-Lösung in einer Konzentration von 3 mg/ml in 0,1% Essigsäure angesetzt. Von der Lösung werden in jedes Well 50 µl pipettiert und dann, verschlossen mit ihrem Deckel, vorsichtig durch leichtes Schwenken der Platte unter visueller Kontrolle über die gesamte Membranoberfläche verteilt. Anschließend werden die Platten zur Inkubation eine Stunde ruhen gelassen. Nach der Inkubation werden die Überstände vorsichtig abgesaugt und die Membranen drei Mal mit je 200 µl sterilem destillierten Wasser gewaschen und unter der Sterilbank offen eine Stunde luftgetrocknet.

Die Aussaat der Zellen auf das Transwellsystem erfolgt gemäß Schema in die unterschiedlichen Kompartimente des Wells. So werden die Endothelzellen immer auf die Oberseite der zuvor mit Kollagen beschichteten Membran ausgesät. Die Oberfläche beträgt hierbei 0,33 cm² pro Well, sodass bei 24 Wells pro Platte die Gesamtfläche 8 cm² beträgt. Hieraus ergibt sich ein Endothelzellbedarf für eine Platte von etwa einer Gehirnhemisphäre, die in ECGM ausgesät wird. Je nach Versuchsansatz wird dem Medium noch 3 µg/ml Puromycin zugesetzt. Das Volumen pro Well beträgt 200 µl.

3.2.6 Zellcharakterisierung

Die Charakterisierung der Endothelzellen und der Astrozyten erfolgt mittels Phasenkontrastmikroskopie und spezifischen Immunfluoreszenzfärbungen. Hierzu werden die Zellen jeweils wie oben beschrieben isoliert und auf Labtec Objektträger® ausgesät. Die Astrozyten werden mit GFAP angefärbt, die Endothelzellen mit Occludin und CD31 als spezifische Marker. Es erfolgt ein Feinschnitt durch eine Insertmembran der direkten Cokultur. Diese wird angefärbt, sodass die Endothelzellen auf der Oberseite und die Astrozyten auf der Unterseite dargestellt werden können.

Zuvor werden die Insertmembranen analog der Transwellsysteme mit einer Kollagen-I-Beschichtung versehen. Die Volumina sind entsprechend der Größe der Oberflächen mit 200 µl Kollagenlösung und 800 µl Aqua dest. zur Spülung gewählt.

Sobald die Zellen mikroskopisch konfluent gewachsen sind, werden die Mediumüberstände entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Der Überstand wird erneut entfernt und die Zellen mit jeweils 200 µl Paraformaldehyd (PFA) bedeckt und für

15 Minuten bei Raumtemperatur damit inkubiert. Im Anschluss wird das PFA abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Hiernach erfolgt eine Permeabilisierung der Zellen für 10 Minuten mit 0,2%iger Triton X-100 Lösung. Nach einem weiteren Waschgang mit PBS werden die Primärantikörper aufgetragen. Diese werden in 1%iger boviner Serumalbuminlösung gemäß Tabelle gelöst auf die Zellen gegeben und die jeweils 200 µl pro Well für 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren gelassen. Das Serumalbumin dient der Blockade unspezifischer Antikörperbindungsstellen.

Tabelle 9: Inkubationszeit und Verdünnung Antikörper

	Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit [min]
Primärantikörper	GFAP	1:500	120
Primärantikörper	CD31	1:50	120
Primärantikörper	Occludin	1:500	120
Sekundärantikörper	Alexa Fluor 488 anti rabbit	1:500-1:1.000	60
Kernfärbung	Hoechst	1:10.000 in PBS	10
Kernfärbung	NucRed	2 Tropfen pro ml PBS	15

Nach der Inkubation der Primärantikörper werden die Zellen dreimal mit PBS, dem 0,05% Tween zugesetzt ist, gewaschen. Hiernach werden der Sekundärantikörper in 1% BSA verdünnt (gemäß Tabelle) und 60 Minuten bei Dunkelheit inkubieren gelassen. Nach erneutem dreimaligen waschen mit PBS + 0,05% Tween werden die Kammern der Objektträger mit dem mitgelieferten Schieber vorsichtig entfernt und ein Tropfen Eindeckmedium mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) aufgetragen, das zur Kernfärbung, sowie als Eindeckmedium dient. Nun wird das Deckglas vorsichtig ohne Luftblasenbildung von der Seite beginnend aufgelegt und die Zellen dunkel im Kühlschrank bis zur Mikroskopie gelagert. Diese erfolgt innerhalb von 24 Stunden nach der Zellfärbung.

3.2.7 Transendotheliale elektrische Widerstandsmessung (TEER)

Neben der Immunfluoreszenzfärbung der Primärzellen erfolgt eine Widerstandsmessung über die mit Endothelzellen bestückte Membran der Transwellsysteme hinweg. Die Ergebnisse der TEER- Messung lassen Rückschlüsse auf die Ausbildung eines konfluenten Zelllayers, sowie die Ausbildung von Zell-Zell Kontakten zu.

Hierzu wird eine zweipolige Elektrode (EVOMX) vorbereitend mit beiden Polen für 15 Minuten in 70%igen vergällten Ethanol gestellt. Hiernach wird die Elektrode in ein Falcon PBS getaucht, um keine toxischen Ethanolreste in den Versuchsansatz zu verschleppen. Die Messung erfolgt gemäß Abbildung 5: Skizze einer TEER-Messung in einer Monokultur, zu sehen ist die Anordnung der Elektroden der EVOMX im oberen und unteren Kompartiment der Versuchsansätze, hieraus geht hervor, dass der Widerstand über die Endothelzellen (grün) gemessen werden kann und die Medien der beiden Kompartimente nicht miteinander gemischt werdendurch die Aussparungen in den Wells, sodass sich eine Elektrode im oberen Kompartiment und die zweite, längere Elektrode im unteren Kompartiment des Versuchsansatzes befindet.

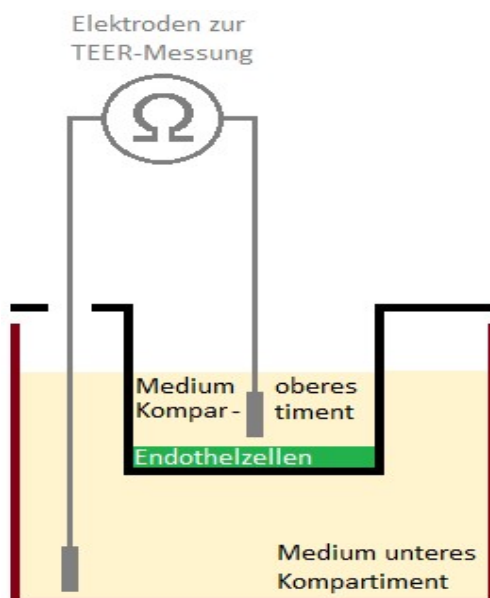


Abbildung 5: Skizze einer TEER-Messung in einer Monokultur, zu sehen ist die Anordnung der Elektroden der EVOMX im oberen und unteren Kompartiment der Versuchsansätze, hieraus geht hervor, dass der Widerstand über die Endothelzellen (grün) gemessen werden kann und die Medien der beiden Kompartimente nicht miteinander gemischt werden

Der gemessene Widerstand wird notiert und später von $\Omega \cdot 0,33 \text{ cm}^2$ in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ umgerechnet. Nach der Messung wird die Elektrode erneut mit PBS gereinigt und über den Zeitraum eines Versuches in 50 ml 1 M Kaliumchloridlösung gestellt. Jeder Versuchsansatz wird an drei biologischen Replikaten wiederholt.

3.2.8 Analyse mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie auch fluorescence-activated cell scanning (FACS-Analyse) erfolgt am Tag nach Nanopartikelzugabe in den Transwell-Versuchsreihen (3.2.4 Zellaussaat auf Transwellssystem). Pro Probe werden je zwei Wells mit gleicher Nanopartikelkonzentration gepoolt, um eine ausreichende Zahl an Endothelzellen für die Messung sicherzustellen. Zunächst werden die Überstände in Kryoröhrchen gesammelt. Anschließend wird in jedes Well 50 μl Accutase gegeben und vorsichtig durch Schwenken der Platte über die gesamte Oberfläche verteilt. Es folgt eine Inkubation über 30 Minuten im Brutschrank. Hiernach werden die Wells mit 150 μl ECGM aufgefüllt und mit der Pipette gründlich resuspendiert, um möglichst alle abgelösten Zellen zu mobilisieren. Die Suspensionen werden nun gepoolt. Es werden jeweils zwei gleiche Ansätze in ein Kryoröhrchen überführt und anschließend abzentrifugiert. Die Überstände werden verworfen und das Zellpellet in 300 μl reines DMEM aufgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Es erfolgt eine Zugabe von jeweils 3 μl 7-AAD (7-Aminoactinomycin) pro FACS-Röhrchen. Hiernach werden die Röhrchen mit Aluminiumfolie abgedeckt und zügig die FACS-Messung durchgeführt.

Die Datenauswertung erfolgt mit der BD Accuri C6 Software von BD Biosciences. Diese erstellt einen Plot mit dem forward scatter (FSC) der gegen den sideward scatter (SSC) aufgetragen wird. Die jeweilige Zellpopulation wird durch ein Gate gekennzeichnet. Im zweiten Gate wird die ausgewählte Population auf Vitalität betrachtet. Hierzu wurde vorab der Farbstoff 7-AAD hinzugefügt. In diesem Plot werden nun nur die vitalen Zellen ausgewählt, um sie in einem dritten Gate gegen die Fluoreszenzintensität aufzutragen. Hierzu werden mindestens 10.000 Zellen gemessen und der Median bestimmt.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzintensität der beiden Partikel müssen zum Vergleich zunächst normiert werden, da die Nanopartikel bei der Synthese unterschiedliche Mengen an Farbstoff erhalten. Hierzu werden aus den Mittelwerten der Fluoreszenzintensitätsmessungen die Leuchtkraft bezogen auf den stärker fluoreszierenden Partikel bestimmt. Der schwächer fluoreszierende Partikel wird auf 100% gesetzt und entsprechend der stärker fluoreszierende Partikel angepasst:

Der Faktor für die Normierung ergibt sich aus: $Faktor = \frac{1}{Leuchtkraft\ des\ Partikels}$

Somit ergibt sich als normiertes Ergebnis:

$$Normierung = Fluoreszenzintensität * Faktor$$

Dieses ist für den schwächeren Partikel gleich eins.

3.2.9 Toxizitätstests Astrozyten und zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen

3.2.9.1 LDH Toxizitätstest

Der LDH-Toxizitätstest der Firma Promocell wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Für den LDH-Test werden analog zu den Transwellsystemen Endothelzellen in eine 96-Well-Platte ausgesät. Bestückt werden hierbei die Reihen D-H. Die Reihen A-C dienen als Kontrolle ohne Endothelzellen gemäß Abbildung 6: Belegung einer 96-Wellplatte. Der Mediumwechsel des DMEM erfolgt an den Tagen 1, 3 und 6. Der Test wird an Tag 9 und 10 nach Aussaat durchgeführt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M 150 µl			M+Mix+Stopp			Triton X 100			3-NPA		
B	M+1500 PFDL			M+150 PFDL			M+37,5 PFDL			M+9,375 PFDL		
C	M+1500 PLLA			M+150 PLLA			M+37,5 PLLA			M+9,375 PLLA		
D	E+1500 PFDL			E+300 PFDL			E+150 PFDL			E+75 PFDL		
E	E+37,5 PFDL			E+18,75 PFDL			E+9,375 PFDL			E+4,69 PFDL		
F	E+1500 PLLA			E+300 PLLA			E+150 PLLA			E+75 PLLA		
G	E+37,5 PLLA			E+18,75 PLLA			E+9,375 PLLA			E+4,69 PLLA		
H	Endos			E+Lyse			E+3-NPA			Endos		

Abbildung 6: Belegung einer 96-Wellplatte, M: Medium, E: Endothelzellen, dargestellt ist die Belegung stets mit Triplets und einer absteigenden Konzentration der Nanopartikel, in den Reihen A-C ohne Nanopartikel, in den Reihen D-H wurden zuvor Endothelzellen ausgesät

Hierzu werden am Tag 9 nach Aussaat ein Großteil der Zellen und die Kontrollen mit Nanopartikeln bestückt, gemäß Abbildung 5. Dies geschieht aus einer Verdünnungsreihe. Jede Konzentration wird dreimal eingesetzt. Der Ansatz wird für 20 Stunden zur Inkubation in den Brutschrank gestellt. Am Tag der Messung werden bei drei Wells das Medium abgesaugt und durch 0,1% Triton X ersetzt und bei drei weiteren Wells 50 µl Medium entfernt und 15 µl 3-NPA (nitro propion acid) hinzugegeben und anschließend werden beide Ansätze für eine weitere Stunde inkubiert. Die Zugabe des 3-NPAs bewirkt *in-vitro* eine Deaktivierung des Enzyms Succinat Dehydrogenase (SDH) der mitochondrialen Atmungskette, wodurch diese zum Erliegen kommt (Scallet et al. 2001). Im Anschluss werden von sämtlichen Wells 50 µl mit einer Multipipette auf eine neue Platte übertragen. Dort werden 50 µl Substratmix hinzugefügt und mittels Multipipette durchmischt. Der Ansatz wird 30 Minuten zur Inkubation in den Brutschrank gestellt, anschließend wird durch Zugabe von je 50 µl Stoppreagenz die Reaktion beendet und die Platte verschlossen und in Alufolie eingepackt. Im ELISA-Rea-

der erfolgt innerhalb der vom Hersteller angegebenen zeitlichen Fristen eine photometrische Absorptionsmessung bei 492 nm Wellenlänge. Dieser Test wird an drei biologischen Replikaten durchgeführt.

3.2.9.2 CCK-8 Toxizitätstest

Der Toxizitätstest mittels Cell-Counting Kit der Firma Sigma Aldrich wird gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Der CCK-8 Toxizitätstest erfolgt aus den gleichen Versuchsansätzen wie der LDH-Test. Auch hier werden zunächst die entsprechenden Wells mit 3-NPA und Triton X100 versetzt und eine Stunde inkubiert. Im Anschluss erfolgt das Abpipettieren von 50 µl Medium, sodass pro Well ein Volumen von 150 µl sowie die Primärzellen verbleiben. Entsprechend der Herstellerangabe wird nun das CCK-8 für 5 Minuten bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und es werden 15 µl der CCK-8 Lösung in jedes Well pipettiert und eine Stunde inkubiert. Hiernach werden jeweils 100 µl in eine neue Platte übertragen und unmittelbar eine Messung in ELISA-Reader bei 450 nm Wellenlänge durchgeführt. Dabei wird auf ein blasenfreies Pipettieren besonders geachtet, um eine Fehlmessung durch Luftblasen zu vermeiden. Auch dieser Test wird, sowohl mit Endothelzellen als auch mit Astrozyten, an drei biologischen Replikaten durchgeführt (siehe auch Abbildung 3: Schematische Darstellung der Versuchsabläufe).

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Primärzellen

Aus Schweinegehirnen können Endothelzellen und Astrozyten erfolgreich und vital isoliert und auf Membranen ausgesät werden. Die Lichtmikroskopie zeigt zellmorphologische Charakteristika der entsprechenden Zellpopulationen. Ebenso belegt die Immunfluoreszenzfärbung die charakteristische Expression von GFAP bei den Astrozyten und CD31 sowie Occludin als spezifischen Marker bei porcinen Endothelzellen. Alle Versuchsansätze zeigen in der Lichtmikroskopie die typische Morphologie. Die stichprobenartig durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen beweisen die charakteristische Expression von GFAP bei Astrozyten und Occludin und CD31 bei Endothelzellen.

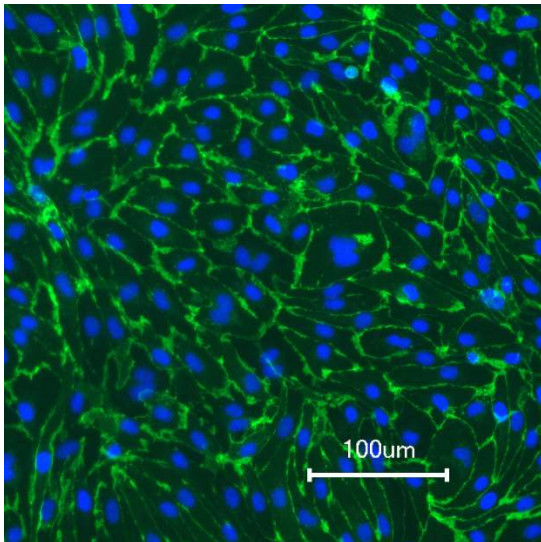


Abbildung 7: Endothelzellen Fluoreszenzmikroskopie , Vergrößerung 40x, CD31 Färbung, die Grüne Farbe stellt CD31 dar, was in den Zell-Zell Kontakten der Endothelzellen zu finden ist, der blaue Farbstoff stellt die Zellkerne dar

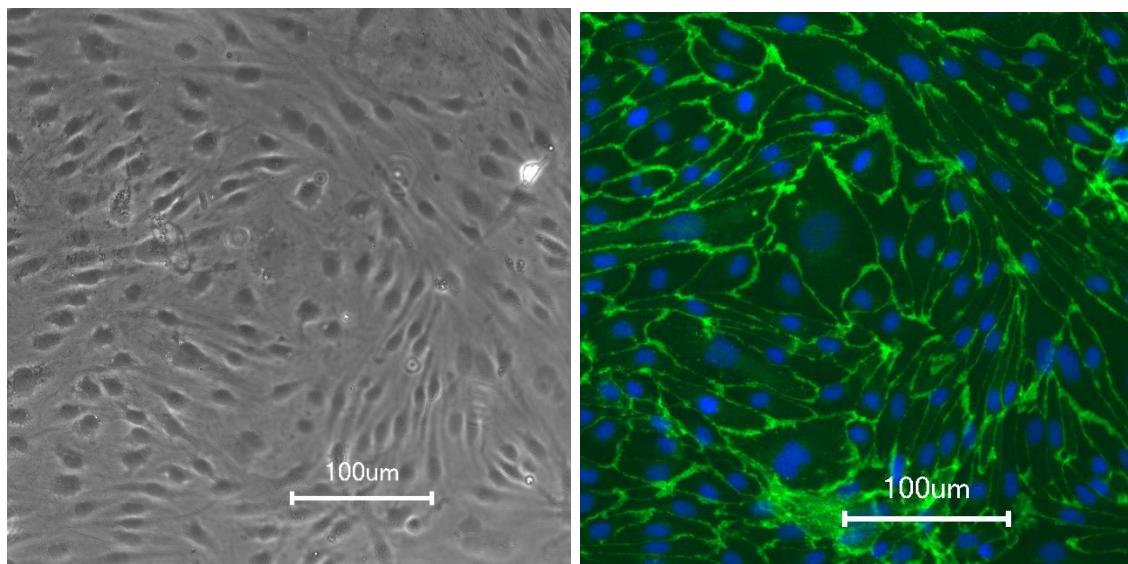


Abbildung 8: Endothelzellen: lichtmikroskopie (links) und fluoreszenzmikroskopische (rechts) Aufnahme von anti-CD31 angefärbten zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen , Vergrößerung 40x, Dargestellt in grün ist CD31, was in den Zell-Zell Kontakten der Endothelzellen zu finden ist und in blau die DAPI gefärbten Zellkerne

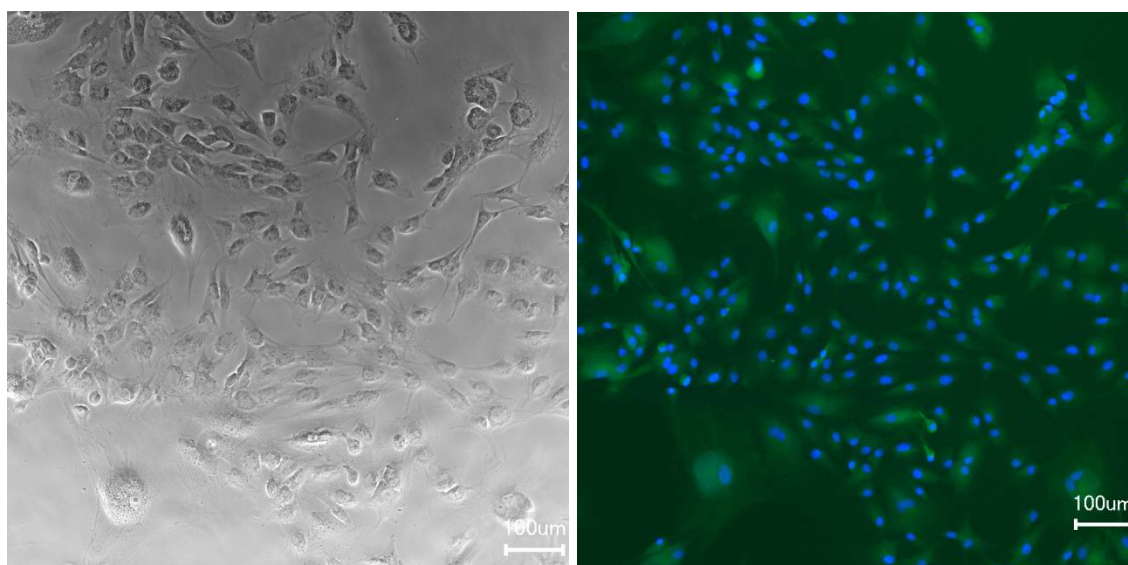


Abbildung 9: Astrozyten: Lichtmikroskopische (links) und fluoreszenzmikroskopische (rechts) Aufnahme , Vergrößerung 40x, Dargestellt in grün sind anti GFAP gefärbte Astrozyten und in blau die DAPI gefärbten Zellkerne

4.2 Etablierung eines reproduzierbaren BHS-Modells

Die Entwicklung eines geeigneten *in-vitro* Modells der Blut-Hirn-Schranke stellt das erste große Ziel der vorliegenden Arbeit dar, bevor dieses zu Versuchszwecken verwendet werden kann. Daher werden zunächst Kriterien festgelegt, die zur Beurteilung des Modells im Hinblick auf Zellart und Zelldichte dienen. Dies ist zum einen die *spezifische Charakterisierung* und zum anderen der *Nachweis der Barriereintegrität mittels TEER-Messung*. Die Zellart wird stets parallel in Kulturschalen aus den gleichen Zelllinien, die auch in den Modellversuchen verwendet werden, kultiviert und mikroskopisch kontrolliert. Eine mikroskopische Kontrolle der Endothelzellen auf den Membranen der Transwellversuche ist nicht möglich. Nach Abschluss der Messung erfolgen daher Fixierungen von Membranen, auf denen Endothelzellen und Astrozyten in direkter Cokultur ausgesät sind. Aus diesen werden sehr dünne Streifen herausgeschnitten und mikroskopisch beurteilt. Es zeigt sich auf der apikalen Fläche der Membran ein Monolayer Zellen, das morphologisch mit den zu erwartenden Endothelzellen korreliert. Basal zeigt sich entsprechend als Korrelat ein Astrozytenmonolayer.



Abbildung 10: Querschnitt durch eine Membran mit zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen apikal und Astrozyten basal; HE-Färbung, erstellt von Dr. Verena Grützner

4.2.1 Puromycineffekt auf das Blut-Hirn-Schranken-Modell

Im Rahmen des BMBF Verbundprojektes wurde der Einfluss von Puromycin auf das erstellte Bluthirnschrankenmodell in der Widerstandsmessung erfasst und mit Versuchsansätzen ohne Puromycin unter gleichen Kulturbedingungen in ein Verhältnis zueinander gesetzt. Dieser Effekt ist reproduzierbar. Die TEER-Werte lagen durchschnittlich bei $42,0\% \pm 10,1\%$ in den Kulturen, die nur 15 Minuten mit Puromycin behandelt wurde im Vergleich zu denen die drei Tage mit Puromycin ($\cong 100\%$) behandelt wurden (vgl. Abbildung 11: Effekt von Puromycin auf die Endothelzellbarriere

, dargestellt sind hier die Verläufe der Mittelwerte der TEER-Werte über die Versuchstage seit Isolation der Primärzellen). Ebenso ist in der Immunfluoreszenzfärbung deutlich ein Effekt auf die Dichte der Endothelzellen zu sehen. Ohne die dreitägige Zugabe von Puromycin sind markante Lücken ohne charakteristische Zell-Zell Kontakte im Endothelzelllayer zu sehen, die mit dem Einwachsen von Fremdzellen vereinbar sind und somit die Barrierefunktion herabsetzen.

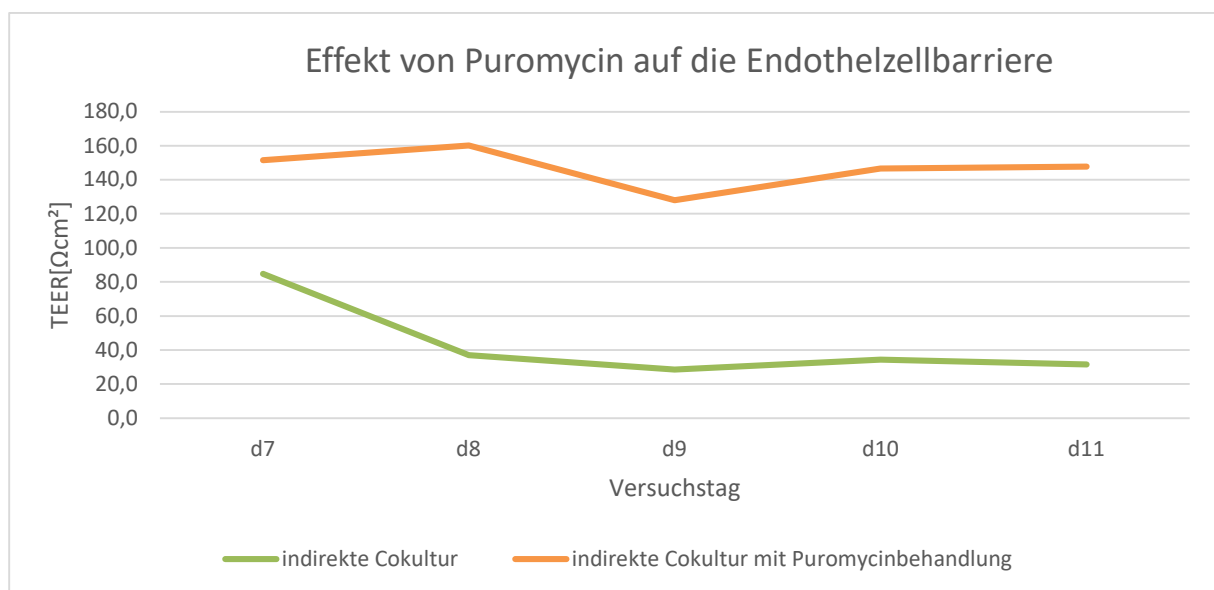


Abbildung 11: Effekt von Puromycin auf die Endothelzellbarriere , dargestellt sind hier die Verläufe der Mittelwerte der TEER-Werte über die Versuchstage seit Isolation der Primärzellen aus Schweinegehirnen

4.3 Vergleich der Astrozytenaussaat zur Verbesserung der Barriere

Neben der Behandlung der Endothelzellen mit Puromycin zur Verbesserung der Kultivierung der Monokultur wird die Anordnung der Astrozyten zur Verbesserung der Barriereintegrität untersucht. Untersucht werden die Monokultur ohne den Einfluss von Astrozyten, die direkte Cokultur als Korrelat zur *in-vivo* BHS mit direktem Kontakt der Astrozyten zu den Endothelzellen, sowie die indirekte Cokultur, bei der kein direkter Kontakt zwischen Endothelzellen und Astrozyten besteht.

Hierbei zeigte sich im deutlichen Unterschied zur Erwartung die Überlegenheit beider Cokulturen im Vergleich zu den Monokulturen hinsichtlich der TEER-Messungen. Im Vergleich zu der Monokultur erreichte die direkte Cokultur TEER-Werte von $127,2 \pm 16,7\%$ der Monokultur ($n=15$). Die indirekte Cokultur erreichte $136,1 \pm 4,4\%$ ($n=15$).

Jedoch ist ein Vergleich bei der direkten Cokultur mit der Monokultur nur möglich, wenn deren Endothelzellen ebenfalls lediglich 15 Minuten mit Puromycin behandelt werden. Eine Versuchsdurchführung der direkten Cokultur mit dreitägiger Puromycinbehandlung ist nicht möglich, da die Astrozyten absterben würden. Vergleicht man nun dennoch die direkte Cokultur, deren Endothelzellen 15 Minuten mit Puromycin behandelt wurden, mit der dreitägig behandelten Monokultur, so erreicht die direkte Cokultur nur $54,8 \pm 16,7\%$ ($n=15$) des Widerstandes der Monokultur an Versuchstag 15.

Ein Vergleich der direkten Cokultur mit der indirekten Cokultur ist somit nur möglich, wenn man die Vergleichskultur der indirekten Cokultur ebenfalls nur 15 Minuten mit Puromycin behandelt. Hierbei ergeben sich bei der indirekten Cokultur niedrigere TEER-Werte, von $69,8\% \pm 10,7\%$ ($n=15$), als bei der direkten Cokultur (diese wurde als 100% gesetzt).

Da ein Versuchsansatz mit einer länger behandelten direkten Cokultur nicht möglich ist, wird für die nachfolgenden Versuche mit Nanopartikeln ausschließlich auf die indirekte Cokultur mit einer dreitägigen Puromycinbehandlung der Endothelzellen zurückgegriffen. Diese haben durchweg deutlich höhere Widerstandswerte erreicht als die Vergleichskulturen, wie es auch aus Abbildung 12: Entwicklung der TEER-Werte (Mittelwerte) unter verschiedener Kulturbedingungen hervorgeht.

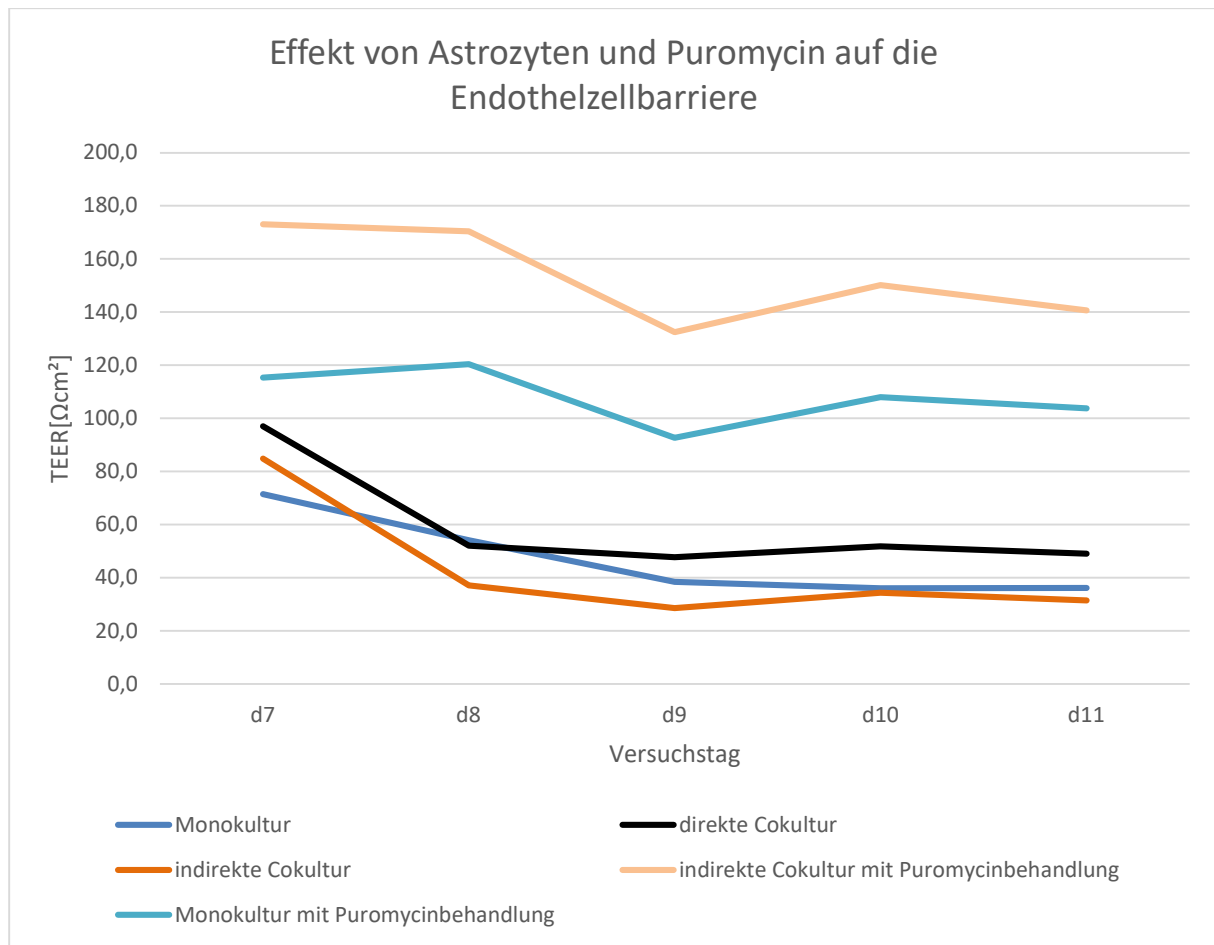


Abbildung 12: Entwicklung der TEER-Werte (Mittelwerte) unter verschiedener Kulturbedingungen Gezeigt werden die Werte der Versuchstage 7-11 nach Isolation der Primärzellen aus Schweinegehirnen. Nach der Messung von Tag 8 erfolgte ein Mediumwechsel. Die Konzentration des Puromycins beträgt $3\mu\text{g/ml}$.

4.4 Einfluss der NP auf die BHS

Die Testung der Nanopartikel erfolgt mit verschiedenen Konzentrationen, um einen Konzentrationsbereich zu finden, in dem von einer therapeutisch nutzbaren Konzentration ausgegangen werden kann, gleichzeitig aber die Toxizitätsgrenze nicht überschritten wird. Deshalb erfolgt der Aufbau immer nach gleichem Modell und am zehnten Tag nach Endothelzellisolation erfolgt die Zugabe der Nanopartikel, ohne das Medium an diesem Tag zu wechseln. Ansonsten wäre dies als Confounder zu werten und würde so die Messung unbrauchbar machen (Abbildung 13: Entwicklung der TEER Werte unter 20-stündiger Inkubation mit Nanopartikeln). In der Auswertung zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg der TEER-Werte nach dem Mediumwechsel ab Tag 8 bis zur Beimpfung der Wells mit Nanopartikeln. Bei der Messung am Folgetag zeigt sich

ein weiterer Anstieg der Werte in den Versuchsansätzen der Kontrolle ohne Nanopartikel, sowie in den Versuchsansätzen mit 150 $\mu\text{g/ml}$ Nanopartikel des PLLA-SDS und bei 150 $\mu\text{g/ml}$ PFDL-SDS. Bei beiden Partikeln ist bei einer Konzentration von 1500 $\mu\text{g/ml}$ ein deutlicher Abfall der TEER-Werte zu beobachten. Bei einer Konzentration von 300 $\mu\text{g/ml}$ ist ein solcher Abfall der Werte gegenüber der Kontrolle nicht zu sehen (Abbildung 13: Entwicklung der TEER Werte unter 20-stündiger Inkubation mit Nanopartikeln).

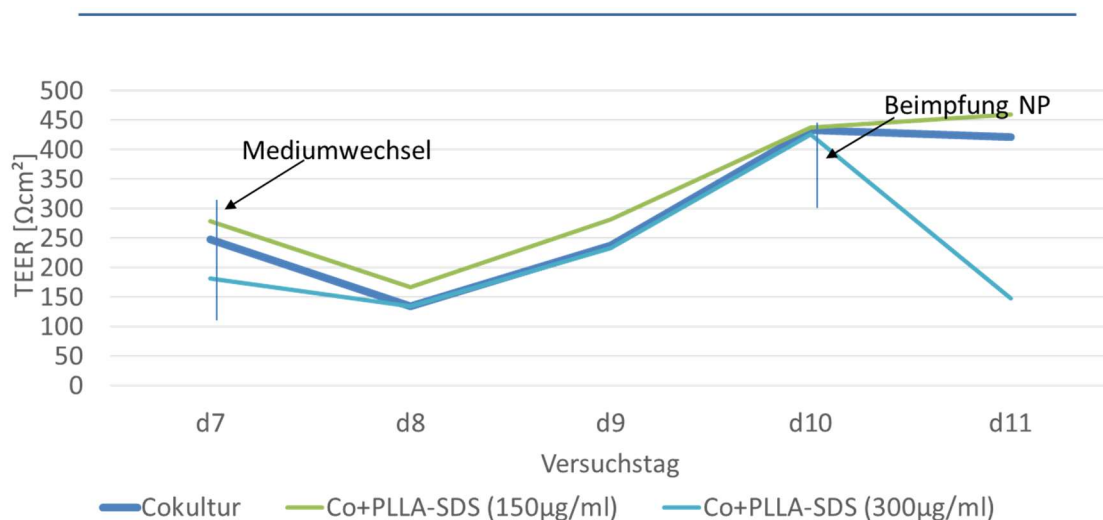


Abbildung 13: Entwicklung der TEER Werte unter 20-stündiger Inkubation mit Nanopartikeln Die indirekten Kokulturen wurden mit 150 $\mu\text{g/ml}$ PLLA-SDS und PFDL-SDS beimpft. An Tag 7-10 vor NP-Zugabe unterscheiden sich die Versuchsansätze nicht voneinander. Danach wurden in zwei Versuchsreihen Nanopartikel zugegeben und am Folgetag eine erneute TEER-Messung durchgeführt. Alle Werte sind Mittelwerte

4.5 Ergebnisse Durchflusszytometrie

Die FACS-Analyse soll neben der Vitalität der Endothelzellen Aufschluss über die Nanopartikelaufnahme in die vitalen Zellen geben. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Vitalität der isolierten zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen und die Aufnahme der Nanopartikel PFDL-SDS und PLLA-SDS in den Konzentrationen von 150, 300 und 1500 $\mu\text{g/ml}$ in die Zellen beurteilt. Die Vitalität der Zellen wird anschließend mit den Ergebnissen der TEER-Messung verglichen.

Die Messung der Autofluoreszenz der Endothelzellen ergibt durchschnittlich 1208 ± 304 a.u. (arbitrary units). Diese wird von den gemessenen Fluoreszenzen der Nanopartikelversuche abgezogen, um die reine Nanopartikelfluoreszenz zu erhalten. Hierbei zeigt sich eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität mit steigender Konzentration der Nanopartikel sowohl in den Versuchen mit PFDL-SDS als auch mit PLLA-SDS (Abbildung 14: Fluoreszenzintensität nach 20-stündiger PFDL-SDS; Abbildung 15: Fluoreszenzintensität nach 20-stündiger PLLA-SDS Inkubation der indirekten Kokulturen mit von $150 \mu\text{g/ml}$, $300 \mu\text{g/ml}$ und $1500 \mu\text{g/ml}$)

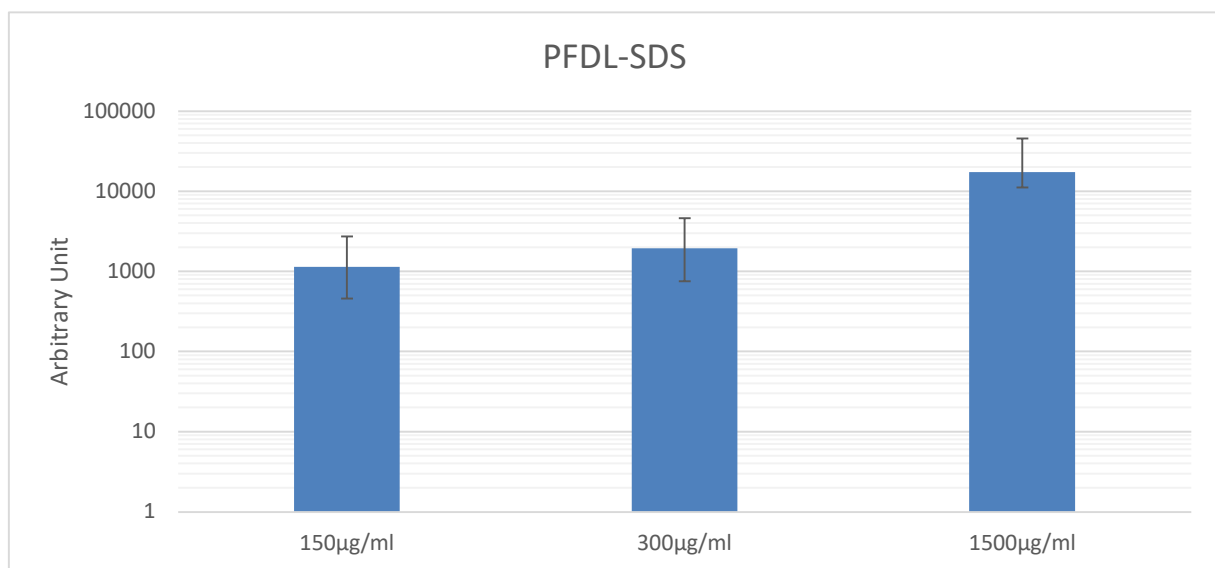


Abbildung 14: Fluoreszenzintensität nach 20-stündiger PFDL-SDS Inkubation der indirekten Kokulturen mit Konzentrationen von $150 \mu\text{g/ml}$, $300 \mu\text{g/ml}$ und $1500 \mu\text{g/ml}$, Das Balkendiagramm zeigt die FACS-Werte als Mittelwert + SD

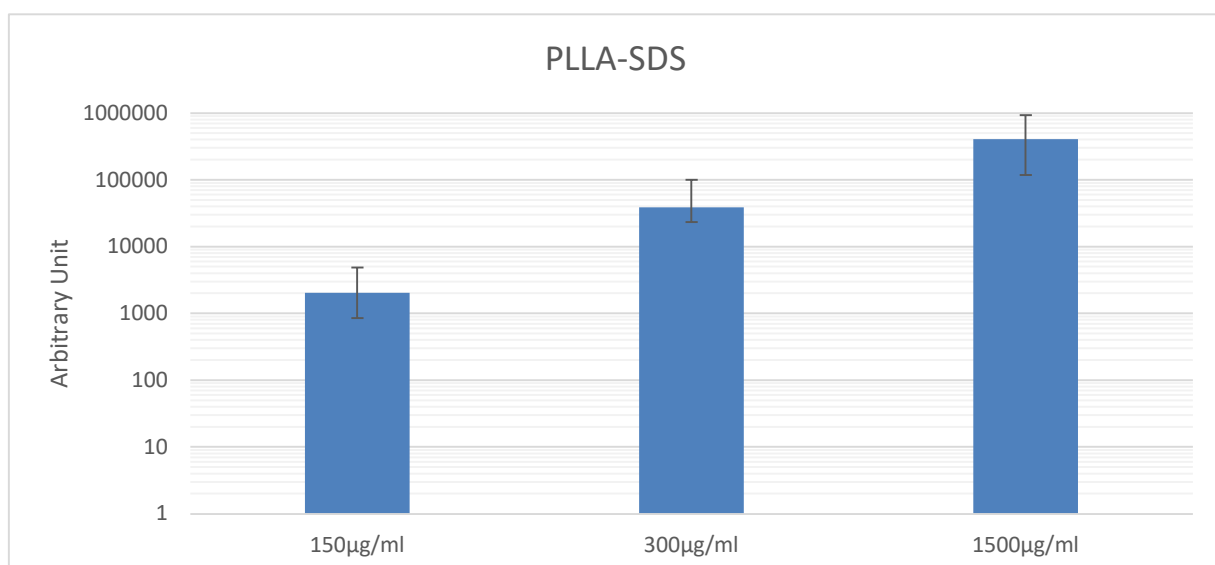


Abbildung 15: Fluoreszenzintensität nach 20-stündiger PLLA-SDS Inkubation der indirekten Kokulturen mit von 150 µg/ml, 300 µg/ml und 1500 µg/ml, Das Balkendiagramm zeigt die FACS-Werte als Mittelwert + SD

Nach Normierung der Ergebnisse mit dem schwächer fluoreszierenden PFDL-SDS Partikel als Referenzpartikel ergibt sich eine um circa 1,3-fach höhere Aufnahme von PFDL-Partikeln im Vergleich zu PLLA-SDS Partikeln in die Endothelzellen bei einer Konzentration von 1500 µg/ml. Bei einer Konzentration von 300 µg/ml liegt der Faktor des PFDL-Partikels bei 2. Bei einer Konzentration von 150 µg/ml liegt die Fluoreszenz 15-mal höher als bei PLLA-SDS.

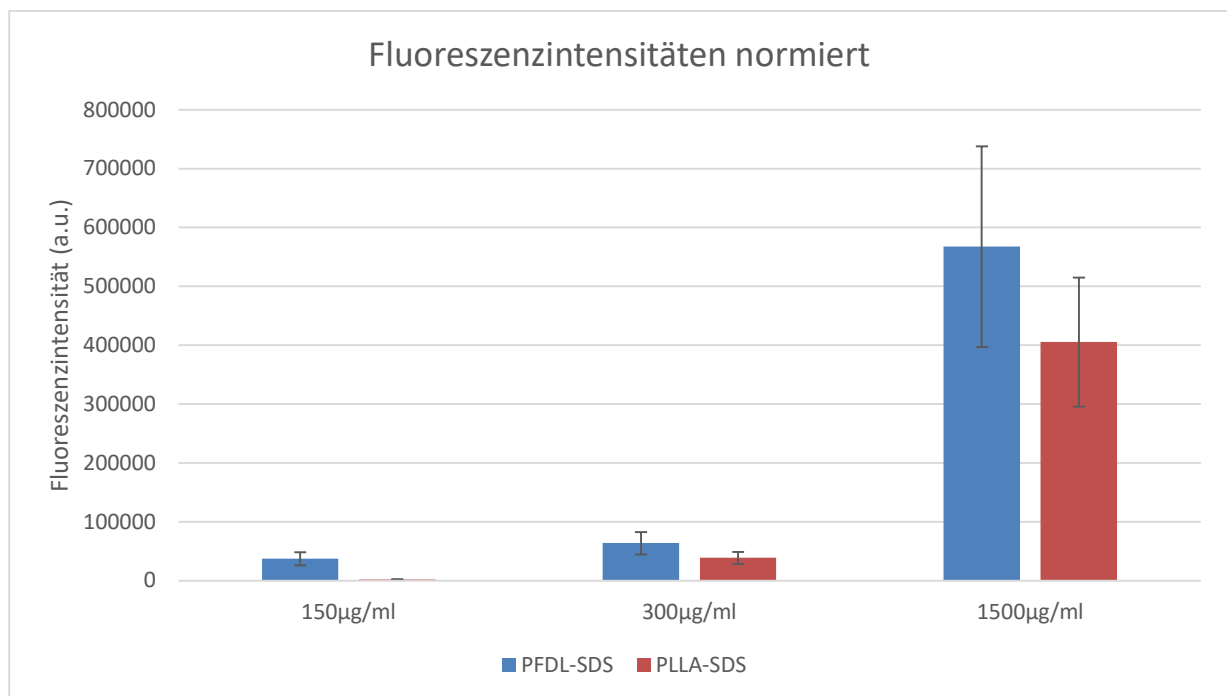


Abbildung 16: Fluoreszenzintensität des PFDL-SDS Partikels und des PLLA-SDS Partikels normiert zur Vergleichbarkeit in den Konzentrationen 150 µg/ml, 300 µg/ml und 1500 µg/ml Dargestellt sind Mittelwerte + SD

Die Messung der Vitalität ergibt einen Zusammenhang zwischen Konzentration der Nanopartikel und dem prozentualen Anteil überlebender Endothelzellen. In der Kontrollkultur mit Endothelzellen ohne NP Inkubation liegt der Anteil überlebender Zellen bei $96,41 \pm 1,03\%$ ($n=5$). In den Versuchen mit 150 µg/ml und 300 µg/ml liegen die Anzahl lebender Zellen bei $94,93 \pm 1,76\%$ ($n=3$) beziehungsweise bei $92,63 \pm 1,93\%$ ($n=3$) für den PFDL-SDS Partikel und bei $92,59 \pm 2,55\%$ ($n=3$) bzw. bei $91,59 \pm 3,14\%$ ($n=3$) für den PLLA-SDS Partikel (Abbildung 17: Prozentualer Anteil lebender und toter Endothelzellen nach 20-stündiger Inkubation; Abbildung 18:). Bei einer Konzentration

von 1500 $\mu\text{g/ml}$ fallen die Werte auf $80,66 \pm 7,08\%$ ($n=3$) für den PFDL-SDS Partikel und auf $88,24 \pm 5,68\%$ ($n=3$) beim PLLA-SDS Partikel.

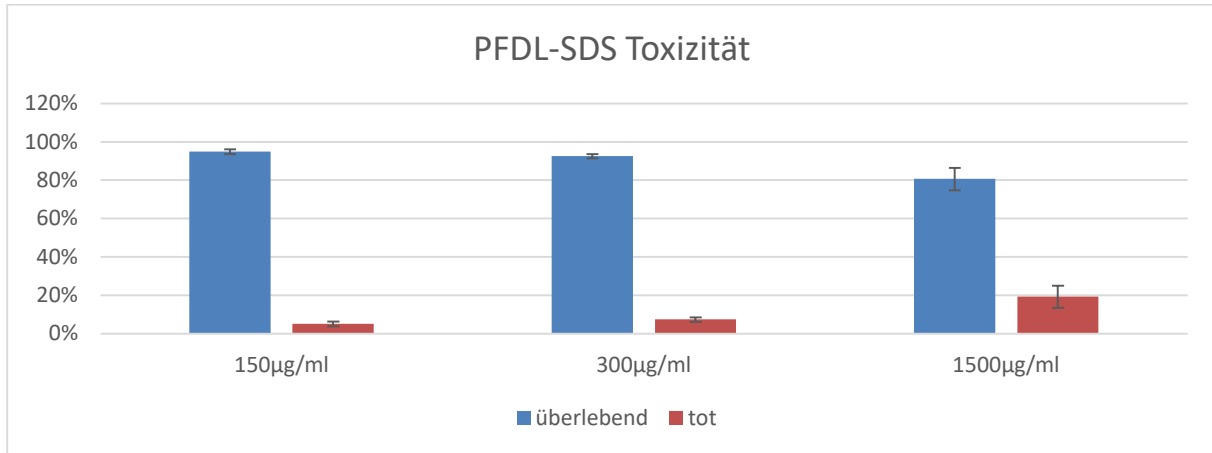


Abbildung 17: Prozentualer Anteil lebender und toter Endothelzellen nach 20-stündiger Inkubation mit PFDL-SDS, in Konzentrationen 150 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$ und 1500 $\mu\text{g/ml}$. In blau sind der Anteil vitaler Zellen und in rot der Anteil avitaler Zellen, die 7-AAD aufgenommen haben. Alle Werte sind Mittelwerte + SD.

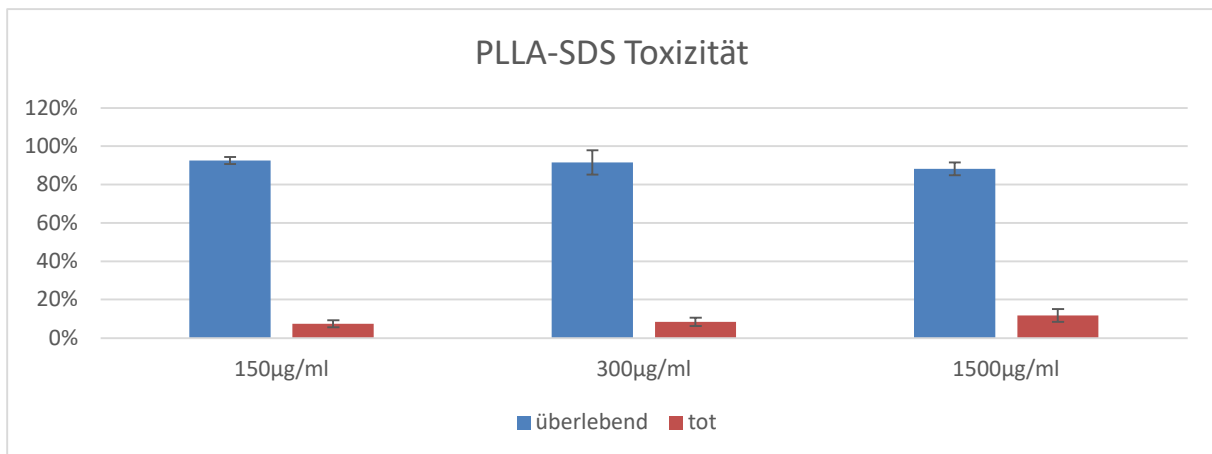


Abbildung 18: Prozentualer Anteil lebender und toter Endothelzellen nach 20-stündiger Inkubation mit PLLA-SDS in Konzentrationen 150 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$ und 1500 $\mu\text{g/ml}$. In blau sind der Anteil vitaler Zellen und in rot der Anteil avitaler Zellen, die 7-AAD aufgenommen haben. Alle Werte sind Mittelwerte + SD.

4.6 Toxizität der NP in verschiedenen Konzentrationen

4.6.1 LDH-Toxizitätstest

Die gemessenen Absorptionswerte der mit PFDL-SDS oder PLLA-SDS behandelten Endothelzellen werden in Verhältnis zu den unbehandelten Endothelzellen gesetzt. Die Inkubationszeit beträgt 20 Stunden. Es wird identisch ebenso eine Negativkontrolle mit lysierten Zellen erstellt. Hierbei erreicht die mit Triton X100 lysierte Kontrolle null Prozent des Wertes der Endothelzellkontrolle. In den Verdünnungsreihen mit PFDL-SDS Partikeln sind die gemessenen Absorptionswerte höher als in der Kontrollprobe mit Endothel. Innerhalb der absteigenden Verdünnungsreihe ist eine abnehmende Tendenz zu erkennen von $190\% \pm 4\%$ bei einer Konzentration von $1500 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ auf $150\% \pm 2\%$ bei der niedrigsten Konzentration von $4,75 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($n=3$).

In der Verdünnungsreihe mit dem PLLA-SDS Partikel liegen die Absorptionswerte unter denen der Kontrolle. Innerhalb der Verdünnungsreihe ist bei keinem der biologischen Replikate, eine Tendenz der Absorptionswertänderung erkennbar. So liegen die höchsten Werte bei einer Konzentration von $18,75 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit $117 \pm 6\%$ vor. Die niedrigsten Werte werden bei $37,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ gemessen mit $73 \pm 8\%$.

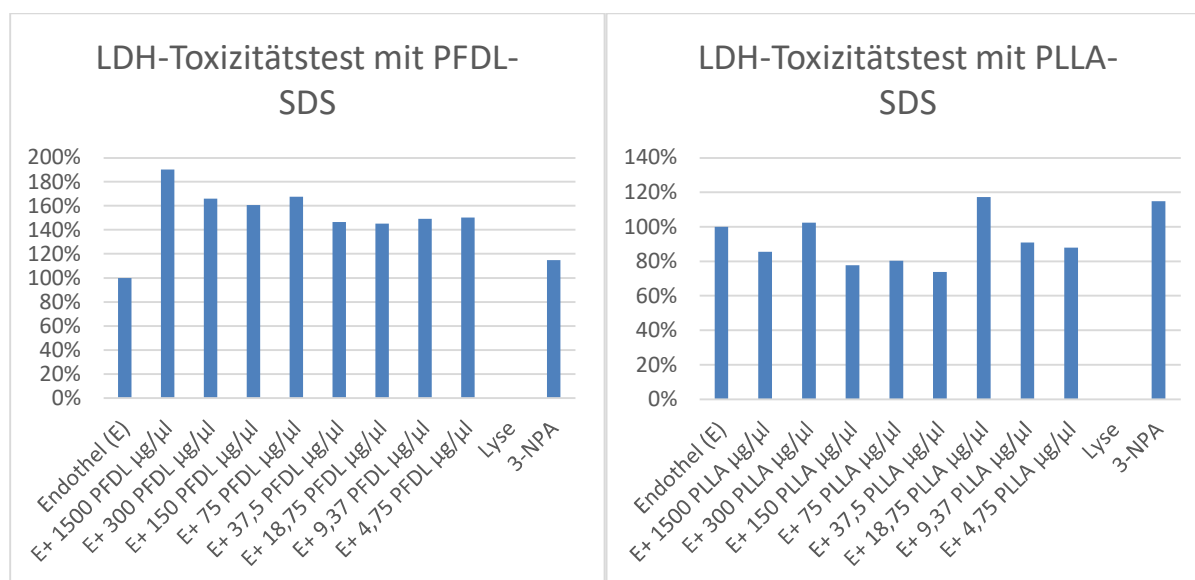


Abbildung 19: LDH-Toxizitätstest nach 20 Std. Inkubation der EMEC mit PFDL-SDS links bzw. PLLA-SDS rechts in absteigender Konzentration der Nanopartikel, sowie eine Probe mit Lysierung mit Triton X-100 und einer Probe, der 3-NPA zugesetzt wurde zur Hemmung der mitochondrialen Atmungskette. Dargestellt sind Mittelwerte.

4.6.2 CCK8-Toxizitätstest an Monokulturen

Die Endothelzellen und die Astrozyten für dieses Assay wurden jeweils in einer Monokultur in einer 96-Well Platte kultiviert. Zur Vergleichbarkeit wurde eine ECMEC und eine Astrozytenprobe unbehandelt gelassen und deren Absorptionswerte als 100% gesetzt. Es wird eine Verdünnungsreihe der beiden zu testenden Nanopartikeln aufgetragen und für 20 Stunden inkubiert bevor die Messung durchgeführt wird (siehe Abbildung 6: Belegung einer 96-Wellplatte, M: Medium, E: Endothelzellen). Die Absorptionsergebnisse werden ins Verhältnis zur Monokultur ohne Nanopartikelexposition gesetzt. Es zeigt sich in der Verdünnungsreihe keine Tendenz zur Abnahme der Toxizität bei abnehmender Verdünnung der Nanopartikel auf die Endothelzellen. Vielmehr zeigen sich schwankende Werte bei allen Konzentrationen bei beiden Nanopartikeln. Die Positivkontrolle mit Triton X100 zum Lysieren der Zellen zeigt einen Wert von lediglich $2\pm 2\%$ Prozent der Endothelzellwerte. Die Zugabe der 3-NPA zur Hemmung der mitochondrialen Atmungskette führt zu einem deutlichen Abfall der Absorptionswerte auf $40\pm 8\%$ des Ausgangswertes.

In den Versuchsansätzen mit Astrozyten ist nach Zugabe von 3-NPA kein Abfall der Absorptionswerte zu messen. Auch die 20-stündige Inkubation mit PFDL-SDS und PLLA-SDS führte zu keiner nennenswerten Veränderung der Absorptionswerte. Die Wells, zu denen Triton X100 zugegeben wird, fallen hingegen deutlich ab auf $20\pm 4\%$ des Ausgangswertes.

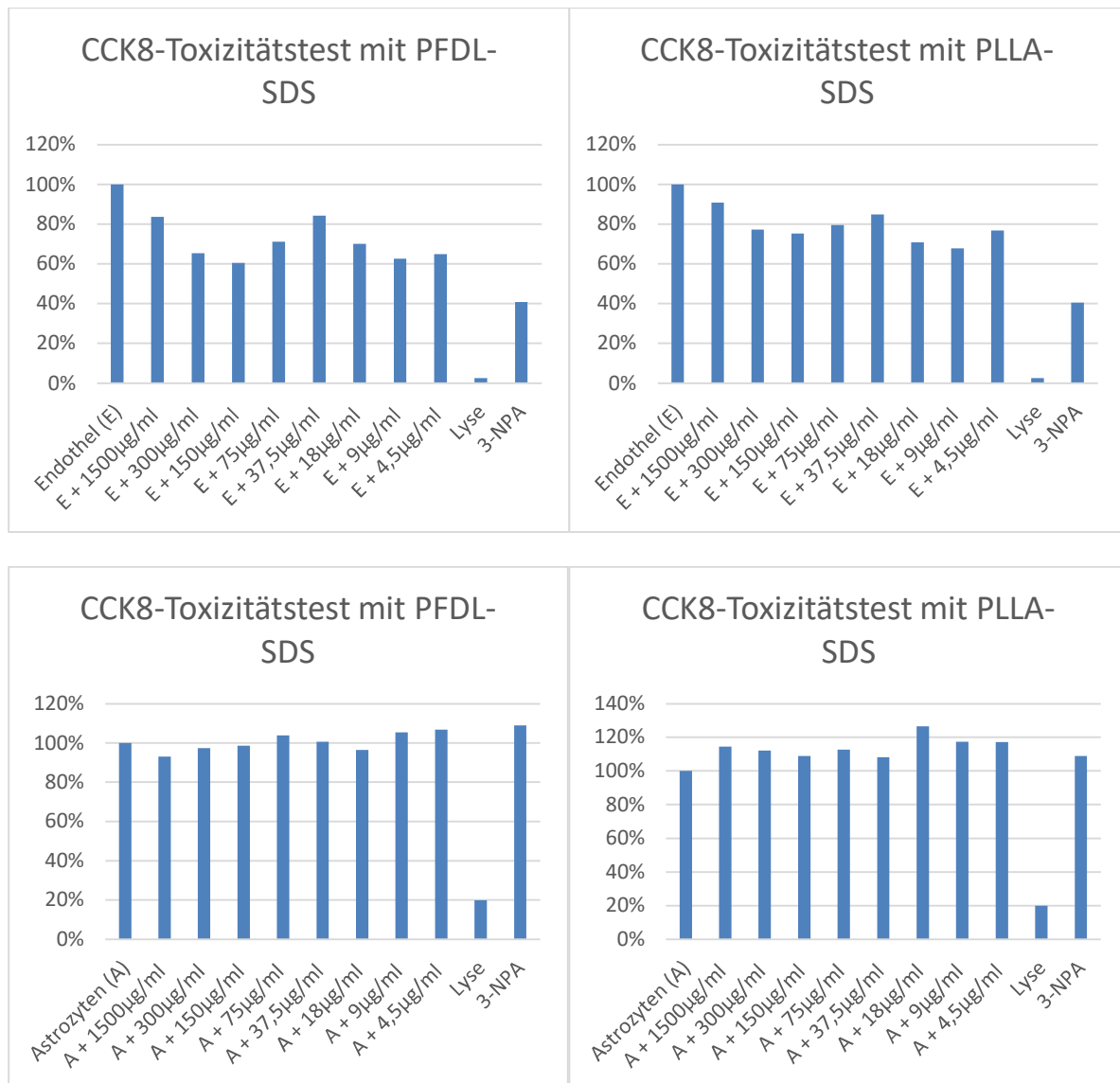


Abbildung 20: Test der mitochondrialen Funktion mittels des CCK8-Essays nach 20 Std. Inkubation der EMEC in den oberen Grafiken mit PFDL-SDS links bzw. PLLA-SDS rechts und Astrozyten in den unteren beiden Grafiken in absteigender Konzentration der Nanopartikel, sowie eine Probe mit Zelllysierung mit 0,1% Triton X-100 und einer Probe, der 10% 3-NPA zugesetzt wurde zur Hemmung der mitochondrialen Atmungskette. Dargestellt sind Mittelwerte.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methode

5.1.1 Isolation, Kultivierung und Charakterisierung der Primärzellen

Die Etablierung des *in-vitro* BHS-Modelles bietet einige Vorteile gegenüber einer *in-vivo* Testung verschiedener Nanopartikel. Ein großer Vorteil der *in-vitro* Testung von Nanopartikeln ist, dass in großer Zahl getestet werden kann und so entsprechend vielversprechende Nanopartikel identifiziert werden können, bevor diese in Tierversuchen zum Einsatz kommen.

Ein weiterer großer Vorteil ist die hohe Verfügbarkeit der Primärzellen, insbesondere der Astrozyten. Diese verlieren auch nach mehrfacher Passagierung nicht ihre charakteristischen Eigenschaften und können zudem kryokonserviert bei -196°C in flüssigem Stickstoff über längere Zeit aufbewahrt werden. Auch die Endothelzellen sind verhältnismäßig leicht verfügbar, mit der Einschränkung, dass eine Verwendung nur in der ersten Aussaat möglich ist, ohne Charaktereigenschaften, wie die Ausbildung besonders dichter Tight-Junctions, zu verlieren. Hierzu eignen sich kapilläre Endothelzellen besser als solche aus Ateriolen oder Venolen, da sie deutlich mehr und dichtere Zell-Zell-Kontakte ausbilden (Wolburg und Lippoldt 2002). Ebenso sind in den kapillären Endothelzellen mehr Effluxtransporter (Ge et al. 2005; Macdonald et al. 2010; Saubaméa et al. 2012), sowie mehr spezifische Rezeptoren zur Aufnahme durch Transzytose vorhanden (Ge et al. 2005).

Die ersten Ansätze zerebrale mikrovaskuläre Zellen aus Tieren zu isolieren, gab es bereits 1975 als man versuchte Kapillarfragmente aus Rattenhirnen in Kultur zu geben. Es entstanden Mischkulturen aus Endothelzellen, Perizyten und Fibroblasten (Goldstein et al. 1975). Auch die Haftung der Zellen an den Kulturoberflächen stellte sich als problematisch dar. Bereits wenige Jahre später wurde das erste Protokoll zur Isolation von Endothelzellen und Astrozyten veröffentlicht, welches auch heute noch modifiziert die Grundlage der Isolation bildet (Bowman et al. 1981). Hierbei spielen physikalische Grundlagen wie die homogene Zerkleinerung und die Trennung über einen Dichtegradienten eine ebenso bedeutende Rolle wie die enzymatische Aufreinigung der Zellen.

Das Modell des in-vitro BHS-Modells soll durch seine hohe parazelluläre Dichte geeignet sein, um hieran Nanopartikel zu testen, im Hinblick auf ihre Fähigkeit die Endothelzellen zu durchdringen. Hierzu wurden zu bestehenden Modellen, in denen bspw. Endothelzellmonokulturen aus Rattengehirnen (Abbott et al. 2012) und Schweinegehirnen (Nielsen et al. 2017) getestet und mit konditioniertem Medium kultiviert wurden, in dieser Arbeit verschiedene Cokulturen mit Astrozyten getestet und miteinander verglichen.

Die Zellfärbung beruht auf spezifischen Immunfluoreszenzfärbungen, die schon viele Jahre etabliert sind. Durch die Anordnung der Anfärbung kann der sichere Nachweis erbracht werden, dass die verwendeten Zellen Endothelzellen (CD31) bzw. Astrozyten (GFAP) sind.

5.1.2 Methodik der Widerstandsmessung

Die Messung von elektrischen Strömen im Zellverband mittels Elektrode ist eine bereits seit langer Zeit bewährte Methode zur Bestimmung des transendothelialen elektrischen Widerstands und somit der Dichte des endothelialen Zellverbands (Czupalla et al. 2014; Vries et al. 1996). In den 1990er Jahren wurde mittels vergleichbarer Methode bereits der Widerstand an einem Monolayer Endothelzellen bestimmt und der Effekt des Tumornekrosefaktors und Interleukin-1 ausgewertet. Es wurden TEER-Werte um $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$ gemessen die damit unter denen aus dieser Versuchsreihe liegen. Die lange Erfahrung mit dieser Methode, sowie die positive Korrelation der Messergebnisse mit den Erfahrungs- und Erwartungswerten stellen die großen Vorteile der Methode dar. Es zeigt sich auch eine hohe Reproduzierbarkeit der Messergebnisse bei dreimaliger Messung der gleichen Proben in den Transwellversuchen. Bei der Auswahl der Elektrode ist bei dieser Methode der TEER-Messung die Berücksichtigung des Messbereiches wichtig. Dieser liegt bei der verwendeten Elektrode von EVOM bei $0 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bis $9999 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und ist damit für die Versuche geeignet. Nachteilig ist, dass keine Aussage über die Qualität der Kultur getroffen werden kann. Hierzu ist eine mikroskopische Untersuchung unerlässlich, um die Auswirkungen von anderen Zellen als Endothelzellen zu berücksichtigen. Am häufigsten finden sich Kontaminationen durch Perizyten in den Endothelzellkulturen. Diese wachsen in porzinen Kulturen meist unter

dem Monolayer der Endothelzellen nahe oder mit direktem Kontakt zu der Extrazellulärmatrix (Pardridge 2012). Hier liegt auch ein großer Vorteil zu Kulturen aus Primärzellen anderer Tiere wie beispielsweise Ratten. In diesen Kulturen aus Rattenzellen haben sich um die Perizyten zellfreie Stellen gebildet, sodass der Endothelzelllayer nicht mehr durchgängig war (Abbott et al. 1992; Parkinson und Hacking 2005). Jedoch ist für hohe TEER-Werte ein konfluenten Endothelzelllayer obligat, sodass sich die porzinen Kulturen daher gut eignen. Zudem sind die porzinen Endothelzellen der menschlichen Endothelzelle physiologisch ähnlicher als die Endothelzellen anderer Versuchstiere sind (Walters et al. 2011). Gensequenzierungen haben hierzu Übereinstimmungen der kodierenden Gene von Mensch und Schwein von 60% ergeben, während es bei Mensch und Ratte nur etwa 40% sind (Thomas et al. 2003).

5.1.3 Diskussion der FACS-Analyse

Die Durchflusszytometrie zeigt eine zunehmende Intensität der Fluoreszenz bei höherer Konzentration der Nanopartikel. Ebenso ist eine höhere Toxizität bei höherer Konzentration der Nanopartikel zu vermuten, da die Viabilität der Endothelzellen bei höherer Konzentration der Nanopartikel abnimmt. Diese Ergebnisse decken sich mit der Hypothese, dass mit zunehmender Konzentration der Nanopartikel auch die Aufnahme in die Zellen und somit die Fluoreszenz zunimmt, während die Toxizität mit zunehmender Konzentration ebenfalls zunimmt. Eine Fehlerquelle in der FACS-Analyse stellt die Größenordnung der Zellen dar. Eine absolut präzise Abgrenzung ist hierbei nicht möglich, da sich die Zellen in jedem biologischen Replikat in ihrer Größe etwas unterscheiden, je nach Wachstumsgeschwindigkeit, Zelldichte und Anteil an Fremdzellen. Diese Fehlerquelle kann reduziert werden, indem die Einschlussgrenzen bei jedem Versuch gleich gewählt werden, um so einen Vergleich zu erlauben. Die absoluten Werte der Fluoreszenzintensität variieren in jedem biologischen Replikat stark, allerdings sind die relativen Verhältnisse innerhalb eines Replikats für die getesteten Konzentrationen von 150 µg/ml, 300 µg/ml und 1500 µg/ml sehr ähnlich, sodass dennoch eine Aussage bezüglich der Aufnahme möglich ist.

5.1.4 Diskussion der Toxizitätstests

Die Methodik der Toxizitätstests entspricht den Herstellerangaben. Die Ergebnisse des LDH-Tests müssen jedoch besonders kritisch betrachtet werden. Hier stellen die Proben mit Endothelzellen ohne Zugabe von Nanopartikeln und ohne Zugabe toxischer Substanzen die Kontrollprobe mit der niedrigsten zu erwartenden Absorption dar, die lysierte Probe mit Triton X 100 sollte die höchsten Absorptionswerte liefern (vgl. Abbildung 17: Prozentualer Anteil lebender und toter Endothelzellen nach 20-stündiger Inkubation, Abbildung 18:). Da diese Probe in allen Replikaten keine Farbreaktion aufweist, ist hier von auszugehen, dass der Test nicht so funktioniert hat, wie dies vom Hersteller vorgesehen war. Eine mögliche Erklärung hierfür kann die verwendete Konzentration sein. Diese lag bei 0,1% und könnte somit zu gering gewesen sein, um die Endothelzellen zu lysieren. Dadurch findet keine Freisetzung von LDH statt und damit auch keine Farbreaktion. Dem entgegen steht die positive Farbreaktion im CCK-8 Toxizitätstest.

Hierbei ist die Probe auch ohne Farbreaktion, was auf Grund der Farbreaktion gewünscht ist. Somit können diese Ergebnisse in Korrelation mit der Endothelzellkontrolle ohne Zusätze interpretiert werden (5.2.3 Beurteilung der FACS-Analysen)

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Beurteilung des BHS-Modells

Das *in-vitro* Modell der Bluthirnschranke hängt qualitativ maßgeblich von der Qualität der isolierten Zellen ab. Jede Verunreinigung insbesondere der Endothelzellen sorgt für eine Durchlässigkeit in der Barriere (Helms et al. 2016). Ebenso wichtig ist eine homogene Aussaat der Zellen, sodass sich ein konfluenter Monolayer an Zellen ausbildet und deren Differenzierung durch Mediatoren, welche unter anderem von Astrozyten ausgeschüttet werden. Diese sorgen für das konfluente Wachstum der Zellen, deren apikale und basale Ausrichtung, sowie deren Interaktion untereinander hinsichtlich der Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte (Abbott et al. 2008; Deli et al. 2005; Tóth et al. 2011). Somit korrelieren die in den Messungen erhobenen TEER-Werte mit der in der Theorie zu erwartender Tendenz, dass in Cokulturen höhere Werte messbar sind als in Monokulturen. Der positive Effekt der Astrozyten, aber auch von astrozytenkonditioniertem Medium (Smith et al. 2007b) auf die Integrität der Barriere wird auch in zahlreichen anderen Arbeiten beschrieben (Cohen-Kashi Malina et al. 2009a; Cohen-Kashi-Malina et al. 2012; Kido et al. 2002).

Ebenso verbessert die Verwendung von Puromycin in den ersten drei Tagen die Integrität der Barriere, was die höhere Reinheit der Primärzellen bewirkt (Perrière et al. 2005). Die Überlegenheit der indirekten gegenüber der direkten Cokultur erscheint zunächst nicht schlüssig, da bei der direkten Kultur eine Kommunikation der Astrozyten mit den Endothelzellen möglich ist, jedoch scheint es ausreichend zu sein, dass entsprechende Mediatoren in das Medium abgegeben werden und so einen ausreichend hohen Effekt auf das Wachstum der Endothelzellen hat (vgl. 2.3 Astrozyt und Perizyt). Dies erklärt auch die Ergebnisse von (Smith et al. 2007b), die dieses Ergebnis mit konditioniertem Medium nachgewiesen haben. Dieser Effekt und die Nachteile der direkten Cokultur, die sich aus der aufwendigeren und weniger präzisen Aussaat ergeben, begünstigen klar die indirekte Cokultur. Zudem ist bei der direkten Cokultur keine dreitägige Behandlung mit Puromycin möglich, sondern nur eine 15-minütige Behandlung vor der Zellaussaat, um den Anteil an Fibroblasten und Perizyten zu reduzieren, sodass die puromycinbehandelte indirekte Cokultur auch deshalb den anderen Ansätzen gegenüber überlegen gewesen ist.

Die erzielten Spitzenwerte um Versuchstag 10 von bis zu $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ sind verglichen mit den Messwerten aus einer Forschungsarbeit von 2013 mit Werten um $800 \Omega \cdot \text{cm}^2$ nicht ganz so hoch (Patabendige et al. 2013). Dort wurde jedoch zusätzlich noch in das Wachstumsmedium Transferrin, Insulin, Progesteron und weitere wachstumsbegünstigende Faktoren gegeben. Verglichen mit ähnlichen Ansätzen wie bei Skinner et al. 2009 ($\sim 400 \Omega \cdot \text{cm}^2$) konnten in dieser Arbeit vergleichbar hohe TEER-Werte erzielt werden. Wieder andere Arbeiten arbeiteten mit Cokulturen mit Endothelzellen, Astrozyten und Perizyten und erreichten so TEER-Werte von $837 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 38 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Thomsen et al. 2015). Alles in allem stellt sich das hier verwendete Modell mit $445 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 45 \Omega \cdot \text{cm}^2$ unter den Bedingungen ähnlich gut dar wie vergleichbare Modelle in der Literatur. Mit höherem Aufwand lassen sich auch höhere TEER-Werte erzielen.

5.2.2 Einfluss des Puromycins und des Mediumwechsels auf die Barriereintegrität

Puromycin ist ein Nukleosid-Antibiotikum, das aus Streptomyceten gewonnen wird. Es inhibiert die Proteinbiosynthese sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Zellen. Es eignet sich zur Selektion der Endothelzellen, da diese eine spezifische Abwehr durch das P-Glykoprotein besitzen und somit nicht durch das Puromycin geschädigt werden (DARKEN 1964).

In allen durchgeführten Versuchsansätzen in den Transwellssystemen zeigt sich nach dem Wechsel des Mediums bei der Messung am Folgetag, entgegen der sonst steigenden Tendenz, ein vorübergehender Abfall der TEER-Werte (siehe Abbildung 12: Entwicklung der TEER-Werte (Mittelwerte) unter verschiedener Kulturbedingungen).

Dieser kann durch mehrere Mechanismen erklärt werden: Zum einen kommt es zu einer physikalischen Belastung der Zellen und der Zell-Zell-Kontakte durch das Absaugen des Mediums und das Pipettieren des neuen Mediums. Zum anderen enthält das verbrauchte Medium Mediatoren der Astrozyten, die die Ausbildung eines stabilen und dichten Endothelzellmonolayers induzieren. Diese sind im frischen Medium zunächst nicht mehr enthalten und müssen erst neu gebildet werden, wodurch die Barriereintegrität zunächst ebenfalls gehemmt wird.

5.2.3 Beurteilung der FACS-Analysen

Die FACS-Analyse gibt Aufschluss über die Vitalität der Endothelzellen in den Transwellversuchen nach 20-stündiger Beimpfung mit den Nanopartikeln PFDL-SDS und PLLA-SDS in Konzentration von 150 µg/ml, 300 µg/ml und 1500 µg/ml nach jeweils einem Tag. Hierbei zeigt sich im Vergleich zu den Vergleichskulturen ohne Nanopartikel sowohl für den PFDL-SDS als auch für den PLLA-SDS Partikel in Konzentrationen von 150 µg/µl und 300 µg/µl keine signifikante Abnahme der vitalen Zellen. Somit kann nach Beurteilung der FACS-Analyse davon ausgegangen werden, dass in den verwendeten Konzentrationen kein toxischer Effekt auf die Endothelzellen zu beobachten ist.

In der Größenordnung von der zehnfachen Konzentration mit 1500 µg/µl ist bei beiden getesteten Partikeln ein Abfall der Vitalität zu beobachten auf 80,66%±7,08% beim PFDL-SDS Partikel und 88,24%±5,68% beim PLLA-SDS Partikel. Hierbei könnte es sich um einen toxischen Effekt der Nanopartikel handeln, wodurch die verminderte Vitalität zu erklären ist. Dieser ist jedoch verglichen mit den Werten der Kontrollendothelzellen (96,41% ± 1,03%) nicht sehr ausgeprägt in Anbetracht dessen, dass die Partikel in einer Konzentration von 150 µg/µl *in-vivo* getestet werden sollen.

Im Hinblick auf die Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen wurde die Fluoreszenz der Zellen nach Nanopartikelexposition gemessen und gegeneinander aufgetragen (Abbildung 14: Fluoreszenzintensität nach 20-stündiger PFDL-SDS; Abbildung 15: Fluoreszenzintensität nach 20-stündiger PLLA-SDS Inkubation der indirekten Kokulturen mit von 150 µg/ml, 300 µg/ml und 1500 µg/ml). Bei Betrachtung der Intensitäten des PFDL-SDS Partikels fällt auf, dass die gemessene Fluoreszenz bei einer Konzentration von 300 µg/µl um 70,7% höher liegt als bei 150 µg/µl. Bei 1500 µg/µl ist die Intensität etwa 15-fach höher als bei 150 µg/µl. Hieraus ergibt sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzintensität der Endothelzellen und der Konzentration der Nanopartikel. Der Zusammenhang ist in den erfolgten Versuchen nicht linear. Dies kann zum einen mit den Nanopartikeln zusammenhängen, sollten diese nicht alle gleichmäßig mit dem Fluoreszenzfarbstoff beladen sein. Einen Effekt dürfte hierbei aber die absolute Zellzahl in den Wells haben. Durch die Aussprossung der Endothelzellen aus kleinsten Kapillarfragmenten variiert die Zellzahl pro Well, sodass hierdurch die nicht lineare Zunahme der Fluoreszenz mitbedingt kann. Ebenso ist die Aufnahmekinetik ein Einflussfaktor, da nach 24h noch nicht das Maximum an Nanopartikeln

in die Zellen aufgenommen werden konnte (Galley 2020). Es kann davon ausgegangen werden, dass der PFDL-SDS Nanopartikel in die Zellen aufgenommen wird und eine hohe Konzentration an eingesetzten Nanopartikeln mit einer hohen Aufnahme in die Zellen korreliert. Dem entgegen steht die abnehmende Vitalität der Endothelzellen bei Zunahme der Konzentration.

Dieses Resultat zeigt sich auch bei dem PLLA-SDS Partikel. Hier ist die Fluoreszenzzunahme noch stärker messbar. Eine Verdopplung der Konzentration von 150 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ auf 300 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sorgt hier für eine durchschnittliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität auf das 19-fache, eine Verzehnfachung erhöht sie auf das 200-fache. Auch hier zeigt sich direkter Zusammenhang zwischen der Zunahme der Konzentration und der Zunahme der Fluoreszenzintensität. Dieser ist jedoch nicht proportional zur Konzentration.

Eine quantitative Beurteilung auf dieser Grundlage zum Vergleich der beiden Partikel ist nicht möglich, daher erfolgt eine Normierung der Ergebnisse, um der Tatsache einer unterschiedlichen Beladung der Partikel mit Fluoreszenzfarbstoff Rechnung zu tragen. Hieraus ergibt sich in den durchgeführten Versuchen eine höhere Aufnahme des PFDL-Partikels in allen getesteten Konzentrationen nach 24h. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die Kinetik der Aufnahme nach einer längeren Inkubation nicht mehr wesentlich verändert. So zeigt die Arbeit „Charakterisierung und zeitliche Kinetik der Aufnahme von Nanopartikeln in C6-Gliomzellen, Astrozyten und zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellenkeine“ (Galley 2020) signifikant höhere Aufnahme des PFDL-SDS sowie des PLLA-SDS Nanopartikels nach 48h im Vergleich zu 24h in CMEC. Vom Messzeitpunkt 4h zu 24h kann eine deutliche Steigerung der Aufnahme nachgewiesen werden.

5.2.4 Beurteilung des Toxizitätstests mit LDH

Der LDH-Test beruht auf der Bestimmung der Enzymaktivität von Laktatdehydrogenase (LDH) im Zytoplasmat, das aus avitalen Zellen freigesetzt wird und somit im Medium nachgewiesen werden kann. Die LDH-Aktivität wird mittels eines enzymatischen Tests bestimmt. Es finden nacheinander zwei Redoxreaktionen statt. Zunächst wird Laktat durch die Oxidoreduktase LDH zu Pyruvat oxidiert, gleichzeitig wird das Coenzym NAD^+ durch die Übertragung von Wasserstoff (vom Substrat Laktat) zu

NADH/H⁺ reduziert wird. Im zweiten Schritt transferiert der im Testreagenz enthaltene Katalysator Diaphorase Wasserstoff vom entstandenen NADH/H⁺ auf das schwach gelbfarbene Tetrazolium-Salz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid), das dadurch zu dem rot gefärbten Formazan-Salz reduziert wird, NADH/H⁺ wird zu NAD⁺ oxidiert. Diese Farbstoffbildung wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) gemessen. Je mehr Zellen geschädigt sind, desto größer ist die Menge an freigesetztem LDH. Diese Menge an LDH korreliert direkt mit der Menge an gebildetem Formazan-Salz und ist daher direkt proportional zur Anzahl geschädigter Zellen (Smith et al. 2011).

Die höheren Absorptionswerte der mit Nanopartikeln beimpften Wells, sowohl bei dem PFDL-SDS als auch bei dem PLLA-SDS Nanopartikel sprechen für eine geringere Vitalität der Endothelzellen. Jedoch kann der LDH-Test nicht verwertet werden, da die mit Triton X100 lysierte Probe keine Farbreaktion hervorbrachte. Auch nach Kontrolle aller Versuchsansätze konnte hierzu keine Erklärung gefunden werden. Die Kontrollprobe mit 3-NPA lieferte jedoch höhere Werte als die Kontrolle mit reinen Endothelzellen. Dadurch liegt ein Problem bei der lysierten Probe mit Triton X 100 nahe.

5.2.5 Beurteilung des Toxizitätstests mit Cell Counting Kit-8

Der CCK-8 Test basiert auf einer Farbstoffreaktion mit dem gelblichen Farbstoff WST-8 (water soluble tetrazolium) (ISHIYAMA et al. 1996). Dieser wird durch 1-Methoxy-PMS zu einem orangefarbenen Tetrazolium reduziert. Dieses wiederum wird durch das zelluläre NADH und NADPH reduziert (ISHIYAMA et al. 1997). Somit hängt die Farbreaktion direkt von der Aktivität der zellulären Dehydrogenasen und damit von der Anzahl vitaler Zellen ab.

Der Test beruht auf der Freisetzung von Dehydrogenasen, die eine Reduktion des Farbstoffs bedingen und somit eine Farbreaktion auslösen. Diese werden photometrisch detektiert und stehen in einem direkten Zusammenhang mit der Durchlässigkeit der Zellmembran. Dementsprechend reagierte die Kontrollprobe mit Triton X100, das die Zellmembran durchlässiger macht und somit das intrazelluläre Milieu inklusive der Mitochondrien negativ beeinflusst mit einem Abfall der Messwerte um deutlich über 90% bei den Endothelzellen und bei den Astrozyten wie zu erwarten über 80%. Gleich-

ches gilt für die Probe mit 3-NPA, welches über eine direkte Hemmung der mitochondrialen Atmungskette als zelltoxisch beschrieben ist. Im Vergleich zu Triton X100 kann von in der eingesetzten Konzentration von einer geringeren Toxizität ausgegangen werden.

In den Versuchen mit Endothelzellen sind die gegenüber der reinen Endothelzellprobe niedrigeren Absorptionswerte auffällig. Diese zeigen einen höheren Farbumsatz bei Zugabe von Nanopartikeln in jeder der getesteten Konzentrationen.

Es fällt jedoch auf, dass die Veränderung in den Messwerten einer Systematik unterliegen, die nicht mit der Konzentration der Nanopartikel korreliert, sondern mit der Anordnung der Versuchstriplets auf den Messplatten. So sind die Werte der Triplets in Reihe 1-3 sowie 9-12 jeweils unabhängig von der Konzentration der verwendeten Partikel in allen biologischen Replikaten höher als in den Triplets 4-6 und 7-9. Dies deutet auf einen systemischen Fehler hin, der die Messung derart stark beeinflusst, sodass die Ergebnisse trotz Reproduktion keine zuverlässige Aussage zur Toxizität zulassen. Hierbei kommen verschiedene Ursachen in Betracht. Zum einen ist eine Fehlmessung mit Fehlkalibrierung des ELISA-Readers möglich. Hiergegen sprechen jedoch die Leerwerte, die unabhängig der Position stets bei 0 verbleiben. Eine andere Möglichkeit ist ein unterschiedliches Wachstumsmilieu der Endothelzellen an unterschiedlichen Bereichen der Testplatten. So geschieht der Gasaustausch im Inkubator mittels Diffusion über die Ränder der Platte, sodass sich die Gaszusammensetzung in der Mitte der Platte durchaus vom Rand der Platte unterscheiden kann. Ein Zusammenhang mit der Verarbeitung der Zellen und dem Wechsel des Mediums ist eher unwahrscheinlich. Hier lässt sich durch das Arbeiten mit Multipipette unter Sicht eine unterschiedliche Bestückung der Wells mit Zellen respektive mit Medium nahezu ausschließen.

In den Astrozytenkulturen ist dieser Effekt jedoch nicht zu beobachten. Ebenso findet sich hier kein Abfall der Absorptionswerte von den mit Nanopartikeln behandelten Wells zu den reinen Astrozytenkulturen. Dies spricht dafür, dass die Nanopartikel in den getesteten Konzentrationen keinen toxischen Effekt auf die Astrozyten haben. Da zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen durch ihren enormen Energiebedarf (Bauer 2002) schwieriger kultiviert werden können, könnte so auch erklärt werden, warum bei den Astrozyten keinen systematischen Messwertveränderungen wie bei den Endothelzellen kommt, obwohl die Anordnung der Nanopartikelkonzentration auf den Platten die gleiche war.

5.2.6 Vergleich Ergebnisse TEER-Messung mit FACS-Messung

In der TEER-Messung zeigt sich ein monotoner Zusammenhang zwischen der Höhe der Werte und der Integrität der Barriere. In der FACS-Messung besteht ebenfalls ein monotoner Zusammenhang zwischen der Höhe der Fluoreszenz und der Partikelaufnahme und Zellvitalität. Somit korreliert auch die Höhe der TEER-Werte mit der Höhe der Fluoreszenzwerte einer Messung. Als Maß zur Darstellung dieses Zusammenhangs wird der Spearman-Korrelationskoeffizient herangezogen. Dieser eignet sich, da es sich um einen monotonen Zusammenhang zwischen den FACS-Messdaten und der Höhe der TEER-Werte handelt. Er beträgt in den durchgeführten Versuchen 0,66 und kann als deutlicher Zusammenhang zwischen den Ergebnissen aus den beiden Versuchsreihen interpretiert werden (Hazra und Gogtay 2016). Somit zeigen beide Versuchsreihen den gleichen Zusammenhang - eine Abnahme der Integrität der Barriere bei Zunahme der Konzentration an Nanopartikeln. Dieser Zusammenhang ist am ehesten auf die toxische Wirkung der Nanopartikeln in hoher Konzentration zurückzuführen. Die Abnahme der Zellvitalität konnte ebenso in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Auch der CCK-8 Toxizitätstest lässt diese Schlussfolgerung bei eingeschränkter Beurteilbarkeit zu (siehe auch 5.2.5 Beurteilung des Toxizitätstests mit Cell Counting Kit-8). Hier zeigten sich in den Endothelzellkulturen stärkere Farbreaktionen, wenn ihnen zuvor Nanopartikel zugesetzt waren, als bei den Monokulturen ohne Zugabe von Partikeln.

5.2.7 Beurteilung der Nanopartikel

In Zusammenschau der durchgeführten Versuche werden die beiden Partikel (PFDL-SDS, PLLA-SDS) abschließend miteinander verglichen und im Hinblick auf die parallel durch P. Bechinger (Nanopartikel als Transportsysteme zur Therapie des Schädel-Hirn-Traumas: Analyse der zeitlichen Aufnahme in Organe und Überwindung der Blut-Hirn-Schranke von vier unterschiedlich funktionalisierten Poly(L-lactid) und Poly(perfluorodecylacrylat)-NP in der Ratte) am IncP begonnene weitere *in-vivo* Testung beurteilt.

Die Erwartung an die beiden getesteten Partikel wurde in den meisten Versuchen erfüllt. Lediglich die Toxizitätstests lieferten keine verwertbaren Aussagen zur Toxizität beider Partikel. Allerdings sind sowohl der PFDL-SDS als auch der PLLA-SDS Partikel

nachweislich in die Endothelzellen eingedrungen bei vermehrter Aufnahme des PFDL-SDS Partikels gegenüber dem PLLA-SDS Partikel in jeweils gleicher Konzentration. Die Vitalitätsmessung in der Durchflusszytometrie ergibt keine eindeutige Überlegenheit einer der getesteten Partikel. Somit kann abschließend der PFDL-SDS Partikel in den *in-vitro* Testungen als überlegen bewertet werden. Da die absoluten Messdaten beider Partikel auf ein hohes Überleben der Endothelzellen bei Konzentrationen von 150 µg/µl und 300 µg/µl hindeuten und auch bei beiden Partikeln eine Aufnahme in die Zellen stattfindet, sollten beide Partikel in den weiteren Testungen berücksichtigt werden.

6 Zusammenfassung

In Rahmen eines BMBF-Verbundprojektes wurden 10 verschiedene Nanopartikel in Zellkulturmonolayer auf ihre Aufnahme und ihre Effekte auf die Vitalität untersucht (siehe Doktorarbeit „Charakterisierung und zeitliche Kinetik der Aufnahme von Nanopartikeln in C6-Gliomzellen, Astrozyten und zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen“ von Michalea Galley, 2020). Davon wurden dann nicht-bioabbaubare PFDL und bioabbaubare PLLA NP ausgewählt, um sie weiter *in-vitro* und *in-vivo* (siehe Doktorarbeit „Nanopartikel als Transportsysteme zur Therapie des Schädel-Hirn-Traumas: Analyse der zeitlichen Aufnahme in Organe und Überwindung der Blut-Hirn-Schranke von vier unterschiedlich funktionalisierten Poly(L-lactid) und Poly(perfluorodecylacrylat)-NP in der Ratte“ von Patrick Bechinger, 2020) auf ihre Auswirkungen auf die BHS zu testen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein künstliches Blut-Hirnschrankenmodell aus zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen und Astrozyten aus dem Schweinehirn etabliert, um damit konzentrationsabhängige Effekte des PFDL-SDS und PLLA-SDS NP auf die Integrität der BHS und zelluläre Toxizität zu analysieren. Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

1. Lässt sich mit Astrozyten und zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Schweinehirn eine stabile *in-vitro* Blut-Hirnschranke herstellen?

Durch die Kokultivierung von zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen und Astrozyten aus dem Schweinehirn kann eine künstliche BHS hergestellt werden, die in der Literatur mit TEER Werten, dem Maß der BHS-Integrität, zwischen 200 und 1500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ beschrieben wird. In der vorliegenden Arbeit wurden innerhalb von zehn Tagen durchschnittliche TEER-Werte von 445 $\Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 10,2\%$ erreicht. Die BHS-Dichte und Stabilität reichte aus, um das *in-vitro* Modell zur Untersuchung von NP zu verwenden.

2. Werden bioabbaubare Poly(L)-Laktid und nicht-bioabbaubare perfluorodecylacrylat Nanopartikel unterschiedlich in die zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen aufgenommen?

Es wurden die beiden primären Zelltypen sowohl in der Monokultur als auch in der Kokultur mit den zwei NP, dem PFDL-SDS und dem PLLA-SDS, für 20h bei Konzentrationen von 150, 300 und 1500 µg/ml inkubiert. Beide Partikel wurden konzentrationsabhängig in die Zellen aufgenommen, wobei der PFDL-SDS NP eine deutlich höhere Aufnahme nach 20h zeigte.

3. Gibt es eine konzentrationsabhängige Toxizität und Störung der BHS mit den verwendeten NP?

Die Konzentration von 1500 µg/ml erhöhte bei beiden NP die zelluläre Aufnahme von 7-AAD, was auf einen deutlichen Vitalitätsverlust bei hohen Konzentrationen hinweist. Als Konsequenz fiel im *in-vitro* BHS-Modell wiederum für beide getesteten NP die Barrierefunktion zusammen, d.h. die TEER Werte sanken bei Konzentrationen der Nanopartikel PFDL-SDS und PLLA-SDS von 1500 µg/ml deutlich ab. Innerhalb der 20-stündigen Inkubationszeit konnte mittels des LDH- Tests eine Störung der endothelialen Zellmembranintegrität durch die höchste PFDL-SDS Konzentration, aber nicht für den PLLA-SDS NP nachgewiesen werden. Hingegen konnte mit dem CCK-8 Assay keine zelluläre Toxizität aller getesteten NP Konzentrationen auf die mitochondriale Funktion, weder in Endothelzellen noch in Astrozyten bestätigt werden. Beide getesteten NP besitzen also in ihrer höchsten getesteten Konzentration einen negativen Einfluss auf die Integrität der endothelialen Zellmembran selbst und der künstlichen BHS ohne jedoch innerhalb der Inkubationszeit die zelluläre Funktion zu beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine einfache, indirekte Kokultur von zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen und Astrozyten aus dem Schweinehirn eine stabile künstliche BHS entstehen lässt, mit der bereits vor dem Verlust mitochondrialer Funktion eine Störung der BHS-Integrität detektiert werden kann.

7 Anhang

Mittelwerte und Standardabweichungen zu Abbildung 11:

Kokultur ohne Puromycin		Kokultur mit Puromycin	
Mittelwert	SD in %	Mittelwert	SD in %
84,9	6,2	151,4	8,5
37,0	7,1	160,2	10,3
28,6	0,6	128,0	6,7
34,3	1,6	146,7	14,8
31,4	2,6	147,8	7,8

Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichung zu Abbildung 11

Mittelwerte und Standardabweichungen zu Abbildung 12:

	Monokultur		direkte Cokultur		indirekte Cokultur		indirekte Cokultur mit Puromycinbehandlung		Monokultur mit Puromycinbehandlung	
	Mittelwert	SD in %	Mittelwert	SD in %	Mittelwert	SD in %	Mittelwert	SD in %	Mittelwert	SD in %
d7	71,4	9,3	97,0	6,8	84,9	6,2	173,1	2,4	115,3	4,1
d8	54,1	12,2	52,0	15,8	37,0	7,1	170,3	0,4	120,4	9,1
d9	38,3	8,9	47,8	24,2	28,6	0,6	132,4	11,9	92,7	10,8
d10	36,0	5,3	51,8	23,8	34,3	1,6	150,1	16,0	108,0	17,6
d11	36,1	0,9	49,0	21,8	31,4	2,6	140,6	17,9	103,8	23,3

Tabelle 11: Mittelwerte und Standardabweichung zu Abbildung 12

Mittelwerte und Standardabweichungen zu Abbildung 13:

	Kokultur		Kokultur mit PFDL-SDS		Kokultur mit PLLA-SDS	
	Mittelwert	SD in %	Mittelwert	SD in %	Mittelwert	SD in %
d7	248	50	164	25	182	25
d8	135	34	86	11	134	19
d9	238	21	186	5	232	8
d10	434	10	393	5	426	9
d11	421	10	27	10	148	37

Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichung zu Abbildung 13

Mittelwert und Standardabweichung zu Abbildung 16:

	PFDL-SDSr		PLLA-SDS	
	Mittelwert (a.u.)	SD in %	Mittelwert (a.u.)	SD in %
150µg/ml	37378	40%	2026	42%
300µg/ml	63820	39%	38813	60%
1500µg/ml	567611	64%	405442	29%

Tabelle 13: Mittelwert und Standardabweichung zu Abbildung 16

Mittelwerte und Standardabweichung zu Abbildung 17 und 18:

	PFDL-SDS überlebend		PLLA-SDS überlebend	
	Mittelwert	SD in %	Mittelwert	SD in %
150µg/ml	95%	2%	93%	2%
300µg/ml	93%	2%	92%	6%
1500µg/ml	81%	7%	88%	3%

Tabelle 14: Mittelwerte und Standardabweichung zu Abbildung 17 und 18

8 Literaturverzeichnis

Abbott, N. J.; Dolman, D. E. M.; Patabendige, A. K. (2008): Assays to predict drug permeation across the blood-brain barrier, and distribution to brain. In: *Curr Drug Metab* 9 (9), S. 901–910. DOI: 10.2174/138920008786485182.

Abbott, N. J.; Hughes, C. C.; Revest, P. A.; Greenwood, J. (1992): Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture: towards an in vitro blood-brain barrier. In: *J Cell Sci* 103 (Pt 1), S. 23–37. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1429907>.

Abbott, N. Joan; Dolman, Diana E. M.; Drndarski, Svetlana; Fredriksson, Sarah M. (2012): An improved in vitro blood-brain barrier model: rat brain endothelial cells co-cultured with astrocytes. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 814, S. 415–430. DOI: 10.1007/978-1-61779-452-0_28.

Abbott, N. Joan; Patabendige, Adjanie A. K.; Dolman, Diana E. M.; Yusof, Siti R.; Begley, David J. (2010): Structure and function of the blood-brain barrier. In: *Neurobiol Dis* 37 (1), S. 13–25. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.

Adjei, Isaac M.; Sharma, Blanka; Labhasetwar, Vinod (2014): Nanoparticles: cellular uptake and cytotoxicity. In: *Advances in experimental medicine and biology* 811, S. 73–91. DOI: 10.1007/978-94-017-8739-0_5.

Alvarez, Jorge Ivan; Dodelet-Devillers, Aurore; Kebir, Hania; Ifergan, Igal; Fabre, Pierre J.; Terouz, Simone et al. (2011): The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. In: *Science (New York, N.Y.)* 334 (6063), S. 1727–1731. DOI: 10.1126/science.1206936.

Alvarez, Jorge Ivan; Katayama, Takahiro; Prat, Alexandre (2013): Glial influence on the blood brain barrier. In: *Glia* 61 (12), S. 1939–1958. DOI: 10.1002/glia.22575.

Attwell, David; Buchan, Alastair M.; Charpak, Serge; Lauritzen, Martin; Macvicar, Brian A.; Newman, Eric A. (2010): Glial and neuronal control of brain blood flow. In: *Nature* 468 (7321), S. 232–243. DOI: 10.1038/nature09613.

Ballabh, Praveen; Braun, Alex; Nedergaard, Maiken (2004): The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. In: *Neurobiol Dis* 16 (1), S. 1–13. DOI: 10.1016/j.nbd.2003.12.016.

Bauer, Björn (2002): In vitro Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke zur Untersuchung der Permeation und P-Glycoprotein-Interaktion von Arzneistoffen. Heidelberg University Library.

Bechinger, Patrick (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.

Bickel, Ulrich (2005): How to measure drug transport across the blood-brain barrier. In: *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics* 2 (1), S. 15–26. DOI: 10.1602/neurorx.2.1.15.

Bobilya, Dennis J. (2010): A model for transport studies of the blood-brain barrier. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 637, S. 149–163. DOI: 10.1007/978-1-60761-700-6_8.

Bobilya, Dennis J. (2012): Isolation and cultivation of porcine astrocytes. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 814, S. 127–135. DOI: 10.1007/978-1-61779-452-0_10.

Bowman, P. D.; Betz, A. L.; Ar, D.; Wolinsky, J. S.; Penney, J. B.; Shivers, R. R.; Goldstein, G. W. (1981): Primary culture of capillary endothelium from rat brain. In: *In vitro* 17 (4), S. 353–362.

Butt, A. M.; Jones, H. C.; Abbott, N. J. (1990): Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. In: *The Journal of physiology* 429, S. 47–62. DOI: 10.1113/jphysiol.1990.sp018243.

Cohen-Kashi Malina, Katayun; Cooper, Itzik; Teichberg, Vivian I. (2009a): Closing the gap between the in-vivo and in-vitro blood-brain barrier tightness. In: *Brain research* 1284, S. 12–21. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.05.072.

Cohen-Kashi Malina, Katayun; Cooper, Itzik; Teichberg, Vivian I. (2009b): Closing the gap between the in-vivo and in-vitro blood-brain barrier tightness. In: *Brain research* 1284, S. 12–21. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.05.072.

Cohen-Kashi-Malina, Katayun; Cooper, Itzik; Teichberg, Vivian I. (2012): Mechanisms of glutamate efflux at the blood-brain barrier: involvement of glial cells. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 32 (1), S. 177–189. DOI: 10.1038/jcbfm.2011.121.

- Collnot, Lehr (2011): Neue Hoffnung bei entzündlichen Darmerkrankungen. In: *Deutsche Apothekerzeitung* 2011, 07.07.2011 (27), S. 60, zuletzt geprüft am 30.12.2019.
- Czupalla, Cathrin J.; Liebner, Stefan; Devraj, Kavi (2014): In vitro models of the blood-brain barrier. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1135, S. 415–437. DOI: 10.1007/978-1-4939-0320-7_34.
- DARKEN, M. A. (1964): PUROMYCIN INHIBITION OF PROTEIN SYNTHESIS. In: *Pharmacological reviews* 16, S. 223–243.
- Deli, Máiria A.; Abrahám, Csongor S.; Kataoka, Yasufumi; Niwa, Masami (2005): Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. In: *Cell Mol Neurobiol* 25 (1), S. 59–127. DOI: 10.1007/s10571-004-1377-8.
- Franke, H.; Galla, H.; Beuckmann, C. T. (2000): Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro. In: *Brain research. Brain research protocols* 5 (3), S. 248–256.
- Franke, H.; Galla, H. J.; Beuckmann, C. T. (1999): An improved low-permeability in vitro-model of the blood-brain barrier: transport studies on retinoids, sucrose, haloperidol, caffeine and mannitol. In: *Brain research* 818 (1), S. 65–71. DOI: 10.1016/s0006-8993(98)01282-7.
- Galley, Michaela (2020): In-vitro Charakterisierung und zeitliche Kinetik der Aufnahme von 10 bioabbaubaren und nicht-abbaubaren Nanopartikeln in Monokulturen von C6-Gliomazellen sowie zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen und Astrozyten aus dem Schweinehirn.
- Ge, Shujun; Song, Li; Pachter, Joel S. (2005): Where is the blood-brain barrier ... really? In: *J Neurosci Res* 79 (4), S. 421–427. DOI: 10.1002/jnr.20313.
- Goldstein, G. W.; Wolinsky, J. S.; Csejtey, J.; Diamond, I. (1975): Isolation of metabolically active capillaries from rat brain. In: *Journal of neurochemistry* 25 (5), S. 715–717.
- Greene, Chris; Campbell, Matthew (2016): Tight junction modulation of the blood brain barrier: CNS delivery of small molecules. In: *Tissue barriers* 4 (1), e1138017. DOI: 10.1080/21688370.2015.1138017.

Hamilton, Nicola; Attwell, David; Hall, Catherine (2010): Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. In: *Frontiers in Neuroenergetics* 2, S. 5. DOI: 10.3389/fnene.2010.00005.

Hazra, Avijit; Gogtay, Nithya (2016): Biostatistics Series Module 6: Correlation and Linear Regression. In: *Indian journal of dermatology* 61 (6), S. 593–601. DOI: 10.4103/0019-5154.193662.

Helms, Hans C.; Abbott, N. Joan; Burek, Malgorzata; Cecchelli, Romeo; Couraud, Pierre-Olivier; Deli, Maria A. et al. (2016): In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 36 (5), S. 862–890. DOI: 10.1177/0271678X16630991.

Huwylar, J.; Wu, D.; Pardridge, W. M. (1996): Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (24), S. 14164–14169. DOI: 10.1073/pnas.93.24.14164.

Iliff, Jeffrey J.; Wang, Minghuan; Liao, Yonghong; Plogg, Benjamin A.; Peng, Weiguo; Gundersen, Georg A. et al. (2012): A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . In: *Science translational medicine* 4 (147), 147ra111. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003748.

ISHIYAMA, Munetaka; Miyazono, Yoko; SASAMOTO, Kazumi; OHKURA, Yosuke; UENO, Keiyu (1997): A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. In: *Talanta* 44 (7), S. 1299–1305. DOI: 10.1016/S0039-9140(97)00017-9.

ISHIYAMA, Munetaka; TOMINAGA, Hideyuki; SHIGA, Masanobu; SASAMOTO, Kazumi; OHKURA, Yosuke; UENO, Keiyu (1996): A Combined Assay of Cell Viability and in Vitro Cytotoxicity with a Highly Water-Soluble Tetrazolium Salt, Neutral Red and Crystal Violet. In: *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 19 (11), S. 1518–1520. DOI: 10.1248/bpb.19.1518.

Jeliazkova-Mecheva, Valentina V.; Bobilya, Dennis J. (2003): A porcine astrocyte/endothelial cell co-culture model of the blood-brain barrier. In: *Brain research. Brain research protocols* 12 (2), S. 91–98.

Kido, Yasuto; Tamai, Ikumi; Nakanishi, Takeo; Kagami, Toru; Hirosawa, Iori; Sai, Yoshimichi; Tsuji, Akira (2002): Evaluation of blood-brain barrier transporters by co-culture of brain capillary endothelial cells with astrocytes. In: *Drug Metab Pharmacokin* 17 (1), S. 34–41. DOI: 10.2133/dmpk.17.34.

Langer, K. (2011): Mit Nanopartikeln die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Schwerpunkt Nano. In: *Deutsche Apothekerzeitung* 2011, 07.07.2011 (27/2011), S. 68. Online verfügbar unter <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/daz-az/2011/daz-27-2011/mit-nanopartikeln-die-blut-hirn-schranke-ueberwinden>, zuletzt geprüft am 02.01.2020.

Lasbennes, F.; Gayet, J. (1984): Capacity for energy metabolism in microvessels isolated from rat brain. In: *Neurochemical research* 9 (1), S. 1–10. DOI: 10.1007/bf00967654.

Macdonald, Jennifer A.; Murugesan, Nivetha; Pachter, Joel S. (2010): Endothelial cell heterogeneity of blood-brain barrier gene expression along the cerebral microvasculature. In: *J Neurosci Res* 88 (7), S. 1457–1474. DOI: 10.1002/jnr.22316.

McQuaid, Stephen; Cunnea, Paula; McMahon, Jill; Fitzgerald, Una (2009): The effects of blood-brain barrier disruption on glial cell function in multiple sclerosis. In: *Biochemical Society transactions* 37 (Pt 1), S. 329–331. DOI: 10.1042/BST0370329.

Michaelis, K.; Hoffmann, M. M.; Dreis, S.; Herbert, E.; Alyautdin, R. N.; Michaelis, M. et al. (2006): Covalent linkage of apolipoprotein e to albumin nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain. In: *J Pharmacol Exp Ther* 317 (3), S. 1246–1253. DOI: 10.1124/jpet.105.097139.

Mukherjee, Sushmita; Ghosh, Richik N.; Maxfield, Frederick R. (1997): Endocytosis. In: *Physiological reviews* 77 (3), S. 759–803.

Nielsen, Simone S. E.; Siupka, Piotr; Georgian, Ana; Preston, Jane E.; Toth, Andrea E.; Yusof, Siti R. et al. (2017): Improved Method for the Establishment of an In Vitro Blood-Brain Barrier Model Based on Porcine Brain Endothelial Cells. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (127). DOI: 10.3791/56277.

Owens, Donald E. 3rd; Peppas, Nicholas A. (2006): Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. In: *International journal of pharmaceuticals* 307 (1), S. 93–102. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.010.

Papa, Linda; Zonfrillo, Mark R.; Ramirez, Jose; Silvestri, Salvatore; Giordano, Philip; Braga, Carolina F. et al. (2015): Performance of Glial Fibrillary Acidic Protein in Detecting Traumatic Intracranial Lesions on Computed Tomography in Children and Youth With Mild Head Trauma. In: *Academic emergency medicine : official journal of the Society for Academic Emergency Medicine* 22 (11), S. 1274–1282. DOI: 10.1111/acem.12795.

Pardridge, William M. (2012): Drug transport across the blood-brain barrier. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 32 (11), S. 1959–1972. DOI: 10.1038/jcbfm.2012.126.

Parkinson, Fiona E.; Hacking, Cindy (2005): Pericyte abundance affects sucrose permeability in cultures of rat brain microvascular endothelial cells. In: *Brain research* 1049 (1), S. 8–14. DOI: 10.1016/j.brainres.2005.04.054.

Patabendige, Adjanie; Abbott, N. Joan (2014): Primary porcine brain microvessel endothelial cell isolation and culture. In: *Current protocols in neuroscience* 69, 3.27.1-17. DOI: 10.1002/0471142301.ns0327s69.

Patabendige, Adjanie; Skinner, Robert A.; Morgan, Louise; Abbott, N. Joan (2013): A detailed method for preparation of a functional and flexible blood-brain barrier model using porcine brain endothelial cells. In: *Brain research* 1521, S. 16–30. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.04.006.

Patel, Mayur M.; Patel, Bhoomika M. (2017): Crossing the Blood-Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain. In: *CNS drugs* 31 (2), S. 109–133. DOI: 10.1007/s40263-016-0405-9.

Perrière, N.; Demeuse, Ph; Garcia, E.; Regina, A.; Debray, M.; Andreux, J-P et al. (2005): Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. In: *Journal of neurochemistry* 93 (2), S. 279–289. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.03020.x.

Risau, W.; Engelhardt, B.; Wekerle, H. (1990): Immune function of the blood-brain barrier: incomplete presentation of protein (auto-)antigens by rat brain microvascular endothelium in vitro. In: *The Journal of cell biology* 110 (5), S. 1757–1766. DOI: 10.1083/jcb.110.5.1757.

Roser, M.; Fischer, D.; Kissel, T. (1998): Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. In: *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* :

official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V 46 (3), S. 255–263. DOI: 10.1016/s0939-6411(98)00038-1.

Saubaméa, Bruno; Cochois-Guégan, Véronique; Cisternino, Salvatore; Scherrmann, Jean-Michel (2012): Heterogeneity in the rat brain vasculature revealed by quantitative confocal analysis of endothelial barrier antigen and P-glycoprotein expression. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 32 (1), S. 81–92. DOI: 10.1038/jcbfm.2011.109.

Scallet, A. C.; Nony, P. L.; Rountree, R. L.; Binienda, Z. K. (2001): Biomarkers of 3-nitropropionic acid (3-NPA)-induced mitochondrial dysfunction as indicators of neuroprotection. In: *Ann N Y Acad Sci* 939, S. 381–392. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03647.x.

Schunck, Tobias; Onyema, Helen; Zupke, Oliver; Musyanovych, Anna (2016): Welche Eigenschaften von Nanopartikeln bestimmen deren Aufnahme in Zellen? In: *Biospektrum* 22 (7), S. 762–764. DOI: 10.1007/s12268-016-0753-5.

Skinner, R. A.; Gibson, R. M.; Rothwell, N. J.; Pinteaux, E.; Penny, J. I. (2009): Transport of interleukin-1 across cerebromicrovascular endothelial cells. In: *Br J Pharmacol* 156 (7), S. 1115–1123. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2008.00129.x.

Smith, Mathew; Omid, Yadollah; Gumbleton, Mark (2007a): Primary porcine brain microvascular endothelial cells: biochemical and functional characterisation as a model for drug transport and targeting. In: *Journal of drug targeting* 15 (4), S. 253–268. DOI: 10.1080/10611860701288539.

Smith, Mathew; Omid, Yadollah; Gumbleton, Mark (2007b): Primary porcine brain microvascular endothelial cells: biochemical and functional characterisation as a model for drug transport and targeting. In: *Journal of drug targeting* 15 (4), S. 253–268. DOI: 10.1080/10611860701288539.

Smith, Shilo M.; Wunder, Michael B.; Norris, David A.; Shellman, Yiqun G. (2011): A simple protocol for using a LDH-based cytotoxicity assay to assess the effects of death and growth inhibition at the same time. In: *PloS one* 6 (11), e26908. DOI: 10.1371/journal.pone.0026908.

Srinivasan, Balaji; Kolli, Aditya Reddy; Esch, Mandy Brigitte; Abaci, Hasan Erbil; Shuler, Michael L.; Hickman, James J. (2015): TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. In: *Journal of laboratory automation* 20 (2), S. 107–126. DOI: 10.1177/2211068214561025.

Steinbach, Nau: Daten und Wissen zu Nanomaterialien. Aufbereitung gesellschaftlich relevanter naturwissenschaftlicher Fakten. www.nanopartikel.info, zuletzt geprüft am 30.12.2019.

Swain, Suryakanta; Sahu, Prafulla Kumar; Beg, Sarwar; Babu, Sitty Manohar (2016): Nanoparticles for Cancer Targeting: Current and Future Directions. In: *Curr Drug Deliv* 13 (8), S. 1290–1302. DOI: 10.2174/1567201813666160713121122.

Sweeney, Melanie D.; Zhao, Zhen; Montagne, Axel; Nelson, Amy R.; Zlokovic, Berislav V. (2019): Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. In: *Physiological reviews* 99 (1), S. 21–78. DOI: 10.1152/physrev.00050.2017.

Tenzer, Stefan; Docter, Dominic; Kuharev, Jörg; Musyanovych, Anna; Fetz, Verena; Hecht, Rouven et al. (2013): Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. In: *Nat Nanotechnol* 8 (10), S. 772–781. DOI: 10.1038/nnano.2013.181.

Thomas, J. W.; Touchman, J. W.; Blakesley, R. W.; Bouffard, G. G.; Beckstrom-Sternberg, S. M.; Margulies, E. H. et al. (2003): Comparative analyses of multi-species sequences from targeted genomic regions. In: *Nature* 424 (6950), S. 788–793. DOI: 10.1038/nature01858.

Thomsen, Louiza Bohn; Burkhart, Annette; Moos, Torben (2015): A Triple Culture Model of the Blood-Brain Barrier Using Porcine Brain Endothelial cells, Astrocytes and Pericytes. In: *PLoS one* 10 (8), e0134765. DOI: 10.1371/journal.pone.0134765.

Tóth, Andrea; Veszélka, Szilvia; Nakagawa, Shinsuke; Niwa, Masami; Deli, Mária A. (2011): Patented in vitro blood-brain barrier models in CNS drug discovery. In: *Recent Pat CNS Drug Discov* 6 (2), S. 107–118. DOI: 10.2174/157488911795933910.

Tsukita, S.; Furuse, M.; Itoh, M. (2001): Multifunctional strands in tight junctions. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 2 (4), S. 285–293. DOI: 10.1038/35067088.

Ulfig, Norbert; Brand-Saberi, Beate (Hg.) (2017): Kurzlehrbuch Embryologie. 3., aktualisierte Auflage: Georg Thieme Verlag.

Volgina, N. E.; Gurina, O. I.; Grinenko, N. F.; Baklaushev, V. P.; Ivanova, N. V.; Chekhonin, V. P. (2012): Expression of tight junction proteins by umbilical vein epithelial cells co-cultured with allogenic astrocytes. In: *Bulletin of experimental biology and medicine* 154 (1), S. 124–129. DOI: 10.1007/s10517-012-1891-5.

Vries, H. E. de; Blom-Roosemalen, M. C.; van Oosten, M.; Boer, A. G. de; van Berkel, T. J.; Breimer, D. D.; Kuiper, J. (1996): The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. In: *J Neuroimmunol* 64 (1), S. 37–43. DOI: 10.1016/0165-5728(95)00148-4.

Walters, Eric M.; Agca, Yuksel; Ganjam, Venkateshu; Evans, Tim (2011): Animal models got you puzzled?: think pig. In: *Ann N Y Acad Sci* 1245, S. 63–64. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06345.x.

Wang, Zhaoye; Sun, Hui; Yakisich, Juan Sebastian (2014): Overcoming the blood-brain barrier for chemotherapy: limitations, challenges and rising problems. In: *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 14 (8), S. 1085–1093. DOI: 10.2174/18715206113139990029.

Welsch, Ulrich (2006): Sobotta Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. 2., völlig überarb. Aufl. München: Urban & Fischer in Elsevier (StudentConsult).

Wilhelm, Imola; Fazakas, Csilla; Krizbai, Istvan A. (2011): In vitro models of the blood-brain barrier. In: *Acta neurobiologiae experimentalis* 71 (1), S. 113–128.

Wolburg, Hartwig; Lippoldt, Andrea (2002): Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. In: *Vascul Pharmacol* 38 (6), S. 323–337. DOI: 10.1016/s1537-1891(02)00200-8.

Wolf, Sabine; Seehaus, Bernhard; Minol, Klaus; Gnter Gassen, Hans (1996): Die Blut-Hirn-Schranke: Eine Besonderheit des cerebralen Mikrozirkulationssystems. In: *Naturwissenschaften* 83 (7), S. 302–311. DOI: 10.1007/BF01152211.

Zensi, Anja; Begley, David; Pontikis, Charles; Legros, Celine; Mihoreanu, Larisa; Büchel, Claudia; Kreuter, Jörg (2010): Human serum albumin nanoparticles modified with apolipoprotein A-I cross the blood-brain barrier and enter the rodent brain. In: *Journal of drug targeting* 18 (10), S. 842–848. DOI: 10.3109/1061186X.2010.513712.

Zensi, Anja; Begley, David; Pontikis, Charles; Legros, Celine; Mihoreanu, Larisa; Wagner, Sylvia et al. (2009): Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. In: *J Control Release* 137 (1), S. 78–86. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.03.002.

Zhang, Sulin; Gao, Huajian; Bao, Gang (2015): Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. In: *ACS nano* 9 (9), S. 8655–8671. DOI: 10.1021/acsnano.5b03184.

Zhang, Yan; Li, Cheryl S. W.; Ye, Yuyang; Johnson, Kjell; Poe, Julie; Johnson, Shannon et al. (2006): Porcine brain microvessel endothelial cells as an in vitro model to predict in vivo blood-brain barrier permeability. In: *Drug Metab Dispos* 34 (11), S. 1935–1943. DOI: 10.1124/dmd.105.006437.

Zink, Christoph; Pschyrembel, Willibald: Pschyrembel klinisches Wörterbuch: De Gruyter.

Zlokovic, Berislav V. (2008): The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. In: *Neuron* 57 (2), S. 178–201. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.01.003.

Danksagung

Lebenslauf

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt wurde. Alle von mir benutzten Veröffentlichungen, ungedruckten Materialien, sonstige Hilfsmittel sowie Textstellen, die ich wörtlich oder inhaltlich aus gedruckten oder ungedruckten Arbeiten übernommen habe, habe ich als solche gekennzeichnet und mit den erforderlichen bibliographischen Angaben nachgewiesen. Unterstützungsleistungen, die ich von anderen Personen erhalten habe, wurden in der Dissertationsschrift als solche benannt.

Die Dissertation wurde bei keiner anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich vorgelegt, weder im In- noch im Ausland.

Überdies bin ich nicht im Besitz eines anderen Doktorgrades.

Ich habe bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet.

Mir ist bekannt, dass die Zulassung zur Promotion zu versagen ist, wenn die Unterlagen unvollständig oder die Angaben unrichtig sind. Ich bin darüber informiert, dass ich zur Führung des Dokortitels erst mit Aushändigung der Promotionsurkunde berechtigt bin.

Ulm, 27.01.2021

Timo Orben