

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

Nanopartikel als Transportsysteme zur Therapie des Schädel-Hirn-Traumas: In-vivo  
Analyse der zeitlichen Aufnahme in Organe, Überwindung der Blut-Hirn-Schranke  
und Inflammationsreaktion von vier unterschiedlich funktionalisierten Poly(L-lactid)  
und Poly(perfluorodecylacrylat)-Nanopartikeln in der Ratte

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

Vorgelegt von

Patrick Bechinger  
aus Karlsruhe

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

07. Dezember 2021

Für Sophie, Theo und Carlo

---

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>X</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Zielsetzung.....	3
<b>2 Wissenschaftlicher Hintergrund.....</b>	<b>4</b>
2.1 Das Schädel-Hirn-Trauma .....	4
2.1.1 Definition.....	4
2.1.2 Epidemiologie und Ätiologie .....	4
2.1.3 Pathophysiologie .....	5
2.1.3.1 Primärer Schaden.....	5
2.1.3.2 Sekundärer Schaden .....	6
2.1.4 Therapieoptionen und Prognose.....	8
2.2 Die Blut-Hirn-Schranke .....	9
2.2.1 Anatomie und Funktion.....	9
2.2.2 Transportmechanismen .....	12
2.2.3 Schädigung der BHS beim Schädel-Hirn-Trauma .....	14
2.3 Nanopartikel als Transportsysteme zur Überwindung der BHS .....	15
2.3.1 Klassifikation.....	16
2.3.2 Coronabildung und Transport im Blut .....	17
2.3.3 Elimination und Toxizität.....	18
2.3.5 Passage der Blut-Hirn-Schranke .....	19
2.3.6 Nanopartikel zur Therapie des Schädel-Hirn-Traumas.....	21
2.4 Fragestellung .....	24
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.1 Versuchstiere.....	25
3.1.1 Versuchsgruppen.....	25
3.2 Nanopartikel.....	27
3.2.1 Synthese und Charakterisierung.....	27
3.2.2 Vorbereitung der Nanopartikel für die i.v.-Applikation.....	29
3.3 Narkose.....	29
3.4 Vorversuch: Intracerebroventrikuläre Injektion.....	29
3.4.1 Operation .....	30
3.4.2 Intraventrikuläre Applikation der Nanopartikel .....	30
3.4.3 Abschluss des Experimentes.....	31
3.5 Intravenöse Applikation der Nanopartikel.....	31
3.5.1 Vorgehen .....	31
3.6 Controlled Cortical Impact.....	32
3.6.1 Operation.....	32
3.6.2 CCI-Traumainduktion.....	33
3.6.3 Intravenöse Applikation der Nanopartikel .....	34
3.6.4 Abschluss des Experimentes.....	34

3.7	Euthanasie und Organentnahme .....	35
3.8	Histologische Aufarbeitung und Färbung .....	36
3.8.1	Gefrierschnitte .....	36
3.8.2	Immunfluoreszenz-Färbungen .....	36
3.8.2.1	DAPI-Kernfärbung zur Analyse der NP-Verteilung in Organen .....	36
3.8.2.2	NeuN .....	37
3.8.2.3	GFAP .....	37
3.8.2.4	Iba1 .....	38
3.8.2.5	CD31 .....	38
3.8.2	Immunhistochemische Färbungen .....	38
3.9	Auswertung .....	40
3.9.1	Festlegung der Regions of Interest (ROI) .....	40
3.9.2	Mikroskopie .....	41
3.10	Statistische Analyse .....	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
4.1	Vorversuch: Intraventrikuläre Injektion von NP .....	43
4.2	NP-Verteilung in Organen .....	44
4.2.1	Unterschiede der Verteilung innerhalb der Versuchsgruppen .....	45
4.2.2	Zeitliche Kinetik der NP-Verteilung in Organen .....	46
4.2.3	Vergleich der relativen NP-Verteilung in Organen .....	47
4.3	Quantifizierung der NP-Aufnahme in das Hirnparenchym .....	50
4.4	NP-Aufnahme in das Hirnparenchym nach Controlled Cortical Impact .....	52
4.4.1	Relative NP-Aufnahme in das Hirnparenchym nach CCI .....	55
4.4.2	Vergleich der relativen NP-Aufnahme in ipsi- und kontralateraler Hemisphäre nach CCI .....	56
4.4.3	Vergleich der NP-Aufnahme in Läsionsgebiet und Hippocampus nach CCI .....	57
4.5	Aufnahme in neuronale, gliale und endotheliale Zellen des Gehirns .....	60
4.6	Analyse einer möglichen Neuroinflammation nach NP-Applikation .....	62
4.6.1	Astrozyten-Aktivierung .....	62
4.6.2	Mikroglia-Aktivierung .....	63
4.6.3	TNF $\alpha$ -Expression .....	65
4.6.4	Interleukin 1 $\beta$ -Expression .....	66
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>69</b>
5.1	Diskussion der Methoden .....	69
5.1.1	Applikation der Nanopartikel .....	69
5.1.3	Controlled Cortical Impact Traumamodell .....	71
5.1.4	Die Auswertung .....	72
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	74
5.2.1	NP-Verteilung in Organen .....	74
5.2.2	NP-Aufnahme in das Hirnparenchym .....	77
5.2.3	NP-Aufnahme in Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und BCECs .....	80
5.2.4	NP-Aufnahme in das Hirnparenchym nach CCI .....	82
5.2.5	Neuroinflammation .....	86
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick .....	90

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>111</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>115</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>117</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

°C	Grad Celsius
ACE-1	Angiotensin-converting enzyme 1
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
APC	Antigene presenting cells (Antigenpräsentierende Zellen)
ATP	Adenosintriphosphat
BCEC	Brain capillary endothelial cell
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CBF	Cerebral Blood Flow (Zerebraler Blutfluss)
CCI	Controlled Cortical Impact
CHI	Closed Head Injury (geschlossenes Schädel-Hirn-Trauma)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPP	Cerebral Perfusion Pressure (Zerebraler Perfusionsdruck)
CSI	Cortical stab injury (Kortikale Stichverletzung)
CVR	Cerebro-Vascular Resistance (Zerebraler Gefäßwiderstand)
Da	Dalton (molekulare Masse)
DAI	Diffuse axonal injury (Diffuse axonale Schädigung)
DAMP	Damage associated molecular pattern
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
FPI	Fluid percussion injury
FUS	Fokussierter Ultraschall
g	Gramm
GCS	Glasgow Coma Scale
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HMGB1	High-Mobility Group Box 1

HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
ICP	Intracranial pressure (Intrakranieller Druck)
Iba1	Ionized calcium binding adapter molecule 1
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IL1 $\beta$	Interleukin 1 beta
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
i.c.v.	Intracerebroventrikulär
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
JP	Japan
K <sup>+</sup>	Kalium
kg	Kilogramm
l	Liter
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	Low Density Lipoproteinrezeptor
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
MCAO	Middle cerebral artery occlusion
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MPS	Mononuclear phagocyte system
ms	Millisekunde
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
nm	Nanometer

NP	Nanopartikel
NVU	Neurovascular Unit (Neurovaskuläre Einheit)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PAMAM	Polyamidoamin
PBCA	Poly(butylcyanoacrylat)
PEG	Polyethylenglycol
PFDL	Poly(perfluorodecylacrylat)
PLGA	Poly(lactid-co-glycolid)
PLLA	Poly(L-lactid)
RNS	Reactive nitrogen species (Reaktive Stickstoffspezies)
ROI	Region of interest
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
s	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
siRNA	Small interfering Ribonucleinsäure
SLC	Solute carrier
TBI	Traumatic Brain Injury (Schädel-Hirn-Trauma)
TEER	Transendothelial electrical resistance (transendothelialer Widerstand)
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
Tw	Tween® (Polysorbat 80)
UK	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
USA	United States of America
vs	Versus
v/v	Volumenprozent
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
YLD	Years lived with Disease (mit Behinderung gelebte Lebensjahre)
ZNS	Zentrales Nervensystem

---

## Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

---

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Literaturübersicht.....	22
Tabelle 2: Versuchsgruppen.....	26
Tabelle 3: Charakterisierungsdaten der verwendeten Nanopartikel.....	28
Tabelle 4: NP-Verteilung in Organen.....	49
Tabelle 5: Relative NP-Verteilung in Organen.....	50
Tabelle 6: NP-Aufnahme in das Hirnparenchym.....	59
Tabelle 7: Relative NP-Aufnahme in das Hirnparenchym nach CCI.....	59
Tabelle 8: NP-Aufnahme in Kortex vs. Hippocampus.....	60
Tabelle 9: Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	68
Tabelle 10: Geräte und Instrumente.....	111
Tabelle 11: Chemikalien, Medikamente und Lösungen.....	112
Tabelle 12: Antikörper.....	113
Tabelle 13: Nanopartikel.....	113
Tabelle 14: Verbrauchsmaterial.....	114
Tabelle 15: Software.....	114

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas.....	8
Abbildung 2: Die neurovaskuläre Einheit.....	10
Abbildung 3: Klassifikation der Nanopartikel.....	17
Abbildung 4: Aufnahme von Nanopartikeln in Endothelzellen der BHS.....	21
Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf der Versuche.....	26
Abbildung 6: Morphologie der Nanopartikel.....	28
Abbildung 7: Intraventrikuläre Injektion der Nanopartikel.....	31
Abbildung 8: Intravenöse Applikation der NP.....	32
Abbildung 9: Schädelpräparation zur Durchführung des CCI.....	33
Abbildung 10: Das Controlled Cortical Impact Modell.....	34
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Regions of interest (ROI).....	40
Abbildung 12: Intraventrikuläre Injektion der Nanopartikel.....	43
Abbildung 13: PLLA-Tw NP-Verteilung in Organen.....	44
Abbildung 14: NP-Verteilung in Organen nach 4 Stunden.....	45
Abbildung 15: NP-Verteilung in Organen nach 24 Stunden.....	46
Abbildung 16: NP-Verteilung in Organen nach 4 vs. 24 Stunden.....	47
Abbildung 17: Relative NP-Verteilung in Organen.....	48
Abbildung 18: Nanopartikel-Aufnahme in das Hirnparenchym.....	51
Abbildung 19: NP-Akkumulation nach CCI.....	52
Abbildung 20: NP-Aufnahme in das Hirnparenchym.....	54
Abbildung 21: Relative NP-Aufnahme in das Hirnparenchym nach CCI.....	55
Abbildung 22: Relative NP-Aufnahme nach CCI ipsi- vs. kontralateral.....	56
Abbildung 23: NP-Aufnahme nach CCI in Kortex vs. Hippocampus.....	58
Abbildung 24: Aufnahme der NP in Zellen des Gehirns.....	61
Abbildung 25: Analyse der GFAP-Expression.....	62

Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung gegen GFAP.....	63
Abbildung 27: Auswertung der Iba1-Expression.....	64
Abbildung 28: Immunhistochemische Färbung gegen Iba1.....	64
Abbildung 29: Analyse der TNF $\alpha$ -Expression.....	65
Abbildung 30: Immunhistochemische Färbung gegen TNF $\alpha$ .....	66
Abbildung 31: Analyse der IL1 $\beta$ -Expression.....	67
Abbildung 32: Immunhistochemische Färbung gegen IL1 $\beta$ .....	67

---

# 1 Einleitung

---

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist die Hauptursache für Tod und Behinderung im jungen Erwachsenenalter und stellt ein gesamtgesellschaftliches Problem mit erheblicher sozioökonomischer Relevanz dar (Firsching et al., 2016). Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten bestehen nach wie vor keine wesentlichen kausal-therapeutischen Optionen. Das klinische Outcome der betroffenen Patienten ist unverändert schlecht, was bei einem nicht unerheblichen Anteil in einem dramatischen Verlust der Lebensqualität nach Krankenhausentlassung resultiert (Rickels et al., 2011). Die Behandlung beschränkt sich bisher auf die Therapie der Symptome, welche standardmäßig aus einer medikamentösen Senkung und chirurgischen Dekompression des erhöhten intrakraniellen Druckes besteht. Der Grund für die schlechte therapeutische Zugänglichkeit ist die biphasisch verlaufende, komplexe Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas. In der Initialphase kommt es durch die direkte traumatische Gewalteinwirkung auf das Gehirnparenchym zum sogenannten Primären Hirnschaden mit fokalen und diffusen Verletzungsmustern. Mit einer Latenz von Stunden bis Tagen entsteht durch Gewebehypoxie und Substratmangel eine Störung des Zellmetabolismus und eine im Verlauf progrediente Inflammationsreaktion. Dies wird als sekundärer Hirnschaden bezeichnet und führt letztendlich zum Zelluntergang (Werner und Engelhard, 2007, Thal und Neuhaus, 2014). Konsekutiv kommt es zu einer gestörten Integrität der Blut-Hirn-Schranke. Hieraus resultiert eine gesteigerte vaskuläre Permeabilität, die jedoch ebenfalls biphasisch verläuft (Shlosberg et al., 2010). Somit ist trotz erhöhter Durchlässigkeit für makromolekulare Substanzen keine kontinuierliche Passage nicht-schrankengängiger Arzneimittel möglich.

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine hochselektive physiologische Barriere zwischen Gefäß- und zentralem Nervensystem. Ihre Funktion ist die Aufrechterhaltung der Homöostase des neuronalen Gewebes und seiner Mikroumgebung, sowie der gleichzeitige Schutz vor exogenen Noxen. Die Barrierefunktion wird hauptsächlich durch die mikrovaskulären Gefäßendothelzellen des ZNS (BCECs) determiniert, welche über Tight junctions miteinander in Verbindung stehen. In direkter Nachbarschaft bilden Zelltypen wie Astrozyten, Pericyten und Mikrogliazellen eine, als neurovaskuläre Einheit bezeichnete, regulatorisch eingreifende Komponente.

Darüber hinaus steuern spezifische Transportproteine den Stoffaustausch. Gleichzeitig ist die BHS auch ein unüberwindbares Hindernis für zahlreiche Pharmaka. Durch die leistungsfähige Barrierefunktion wird verhindert, dass ausreichende Wirkstoffkonzentrationen ihren Zielort erreichen (Abbott, 2013).

Während der primäre Hirnschaden nach SHT keiner Therapie zugänglich ist, sind die sekundären Prozesse potentiell medikamentös beeinflussbar. Ein vielversprechender Ansatz sind Nanopartikel. Diese Partikel haben eine Größe von 1 bis 1000 nm und sind bereits für zahlreiche biomedizinische Anwendungen etabliert worden. Sie können als Transportsysteme dienen, um die BHS zu überwinden. Idealerweise sollten die zum Einsatz kommenden NP biodegradierbar sein und keine akute oder chronische Neurotoxizität aufweisen, sowie eine ausreichend lange Verweildauer im Gefäßsystem haben. Verschiedene Faktoren wie Partikelgröße, Zusammensetzung und Ladung der Oberfläche beeinflussen dabei die Effizienz zur Penetration der BHS (Bharadwaj et al., 2018b). Ein Problem ist hierbei, dass ein Großteil der systemisch applizierten Nanopartikel in peripheren Geweben akkumuliert und ein nur geringer Anteil das Zielgewebe erreicht (Zhang et al., 2016a). Durch Modifikation ihrer Oberflächenstruktur besteht die Möglichkeit, die so funktionalisierten NP unter Ausnutzung spezifischer Transportprozesse zielgerichtet an bestimmte Strukturen zu bringen. Der Einsatz von Nanopartikeln als Transportsysteme zur Überwindung der BHS gewinnt in der biomedizinischen Forschung zunehmend an Bedeutung. Bei der Behandlung von Schädel-Hirn-Traumata könnte der Einsatz von NP vielversprechende neue Therapieoptionen bieten, ist bisher jedoch wenig erforscht (Bharadwaj et al., 2018b).

## **1.1 Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Nanopartikel auf Polymerbasis mit unterschiedlicher Funktionalisierung und Größe im Tiermodell auf ihre Verteilung in Organen, Fähigkeit zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und der Akkumulation im Hirngewebe nach systemischer Applikation zu untersuchen. Hierzu wurden die NP Sprague-Dawley Ratten intravenös verabreicht und Effekte 4 und 24 Stunden nach Injektion analysiert. Unter Nutzung eines experimentellen Schädel-Hirn-Traumas im Modell der Controlled Cortical Impact (CCI) Hirnverletzung, sollte zusätzlich der Unterschied der Nanopartikel-Aufnahme in das Gehirn bei gestörter gegenüber intakter BHS charakterisiert werden, um das therapeutische Potential im Perikontusionsgebiet abzuschätzen. Darüber hinaus war es Ziel eine mögliche Inflammationsreaktion durch die applizierten NP im Gehirn zu untersuchen.

---

## **2 Wissenschaftlicher Hintergrund**

---

### **2.1 Das Schädel-Hirn-Trauma**

#### **2.1.1 Definition**

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist definiert als Verletzung oder Funktionseinschränkung des Hirnparenchyms in Folge einer äußeren Gewalteinwirkung. Begleitend kann es zur Verletzung des knöchernen Schädels, der umgebenden Weichteilstrukturen, sowie der hirnversorgenden Gefäße und Hirnhäute kommen (Menon et al., 2010, Firsching et al., 2016).

Zur Festlegung des Schweregrades hat sich klinisch die Einteilung nach der Glasgow Coma Scale (GCS) etabliert. Hierbei wird das neurologische Defizit durch Beurteilung der drei Kategorien Augenöffnen, beste verbale Reaktion und beste motorische Reaktion über einen Summenscore bewertet. Die Summe kann hierbei zwischen 3 und maximal 15 Punkten betragen. Anhand dieses Scores wird die Einteilung in leichtes (GCS 13-15), moderates (GCS 9-12) und schweres SHT vorgenommen (Teasdale und Jennett, 1974, Saatman et al., 2008). Die mit über 91% überwiegenden Zahl der Patienten erleidet ein leichtes SHT. Der Anteil an Patienten mit schwerem SHT liegt bei etwa 5% (Rickels et al., 2010).

#### **2.1.2 Epidemiologie und Ätiologie**

Das SHT ist weltweit die häufigste Todesursache bei Kindern und jungen Erwachsenen und mit jährlich 8,1 Millionen verursachten Years lived with Disability (YLD, mit Behinderung gelebte Lebensjahre) der häufigste Auslöser einer bleibenden Behinderung in dieser Altersgruppe. Die weltweite Prävalenz des SHT hat hierbei seit 1990 um fast 10% zugenommen (Rosenfeld et al., 2012, Maas et al., 2017, GBD 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators, 2019). Mit einer Inzidenz von 332/100.000 Einwohnern pro Jahr in Deutschland und den hierdurch verursachten jährlichen Kosten in Höhe von etwa 2,5 Milliarden Euro, besitzt das Schädel-Hirn-Trauma darüber hinaus große gesundheitsökonomische Bedeutung (Rickels et al., 2010). In der Altersverteilung zeigt sich ein trimodales Verteilungsmuster (Rickels, 2018). Ein erster Häufigkeitsgipfel betrifft die ersten Lebensjahre. Kinder machen mit fast 30% einen nicht unerheblichen Anteil des Patientenkollektivs aus.

Ein zweiter Häufigkeitsgipfel besteht im Bereich des jungen Erwachsenenalters. Der letzte Häufigkeitsgipfel betrifft die Altersspanne des Seniums. Bei Menschen über 65 Jahren ist vor allem der Sturz im häuslichen Umfeld der hauptsächliche Verletzungsmechanismus für ein SHT (Destatis, 2019). Weltweit sind Stürze und Verkehrsunfälle die Hauptursachen für ein Schädel-Hirn-Trauma (GBD 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators, 2019). Gerade im Hinblick auf die sich verändernde Altersstruktur der Bevölkerung im Zuge des demografischen Wandels ist zu vermuten, dass sich die Inzidenz des SHT in Zukunft weiter erhöhen wird (Brazinova et al., 2018).

### **2.1.3 Pathophysiologie**

Die Pathophysiologie nach Schädel-Hirn-Trauma ist durch eine äußerst komplexe Abfolge sich gegenseitig beeinflussender und verstärkender Prozesse gekennzeichnet. Hierbei muss zwischen zwei Phasen der Hirnschädigung unterschieden werden: Dem primären und dem sekundären Schaden.

#### **2.1.3.1 Primärer Schaden**

Der primäre Gewebeschaden entsteht durch die mechanische Krafteinwirkung auf das Hirngewebe unmittelbar im Moment des Traumas. Die hierbei geschädigten Zellverbände sind irreversibel zerstört und daher nicht therapeutisch behandelbar. Die Entstehung der Primärläsion ist somit nur durch Maßnahmen der Primärprävention zu beeinflussen, z.B. behelmtes Fahrradfahren oder Management des Sturzrisikos bei älteren Patienten. Als Schädigungsmuster werden im Wesentlichen drei Entitäten unterschieden: Zum einen epidurale, subdurale oder intracerebrale Blutungen durch Läsionen intrakranieller Gefäße. Die rasche Volumenzunahme innerhalb des Schädels durch eine raumfordernde Blutung führt zu einem schnellen Anstieg des intrakraniellen Druckes (ICP) und kann im Extremfall zu einer Herniation des Hirngewebes in den Tentoriumschlitz oder das Foramen magnum führen (Terpolilli und Plesnila, 2018b). Ein weiterer Typ der primären Hirnschädigung ist die Kontusion. Als Kontusionen werden lokal umschriebene Läsionen des Hirnparenchyms bezeichnet. Sie treten meist temporal und im Bereich der Schädelbasis auf. Hierbei kann es nicht nur zu einer Schädigung am Ort der Krafteinwirkung kommen (als „coup“ bezeichnet), sondern

auch zu einer Gewebsverletzung auf der gegenüberliegenden Seite des Gehirns („contre-coup“) (Ommaya et al., 1971).

Der dritte wichtige Schädigungsmechanismus ist der diffuse Axonschaden (diffuse axonal injury, DAI). Eine traumatisch bedingte Dehnung der Axone, vorwiegend als Folge von Scherkräften bei Akzelerations- und Dezelerationsverletzungen, verursacht hierbei eine Störung axonaler Transportprozesse. Dies führt über eine Degradierung des axonalen Zytoskeletts schließlich zum Axonverlust (Büki und Povlishock, 2006, Smith et al., 2013).

### **2.1.3.2 Sekundärer Schaden**

Mit einer zeitlichen Verzögerung von Stunden bis Tagen kommt es zur Entstehung des sogenannten sekundären Hirnschadens. Dieser entwickelt sich in einem die Primärläsion umgebenden Areal, welches auch als „Traumatische Penumbra“ bezeichnet wird (Terpolilli und Plesnila, 2018a) und kann den Funktionsverlust durch den primären Schaden weiter aggravieren (Zweckberger et al., 2006). In Folge von Gefäßverletzungen und mechanischer bedingter Störung der Blut-Hirn-Schrankenintegrität kommt es zur Ausbildung eines akuten vasogenen Hirnödems mit Flüssigkeitsextravasation in das Interstitium. Die Schädigungsmechanismen an der Blut-Hirn-Schranke werden in Kapitel 2.2.4 detaillierter beschrieben. Das zytotoxische Hirnödem tritt unabhängig von einer Störung der BHS auf und entsteht im Gegensatz zum vasogenen Hirnödem intrazellulär. Eine Kompromittierung der cerebralen Mikrozirkulation führt zum Funktionsverlust der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase durch zellulären Substratmangel und einem konsekutiven Zusammenbruch der Ionengradienten. Hierdurch kommt es zu einer erhöhten Permeabilität der Zellmembranen. Insbesondere bei Astrozyten sorgt deren Aufnahme osmotisch wirksamer Substanzen wie Glutamat und verschiedener Ionen, die durch die Gewebeschädigung in hoher Konzentration im Interstitium vorliegen für eine Zellschwellung (Werner und Engelhard, 2007). Das zytotoxische Hirnödem macht einen Hauptteil der Hirnschwellung nach Schädel-Hirn-Trauma aus (Marmarou et al., 2006). Raumfordernde intrakraniellen Blutungen, aber auch die Ödembildung führen zu einer Zunahme des intrakraniellen Volumens. Gemäß der Monro-Kellie-Doktrin muss die Summe der drei Kompartimente Blut, Liquor und Hirnparenchym stets gleichbleiben, um einen konstanten ICP aufrecht zu erhalten.

Da der Schädel einer intrakraniellen Volumenvergrößerung entgegensteht („closed box“-Konzept), kommt es nach Aufbrauchen der intrazerebralen Compliance zu einem starken Anstieg des ICP (Mokri, 2001, Wilson, 2016).

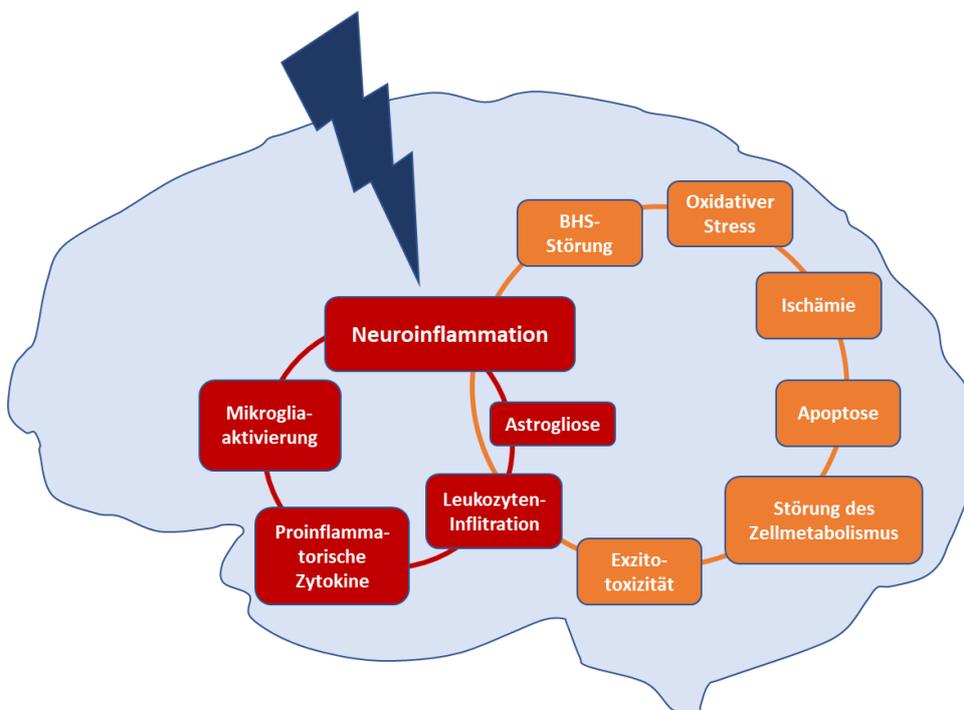
Durch eine Störung der cerebralen Autoregulation mit lokal vermindertem cerebralen Blutfluss (CBF) kommt es, wie bereits beschrieben, zu einem Missverhältnis von Angebot und Bedarf an Sauerstoff und Energieträgern im cerebraler Metabolismus. Hieraus resultiert ein anaerober Zellstoffwechsel mit ischämiebedingter Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiver Stickstoffspezies (RNS), was als oxidativer Stress bezeichnet wird. Konsekutiv kommt es zur mitochondrialen Dysfunktion mit Störung der oxidativen Phosphorylierung.

Die traumatische Gewebeerstörung löst eine massive Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter, insbesondere von Glutamat aus. Dies löst über  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure- (AMPA) und N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA) Rezeptoren einen exzessiven Calciumeinstrom in Neurone und Gliazellen aus und vermittelt die sogenannte Exzitotoxizität. Die intrazelluläre Akkumulation von Calciumionen führt über eine Aktivierung der Lipidperoxidation zur Autolyse zellulärer Strukturen, DNA-Fragmentierung und letztendlich zur Apoptose (Werner und Engelhard, 2007).

Durch Freisetzung von sogenannten Damage associated molecular patterns (DAMP) aus geschädigten Zellen, wie High-mobility group box 1 (HMGB1), Hitzeschockproteine (HSP) und ATP wird eine kaskadenartig ablaufende Inflammationsreaktion ausgelöst (Jassam et al., 2017). Die Genexpression proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), sowie chemotaktischer Zytokine (Chemokine) wie CCL2, CCL3, CXCL1 und CXCL4 wird hochreguliert (Chiu et al., 2016, Jassam et al., 2017) und es erfolgt eine Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten (Corps et al., 2015). In aktivierten Astrozyten wird über den nuclear-factor-KB (NF $\kappa$ B) die Transkription und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren wie TNF $\alpha$  und Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) gesteigert (Cederberg und Siesjö, 2010, Burda et al., 2016, Karve et al., 2016). Ebenso wird das Intermediärfilament Glial fibrillary acidic protein (GFAP) vermehrt exprimiert, wodurch es zur Induktion einer reaktiven Astroglie und Ausbildung einer Glianarbe kommt. Die Mikrogliaaktivierung führt zur Polarisierung in ihren amöboid beweglichen M1 Phänotyp.

Nach Aktivierung kommt es ebenfalls zur Freisetzung proinflammatorische Zytokine und reaktiver Sauerstoffspezies, sowie reaktiver Stickstoffspezies (RNS) durch vermehrte Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) (Donat et al., 2017). Hierdurch werden wiederum benachbarte Mikroglia aktiviert und es kommt zur Rekrutierung weiterer Entzündungszellen. Letztendlich wird durch Freisetzung von zytotoxischen Mediatoren die Caspase-vermittelte Apoptose ausgelöst. (Karve et al., 2016, Donat et al., 2017).

Der sekundäre Hirnschaden stellt somit ein äußerst komplexes System verschiedener Schädigungsmechanismen dar, die sich im Sinne eines circulus vitiosus gegenseitig modulieren, aktivieren und verstärken können.



**Abbildung 1: Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas.** Vereinfachte Darstellung der komplexen, parallel verlaufenden pathophysiologischen Mechanismen des sekundären Hirnschadens. Modifiziert nach (McDonald et al., 2016).

#### 2.1.4 Therapieoptionen und Prognose

Die intensivmedizinische Therapie nach SHT ist begrenzt auf die Eindämmung des Ausmaßes und der weiteren Progression der Hirnschädigung. Der Fokus liegt hierbei auf der Sicherung der Vitalfunktionen und der symptomatischen Therapie. Ziel ist das Aufrechterhalten einer adäquaten Hirnperfusion durch einen CPP zwischen 60 und 70

mmHg (Carney et al., 2017). Zur Therapie des erhöhten Hirndrucks erfolgt ein invasives Monitoring. Bei Verdacht auf transtentorielle Herniation wird versucht, den extrem gesteigerten Hirndruck durch Infusion von Mannitol und milde Hyperventilation akut zu senken. Raumfordernde intrakranielle Hämatoome, insbesondere bei einem ICP über 22 mmHg oder Mittellinienverlagerung werden chirurgisch mittels dekompressiver Kraniektomie entlastet (Firsching et al., 2016, Walter und Zweckberger, 2018). Es existiert aktuell trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung, so zum Beispiel Weiser et al. (Weiser et al., 1999), keine medikamentöse Therapie zur Reduktion des sekundären Hirnschadens.

Die Mortalität des Schädel-Hirn-Traumas beträgt je nach Schweregrad der strukturellen und funktionellen Schädigung bis zu 40%, bei besonders ungünstiger Verletzungskonstellation auch bis zu 70%. Nach schwerem SHT ist die Lebensqualität durch Langzeitkomplikationen wie hypophysäre Insuffizienz, persistierende kognitive und motorische Einschränkungen oder Entwicklung einer Epilepsie häufig stark eingeschränkt (Walter und Zweckberger, 2018).

## **2.2 Die Blut-Hirn-Schranke**

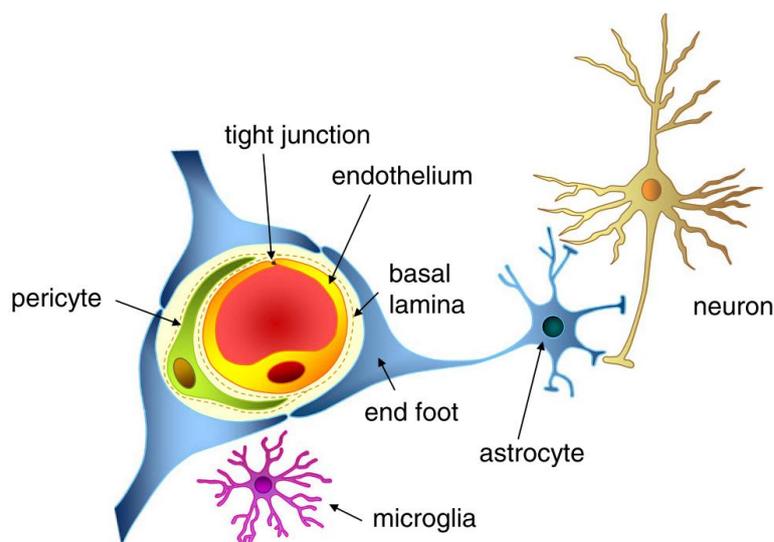
### **2.2.1 Anatomie und Funktion**

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) stellt ein dynamisches Barriersystem zwischen Blutkreislauf und Interstitium des Zentralen Nervensystems dar. Ihre zentrale Aufgabe ist der Schutz des neuronalen Gewebes vor im Kreislauf zirkulierenden Pathogenen und Xenobiotika. Außerdem sorgt sie durch Restriktion des Flüssigkeits- und Ionenaustausches für die Homöostase der cerebralen Mikroumgebung (Thal und Neuhaus, 2014). Die Grundprinzipien des zugrundeliegenden Konzeptes wurden bereits Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts, basierend auf vorhergehenden Untersuchungen von Paul Ehrlich, durch den Berliner Neurologen Max Lewandowsky beschrieben (Lewandowsky, 1900, Davson et al., 1993).

Hauptkomponente der BHS sind die Endothelzellen der hirnersorgenden Mikrogefäße, die sogenannten brain capillary endothelial cells (BCECs). Diese sind über Tight junctions (TJ) eng miteinander verbunden, sodass ein parazellulärer Stoffaustausch nicht möglich ist. Tight junctions, auch Zonulae occludentes genannt, sind im apikalen Bereich der Endothelzellen lokalisierte Zell-Zell-Verbindungen,

die als Diffusionsbarriere den Interzellularraum abdichten. Sie bestehen aus integralen Transmembranproteinen wie Claudinen, allen voran Claudin-5 (Haseloff et al., 2015) und Occludinen, sowie junktionalen Adhäsionsmolekülen (JAMs) und assoziierten Gerüstproteinen (ZO-1, ZO-2 und ZO-3), welche Claudine und Occludine mit intrazellulären Aktinfilamenten und dem Zytoskelett vernetzen (Wolburg und Lippoldt, 2002, Wolburg et al., 2009, Abbott et al., 2010). Zusätzlich sind die BCECs über Cadherin-abhängige Adhäsionsverbindungen (adherens junctions, AJ) miteinander verbunden und so zusätzlich mechanisch stabilisiert. Die mikrovaskulären Endothelzellen sind auf der abluminalen Seite vollständig von einer Basallamina umgeben. Diese besteht aus verschiedenen Adhäsionsproteinen wie Kollagen IV und Fibronektin, Glycoproteinen wie Laminin, sowie diversen Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen der extrazellulären Matrix (Hawkins und Davis, 2005, Thomsen et al., 2017). Die Basallamina dient unter anderem Astrozyten und Perizyten als Verankerung und trägt zusätzlich zur Barrierefunktion bei (Sorokin, 2010).

Diese dichte Versiegelung der Zellverbindungen über Tight junctions limitiert den parazellulären Transport wesentlich und stellt das morphologische Korrelat der Barrierefunktion zwischen apikaler und basolateraler Seite gegenüber Ionen und anderen polaren Substanzen dar (Srinivasan und Red, 2015). Hieraus ergibt sich ein, im Vergleich mit anderen Gefäßendothelien, besonders hoher transendothelialer Wechselstromwiderstand (transendothelial electrical resistance, TEER) von ca. 2000 Ohm\*cm<sup>2</sup> in vivo (Butt et al., 1990, Prabhakarparandian et al., 2013).



**Abbildung 2: Die neurovaskuläre Einheit.** Schematische Abbildung der Bestandteile Blut-Hirn-Schranke (Abbott, 2013).

Die beiden anderen wichtigen Zelltypen, die an der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind, sind Astrozyten und Perizyten. Sie bilden gemeinsam mit den Endothelzellen eine als neurovaskuläre Einheit (neurovascular unit, NVU) bezeichnete funktionelle Einheit.

Astrozyten stehen über ihre Endfüße, welche perivaskulär auf der Außenseite der Basallamina lokalisiert sind, in engem Kontakt mit den BCECs. Sie spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der BHS-Funktion während der Embryonalentwicklung. Über den Sonic Hedgehog-Signalweg induzieren sie die Expression von Tight junction-Proteinen und mittels Sekretion von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) die Angiogenese. Darüber hinaus sind sie durch Produktion von Angiotensin-converting enzyme 1 (ACE-1) und dem neuroprotektiv wirkenden Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) an der Stabilisation und Aufrechterhaltung ihrer funktionellen Integrität beteiligt (Daneman und Prat, 2015). Die astroglialen Endfüßen stehen untereinander über Connexin-vermittelte Gap junctions in engem Kontakt und bilden ein funktionelles Synzytium, welches zentrale Aufgaben für die Homöostase übernimmt. Durch die hohe Anzahl an dort exprimierten Aquaporin 4 Kanalproteinen erfolgt der Flüssigkeitsaustausch hierbei sowohl zwischen Endothelzellen als auch Neuronen. Über einwärtsgerichtete  $K^+$ -Kanäle (Kir4.1) nehmen sie eine Rolle bei der Regulation der extrazellulären Kaliumkonzentration wahr (spatial buffering). Astrozyten stellen das Bindeglied zwischen Gefäßendothel und Neuronen dar. Sie vermitteln neurovaskuläre Interaktion und sind am Recycling exzitatorischer Neurotransmitter, hier vor allem Glutamat beteiligt (Abbott et al., 2006).

Perizyten bilden eine Gruppe kontraktiler Zellen, welche als Bestandteil der neurovaskulären Einheit eine Vielzahl von regulativen und unterstützenden Funktionen ausüben. Sie sind auf der abluminalen Seite der BCECs lokalisiert und über lange Zellfortsätze in die Basallamina eingebettet. Perizyten tragen synergistisch mit Astrozyten zum Erhalt der physiologischen Schrankenfunktion bei. Sie besitzen immunmodulatorische Eigenschaften und spielen eine Rolle bei der Phagozytose von Metaboliten und Zellfragmenten. Darüber hinaus können sie auch als Antigen-präsentierende Zellen (APC) fungieren (Cai et al., 2017). Über direkte Kommunikation mit den mikrovaskulären Endothelzellen sind sie an induktiven Prozessen zur Formation von Tight junction Verbindungen beteiligt (Kim et al., 2009). Perizyten exprimieren eine große Anzahl unterschiedlicher kontraktiler Proteine, darunter Actin alpha 2 (alpha smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA). Hierüber üben sie Kontrolle über den Gefäßdurchmesser aus und können so den CBF an die neuronale Aktivität anpassen

(Hall et al., 2014). Zusätzlich greifen sie als regulatorische Komponente in Angiogenese, Wundheilung und Infiltration von Immunzellen ein (Daneman und Prat, 2015).

Mikroglia sind die ortsständigen Immunzellen des Gehirns. Sie bilden die Hauptkomponente der angeborenen Immunantwort im Gehirn und nehmen, wie bereits in Kapitel 2.1.3 beschrieben wichtige immunmodulatorische Funktionen wahr. Sie sind an der Phagozytose von Pathogenen und über die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) an Reparaturprozessen beteiligt, können T-Zell Migration ins Gehirn vermitteln (Keaney und Campbell, 2015) und sezernieren bei Aktivierung sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine. Ebenso sind sie zur Antigenpräsentation über den Major histocompatibility complex MHC-I und MHC-II befähigt. Mikroglia sind damit die primären zellulären Regulatoren der Immunantwort nach Auftreten einer Hirnschädigung.

### **2.2.2 Transportmechanismen**

Transportprozesse über die Blut-Hirn-Schranke finden in streng regulierter Weise statt. Hierbei können verschiedene Transportmechanismen über die Barriere unterschieden werden (Jain, 2012). Die gesamte Austauschfläche an der BHS beträgt beim Erwachsenen im Durchschnitt 15 m<sup>2</sup> (Nag und Begley, 2005).

a) Passive Diffusion: Die Passive Diffusion über die BHS ist reduziert auf lipophile Moleküle mit einem Molekulargewicht <500 Da und niedriger Polarität. Die Blutgase O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> können ebenfalls frei über die Lipiddoppelschicht diffundieren. Insgesamt passieren Stoffe mit positiver Oberflächenladung die Zellmembran aufgrund ihrer Interaktion mit der negativ geladenen Glykokalyx leichter (Abbott et al., 2010).

b) Carrier-vermittelter Transport: Zur nutritiven Versorgung des Gehirns mit Substraten wie Glucose und Aminosäuren und zum Abtransport von Metaboliten des Zellstoffwechsels, sowie für den Weitertransport von ausgeschütteten Neurotransmittern, wird eine Vielzahl von Transportproteinen exprimiert, die als Solute carrier (SLC) bezeichnet werden. BCECs exprimieren eine Vielzahl verschiedener Transportproteine, die polare Stoffe über die Blut-Hirn-Schranke transportieren. Diese weisen eine unterschiedliche Direktionalität des Transports auf und können sowohl luminal als auch abluminal lokalisiert sein. Hierbei ist der jeweilige SLC-Transporter

spezifisch für sein Substrat. Beispiele hierfür sind zum Beispiel die Glucose-Transporter GLUT1, auch als SLC2A1 bekannt, sowie der Transporter für basische L-Aminosäuren SLC7A1 (Abbott et al., 2010, Daneman und Prat, 2015).

Viele niedermolekulare Substanzen sind weitaus weniger ZNS-gängig als ihre lipophilen Eigenschaften suggerieren. Dies liegt an der Expression eines Efflux-Transporters auf der luminalen Seite der BCECs. Er gehört zur Gruppe der ABC-Transporter (ATP-binding cassette) und wird als P-Glycoprotein oder auch MDR1 bezeichnet. Unter ATP-Hydrolyse und entgegen des Konzentrationsgefälles transportiert dieser eine große Anzahl unterschiedlicher Substrate wieder aus den Endothelzellen in den Blutkreislauf (Begley, 2004). Hierin liegt auch die Tatsache begründet, dass ein Großteil potentieller Neuropharmaka nicht ihren Wirkort erreicht (De Wit et al., 2016, van Assema und van Berckel, 2016).

c) Transzytose: Es besteht eine Reihe spezifischer und nicht-spezifischer Transzytosemechanismen für den transzellulären Transport von Makromolekülen über die BHS. Die Passage durch die Hirnendothelzellen lässt sich in drei Phasen gliedern. Zunächst erfolgt die Endozytose der Makromoleküle. Diese werden entweder über Wechselwirkung mit der negativ geladenen Zellmembran per adsorptiver Endozytose oder rezeptorvermittelt internalisiert. Zu den an der Blut-Hirn-Schranke für die rezeptorvermittelte Transzytose (receptor mediated transcytosis, RMT) exprimierten Rezeptoren zählen unter anderem Insulin-, Transferrin- und Low-density lipoprotein (LDL)-Rezeptoren (Preston et al., 2014). Die Internalisierung erfolgt bei der adsorptiven Endozytose über Caveolae und bei der RMT über Abschnürung der Zellmembran in Clathrin-umhüllten Vesikeln. Intrazellulär werden die Vesikel entlang des Zytoskeletts transportiert und weiter prozessiert, um schließlich auf der basolateralen Seite mit der Zellmembran zu fusionieren, wo der Vesikelinhalt wieder abgegeben wird (Pulgar, 2018, Villaseñor et al., 2019).

d) Monozyteneinwanderung: Unter Inflammationsbedingungen können Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems (Mononuclear phagocyte system, MPS) wie neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten aus der Peripherie rekrutiert werden und die BHS mittels Diapedese überwinden (Engelhardt und Wolburg, 2004). Hierbei ist deren Einwanderung in das Gehirn als immunprivilegiertem Organ deutlich geringer ausgeprägt als in anderen Geweben. Bei geschädigter BHS, beispielsweise durch Infektion oder Trauma können monozytäre Zellen diese sowohl über trans- als auch

über parazelluläre Transportwege passieren. Somit kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Infiltration von Immunzellen in das ZNS (Prinz und Priller, 2017).

### **2.2.3 Schädigung der BHS beim Schädel-Hirn-Trauma**

Nach Schädel-Hirn-Trauma kommt es zu einer charakteristischen, biphasischen Öffnung der Blut-Hirn-Schranke. Ein erster Gipfel der BHS-Störung manifestiert sich innerhalb von 4-5 Stunden nach Trauma (Habgood et al., 2007). Die durch das Trauma auftretenden Scherkräfte führen initial zu einer mechanischen Ruptur der mikrovaskulären Endothelzellschicht mit Caveolin-1 vermittelter, gesteigerter Transzytoseaktivität (Nag et al., 2007, Nag et al., 2009). Schwere SHT führen auch zu einer Kompromittierung der Tight junctions, was in einer gesteigerten Permeabilität auch über parazelluläre Transportwege resultiert (Prakash und Carmichael, 2015). Dies wird durch eine Hochregulation der Expression von Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) und VEGF mit hierdurch ausgelöster Degradierung der TJ-Proteine Claudin-5 und Occludin begünstigt (Rosenberg, 2009, Yang und Rosenberg, 2011). Nach einer Refraktärphase kommt es ca. 48-72 Stunden nach Trauma zu einem zweiten Gipfel der BHS-Störung. In der Frühphase nach traumatischer Schädigung ist die BHS sowohl für nieder- als auch höhermolekulare Stoffe durchlässig. Danach kommt es zu einer vorübergehenden Restitution der Barrierefunktion. In der zweiten Phase, 2-3 Tage nach Trauma, besteht erneut eine erhöhte Permeabilität für größere Moleküle (Habgood et al., 2007, Kang et al., 2013). So beobachteten Baldwin et al. einen zweigipfligen Anstieg in der Extravasation von Meerrettichperoxidase (HRP, molekulare Masse 40.000 Da) 3-6 Stunden und 2 Tage nach experimentellem SHT (Baldwin et al., 1996). Başkaya und Kollegen demonstrierten mittels Extravasation des Fluoreszenzfarbstoffes Evans blue (961 Da) ähnliche Ergebnisse (Başkaya et al., 1997). Die Desintegrität der BHS spielt für die Entstehung eines vasogenen Hirnödems nach Schädel-Hirn-Trauma somit eine entscheidende Rolle. Der Verlust der mikrovaskulären Gefäßintegrität führt zur Aktivierung des Gerinnungssystems und der Thrombin-vermittelten Formation von Mikrothromben (Schwarzmaier et al., 2010, Chodobski et al., 2011, Krenzlin et al., 2016). Blutbestandteile wie Fibrinogen und Albumin gelangen ins Gehirn und lösen eine Mikroglia-Aktivierung aus. Über die gesteigerte Expression proinflammatorischer Cytokine wie  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und Transforming growth factor  $\beta$  ( $\text{TGF-}\beta$ ) führt dies zur Neuroinflammation und schließlich

Caspase-abhängigen Neurodegeneration und reaktiven Astroglie (Schachtrup et al., 2010, Alves, 2014). Durch die gestörte vaskuläre Autoregulation und vermehrte Freisetzung von vasoaktiven Substanzen wie Endothelin-1 aus Perizyten kommt es unmittelbar nach Trauma zu Vasospasmen und einer hierdurch ausgelösten Reduktion des regionalen CBF. Durch die hieraus resultierende Ischämie werden kaskadenartig ablaufende Inflammationsprozesse angestoßen (Logsdon et al., 2015). Durch die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 auf BCECs wird die Invasion von Immunzellen aus der Peripherie begünstigt. Diese verstärken ihrerseits über die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) die Dysfunktion der BHS (Schwarzmaier et al., 2013, Jassam et al., 2017, Liu et al., 2018).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke maßgeblich zu Ausprägung und weiterem Fortschreiten des sekundärer Hirnschadens nach Schädel-Hirn-Trauma beiträgt.

### **2.3 Nanopartikel als Transportsysteme zur Überwindung der BHS**

Als Nanopartikel werden im pharmazeutischen Sinne kolloidale Partikel in der Größenordnung von 1 bis 1000 nm verstanden (Kreuter, 2007, Poupot et al., 2018). Bereits Anfang der 1970er Jahre wurden erstmals mit der Entwicklung von Nanopartikeln als Arzneimitteltransporter begonnen (Khanna et al., 1970). Der Fokus lag hierbei auf der innovativen Möglichkeit der kontrollierten Freisetzung eines enkapsulierten Wirkstoffs (Speiser, 1991). Durch Weiterentwicklungen im Bereich der analytischen Technik hat sich die Erforschung nanopartikulärer Trägersysteme in den letzten 25 Jahren deutlich intensiviert. Nanopartikel sind aktuell Gegenstand weitreichender Forschung für eine Vielzahl verschiedener Anwendungsgebiete. In NP eingeschlossene Wirkstoffe werden vor einem frühzeitigen enzymatischen Abbau geschützt, können zielgerichtet an ihren Wirkort gebracht werden und unterliegen dort einer verbesserten zellulären Aufnahme (Gao, 2016). Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf ihrem Einsatz zum Transport regulär nicht BHS-gängiger Pharmaka über die Blut-Hirn-Schranke. Zum einen werden NP zur Therapie unterschiedlicher neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer-Krankheit, Morbus Parkinson und Multiple Sklerose, aber auch anderer ZNS-Erkrankungen wie Epilepsie, Schlaganfall und Infektionen durch neurotrophe Erreger entwickelt. Ein weiteres Forschungsgebiet

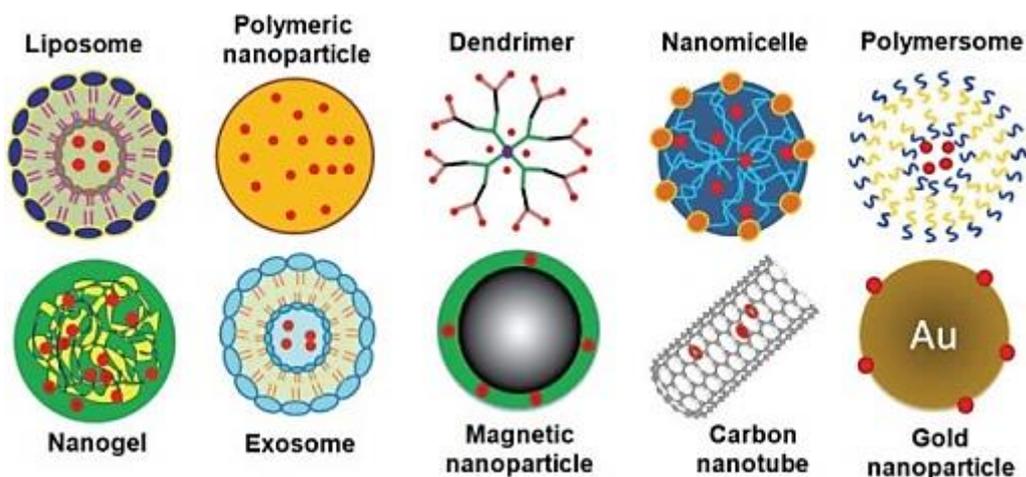
ist ihre Anwendung zur Therapie hirneigener Tumore, insbesondere bei Glioblastomen (Pourgholi et al., 2016, Luciano et al., 2017). Darüber hinaus werden Nanopartikel zur erweiterten Bildgebung entwickelt, beispielsweise Micellen mit dem MRT-Kontrastmittel Gadolinium (Lux et al., 2015, Kim et al., 2018). Für einzelne Anwendungen wie der Tumortherapie und Therapie der Multiple Sklerose sind bereits einige Arzneimittel durch die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) zugelassen worden (Bhardwaj et al., 2019).

### **2.3.1 Klassifikation**

Bisher wurde bereits eine Vielzahl synthetisch hergestellter Nanopartikel in unterschiedlicher Zusammensetzung und aus verschiedenen Ausgangsmaterialien entwickelt. In Sensu stricto zählen hierzu die polymerischen NP. Diese gliedern sich zum einen in NP aus biologischen Polymeren wie den Polyestern Poly(butylcyanoacrylat) (PBCA), Poly(L-lactid) (PLLA) und Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) einem Copolymer aus Milchsäure und Glycolsäure. Diese biologischen Polymere sind bereits seit langem in Medizinprodukten, zum Beispiel PLLA in resorbierbarem Fadenmaterial oder PBCA in Gewebeklebern etabliert (Saraiva et al., 2016). Des Weiteren gehören hierzu auch NP auf der Basis natürlicher Polymere wie Chitosan, einem Polyaminosaccharid aus dem Exoskelett von Gliedertieren, oder dem Serumprotein Albumin. Außerdem die Gruppe der Dendrimere, baumartig verzweigten Polymerketten, häufig aus Polyamidoaminen (PAMAM). Eine weitere große Gruppe bilden Nanopartikel aus anorganischem Material wie Gold, Silber, und mesoporösem Siliciumdioxid, welches eine besonders große Oberflächenstruktur aufweist. Ebenso zählen hierzu die Carbon-basierten Nanopartikel wie Nanotubes, Fullerene und NP mit ferromagnetischen Eigenschaften. Eine besondere Gruppe bilden die Carbon Quantum Dots. Diese besonders kleinen Nanopartikel bestehen aus Halbleiterstrukturen und lassen eine Regulierung ihrer optischen und elektronischen Eigenschaften, beispielsweise ihrer Fluoreszenz zu (Xu et al., 2013, Wu et al., 2016).

Im weiteren Sinne gehören auch Liposomen zu den Nanopartikeln. Diese bestehen aus einer äußeren, amphiphilen Lipiddoppelschicht und einem hydrophilen Kern und zeichnen sich durch ihre Biokompatibilität aus. Die sogenannten Solid lipid Nanopartikel (SLN) besitzen hingegen einen im Inneren befindlichen, hydrophoben Lipidkern. Ihre Vorteile sind eine höhere Kapazität für den Wirkstofftransport und unter

anderem auch geringere Produktionskosten. Micellen sind nanopartikuläre Aggregate aus amphiphilen Molekülen mit hydrophobem Kern und hydrophiler Oberfläche (Musyanovych und Landfester, 2014). Neben Nanogelen und Nanoemulsionen sind zuletzt noch die vesikulären Polymersomen und die Exosomen zu nennen, welche aus zelleigenen Membrankomponenten bestehen. Die Bandbreite unterschiedlicher Nanopartikel-Typen für biomedizinische Anwendungen ist sehr groß und nimmt stetig zu. (Patel und Patel, 2017, Bony und Kievit, 2019).



**Abbildung 3: Klassifikation der Nanopartikel.** Übersicht verschiedener Nanopartikelarten (Agrahari, 2017).

### 2.3.2 Coronabildung und Transport im Blut

Nanopartikel interagieren nach systemischer Applikation mit Plasmaproteinen, die sich auf ihrer Oberfläche anlagern und eine sogenannte Protein-Corona bilden. Hierdurch werden ihre Bioverfügbarkeit, Interaktion mit Immunzellen, Verteilung in Organen und schließlich Aufnahme in Zellen des Zielgewebes determiniert. In die Ausbildung der Corona sind zum einen NP-Protein Interaktionen und zum anderen Protein-Protein Interaktionen involviert. Zunächst kommt es zur Adsorption der im Blutplasma quantitativ am meisten vorhandenen Proteine wie Albumin. Im zeitlichen Verlauf werden diese durch Plasmaproteine mit höherer Affinität zur Oberfläche der NP abgelöst. Dies wird als Vroman-Effekt bezeichnet (Gupta und Roy, 2020). Die Protein-Corona kann weiterhin in eine Hard-Corona aus stabil an die Oberfläche der NP gebundenen Proteinen und eine Soft-Corona aus niedrigaffinen und reversibel gebundenen Proteinen unterteilt werden. Dies verdeutlicht die dynamischen Eigenschaften und Komplexität der Corona (Nguyen und Lee, 2017).

Die Corona weist je nach Typ des Nanopartikels und seiner physikochemischen Oberflächeneigenschaften eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung auf. So stellen  $\alpha$ 2-Makroglobulin und Albumin den größten Anteil der Protein-Corona bei Gold-NP (Cox et al., 2018, Gupta und Roy, 2020). Bei SDS-funktionalisierten Polystyren-NP sind die hauptsächlichen Bestandteile verschiedene Apolipoproteine (Ritz et al., 2015). Größe, Oberflächenladung und Funktionalisierung der NP haben entscheidenden Einfluss auf die Coronabildung.

Ein limitierender Faktor für die Bioverfügbarkeit von Nanopartikeln ist die rasche Oponisierung und Phagozytose der NP durch Immunzellen, sodass unter Umständen lediglich 1-5% der applizierten NP ihren Wirkort erreichen (Zhang et al., 2016b). Durch Konjugation mit Polyethylenglycol (PEG), der sogenannten PEGylierung ist es möglich, der Degradierung durch das Monozyten-Makrophagen-System zu entgehen und die Plasmahalbwertszeit und Zirkulation von Nanopartikeln im Blutkreislauf zu verlängern (Grabrucker et al., 2016, Saraiva et al., 2016). Die Formation der Protein-Corona ermöglicht verschiedenen NP erst ihre Zellaufnahme über spezifische Transportmechanismen (siehe hierzu Kapitel 2.3.5).

### **2.3.3 Elimination und Toxizität**

Wie bereits beschrieben, zirkulieren NP als Komplex mit der sie umgebenden Protein-Corona. Durch Interaktion mit Immunzellen des MPS kommt es zu einer Anreicherung von Nanopartikeln insbesondere in Leber und Milz und hierdurch Begrenzung ihrer Bioverfügbarkeit (Kumar et al., 2010). Generell akkumulieren größere Nanopartikel hier in höherem Umfang und können hepatobiliär abgebaut werden. Sehr kleine Partikel mit einem Durchmesser unter 10 nm werden bereits nach kurzer Zeit renal eliminiert (Hoshyar et al., 2016, Ravindran et al., 2018). Nach ihrer Phagozytose werden Nanopartikel in Lysosomen aufgenommen und dort entweder degradiert oder, bei nicht bioabbaubaren NP für Monate bis Jahre gespeichert (Zhang et al., 2016b). Bioabbaubare Nanopartikel wie PLLA- oder PLGA-NP werden hydrolysiert und über den Citratzyklus metabolisiert (Calzoni et al., 2019).

Nanopartikel als Transportmittel für Wirkstoffe bieten zahlreiche Vorteile, bergen jedoch auch die Gefahr potentieller Toxizität (Voigt et al., 2014b, Wolfram et al., 2015). Insbesondere ist dies bei NP auf der Basis von anorganischem Material bekannt. So konnten zahlreiche Studien zytotoxische Effekte von Silber-Nanopartikeln

demonstrieren (Kim et al., 2012, Pratsinis et al., 2013). Auch für Quantum Dots sind potentiell hepato-, immuno- und neurotoxische Auswirkungen belegt (Wu et al., 2016). Polystyren-NP können durch eine Schädigung lysosomaler Membranstrukturen zur Induktion von oxidativem Stress und mitochondrialer Dysfunktion führen (Lunov et al., 2011). Die Toxizität von bioabbaubaren Nanopartikeln, insbesondere deren neurotoxische Effekte sind bisher unklar. Die Nanopartikel-vermittelte Neurotoxizität wird in Kapitel 5.2.5 genauer erörtert.

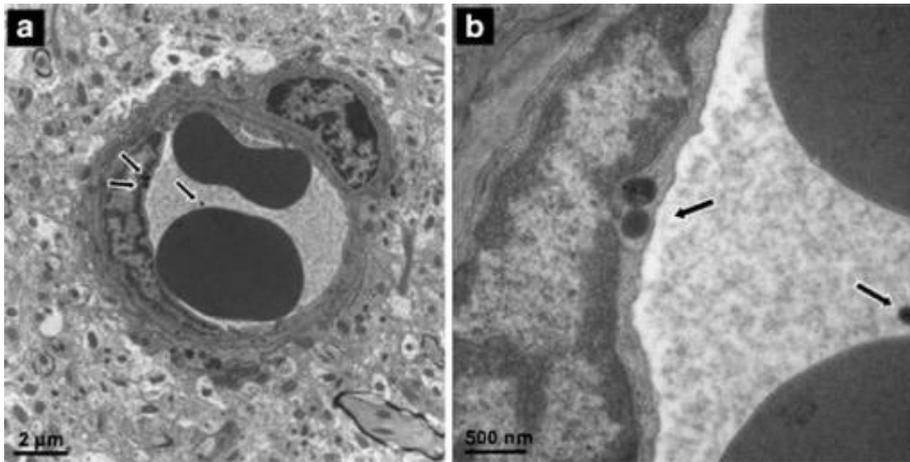
Darüber hinaus können auch bestimmte Oberflächeneigenschaften der NP schädigende Auswirkungen haben. Bereits seit längerem ist der Zusammenhang zwischen stark positiver Oberflächenladung und Störung der Blut-Hirn-Schranke bekannt (Lockman et al., 2004). Ebenso sind hepatotoxische Effekte von positiv geladenen Lipid-NP über ihre Interaktion mit Toll-like Rezeptoren (TLR) bekannt (Kedmi et al., 2010). Auch ein negativer Einfluss einer hydrophoben NP-Oberfläche auf die Aktivierung von Immunzellen ist bereits nachgewiesen worden (Moyano et al., 2012). Über Wechselwirkungen zwischen NP und Protein-Corona kann es zur Induktion fehlerhafter Proteinfaltung von adsorbierten Plasmaproteinen und konsekutiver Inflammationsreaktion durch ihre immunogene Wirkung kommen (Deng et al., 2011). Auch negative Auswirkungen auf die rheologischen Eigenschaften des Blutes und Aktivierung von Komplement- und Gerinnungssystem durch die zirkulierenden NP-Protein Komplexe werden diskutiert (Tenzer et al., 2013, Docter et al., 2015).

### **2.3.5 Passage der Blut-Hirn-Schranke**

Es bestehen zahlreiche Möglichkeiten, die Passage von Nanopartikeln über die BHS zu erleichtern. Zum einen gelingt es durch invasive Methoden eine temporäre Öffnung der BHS über Modulation der Tight junction Strukturen hervorzurufen, zum Beispiel durch die Anwendung von fokussiertem Ultraschall (FUS) (Åslund et al., 2015, Fisher und Price, 2019, Mead et al., 2019), einer hyperosmotischen Öffnung der BHS durch intraarterielle Infusion des Osmodiuretikums Mannitol (Foley et al., 2014) oder Verabreichung von vasoaktiven Substanzen wie dem Bradykinin-Analogon RMP-7 (Borlongan und Emerich, 2003). Zum anderen kann die BHS über direkte intracerebroventrikuläre oder intrathekale Injektion umgangen werden. Diese invasiven Methoden bergen gewisse Sicherheitsrisiken und können auch selber das

ZNS schädigen (Zhang et al., 2016a, Patel und Patel, 2017). Zu den nicht-invasiven Methoden zählen die intranasale Applikation. Hierbei erfolgt die Aufnahme der Nanopartikel über den Nervus olfactorius als vorgelagerter Hirnanteil, wodurch die Blut-Hirn-Schranke umgangen wird. Limitationen stellen die hohe mukoziliäre Clearance und eine Begrenzung der applizierbaren Wirkstoffmenge über die Schleimhäute dar (Battaglia et al., 2018, Patel et al., 2018, Alshweiat et al., 2019).

Eine innovative Strategie stellt die Funktionalisierung der Nanopartikel durch Modifikation ihrer physikochemischen Oberflächeneigenschaften, entweder über Adsorption oder kovalente Verknüpfung mit grenzflächenaktiven Substanzen dar. So ermöglicht die Funktionalisierung von polymerischen NP mit dem nichtionischen Tensid Polysorbat-80 die Penetration der BHS und erhöht ihre Verweildauer im Blutkreislauf aufgrund einer verringerten Aufnahme durch das Monozyten-Makrophagen-System. Die so vektorisierten Nanopartikel werden hierbei nach dem Prinzip eines Trojanischen Pferdes über apikal lokalisierte Rezeptoren in Hirnendothelzellen aufgenommen (Alyautdin et al., 2014). Das kovalent an der Oberfläche der NP gebundene Polysorbat-80 adsorbiert, im Rahmen der Protein-Coronabildung wie bereits weiter oben beschrieben, Apolipoproteine ApoE und ApoA-I aus dem Blutplasma und stimuliert die Interaktion mit Low density Lipoproteinrezeptoren (LDLR) LRP1 und LRP2 an BCECs was schließlich zur rezeptorvermittelten Transzytose der NP führt (Kreuter et al., 2002, Kreuter et al., 2003, Sun et al., 2004). Für das anionische Tensid Natriumlaurylsulfat (SDS) ist eine temporäre Öffnung der BHS durch Interaktion mit Membrankomponenten beobachtet worden (Saija et al., 1997). Dies liefert eine mögliche Erklärung für einen zusätzlichen Mechanismus über den SDS-funktionalisierte NP die BHS überwinden. Ein weiterer Ansatz, welcher dem Prinzip des Trojanischen Pferdes folgt, ist die Funktionalisierung von Nanopartikeln über Konjugation mit Lactoferrin. Dies ermöglicht ihre Transzytose über Transferrinrezeptoren (TfR), welche an der luminalen Seite der mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert werden (Hu et al., 2011a, Li et al., 2018). Die Funktionalisierung der NP scheint für ihre Internalisierung möglicherweise insgesamt wichtiger zu sein als andere Charakteristika wie Zetapotential oder Durchmesser (Voigt et al., 2014a). Andere Studien verdeutlichen die inverse Beziehung von Nanopartikel-Größe und ihrer Fähigkeit zur Überwindung der BHS (Sonavane et al., 2008, Bharadwaj et al., 2016).



**Abbildung 4: Aufnahme von Nanopartikeln in Endothelzellen der BHS.** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gefäßquerschnitts (a) im Cortex einer Maus, 15 Min. nach intravenöser Applikation von ApoE-modifizierten Albumin-NP (van Rooy et al., 2011). In der Vergrößerung (b) sind zwei NP zu sehen, die von einer mikrovaskulären Endothelzelle aufgenommen wurden und ein NP, der sich noch im Gefäßlumen befindet.

### 2.3.6 Nanopartikel zur Therapie des Schädel-Hirn-Traumas

Die beim SHT auftretende Störung der Blut-Hirn-Schranke bietet einen therapeutischen Ansatz zur Steigerung der Aufnahme von Nanopartikeln ins Gehirn (Bony und Kievit, 2019). Durch den Trauma-assoziierten Integritätsverlust der Tight junctions kommt es zu einem, vor allem passiven Übertritt der Nanopartikel über parazelluläre Transportwege in das ZNS, die hier einem Enhanced permeability and retention (EPR) ähnlicher Effekt unterliegen (Boyd et al., 2015). Die Desintegrität der BHS ist jedoch, wie bereits in Kapitel 2.2.3 beschrieben, transient. Potentiell neuroprotektive Pharmaka benötigen hingegen einen stabilen Wirkspiegel und müssen daher auch in der Lage sein, die intakte BHS zu überwinden. Die Mechanismen der Passage von systemisch applizierten Nanopartikeln über die geschädigte Blut-Hirn-Schranke sind in der Vergangenheit vor allem für die cerebrale Ischämie erforscht worden. Aufgrund der Überschneidung ihrer pathophysiologischen Mechanismen bieten Schädel-Hirn-Trauma und Ischämie zahlreiche Parallelen (Bharadwaj et al., 2018b). Einige wenige Forschungsgruppen haben sich dezidiert mit der Rolle von Nanopartikeln zur Therapie des SHT im Tiermodell beschäftigt. Cruz und Kollegen untersuchten den Einfluss der Partikelgröße von PLGA-Nanopartikeln auf die Hirnverteilung nach experimentellem SHT und zeigten, dass kleine NP die Blut-Hirn-Schranke in höherem Ausmaß passierten als größere (Cruz et al., 2016). Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Bharadwaj et al. mit PEGylierten Polystyrol-NP (Bharadwaj et al., 2016). Darüber hinaus wurden bereits Untersuchungen zu NP mit

neuroprotektiven Wirkstoffen nach experimentellem SHT durchgeführt. So konnten Ruozi et al. zeigen, dass mit Cerebrolysin beladene PLGA Nanopartikel in der Lage sind, den sekundären Hirnschaden nach SHT abhängig von ihrer Größe und Funktionalisierung zu reduzieren (Ruozi et al., 2015). Anderen Studien konnten nachweisen, dass mit Small interfering Ribonucleinsäure (siRNA) beladene NP im Läsionsgebiet akkumulieren und dort die Expression proinflammatorischer Gene herunterregulieren (Kang et al., 2016, Kwon et al., 2016, Mann et al., 2016). Zusammenfassend zeigen die bisherigen Resultate, dass Nanopartikel nach experimentellem SHT im periläsionalen Gebiet akkumulieren und dort zielgerichtet Wirkstoffe freisetzen können. Durch Funktionalisierung kann ihre Aufnahme und Verweildauer im geschädigten Hirngewebe zusätzlich erhöht werden (Bharadwaj et al., 2018b). Insgesamt ist die Anzahl wissenschaftlicher Publikationen zur Anwendung von Nanopartikeln beim Schädel-Hirn-Trauma bisher begrenzt und verdeutlicht die Wichtigkeit weiterer Forschung. Ein Überblick über die relevanten, bisher publizierten Originalarbeiten ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Literaturübersicht.** Zusammenfassung der Pubmed-Suche nach den Begriffen „Nanoparticle + Traumatic Brain Injury“.

	<b>Trauma-Modell</b>	<b>Tierart</b>	<b>Injektions-route</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>Referenz</b>
PLGA-NP, SDF-1 beladen	Kryoläsion	C57BL/6 Mäuse	i.c.	Induktion der Stammzell-Migration in das Läsionsgebiet	(Zamproni et al., 2017)
Ceriumoxid-NP	FPI	Sprague-Dawley Ratten	i.v.	Reduktion von oxidativem Schaden, Verbesserung des neurologischen Outcomes	(Bailey et al., 2016)
Poröses Silizium-NP, siRNA beladen	Penetr. Trauma	C57BL/6 Mäuse	i.v.	Akkumulation im periläsionalen Areal, Downregulation von Caspase 3	(Kwon et al., 2016)
Poröses Silizium-NP, CAQK-ummantelt, siRNA beladen	Penetr. Trauma, CCI	C57BL/6 Mäuse	i.v.	Akkumulation im Läsionsgebiet mit 70% Silencing der GFP-Expression	(Mann et al., 2016)
PLGA-NP, BDNF-beladen	Weight drop	C57BL/6 Mäuse	i.v.	Signifikant erhöhte BDNF-Aufnahme im Gehirn, Verbesserung des neurologischen Outcomes	(Khalin et al., 2016)
PLGA-NP, 800CW-ummantelt	Kryoläsion	BALB/c Mäuse	i.v.	Höhere Aufnahme kleinerer NP (100 nm) ins Gehirn im Vergleich zu größeren NP	(Cruz et al., 2016)
PLGA-NP, Cerebrolysin-beladen	Penetr. Trauma	Sprague-Dawley Ratten	i.v.	Reduktion des Hirnschadens nach TBI, abhängig von Größe und Oberflächeneigenschaften der NP	(Ruozi et al., 2015)

Nanopartikel	Trauma-Modell	Tierart	Injektions-route	Schlussfolgerung	Referenz
PBCA-NP, Polysorbat 80-ummantelt, HRP oder EGFP-beladen	FPI	Sprague-Dawley Ratten	i.v.	HRP und EGFR überwinden mit Hilfe der PBCA-NP die Blut-Hirn-Schranke und verteilen sich nach TBI im Schadensgebiet	(Lin et al., 2012)
PEGylierte Polystyrol-NP	CCI	C57BL/6 Mäuse	retro-orbital	Inverser Zusammenhang zwischen NP-Größe und Akkumulation im Periläsionsgebiet	(Bharadwaj et al., 2016)
PEGylierte Polystyrol-NP	CHI, FPI	C57BL/6 Mäuse	retro-orbital	NP-Akkumulation am höchsten 3h nach Trauma, Korrelation zwischen BHS-Störung und NP-Aufnahme	(Bharadwaj et al., 2018)
PEGylierte Carbon cluster-NP	CCI	Long Evans Ratten	i.v.	Verbesserung des CBF, Normalisierung von ROS und NO-Level	(Bitner et al., 2012)
Ibuprofen Nano-prodrug mit TEG-spacer	CCI	C57BL/6 Mäuse	i.v. oder i.p.	Akkumulation im Läsionsgebiet, Verbesserung des neurologischen Outcomes	(Clond et al., 2013)
Poröses Silizium-NP, Ca-Silicat-ummantelt, siRNA beladen	Penetr. Trauma	Mäuse	i.v.	Erhöhte siRNA Akkumulation im Bereich der Hirnschädigung	(Kang et al., 2016)
Thioether-Polysorbat 80 Crosslink-NP	CCI	C57BL/6 Mäuse	i.v.	Akkumulation im geschädigten Gehirn, Reduktion der Neuroinflammation, Verbesserung des neurologischen Outcomes	(Yoo et al., 2017)
PLGA-NP, beladen mit Dexamethason	Blast TBI	Sprague Dawley Ratten	i.v.	Reduktion von Apoptose und BHS-Störung, Verbesserung des neurologischen Outcomes	(Hubbard et al., 2018)
Protein-NP, beladen mit Tat-NR2B9c	CCI	C57BL/6 Mäuse	i.v.	Reduktion des Läsionsvolumens, Verbesserung des neurologischen Outcomes	(Wu et al., 2019)
Carboxylierte PLGA-NP	CCI, CHI	C57BL/6 Mäuse	i.v.	Reduktion von Neuroinflammation, Läsionsvolumen und Hirnödemen, Verbesserung des neurologischen Outcomes	(Sharma et al., 2020)
Redox-aktive, TEMPO-beladene NP	TBI	Mäuse	i.v. und i.p.	Verbesserung des neurologischen Outcomes und Reduktion des Läsionsvolumens	(Takahashi et al., 2020)

## 2.4 Fragestellung

Die wissenschaftlichen Fragestellungen, welche sich aus der eingangs formulierten Zielsetzung der vorliegenden Arbeit und dem aktuellen Stand der Wissenschaft ergaben, waren:

1. Gibt es Unterschiede in der organspezifischen und zeitlichen Aufnahme der Untersuchten NP in Leber, Niere, Herz, Milz, Lunge und Gehirn?
2. Überwinden die verabreichten NP die intakte Blut-Hirn-Schranke und gibt es Unterschiede zwischen den verwendeten NP?
  - a. Werden die NP im Untersuchungszeitraum in neuronalen, glialen und endothelialen Zellen aufgenommen?
3. Wie stark akkumulieren die verschiedenen NP nach einer SHT-induzierten Störung der Blut-Hirn-Schranke im therapeutisch zugänglichen Perikontusionsgebiet?
4. Lösen die untersuchten NP im Hirngewebe eine astrozytäre und mikrogliale Inflamationsreaktion aus?

---

## **3 Material und Methoden**

---

### **3.1 Versuchstiere**

Alle durchgeführten Experimente wurden durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz unter dem Aktenzeichen 23 1770-G15-1-085 genehmigt. Es wurden insgesamt (n=55) männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River Deutschland; Sulzfeld) mit einem Gewicht von  $250 \pm 50$  g verwendet. Die Tiere wurden in Gruppen zu zwei bei regelmäßigem Tag-/Nachtrhythmus von 12h/12h, konstanter Luftfeuchtigkeit von  $50 \pm 5\%$ , einer Raumtemperatur von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  und Zugang zu Futter und Wasser ad libitum gehalten. Nach der Operation wurden die Tiere bis zur Euthanasie einzeln gehalten, um Verletzungen durch andere Tiere zu vermeiden. Während des gesamten Zeitraums wurde größter Wert darauf gelegt, Schmerz, Leid und Belastung auf ein Minimum zu reduzieren.

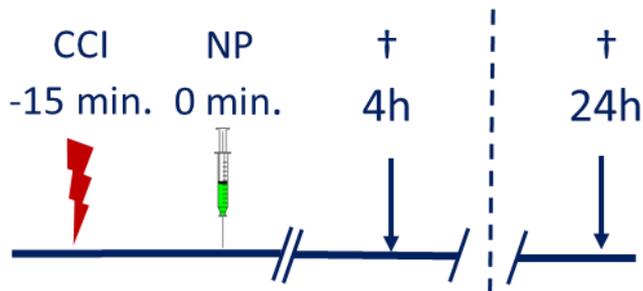
#### **3.1.1 Versuchsgruppen**

Vor Versuchsbeginn wurden die Versuchstiere randomisiert in 16 verschiedenen Versuchsgruppen eingeteilt. Diese gliederten sich in zwei Versuchsreihen, mit und ohne fokale kortikale Kontusion (CCI), sowie jeweils zwei Überlebenszeitpunkte (4 und 24 Stunden) für die vier verschiedenen getesteten Nanopartikel PLLA-SDS, PLLA-Tw, PFDL-SDS und PFDL-Tw. Eine Versuchsgruppe bestand aus Kontrolltieren, die keine Nanopartikel verabreicht bekamen (Ctrl). Abbildung 5 illustriert den Ablauf der Versuchsreihe II.

Die Tiere aller Versuchsgruppen wurden zu ihrem zugeordneten Überlebenszeitpunkt euthanasiert und Gehirn und periphere Organe zur immunhistochemischen Aufarbeitung entnommen.

**Tabelle 2: Versuchsgruppen.** Übersicht der unterschiedlichen Versuchsgruppen in Versuchsreihe I und II.

Versuchsreihe I		Versuchsreihe II	
NP i.v.		CCI + NP i.v.	
PLLA-SDS 4h (n=3)	PLLA SDS 24h (n=3)	PLLA-SDS 4h CCI (n=3)	PLLA-SDS 24h CCI (n=3)
PLLA-Tw 4h (n=3)	PLLA-Tw 24h (n=3)	PLLA-Tw 4h CCI (n=3)	PLLA-Tw 24h CCI (n=3)
PFDL-SDS 4h (n=3)	PFDL-SDS 24h (n=3)	PFDL-SDS 4h CCI (n=3)	PFDL-SDS 24h CCI (n=3)
PFDL-Tw 4h (n=3)	PFDL-Tw 24h (n=3)	PFDL-Tw 4h CCI (n=3)	PFDL-Tw 24h CCI (n=3)
Ctrl (n=3)			



**Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf der Versuche.** In Versuchsreihe II erfolgte die intravenöse Applikation von 10000 µg/kg KG des jeweiligen Nanopartikels 15 Minuten nach Induktion einer Controlled Cortical Impact Hirnverletzung. Entsprechend des zugeordneten Überlebenszeitpunktes wurden die Versuchstiere entweder 4 oder 24 Stunden nach Injektion der Nanopartikel euthanasiert. Versuchsreihe I erfolgte analog, jedoch ohne Auslösen eines CCI-Traumas.

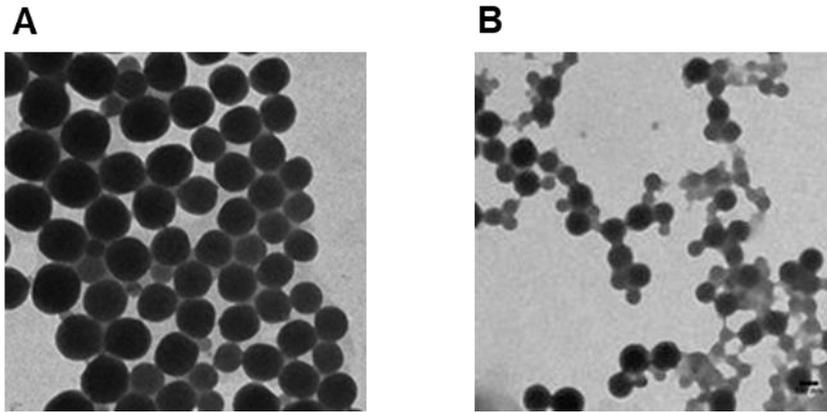
## **3.2 Nanopartikel**

### **3.2.1 Synthese und Charakterisierung**

Die Synthese und Charakterisierung der Nanopartikel erfolgte durch die Gruppe Mikrosysteme für Biologie und Medizin des Fraunhofer Instituts für Mikrotechnik und Mikrosysteme in Mainz. Diese wurden im Rahmen der Kooperation innerhalb eines BMBF-Verbundprojektes (FKZ 13N13258) bereitgestellt. Es kamen vier verschiedenen Nanopartikel zum Einsatz. Die Synthese der einzelnen Nanopartikel wird im Folgenden Überblicksartig dargestellt. Die Herstellung aller Partikeltypen erfolgte mittels Miniemulsionsverfahren (Musyanovych et al., 2008).

Die Poly(perfluorodecylacrylat)-Partikel (PFDL) wurden durch die sogenannte freie radikalische Polymerisation des Styrols oder Perfluorodecylacrylat mit dem öllöslichen Azo-Initiator V59 im direkten Öl-in-Wasser System hergestellt. Als Marker für die Fluoreszenzmessungen wurde der fluoreszierende Farbstoff N-(2,6-Diisopropylphenyl)-perylene-3,4-dicarboximid (PMI) verwendet, welcher bei Anregung im grünen Bereich des Lichtspektrums fluoresziert (Absorptionsmaximum 479 nm). Die Ölphase bestand aus einem Monomer, dem Initiator, einem Hexadecan und dem Fluoreszenzfarbstoff. Die wässrige Phase bestand aus der Tensid-Lösung. Als Tensid wurde entweder Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Polysorbat 80 (Tween® 80) verwendet, wodurch sich als Endprodukt die beiden Nanopartikel-Typen PFDL-SDS und PFDL-Tw darstellten.

Die Synthese der Poly(L-lactid)-Nanopartikel (PLLA) erfolgte durch eine Kombination aus Miniemulsion und Lösungsmittelverdampfungstechnik. Hierzu wurden zunächst Poly(L-lactid) und der Fluoreszenzfarbstoff PMI in Chloroform gelöst und zusammen mit der SDS-Lösung als wässriger Phase per Ultraschallkavitation eine Miniemulsion hergestellt. In einem zweiten Schritt wurde das Chloroform durch Erhitzen verdampft, wodurch die Ausfällung in Tröpfchen und somit Verkapselung des PMI erfolgte. Die Partikel wurden mit SDS als Tensid stabilisiert, oder dieses durch mehrfache Zentrifugation und Redispergierung durch Polysorbat 80 ausgetauscht, sodass die beiden Nanopartikel-Typen PLLA-SDS und PLLA-Tw entstanden.



**Abbildung 6: Morphologie der Nanopartikel.** Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen des PFDL-SDS Nanopartikels (A) und des PLLA-SDS Nanopartikels (B). (Mit freundlicher Genehmigung des Fraunhofer IMM, Mainz)

Im Anschluss an die Syntheseschritte erfolgte die Charakterisierung der so hergestellten Nanopartikel mittels Gel-Permeations-Chromatographie und Dynamischer Lichtstreuung (Dynamic light scattering) (Musyanovych et al., 2008).

**Tabelle 3: Charakterisierungsdaten der verwendeten Nanopartikel.**

Nanopartikel	Feststoffgehalt der Lösung (%)	Durchmesser (nm)	Polydispersitäts-Index	Zetapotential (mV)
PFDL-SDS	5,70	197 ± 21	0,52	- 70 ± 12
PFDL-Tw	5,25	201 ± 26	0,53	- 60 ± 10
PLLA-SDS	1,91	121 ± 23	0,12	- 61 ± 4
PLLA-Tw	1,10	156 ± 27	0,22	- 31 ± 3

### **3.2.2 Vorbereitung der Nanopartikel für die i.v.-Applikation**

Für die intraventrikuläre und intravenöse Applikation wurde die durch das Fraunhofer Institut zur Verfügung gestellte Nanopartikel-Stammlösung je nach Feststoffgehalt mit PBS verdünnt. Zur intraventrikulären Injektion wurde eine NP-Lösung mit einer Dosis von 1000 µg/kg, für die intravenöse Verabreichung 10000 µg/kg Körpergewicht der Versuchstiere hergestellt. Diese wurde unmittelbar am jeweiligen Versuchstag vorbereitet und bis zur endgültigen Verwendung in lichtgeschützte Eppendorf-Reaktionsgefäße (Rotilabo® Reaktionsgefäße schwarz, 1,5 ml, Carl Roth; Karlsruhe) aliquotiert.

### **3.3 Narkose**

Zunächst wurden die Versuchstiere mittels Isofluran (Forene® 100% (v/v), AbbVie; Wiesbaden) in eine Kurznarkose versetzt. Hierzu wurde eine Kompresse mit 1 ml Isofluran beträufelt und in einen Plexiglaszylinder gegeben. Nach zwei Minuten Sättigungszeit wurde das zu narkotisierende Tier in den Behälter überführt, in dem es unter ständiger Beobachtung nach kurzer Zeit einschlieft. Nun erfolgte die Anästhesie mit Chloralhydrat (36 mg/ml, Apotheke der Universitätsmedizin Mainz; Mainz) in einer initialen Dosis von 1 ml/100 g Körpergewicht als intraperitoneale (i.p.) Bolus-Injektion. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte eine stündliche i.p.-Injektion von Chloralhydrat mit der halben Einleitungs-dosis oder wann immer erforderlich. Vor Beginn der Operationen wurden die Haare im Bereich des Operationsgebietes mit einer Schermaschine (GT 104 favorita II, Aesculap; Tuttlingen) rasiert. Zur Vermeidung von Hornhautschäden wurde beidseits Augensalbe (Corneregel®, Dr. Mann Pharma; Berlin) aufgetragen.

### **3.4 Vorversuch: Intracerebroventrikuläre Injektion**

Zur Evaluation der Möglichkeit, die applizierten Nanopartikel mit der zur Verfügung stehenden Technik fluoreszenzmikroskopisch zu detektieren, wurden zunächst Vorversuche an einer Gruppe von n=4 Versuchstieren durchgeführt. Hierbei wurden die Nanopartikel intraventrikulär injiziert, um mögliche Verteilungseffekte im Kreislauf und die Blut-Hirn-Schranke zu umgehen und so die Auffindung im Hirngewebe zu

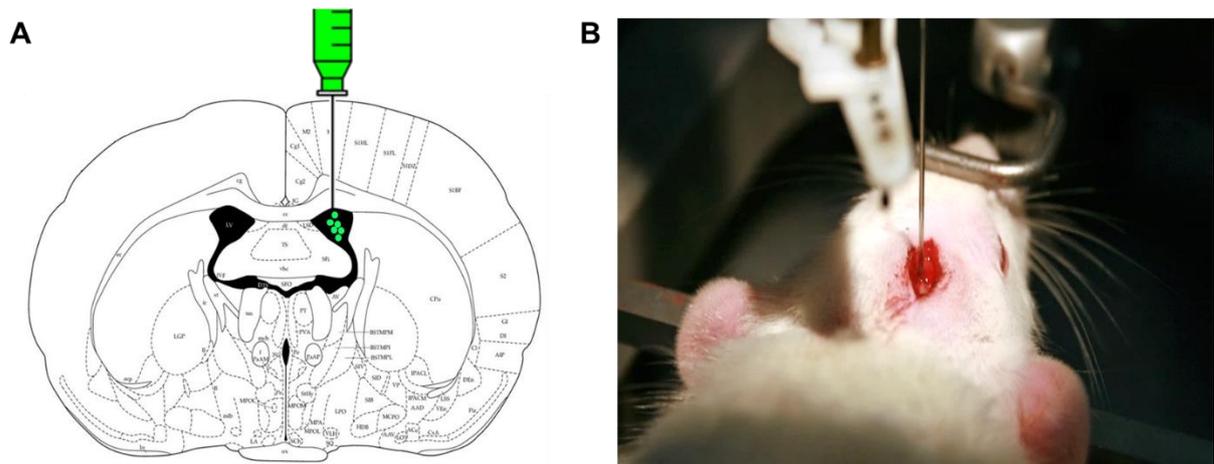
erleichtern. Die Tiere wurden eine Stunde nach intraventrikulärer Injektion euthanasiert und die Gehirne zur histologischen Aufarbeitung entnommen.

### **3.4.1 Operation**

Die Versuchstiere wurden in Bauchlage auf einer Wärmematte (Homeothermic Blanket Unit, Harvard Apparatus; Cambridge, UK) platziert und eine Körpertemperatur von  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  mittels Rückkopplung über eine rektale Temperatursonde aufrechterhalten. Danach wurden die Tiere mit einer Fixierklemme an den Incisivi maxillares und mit zwei beidseits in den Meatus acusticus externus eingebrachten Earbars in einem stereotaktischen Rahmen (David Kopf Instruments; Tujunga, USA) fixiert. Nach Desinfektion mit einem Wund- und Schleimhautantiseptikum erfolgte eine sagittale Hautinzision von ca. 20 mm entlang der Mittellinie des Schädels. Die Kopfhaut wurde mobilisiert und das Periost mit einem Dissektor von der Schädeldecke gelöst. Im Anschluss erfolgte die Desinfektion und Blutstillung mit 3% Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops (Zeiss OPMI pico, Carl Zeiss; Jena) wurde mittels einer Hochgeschwindigkeitsfräse (Microtron GD-850 DBP, Aesculap; Tuttlingen) im Bereich des rechten Seitenventrikels eine Trepanation der Schädelkalotte durchgeführt. Die hierzu verwendeten stereotaktischen Koordinaten, basierend auf Bregma und Lambda als anatomischen Landmarken, waren AP -0,9 mm, ML -1,6 mm, DV 3,5 mm. Hierbei erfolgte eine kontinuierliche Kühlung mit 0,9% Kochsalzlösung (Maciaczyk J 2016).

### **3.4.2 Intraventrikuläre Applikation der Nanopartikel**

Für die intraventrikuläre Applikation der Nanopartikel wurde eine Dosis von  $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht gewählt. Die Injektion in den rechten Seitenventrikel erfolgte mittels einer Mikroliterspritze mit  $25 \mu\text{l}$  Fassungsvermögen (Modell 702 N SYR, Hamilton Robotics; Reno, USA) mit einer aufgesetzten Kanüle der Größe 30G ohne Schliff. Die Nanopartikel-Lösung wurde langsam über eine Dauer von 2 Minuten mit einem Gesamtvolumen von  $10 \mu\text{l}$  verabreicht. Hierbei wurde darauf geachtet, die Injektionskanüle 2 Minuten vor und 5 Minuten nach Injektion in Situ zu belassen, um ein unbeabsichtigtes Entweichen der Nanopartikel-Lösung aus dem Stichkanal zu verhindern (DeVos und Miller, 2013).



**Abbildung 7: Intraventrikuläre Injektion der Nanopartikel.** Darstellung der Injektionsstelle im koronaren Hirnschnitt, Ebene Bregma - 0,92, modifiziert nach (Paxinos und Watson, 2007). (B) OP-Situs der intraventrikulären Injektion in den rechten Seitenventrikel.

### 3.4.3 Abschluss des Experimentes

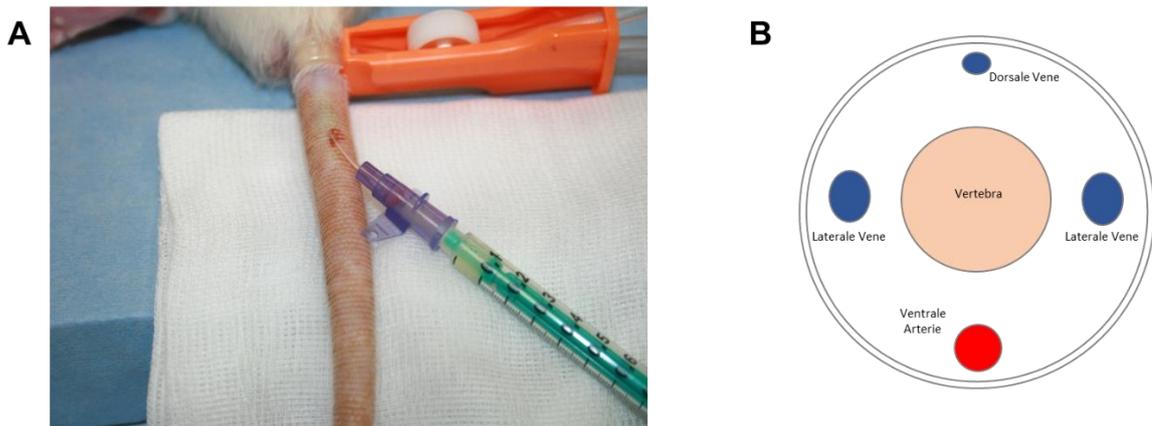
Nach Entfernen der Injektionskanüle erfolgte der Verschluss des Bohrlochs mit Histoacryl®-Gewebekleber. Die Haut wurde mittels Einzelknopfnähten mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen. Eine Stunde nach intraventrikulärer Injektion der NP wurden die Versuchstiere ohne erneutes erwachen aus der Narkose euthanasiert.

## 3.5 Intravenöse Applikation der Nanopartikel

### 3.5.1 Vorgehen

Die Versuchstiere wurden in Bauchlage auf einer Wärmematte (Homeothermic Blanket Unit, Harvard Apparatus; Cambridge, UK) platziert und eine Körpertemperatur von  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  mittels Rückkopplung über eine rektale Temperatursonde aufrechterhalten. Zur Vasodilatation wurde der Schwanz mittels einer Infrarot-Wärmelampe (Beurer IL11, Beurer; Ulm) für 5 Minuten vorgewärmt. Im Anschluss erfolgte die Anlage eines, aus der Rollenklemme und einem 20 cm langen Schlauchstück eines Infusionssystems (Intrafix® Primeline, B. Braun; Melsungen) bestehenden Venenstauers, sowie zweimalige Desinfektion mit einem Wund- und Schleimhautantiseptikum. Etwa 3 cm unterhalb der Schwanzwurzel wurde die laterale Schwanzvene mit einem Venenverweilkatheter der Größe 26G (Klinijekt®, 26G,

Klinika Medical; Usingen) punktiert und zur Lagekontrolle der Rücklauf von Blut kontrolliert. Daraufhin wurde der Venenstauer wieder gelöst und die vorbereitete Nanopartikel-Lösung langsam intravenös verabreicht. Nach vollständiger Applikation wurde der Venenverweilkatheter entfernt und mit einer Kompresse direkter Druck auf die Punktionsstelle ausgeübt, bis es zur Hämostase kam. Abschließend wurden die Tiere in Käfige umgesetzt und bis zum vollständigen Erwachen auf einer Wärmematte platziert und überwacht.



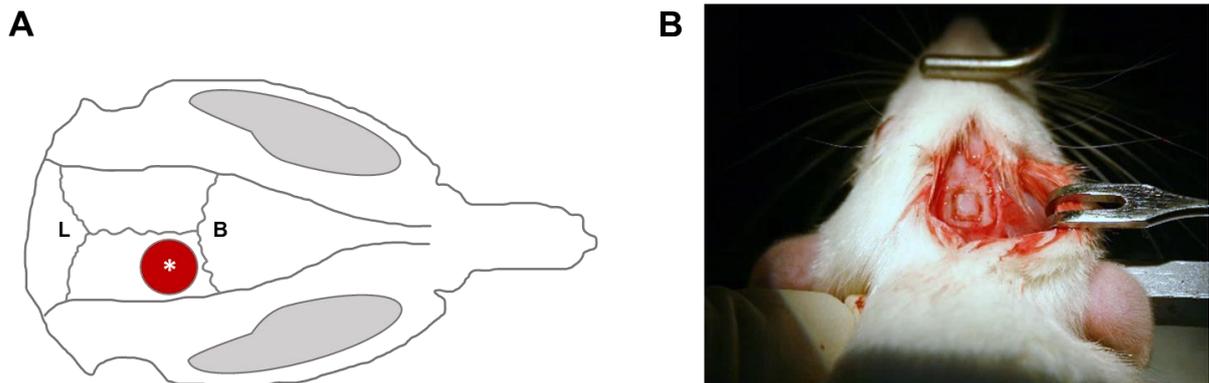
**Abbildung 8: Intravenöse Applikation der NP.** Intravenöse Injektion der Nanopartikel über die laterale Schwanzvene. (B) Anatomie der Gefäßversorgung am Schwanz der Ratte. Modifiziert nach (Saleem et al., 2019).

### 3.6 Controlled Cortical Impact

#### 3.6.1 Operation

Die Versuchstiere wurden in Bauchlage auf einer Heizmatte (Homeothermic Blanket Unit, Harvard Apparatus; Cambridge, UK) platziert und eine Körpertemperatur von  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  mittels Rückkopplung über eine rektale Temperatursonde aufrechterhalten. Danach wurden die Tiere mit einer Fixierklemme an den Incisivi maxillares und mit zwei beidseits in den Meatus acusticus externus eingebrachten Earbars in einem stereotaktischen Rahmen (David Kopf Instruments; Tujunga, USA) fixiert. Nach Desinfektion mit einem Wund- und Schleimhautantiseptikum erfolgte eine longitudinale Hautinzision von ca. 20 mm entlang der Mittellinie des Schädels. Die Kopfhaut wurde mobilisiert und das Periost mit einem Dissektor von der Schädeldecke gelöst (Romine et al., 2014). Im Anschluss erfolgte die Desinfektion mit 3%igem

Wasserstoffperoxid. Im Bereich des rechten Os parietale wurde unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops (Zeiss OPMI pico, Carl Zeiss; Jena) mit einer Hochgeschwindigkeitsfräse (Microtron GD-850 DBP, Aesculap; Tuttlingen) die Anlage einer osteoplastischen Kraniotomie mit einem Durchmesser von ca. 7 mm durchgeführt. Die Begrenzungen waren hierbei nach rostral die Sutura coronaria dextra und nach medial die Sutura sagittalis mit Bregma (s. Abb. 5). Hierbei wurde streng darauf geachtet, die Dura nicht zu verletzen.

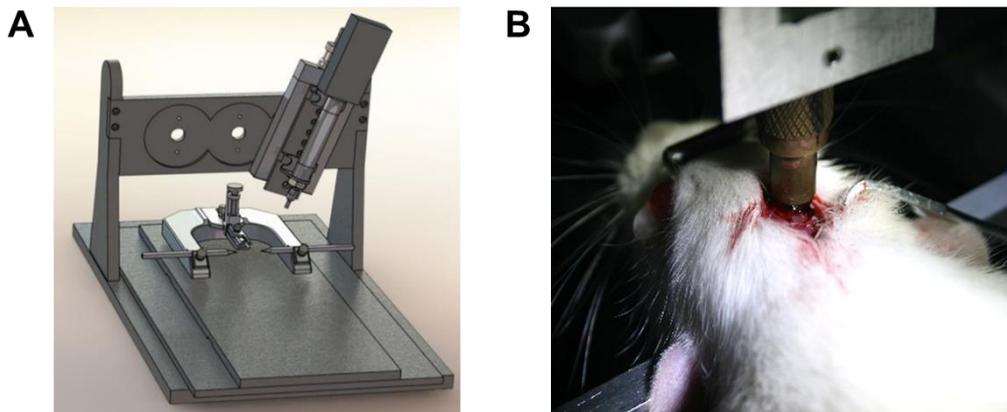


**Abbildung 9: Schädelpräparation zur Durchführung des CCI.** (A) Schemazeichnung der Kraniotomie (L: Lambda, B: Bregma, \*: Kraniotomie). (B) OP-Situs: Kraniotomie im Bereich des rechten Os parietale.

### 3.6.2 CCI-Traumainduktion

Das experimentelle Schädel-Hirn-Trauma wurde mittels eines pneumatisch betriebenen Controlled Cortical Impact Device (Controlled Cortical Impact Device, L. Kopacz, Universitätsmedizin Mainz; Mainz) induziert. Das verwendete System stellt eine Modifikation des 1991 von Dixon et al. Beschriebenen Modells der Controlled Cortical Impact (CCI) Hirnverletzung dar (Dixon et al., 1991) und ist bereits seit langem an unserer Arbeitsgruppe etabliert (Alessandri et al., 2012). Durch einen elektronisch gesteuerten und mit Druckluft beschleunigten Bolzen wird hierbei ein fokales Trauma im Bereich des Kortex hervorgerufen. Unmittelbar vor jeder Traumaauslösung wurden die voreingestellten Werte durch einen Probedurchlauf ohne Versuchstier auf Korrektheit überprüft und wenn nötig angepasst. Die verwendeten Trauma-Parameter waren: Durchmesser 6 mm, Geschwindigkeit 5 m/s, Eindringtiefe 2mm und Verweildauer 200 ms. Die exakte Positionierung des Traumabolzens im rechten

Winkel und mit direktem Kontakt zur Duraoberfläche erfolgte mittels einer Mikrometerschraube. Ziel war hierbei eine perpendiculäre Krafteinwirkung auf den rechten Parietalcortex. Hierbei wurde darauf geachtet, dass Bregma und Lambda auf dem gleichen Niveau lagen. Jetzt erfolgte die Auslösung des Traumamechanismus. Im Anschluss wurde das CCI-Device entfernt und sofort der autologe Knochendeckel rückverlagert und mittels Gewebekleber fixiert. Abschließend wurde die Haut spannungsfrei in Einzelknopftechnik adaptiert. Hierfür wurde nicht-resorbierbares Nahtmaterial der Fadenstärke 4-0 verwendet.



**Abbildung 10: Das Controlled Cortical Impact Modell.** (A) Controlled cortical impact device (Osier und Dixon, 2016). (B) Traumainduktion durch den, auf die intakte Dura aufgesetzten, pneumatisch betriebenen Bolzen.

### 3.6.3 Intravenöse Applikation der Nanopartikel

Die intravenöse Applikation der Nanopartikel erfolgte 15 Minuten nach CCI, analog der in Kapitel 3.3 beschriebenen Methode.

### 3.6.4 Abschluss des Experimentes

Die Tiere wurden in Einzelkäfige umgesetzt. Sie wurden bis zum vollständigen Erwachen durch eine Wärmematte auf 37 °C gewärmt und engmaschig überwacht. Die postoperative Analgesie bestand aus Tramadol-Tropfen in einer Dosis von 1 mg/ml über das Trinkwasser.

### **3.7 Euthanasie und Organentnahme**

Für die weitere histologische Aufarbeitung der Organe wurden die Versuchstiere nach Ablauf des jeweiligen Versuchszeitraums (4h, 24h) euthanasiert. Hierzu wurden die Tiere erneut mittels Isofluran (Forene® 100% (v/v), AbbVie; Wiesbaden) in eine Kurznarkose versetzt und mit einer erhöhten Dosis von 1,2ml/100g KG Chloralhydrat (36 mg/ml, Apotheke der Universitätsmedizin Mainz; Mainz) in tiefe Narkose versetzt. Das Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde durch Überprüfen des Zwischenzehenreflexes überprüft. Im Anschluss erfolgte mittels einer Präparierschere die Eröffnung des Abdomens durch einen Rippenbogenrandschnitt. Nach Darstellung des Diaphragmas wurde dieses zirkulär eröffnet, wobei auch Teile des knöchernen Thorax durchtrennt werden mussten. Anschließend erfolgte die Punktion des linken Ventrikels mittels einer Kanüle. Diese wurde mit einer Overholt-Klemme an der Herzspitze fixiert. Nach Eröffnung des rechten Herzohres erfolgte die transkardiale Perfusion mit einer gepufferten Vollelektrolytlösung (Sterofundin® ISO, B. Braun; Melsungen) über einen Dreiwegehahn. Diese erfolgte als Schwerkraftinfusion mit einem Druck von ca. 80 mmHg. Die Exsanguination erfolgte hierbei so lange bis die Spülflüssigkeit nicht länger blutig tingiert erschien sowie eine Entfärbung von Leber und Schleimhäuten stattgefunden hatte. Daraufhin wurden die Tiere mittels Scherenschlag dekapitiert, das Schädeldach eröffnet und das Gehirn nach Durchtrennung der Hirnnerven und des Zervikalmarks aus der Schädelbasis präpariert. Im Anschluss wurde das entnommene Gehirn für 3 Minuten in Isopentan auf Trockeneis schockgefroren. Des Weiteren wurden Herz, Lunge, Leber, Milz und Nieren entnommen und auf gleiche Weise schockgefroren. Die Organe wurden lichtgeschützt in Aluminiumfolie eingewickelt, in Klarsichtbeutel verpackt und bei -80° C bis zur weiteren Verwendung in einem Tiefkühlschrank gelagert.

## **3.8 Histologische Aufarbeitung und Färbung**

### **3.8.1 Gefrierschnitte**

Das Anfertigen der Gefrierschnitte von Gehirnen und peripheren Organen erfolgte mit Hilfe eines Kryostaten (CM 1850 UV, Leica; Nussloch). Dieser war während der histologischen Aufarbeitung stets auf eine Temperatur von  $-18^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Zunächst wurde mittels eines Einmalskalpells eine glatte Auflagefläche an den gefrorenen Organen geschaffen. Für die Hirnschnitte wurde hierbei ein Teil des basalen Kleinhirns entfernt. Im Anschluss wurden die Organpräparate unter Verwendung eines Einbettmediums (Tissue-Tek® O.C.T. Compund, Sakura Finetek; Staufen im Breisgau) auf einen Präparatehalter aufgefroren und in den Kryostaten eingespannt. Die Schnittdicke aller angefertigten Schnitte betrug  $12\ \mu\text{m}$ .

Für die Hirnschnitte wurde das Gehirn in koronarer Schnitfführung bis zur Ebene Bregma  $0,00\ \text{mm}$  durchgeschnitten und das bis dorthin anfallende Material verworfen. Dann wurden 18 Schnitte in Folge aufgenommen mit jeweils drei Schnitten pro Objektträger aufgezo-gen. Dasselbe wurde für die Ebenen Bregma  $-0,84\ \text{mm}$ ,  $-2,04\ \text{mm}$  und  $-3,00\ \text{mm}$  wiederholt. Als Referenz diente hierbei der Atlas „The Rat Brain in stereotaxic coordinates“ (Paxinos und Watson, 2007). Für die Gefrierschnitte der peripheren Organe wurden diese bis zum näherungsweise größten Transversaldurchmesser durchgeschnitten und ab hier 15 Schnitte in Folge aufgenommen. Hierbei wurden ebenfalls jeweils drei Schnitte auf einem Objektträger angeordnet. Die Objektträger wurden bis zur weiteren Verwendung in Objektträgerkästen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **3.8.2 Immunfluoreszenz-Färbungen**

#### **3.8.2.1 DAPI-Kernfärbung zur Analyse der NP-Verteilung in Organen**

Um die relevanten Areale für die Analyse der Nanopartikel-Verteilung in den Organ- und Hirnschnitten leichter auffinden zu können, wurde eine Kernfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die doppelsträngige DNA des Zellkerns und fluoresziert bei Anregung in blauer Farbe. Hierfür wurde ein Eindeckmedium mit integriertem DAPI-Kernfarbstoff genutzt. Nach Entnahme der Objektträger aus dem Tiefkühlschrank wurden die Schnitte zunächst

bei Raumtemperatur für 15 Minuten getrocknet. Im Anschluss wurden sie mit je einem Tropfen Eindeckmedium benetzt und sofort mit Deckgläsern eingedeckelt. Bis zur mikroskopischen Auswertung am darauffolgenden Tag erfolgte die lichtgeschützte Lagerung im Kühlschrank bei 4°C.

### **3.8.2.2 NeuN**

Zur Darstellung der Koloaliation von Neuronen und den von diesen aufgenommenen Nanopartikeln wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen Neuronal Nuclei (NeuN) durchgeführt.

Die Objektträger wurden zunächst bei Raumtemperatur für 15 Minuten luftgetrocknet. Daraufhin erfolgte die Fixierung mit 4% PFA für ebenfalls 15 Minuten. Nun folgten drei Waschschrirte mit PBS für jeweils 5 Minuten. Im Anschluss wurden die Schnitte für eine Stunde in normalem Eselserum, verdünnt in PBST und 1% BSA inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Jetzt wurden die Schnitte mit jeweils 100 µl des verdünnten Primärantikörpers (Mouse Anti-NeuN, Merck Millipore; Burlington, USA) in einer Verdünnung von 1:100 benetzt und in Färbekammern bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Verdünnung des Primärantikörpers erfolgte hierbei ebenfalls in PBST, sowie 1% BSA.

Am nächsten Tag erfolgten drei Waschschrirte in PBS für jeweils 5 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte für zwei Stunden mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 546 donkey anti-mouse, Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA) inkubiert. Dazu wurden die Schnitte wieder mit jeweils 100 µl des, im Verhältnis 1:500 verdünnten, Sekundärantikörpers benetzt. Die Inkubation erfolgte in Färbekammern bei Raumtemperatur. Die Verdünnung der Antikörperlösung erfolgte hierbei erneut mit PBST, sowie 1% BSA. Nach dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten folgte das Eideckeln der Schnitte mit DAPI-Eideckmedium und Deckgläsern. Lichtgeschützt wurden diese bis zur mikroskopischen Auswertung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

### **3.8.2.3 GFAP**

Die Immunfluoreszenzfärbung gegen Glial fibrillary acidic protein (GFAP) zur Darstellung aktivierter Astrozyten wurde analog zur oben beschriebenen Färbung

gegen NeuN durchgeführt (siehe Kapitel 3.6.2.2). Abweichend wurde hierbei als Primärantikörper Mouse Anti-GFAP (BD Pharmingen; San Diego, USA) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet.

#### **3.8.2.4 Iba1**

Die Immunfluoreszenzfärbung gegen Ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1) zur Darstellung der Mikroglia wurde analog zur oben beschriebenen Färbung gegen NeuN durchgeführt (siehe Kapitel 3.6.2.2). Abweichend hiervon wurde der Primärantikörper Mouse Anti-Iba1 (Santa Cruz Biotechnology; Dallas, USA) in einer Verdünnung von 1:200 verwendet.

#### **3.8.2.5 CD31**

Die Immunfluoreszenzfärbung gegen Cluster of Differentiation 31 (CD31) zur Darstellung von Endothelzellen des Gehirns wurde analog zur oben beschriebenen Färbung gegen NeuN durchgeführt (siehe Kapitel 3.6.2.2). Als Primärantikörper diente hierbei Mouse Anti-CD 31 (Abcam; Cambridge, UK), verdünnt auf 1:10.

### **3.8.2 Immunhistochemische Färbungen**

Für die Analyse einer möglichen Inflammationsreaktion durch die verabreichten Nanopartikel wurden Hirnschnitte der Versuchsreihe I auf der Basis von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) immunhistochemisch gefärbt. Nach Oxidation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultiert ein positives Färbeergebnis hierbei als brauner Farbstoffkomplex in der Lichtmikroskopie.

Hierfür wurden die Schnitte zunächst für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss mittels PFA 4% ebenfalls für 10 Minuten fixiert. Nun erfolgte das Blocken der endogenen Peroxidaseaktivität mittels Methanol und Wasserstoffperoxid (100 ml Methanol + 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + PBS). Methanol und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden anschließend durch einmaliges Spülen mit 70% Ethanol entfernt.

Anschließend erfolgte eine Präinkubation mit 5% Normalserum in PBST für 30 Minuten. Hierfür wurde bei den Färbungen gegen GFAP und TNF $\alpha$  normales Pferdeserum und für die Färbungen gegen Iba1 und IL1 $\beta$  normales Kaninchenserum,

jeweils aus dem Vectastain® Elite® ABC-Kit (Vector Laboratories; Burlingame, USA), verwendet. Ohne weiteres Waschen wurden die Schnitte anschließend mit dem jeweiligen Primärantikörper gegen aktivierte Astrozyten (Mouse Anti-GFAP, BD Pharmingen, Verdünnung 1:200), Mikrogliazellen (Goat Anti-Iba1 (sc-28528), Santa Cruz Biotechnology; Dallas, USA, Verdünnung 1:100), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (Mouse Anti-TNF $\alpha$  (ab1793), Abcam; Cambridge, UK, Verdünnung 1:50) und Interleukin 1 $\beta$  (Goat Anti-IL1 $\beta$  (ab9787), Abcam; Cambridge, UK, Verdünnung 1:50), gelöst in 1% BSA und PBST in einer mit Leitungswasser befeuchteten Färbekammer über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Parallel wurden auf jedem Objektträger Negativkontrollen mitgeführt. Hierfür diente der jeweils mittlere der drei Hirnschnitte auf dem Objektträger.

Nachdem die Schnitte erneut dreimal mit PBST gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Biotin-konjugierten Sekundärantikörper (Mouse-IgG Vectastain® Elite® ABC-Kit (PK 6102), Vector Laboratories; Burlingame, USA und Goat-IgG Vectastain® Elite® ABC-Kit (PK 6105), Vector Laboratories; Burlingame, USA, Verdünnung 1:100 in 1% BSA und PBST) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Hierauf folgten drei Waschschrte mit PBST für jeweils 5 Minuten, gefolgt von der Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain® ABC-Kit (HRP), Vector Laboratories; Burlingame, USA) als enzymatischem Amplifikationssystem (Ansatz: 1 Tropfen Lösung A + 1 Tropfen Lösung B + 2,5 ml PBS).

Nun wurden die Schnitte mit dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen und mittels DAB (DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit SK 4100, Vector Laboratories; Burlingame, USA) für 2-5min nach Herstellerangaben gefärbt. Nach einmaligem Waschen für 5 Minuten in PBS folgte eine aufsteigende Alkohol-Verdünnungsreihe mit Isopropylalkohol 70 % → 80 % → 96 % → 100 % für je 5 Minuten zum Entwässern der Schnitte. Nachdem die Schnitte für 10 Minuten unter dem Abzug in Xylol als Intermedium zur Verdrängung des Alkohols gegeben wurden, erfolgte abschließend das Eindeckeln mittels Eukitt-Eindeckmedium und Deckgläsern, sowie Trocknen der Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur.

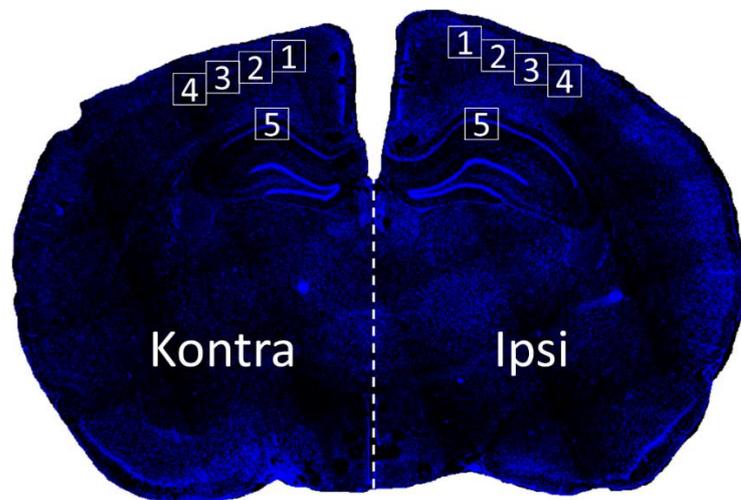
Nach Abschluss der immunhistochemischen Färbeschritte wurden die Objektträger in Präparatemappen einsortiert und bis zur mikroskopischen Auswertung lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

### 3.9 Auswertung

#### 3.9.1 Festlegung der Regions of Interest (ROI)

Zur mikroskopischen Analyse der Verteilung von Nanopartikeln im Gehirn wurden bei 40-facher Vergrößerung Regions of Interest (ROI) in einer Größe von 363 x 273 µm im Bereich des rechten Parietalcortex nahe der Kortexoberfläche und im Hippocampus gebildet. Hierfür wurden Hirnschnitte der Ebene Bregma -3.00 mm verwendet. ROI 1 entsprach hierbei dem unmittelbaren Läsionsareal bei den Versuchstieren mit CCI. Die ROI 2-4 schlossen sich nach lateral angrenzend an. ROI 5 wurde im Bereich der Region CA1 des Hippocampus festgelegt. Bei den Versuchsgruppen mit experimentellem Schädel-Hirn-Trauma wurden die ROI auf der kontralateralen Seite in ungefähr gleichem Abstand zur Mittellinie gespiegelt platziert, um einen Vergleich der ipsi- und kontralateralen Resultate zu ermöglichen.

Für die Analyse der Inflammationsreaktion wurden die ROI in der gleichen Weise festgelegt. Bei 20facher Vergrößerung entsprach dies einer Größe von jeweils 865 x 486 µm.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der Regions of interest (ROI).** Die ROI befinden sich auf der Ebene Bregma -3.00 mm (Paxinos und Watson, 2007), jeweils im ipsi- und kontralateralen Cortex (ROI 1-4) und im Bereich des Hippocampus (ROI 5). Die gestrichelte Linie markiert die Mittellinie.

### 3.9.2 Mikroskopie

Die mikroskopische Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen wurde mit einem digitalen Fluoreszenzmikroskop (BZ-9000 Bioevo, Keyence; Osaka, JP) durchgeführt. Hirn- und Organschnitte wurden in 40facher Vergrößerung mikroskopiert und mit Hilfe der integrierten Kamera Aufnahmen der entsprechenden ROI angefertigt. Die Exzitationszeit und Filtereinstellungen des Mikroskops wurden während der gesamten Auswertung unverändert belassen, um die Resultate zu objektivieren. Die Bestimmung der immunreaktiven Flächen wurde unter Nutzung einer Bildanalysesoftware (ImageJ 1.52n (Schindelin et al., 2012), NIH; Bethesda, USA) durchgeführt. Hierfür wurden die Bilddateien zunächst in Graustufenbilder umgewandelt. Dann wurde ein Schwellenwert (Threshold) festgelegt, welcher so festgelegt wurde, dass das Fluoreszenzsignal der Nanopartikel optimal zur Darstellung kam. Der so eingestellte Threshold wurde nun auf alle ausgewerteten Bilder unverändert übertragen. Mit der Analysefunktion wurde schließlich die angefärbte Fläche im Verhältnis zur Gesamtfläche des ausgewerteten ROI ausgemessen.

Die immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitte wurden der Gewebe-Biobank der Universitätsmedizin Mainz (Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Mainz) zur Bearbeitung zur Verfügung gestellt. Hier erfolgte das Einscannen mittels eines Objektträgerscanners (NanoZoomer 2.0 HT, Hamamatsu Photonics; Hamamatsu, JP) in 20-facher Vergrößerung und die anschließende Bereitstellung der Bilder in digitaler Form. In einem Bildbearbeitungsprogramm (NDPView 2.5.19, Hamamatsu Photonics; Hamamatsu, JP) wurden dann die Ausschnitte der jeweiligen ROI festgelegt und als separate Bilddateien abgespeichert. Die Auswertung der immunreaktiven Flächen erfolgte schließlich wieder mit ImageJ. Nach Umwandlung in Graustufenbilder wurde der Threshold wurde hierbei so gewählt, dass nur die eindeutig durch die jeweilige Färbung angefärbten Strukturen sichtbar waren. Das Ausmessen der immunreaktiven Fläche wurde hier ebenfalls in der oben beschriebenen Weise durchgeführt.

### 3.10 Statistische Analyse

Die erhobenen Daten wurden zunächst in einem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel 2019, Microsoft Corporation; Redmond, USA) gespeichert und dann zur statistischen Auswertung und grafischen Darstellung der Ergebnisse in eine wissenschaftliche Datenanalyse- und Statistiksoftware (SigmaPlot 12.5, Systat Software; San Jose, USA) überführt.

Zum Vergleich der einzelnen Gruppen wurde bei normalverteilten Daten eine One Way ANOVA Varianzanalyse durchgeführt und die Resultate mit dem post-hoc Test Student-Newman-Keuls auf ihre statistische Signifikanz getestet. Lag keine Normalverteilung vor, kamen die Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks und als post hoc Test der Dunnett's Test zum Vergleich mehrerer Versuchsgruppen gegen eine Kontrollgruppe, sowie der Student-Newman-Keuls-Test zur Anwendung. Für den Vergleich der ipsi- und kontralateralen ROI, sowie von Kortex und Hippocampus wurde für normalverteilte Daten der Paired-t-Test, für nicht-normalverteilte Daten der Wilcoxon Signed Rank Test verwendet. Die Überprüfung der Normalverteilung erfolgte mittels des Shapiro-Wilk-Tests. Eine statistische Signifikanz wurde bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  angenommen. Hierbei wurde mittels Holm-Sidak Methode gegen multiples Testen adjustiert.

Das jeweilige Signifikanzniveau ist im Weiteren wie folgt gekennzeichnet: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ . Die Gruppengrößen sind mit (n=...) angegeben, die Kontrollgruppe als (Ctrl) bezeichnet. Alle Angaben sind als Mittelwert  $\pm$ Standardfehler (SEM, Standard error of the mean) dargestellt.

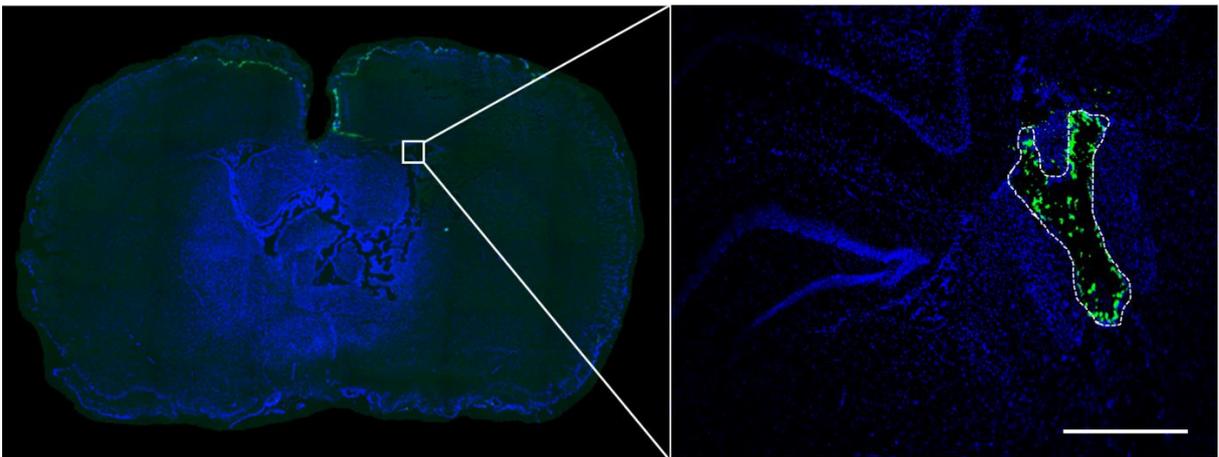
---

## 4 Ergebnisse

---

### 4.1 Vorversuch: Intraventrikuläre Injektion von NP

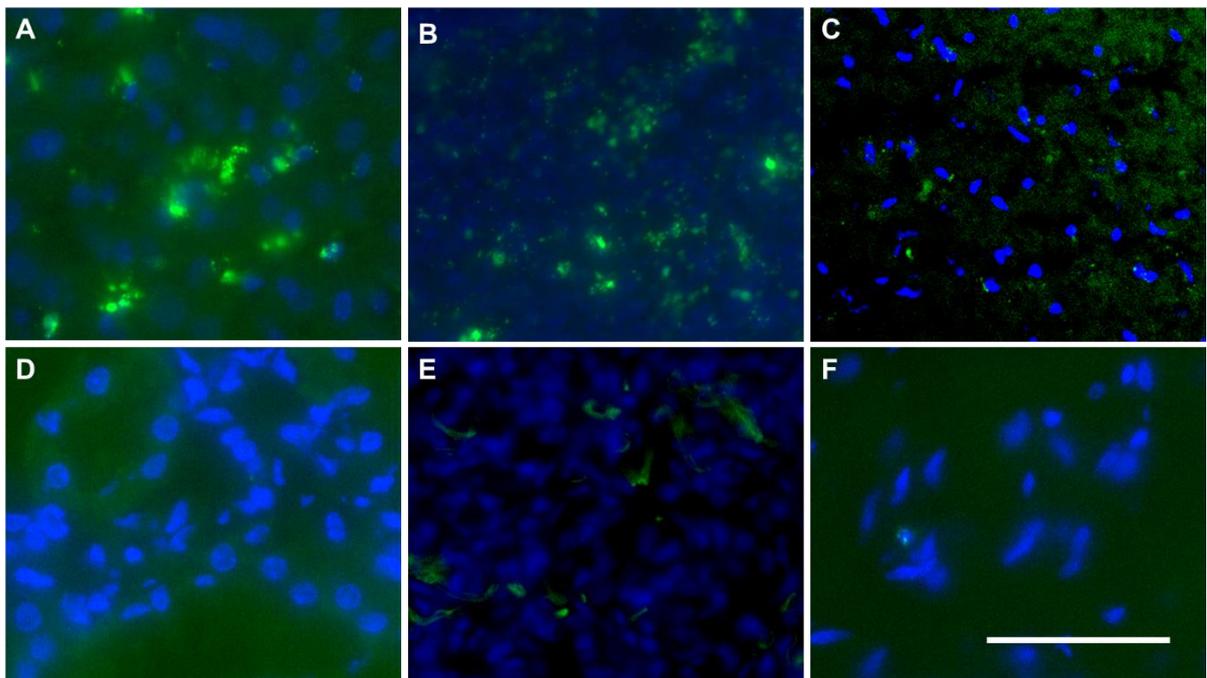
Zur Evaluation der fluoreszenzmikroskopischen Detektierbarkeit der eingesetzten Nanopartikel in histologischen Hirnschnitten wurden diese im Rahmen eines Vorversuchs intraventrikulär injiziert. Hierfür wurde jeweils einem Versuchstier der entsprechende NP (PLLA-SDS, PLLA-Tw, PFDL-SDS, PFDL-Tw) in den rechten Seitenventrikel injiziert und dieses nach einer Stunde euthanasiert. Nach der histologischen Aufarbeitung gelang der mikroskopische Nachweis der NP sowohl intraventrikulär, als auch im Hirnparenchym. Abbildung 14 demonstriert das Fluoreszenzsignal von PLLA-SDS Nanopartikeln im rechten Seitenventrikel eine Stunde nach Injektion.



**Abbildung 12: Intraventrikuläre Injektion der Nanopartikel.** Die Übersichtsaufnahme (links) zeigt einen Hirnschnitt in der Ebene Bregma -0,92 eine Stunde nach intraventrikulärer Injektion von PLLA-SDS Nanopartikeln (1000µg/kg KG). In der Vergrößerung (rechts) kommen die Nanopartikel im lateralen Seitenventrikel als grünes Fluoreszenzsignal zur Darstellung. Die DAPI-gefärbten Zellkerne sind in blau dargestellt. Maßstab: 100 µm.

## 4.2 NP-Verteilung in Organen

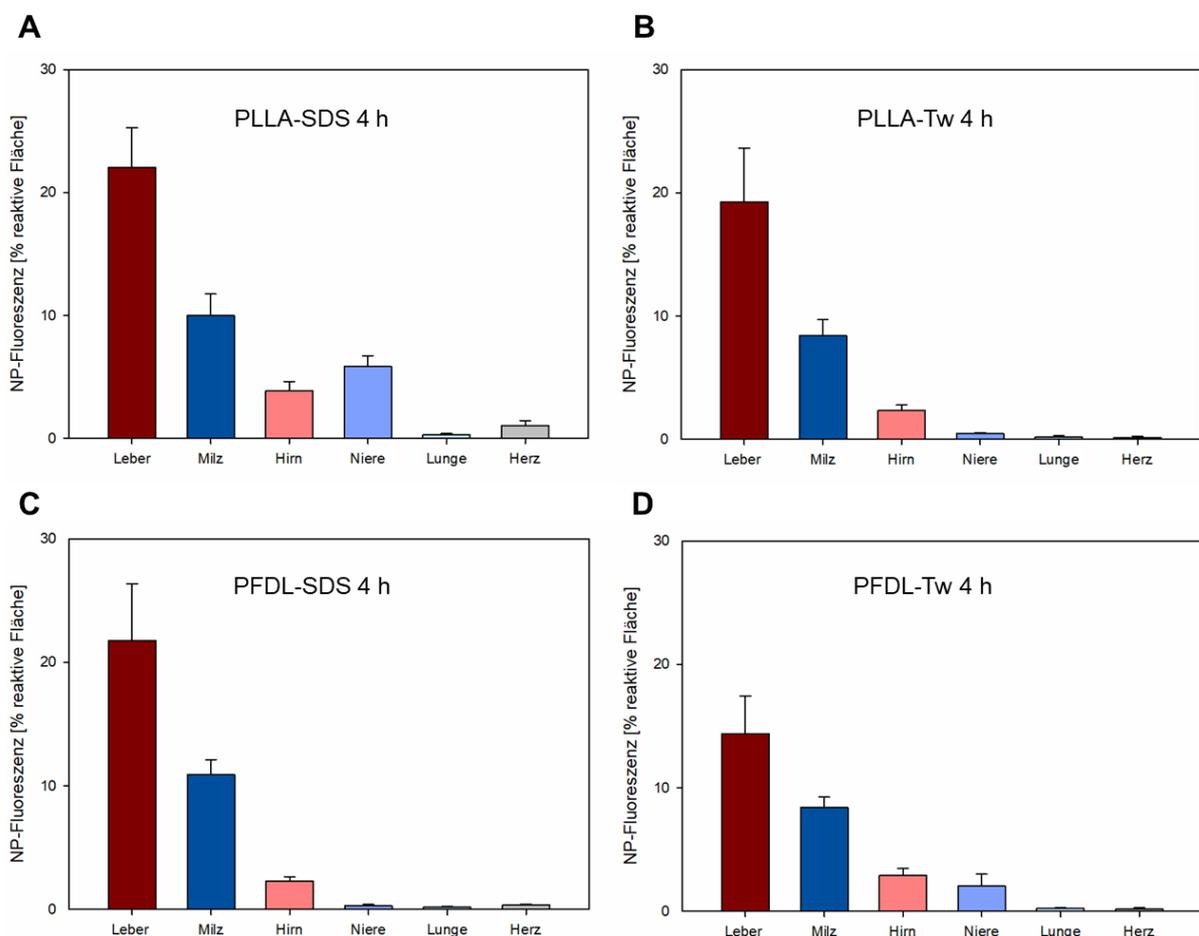
Um die Biodistribution der applizierten Nanopartikel zu untersuchen, wurden histologische Schnitte von Leber, Milz, Hirn, Niere, Lunge und Herz jeweils 4 und 24 Stunden nach intravenöser Verabreichung von 10000 µg/kg KG der NP fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Hierbei wurde das Fluoreszenzsignal der aufgenommenen Nanopartikel als reaktive Fläche in Prozent der Gesamtfläche quantifiziert. Abbildung 13 zeigt exemplarisch die mikroskopischen Aufnahmen der Organschnitte mit PLLA-Tw Nanopartikeln, 24 Stunden nach Injektion über die laterale Schwanzvene.



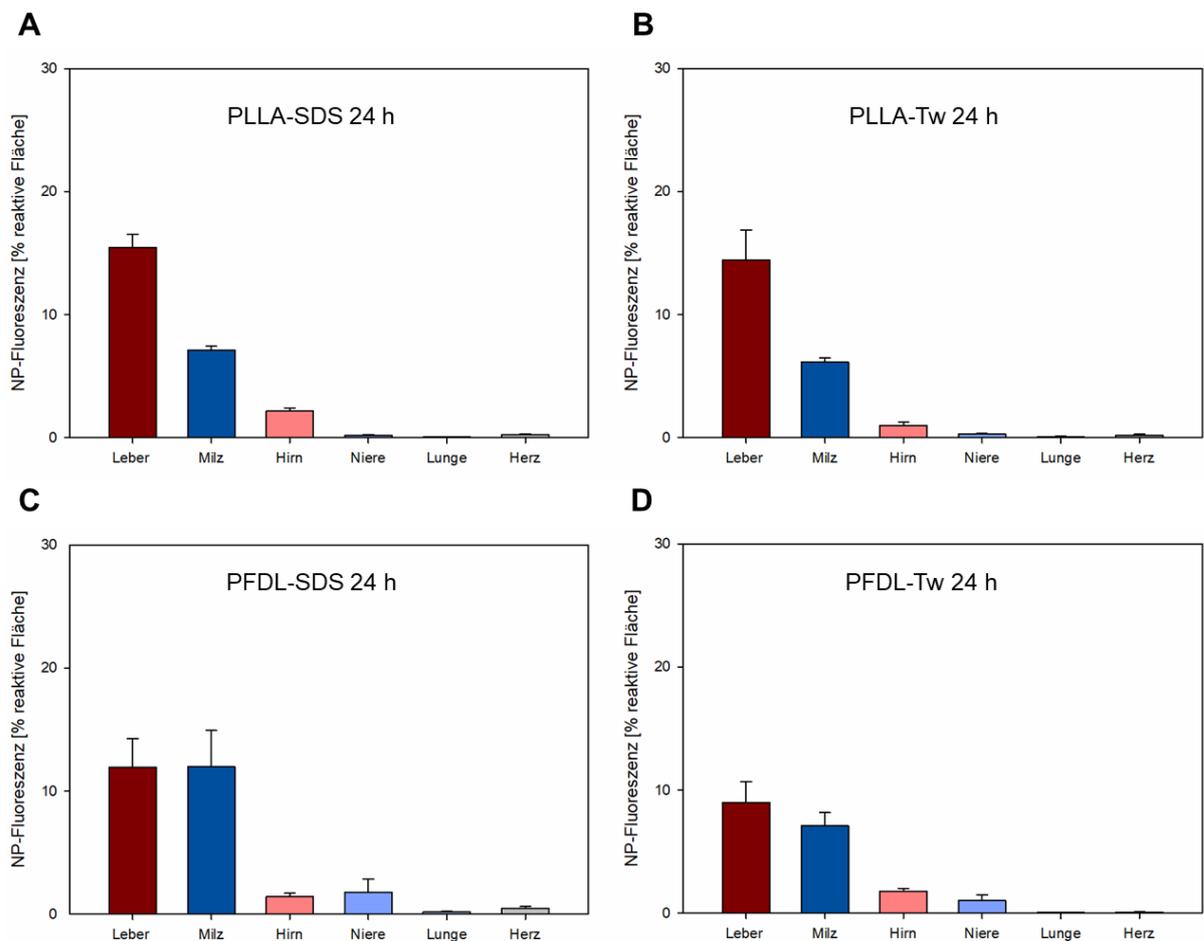
**Abbildung 13: PLLA-Tw NP-Verteilung in Organen.** Aufnahme des PLLA-Tw Nanopartikels in den verschiedenen Organen 24 Stunden nach intravenöser Injektion (10000 µg/kg KG). Dargestellt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder der Organschnitte von Leber (A), Milz (B), Hirn (C), Niere (D), Lunge (E) und Herz (F). Maßstab 50 µm.

#### 4.2.1 Unterschiede der Verteilung innerhalb der Versuchsgruppen

Bei der Beurteilung der NP-Verteilung in Organen zeigt sich insgesamt ein ähnliches Verteilungsmuster der unterschiedlichen Nanopartikel. Die höchste Aufnahme der Nanopartikel findet sich in der Leber, gefolgt von der Milz. Weniger ausgeprägt ist die Aufnahme in Hirn und Niere. In geringem Ausmaß werden die verwendeten Nanopartikel auch in Herz und Lunge aufgenommen. In Abbildung 14 ist die Verteilung der vier verschiedenen NP-Typen zum Zeitpunkt 4 Stunden, in Abbildung 15 die Verteilung nach 24 Stunden dargestellt. Alle Mittelwerte  $\pm$  SEM sind Tabelle 4 zu entnehmen.



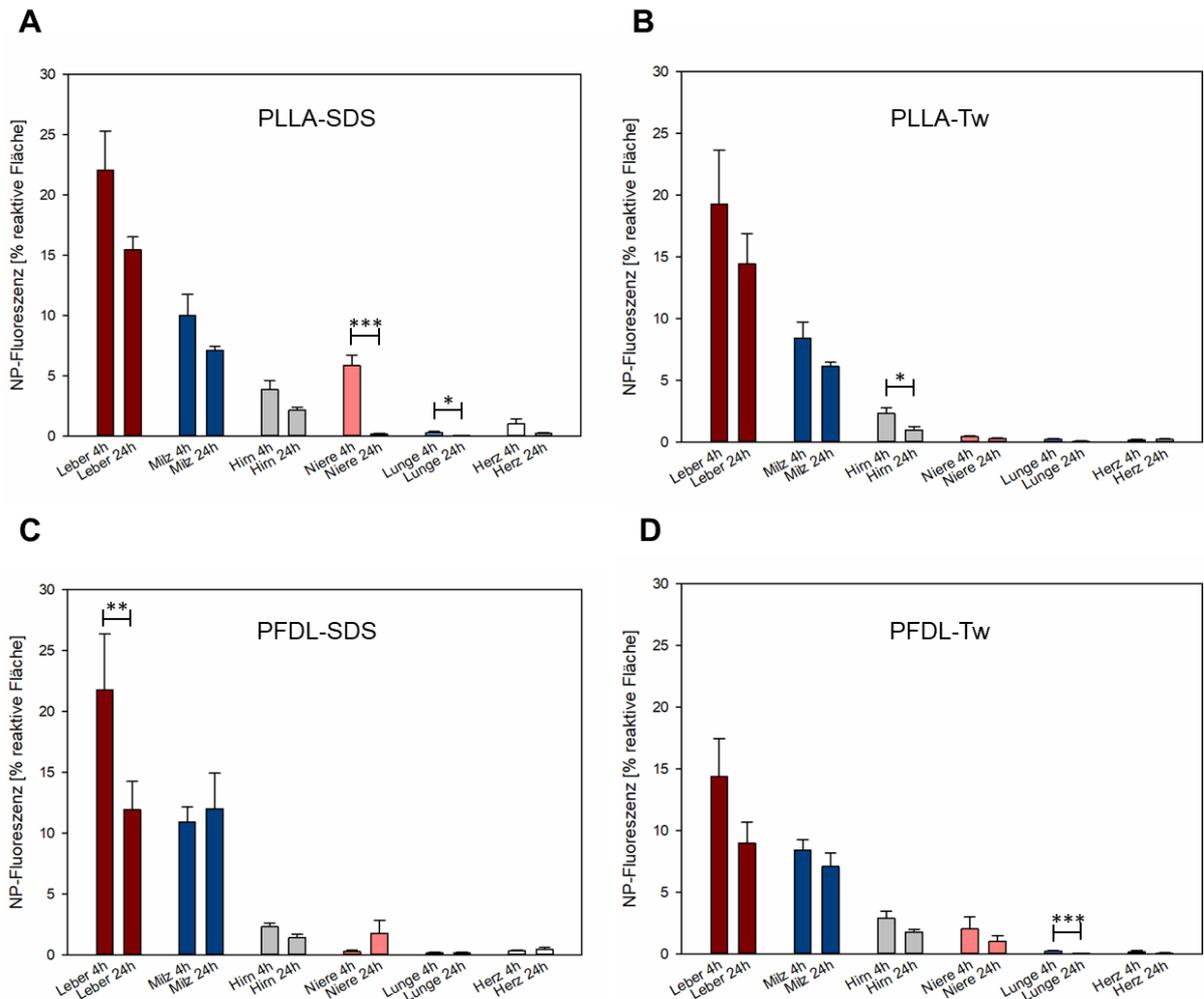
**Abbildung 14: NP-Verteilung in Organen nach 4 Stunden.** Dargestellt ist die Quantifizierung der Organaufnahme der verwendeten Nanopartikel 4 h nach intravenöser Applikation (10000  $\mu$ g/kg KG) als % reaktive Fläche in der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung. Es zeigt sich eine deutlich höhere Aufnahme der NP nach 4 Stunden in Leber und Milz, gefolgt von Hirn und Niere und in geringem Umfang auch in Lunge und Herz. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3.



**Abbildung 15: NP-Verteilung in Organen nach 24 Stunden.** Dargestellt ist die Quantifizierung der Organaufnahme der verwendeten Nanopartikel 24 h nach intravenöser Applikation (10000 µg/kg KG) als % reaktive Fläche in der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung. Es zeigt sich eine deutlich höhere Aufnahme der NP nach 24 Stunden in Leber und Milz, gefolgt von Hirn und Niere und in geringem Umfang auch in Lunge und Herz. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte ± SEM, n=3.

#### 4.2.2 Zeitliche Kinetik der NP-Verteilung in Organen

Im zeitlichen Vergleich zwischen der Verteilung der NP in Organen nach 4 und 24 h zeigt sich insgesamt ein Trend zu einer höheren NP-Aufnahme nach 4 Stunden und einer geringeren Akkumulation der Nanopartikel nach 24 Stunden in allen Organen (siehe Abbildung 16). Dieser Unterschied erreicht jedoch nur bei folgenden Organen der einzelnen Versuchsgruppen statistische Signifikanz: PLLA-SDS Niere ( $p < 0,001$ , Paired t-Test) und Lunge ( $p = 0,039$ , Wilcoxon Signed Rank Test), PLLA-Tw Hirn ( $p = 0,012$ , Paired t-Test), PFDL-SDS Leber ( $p = 0,005$ , Paired t-Test), PFDL-Tw Lunge ( $p < 0,001$ , Paired t-Test).

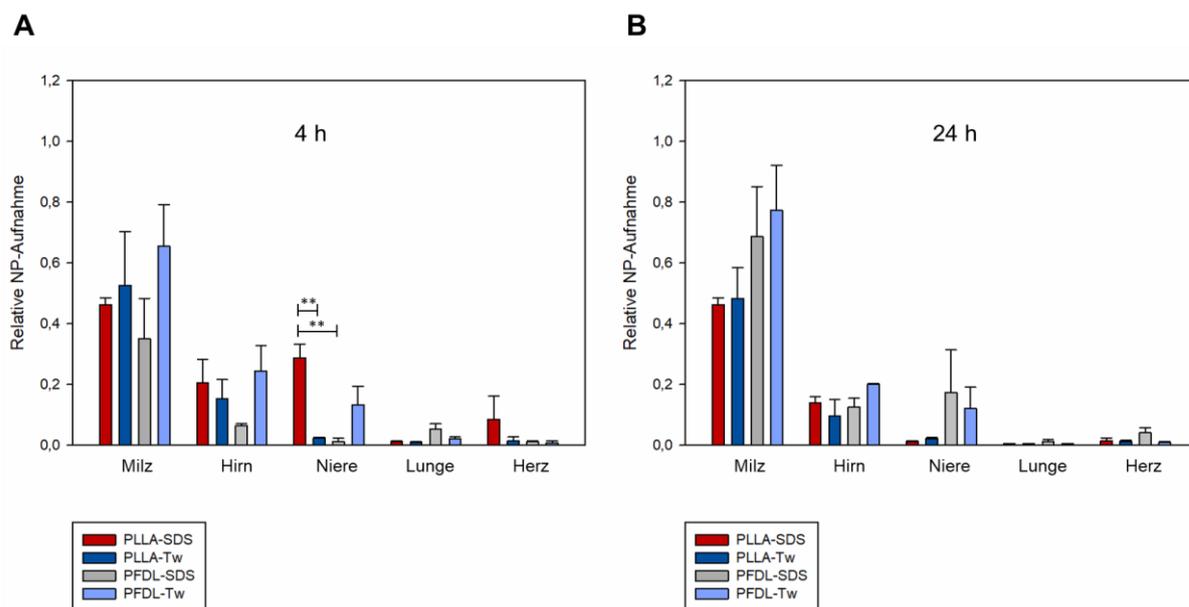


**Abbildung 16: NP-Verteilung in Organen nach 4 vs. 24 Stunden.** Dargestellt ist die Organaufnahme der Nanopartikel 4 und 24 Stunden nach intravenöser Applikation (10000 µg/kg KG). Insgesamt zeigt sich ein Trend zu einer höheren Aufnahme nach 4 Stunden und einer niedrigeren Aufnahme 24 Stunden nach Applikation der Nanopartikel. Es liegt ein statistisch signifikanter Unterschied 4 und 24 Stunden bei den Versuchsgruppen PLLA-SDS in Niere ( $p < 0,001$ ) und Lunge ( $p = 0,039$ ), PLLA-Tw im Hirn ( $p = 0,012$ ), PFDL-SDS in der Leber ( $p = 0,005$ ) und PFDL-Tw in der Lunge ( $p < 0,001$ ) vor. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.2.3 Vergleich der relativen NP-Verteilung in Organen

Da die Menge an Fluoreszenzfarbstoff in den jeweiligen Nanopartikel-Typen differierte, musste für den Vergleich der Verteilung in Organen zwischen den verschiedenen Nanopartikeln eine Normierung vorgenommen werden. Bei allen verabreichten Nanopartikeln war die Aufnahme in der Leber am größten, sodass die Mittelwerte der reaktiven Flächen der übrigen Organe auf den der Leber normiert wurde. In der Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigt sich ein Trend zu einer erhöhten relativen Aufnahme des PFDL-Tw Nanopartikels in Milz, Gehirn und Niere

gegenüber den anderen Nanopartikeln zu beiden Untersuchungszeitpunkten. Dieser erreicht jedoch keine statistische Signifikanz. Bei Betrachtung des Balkendiagrammes für den Zeitpunkt 24 h (Abbildung 17 B) lässt sich eine, ebenfalls nicht signifikante, erhöhte relative Aufnahme auch bei PFDL-SDS Nanopartikeln insbesondere in Milz und Niere feststellen. Ein signifikanter Unterschied besteht dahingegen bei der relativen NP-Aufnahme in der Niere zwischen PLLA-SDS und PFDL-SDS Nanopartikeln ( $p=0,006$ , One Way ANOVA; Student-Newman-Keuls post-hoc Test), sowie zwischen PLLA-SDS und PLLA-Tw Nanopartikeln ( $p=0,006$ , One Way ANOVA; Student-Newman-Keuls post-hoc Test) jeweils zum Zeitpunkt 4 h nach NP-Gabe. Die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der relativen NP-Verteilung in Organen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.



**Abbildung 17: Relative NP-Verteilung in Organen.** Dargestellt ist die relative Aufnahme der verschiedenen Nanopartikel in Milz, Hirn, Niere, Lunge und Herz, bezogen auf die Aufnahme in der Leber (=100%) nach 4 Stunden (A) und 24 Stunden (B) nach intravenöser Injektion des jeweiligen Nanopartikels (10000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG). Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied bei der relativen NP-Aufnahme in der Niere zwischen PLLA-SDS und PFDL-SDS Nanopartikeln ( $p=0,006$ ), sowie zwischen PLLA-SDS und PLLA-Tw Nanopartikeln ( $p=0,006$ ) jeweils zum Zeitpunkt 4 h. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=3$ .  $**p<0,01$ .

**Tabelle 4: NP-Verteilung in Organen.** Mittelwerte  $\pm$  SEM der reaktiven Flächen in % der Gesamfläche bei der Auswertung der Verteilung der applizierten Nanopartikel in den verschiedenen Organen.

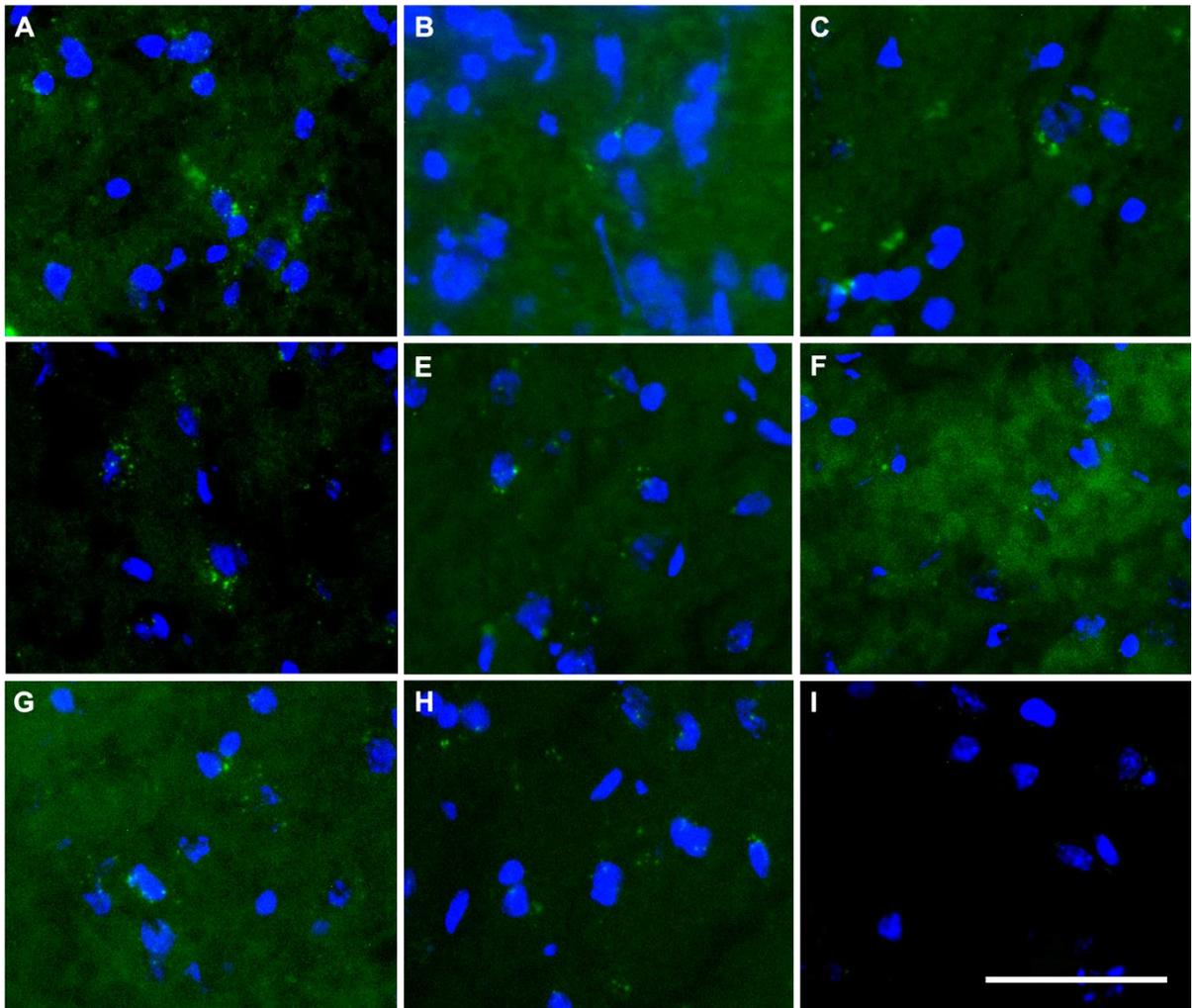
	<b>Leber</b>	<b>Milz</b>	<b>Niere</b>	<b>Lunge</b>	<b>Herz</b>
PLLA- SDS 4 h	22,04 $\pm$ 3,25	10,01 $\pm$ 1,75	5,85 $\pm$ 0,86	0,27 $\pm$ 0,11	1,02 $\pm$ 0,43
PLLA- SDS 24 h	15,45 $\pm$ 1,08	7,14 $\pm$ 0,30	0,20 $\pm$ 0,05	0,07 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,08
PLLA-Tw 4 h	19,29 $\pm$ 4,35	8,42 $\pm$ 1,31	0,44 $\pm$ 0,08	0,21 $\pm$ 0,09	0,15 $\pm$ 0,10
PLLA-Tw 24 h	14,46 $\pm$ 2,45	6,14 $\pm$ 0,34	0,27 $\pm$ 0,06	0,08 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,07
PFDL- SDS 4 h	38,80 $\pm$ 6,21	10,91 $\pm$ 1,23	0,29 $\pm$ 0,10	0,17 $\pm$ 0,08	0,34 $\pm$ 0,08
PFDL- SDS 24 h	11,93 $\pm$ 2,34	12,00 $\pm$ 2,93	1,79 $\pm$ 1,06	0,17 $\pm$ 0,07	0,48 $\pm$ 0,14
PFDL-Tw 4 h	14,37 $\pm$ 3,10	8,41 $\pm$ 0,84	2,03 $\pm$ 0,97	0,23 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,11
PFDL-Tw 24 h	8,96 $\pm$ 1,69	7,09 $\pm$ 1,08	1,02 $\pm$ 0,47	0,04 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,02
Ctrl	0,06 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,07	0,06 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01

**Tabelle 5: Relative NP-Verteilung in Organen.** Mittelwerte $\pm$ SEM der relativen NP-Verteilung in den verschiedenen Organen, normiert auf die jeweiligen Mittelwerte der reaktiven Flächen der Leber.

	Leber	Milz	Hirn	Niere	Lunge	Herz
PLLA- SDS 4 h	1,0	0,463 $\pm$ 0,0217	0,205 $\pm$ 0,0755	0,288 $\pm$ 0,0448	0,0128 $\pm$ 0,0008	0,0850 $\pm$ 0,0766
PLLA- SDS 24 h	1,0	0,463 $\pm$ 0,0217	0,139 $\pm$ 0,0216	0,0130 $\pm$ 0,0020	0,0043 $\pm$ 0,0015	0,0142 $\pm$ 0,0097
PLLA- Tw 4 h	1,0	0,526 $\pm$ 0,177	0,153 $\pm$ 0,0629	0,0230 $\pm$ 0,0280	0,0096 $\pm$ 0,0026	0,0141 $\pm$ 0,0132
PLLA- Tw 24 h	1,0	0,483 $\pm$ 0,102	0,0971 $\pm$ 0,0543	0,0208 $\pm$ 0,0038	0,0048 $\pm$ 0,0013	0,0126 $\pm$ 0,0031
PFDL- SDS 4 h	1,0	0,350 $\pm$ 0,133	0,0632 $\pm$ 0,0073	0,0124 $\pm$ 0,0100	0,0525 $\pm$ 0,0175	0,0109 $\pm$ 0,0041
PFDL- SDS 24 h	1,0	0,687 $\pm$ 0,165	0,125 $\pm$ 0,0296	0,172 $\pm$ 0,141	0,0128 $\pm$ 0,0068	0,0408 $\pm$ 0,0164
PFDL- Tw 4 h	1,0	0,655 $\pm$ 0,137	0,245 $\pm$ 0,0836	0,133 $\pm$ 0,0616	0,0201 $\pm$ 0,0075	0,0081 $\pm$ 0,0065
PFDL- Tw 24 h	1,0	0,774 $\pm$ 0,148	0,200 $\pm$ 0,0038	0,122 $\pm$ 0,0691	0,0051 $\pm$ 0,0010	0,0089 $\pm$ 0,0033

### 4.3 Quantifizierung der NP-Aufnahme in das Hirnparenchym

Um die Überwindung der intakten Blut-Hirn-Schranke durch die Nanopartikel und ihre Aufnahme in das Gehirn zu untersuchen, wurden histologische Hirnschnitte jeweils 4 und 24 Stunden nach intravenöser Verabreichung der NP (10000  $\mu$ g/kg KG) fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Hierbei wurde das Fluoreszenzsignal der aufgenommenen Nanopartikel, wie bereits oben beschrieben, als reaktive Fläche in Prozent der Gesamtfläche quantifiziert. Abbildung 18 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Hirnschnitte, jeweils 4 und 24 Stunden nach Injektion der verschiedenen Nanopartikel über die laterale Schwanzvene.

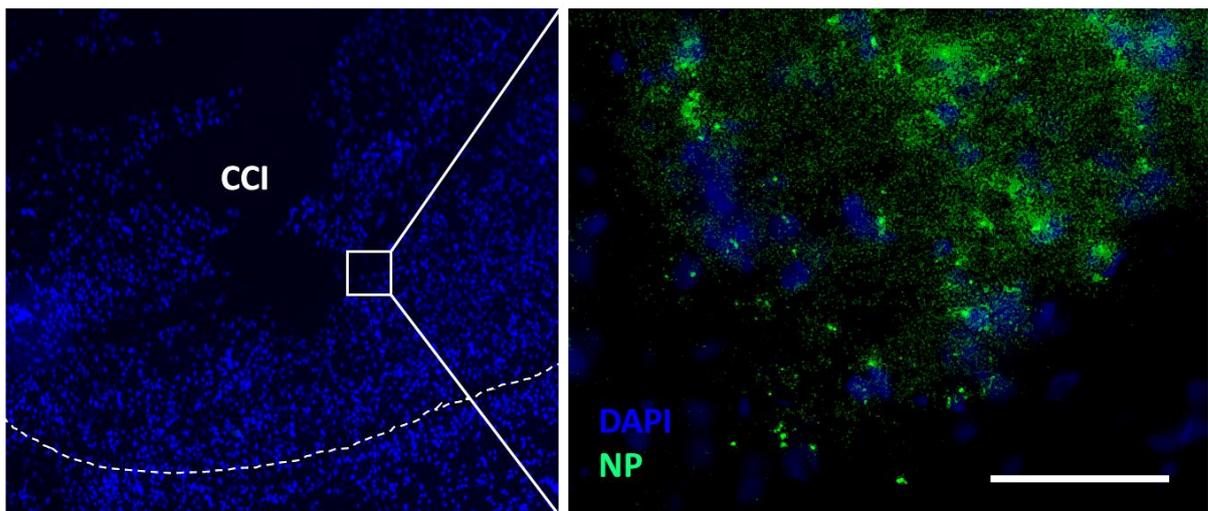


**Abbildung 18: Nanopartikel-Aufnahme in das Hirnparenchym.** Dargestellt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder von Hirnschnitten der verschiedenen Versuchsgruppen. PLLA-SDS 4 h (A), PLLA-SDS 24 h (B), PLLA-Tw 4 h (C), PLLA-Tw 24 h (D), PFDL-SDS 4 h (E), PFDL-SDS 24 h (F), PFDL-Tw 4 h (G), PFDL-Tw 24 h (H) und Ctrl (I). Die NP zeigen sich als grünes, die DAPI-gefärbten Zellkerne als blaues Fluoreszenzsignal. Maßstab 50  $\mu$ m.

Wie in Abbildung 20 gezeigt, lässt sich im Vergleich der Versuchsgruppen 4 Stunden und 24 Stunden nach Nanopartikel-Applikation ein Trend zu einer höheren Akkumulation nach 4 Stunden und etwas niedrigeren Ansammlung nach 24 Stunden feststellen. Dieser Unterschied ist jedoch nur in den PLLA-Tw Versuchsgruppen statistisch signifikant ( $p=0,012$ , Paired t-Test). Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder beider Untersuchungszeitpunkte sind in Abbildung 19 als Übersicht zusammengestellt. Mittelwerte  $\pm$  SEM der NP-Aufnahme im Gehirn sind in Tabelle 6 aufgeführt.

#### 4.4 NP-Aufnahme in das Hirnparenchym nach Controlled Cortical Impact

Die Akkumulation von Nanopartikeln im Gehirn bei, durch ein experimentelles Schädel-Hirn-Trauma geschädigter Blut-Hirn-Schranke wurden in gleicher Weise an histologischen Hirnschnitten zu den beiden Zeitpunkten 4 und 24 Stunden nach intravenöser Verabreichung der NP fluoreszenzmikroskopisch analysiert. In Abbildung 19 ist beispielhaft die Akkumulation des PLLA-SDS Nanopartikels nach 24 Stunden im Bereich der Kontusionsstelle (ipsilateraler ROI 1) gezeigt.

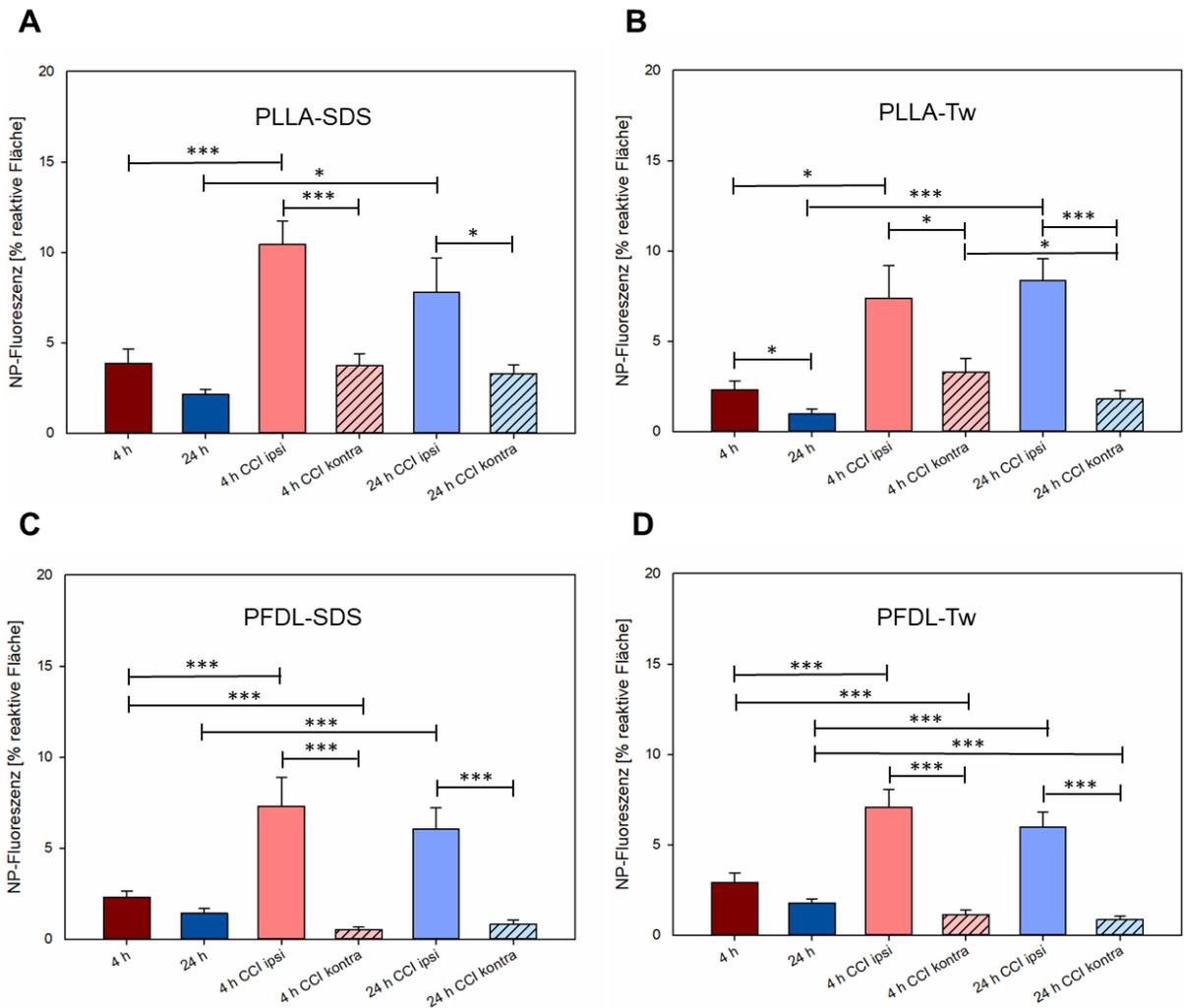


**Abbildung 19: NP-Akkumulation nach CCI.** Dargestellt ist die Akkumulation von PLLA-SDS NP im Bereich der Kontusionsstelle zum Zeitpunkt 24 h nach intravenöser Applikation. Die gestrichelte Linie in der Übersichtsaufnahme (links) markiert den Läsionsrand. Die DAPI-gefärbten Zellkerne sind in der Abbildung blau gefärbt, die Nanopartikel stellen sich in der vergrößerten Aufnahme (rechts) als grünes Fluoreszenzsignal dar. Maßstab 50 µm.

Wie in Abbildung 20 dargestellt, zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der ipsilateralen ROI in der 4 h-Versuchsgruppe mit CCI und der 4h-Versuchsgruppe ohne CCI (PLLA-SDS 4 h CCI:  $p < 0,001$ , PLLA-Tw 4 h CCI:  $p = 0,023$ , PFDL-SDS 4 h CCI:  $p < 0,001$ , PFDL-Tw 4 h CCI:  $p < 0,001$ , Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks; Student-Newman-Keuls post-hoc Test). Dieser hochsignifikante Unterschied zeigt sich ebenfalls in den Versuchsgruppen 24 h nach NP-Applikation (PLLA-SDS 24 h CCI:  $p = 0,014$ , PLLA-Tw 24 h CCI:  $p < 0,001$ , PFDL-SDS 24 h CCI:  $p < 0,001$ , PFDL-Tw 24 h CCI:  $p < 0,001$ , Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks; Student-Newman-Keuls post-hoc Test). Ebenso unterscheiden sich die Mittelwerte der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre hochsignifikant (PLLA-SDS 4 h CCI:  $p < 0,001$ , PLLA-SDS 24 h CCI:  $p = 0,014$ , PLLA-Tw 4 h CCI:  $p = 0,023$ , PLLA-Tw 24 h CCI:  $p < 0,001$ ,

PFDL-SDS 4 h CCI:  $p < 0,001$ , PFDL-SDS 24 h CCI:  $p < 0,001$ , PFDL-Tw 4 h CCI:  $p < 0,001$ , PFDL-Tw 24 h CCI:  $p < 0,001$ , Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks; Student-Newman-Keuls post-hoc Test). Zwischen den kontralateralen ROI der PLLA-Versuchsgruppen mit CCI und der 4 h-, respektive der 24 h Versuchsgruppe ohne CCI ist hingegen kein signifikanter Unterschied nachweisbar. Bei den PFDL-Versuchsgruppen ist jedoch 4 Stunden nach NP-Applikation ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der kontralateralen ROI mit CCI und denen der 4 h Gruppen ohne CCI zu verzeichnen (PFDL-SDS 4h CCI:  $p < 0,001$ , PFDL-Tw:  $p < 0,001$ , Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks; Student-Newman-Keuls post-hoc Test). Dieser besteht bei PFDL-Tw auch nach 24 Stunden ( $p < 0,001$ , Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks; Student-Newman-Keuls post-hoc Test).

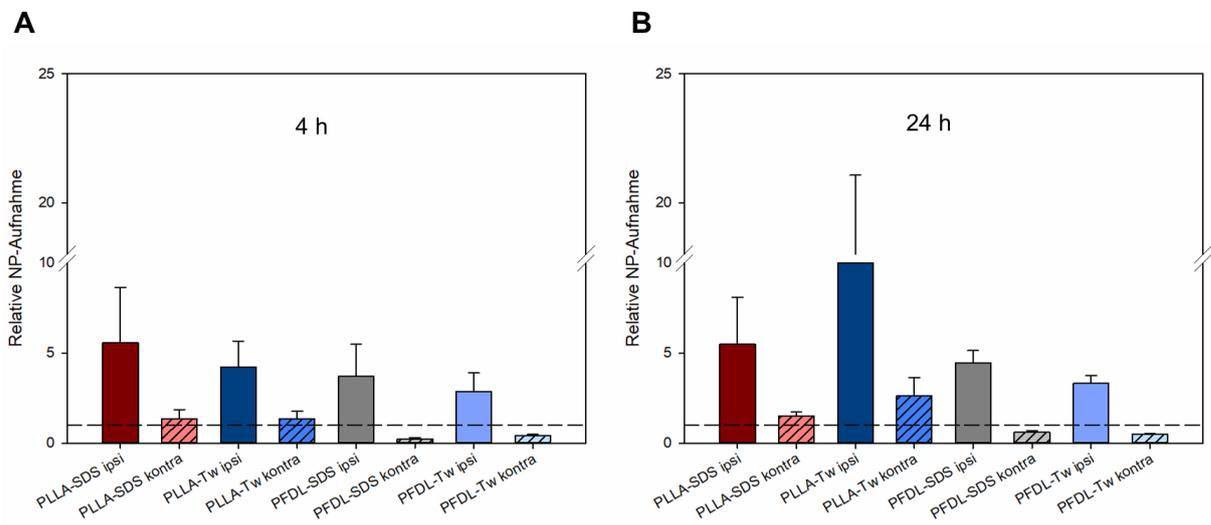
Im zeitlichen Vergleich zwischen 4 und 24 Stunden nach CCI ist bei den einzelnen Nanopartikeln kein signifikanter Unterschied im Sinne einer erhöhten oder geringeren Akkumulation zwischen 4 und 24 h zu verzeichnen. Lediglich der PLLA-Tw NP weist zwischen den Mittelwerten der jeweiligen kontralateralen Hemisphären einen signifikanten Unterschied auf ( $p = 0,045$ , Paired t-Test) (siehe Abbildung 20 B).



**Abbildung 20: NP-Aufnahme in das Hirnparenchym.** In den Versuchsgruppen ohne CCI lässt sich eine, im Vergleich zum Zeitpunkt 24 h, höhere Aufnahme der Nanopartikel im 4 Stunden nach intravenöser Applikation (10000 µg/kg KG) feststellen. Dieser Unterschied erreicht bei PLLA-Tw statistische Signifikanz ( $p=0,012$ ). Es zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den ipsilateralen ROI der Versuchsgruppen mit CCI und der jeweiligen Versuchsgruppe ohne CCI zum gleichen Untersuchungszeitpunkt (PLLA-SDS 4 h CCI:  $p<0,001$ , PLLA-SDS 24 h CCI:  $p=0,014$ , PLLA-Tw 4 h CCI:  $p=0,023$ , PLLA-Tw 24 h CCI:  $p<0,001$ , PFDL-SDS 4 h CCI:  $p<0,001$ , PFDL-SDS 24 h CCI:  $p<0,001$ , PFDL-Tw 4 h CCI:  $p<0,001$ , PFDL-Tw 24 h CCI:  $p<0,001$ ). Auch zwischen der ipsi- und kontralateralen Seite der Versuchsgruppen mit CCI besteht jeweils ein signifikanter Unterschied (PLLA-SDS 4 h CCI:  $p<0,001$ , PLLA-SDS 24 h CCI:  $p=0,014$ , PLLA-Tw 4 h CCI:  $p=0,023$ , PLLA-Tw 24 h CCI:  $p<0,001$ , PFDL-SDS 4 h CCI:  $p<0,001$ , PFDL-SDS 24 h CCI:  $p<0,001$ , PFDL-Tw 4 h CCI:  $p<0,001$ , PFDL-Tw 24 h CCI:  $p<0,001$ ). Die Balken repräsentieren die Mittelwerte±SEM,  $n=3$ . \* $p<0,05$ , \*\*\* $p<0,001$ .

#### 4.4.1 Relative NP-Aufnahme in das Hirnparenchym nach CCI

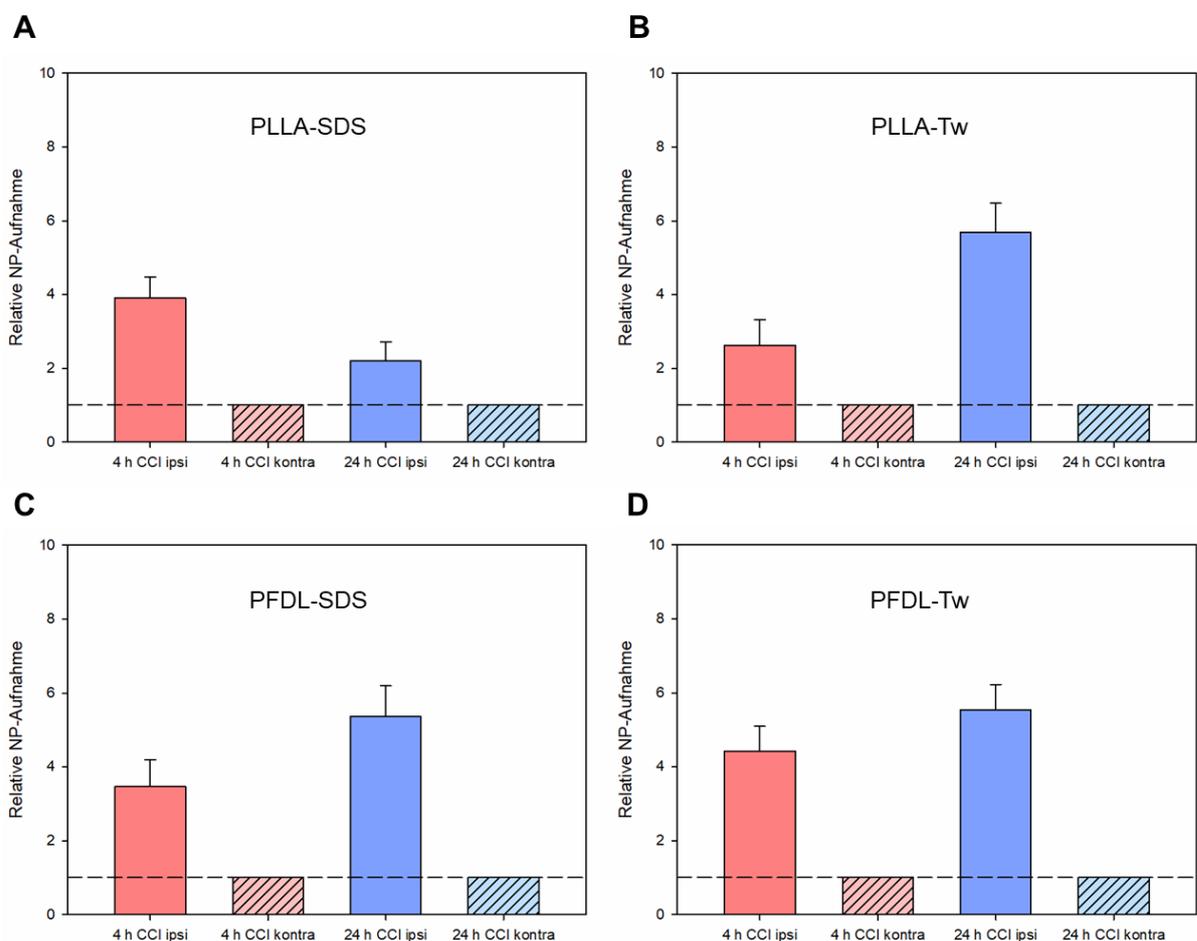
Um die einzelnen Nanopartikel hinsichtlich ihrer Akkumulation im Gehirn nach CCI vergleichen zu können, wurde eine Normierung auf die Mittelwerte der jeweiligen Versuchsgruppe ohne CCI zum selben Zeitpunkt vorgenommen (beispielsweise PLLA-SDS 4 h CCI ipsilateral bzw. kontralateral, normiert auf PLLA-SDS 4 h ohne CCI). Im Vergleich zeigt sich hier kein signifikanter Unterschied in der relativen Aufnahme zwischen den einzelnen Nanopartikeln. Die scheinbar erhöhte relative Aufnahme des PLLA-Tw NP auf der ipsilateralen Seite nach 24h, ist durch einen hohen Standardfehler (siehe Tabelle 7) bedingt und erreicht nicht das geforderte Signifikanzniveau.



**Abbildung 21: Relative NP-Aufnahme in das Hirnparenchym nach CCI.** Dargestellt ist die Aufnahme der Nanopartikel in den ROI der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma zum Zeitpunkt 4h (A) und 24 h (B) nach intravenöser Verabreichung der Nanopartikel, jeweils normiert auf den Mittelwert der Versuchsgruppe 4 h ohne CCI bzw. 24 h ohne CCI. Es findet sich kein signifikanter Unterschied. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ SEM, die gestrichelte Linie markiert den Normierungswert = 1, n=3.

#### 4.4.2 Vergleich der relativen NP-Aufnahme in ipsi- und kontralateraler Hemisphäre nach CCI

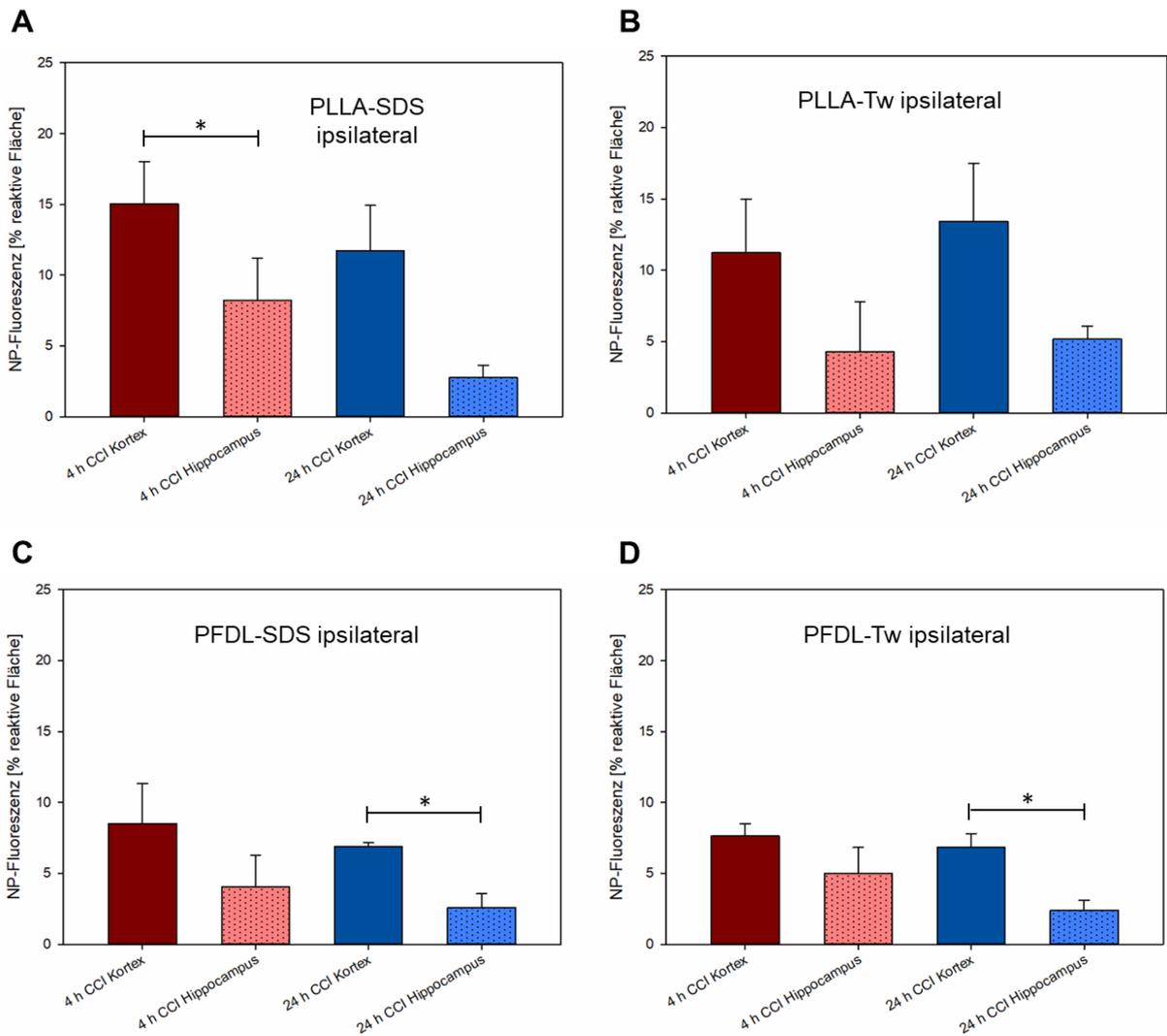
Um die relative Aufnahme der Nanopartikel im perilesionalen Areal nach CCI im Vergleich zur nicht geschädigten Seite darzustellen, wurde eine Normierung der Mittelwerte der ipsilateralen Seite auf die Mittelwerte der jeweiligen kontralateralen Seite innerhalb der Versuchsgruppen vorgenommen. Wie Abbildung 22 demonstriert, besteht im Vergleich zur kontralateralen Seite eine im Mittel etwa 6-fach erhöhte Aufnahme der Nanopartikel auf der geschädigten Seite.



**Abbildung 22: Relative NP-Aufnahme nach CCI ipsi- vs. kontralateral.** Die Graphen zeigen die relative Aufnahme der Nanopartikel nach CCI in den ROI der ipsilateralen Hemisphäre im Verhältnis zur kontralateralen Seite. Es zeigt sich eine deutlich höhere NP-Aufnahme auf der ipsilateralen Seite nach 4 und 24 Stunden. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM, die gestrichelte Linie markiert den Normierungswert = 1, n=3.

#### **4.4.3 Vergleich der NP-Aufnahme in Läsionsgebiet und Hippocampus nach CCI**

Zur genaueren Differenzierung der Nanopartikel-Akkumulation nach Controlled Cortical Impact, wurde ihre Verteilung im periläsionalen Areal und den weiter peripher von der Läsion liegenden hippocampalen Strukturen untersucht. Hierzu wurden die Mittelwerte der ipsilateralen ROI 1-4 (zusammenfassend als Kortex bezeichnet) und die Mittelwerte des ipsilateralen ROI 5 (CA1-Region des Hippocampus) miteinander verglichen. Wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, ist die Aufnahme von Nanopartikeln in dem das Schadensgebiet umgebenden Bereich im Vergleich zur Akkumulation im Hippocampus höher. Dieser Unterschied erreicht jedoch nur bei folgenden Versuchsgruppen statistische Signifikanz: PLLA-SDS 4 h CCI:  $p=0,049$ , PFDL-SDS 24 h CCI:  $p=0,032$ , PFDL-Tw 24 h CCI:  $p=0,010$ , Paired t-Test. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM sind in Tabelle 8 zusammengefasst.



**Abbildung 23: NP-Aufnahme nach CCI in Kortex vs. Hippocampus.** Die Graphen zeigen die Aufnahme der Nanopartikel nach CCI in den kortikalen ROI (ROI 1-4) der ipsilateralen Hemisphäre im Vergleich zu den ipsilateralen ROI im Hippocampus (ROI 5). Es zeigt sich nach 4 und 24 Stunden eine höhere NP-Aufnahme im Kortex gegenüber dem Hippocampus, statistisch signifikant bei PLLA-SDS 4 h CCI ( $p=0,049$ ), PFDL-SDS 24 h CCI ( $p=0,032$ ) und PFDL-Tw 24 h CCI ( $p=0,010$ ). Die Balken repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=3$ . \* $p<0,05$ .

**Tabelle 6: NP-Aufnahme in das Hirnparenchym.** Mittelwerte  $\pm$  SEM der reaktiven Flächen in % der Gesamtfläche bei der Auswertung der NP-Aufnahme in das Gehirn.

	PLLA-SDS	PLLA-Tw	PFDL-SDS	PFDL-Tw
4 h	3,87 $\pm$ 0,77	2,32 $\pm$ 0,46	2,31 $\pm$ 0,34	2,90 $\pm$ 0,55
24 h	2,16 $\pm$ 0,26	1,00 $\pm$ 0,26	1,43 $\pm$ 0,26	1,79 $\pm$ 0,22
4 h CCI ipsilateral	13,67 $\pm$ 1,73	9,84 $\pm$ 2,29	7,32 $\pm$ 1,58	7,10 $\pm$ 0,96
4 h CCI kontralateral	3,76 $\pm$ 0,64	3,31 $\pm$ 0,76	0,54 $\pm$ 0,12	1,14 $\pm$ 0,25
24 h CCI ipsilateral	9,92 $\pm$ 2,17	11,79 $\pm$ 2,07	6,04 $\pm$ 1,18	5,96 $\pm$ 0,85
24 h CCI kontralateral	3,29 $\pm$ 0,51	1,80 $\pm$ 0,49	0,82 $\pm$ 0,24	0,86 $\pm$ 0,19
Ctrl	0,02 $\pm$ 0,01			

**Tabelle 7: Relative NP-Aufnahme in das Hirnparenchym nach CCI.** Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen Aufnahme von Nanopartikeln nach CCI, normiert auf die jeweiligen Mittelwerte der 4 h, bzw. 24 h Versuchsgruppen ohne CCI.

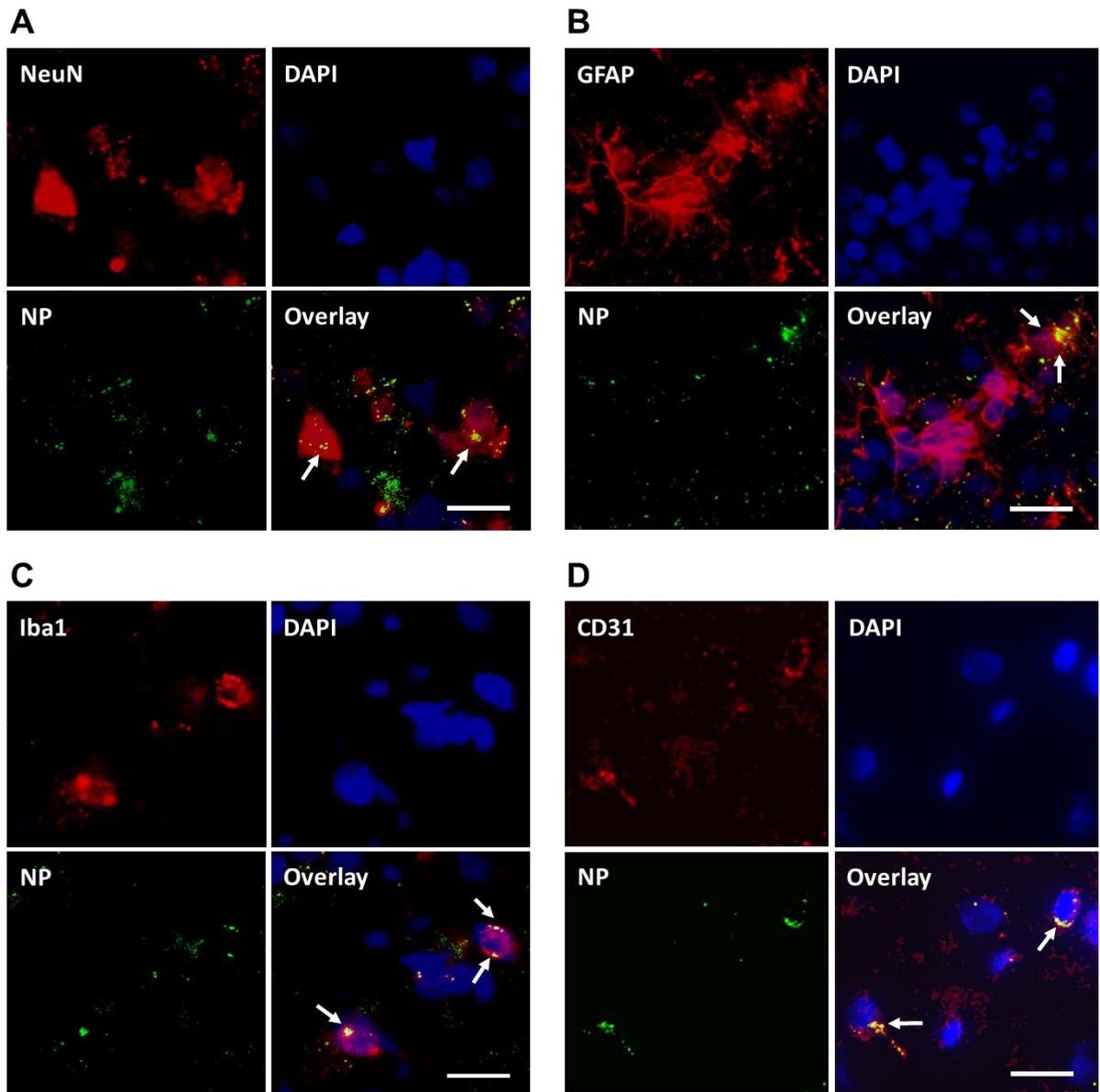
	PLLA-SDS	PLLA-Tw	PFDL-SDS	PFDL-Tw
4 h CCI ipsilateral	5,56 $\pm$ 3,09	4,23 $\pm$ 1,45	3,72 $\pm$ 1,78	2,87 $\pm$ 1,02
4 h CCI kontralateral	1,34 $\pm$ 0,53	1,36 $\pm$ 0,40	0,23 $\pm$ 0,06	0,41 $\pm$ 0,06
24 h CCI ipsilateral	5,49 $\pm$ 2,63	15,86 $\pm$ 5,21	4,44 $\pm$ 0,69	3,31 $\pm$ 0,43
24 h CCI kontralateral	1,49 $\pm$ 0,25	2,63 $\pm$ 1,03	0,60 $\pm$ 0,10	0,47 $\pm$ 0,07

**Tabelle 8: NP-Aufnahme in Kortex vs. Hippocampus.** Mittelwerte  $\pm$  SEM der reaktiven Flächen in % der Gesamtfläche bei der Auswertung der NP-Aufnahme in den ipsilateralen ROI1-4 (Kortex) im Vergleich zu ROI5 (Hippocampus).

	PLLA-SDS	PLLA-Tw	PFDL-SDS	PFDL-Tw
4 h CCI Kortex	5,56 $\pm$ 3,09	4,23 $\pm$ 1,45	3,72 $\pm$ 1,78	2,87 $\pm$ 1,02
4 h CCI Hippocampus	1,34 $\pm$ 0,53	1,36 $\pm$ 0,40	0,23 $\pm$ 0,06	0,41 $\pm$ 0,06
24 h CCI Kortex	5,49 $\pm$ 2,63	15,86 $\pm$ 5,21	4,44 $\pm$ 0,69	3,31 $\pm$ 0,43
24 h CCI Hippocampus	1,49 $\pm$ 0,25	2,63 $\pm$ 1,03	0,60 $\pm$ 0,01	0,47 $\pm$ 0,07

#### 4.5 Aufnahme in neuronale, gliale und endotheliale Zellen des Gehirns

Die Aufnahme der verschiedenen Nanopartikel in Neuronen, Mikroglia, Astrozyten und mikrovaskuläre Endothelzellen des Gehirns wurde qualitativ evaluiert. Hier zeigt sich, dass alle NP im Untersuchungszeitraum in die jeweiligen Zellen aufgenommen wurden. Eine genaue Aussage über zeitliche und quantitative Unterschiede der NP-Aufnahme ließ sich mit dieser Methode nicht treffen, sodass keine statistische Auswertung vorgenommen wurde. Abbildung 24 zeigt beispielhaft die Kollokalisierung von PLLA-SDS NP mit Neuronen (NeuN), Mikroglia (Iba1), Astrozyten (GFAP) und Endothelzellen (CD31). Die Kollokalisierung von Nanopartikeln mit den jeweiligen Zelltypen resultiert in der Überlagerung der einzelnen Bildkanäle (Overlay) als gelbes Fluoreszenzsignal und weist auf ihre Internalisierung hin.



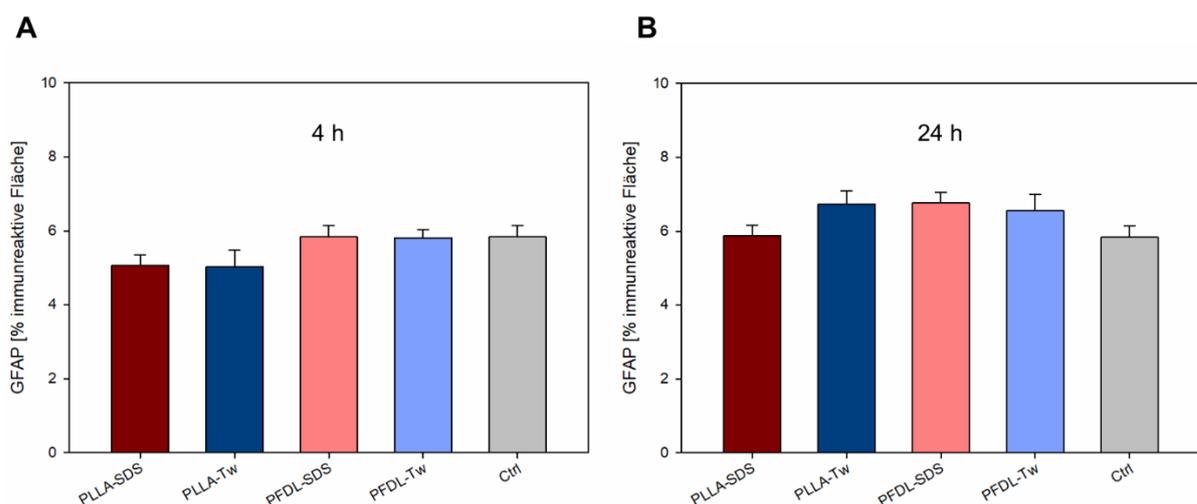
**Abbildung 24: Aufnahme der NP in Zellen des Gehirns.** Dargestellt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder der Aufnahme von PLLA-SDS Nanopartikeln in Neuronen (A), Astrozyten (B), Mikroglia (C) und mikrovaskuläre Endothelzellen (D) zum Zeitpunkt 4 h nach intravenöser Applikation. Die Pfeile markieren die Kolokalisation von NP (grün) und den entsprechenden Zellen (rot). Die DAPI-gefärbten Zellkerne sind in der Abbildung blau gefärbt. Maßstab 25  $\mu$ m.

## 4.6 Analyse einer möglichen Neuroinflammation nach NP-Applikation

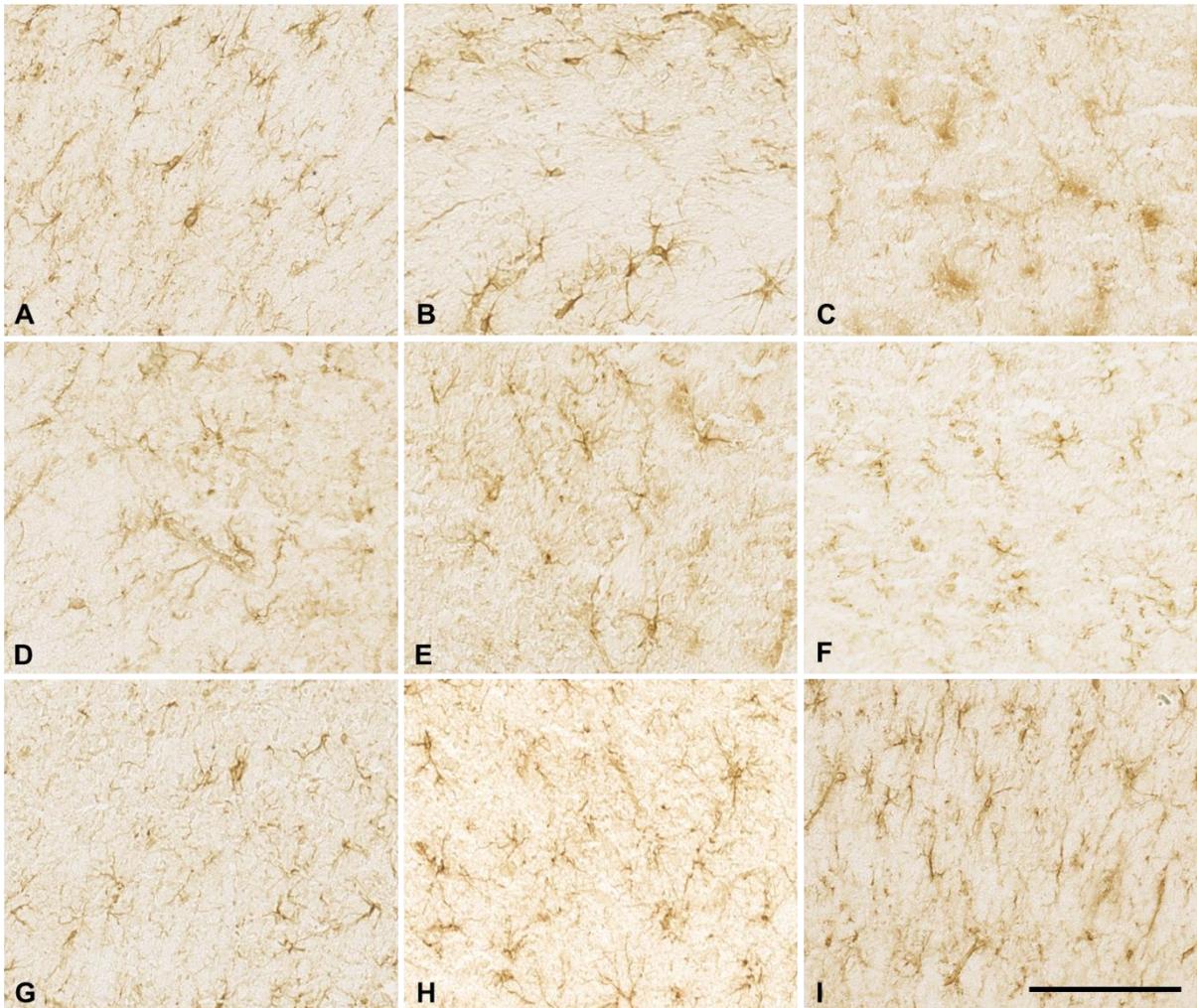
Abschließend wurden mögliche neuroinflammatorische Effekte durch die Aufnahme der Nanopartikel im Gehirn untersucht. Hierfür wurden histologische Hirnschnitte immunhistochemisch gegen GFAP und Iba1 gefärbt, um die Auswirkung der NP-Applikation auf eine Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia zu beurteilen. Darüber hinaus wurden immunhistochemische Färbungen gegen TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$  durchgeführt, um eine möglicherweise gesteigerte Expression von proinflammatorischen Zytokinen in neuronalem Gewebe nachzuweisen.

### 4.6.1 Astrozyten-Aktivierung

In der immunhistochemischen Färbung gegen GFAP zeigt sich kein signifikanter Unterschied der immunreaktiven Flächen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen, sowie der Kontrollgruppe im Untersuchungszeitraum von 4 Stunden und 24 Stunden nach intravenöser NP-Applikation (siehe Abbildung 25). Die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler können Tabelle 9 entnommen werden. In Abbildung 26 sind die zugehörigen mikroskopischen Bilder der GFAP-gefärbten Hirnschnitte zusammengestellt.



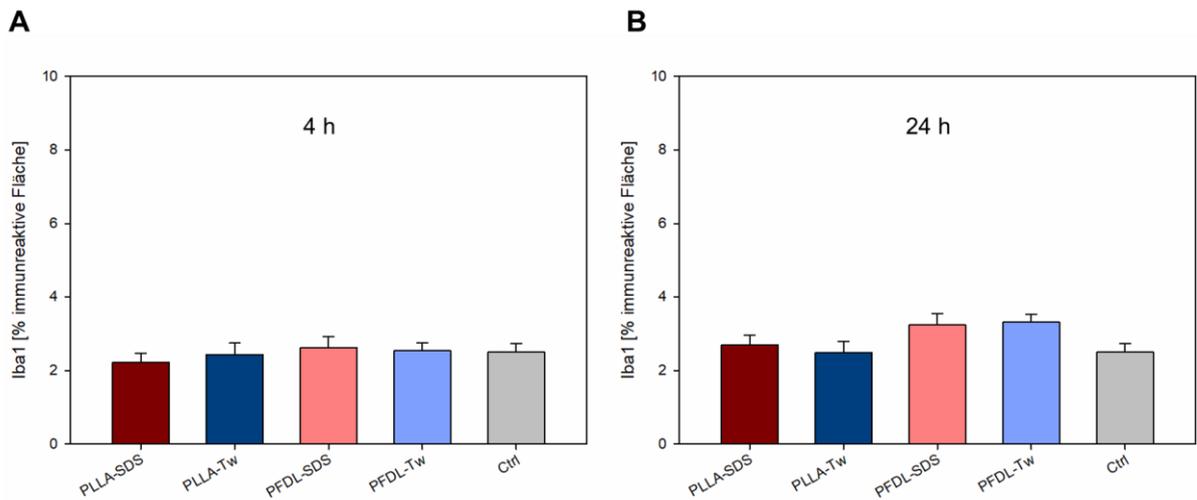
**Abbildung 25: Analyse der GFAP-Expression.** Dargestellt ist die GFAP-Expression 4 Stunden (A) und 24 Stunden (B) nach intravenöser Applikation der verschiedenen Nanopartikel (10000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG; ohne CCI-Trauma). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Aktivierung von Astrozyten in den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3.



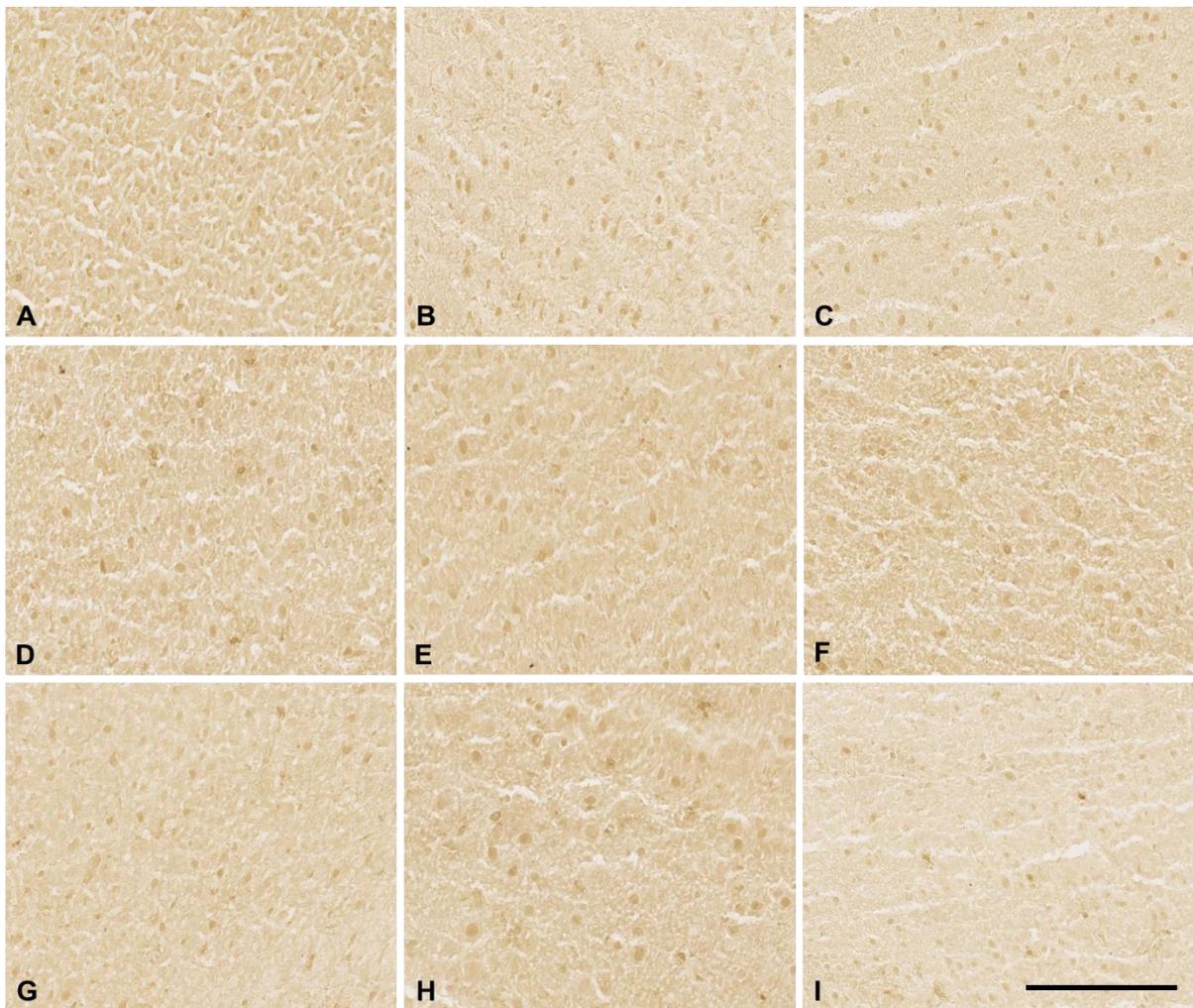
**Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung gegen GFAP.** Dargestellt sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Versuchsgruppen. PLLA-SDS 4h (A), PLLA-SDS 24h (B), PLLA-Tw 4h (C), PLLA-Tw 24h (D), PFDL-SDS 4h (E), PFDL-SDS 24h (F), PFDL-Tw 4h (G), PFDL-Tw 24h (H) und Ctrl (I). Maßstab 100  $\mu$ m.

#### 4.6.2 Mikroglia-Aktivierung

Auch bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbung gegen Iba1 ist kein signifikanter Unterschied der immunreaktiven Flächen nachweisbar. Es ergibt sich somit kein Hinweis auf eine vermehrte Aktivierung von Mikroglia durch die Nanopartikel, weder nach 4 Stunden noch nach 24 Stunden (siehe Abbildung 27). Die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler sind in Tabelle 9 aufgeführt. In Abbildung 28 sind die zugehörigen mikroskopischen Bilder der Iba1-gefärbten Hirnschnitte zusammengestellt.



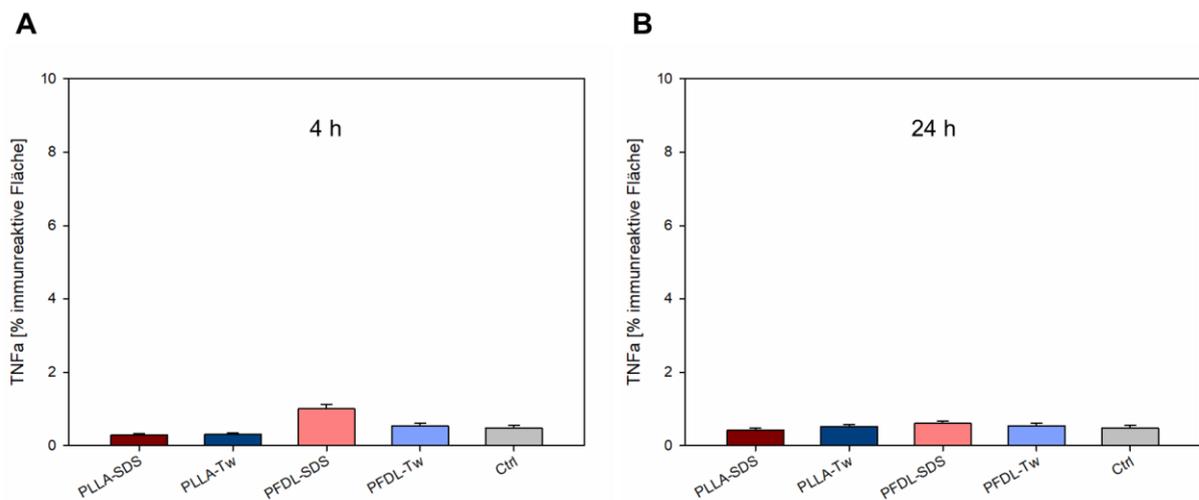
**Abbildung 27: Auswertung der Iba1-Expression.** Dargestellt ist die Iba1-Expression 4 Stunden (A) und 24 Stunden (B) nach intravenöser Applikation der verschiedenen Nanopartikel (10000 µg/kg KG; ohne CCI-Trauma). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Aktivierung von Mikroglia in den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte ± SEM, n=3



**Abbildung 28: Immunhistochemische Färbung gegen Iba1.** Dargestellt sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Iba1-gefärbten Hirnschnitten der verschiedenen Versuchsgruppen. PLLA-SDS 4h (A), PLLA-SDS 24h (B), PLLA-Tw 4h (C), PLLA-Tw 24h (D), PFDL-SDS 4h (E), PFDL-SDS 24h (F), PFDL-Tw 4h (G), PFDL-Tw 24h (H) und Ctrl (I). Maßstab 100 µm.

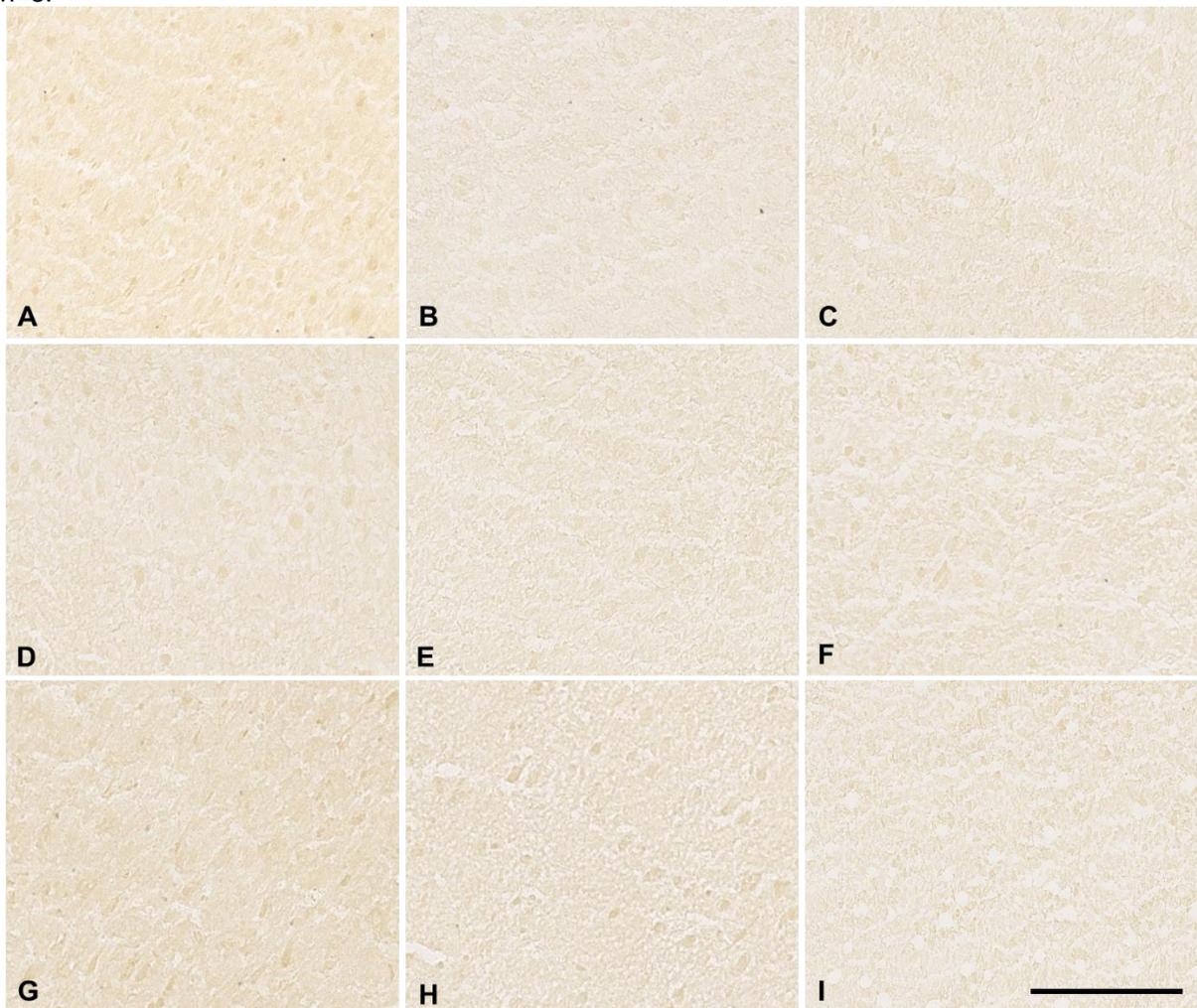
### 4.6.3 TNF $\alpha$ -Expression

Bei der Auswertung der gegen TNF $\alpha$ -gefärbten Hirnschnitte ist kein signifikanter Anstieg der Expression des proinflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor  $\alpha$  in den verschiedenen Versuchsgruppen festzustellen (siehe Abbildung 29). Ein Trend zu einer leicht erhöhten TNF $\alpha$ -Expression in der Versuchsgruppe PFDL-SDS 4 Stunden nach Applikation der Nanopartikel (Abbildung 29 A) erreicht nicht das geforderte Signifikanzniveau und ist nach 24 Stunden bereits rückläufig. Die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler sind in Tabelle 9 aufgelistet. In Abbildung 30 sind die zugehörigen mikroskopischen Bilder der Iba1-gefärbten Hirnschnitte zusammengestellt.



**Abbildung 29: Analyse der TNF  $\alpha$ -Expression.** Dargestellt ist die Tumornekrosefaktor  $\alpha$ -Expression 4 Stunden (A) und 24 Stunden (B) nach intravenöser Applikation der verschiedenen Nanopartikel (10000  $\mu$ g/kg KG; ohne CCI-Trauma). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Expression von TNF $\alpha$  in den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM,

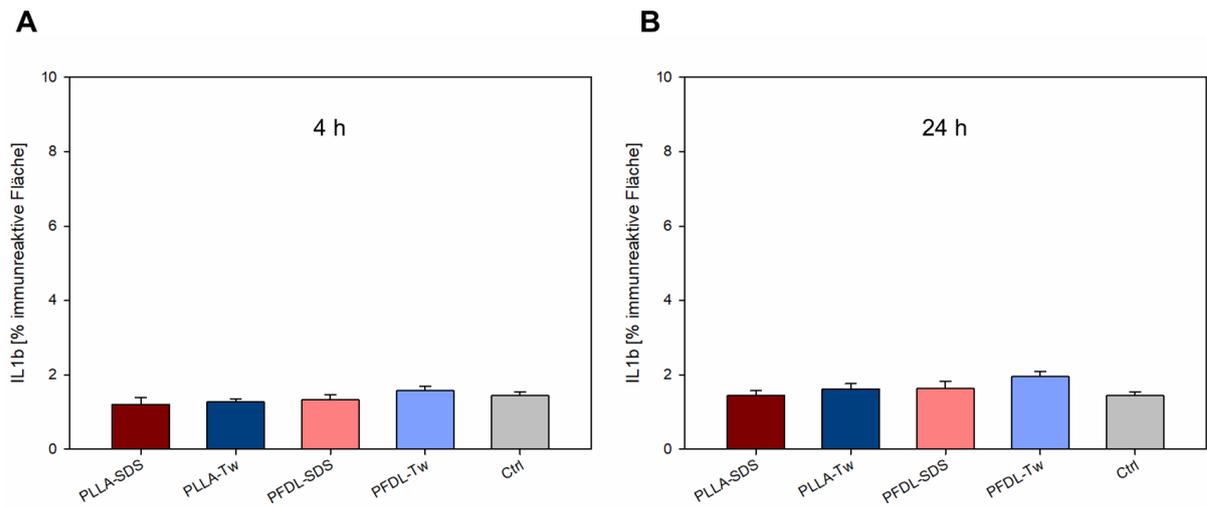
n=3.



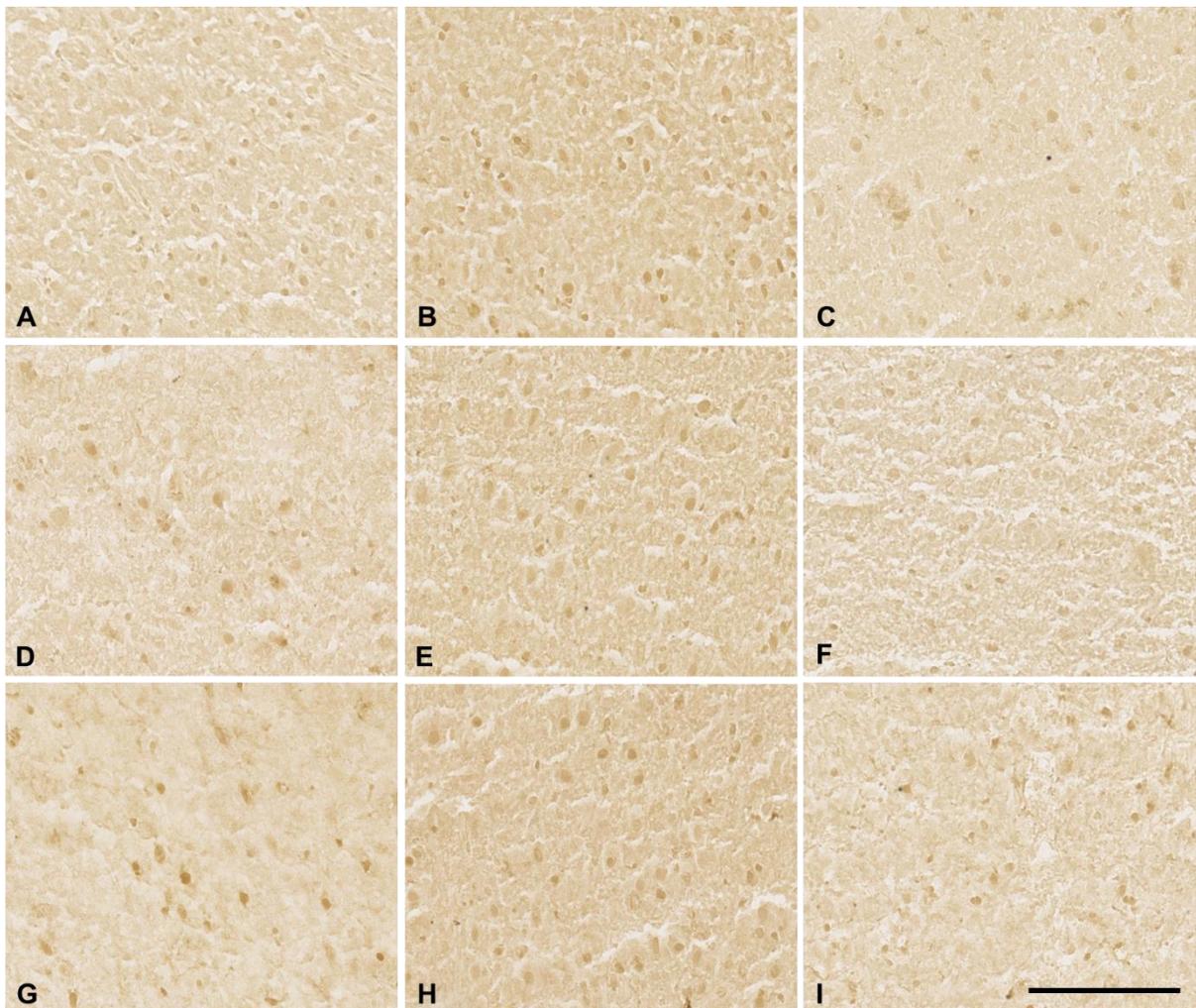
**Abbildung 30: Immunhistochemische Färbung gegen TNF $\alpha$ .** Dargestellt sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Versuchsgruppen. PLLA-SDS 4h (A), PLLA-SDS 24h (B), PLLA-Tw 4h (C), PLLA-Tw 24h (D), PFDL-SDS 4h (E), PFDL-SDS 24h (F), PFDL-Tw 4h (G), PFDL-Tw 24h (H) und Ctrl (I). Maßstab 100  $\mu$ m.

#### 4.6.4 Interleukin 1 $\beta$ -Expression

Hier ist ebenfalls kein signifikanter Effekt auf eine Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin 1 $\beta$  zu verzeichnen. Ein leichter Anstieg der IL1 $\beta$ -Expression bei den Versuchsgruppen mit PFDL-Tw Nanopartikeln nach 4 und 24 Stunden erreicht nicht das geforderte Signifikanzniveau (siehe Abbildung 31). Die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ebenfalls Tabelle 9 zu entnehmen. In Abbildung 32 sind die zugehörigen mikroskopischen Bilder der IL1 $\beta$ -gefärbten Hirnschnitte zusammengestellt.



**Abbildung 31: Analyse der IL1 $\beta$ -Expression.** Dargestellt ist die Interleukin 1 $\beta$ -Expression 4 Stunden (A) und 24 Stunden (B) nach intravenöser Applikation der Nanopartikel (10000  $\mu$ g/kg KG; ohne CCI-Trauma). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Expression von IL1 $\beta$  in den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3.



**Abbildung 32: Immunhistochemische Färbung gegen IL1 $\beta$ .** Dargestellt sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Versuchsgruppen. PLLA-SDS 4h (A), PLLA-SDS 24h (B), PLLA-Tw 4h (C), PLLA-Tw 24h (D), PFDL-SDS 4h (E), PFDL-SDS 24h (F), PFDL-Tw 4h (G), PFDL-Tw 24h (H) und Ctrl (I). Maßstab 100  $\mu$ m.

**Tabelle 9: Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.** Übersicht der Auswertung von immunhistochemischen Färbungen gegen Iba1, GFAP, IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$ . Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der immunreaktiven Flächen in % der Gesamtfläche angegeben.

	<b>Iba1</b>	<b>GFAP</b>	<b>IL1<math>\beta</math></b>	<b>TNF<math>\alpha</math></b>
PLLA-SDS 4h	2,22 $\pm$ 0,25	5,06 $\pm$ 0,28	1,21 $\pm$ 0,19	0,29 $\pm$ 0,04
PLLA-SDS 24h	2,70 $\pm$ 0,26	5,88 $\pm$ 0,29	1,45 $\pm$ 0,13	0,43 $\pm$ 0,05
PLLA-Tw 4h	2,44 $\pm$ 0,30	5,03 $\pm$ 0,45	1,27 $\pm$ 0,09	0,31 $\pm$ 0,04
PLLA-Tw 24h	2,49 $\pm$ 0,30	6,73 $\pm$ 0,36	1,62 $\pm$ 0,15	0,53 $\pm$ 0,05
PFDL-SDS 4h	2,63 $\pm$ 0,29	5,83 $\pm$ 0,32	1,34 $\pm$ 0,12	0,61 $\pm$ 0,21
PFDL-SDS 24h	3,25 $\pm$ 0,30	6,77 $\pm$ 0,29	1,63 $\pm$ 0,19	0,70 $\pm$ 0,07
PFDL-Tw 4h	2,54 $\pm$ 0,22	5,81 $\pm$ 0,23	1,57 $\pm$ 0,12	0,54 $\pm$ 0,08
PFDL-Tw 24h	3,32 $\pm$ 0,21	6,56 $\pm$ 0,44	1,95 $\pm$ 0,14	0,54 $\pm$ 0,07
Ctrl	2,50 $\pm$ 0,23	5,84 $\pm$ 0,31	1,44 $\pm$ 0,09	0,48 $\pm$ 0,07

---

## 5 Diskussion

---

### 5.1 Diskussion der Methoden

#### 5.1.1 Applikation der Nanopartikel

Für die systemische Applikation von Nanopartikeln in tierexperimentellen Studien stehen verschiedene Zugangswege zur Verfügung. Das Standardverfahren ist die intravenöse Verabreichung der NP über die laterale Schwanzvene, welches auch in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam. Die Punktion mittels einer Venenverweilkanüle ist technisch unkompliziert, bei aseptischem Vorgehen komplikationsarm und ermöglicht ausreichend hohe Injektionsvolumina (Turner et al., 2011). Bharadwaj et al. nutzten die retroorbitale Injektion als gleichwertige Alternative zur intravenösen Verabreichung (Bharadwaj et al., 2016). Reddy et al. zeigten, dass die Applikation von NP in die Arteria carotis interna im Vergleich zur intravenösen Applikation die Aufnahme der NP im Gehirn stark erhöhte. Dies wird mit einer verringerten NP-Verteilung in Organen und Exposition gegenüber dem Monozyten-Makrophagen-System begründet (Reddy und Labhasetwar, 2009). Demgegenüber steht eine höhere Invasivität, die Gefahr von injektionsbedingten Vasospasmen und der deutlich gesteigerte präparative Aufwand. Ein anderes etabliertes Verfahren ist die intraperitoneale Applikation. Diverse Studien konnten zeigen, dass verschiedene intraperitoneal verabreichte Nanopartikel systemisch aufgenommen werden und sich nach Überwindung der BHS auch im Gehirn wiederfinden (Kato et al., 2010, Salimi et al., 2018, So et al., 2019). Hier besteht allerdings die Gefahr einer Fehlpunktion mit akzidenteller Organverletzung. Darüber hinaus ist die Bioverfügbarkeit bei Resorption über das Peritoneum langsamer als bei intravenöser Applikation der NP. Weitere Applikationsformen sind zum einen die pulmonale Applikation. Die Verabreichung von Nanopartikeln per Inhalation ist bisher vorwiegend zur lokalen Chemotherapie in der Lunge entwickelt worden (Mangal et al., 2017). Ein Vorteil ist hier, dass Akkumulation in der in der Leber und ebenfalls der Abbau durch das MPS verringert werden (Yhee et al., 2016). Die subkutane, sowie die transdermale Applikation finden vorwiegend für langsame und konstante Freisetzung, sowie für topische Therapien Anwendung (Palmer und DeLouise, 2016). Schließlich besteht noch die Option einer oralen Verabreichung von Nanopartikeln. Hier liegt der Nachteil in der enzymatischen Degradierung der NP durch den niedrigen pH im Magen, einer vergleichsweise

langsamen Resorption über die intestinale Mucosa und somit geringeren Bioverfügbarkeit (Pridgen et al., 2014). Einige Verfahren der NP-Applikation umgehen die Blut-Hirn-Schranke und kamen damit für die Fragestellungen dieser Arbeit nicht in Frage, so zum Beispiel die intranasale Verabreichung (Alshweiat et al., 2019), die intraventrikuläre (Shyam et al., 2015) und die direkte intraparenchymatöse Injektion (Bergonzi et al., 2016).

Zusammengefasst erwies sich die intravenöse Injektion über die laterale Schwanzvene als zuverlässiges Verfahren, welches eine kontrollierte Freisetzung und hohe Bioverfügbarkeit der Nanopartikel ermöglichte. Zusätzlich spiegelt die intravenöse Verabreichung der NP die klinische Realität der Arzneimittel-Applikation nach schweren Schädel-Hirn-Traumata am besten wider.

### **5.1.2 Narkose**

Zur Durchführung der intravenösen Applikation der NP sowie des Controlled Cortical Impact war die Anästhesie der Versuchstiere notwendig. Hierfür wurde das seit langem in neurowissenschaftlichen Experimenten genutzte Chloralhydrat verwendet (Flecknell, 2015). Anästhetika können möglicherweise die cerebrale NP-Aufnahme beeinflussen. So demonstrierten Kannan et al. eine erhöhte Aufnahme von Poly(amidoamin) Dendrimer-NP in Mikroglia im in vitro-Versuch durch Pentobarbital (Kannan et al., 2017). Für Chloralhydrat ist ein derartiger Effekt bisher nicht beschrieben. Bei repetitiver intraperitonealer Injektion hochkonzentrierter Chloralhydrat-Lösung kann es zur Ausbildung eines Ileus und zur Peritonitis kommen (Hüske et al., 2016). Chloralhydrat führt hingegen nicht zu einer Störung der BHS und weist keine Neurotoxizität auf (Silverman und Muir, 1993, Rodrigues et al., 2006). Vielmehr gibt es Hinweise auf neuroprotektive Eigenschaften. Die von Liu et al. an C57BL/6-Mäusen durchgeführte Studie lieferte Hinweise darauf, dass eine Präkonditionierung mit Chloralhydrat die TNF $\alpha$ - und IL1 $\beta$ -Expression nach experimenteller cerebraler Ischämie (Middle cerebral artery occlusion, MCAO) supprimiert. Die basalen Level der proinflammatorischen Zytokinen blieben bei Sham-Tieren jedoch unbeeinträchtigt (Liu et al., 2015). Eine Auswirkung auf mögliche neuroinflammatorische Effekte der Nanopartikel ist damit nicht vollständig auszuschließen und sollte bei der Beurteilung der Ergebnisse mit bedacht werden.

### 5.1.3 Controlled Cortical Impact Traumamodell

In der vorliegenden Arbeit wurde das Controlled Cortical Impact Modell zur Auslösung des experimentellen Schädel-Hirn-Traumas genutzt. Ursprünglich durch Lighthall beschrieben (Lighthall, 1988), wurde das Modell später durch Dixon und Kollegen für die Anwendung an Ratten modifiziert (Dixon et al., 1991). Das hier verwendete Traumamodell ist also bereits seit vielen Jahren etabliert und in der neurotraumatologischen Forschung weit verbreitet. Es basiert auf einem pneumatisch betriebenen Bolzen, welcher eine fokale Kontusion bei intakter Dura hervorruft (Clausen, 2016). Durch die präzise Kontrolle der verschiedenen einzustellenden Traumaparameter wie Geschwindigkeit und Eindringtiefe liefert das CCI reproduzierbare histopathologische Korrelate, wie sie in der klinischen Realität bei SHT-Patienten auftreten (Romine et al., 2014).

Neben dem CCI-Modell existieren verschiedene andere SHT Modelle. Hier ist zum einen das Modell der Fluid Percussion Injury (FPI) (Dixon et al., 1987, McIntosh et al., 1987, McIntosh et al., 1989) zu nennen. Das Funktionsprinzip der FPI basiert auf einem Pendel, welches kinetische Energie auf eine Flüssigkeitssäule überträgt und so einen Druckimpuls auf die intakte Dura auslöst (Xiong et al., 2013). Hierdurch kommt es zu einer fokalen kortikalen Kontusion und zusätzlichen, diffusen subkortikalen Hirnschädigung (Ma et al., 2019). Im Vergleich zu anderen Modellen ist die Mortalität durch prolongierte Apnoephasen als Folge einer Kompression des Hirnstammes deutlich erhöht (Cernak, 2005). Ein weiteres häufig verwendetes Modell ist die Weight Drop Injury (WDI). Hier verursacht ein frei fallendes Gewicht durch direkten Aufprall auf die Schädelkalotte eine kortikale Kontusion, Schrankenstörung der BHS und konsekutive Entwicklung eines Hirnödems. Im Verlauf etablierten sich verschiedene Versionen des Modells. Zum einen das Modell nach Feeney, mit überwiegend fokaler Schädigung (Feeney et al., 1981), jedoch erhöhter Mortalität der Versuchstiere durch Kalottenfrakturen und Apnoe. Zum anderen die Modifikation nach Shohami (Shapira et al., 1988, Shohami et al., 1988), ebenfalls mit vorwiegend fokaler Läsion, sowie das Modell nach Marmarou, mit vor allem diffuser Hirnschädigung (Marmarou et al., 1994). Insgesamt bietet das Modell eine im Vergleich geringere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch die hohe Variabilität der Verletzungsschwere (Albert-Weissenberger und Sirén, 2010). Darüber hinaus wird in zahlreichen Veröffentlichungen das Modell der Kryoläsion genutzt (Pappius, 1981, Cruz et al., 2016, Zamproni et al., 2017). Ein mittels flüssigen Stickstoffs gekühlter Kupferzylinder wird auf die freigelegte Dura

aufgebracht und führt zu einer fokalen Läsion mit Störung der BHS. Dieses Modell stellt jedoch nur einen Teilaspekt des SHT ohne mechanische Krafteinwirkung dar (Raslan et al., 2012). Zur Modellierung eines penetrierenden Schädel-Hirn-Traumas, wie es beispielsweise im militärischen Kontext auftritt, wird unter anderem die kortikale Stichverletzung (Cortical stab injury, CSI) verwendet (Ruozi et al., 2015, Kang et al., 2016, Kwon et al., 2016, Mann et al., 2016). In diesem Modell wird eine Injektionsnadel an definierten stereotaktischen Koordinaten durch die intakte Dura in das kortikale Gewebe gestochen und so eine Serie lokaler Läsionen verursacht (Phipps, 2016). Auch dieses Modell bildet nur einen klinisch weniger relevanten Anteil der Schädigungsmechanismen eines SHT ab.

Da der Schwerpunkt der vorliegenden Studie auf der Evaluation der NP-Aufnahme bei SHT mit lokal geschädigter BHS und reliablem Schädigungsausmaß lag, erfüllte das CCI insgesamt am besten die Anforderungen eine gut begrenzte kortikale Kontusion mit Kompromittierung der BHS, ohne zusätzliche diffuse Schädigungen abzubilden und wurde deshalb anderen Modellen vorgezogen.

#### **5.1.4 Die Auswertung**

Zur Analyse der Aufnahme von intravenös verabreichten, mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladenen Nanopartikeln in Gehirn und peripheren Organen wurden in der hiesigen Studie immunhistochemisch aufgearbeitete Gefrierschnitte mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Die Fluoreszenzmikroskopie ist ein weit verbreitetes und sensitives Verfahren zur Analyse insbesondere der NP-Aufnahme im Gehirn (Harpreet und Gurpreet, 2013). Die Analyse der akquirierten Bilder kann hierbei durch bestimmte optische Phänomene wie der Hintergrundfluoreszenz durch endogene Fluorophore beeinträchtigt werden. So stellte sich bei der Auswertung der Gefrierschnitte des Lungengewebes heraus, dass diese aufgrund der elastischen Fasern des Lungengerüsts eine starke Autofluoreszenz im Wellenlängenbereich des grünen Farbkanals aufwiesen. Somit sind die Ergebnisse der NP-Aufnahme im Lungengewebe mit einem gewissen Fehler behaftet. Da eine weitere Prozessierung der histologischen Schnitte zur Reduktion der Autofluoreszenz wie Photobleaching (Kumar et al., 2015) oder Fluoreszenzlöschung (Quenching) mit beispielsweise Sudan Black B (Erben et al., 2016) potentiell mit dem Fluoreszenzsignal der Nanopartikel

interferieren, wäre hier für zukünftige Untersuchungen die Markierung der NP durch einem Fluoreszenzfarbstoff mit anderem Emissionsspektrum zu bevorzugen.

Eine höhere Auflösung als die herkömmliche Fluoreszenzmikroskopie bieten die konfokale Laserscanning-Mikroskopie und Multiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie. Die Elektronenmikroskopie erlaubt durch ihre noch höhere Auflösung sogar die Lokalisation der NP in subzellulären Kompartimenten (Zensi et al., 2009, Cabezon et al., 2015). Ein Nachteil ist hierbei jedoch die zeitintensive Aufarbeitung und Auswertung. Ein weiteres, viel genutztes Verfahren sind sogenannte in vivo-imaging Systeme. Hier wird die Epifluoreszenz der Fluorophor-beladenen NP genutzt, um die NP-Akkumulation im ganzen Versuchstier oder ex vivo in einzelnen Organen zu detektieren. Dies nutzten zum Beispiel Cruz et al. zur Analyse der Biodistribution von PLGA-Nanopartikeln (Cruz et al., 2016). Das Verfahren erlaubt einen hohen Durchsatz, jedoch keine genaue Lokalisation der Nanopartikel (Kang et al., 2016, Meng et al., 2018) und ist somit nicht sensitiv genug um qualitative Aussagen über die Aufnahme in bestimmten Hirnregionen zu machen (van Rooy et al., 2011). Saucier-Sawyer et al. nutzten eine weitere, ebenfalls Fluoreszenz-basierte Technik zur Auswertung der Hirnaufnahme von PLGA-NP. Mit Hilfe eines Microplate readers wurde die Fluoreszenzintensität der NP in homogenisiertem Hirngewebe gemessen und so die prozentuale Aufnahmemenge im Gehirn bestimmt. (Saucier-Sawyer et al., 2015). Ein Standardverfahren für genauere pharmakokinetische Studien ist hingegen die quantitative Autoradiographie. Hier wird die zu untersuchende Substanz mit einem Radionuklid markiert, welches nach Verabreichung im Gewebe mit hoher spatialer Auflösung detektiert werden kann (van Rooy et al., 2011). Bode et al. nutzten zur genaueren Ermittlung der NP-Plasmakonzentrationen ein elegantes Vorgehen. Indem unter anderem Polyester-NP und Acrylamid-NP mit einem Reporter-Peptid 5A modifiziert wurden, konnte die aufgenommene Menge über ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) quantifiziert werden (Bode et al., 2017).

Unter der Vielzahl optischer Analysemethoden erschien die Fluoreszenzmikroskopie zur Beantwortung der Fragestellungen in der hier durchgeführten Untersuchung insgesamt als geeignetstes Verfahren, da sie einen Mittelweg zwischen Sensitivität bezüglich der Lokalisation von Nanopartikeln und Zeiteffizienz bietet.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 NP-Verteilung in Organen

Um die Verteilung und Aufnahme der intravenös verabreichten Nanopartikel in einzelnen Organen miteinander zu vergleichen, erfolgte in der hier vorgelegten Studie die fluoreszenzmikroskopische Detektion der Fluorophor-beladenen Nanopartikel in histologischen Gefrierschnitten. Aufgrund der großen Bandbreite verschiedener Nanopartikel-Typen und unterschiedlicher Funktionalisierungen ist ein Vergleich zwischen der Biodistribution einzelner Nanopartikel nur eingeschränkt möglich. Der Fokus des folgenden Abschnittes liegt daher auf den Verteilungseigenschaften der, auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzten, polymerischen Nanopartikel.

Grundsätzlich ist die Biodistribution systemisch applizierter Nanopartikel von verschiedenen Faktoren, wie deren Größe und Oberflächencharakteristika abhängig. Über den Einfluss der Partikelgröße auf die Verteilung in Organen existieren zum Teil widersprüchliche Ansichten. Zum einen gibt es die Hypothese, dass größere NP mit einem hydrodynamischen Durchmesser über 200 nm schneller in Leber und Milz aufgenommen werden, da sie möglicherweise einem kapillären Filtereffekt unterliegen (Moghimi et al., 1993, Owens und Peppas, 2006, Hoshyar et al., 2016). Cruz et al. zeigten eine Korrelation zwischen der Größe der Nanopartikel und Retention in der Leber mit einer deutlich ausgeprägteren Akkumulation von NP mit 800 nm Durchmesser gegenüber NP mit 100 nm Durchmesser. Demgegenüber besteht die Hypothese einer inversen Korrelation zwischen Partikelgröße und Aufnahme in Leber und Milz (Beletsi et al., 2005, Saxena et al., 2006, Simon und Sabliov, 2014). Ein mögliche Erklärungsansatz ist, dass die Aufnahme der NP mehr von der Größe ihrer Oberfläche als von ihrer Masse abhängig ist (Aggarwal et al., 2009). Nanopartikel mit kleinem Durchmesser besitzen im Verhältnis zu ihrem Volumen eine wesentlich größere Oberfläche, welche ein höheres Interaktionspotential mit Plasmaproteinen bietet (Simon und Sabliov, 2014). Die Heterogenität der untersuchten Nanopartikel, Funktionalisierungen und angewendeten Tiermodelle lässt eine abschließende Klärung auf dem Boden der aktuellen Studienlage jedoch nicht zu.

Die zirkulierenden Plasmaproteine formieren, wie bereits zuvor beschrieben, bei Kontakt der NP mit dem Blutstrom eine Proteincorona und agieren als Oponine für Immunzellen des Monozyten-Makrophagen-Systems (Dobrovolskaia et al., 2008). Die Phagozytose der so opsonierten Nanopartikel erfolgt schließlich auf verschiedenen

Wegen. Zum einen erfolgt sie rezeptorvermittelt durch die Interaktion der adsorbierten Plasmaproteine, hier unter anderem verschiedene Apolipoproteine, Fibronectin, Immunglobuline und Komplementfaktoren mit spezifischen membranständigen Rezeptoren der phagozytierenden Zellen (Allémann et al., 1997). Zum anderen durch eine unspezifische Adhäsion von Phagozyten an die Bestandteile der Proteincorona (Frank und Fries, 1991). Darüber hinaus kann die Phagozytose auch durch Aktivierung des Komplementsystems initiiert werden (Owens und Peppas, 2006). Folglich scheint die Zusammensetzung der Proteincorona der vordringliche Einflussfaktor in Hinblick auf das Ausmaß der NP-Aufnahme zu sein (Aggarwal et al., 2009). Nagayama et al. zeigten diesbezüglich, dass die Aufnahme von Polystyren-NP signifikant höher war wenn sie vor der direkten Injektion in die Leber mit Blutserum inkubiert wurden (Nagayama et al., 2007). Aufgrund der hohen Anzahl von Zellen des MPS in Leber und Milz akkumulieren NP in diesen Organen in besonders hohem Umfang, während sie in anderen Organen nur in geringerem Anteil aufgenommen werden (Bazile et al., 1992, Alexis et al., 2008). Nach intravenöser Verabreichung stellt die Akkumulation in der Leber bei einem Großteil der Nanopartikelsysteme den hauptsächlichen Mechanismus der Elimination aus dem Blutkreislauf dar (Simpson et al., 2019). Mehrere Studien untersuchten die Aufnahmekinetik von PLGA-Nanopartikeln und demonstrierten ihre vorwiegende Internalisierung in CD68-positiven Kupffer-Zellen der Leber (Park et al., 2016, Zhang et al., 2016b).

Die in der vorliegenden Arbeit generierten Resultate stimmen mit der häufig in der Literatur beschriebenen Beobachtung überein, dass intravenös verabreichten NP hauptsächlich in Leber und Milz aufgenommen werden. So sind die eigenen Ergebnisse schlüssig zu den von Kulkarni und Feng für Polystyren-NP und Cruz et al. für PLGA-NP erhobenen Daten zur NP-Biodistribution, bei denen sich ebenfalls das Bild einer hohen Verteilung in Leber und Milz, sowie geringeren Akkumulation in Niere und Gehirn und sehr niedriger Aufnahme in Lunge und Herz zeigte (Kulkarni und Feng, 2013, Cruz et al., 2016). Ebenso bestätigen die eigenen Daten die in vielen Publikationen beschriebene, insgesamt höhere Akkumulation in den untersuchten Organen wenige Stunden nach Injektion und im zeitlichen Verlauf verringerte Aufnahme (Li et al., 2001, Snehalatha et al., 2008, Tosi et al., 2010, Parveen und Sahoo, 2011, Shalgunov et al., 2017).

Neben der Größe der Nanopartikel beeinflussen auch weitere Faktoren die Formation der Proteincorona. So weisen die Resultate verschiedener in-vivo Studien auf eine

schnellere Opsonisierung hydrophober NP im Vergleich zu hydrophilen NP, aufgrund vermehrter Adsorption von Plasmaproteinen an ihrer Oberfläche hin. Ebenso scheinen geladene NP in größerem Umfang opsonisiert und phagozytiert zu werden als solche mit neutraler Oberflächenladung (Roser et al., 1998, Dobrovolskaia et al., 2008). Wie bereits dargestellt ist die schnelle Phagozytose durch das MPS ein limitierender Faktor für die Bioverfügbarkeit von Nanopartikeln. Ein gängiges Verfahren, um die Zirkulation von Nanopartikeln im Kreislauf zu verlängern ist ihre Verknüpfung mit Polyethylenglykol (PEG)-Ketten. Über eine sterische Stabilisierung und Reduktion der elektrostatischen Wechselwirkungen führt die PEGylierung zu einer verminderten NP-Aufnahme in residente Makrophagen von Leber und Milz (Gref et al., 1995, Paciotti et al., 2004, Alexis et al., 2008). Darüber hinaus beeinflusst auch die Funktionalisierung der Nanopartikel mit oberflächenaktiven Substanzen ihre Biodistribution. Ambruosi et al. konnten zeigen, dass Polysorbat-80 funktionalisierte PBCA-NP weniger stark in peripheren Organen retiniert werden als solche ohne Funktionalisierung und bestätigten hierdurch vorangegangene Untersuchungen mit NP des gleichen Typs (Gipps et al., 1988, Tröster und Kreuter, 1992). Ein weiterer Effekt war die Verdopplung der Hirnaufnahme durch die Funktionalisierung mit Polysorbat-80 (Ambruosi et al., 2005). Der Einfluss einer Oberflächenfunktionalisierung auf den Transport über die Blut-Hirn-Schranke wird im nächsten Kapitel beleuchtet.

Sehr kleine Nanopartikel mit einem Molekulargewicht unter 5000 Da oder einem Partikeldurchmesser kleiner als 10 nm werden schnell renal eliminiert, da sie die glomerulären Filtrationsstrukturen ungehindert passieren können (Owens und Peppas, 2006, Hoshyar et al., 2016, Simpson et al., 2019). In der vorliegenden Studie wiesen die PLLA-SDS und PFDL-Tw Nanopartikel zum Zeitpunkt 4 Stunden nach Applikation eine im Vergleich mit den beiden anderen eingesetzten NP eine höhere Akkumulation in der Niere auf. Auch nach 24 Stunden war die Aufnahme beider PFDL-Nanopartikel in der Niere erhöht. Im Unterschied hierzu wiesen mehrere Untersuchungen eine über die Zeit deutlich abnehmende Akkumulation intravenös verabreichter NP in der Niere nach. Li et al. demonstrierten bei Polyvinylalkohol-funktionalisierten PLGA-NP mit einem mittleren Durchmesser von 214 nm eine relative Aufnahme von 0,65% nach 3 Stunden und 0,13% nach 24 Stunden (Li et al., 2001). Tosi et al. beobachteten bei PLGA-NP mit einer Poloxamer-188 Funktionalisierung und einem Durchmesser von 140-200 nm ein Absinken der relativen Aufnahme auf 1,5% nach 24 Stunden im Vergleich zu 2% nach 5 Stunden (Tosi et al., 2010). Vergleichbare Ergebnisse

erzielten auch Parveen und Sahoo, sowie Snehalatha et al. (Snehalatha et al., 2008, Parveen und Sahoo, 2011), sodass die Verringerung der NP-Akkumulation im zeitlichen Verlauf insgesamt plausibel erscheint. Eine mögliche Erklärung für die Abweichung der eigenen Resultate könnte die teilweise Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes aus den Nanopartikeln innerhalb von 24 Stunden nach Verabreichung sein. Um die genaueren Umstände des beobachteten Phänomens zu klären, sind jedoch weiterführende Untersuchungen nötig.

### **5.2.2 NP-Aufnahme in das Hirnparenchym**

In der vorliegenden Dissertation wurde die Überwindung der BHS durch systemisch verabreichte Nanopartikel untersucht, indem deren Fluoreszenzsignal in Gefrierschnitten des Gehirns hinsichtlich einer Anreicherung im Hirngewebe evaluiert wurde. Die Blut-Hirn-Schranke stellt, bedingt durch die enge Verbindung mikrovaskulärer Endothelzellen über Tight junctions und den resultierenden hohen transendothelialen Widerstand, ein großes Hindernis für den Transport von Nanopartikeln in das Gehirn dar. Bei verschiedenen NP-Typen wurde jedoch ihre Fähigkeit zur Überwindung der BHS und Akkumulation im Hirngewebe beobachtet. Allen voran besitzen polymerische NP, aber auch NP aus anorganischem Material wie Silber, Gold und Silizium, Lipid-NP, sowie NP auf Carbonbasis die prinzipielle Eigenschaft eines Übertritts in das Hirnparenchym nach systemischer Verabreichung (Bharadwaj et al., 2018b). Ein Vorteil polymerischer Nanopartikel gegenüber den anderen NP-Typen ist, dass diese biokompatibel und teilweise auch bioabbaubar sind und hierdurch ein geringeres Risiko für schädigende Auswirkungen durch längerfristige Ablagerung im Gehirn aufweisen. Trotz ihres Potentials die BHS zu überwinden, erreichen nur geringe Mengen der injizierten Nanopartikel das Hirnparenchym. Verschiedene Studien berichten, dass insgesamt weniger als 5% der verabreichten Gesamtdosis das Gehirn erreichen (Gustafson et al., 2015, Zhang et al., 2016a). Cupaioli et al. und Snehalatha et al. berichten für Poloxamer-188 funktionalisierte PLGA-NP sogar von einem noch geringeren Anteil zwischen 0,01-0,5% innerhalb von 24 Stunden nach intravenöser Verabreichung (Snehalatha et al., 2008, Cupaioli et al., 2014). Tosi et al. und Vergoni et al. konnten darüber hinaus bis 24 Stunden nach Applikation keinerlei Akkumulation von Poloxamer-188 funktionalisierten PLGA-NP im Hirn detektieren (Vergoni et al., 2009, Tosi et al., 2010).

Auch in der hier vorgelegten Studie lag die NP-Aufnahme im Gehirn ohne CCI weit unter dem Anteil der Akkumulation in Leber und Milz. Wie im vorangehenden Kapitel erläutert, ist ein Hauptgrund die rasche Elimination der zirkulierenden Nanopartikel aus dem Gefäßsystem durch phagozytierende Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems. Über eine Funktionalisierung der Oberfläche kann die Verweildauer der NP in der Blutzirkulation verlängert und so die Effizienz ihrer Hirnaufnahme gesteigert werden. Dies zeigten unter anderem auch Nance et al. am Beispiel der PEGylierung von Polystyren- und PLGA-Nanopartikeln (Nance et al., 2012).

Zahlreiche Studien belegen einen inversen Zusammenhang zwischen Partikelgröße und BHS-Penetration (Etame et al., 2011, Hanada et al., 2014, Bharadwaj et al., 2016). So konnten Kulkarni et al. bei Polystyren-NP mit einem Durchmesser zwischen 25 und 500 nm eine bevorzugte Akkumulation der kleineren NP im Gehirn 3 Stunden nach intravenöser Applikation feststellen (Kulkarni und Feng, 2013). Ähnliche Beobachtungen machten auch Sonavane et al. bei Gold-NP (Sonavane et al., 2008). Insgesamt scheint sich der ideale Durchmesser zur Überwindung der BHS im Bereich zwischen 10 und 200 nm zu bewegen (Hoshyar et al., 2016, Saraiva et al., 2016). Alle in der hiesigen Studie eingesetzten Nanopartikel erfüllten dieses Kriterium mit Durchmessern von  $121 \pm 23$  bis  $201 \pm 26$  nm.

Ein wichtiges Charakteristikum, welches die Wechselwirkung von Nanopartikeln mit der Blut-Hirn-Schranke determiniert ist die Ladung ihrer Oberfläche, das sogenannte Zetapotential. In vivo Untersuchungen belegen, dass NP mit stark positivem Zetapotential akute Toxizität an der BHS vermitteln, während negativ geladene NP in gleicher Konzentration nicht die BHS stören (Lockman et al., 2004). Insbesondere die Formation der Proteincorona wird von den Ladungseigenschaften der NP-Oberfläche beeinflusst. Hier besteht eine direkte Korrelation zwischen Zetapotential und Proteinadsorption (Roser et al., 1998, Owens und Peppas, 2006). So verstärkt sich die Adsorption von Plasmaproteinen mit zunehmender Ladung, wohingegen sich der Anteil unterschiedlicher Plasmaproteine in der Corona nicht verändert (Gessner et al., 2002). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nanopartikel wiesen alle eine moderat negative (PLLA-Tw:  $-31 \pm 3$  mV) bis stark negative (PFDL-SDS:  $-70 \pm 12$  mV) Oberflächenladung auf. Gessner et al. analysierten die Adsorption von Plasmaproteinen bei unterschiedlich geladenen Polystyren-NP und beobachteten, dass positiv geladene NP bevorzugt Plasmaproteine mit einem isoelektrischen Punkt unter 5,5 adsorbieren, beispielsweise wie Albumin, während sich die Corona bei

negativ geladenen NP vorwiegend aus Proteinen mit höherem isoelektrischen Punkt zusammensetzt (Gessner et al., 2003). Die Bestandteile der Proteincorona haben somit direkte Auswirkungen auf das individuelle Interaktionspotential mit der BHS.

Maßgeblichen Einfluss auf den Mechanismus, mit dem Nanopartikel die Blut-Hirn-Schranke überwinden und in das Hirngewebe aufgenommen werden, nimmt die Funktionalisierung ihrer Oberfläche. Zur Funktionalisierung von Nanopartikeln werden häufig oberflächenaktive Substanzen verwendet, wie in der hier vorgelegten Untersuchung die Tenside Polysorbat-80 und SDS. Insbesondere die Funktionalisierung mit Polysorbat-80 wurde in der Vergangenheit intensiv untersucht. Zahlreiche Publikationen kamen zu dem Schluss, dass eine Funktionalisierung mit Polysorbat-80 zu einer gesteigerten NP-Akkumulation im Gehirn führt (Gulyaev et al., 1999, Gao und Jiang, 2006, Tahara et al., 2011, Tian et al., 2011, Alyautdin et al., 2014). Auch die ursächlichen Mechanismen wurden bereits detailliert charakterisiert. Polysorbat-80 führt über eine Bindung von Apolipoprotein E zu einer Interaktion mit LDL-Rezeptoren an der BHS und schließlich zur rezeptorvermittelten Transzytose. Koffie et al. konnten am Beispiel von PBCA-NP mit Polysorbat-80 Funktionalisierung zeigen, dass die Adsorption von Apolipoprotein E auf ihrer Oberfläche zu einer signifikant höheren Überwindung der BHS im Vergleich zu unfunktionalisierten NP führt und die so modifizierten NP darüber hinaus keine Schrankenstörung induzieren (Koffie et al., 2011). Zusätzlich werden für Polysorbat-80 P-Glykoprotein inhibierende Eigenschaften diskutiert, welche die Anreicherung der NP im Hirngewebe zusätzlich fördern (Kreuter, 2001, Kreuter et al., 2002, Kreuter et al., 2003, Alexis et al., 2008). Für das anionische Tensid Natriumlaurylsulfat (SDS) wurde, wie eingangs erwähnt, nach intravenöser Verabreichung im Mausmodell eine Unterbrechung der BHS-Integrität für etwa 10 Minuten dokumentiert (Kobiler et al., 1989). Auch Saija et al. beobachteten eine dosisabhängige BHS-Störung nach intraarterieller Infusion verschiedener SDS Konzentrationen (Saija et al., 1997). Die temporäre Störung der Blut-Hirn-Schranke ist somit ein möglicher Mechanismus, über den SDS-funktionalisierte Nanopartikel die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Bezüglich der Komponenten der Proteincorona bei SDS-Funktionalisierung stellten Ritz et al. fest, dass sich diese hauptsächlich aus verschiedenen Apolipoproteinen zusammensetzt (Ritz et al., 2015). Dies lässt naheliegend erscheinen, dass SDS-funktionalisierte Nanopartikel ebenfalls über eine Interaktion mit LDL-Rezeptoren in das Hirngewebe aufgenommen werden. Kreuter et al. zeigten hierzu, dass auch eine direkte

Funktionalisierung von Albumin-NP mit verschiedenen Apolipoproteinen den Transport über die BHS im Vergleich zu NP ohne Funktionalisierung signifikant erhöht (Kreuter et al., 2007).

Bezüglich der zeitliche Kinetik der Aufnahme von Nanopartikeln in das Hirngewebe beobachteten Betzer et al. bei Insulin-ummantelten Gold-Nanopartikeln ein Maximum ihrer Aufnahme bereits 2 Stunden nach intravenöser Injektion (Betzer et al., 2017). Parveen und Sahoo, sowie Snehalatha et al. untersuchten die Biodistribution von PLGA-NP mit unterschiedlicher Funktionalisierung und stellten ebenfalls fest, dass ihre Akkumulation im Gehirn 4 Stunden nach intravenöser Verabreichung höher war als nach 24 Stunden (Snehalatha et al., 2008, Parveen und Sahoo, 2011). Auch die eigenen Beobachtungen konnten den beobachteten zeitlichen Verlauf der NP-Akkumulation im Gehirn untermauern. Es zeigte sich hier übereinstimmend eine höhere Aufnahme in das Hirngewebe nach 4 Stunden im Vergleich zu 24 Stunden nach Injektion der Nanopartikel.

Insgesamt wird deutlich, dass die individuelle Zusammensetzung der Proteincorona unter den vielen Einflussfaktoren die wichtigste Determinante bezüglich der Aufnahme von Nanopartikeln in das Hirngewebe ist. Auch wenn viele NP prinzipiell dazu in der Lage sind die BHS zu überwinden, bleibt ihre Anreicherung im Zielgewebe im Hinblick auf ihren Einsatz als Arzneimitteltransporter eine Herausforderung.

### **5.2.3 NP-Aufnahme in Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und BCECs**

Die Internalisierung von Nanopartikeln in verschiedenen Zelltypen des Gehirns ist bisher vor allem in vitro untersucht worden. In der hier vorgelegten Arbeit konnte die Zellaufnahme im Gehirn auch in vivo, durch den mikroskopischen Nachweis einer Kolo-kalisation von Nanopartikeln und immunfluoreszenzgefärbten Zellen in histologischen Hirnschnitten erbracht werden. Im vorangehenden Kapitel wurde bereits beschrieben, dass ein Hauptmechanismus des Übertritts von Nanopartikeln in das Gehirn ihre rezeptorvermittelte Aufnahme in mikrovaskuläre Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke ist. Weiss et al. analysierten die in vitro-Aufnahme von Polysorbat-80 funktionalisierten PBCA-NP und wiesen ihre Internalisierung in BCEC in einem Transwell-System nach (Weiss et al., 2008). Weiterhin wurde bereits die Aufnahme von Gold-NP (Gromnicova et al., 2013) und Carbon-Nanotubes (Shityakov et al., 2015) in BCECs in einem in vitro BHS-Modell verifiziert.

Auch die NP-Aufnahme in Gliazellen ist durch verschiedene in vitro-Studien belegt. Hohnholt et al. und Sun et al. konnten eine zeit- und konzentrationsabhängige Zellaufnahme von Eisenoxid- und Silber-Nanopartikeln in primären Astrozytenkulturen zeigen (Hohnholt et al., 2013, Sun et al., 2013). Eine weitere Untersuchung demonstrierte die schnelle Aufnahme von Kupferoxid-NP in Astrozyten via Endozytose (Bulcke und Dringen, 2016). Andere Arbeiten charakterisierten darüber hinaus die Internalisierung von PLGA-NP (Chang et al., 2012) und Polyamidoamin-Dendrimere in Astrozyten (Guo et al., 2011). Des Weiteren untersuchten diverse Arbeiten die Aufnahme von Nanopartikeln in Mikroglia. Auch hier konnte eine Internalisierung verschiedener Nanopartikel, wie Eisenoxid-NP (Xue et al., 2012, Luther et al., 2013) und Carbon-Nanotubes (Bardi et al., 2013, Villegas et al., 2014, Bussy et al., 2015) in Mikroglia-Monokulturen zeigen.

Die Ladung ihrer Oberfläche scheint eine Rolle für die selektive Aufnahme von Nanopartikeln in einzelne Zelltypen zu spielen. Walters et al. zeigten an Hirnschnitten neonataler Ratten bei negativ geladenen Quantum Dots eine präferentielle Aufnahme in Neuronen, während eine positive Oberflächenladung in der bevorzugten Internalisierung durch Gliazellen resultierte (Walters et al., 2015). Im Gegensatz hierzu demonstrierten Pinkernelle et al. bei magnetischen NP mit negativem Zetapotential eine bevorzugte Aufnahme gerade in Mikroglia in einer Cokultur mit Neuronen (Pinkernelle et al., 2012). Die genauen Zusammenhänge zwischen Zetapotential und selektiver Akkumulation in bestimmten Zelltypen des ZNS sind somit noch nicht ausreichend geklärt.

Bestrebungen, in der jeweiligen Zielstruktur eine möglichst hohe Konzentration von Nanopartikeln zu erreichen und gleichzeitig die unspezifische Akkumulation in anderen Zellen zu verhindern, führten zur Weiterentwicklung von modifizierten NP zum zielgerichteten Transport und der selektiven Aufnahme in bestimmte Zelltypen (Madhusudanan et al., 2017). Insbesondere Neuronen rückten hierbei als Zielstruktur im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen in den Fokus. Hierfür erfolgte in mehreren Studien eine Konjugation verschiedener Nanopartikel mit Bestandteilen neurotropher Viren. Townsend et al. wiesen bei PLGA-Nanopartikeln, welche mittels Tetanustoxin C funktionalisiert wurden, ihre spezifische neuronale Aufnahme in vitro nach (Townsend et al., 2008). In einer weiteren Studie wurden NP durch Konjugation mit einem Peptid aus Glykoproteinbestandteilen des Rabiesvirus funktionalisiert. Hier

konnte in vivo eine spezifische Aufnahme in Neuronen demonstriert werden, während eine Akkumulation in Gliazellen nicht beobachtet werden konnte (Kwon et al., 2016).

Über das weitere Schicksal systemisch verabreichter Nanopartikel nach ihrer Passage durch die BHS liegen bisher nur limitierte Daten vor. Weiss et al. verifizierten die zuvor in vitro gemachten Beobachtungen und konnten die Internalisierung von PBCA-NP mit Polysorbat 80-Funktionalisierung in cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen auch in vivo zeigen (Weiss et al., 2008). Nicholas et al. untersuchten die Aufnahme von bioabbaubaren PLGA-Mikrosphären nach intracerebraler Injektion im Rattenhirn und demonstrierten ihre vorwiegende Ansammlung in Mikroglia, sowie weniger ausgeprägt auch in Astrozyten (Nicholas et al., 2002). Eine andere Studie zeigte anhand eines Tiermodells des hypothermen Kreislaufstillstands die selektive Aufnahme von PAMAM-Dendrimeren in Neuronen und Mikroglia auf (Mishra et al., 2014).

In vitro Versuche der eigenen Arbeitsgruppe erbrachten den durchflusszytometrischen Nachweis einer zeit- und konzentrationsabhängigen Aufnahme der PLLA- und PFDL-Nanopartikel in C6-Gliomzellen, sowie primäre Astrozyten und mikrovaskuläre Endothelzellen (Galley, 2020). Die eigene Untersuchung konnte darüber hinaus qualitativ nachweisen, dass die verwendeten NP in vivo sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten und Mikroglia, sowie ebenfalls in BCECs aufgenommen werden. Weitere Untersuchungen sind nötig, um Aussagen über quantitative Unterschiede und die zeitliche Kinetik der NP-Aufnahme treffen zu können.

#### **5.2.4 NP-Aufnahme in das Hirnparenchym nach CCI**

Analog zur Evaluation der NP-Akkumulation im Gehirn bei intakter Blut-Hirn-Schranke erfolgte in der hier vorliegenden Dissertation die fluoreszenzmikroskopische Analyse des Übertritts von Nanopartikeln in das Hirnparenchym bei, durch ein experimentelles Schädel-Hirn-Trauma geschädigter Blut-Hirn-Schranke.

Die Verwendung von Nanopartikeln als Arzneimittelträger beim Schädel-Hirn-Trauma ist ein bisher nur in sehr begrenztem Umfang erforschtes Thema. Trotz zahlreicher, in präklinischen Studien als neuroprotektiv wirksam erwiesener Substanzen, bleibt das Erreichen einer ausreichenden Wirkstoffkonzentration im Gehirn durch eine mitunter niedrige BHS-Übertrittsrate, sowie ihre schmale therapeutische Breite durch systemische Toxizität eine große Herausforderung (Bony und Kievit, 2019).

Eine verletzungs- oder erkrankungsbedingte Störung der Blut-Hirn-Schranke, bietet hier die Möglichkeit einer Steigerung der NP-Aufnahme im Gehirn (Bharadwaj et al., 2018b). Wesentlich intensiver erforscht als die Hirnaufnahme von Nanopartikeln im Gehirn nach Schädel-Hirn-Trauma, ist ihr Einsatz als Transportsystem für neuroprotektive Wirkstoffe beim Schlaganfall, sodass zahlreiche Erkenntnisse zum BHS-Übertritt bei geschädigter Blut-Hirn-Schranke aus Studien zur cerebralen Ischämie stammen (Al-Ahmady, 2018). Aufgrund vieler Übereinstimmungen in der Pathophysiologie von sekundärem Hirnschaden und cerebraler Ischämie, lassen sich die Resultate mit gewissen Einschränkungen auch auf die NP-Aufnahme nach Schädel-Hirn-Trauma anwenden. So ist der Mechanismus, welcher zu einer gesteigerten passiven Akkumulation von NP im Hirngewebe führt beim SHT, wie auch bei der cerebralen Ischämie eine biphasisch Hyperpermeabilität der BHS durch transiente Öffnung ihrer Tight junctions (Knowland et al., 2014, Haley und Lawrence, 2016, Al-Ahmady, 2018, Bharadwaj et al., 2018b). Darüber hinaus zeigten verschiedene Untersuchungen, dass bei beiden Entitäten zusätzlich zur passiven Akkumulation eine gesteigerte Transzytose der NP vorliegt. Dies wird durch eine, im Rahmen der inflammatorischen Kaskade nach cerebraler Ischämie und sekundärem Hirnschaden ausgelösten, Hochregulation des integralen Membranproteins Caveolin-1 an der BHS ausgelöst (Gu et al., 2011, Zhao et al., 2014, Shang et al., 2016, Huang et al., 2018).

Ein weiterer Überschneidungspunkt mit einem anderen Teilgebiet der neurowissenschaftlichen Forschung ist der sogenannte Enhanced Permeation and Retention (EPR)-Effekt. Dieser ist bereits seit langem aus Studien zur Therapie hirneigener Tumore, beispielsweise des Glioblastoms bekannt (Karim et al., 2016, Pourgholi et al., 2016). Die durch Angiogenese gebildete Mikrovaskularisierung von Tumoren weist im Gegensatz zu normalem Gefäßendothel häufig eine irreguläre Anordnung der Gefäßendothelzellen und verringerte Integrität der Basalmembran auf (Simpson et al., 2019). Durch die so entstandenen Fenestrations kommt es im mikrovaskulären Gefäßendothel zu einer variablen Permeabilität gegenüber niedermolekularen Substanzen und damit auch zur erhöhten Extravasation von Nanopartikeln (Li et al., 2016, Su und Hu, 2018). BHS-Überwindung und Hirnaufnahme von Nanopartikeln unterliegen bei traumatisch bedingter Schädigung der Blut-Hirn-Schranke einem EPR-ähnlichen Effekt (Clond et al., 2013, Bharadwaj et al., 2016).

Durch mehrere Arbeiten ist ein NP-vermittelter Transport neuroprotektiver Wirkstoffe und eine damit verbundene Abschwächung des sekundären Hirnschadens nach experimentellem SHT gezeigt worden (Bitner et al., 2012, Ruozi et al., 2015, Bailey et al., 2016, Yoo et al., 2017, Wu et al., 2019, Sharma et al., 2020). Der Übertritt von Nanopartikeln über die kompromittierte BHS und deren Verteilung im Gehirn nach SHT wurde bisher jedoch nur durch eine sehr limitierte Anzahl von Studien genauer beleuchtet. Cruz et al. untersuchten die Hirnaufnahme von PLGA-NP unterschiedlicher Größe nach Kryoläsion und zeigten, dass NP mit einem Durchmesser von 100nm die höchste Akkumulation im verletzten Hirnareal aufwiesen. Das Maximum der Konzentration im Läsionsgebiet wurde hierbei bereits eine Stunde nach Injektion erreicht und nahm im Verlauf von 24 Stunden deutlich ab. Bharadwaj et al. analysierten die zeitliche und räumliche Verteilung von carboxylierten Polystyren-Nanopartikeln unterschiedlicher Größe zwischen 20nm und 500nm. Auch hier lag die höchste Aufnahme der NP im Bereich von einer Stunde nach Controlled Cortical Impact. Innerhalb von 24 Stunden nach Trauma wurde eine signifikante Reduktion der NP-Aufnahme registriert (Bharadwaj et al., 2016). Clond et al. beobachteten hingegen eine Akkumulation von NP im Läsionsgebiet auch noch 36 Stunden nach CCI (Clond et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit war im zeitlichen Verlauf kein signifikanter Unterschied zwischen der Aufnahme im Läsionsgebiet nach 4 und 24 Stunden nachweisbar. Zu beobachten war lediglich ein leichter Trend zu einer geringeren Aufnahme der NP nach 24 Stunden. Die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen anderer Studien ist hierbei nicht in jedem Fall möglich. Das von uns gewählte Procedere bildet die gesamte Verweildauer der NP im Kreislauf ab und unterliegt damit auch möglichen Einflüssen wie Umverteilung und Abbau. In der von Bharadwaj et al. durchgeführten Untersuchung wurden die NP zu definierten Zeitpunkten nach CCI (0, 2, 5, 12 und 23 Stunden) injiziert und die Aufnahme im Hirngewebe nach einer Zirkulationsdauer von einer Stunde analysiert. Dies ermöglichte einen direkteren Bezug zum zeitlichen Verlauf der BHS-Störung herzustellen. Betrachtet man die eigenen Ergebnisse zur zeitlichen Kinetik der Hirnaufnahme ohne CCI, passen diese jedoch zu der Hypothese, dass die Akkumulation der NP bereits innerhalb von 24 Stunden nach Verabreichung abfällt.

In einer weiteren Studie untersuchten wiederum Bharadwaj et al. die Aufnahme von Polystyren-NP in einem Fluid Percussion Injury-Modell und wiesen eine Korrelation der höchsten NP-Aufnahme im Gehirn, welche 3 Stunden nach erfolgtem Trauma

vorlag, mit dem Maximum der Extravasation des BHS-Integritätsmarkers Meerrettichperoxidase nach. Sie schlussfolgerten, dass die erhöhte NP-Akkumulation in direktem zeitlichen Zusammenhang mit dem traumatisch bedingten Integritätsverlust der BHS steht (Bharadwaj et al., 2018a). Kwon et al. beobachteten in einem Mausmodell der penetrierenden Hirnverletzung auf der Läsionsseite eine gesteigerte NP-Akkumulation bis 6 Stunden nach Trauma, gefolgt von einer Abnahme nach 24 Stunden. Auf der kontralateralen Seite wies die Aufnahme der Nanopartikel hingegen keinen Unterschied zur Vergleichsgruppe ohne SHT auf (Kwon et al., 2016). Ein signifikanter Unterschied zwischen ipsi- und kontralateraler Seite ließ sich auch in der zuvor zitierten Studie von Bharadwaj et al. nachweisen (Bharadwaj et al., 2016). Die hier vorgelegten, eigenen Ergebnisse wiesen hiermit übereinstimmend einen hochsignifikanten Unterschied zwischen der NP-Akkumulation im Gehirn nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma und der NP-Aufnahme bei intakter Blut-Hirn-Schranke nach. Ebenso ließ sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der Läsionsseite und der nicht geschädigten Hemisphäre ausmachen. Somit sind die hier gewonnenen Resultate als Bestätigung der vorangegangenen Untersuchungen zu verstehen.

Darüber hinaus ließ sich feststellen, dass die relative NP-Aufnahme auf der Läsionsseite gegenüber der kontralateralen Seite im Mittel 6-fach erhöht war. Dieses Resultat ist vereinbar mit den von Kang et al. publizierten Daten, die bei Nanopartikeln aus porösem Silizium eine um das 5,2-fache erhöhte Akkumulation auf der verletzten Hirnseite gegenüber der unverletzten Hemisphäre zum Zeitpunkt 6 Stunden nach penetrierendem Trauma demonstrierten (Kang et al., 2016). Zudem konnten regionalen Unterschiede der NP-Aufnahme im Gehirn nach CCI nachgewiesen werden. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Bharadwaj et al. war die NP-Akkumulation weiter peripher von der Läsion lokalisierten Arealen geringer als direkt an der Kontusionsstelle (Bharadwaj et al., 2016).

Weniger eindeutig sind die eigenen Resultate hinsichtlich der NP-Aufnahme nach Trauma auf der kontralateralen Seite. Hier erwies sich die kontralaterale Aufnahme der PLLA-NP als vergleichbar mit der Aufnahme bei den Versuchsgruppen mit intakter BHS, was auf einen fokalen Integritätsverlust der BHS durch das CCI hindeutet. Bei den PFDL-NP kam es hingegen auf der kontralateralen Seite zu einer signifikant niedrigeren Akkumulation als in der jeweiligen Vergleichsgruppe ohne CCI. Boyd et al. analysierten die Hirnaufnahme von PEGylierten Liposomen nach CCI in Mäusen und

beobachteten ein gegensätzliches Phänomen. 8 Stunden nach CCI war die NP-Aufnahme auf kontralateralen Seite gegenüber der Kontrollgruppe ohne Trauma erhöht, wenn auch weit weniger ausgeprägt als auf der Seite der Läsion. Es wurde hypothetisiert, dass dies auf einer Mitbeteiligung der kontralateralen Hemisphäre durch lokale Änderungen des CBF und Kompromittierung der BHS durch inflammatorische Prozesse beruhe (Boyd et al., 2015). Da die eigenen Beobachtungen hinsichtlich der kontralateralen Aufnahme nicht bei allen eingesetzten Nanopartikeln einheitlich waren, sollten diese durch weitere Untersuchungen genauer überprüft und präzisiert werden.

### **5.2.5 Neuroinflammation**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mögliche neuroinflammatorische Einflüsse durch die verwendeten Nanopartikel untersucht. Hierfür wurde die mikroskopische Bestimmung der immunreaktiven Flächen von immunhistochemisch gegen aktivierte Gliazellen und proinflammatorische Zytokine gefärbten Hirnschnitten genutzt. Die neuroinflammatorischen Auswirkungen durch den Einsatz von Nanopartikeln sind bisher nicht umfassend untersucht worden (Masserini, 2013). Bei einzelnen NP-Typen gibt es jedoch starke Hinweise auf ein neurotoxisches Potential. Dies ist in der Vergangenheit insbesondere für metallische Nanopartikel genauer untersucht worden. Sharma et al. beobachteten bei metallischen NP aus Kupfer, Aluminium und Silber 24 Stunden nach Verabreichung eine Störung der BHS, den Untergang von Neuronen, eine Aktivierung von Gliazellen und die Hochregulation von Hitzeschockproteinen (Sharma und Sharma, 2007, Sharma et al., 2009). Dies wird auch durch eine Arbeit von Trickler et al. untermauert, in der Silber-NP eine erhöhte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, allen voran TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$ , im in-vitro Modell der Blut-Hirn-Schranke auslösten (Trickler et al., 2010). Auch bei Carbon-basierten Nanopartikeln wurden in vitro und tierexperimentell neurotoxische Effekte nachgewiesen, so zum Beispiel durch Carbon Nanotubes (Salvador-Morales et al., 2006, Gholamine et al., 2017) und Quantum Dots (Larner et al., 2017).

Die Erkenntnisse über das weitreichende neuroinflammatorische Potential der oben genannten NP führten zu einer Weiterentwicklung von biokompatiblen und bioabbaubaren Nanopartikeln aus biologischen Polymeren. Bei PLGA- und PLLA-NP konnten in verschiedenen Studien keine negativen Auswirkungen auf die Zellviabilität beobachtet werden (Leite et al., 2015).

In einer *in vitro* Studie wurde eine niedrige, dosisabhängige Zytotoxizität von PLGA-NP an mikrovaskulären Endothelzellen der Retina festgestellt (Lin et al., 2016). In vorausgegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten bei den, auch in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel keine zytotoxischen Effekte dokumentiert werden. In einem *in-vitro* Zellviabilitätsassay ließ sich hier unter Verwendung des Avitalfarbstoffes 7AA-D kein schädigender Einfluss auf C6-Gliomzellen, sowie porcine Astrozyten und zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen durch PLLA-SDS und PFDL-Tw Nanopartikel nachweisen (Galley, 2020).

Das neurotoxische Potential von Nanopartikeln wird maßgeblich durch ihre physikochemischen Eigenschaften determiniert (Cupaioli et al., 2014). Ein entscheidender Faktor ist hierbei nicht nur das Ausgangsmaterial, sondern auch die Funktionalisierung ihrer Oberflächenstruktur. Wie bereits in Kapitel 2.3.2 erläutert, kommt es durch den Kontakt der Nanopartikel mit im Blutstrom zirkulierenden Plasmaproteinen zur Formation einer Proteincorona, welche in ihrer Zusammensetzung einer zeitlichen Dynamik unterliegt. Insbesondere kationische Proteine verursachen hierbei eine erhöhte Immunogenität (Cui und Mumper, 2002, Monopoli et al., 2011). Durch den Übertritt der NP-Proteincorona-Komplexe in das ZNS kann es zu möglichen inflammatorischen Auswirkungen durch Proteinkomponenten kommen, welche die BHS normalerweise nicht überwinden können. Zusätzlich beeinflusst die Oberflächenladung der NP ihre Interaktion mit biologischen Membranen. Stark positiv und negativ geladenen NP scheinen einen störenden Einfluss auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke auszuüben (Lockman et al., 2004). Auch bei den PLLA-SDS und PFDL-SDS NP, die in der vorliegenden Studie zur Anwendung kamen, haben sich hohe Konzentrationen *in vitro* als störend für die Barrierefunktion der BHS erwiesen. So zeigten *in-vitro* Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe an einem Blut-Hirnschrankenmodell aus porcinen zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen und Astrozyten eine konzentrationsabhängige Abnahme der Barrierefunktion. Bei hohen NP-Konzentrationen von 1500 µg/ml kam es hier zu einem signifikanten Abfall des transendothelialen Widerstandes (TEER) im Vergleich zu niedrigeren NP-Konzentrationen von 150 und 300 µg/ml (Orben, 2020). Studien, welche sich dezidiert mit der potentiellen Neurotoxizität der oberflächenaktiven Substanz der funktionalisierten NP auseinandergesetzt haben, sind äußerst rar. Ema et al. fanden nach Polysorbat-80 Langzeitexposition an Ratten keine neurokognitiven Veränderungen und beobachteten keine histopathologischen

Veränderungen (Ema et al., 2008). Der Einfluss einer Funktionalisierung mit SDS auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke wurde bereits im vorangehenden Kapitel beschrieben. Darüber hinaus gibt es auch Hinweise auf ein zytotoxisches Potential. Dong et al. wiesen zytotoxische Effekte von SDS an humanen Astrozytom-Zellen nach (Dong et al., 2009). Voigt et al. beobachteten zytotoxische Effekte durch SDS- und Polysorbat 80-funktionalisierte PBCA-Nanopartikel in vitro, während in vivo keinerlei neurotoxische Effekte oder histopathologische Veränderungen nachgewiesen werden konnten (Voigt et al., 2014b). Eine genaue Aussage ob und in welcher Ausprägung eine Funktionalisierung von Nanopartikeln mit SDS in vivo zu einer Inflamationsreaktion und Neurotoxizität führt, lässt sich anhand der bisher publizierten Daten nicht treffen.

Nach Aufnahme von Nanopartikel in das ZNS kann es, analog zu der in Kapitel 2.1.3.2 beschriebenen Inflamationsreaktion beim sekundären Hirnschaden, zu einer Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten und konsekutiven Freisetzung proinflammatorischer Zytokine kommen. Mikroglia sind als ortsständige Immunzellen des ZNS maßgeblich in die Phagozytose von Pathogenen und Fremdmaterial involviert. Insbesondere für Nanopartikel aus Titandioxid wurde in zahlreichen Studien relevante Auswirkungen auf Aktivierung von Gliazellen und Induktion neuroinflammatorischer Prozesse nachgewiesen (Czajka et al., 2015). Die nasale Verabreichung von Titandioxid-NP über 30 Tage führte zu einer signifikanten Neurodegeneration und Aktivierung von Astrozyten bei Ratten (Wang et al., 2008). Dies bestätigten auch die Beobachtungen von Ze et al., die nach Titandioxid-NP Exposition eine generelle Proliferation von Gliazellen und Nekrosen in cerebralem Gewebe zeigten (Ze et al., 2013). Long et al. wiesen darüber hinaus nach, dass Titandioxid-NP in vitro eine Generierung von ROS durch Mikroglia und damit verbundene Schädigung von Neuronen auslösen (Long et al., 2007). Dies bestätigten auch Hu et al. bei oraler Langzeitgabe im Mausmodell (Hu et al., 2011b). Die Auswirkung verschiedener Nanopartikel auf Mikrogliaaktivierung und Zytokinfreisetzung in vitro charakterisierten auch Xue et al. Eine Exposition gegenüber Titandioxid-NP, Eisen(III)-oxid-NP, Hydroxylapatit-NP und Siliziumdioxid-NP induzierte die Aktivierung von Mikroglia über eine gesteigerte iNOS-Expression und führte zur Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL1}\beta$  und  $\text{IL6}$  und vermittelte zytotoxische Effekten in Neuronen (Xue et al., 2012). Bioabbaubare polymerische NP haben in verschiedenen in-vitro Studien gezeigt, dass von ihnen

keine schädigenden Auswirkungen auf Astrozyten ausgehen (Madhusudanan et al., 2017). Auch Yuan et al. demonstrierten in vivo keine vermehrte GFAP-Expression als Zeichen einer Astrozytenaktivierung durch Polysorbat 80-funktionalisierte Chitosan-Nanopartikel (Yuan et al., 2015). Kolter et al. zeigten in vitro, dass SDS- und Polysorbat 80-funktionalisierte biokompatible PBCA-Nanopartikel keine vermehrte Expression von TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$  auslösten (Kolter et al., 2015).

Anhand der Auswertung der immunhistochemisch gegen GFAP und Iba1 gefärbten Hirnschnitte konnte in der hier vorliegenden Studie gezeigt werden, dass die verwendeten PLLA und PFDL Nanopartikel keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia in einem Zeitraum bis 24 Stunden nach intravenöser Applikation ausüben. Dies deckt sich mit den Beobachtungen zur Biokompatibilität von Nanopartikeln aus biologischen Polymeren in der Literatur. Eine mögliche Störung der Blut-Hirn-Schranke durch die hier verwendeten Nanopartikel ist noch in weiterführenden Untersuchungen zu klären. Die aktuelle Studienlage legt nahe, dass biokompatible polymerische NP nach Aufnahme im Gehirn im Gegensatz zu vielen anderen Nanopartikeln keine Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen stimulieren. In der hiesigen Studie konnte damit übereinstimmend demonstriert werden, dass die verwendeten Nanopartikel im Untersuchungszeitraum keine erhöhte Expression von TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$  auslösen.

Diskussionswürdig ist die fehlende Nutzung einer Positivkontrolle zur Evaluation der Neuroinflammation. Albertazzi und Kollegen nutzten beispielsweise das Lipopolysaccharid (LPS)-Modell als interne Positivkontrolle (Albertazzi et al., 2013). Lipopolysaccharide sind Hauptbestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien und führen nach peripherer Verabreichung zur Aktivierung von Immunkompetenten Zellen des Gehirns und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Qin et al., 2007, Chen et al., 2012, Catorce und Gevorkian, 2016). Durch die parallele Untersuchung vier verschiedenen Inflammationsparameter, einerseits der Astrozyten- und Mikrogliaaktivierung und andererseits Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$ , konnten jedoch in der vorliegenden Arbeit trotz fehlender Positivkontrolle konsistente Resultate erzielt werden.

Auch wenn für einige Nanomaterialien definitive neurotoxische Effekte belegt sind, lässt sich über eine mögliche Neurotoxizität insbesondere von bioabbaubaren NP auf Polymerbasis noch keine gesicherte Aussage treffen (Teleanu et al., 2019).

Weitergehende Untersuchungen sind nötig, um das individuelle neurotoxische Potential spezifischer Nanopartikel zu klären.

### **5.3 Schlussfolgerung und Ausblick**

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, unterschiedlich funktionalisierte polymerische Nanopartikel im Hinblick auf ihre Biodistribution in verschiedenen Organen, sowie ihr Potential zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und Aufnahme im Gehirn bei systemischer Verabreichung im Tiermodell zu analysieren. Darüber hinaus lag der Fokus auf der Charakterisierung der Nanopartikel-Akkumulation im Läsionsgebiet nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma, sowie der Evaluation möglicher neuroinflammatorischer Auswirkungen durch die verwendeten Nanopartikel.

Abschließend können die eingangs formulierten Forschungsfragen nun wie folgt beantwortet werden:

1. Gibt es Unterschiede in der organspezifischen und zeitlichen Aufnahme der Untersuchten NP in Leber, Niere, Herz, Milz, Lunge und Gehirn?

Die systemisch applizierten Nanopartikel werden innerhalb von 24 Stunden nach Verabreichung vor allem in Leber und Milz aufgenommen. In deutlich geringerem Ausmaß findet auch eine Aufnahme in die übrigen Organe statt.

2. Überwinden die verabreichten NP die intakte Blut-Hirn-Schranke und gibt es Unterschiede zwischen den verwendeten NP?

Bei intravenöser Verabreichung überwinden alle untersuchten NP die intakte Blut-Hirn-Schranke. Hierbei sind keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Hirnaufnahme zwischen den einzelnen Nanopartikeln auszumachen.

- 2 a. Werden die NP im Untersuchungszeitraum in neuronalen, glialen und endothelialen Zellen aufgenommen?

Die eingesetzten NP werden im Beobachtungszeitraum in allen untersuchten Zelltypen aufgenommen. Eine genaue Aussage über zeitliche und zellspezifische Unterschiede lässt sich aufgrund der hier erhobenen Daten nicht treffen.

3. Wie stark akkumulieren die verschiedenen NP nach einer SHT-induzierten Störung der Blut-Hirn-Schranke im therapeutisch zugänglichen Perikontusionsgebiet?

Eine, durch eine kontrollierte kortikale Kontusion induzierte, Störung der Blut-Hirn-Schranke führt zu einer hochsignifikanten Zunahme der NP-Akkumulation im direkt an die Läsion angrenzenden Hirnareal.

4. Lösen die untersuchten NP im Hirngewebe eine astrozytäre und mikrogliale Inflammationsreaktion aus?

Die untersuchten Nanopartikel lösen im Hirngewebe in einem Zeitraum von 24 Stunden nach intravenöser Applikation keine Aktivierung von Gliazellen oder erhöhte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus.

Auf Grundlage der dargelegten Resultate ergeben sich Anknüpfungspunkte für weiterführende Untersuchungen. In verschiedenen Teilbereichen der Auswertung ließen sich Unterschiede beobachten, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichten. Somit bietet es sich an, die Größe der Versuchsgruppen zu erweitern, um die statistische Power insgesamt zu erhöhen. Dies ist für den experimentellen Anteil innerhalb unserer Arbeitsgruppe bereits durchgeführt worden, sodass die weitere Auswertung mittelfristig möglich ist.

Um einen genaueren Einblick in die Pharmakokinetik zu erhalten, würde sich in zukünftigen Studien die Messung von Plasmakonzentrationen der applizierten NP anbieten. Darüber hinaus wäre eine Verlängerung des Beobachtungszeitraumes und Analyse der Verteilung in den einzelnen Organen, beispielsweise 3, 7 und 14 Tage nach Applikation im Hinblick auf die Elimination der NP und mögliche längerfristige Auswirkungen sinnvoll. Hier wäre auch die Auswertung der bereits verfügbaren Organschnitte bezüglich einer möglichen Toxizität in anderen Organen in Erwägung zu ziehen.

Die NP-Aufnahme im Gehirn wurde in der vorliegenden Untersuchung nur innerhalb der ersten 24 Stunden nach Applikation untersucht. Daher könnte die Verlängerung des Zeitfenster auf 48 Stunden tiefergreifende Einblicke auf den Zusammenhang zwischen NP-Aufnahme und zeitlicher Kinetik der BHS-Störung liefern. Darüber hinaus wäre zu evaluieren, inwieweit es durch die NP selbst zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke kommt und ob sich Unterschiede in der Entzündungsreaktion nach CCI zwischen den Versuchsgruppen mit und ohne Verabreichung von NP zeigen. Auch die erzielten Resultate zur Zellaufnahme der NP im Gehirn müssen zukünftig noch genauer differenziert werden. Hier wäre insbesondere eine quantitative Analyse, sowie Charakterisierung möglicher Unterschiede zwischen der Aufnahme ohne Trauma und

nach CCI interessant. Schließlich würde eine Wirkstoffbeladung und Überprüfung, ob ausreichende Wirkstoffkonzentrationen im Gehirn freigesetzt werden, eine genauere Abschätzung des klinischen Potentials der verwendeten Nanopartikel ermöglichen.

---

## 6 Zusammenfassung

---

Das Schädel-Hirn-Trauma ist eine Erkrankung mit dramatischer Auswirkung auf die Lebensqualität und weltweit hoher sozioökonomischer Relevanz. Der durch die initiale Gewalteinwirkung hervorgerufene primäre Hirnschaden ist lediglich präventiv adressierbar. Ein komplexes System pathophysiologischer Prozesse führt in Folge zur Entwicklung des sekundären Hirnschadens. Dieser ist potentiell einer medikamentösen Therapie zugänglich, jedoch mangels neuroprotektiv wirksamer Therapieoptionen für viele Patienten mit einer schlechten Prognose und einem teilweise deletären Outcome assoziiert. Die Blut-Hirn-Schranke sorgt als Transportbarriere in streng regulierter Weise für den Stoffaustausch zwischen Blutkreislauf und ZNS und dient der Aufrechterhaltung eines für neuronale Strukturen protektiven Milieus. Sie hindert jedoch auch hydrophile und höhermolekulare Pharmaka am Erreichen ihres Wirkortes. Nanopartikel stellen eine innovative und vielversprechende Option zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke dar. Sie ermöglichen Wirkstoffen den Übertritt in das Gehirn und können so zukünftige Therapiekonzepte des sekundären Hirnschadens revolutionieren.

In der Vorliegenden Studie sollten zum einen die Fragen beantwortet werden,

1. wie sich systemisch verabreichte Nanopartikel nach 4 und 24 Stunden in verschiedenen Organen verteilen,
2. ob diese die Blut-Hirn-Schranke überwinden und in Neuronen, Gliazellen und mikrovaskulären Endothelzellen aufgenommen werden.

Zum anderem war es Ziel,

3. die Akkumulation der Nanopartikel im periläsionalen Gebiet nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma und hierdurch gestörter Blut-Hirn-Schranke zu quantifizieren und
4. mögliche neuroinflammatorische Effekte durch die applizierten Nanopartikel zu untersuchen.

Hierzu wurden vier verschiedene bioabbaubare (PLLA-SDS, PLLA-Tw) und nicht-bioabbaubare Nanopartikel (PFDL-SDS, PFDL-Tw) auf Polymerbasis mit unterschiedlicher Funktionalisierung Sprague-Dawley Ratten intravenös verabreicht. Ein fokales Schädel-Hirn-Trauma wurde mittels Controlled Cortical Impact

hervorgehoben. Die Organverteilung und Aufnahme in das Gehirn wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie zu den Zeitpunkten 4 und 24 Stunden nach NP-Applikation analysiert. Eine mögliche Inflammationsreaktion durch die verabreichten Nanopartikel wurde immunhistochemisch evaluiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich systemisch applizierte, polymerische Nanopartikel innerhalb von 24 Stunden nach intravenöser Verabreichung hauptsächlich in Leber und Milz verteilen. In geringerem Ausmaß findet auch eine Aufnahme in das Gehirn statt. Nach Überwinden der Blut-Hirn-Schranke wurden die Nanopartikel hier sowohl in mikrovaskulären Endothelzellen, Mikroglia und Astrozyten, als auch in Neuronen aufgenommen. Innerhalb von 24 Stunden nach Verabreichung der Nanopartikel kam es hierbei nicht zu einer Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia, sowie zu keiner erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine. Bei Schädigung der Blut-Hirn-Schranke durch ein experimentelles SHT resultierte dies in einem hochsignifikanten Anstieg der Nanopartikel-Aufnahme im Bereich der Läsion und dem umliegenden Areal.

In Zusammenschau mit den in vorangegangenen Arbeiten gewonnenen Erkenntnissen kann resümiert werden, dass die BHS-Störung im Rahmen eines Schädel-Hirn-Traumas zu einer deutlichen Steigerung der NP-Aufnahme im geschädigten Hirngebiet führt und somit ein Fenster für den zielgerichteten Transport neuroprotektiver Wirkstoffe zur Behandlung des sekundären Hirnschadens öffnet.

---

## 7 Literaturverzeichnis

---

- Abbott N (2013) Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inher Metab Dis*, 36, 437-49.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR & Begley DJ (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*, Jan;37(1):13-25
- Abbott NJ, Rönnbäck L & Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, Jan;7(1):41-53.
- Aggarwal P, Hall J, Mcleland C, Dobrovolskaia M & Mcneil S (2009) Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev*, June 21; 61(6): 428–437.
- Agrahari V (2017) The exciting potential of nanotherapy in brain-tumor targeted drug delivery approaches. *Neural Regen Res.* , Feb;12(2):197-200.
- Al-Ahmady Z (2018) Selective drug delivery approaches to lesioned brain through blood brain barrier disruption. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 15:4, 335-349.
- Albert-Weissenberger C & Sirén A-L (2010) Experimental traumatic brain injury. *Experimental & Translational Stroke Medicine* 2:16.
- Albertazzi L, Gherardini L, Brondi M, Sato S, Bifone A, Pizzorusso T, Ratto G & Bardi G (2013) In Vivo Distribution and Toxicity of PAMAM Dendrimers in the Central Nervous System Depend on Their Surface Chemistry. *Mol. Pharmaceutics*, 10, 249 – 260.
- Alessandri B, Schwandt E, Kamada Y, Nagata M, Heimann A & Kempinski O (2012) The neuroprotective effect of lactate is not due to improved glutamate uptake after controlled cortical impact in rats. *J Neurotrauma.* , 29(12):2181-91.
- Alexis F, Pridgen E, Molnar L & Farokhzad O (2008) Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 5, 4; 505-515
- Allémann E, Gravel P, Leroux J, Balant L & Gurny R (1997) Kinetics of blood component adsorption on poly(D,L-lactic acid) nanoparticles: evidence of complement C3 component involvement. *J Biomed Mater Res.* , Nov; 37(2):229-34.
- Alshweiat A, Ambrus R & Csoka I (2019) Intranasal Nanoparticulate Systems as Alternative Route of Drug Delivery. *Curr Med Chem.*, 26(35):6459-6492.
- Alves JL (2014) Blood-brain barrier and traumatic brain injury. *J Neurosci Res*, 92, 141-7.
- Alyautdin R, Khalin I, Nafeeza MI, Haron MH & Kuznetsov D (2014) Nanoscale drug delivery systems and the blood-brain barrier. *Int J Nanomedicine.* , Feb 7;9:795-811
- Ambruosi A, Yamamoto H & Kreuter J (2005) Body distribution of polysorbate-80 and doxorubicin-loaded [ 14 C]poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after i.v. administration in rats. *Journal of Drug Targeting*, 13:10, 535-542.
- Åslund AKO, Berg S, Hak S, Mørch Y, Torp SH, Sandvig A, Widerøe M, Hansen R & De Lange Davies C (2015) Nanoparticle delivery to the brain--By focused ultrasound and self-assembled nanoparticle-stabilized microbubbles. *J Control Release.* , Dec 28;220(Pt A):287-294.
- Bailey ZS, Nilson E, Bates JA, Oyalowo A, Hockey KS, Sajja V, Thorpe C, Rogers H, Dunn B, Frey AS, Billings MJ, Sholar CA, Hermundstad A, Kumar C, Vandevord PJ & Rzigalinski BA (2016) Cerium Oxide Nanoparticles Improve Outcome After In Vitro and In Vivo Mild Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*, Nov 2.
- Baldwin SA, Fugaccia I, Brown DR, Brown LV & Scheff SW (1996) Blood-brain barrier breach following cortical contusion in the rat. *J Neurosurg.* , Sep;85(3):476-81.
- Bardi G, Nunes A, Gherardini L, Bates K, Al-Jamal K, Gaillard C, Prato M, Bianco A, Pizzorusso T & Kostarelos K (2013) Functionalized carbon nanotubes in the brain: cellular internalization and neuroinflammatory responses. *PLoS One.* , Nov 18;8(11):e80964.
- Başkaya MK, Rao AM, Doğan A, Donaldson D & Dempsey RJ (1997) The biphasic opening of the blood-brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett.* , Apr 18;226(1):33-6.

- Battaglia L, Panciani PP, Muntoni E, Capucchio MT, Biasibetti E, De Bonis P, Mioletti S, Fontanella M & Swaminathan S (2018) Lipid nanoparticles for intranasal administration: application to nose-to-brain delivery. *Expert Opin Drug Deliv.*, Apr;15(4):369-378.
- Bazile D, Ropert C, Huve P, Verrecchia T, Marlard M, Frydman A, Veillard M & Spenlehauer G (1992) Body distribution of fully biodegradable [14C]-poly(lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats. *Biomaterials.* , 13(15):1093-102.
- Begley DJ (2004) ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des.* , 10(12):1295-312.
- Beletsi A, Panagi Z & Avgoustakis K (2005) Biodistribution properties of NPs based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers. *Int J Pharm.*, 298:233–241.
- Bergonzi MC, Guccione C, Grossi C, Piazzini V, Torracchi A, Luccarini I, Casamenti F & Bilia AR (2016) Albumin Nanoparticles for Brain Delivery: A Comparison of Chemical versus Thermal Methods and in vivo Behavior. *ChemMedChem*, 11, 1840-9.
- Betzer O, Shilo M, Opochninsky R, Barnoy E, Motiei M, Okun E, Yadid G & Popovtzer R (2017) The effect of nanoparticle size on the ability to cross the blood–brain barrier: an in vivo study. *Nanomedicine (Lond.)* 12(13), 1533–1546.
- Bharadwaj V, Rowe R, Harrison J, Wu C, Anderson T, Lifshitz J, Adelson P, Kodibagkar V & Stabenfeldt S (2018a) Blood-brainbarrier disruption dictates nanoparticle accumulation following experimental brain injury. *Nanomedicine.* , Oct;14(7):2155-2166.
- Bharadwaj VN, Lifshitz J, Adelson PD, Kodibagkar VD & Stabenfeldt SE (2016) Temporal assessment of nanoparticle accumulation after experimental brain injury: Effect of particle size. *Sci Rep*, 6, 29988.
- Bharadwaj VN, Nguyen DT, Kodibagkar VD & Stabenfeldt SE (2018b) Nanoparticle-Based Therapeutics for Brain Injury. *Adv Healthc Mater*, 7.
- Bhardwaj V, Kaushik A, Khatib ZM, Nair M & Mgoron AJ (2019) Recalcitrant Issues and New Frontiers in Nano-Pharmacology. *Front. Pharmacol.*, Nov 29;10:1369.
- Bitner BR, Marcano DC, Berlin JM, Fabian RH, Cherian L, James C. , Culver JC, Dickinson ME, Robertson CS, Pautler RG, Kent TA & Tour JM (2012) Antioxidant Carbon Particles Improve Cerebrovascular Dysfunction Following Traumatic Brain Injury. *ACS Nano*, September 25; 6(9): 8007–8014.
- Bode GH, Coue G, Freese C, Pickl KE, Sanchez-Purra M, Albaiges B, Borros S, Van Winden EC, Tziveleka LA, Sideratou Z, Engbersen JFJ, Singh S, Albrecht K, Groll J, Moller M, Potgens AJG, Schmitz C, Frohlich E, Grandfils C, Sinner FM, Kirkpatrick CJ, Steinbusch HWM, Frank HG, Unger RE & Martinez-Martinez P (2017) An in vitro and in vivo study of peptide-functionalized nanoparticles for brain targeting: The importance of selective blood-brain barrier uptake. *Nanomedicine*, 13, 1289-1300.
- Bony BA & Kievit FM (2019) A Role for Nanoparticles in Treating Traumatic Brain Injury. *Pharmaceutics.* , Sep 13;11(9). pii: E473.
- Borlongan CV & Emerich DF (2003) Facilitation of drug entry into the CNS via transient permeation of blood brain barrier: laboratory and preliminary clinical evidence from bradykinin receptor agonist, Cereport. *Brain Res Bull.* , May 15;60(3):297-306.
- Boyd BJ, Galle A, Daglas M, Rosenfeld JV & Medcalf R (2015) Traumatic brain injury opens blood-brain barrier to stealth liposomes via an enhanced permeability and retention (EPR)-like effect. *J Drug Target.* , 23(9):847-53.
- Brazinova A, Rehorcikova V, Taylor MS, Buckova V, Majdan M, Psota M, Peeters W, Feigin V, Theadom A, Holkovic L & Synnot A (2018) Epidemiology of Traumatic Brain Injury in Europe: A Living Systematic Review. *J Neurotrauma.*, Dec 19. ahead of print.
- Büki A & Povlishock JT (2006) All roads lead to disconnection? Traumatic axonal injury revisited. *Acta Neurochir (Wien)*. Feb;148(2):181-93; discussion 193-4.
- Bulcke F & Dringen R (2016) Handling of Copper and Copper Oxide Nanoparticles by Astrocytes. *Neurochem Res.* , Feb;41(1-2):33-43.
- Burda JE, Bernstein AM & Sofroniew MV (2016) Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol.* , Jan; 275(0 3): 305–315.

- Bussy C, Al-Jamal K, Boczkowski J, Lanone S, Prato M, Bianco A & Kostarelos K (2015) Microglia Determine Brain Region-Specific Neurotoxic Responses to Chemically Functionalized Carbon Nanotubes. *ACS Nano.* , Aug 25;9(8):7815-30.
- Butt AM, Jones HC & Abbott NJ (1990) Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol.*, Oct;429:47-62.
- Cabezon I, Manich G, Martin-Venegas R, Camins A, Pelegri C & Vilaplana J (2015) Trafficking of Gold Nanoparticles Coated with the 8D3 Anti-Transferrin Receptor Antibody at the Mouse Blood-Brain Barrier. *Mol Pharm*, 12, 4137-45.
- Cai W, Liu H, Zhao J, Chen LY, Chen J, Lu Z & Hu X (2017) Pericytes in Brain Injury and Repair After Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res.* , Apr;8(2):107-121
- Calzoni E, Cesaretti A, Polchi A, Di Michele A, Tancini B & Emiliani C (2019) Biocompatible Polymer Nanoparticles for Drug Delivery Applications in Cancer and Neurodegenerative Disorder Therapies. *J Funct Biomater.* , Jan 8;10(1). pii: E4.
- Carney N, Totten AM, O'reilly C, Ullman JS, Hawryluk GW, Bell MJ, Bratton SL, Chesnut R, Harris OA, Kisson N, Rubiano AM, Shutter L, Tasker RC, Vavilala MS, Wilberger J, Wright DW & Ghajar J (2017) Guidelines for the Management of Severe Traumatic Brain Injury, Fourth Edition. *Neurosurgery.*, Jan 1;80(1):6-15
- Catorce M & Gevorkian G (2016) LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals. *Curr Neuropharmacol.* , Feb; 14(2): 155–164.
- Cederberg D & Siesjö P (2010) What has inflammation to do with traumatic brain injury? *Childs Nerv Syst.* , Feb;26(2):221-6.
- Cernak I (2005 ) Animal models of head trauma. *NeuroRx.* , Jul;2(3):410-22.
- Chang J, Paillard A, Passirani C, Morille M, Benoit J, Betbeder D & Garcion E (2012) Transferrin adsorption onto PLGA nanoparticles governs their interaction with biological systems from blood circulation to brain cancer cells. *Pharm Res.*, Jun;29(6):1495-505.
- Chen Z, Jalabi W, Shpargel K, Farabaugh K, Dutta R, Yin X, Kidd G, Bergmann C, Stohlman S & Trapp B (2012) Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent on hematogenous TLR4. *J. Neurosci.* , 32(34):11706–11715.
- Chiu CC, Liao YE, Yang LY, Wang JY, Tweedie D, Karnati HK, Greig NH & Wang JY (2016) Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. *J Neurosci Methods*, Oct 15;272:38-49.
- Chodobski A, Zink BJ & Szmydynger-Chodobska J (2011) Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Transl Stroke Res.*, Dec;2(4):492-516.
- Clausen F (2016) Animal Models of Traumatic Brain Injury In: Janowski M (ed.) *Experimental Neurosurgery in Animal Models. Neuromethods 116.* New York Springer Science.
- Clond MA, Lee BS, Yu JJ, Singer MB, Amano T, Lamb AW, Drazin D, Kateb B, Ley EJ & Yu JS (2013) Reactive oxygen species-activated nanoprodruge of Ibuprofen for targeting traumatic brain injury in mice. *PLoS One*, 8, e61819.
- Corps KN, Roth TL & McGavern DB (2015) Inflammation and Neuroprotection in Traumatic Brain Injury. *JAMA Neurol.* , Mar; 72(3): 355–362.
- Cox A, Andreozzi P, Dal Magro R, Fiordaliso F, Corbelli A, Talamini L, Chinello C, Raimondo F, Magni F, Tringali M, Krol S, Jacob Silva P, Stellacci F, Masserini M & Re F (2018) Evolution of Nanoparticle Protein Corona across the Blood-Brain Barrier. *ACS Nano.* , Jul 24;12(7):7292-7300.
- Cruz LJ, Stammes MA, Que I, Van Beek ER, Knol-Blankevoort VT, Snoeks TJA, Chan A, Kaijzel EL & Lowik C (2016) Effect of PLGA NP size on efficiency to target traumatic brain injury. *J Control Release*, 223, 31-41.
- Cui Z & Mumper R (2002) Coating of cationized protein on engineered nanoparticles results in enhanced immune responses. *Int J Pharm.*, May 15;238(1-2):229-39.

- Cupaioli F, Zucca F, Boraschi D & Zecca L (2014) Engineered nanoparticles. How brain friendly is this new guest? *Prog Neurobiol.*, Aug-Sep;119-120:20-38.
- Czajka M, Sawicki K, Sikorska K, Popek S, Kruszewski M & Kapka-Skrzypczak L (2015) Toxicity of titanium dioxide nanoparticles in central nervous system. *Toxicol In Vitro.*, Aug;29(5):1042-52.
- Daneman R & Prat A (2015) The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* , Jan 5;7(1):a020412.
- Davson H, Zlokovic B, Rakic L & Segal BS (1993) History and Basic Concept. An Introduction to the Blood-Brain Barrier. CRC Press.
- De Wit NM, Kooij G & De Vries HE (2016) In Vitro and Ex Vivo Model Systems to Measure ABC Transporter Activity at the Blood-Brain Barrier. *Curr Pharm Des.* , 22(38):5768-5773.
- Deng ZJ, Liang M, Monteiro M, Toth I & Minchin RF (2011) Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nat Nanotechnol.* , Jan; 6(1):39-44.
- Destatis (2019) Ergebnisse der Todesursachenstatistik für Deutschland. Statistisches Bundesamt, erschienen am 25.07.2019, Art.-Nr. 5232101177015
- Devos SL & Miller TM (2013) Direct Intraventricular Delivery of Drugs to the Rodent Central Nervous System. *J. Vis. Exp.* , (75), e50326.
- Dixon C, Lyeth B, Povlishock J, Findling R, Hamm R, Marmarou A, Young H & Hayes R (1987) A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurosurg.*, 67:110–119.
- Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghamai AA & Hayes RL (1991) A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *Journal Neuroscience Methods*, 39, 253-262.
- Dobrovolskaia M, Aggarwal P, Hall J & Mcneil S (2008) Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. *Mol Pharm.* , 5(4): 487–495.
- Docter D, Westmeier D, Markiewicz M, Stolte S, Knauer SK & Stauber RH (2015) The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned - challenge accepted? *Chem Soc Rev.* , Oct 7;44(17):6094-121.
- Donat CK, Scott G, Gentleman SM & Sastre M (2017) Microglial Activation in Traumatic Brain Injury. *Front Aging Neurosci*, Jun 28;9:208.
- Dong L, Witkowski C, Craig M, Greenwade M & Joseph K (2009) Cytotoxicity effects of different surfactant molecules conjugated to carbon nanotubes on human astrocytoma cells. *Nanoscale Res Lett.* , Sep 4;4(12):1517-23.
- Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Hirose A & Kamata E (2008) Evaluation of developmental neurotoxicity of polysorbate 80 in rats. *Reprod Toxicol.* , Jan;25(1):89-99.
- Engelhardt B & Wolburg H (2004) Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol.* , Nov;34(11):2955-63.
- Erben T, Ossig R, Naim H & Schnekenburger J (2016) What to do with high autofluorescence background in pancreatic tissues - an efficient Sudan black B quenching method for specific immunofluorescence labelling. *Histopathology.* , Sep;69(3):406-22.
- Etame A, Smith C, Chan W & Rutka J (2011) Design and potential application of PEGylated gold nanoparticles with size-dependent permeation through brain microvasculature. *Nanomedicine (Lond).* 7;992–1000.
- Feeney D, Boyeson M, Linn R, Murray H & Dail W (1981) Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res Bull.*, 211:67-77.
- Firsching R, Rickels E, Mauer UM, Sakowitz OW, Messing-Jünger M, Engelhard KFD, Schwenkreis PFD, Linn JFD, Biberthaler PFD & Schwerdtfeger K 2016. Leitlinie Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter. Update 2015.
- Fisher DG & Price RJ (2019) Recent Advances in the Use of Focused Ultrasound for Magnetic Resonance Image-Guided Therapeutic Nanoparticle Delivery to the Central Nervous System. *Front Pharmacol.* , Nov 13;10:1348.
- Flecknell P (2015) Laboratory Animal Anaesthesia, Academic Press.

- Foley CP, Rubin DG, Santillan A, Sondhi D, Dyke JP, Crystal RG, Gobin YP & Ballon DJ (2014) Intra-arterial delivery of AAV vectors to the mouse brain after mannitol mediated blood brain barrier disruption. *J Control Release.* , Dec 28;196:71-78
- Frank M & Fries L (1991) The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* 12, 322–326.
- Galley M (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. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Gao H (2016) Progress and perspectives on targeting nanoparticles for brain drug delivery. *Acta Pharm Sin B.* , Jul;6(4):268-86.
- Gao K & Jiang X (2006) Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int J Pharm.* , 310:213–219.
- Gbd 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators (2019) Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* , Jan;18(1):56-87.
- Gessner A, Lieske A, Paulke B & Muller R (2002) Influence of surface charge density on protein adsorption on polymeric nanoparticles: analysis by two-dimensional electrophoresis. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* , 54:165–170.
- Gessner A, Lieske A, Paulke B & Muller R (2003) Functional groups on polystyrene model nanoparticles: influence on protein adsorption *J. Biomed. Mater. Res. A.* , 65:319–326.
- Gholamine B, Karimi I, Salimi A, Mazdarani P & Becker L (2017) Neurobehavioral toxicity of carbon nanotubes in mice. *Toxicol Ind Health*, Apr; 33(4):340-350.
- Gipps E, Groscurth P, Kreuter J & Speiser P (1988) Distribution of polyhexylcyanoacrylate nanoparticles in nude mice over extended times and after repeated injection. *J Pharm Sci*, 77:208–209.
- Grabrucker AM, Ruozi B, Belletti D, Pederzoli F, Forni F, Vandelli MA & Tosi G (2016) Nanoparticle transport across the blood brain barrier. *Tissue Barriers.* , Feb 25;4(1):e1153568.
- Gref R, Domb A, Quellec P, Blunk T, Muller R, Verbavatz J & Langer R (1995) The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* , 16, 215–233.
- Gromnicova R, Davies H, Sreekanthreddy P, Romero I, Lund T, Roitt I, Phillips J & Male D (2013) Glucose-coated gold nanoparticles transfer across human brain endothelium and enter astrocytes in vitro. *PLoS One.*, Dec 5;8(12):e81043.
- Gu Y, Dee C & Shen J (2011) Interaction of free radicals, matrix metalloproteinases and caveolin-1 impacts blood-brain barrier permeability. *Front Biosci (Schol Ed).* , Jun 1;3:1216-31.
- Gulyaev A, Gelperina S, Skidan I, Antropov A, Kivman G & Kreuter J (1999) Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharm Res.* , Oct;16(10):1564-9.
- Guo J, Gao X, Su L, Xia H, Gu G, Pang Z, Jiang X, Yao L, Chen J & Chen H (2011) Aptamer-functionalized PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery. *Biomaterials.* , Nov;32(31):8010-20.
- Gupta MN & Roy I (2020) How Corona Formation Impacts Nanomaterials as Drug Carriers. *Mol. Pharmaceutics* 17, 725-737.
- Gustafson H, Holt-Casper D, Grainger D & Ghandehari H (2015) Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano Today.*, Aug;10(4):487-510.
- Habgood MD, Bye N, Dziegielewska KM, Ek CJ, Lane MA, Potter A, Morganti-Kossmann C & Saunders NR (2007) Changes in blood-brain barrier permeability to large and small molecules following traumatic brain injury in mice. *Eur J Neurosci*, 25, 231-8.
- Haley M & Lawrence C (2016) The blood-brain barrier after stroke: structural studies and the role of transcytotic vesicles. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 28:456-470.

- Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M & Attwell D (2014) Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*. , Apr 3;508(7494):55-60.
- Hanada S, Fujioka K, Inoue Y, Kanaya F, Manome Y & Yamamoto K (2014) Cell-Based in Vitro Blood–Brain Barrier Model Can Rapidly Evaluate Nanoparticles' Brain Permeability in Association with Particle Size and Surface Modification. *Int. J. Mol. Sci.* , 15(2), 1812-1825.
- Harpreet K & Gurpreet S (2013) In vivo Methods to study uptake of Nanoparticle into the Brain. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 3(4), 173-177.
- Haseloff RF, Dithmer S, Winkler L, Wolburg H & Blasig IE (2015) Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. *Semin Cell Dev Biol.* , Feb;38:16-25
- Hawkins BT & Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. . *Pharmacol Rev.*, 57;173–185.
- Hohnholt M, Geppert M, Luther E, Petters C, Bulcke F & Dringen R (2013) Handling of iron oxide and silver nanoparticles by astrocytes. *Neurochem Res* 38:227–239.
- Hoshyar N, Gray S, Han H & Bao G (2016) The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine (Lond)*. , Mar;11(6):673-92.
- Hu K, Shi Y, Jiang W, Han J, Huang S & Jiang X (2011a) Lactoferrin conjugated PEG-PLGA nanoparticles for brain delivery: preparation, characterization and efficacy in Parkinson's disease. *Int J Pharm*, 415, 273-83.
- Hu R, Zheng L, Zhang T, Gao G, Cui Y, Cheng Z, Cheng J, Hong M, Tang M & Hong F (2011b) Molecular mechanism of hippocampal apoptosis of mice following exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J Hazard Mater.* , Jul 15;191(1-3):32-40.
- Huang Q, Zhong W, Hu Z & Tang X (2018) A review of the role of cav-1 in neuropathology and neural recovery after ischemic stroke. *J Neuroinflammation.*, Dec 20;15(1):348.
- Hubbard WB, Lashof-Sullivan M, Greenberg S, Norris C, Eck J, Lavik E & Vandevord P (2018) Hemostatic nanoparticles increase survival, mitigate neuropathology and alleviate anxiety in a rodent blast trauma model. *Sci Rep.*, Jul 13;8(1):10622.
- Hüske C, Sander S, Hamann M, Kershaw O, Richter F & Richter A (2016) Towards optimized anesthesia protocols for stereotactic surgery in rats: Analgesic, stress and general health effects of injectable anesthetics. A comparison of a recommended complete reversal anesthesia with traditional chloral hydrate monoanesthesia. *Brain Res.*, Jul 1;1642:364-375.
- Jain KK (2012) Nanobiotechnology-based strategies for crossing the blood-brain barrier. *Nanomedicine (Lond)*. Aug;7(8):1225-33.
- Jassam YN, Izzy S, Whalen M, MCGavern DB & El Khoury J (2017) Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. *Neuron*. , Sep 13;95(6):1246-1265.
- Kang EJ, Major S, Jorks D, Reiffurth C, Offenhauser N, Friedman A & Dreier JP (2013) Blood-brain barrier opening to large molecules does not imply blood-brain barrier opening to small ions. *Neurobiol Dis.*, Apr;52:204-18
- Kang J, Joo J, Kwon EJ, Skalak M, Hussain S, She Z-G, Ruoslahti E, Bhatia SN & Sailor MJ (2016) Self-Sealing Porous Silicon-Calcium Silicate Core–Shell Nanoparticles for Targeted siRNA Delivery to the Injured Brain. *Adv. Mater.* , 28, 7962–7969.
- Kannan G, Kambhampati SP & Kudchadkar SR (2017) Effect of anesthetics on microglial activation and nanoparticle uptake: Implications for drug delivery in traumatic brain injury. *J Control Release*, 263, 192-199.
- Karim R, Palazzo C, Evrard B & Piel G (2016) Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme: Current state-of-the-art. *Journal of Controlled Release* 227; 23–37.
- Karve IP, Taylor JM & Crack PJ (2016) The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol*. 2016 Feb; 173(4): 692–702., Feb; 173(4): 692–702.
- Kato S, Itoh K, Yaoi T, Tozawa T, Yoshikawa Y, Yasui H, Kanamura N, Hoshino A, Manabe N, Yamamoto K & Fushiki S (2010) Organ distribution of quantum dots after intraperitoneal administration, with special reference to area-specific distribution in the brain. *Nanotechnology*. , Aug 20;21(33):335103.

- Keaney J & Campbell M (2015) The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.*, Nov;282(21):4067-79
- Kedmi R, Ben-Arie N & Peer D (2010) The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation. *Biomaterials.*, Sep; 31(26):6867-75.
- Khalin I, Alyautdin R, Wong TW, Gnanou J, Kocherga G & Kreuter J (2016) Brain-derived neurotrophic factor delivered to the brain using poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles improves neurological and cognitive outcome in mice with traumatic brain injury. *Drug Deliv*, 23, 3520-3528.
- Khanna SC, Jecklin T & Speiser P (1970) Bead polymerization technique for sustained-release dosage form. *J Pharm Sci.*, May;59(5):614-8.
- Kim HK, Lee GH & Chang Y (2018) Gadolinium as an MRI contrast agent. *Future Med Chem.*, Mar 1;10(6):639-661
- Kim JH, Kim JH, Yu YS, Kim DH & Kim KW (2009) Recruitment of pericytes and astrocytes is closely related to the formation of tight junction in developing retinal vessels. *J Neurosci Res.*, Feb 15; 87(3):653-9.
- Kim TH, Kim M, Park HS, Shin US, Gong MS & Kim HW (2012) Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. *J Biomed Mater Res A.*, Apr;100(4):1033-43
- Knowland D, Arac A, Sekiguchi K, Hsu M, Lutz S, Perrino J, Steinberg G, Barres B, Nimmerjahn A & Agalliu D (2014) Stepwise recruitment of transcellular and paracellular pathways underlies blood-brain barrier breakdown in stroke. *Neuron.*, May 7;82(3):603-17.
- Kobiler D, Lustig S, Gozes Y, Ben-Nathan D & Akov Y (1989) Sodium dodecylsulphate induces a breach in the blood-brain barrier and enables a West Nile virus variant to penetrate into mouse brain. *Brain Res.*, Sep 4;496(1-2):314-6.
- Koffie R, Farrar C, Saidi L, William C, Hyman B & Spires-Jones T (2011) Nanoparticles enhance brain delivery of blood-brain barrier-impermeable probes for in vivo optical and magnetic resonance imaging. *Proc Natl Acad Sci USA.*, Nov 15;108(46):18837-42.
- Kolter M, Ott M, Hauer C, Reimold I & Fricker G (2015) Nanotoxicity of poly(n-butylcyano-acrylate) nanoparticles at the blood-brain barrier, in human whole blood and in vivo. *J Control Release.*, Jan 10;197:165-79.
- Krenzlin H, Lorenz V, Danckwardt S, Kempfski O & Alessandri B (2016) The Importance of Thrombin in Cerebral Injury and Disease. *Int J Mol Sci.*, Jan 11;17(1). pii: E84.
- Kreuter J (2001) Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev.*, Mar 23;47(1):65-81.
- Kreuter J (2007) Nanoparticles - a historical perspective. *Int J Pharm.*, Feb 22;331(1):1-10.
- Kreuter J, Hekmatara T, Dreis S, Vogel T, Gelperina S & Langer K (2007) Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. *J. Control. Release.*, 118:54-58.
- Kreuter J, Ramge P, Petrov V, Hamm S, Gelperina SE, Engelhardt B, Alyautdin R, Von Briesen H & Begley DJ (2003) Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *Pharm Res.*, Mar;20(3):409-16.
- Kreuter J, Shamenkov D, Petrov V, Ramge P, Cychutek K, Koch-Brandt C & Alyautdin R (2002) Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J Drug Target.*, Jun;10(4):317-25.
- Kulkarni S & Feng S (2013) Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Pharmaceut. Res.*, 30, 2512-2522.
- Kumar B, Sandhyamani S, Nazeer S & Jayasree R (2015) Rapid and simple method of photobleaching to reduce background autofluorescence in lung tissue sections. *Indian J Biochem Biophys.*, Feb;52(1):107-10.
- Kumar R, Roy I, Ohulchanskyy TY, Vathy LA, Bergey EJ, Sajjad M & Prasad PN (2010) In vivo biodistribution and clearance studies using multimodal organically modified silica nanoparticles. *ACS Nano.*, Feb 23; 4(2):699-708.

- Kwon EJ, Skalak M, Lo Bu R & Bhatia SN (2016) Neuron-Targeted Nanoparticle for siRNA Delivery to Traumatic Brain Injuries. *ACS Nano*, 10, 7926-33.
- Larner S, Wang J, Goodman J, O'donoghue Altman M, Xin M & Wang K (2017) In Vitro Neurotoxicity Resulting from Exposure of Cultured Neural Cells to Several Types of Nanoparticles. *J Cell Death*, 10: 1179670717694523.
- Leite P, Pereira M & Granjeiro J (2015) Hazard effects of nanoparticles in central nervous system: Searching for biocompatible nanomaterials for drug delivery. *Toxicol In Vitro.* , Oct;29(7):1653-60.
- Lewandowsky M (1900) Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit. [On the cerebrospinal fluid]. *Z Klin Med.* , 40:480–494.
- Li H, Du J, Du X, Xu C, Sun C, Wang H, Cao Z, Yang X, Zhu Y, Nie S & Wang J (2016) Stimuli-responsive clustered nanoparticles for improved tumor penetration and therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA.* , Apr 12;113(15):4164-9.
- Li H, Tong Y, Bai L, Ye L, Zhong L, Duan X & Zhu Y (2018) Lactoferrin functionalized PEG-PLGA nanoparticles of shikonin for brain targeting therapy of glioma. *Int J Biol Macromol.* , Feb;107(Pt A):204-211
- Li Y, Pei Y, Zhang X, Gu Z, Zhou Z, Yuan W, Zhou J, Zhu J & Gao X (2001) PEGylated PLGA NPs as protein carriers: Synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J Control Release.*, Apr 2;71(2):203-11.
- Lighthall J (1988) Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J Neurotrauma.* , 5(1):1-15.
- Lin H, Yan Y, Maidana D, Bouzika P, Atik A, Matsumoto H, Miller J & Vavvas D (2016) Drug Delivery Nanoparticles: Toxicity Comparison in Retinal Pigment Epithelium and Retinal Vascular Endothelial Cells. *Semin Ophthalmol.* , 31(1-2): 1–9.
- Lin Y, Pan Y, Shi Y, Huang X, Jia N & Jiang JY (2012) Delivery of large molecules via poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles into the injured rat brain. *Nanotechnology*, 23, 165101.
- Liu J, Feng D, Zhang Y, Shang Y, Wu Y, Li X & Pei L (2015) Chloral Hydrate Preconditioning Protects Against Ischemic Stroke via Upregulating Annexin A1. *CNS Neurosci Ther.* , Sep;21(9):718-26.
- Liu Y-W, Li S & Dai S-S (2018) Neutrophils in traumatic brain injury (TBI): friend or foe? *J Neuroinflammation.* , 15: 146.
- Lockman P, Koziara J, Mumper R & Allen D (2004) Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *J Drug Target.* , 12(9-10):635-41.
- Logsdon AF, Lucke-Wold BP, Turner RC, Huber JD, Rosen CL & Simpkins JW (2015) Role of Microvascular Disruption in Brain Damage from Traumatic Brain Injury. *Compr Physiol*, 5, 1147-60.
- Long T, Tajuba J, Sama P, Saleh N, Swartz C, Parker J, Hester S, Lowry G & Veronesi B (2007) Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environ Health Perspect.* , Nov;115(11):1631-7.
- Luciano R, Battafarano G, Saracino R, Rossi M, Perrotta A, Manco M, Muraca M & Del Fattore A (2017) New Perspectives in Glioblastoma: Nanoparticles-based Approaches. *Curr Cancer Drug Targets.* , 17(3):203-220.
- Lunov O, Syrovets T, Loos C, Nienhaus GU, Mailänder V, Landfester K, Rouis M & Simmet T (2011) Amino-functionalized polystyrene nanoparticles activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages. *ACS Nano.* , Dec 27; 5(12):9648-57.
- Luther E, Petters C, Bulcke F, Kaltz A, Thiel K, Bickmeyer U & Dringen R (2013) Endocytotic uptake of iron oxide nanoparticles by cultured brain microglial cells. *Acta Biomater.* , Sep;9(9):8454-65.
- Lux F, Sancey L, Bianchi A, Crémillieux Y, Roux S & Tillement O (2015) Gadolinium-based nanoparticles for theranostic MRI-radiosensitization. *Nanomedicine (Lond).* , 10(11):1801-15.
- Ma X, Aravind A, Pfister B, Chandra N & Haorah J (2019) Animal Models of Traumatic Brain Injury and Assessment of Injury Severity. *Molecular Neurobiology*, 56:5332–5345.
- Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, Andelic N, Bell MJ, Belli A, Bragge P, Brazinova A, Büki A, Chesnut RM, Citerio G, Coburn M, Cooper DJ, Crowder AT, Czeiter E, Czosnyka M, Diaz-Arrastia R, Dreier JP, Duhaime AC, Ercole A, Van Essen TA, Feigin VL, Gao G, Giacino J & Gonzalez-Lara Le

- GR, Gupta D, Hartings Ja, Hill S, Jiang Jy, Ketharanathan N, Kompanje Ejo, Lanyon L, Laureys S, Lecky F, Levin H, Lingsma Hf, Maegele M, Majdan M, Manley G, Marsteller J, Mascia L, Mcfadyen C, Mondello S, Newcombe V, Palotie a, Parizel Pm, Peul W, Piercy J, Polinder S, Puybasset L, Rasmussen Te, Rossaint R, Smielewski P, Söderberg J, Stanworth Sj, Stein Mb, Von Steinbüchel N, Stewart W, Steyerberg Ew, Stocchetti N, Synnot a, Te Ao B, Tenovuo O, Theadom a, Tibboel D, Videtta W, Wang Kkw, Williams Wh, Wilson L, Yaffe K; Intbir Participants and Investigators. (2017) Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol.*, Dec;16(12):987-1048.
- Maciaczyk J KU, Döbrössy M , Nikkhah G (2016) Stereotactic Surgery in Rats. In: M J (ed.) *Experimental Neurosurgery in Animal Models*. New York.
- Madhusudanan P, Reade S & Shankarappa S (2017) Neuroglia as targets for drug delivery systems: A review. *Nanomedicine.* , Feb;13(2):667-679.
- Mangal S, Gao W, Li T & Zhou Q (2017) Pulmonary delivery of nanoparticle chemotherapy for the treatment of lung cancers: challenges and opportunities. *Acta Pharmacol Sin.* , Jun;38(6):782-797.
- Mann AP, Scodeller P, Hussain S, Joo J, Kwon E, Braun GB, Molder T, She ZG, Kotamraju VR, Ranscht B, Krajewski S, Teesalu T, Bhatia S, Sailor MJ & Ruoslahti E (2016) A peptide for targeted, systemic delivery of imaging and therapeutic compounds into acute brain injuries. *Nat Commun*, 7, 11980.
- Marmarou A, Foda M, Van Den Brink W, Campbell J, Kita H & Demetriadou K (1994) A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg.* , Feb;80(2):291-300.
- Marmarou A, Signoretti S, Fatouros PP, Portella G, Aygok GA & Bullock MR (2006) Predominance of cellular edema in traumatic brain swelling in patients with severe head injuries. *J Neurosurg.*, May;104(5):720-30.
- Masserini M (2013) Nanoparticles for brain drug delivery. *ISRN Biochem.* , May 21;2013:238428.
- Mcdonald SJ, Sun M & Agoston DV (2016) The effect of concomitant peripheral injury on traumatic brain injury pathobiology and outcome. *J Neuroinflammation* 13, 90.
- Mcintosh T, Noble L, Andrews B & Faden A (1987) Traumatic brain injury in the rat: characterization of a midline fluid-percussion model. . *Cent Nerv Syst Trauma.* , 4:119–134.
- Mcintosh T, Vink R, Noble L, Yamakami I, Fernyak S & Soares H (1989) Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. . *Neuroscience.*, 28:233–244
- Mead BP, Curley CT, Kim N, Negron K, Garrison WJ, Song J, Rao D, Miller GW, Mandell JW, Purow BW, Suk JS, Hanes J & Price RJ (2019) Focused Ultrasound Preconditioning for Augmented Nanoparticle Penetration and Efficacy in the Central Nervous System. *Small.* , Dec;15(49):e1903460
- Meng F, Wang J, Ping Q & Yeo Y (2018) Quantitative Assessment of Nanoparticle Biodistribution by Fluorescence Imaging, Revisited. *ACS Nano* 12, 6458–6468.
- Menon DK, Schwab K, Wright DW, Maas AI & Health. DaCaWGOTIaITCDEFROTBlaP (2010) Position statement: definition of traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil.*, Nov; 91(11):1637-40.
- Mishra M, Beaty C, Lesniak W, Kambhampati S, Zhang F, Wilson M, Blue M, Troncoso J, Kannan S, Johnston M, Baumgartner W & Kannan R (2014) Dendrimer brain uptake and targeted therapy for brain injury in a large animal model of hypothermic circulatory arrest. *ACS Nano.* , Mar 25;8(3):2134-47.
- Moghimi S, Hedeman H, Muir I, Illum L & Davis S (1993) An investigation of the filtration capacity and the fate of large filtered sterically-stabilized microspheres in rat spleen. *Biochim. Biophys. ACTA*, 1157, 233–240.
- Mokri B (2001) The Monro-Kellie hypothesis: applications in CSF volume depletion. *Neurology.* , Jun 26;56(12):1746-8.
- Monopoli M, Walczyk D, Campbell A, Elia G, Lynch I, Baldelli Bombelli F & Dawson K (2011) Physical-Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to in Vitro and in Vivo Biological Impacts of Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 8, 2525-2534.

- Moyano DF, Goldsmith M, Solfiell DJ, Landesman-Milo D, Miranda OR, Peer D & Rotello VM (2012) Nanoparticle hydrophobicity dictates immune response. *J Am Chem Soc.* , Mar 7; 134(9):3965-7.
- Musyanovych A & Landfester K (2014) Polymer micro- and nanocapsules as biological carriers with multifunctional properties. *Macromol Biosci.* , Apr;14(4):458-77.
- Musyanovych A, Schmitz-Wienke J, Mailander V, Walther P & Landfester K (2008) Preparation of biodegradable polymer nanoparticles by miniemulsion technique and their cell interactions. *Macromol Biosci*, 8, 127-39.
- Nag S & Begley DJ (2005) Blood-brain Barrier, exchange of metabolites an gases. In: Kalimo H (ed.) *Pathology and Genetics. Cerebrovascular Diseases*. Basel: ISN Neuropath. Press.
- Nag S, Manias JL & Stewart DJ (2009) Expression of endothelial phosphorylated caveolin-1 is increased in brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol.* , Aug;35(4):417-26.
- Nag S, Venugopalan R & Stewart DJ (2007) Increased caveolin-1 expression precedes decreased expression of occludin and claudin-5 during blood-brain barrier breakdown. *Acta Neuropathol.* , Nov;114(5):459-69.
- Nagayama S, Ogawara K, Fukuoka Y, Higaki K & Kimura T (2007) Time-dependent changes in opsonin amount associated on nanoparticles alter their hepatic uptake characteristics. *Int. J. Pharm.*, 342, 215–221.
- Nance E, Woodworth G, Sailor K, Shih T, Xu Q, Swaminathan G, Xiang D, Eberhart C & Hanes J (2012) A dense poly(ethylene glycol) coating improves penetration of large polymeric nanoparticles within brain tissue. *Sci Transl Med.*, Aug 29;4(149):149ra119.
- Nguyen VH & Lee BJ (2017) Protein corona: a new approach for nanomedicine design. *Int J Nanomedicine.* , Apr 18;12:3137-3151.
- Nicholas A, Mcinnis C, Gupta K, Snow W, Love D & Mason D (2002) The fate of biodegradable microspheres injected into rat brain. *Neurosci Lett*, 323, pp. 85-88.
- Ommaya AK, Grubb RLJ & Naumann RA (1971) Coup and contre-coup injury: observations on the mechanics of visible brain injuries in the rhesus monkey. *J Neurosurg.* , Nov;35(5):503-16.
- Orben T (2020) In-vitro Untersuchungen zur zellulären Aufnahme, Toxizität und Schrankenstörung eines bioabbaubaren Poly(L)-Laktid und eines nicht-bioabbaubaren Poly(perfluorodecylacrylat)-Nanopartikels an einem in-vitro Bluthirnschrankenmodell aus zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen und Astrozyten aus dem Schweinehirn. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Osier ND & Dixon CE (2016) The Controlled Cortical Impact Model: Applications, Considerations for Researchers, and Future Directions. *Front Neurol.* , 7:134
- Owens DR & Peppas N (2006) Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm.*, Jan 3;307(1):93-102.
- Paciotti G, Myer L, Weinreich D, Goia D, Pavel N, Mclaughlin R & Tamarkin L (2004) Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv.* , May-Jun;11(3):169-83.
- Palmer B & Delouise L (2016) Nanoparticle-Enabled Transdermal Drug Delivery Systems for Enhanced Dose Control and Tissue Targeting. *Molecules.* , Dec; 21(12): 1719.
- Pappius H (1981) Local cerebral glucose utilization in thermally traumatized rat brain. *Ann Neurol.*, 9:484-491.
- Park J, Utsumi T, Seo Y, Deng Y, Satoh A, Saltzman W & Iwakiri Y (2016) Cellular distribution of injected PLGA-nanoparticles in the liver. *Nanomedicine.* , Jul;12(5):1365-74.
- Parveen S & Sahoo S (2011) Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. *Eur J Pharmacol.* , Nov 30;670(2-3):372-83.
- Patel AA, Patel RJ & Patel SR (2018) Nanomedicine for Intranasal Delivery to Improve Brain Uptake. *Curr Drug Deliv.*, 15(4):461-469.
- Patel MM & Patel BM (2017) Crossing the Blood-Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain. *CNS Drugs.* , Feb;31(2):109-133.
- Paxinos G & Watson C (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, 6th Edition.

- Phipps H (2016) Systematic Review of Traumatic Brain Injury Animal Models. In: Kobeissy F, Dixon C, Hayes R & Mondello S (eds.) *Injury Models of the Central Nervous System. Methods in Molecular Biology* 1462. New York: Humana Press.
- Pinkernelle J, Calatayud P, Goya G, Fansa H & Keilhoff G (2012) Magnetic nanoparticles in primary neural cell cultures are mainly taken up by microglia. *BMC Neurosci* 13:32–48.
- Poupot R, Bergozza D & Fruchon S (2018) Nanoparticle-Based Strategies to Treat Neuro-Inflammation. *Materials (Basel)*. , Feb 9;11(2). pii: E270.
- Pourgholi F, Hajivalili M, Farhad JN, Kafil HS & Yousefi M (2016) Nanoparticles: Novel vehicles in treatment of Glioblastoma. *Biomed Pharmacother.* , Feb;77:98-107.
- Prabhakarandian B, Shen MC & Nichols JB (2013) SyM-BBB: A Microfluidic Blood Brain Barrier Model. *Lab Chi.* , 13:1093–1101.
- Prakash R & Carmichael ST (2015) Blood-brain barrier breakdown and neovascularization processes after stroke and traumatic brain injury. *Curr Opin Neurol.*, 28(6): 556–564.
- Pratsinis A, Hervella P, Leroux JC, Pratsinis SE & Sotiriou GA (2013) Toxicity of silver nanoparticles in macrophages. *Small.*, Aug 12;9(15):2576-84.
- Preston JE, Abbott NJ & Begley DJ (2014) Transcytosis of macromolecules at the blood-brain barrier. *Adv Pharmacol.* , 71:147-63.
- Pridgen E, Alexis F & Farokhzad O (2014) Polymeric Nanoparticle Technologies for Oral Drug Delivery. *Clin Gastroenterol Hepatol.* , Oct; 12(10): 1605–1610.
- Prinz M & Priller J (2017) The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nat Neurosci.* , Feb;20(2):136-144.
- Pulgar VM (2018) Transcytosis to Cross the Blood Brain Barrier, New Advancements and Challenges. *Front Neurosci.* , 12: 1019.
- Qin L, Wu X, Block M, Liu Y, Breese G, Hong J, Knapp D & Crews F (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia.* , 55(5):453–462.
- Raslan F, Albert-Weißenberger C, Ernestus R-I, Kleinschnitz C & Sirén A-L (2012) Focal brain trauma in the cryogenic lesion model in mice. *Exp Transl Stroke Med.* , 4: 6.
- Ravindran S, Suthar JK, Rokade R, Deshpande P, Singh P, Pratinidhi A, Khambadkhar R & Utekar S (2018) Pharmacokinetics, Metabolism, Distribution and Permeability of Nanomedicine. *Curr Drug Metab.* , 19(4):327-334.
- Reddy M & Labhasetwar V (2009) Nanoparticle-mediated delivery of superoxide dismutase to the brain: an effective strategy to reduce ischemia-reperfusion injury. *FASEB J.* , 23(5):1384 – 95.
- Rickels E (2018) 2. Epidemiologie des Schädel-Hirn-Traumas. In: Rickels E & Piek J (eds.) *Handbuch Schädel-Hirn-Trauma*. Berlin, Boston: De Gruyter.
- Rickels E, Von Wild K & Wenzlaff P (2010) Head injury in Germany: A population-based prospective study on epidemiology, causes, treatment, and outcome of all degrees of head-injury severity in two distinct areas. *Brain Inj.*, 24: 1491–1504.
- Rickels E, Von Wild K & Wenzlaff P (2011) [Treatment of traumatic brain injury in Germany]. *Unfallchirurg*, 114, 417-23.
- Ritz S, Schöttler S, Kotman N, Baier G, Musyanovych A, Kuharev J, Landfester K, Schild H, Jahn O, Tenzer S & Mailänder V (2015) Protein corona of nanoparticles: distinct proteins regulate the cellular uptake. *Biomacromolecules.* , Apr 13;16(4):1311-21.
- Rodrigues S, De Oliveira M, Martins J, Sannomiya P, De Cássia Tostes R, Nigro D, Carvalho M & Fortes Z (2006) Differential effects of chloral hydrate- and ketamine/xylazine-induced anesthesia by the s.c. route. *Life Sci.* , Sep 20;79(17):1630-7.
- Romine J, Gao X & Chen J (2014) Controlled Cortical Impact Model for Traumatic Brain Injury. *J. Vis. Exp.* (146), e59295., (90), e51781.
- Rosenberg GA (2009) Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol.* , Feb;8(2):205-16.
- Rosenfeld JV, Maas AI, Bragge P, Morganti-Kossmann MC, Manley GT & Gruen RL (2012) Early management of severe traumatic brain injury. *Lancet.* , Sep 22;380(9847):1088-98.

- 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. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 46, 255–263.
- Ruozi B, Belletti D, Sharma HS, Sharma A, Muresanu DF, Mossler H, Forni F, Vandelli MA & Tosi G (2015) PLGA Nanoparticles Loaded Cerebrolysin: Studies on Their Preparation and Investigation of the Effect of Storage and Serum Stability with Reference to Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol*, 52, 899-912.
- Saatman KE, Duhaime AC, Bullock R, Maas AI, Valadka A, Manley GT & Members. WSTaAP (2008) Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *J Neurotrauma.* , Jul;25(7):719-38.
- Saija A, Princi P, Trombetta D, Lanza M & De Pasquale A (1997) Changes in the permeability of the blood-brain barrier following sodium dodecyl sulphate administration in the rat. *Exp Brain Res.* , Jul;115(3):546-51.
- Saleem M, Stevens AM, Deal B, Liu L, Janjic J & Pollock JA (2019) A New Best Practice for Validating Tail Vein Injections in Rat with Near-infrared-Labeled Agents. *J. Vis. Exp.* (146), e59295.
- Salimi M, Sarkar S, Fathi S, Alizadeh A, Saber R, Moradi F & Delavari H (2018) Biodistribution, pharmacokinetics, and toxicity of dendrimer-coated iron oxide nanoparticles in BALB/c mice. *Int J Nanomedicine.*, Mar 13;13:1483-1493.
- Salvador-Morales C, Flahaut E, Sim E, Sloan J, Green M & Sim R (2006) Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol Immunol.* , Feb;43(3):193-201.
- Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L & Bernardino L (2016) Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J Control Release.* , Aug 10;235:34-47.
- Saucier-Sawyer JK, Deng Y, Seo YE, Cheng CJ, Zhang J, Quijano E & Saltzman WM (2015) Systemic delivery of blood-brain barrier-targeted polymeric nanoparticles enhances delivery to brain tissue. *J Drug Target*, 23, 736-49.
- Saxena V, Sadoqi M & Shao J (2006) Polymeric nanoparticulate delivery system for indocyanine green: Biodistribution in healthy mice. *Int J Pharm* 308:200–204.
- Schachtrup C, Ryu JK, Helmrick MJ, Vagena E, Galanakis DK, Degen JL, Margolis RU & Akassoglou K (2010) Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF-beta after vascular damage. *J Neurosci.* , Apr 28; 30(17):5843-54.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P & Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 676-682.
- Schwarzmaier SM, Kim SW, Trabold R & Plesnila N (2010) Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma.*, Jan;27(1):121-30.
- Schwarzmaier SM, Zimmermann R, McGarry NB, Trabold R, Kim SW & Plesnila N (2013) In vivo temporal and spatial profile of leukocyte adhesion and migration after experimental traumatic brain injury in mice. *J Neuroinflammation.* , Feb 28;10:32.
- Shalgunov V, Zaytseva-Zotova D, Zintchenko A, Levada T, Shilov Y, Andreyev D, Dzhumashev D, Metelkin E, Urusova A, Demin O, McDonnell K, Troiano G, Zale S & Safarova E (2017) Comprehensive study of the drug delivery properties of poly(l-lactide)-poly(ethylene glycol) nanoparticles in rats and tumor-bearing mice. *J Control Release.* , Sep 10;261:31-42.
- Shang D, Peng T, Gou S, Li Y, Wu H, Wang C & Yang Z (2016) High Mobility Group Box Protein 1 Boosts Endothelial Albumin Transcytosis through the RAGE/Src/Caveolin-1 Pathway. *Sci Rep.* , Aug 30;6:32180.
- Shapira Y, Shohami E, Sidi A, Soffer D, Freeman S & Cotev S (1988) Experimental closed head injury in rats: mechanical, pathophysiologic, and neurologic properties. *Crit Care Med* 16:258-265.
- Sharma H, Ali S, Hussain S, Schlager J & Sharma A (2009) Influence of Engineered Nanoparticles from Metals on the Blood-Brain Barrier Permeability, Cerebral Blood Flow, Brain Edema and

- Neurotoxicity. An Experimental Study in the Rat and Mice Using Biochemical and Morphological Approaches. *J Nanosci Nanotechnol.* , Aug;9(8):5055-72.
- Sharma H & Sharma A (2007) Nanoparticles aggravate heat stress induced cognitive deficits, blood-brain barrier disruption, edema formation and brain pathology. *Prog Brain Res.* , 162:245-73.
- Sharma S, Ifergan I, Kurz JE, Linsenmeier RA, Xu D, Cooper JG, Miller SD & Kessler JA (2020) Intravenous Immunomodulatory Nanoparticle Treatment for Traumatic Brain Injury. *Ann Neurol.* , Mar;87(3):442-455.
- Shityakov S, Salvador E, Pastorin G & Forster C (2015) Blood-brain barrier transport studies, aggregation, and molecular dynamics simulation of multiwalled carbon nanotube functionalized with fluorescein isothio-cyanate. *Nanomedicine (Lond).* 10:1703-13.
- Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D & Friedman A (2010) Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol*, 6, 393-403.
- Shohami E, Shapira Y & Cotev S (1988) Experimental closed head injury in rats: prostaglandin production in a noninjured zone. *Neurosurgery.*, 22:859-863.
- Shyam R, Ren Y, Lee J, Braunstein K, Mao H & Wong P (2015) Intraventricular Delivery of siRNA Nanoparticles to the Central Nervous System. *Mol Ther Nucleic Acids.* , May 12;4:e242.
- Silverman J & Muir WR (1993) A review of laboratory animal anesthesia with chloral hydrate and chloralose. *Lab Anim Sci.*, Jun;43(3):210-6.
- Simon L & Sabliov C (2014) The effect of nanoparticle properties, detection method, delivery route and animal model on poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles biodistribution in mice and rats. *Drug Metabolism Reviews*, 46:2, 128-141.
- Simpson J, Smith S, Thurecht K & Such G (2019) Engineered Polymeric Materials for Biological Applications: Overcoming Challenges of the Bio-Nano Interface. *Polymers* 11, 1441.
- Smith DH, Hicks R & Povlishock JT (2013) Therapy Development for Diffuse Axonal Injury. *J Neurotrauma.*, Mar 1; 30(5): 307–323.
- Snehalatha M, Venugopal K, Saha R, Babbar A & Sharma R (2008) Etoposide loaded PLGA and PCL nanoparticles II: biodistribution and pharmacokinetics after radiolabeling with Tc-99m. *Drug Deliv.* , Jun;15(5):277-87.
- So P, Ekonomou A, Galley K, Brody L, Sahuri-Arisoylu M, Rattray I, Cash D & Bell J (2019) Intraperitoneal delivery of acetate-encapsulated liposomal nanoparticles for neuroprotection of the penumbra in a rat model of ischemic stroke. *Int J Nanomedicine.* , Mar 18;14:1979-1991.
- Sonavane G, Tomoda K & Makino K (2008) Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids Surf B Biointerfaces.* , Oct 15;66(2):274-80. .
- Sorokin L (2010) The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol.* , Oct;10(10):712-23.
- Speiser PP (1991) Nanoparticles and liposomes: a state of the art. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* , Jun;13(5):337-42.
- Srinivasan B & Red A (2015) TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom.* , Apr; 20(2): 107–126.
- Su Y & Hu S (2018) Functional Nanoparticles for Tumor Penetration of Therapeutics. *Pharmaceutics.* , Oct 18;10(4). pii: E193.
- Sun W, Xie C, Wang H & Hu Y (2004) Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain. *Biomaterials.* , Jul;25(15):3065-71.
- Sun Z, Yathindranath V, Worden M, Thliveris J, Chu S, Parkinson F, Hegmann T & Miller D (2013) Characterization of cellular uptake and toxicity of aminosilane-coated iron oxide nanoparticles with different charges in central nervous system-relevant cell culture models. *Int J Nanomedicine.*, 8:961–970.
- Tahara K, Miyazaki Y, Kawashima Y, Kreuter J & Yamamoto H (2011) Brain targeting with surface-modified poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles delivered via carotid artery administration. *Eur J Pharm Biopharm.* , Jan;77(1):84-8.

- Takahashi T, Marushima A, Nagasaki Y, Hirayama A, Muroi A, Puentes S, Mujagic A, Ishikawa E & Matsumura A (2020) Novel neuroprotection using antioxidant nanoparticles in a mouse model of head trauma. *J Trauma Acute Care Surg.*, [Epub ahead of print].
- Teasdale G & Jennett B (1974) Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet.*, 2, 81-84.
- Teleanu D, Chircov C, Grumezescu A & Teleanu R (2019) Neurotoxicity of Nanomaterials: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials* 9, 96.
- Tenzen S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, Schlenk F, Fischer D, Kiouptsi K, Reinhardt C, Landfester K, Schild H, Maskos M, Knauer SK & Stauber RH (2013) Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol.*, Oct; 8(10):772-81.
- Terpolilli N & Plesnila N (2018a) 4. Pathophysiologie und Pathobiochemie. . In: Rickels E & Piek J (eds.) *Handbuch Schädel-Hirn-Trauma* Berlin, Boston: De Gruyter.
- Terpolilli NA & Plesnila N (2018b) 2. Epidemiologie des Schädel-Hirn-Traumas. In: Rickels E & Piek J (eds.) *Handbuch Schädel-Hirn-Trauma.* . Berlin, Boston.: De Gruyter.
- Thal SC & Neuhaus W (2014) The blood-brain barrier as a target in traumatic brain injury treatment. *Arch Med Res*, 45, 698-710.
- Thomsen MS, Routhe LJ & Moos T (2017) The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *J Cereb Blood Flow Metab.*, Oct;37(10):3300-3317.
- Tian X, Lin X, Wei F, Feng W, Huang Z & Wang P (2011) Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int J Nanomedicine.*, 6:445–452.
- Tosi G, Vergoni A, Ruozi B, Bondioli L, Badiali L, Rivasi F, Costantino L, Forni F & Vandelli M (2010) Sialic acid and glycopeptides conjugated PLGA nanoparticles for central nervous system targeting: In vivo pharmacological evidence and biodistribution. *J Control Release.*, Jul 1;145(1):49-57.
- Townsend S, Evrony G, Guc F, Schulze M, Brown JR & Langer R (2008) Tetanus toxin C fragment conjugated nanoparticles for targeted drug delivery to neurons. *Biomaterials* 28(34):5176-84.
- Trickler W, Lantz S, Murdock R, Schrand A, Robinson B, Newport G, Schlager J, Oldenburg S, Paule M, Slikker WJ, Hussain S & Ali S (2010) Silver nanoparticle induced blood-brain barrier inflammation and increased permeability in primary rat brain microvessel endothelial cells. *Toxicol Sci.*, Nov;118(1):160-70.
- Tröster S & Kreuter J (1992) Influence of the surface properties of low contact angle surfactants on the body distribution of 14C-poly(methyl methacrylate) nanoparticles. *J Microencapsul*, 9:19–28.
- Turner P, Brabb T, Pekow C & Vasbinder M (2011) Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci.*, Sep; 50(5): 600–613.
- Van Assema DM & Van Berckel BN (2016) Blood-Brain Barrier ABC-transporter P-glycoprotein in Alzheimer's Disease: Still a Suspect? *Curr Pharm Des.*, 22(38):5808-5816.
- Van Rooy I, Cakir-Tascioglu S, Hennink W, Storm G, Schiffelers R & Mastrobattista E (2011) In Vivo Methods to Study Uptake of Nanoparticles into the Brain. *Pharm Res* 28:456 – 471.
- Vergoni A, Tosi G, Tacchi R, Vandelli M, Bertolini A & Costantino L (2009) Nanoparticles as drug delivery agents specific for CNS: in vivo biodistribution. *Nanomedicine.*, Dec;5(4):369-77.
- Villaseñor R, Lampe J, Schwaninger M & Collin L (2019) Intracellular transport and regulation of transcytosis across the blood-brain barrier. *Cell Mol Life Sci.*, Mar;76(6):1081-1092.
- Villegas J, Álvarez-Montes L, Rodríguez-Fernández L, González J, Valiente R & Fanarraga M (2014) Multiwalled carbon nanotubes hinder microglia function interfering with cell migration and phagocytosis. *Adv Healthc Mater.*, Mar;3(3):424-32.
- Voigt N, Henrich-Noack P, Kockentiedt S, Hintz W, Tomas J & Sabel BA (2014a) Surfactants, not size or zeta-potential influence blood-brain barrier passage of polymeric nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.*, May;87(1):19-29.

- Voigt N, Henrich-Noack P, Kockentiedt S, Hintz W, Tomas J & Sabel BA (2014b) Toxicity of polymeric nanoparticles in vivo and in vitro. *J Nanopart Res*, 16.
- Walter J & Zweckberger K (2018) [Traumatic Injuries of the Central Nervous System]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, Oct;53(10):668-681.
- Walters R, Medintz I, Delehanty J, Stewart M, Susumu K, Huston A, Dawson P & Dawson G (2015) The Role of Negative Charge in the Delivery of Quantum Dots to Neurons. *ASN Neuro.* , Aug 3;7(4). pii: 1759091415592389.
- Wang J, Chen C, Liu Y, Jiao F, Li W, Lao F, Li Y, Li B, Ge C, Zhou G, Gao Y, Zhao Y & Chai Z (2008) Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases. *Toxicol Lett.* , Dec 15;183(1-3):72-80.
- Weiser T, Brenner M, Palluk R, Bechtel W, Ceci A, Brambilla A, Ensinger H, Sagrada A & Wienrich M (1999) BIR 561 CL: a novel combined antagonist of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors and voltage-dependent sodium channels with anticonvulsive and neuroprotective properties. *J Pharmacol Exp Ther.* , Jun;289(3):1343-9.
- Weiss C, Kohnle M, Landfester K, Hauk T, Fischer D, Schmitz-Wienke J & Mailänder V (2008) The first step into the brain: uptake of NIO-PBCA nanoparticles by endothelial cells in vitro and in vivo, and direct evidence for their blood-brain barrier permeation. *ChemMedChem.*, Sep;3(9):1395-403.
- Werner C & Engelhard K (2007) Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*, 99, 4-9.
- Wilson MH (2016) Monro-Kellie 2.0: The dynamic vascular and venous pathophysiological components of intracranial pressure. *J Cereb Blood Flow Metab.* , Aug;36(8):1338-50.
- Wolburg H & Lippoldt A (2002) Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol.* , Jun;38(6):323-37.
- Wolburg H, Noell S, Mack A, Wolburg-Buchholz K & Fallier-Becker P (2009) Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.* , Jan;335(1):75-96
- Wolfram J, Zhu M, Yang Y, Shen J, Gentile E, Paolino D, Fresta M, Nie G, Chen C, Shen H, Ferrari M & Zhao Y (2015) Safety of nanoparticles in medicine. *Curr Drug Targets.* , 16(14): 1671–1681.
- Wu P, Zhao H, Gou X, Wu X, Zhang S, Deng G & Chen Q (2019) Targeted delivery of polypeptide nanoparticle for treatment of traumatic brain injury. *Int J Nanomedicine.* , May 31;14:4059-4069.
- Wu T, Zhang T, Chen Y & Tang M (2016) Research advances on potential neurotoxicity of quantum dots. *J Appl Toxicol.*, Mar;36(3):345-51.
- Xiong Y, Mahmood A & Chopp M (2013) Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci.* , February; 14(2): 128–142.
- Xu G, Mahajan S, Roy I & Yong KT (2013) Theranostic quantum dots for crossing blood-brain barrier in vitro and providing therapy of HIV-associated encephalopathy. *Front Pharmacol.* , Nov 15;4:140.
- Xue Y, Wu J & Sun J (2012) Four types of inorganic nanoparticles stimulate the inflammatory reaction in brain microglia and damage neurons in vitro. *Toxicol Lett.*, Oct 17;214(2):91-8.
- Yang Y & Rosenberg GA (2011) MMP-mediated disruption of claudin-5 in the blood-brain barrier of rat brain after cerebral ischemia. *Methods Mol Biol.* , 762:333-45
- Yhee J, Im J & Nho R (2016) Advanced Therapeutic Strategies for Chronic Lung Disease Using Nanoparticle-Based Drug Delivery. *J Clin Med.* , Sep 20;5(9). pii: E82.
- Yoo D, Magsam AW, Kelly AM, Stayton PS, Kievit FM & Convertine AJ (2017) Core-Cross-Linked Nanoparticles Reduce Neuroinflammation and Improve Outcome in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *ACS Nano.* , Sep 26;11(9):8600-8611.
- Yuan Z, Hu Y & Gao J (2015) Brain Localization and Neurotoxicity Evaluation of Polysorbate 80-Modified Chitosan Nanoparticles in Rats. *PLoS One.* , Aug 6;10(8):e0134722.
- Zamproni LN, Mundim MV, Porcionatto MA & Des Rieux A (2017) Injection of SDF-1 loaded nanoparticles following traumatic brain injury stimulates neural stem cell recruitment. *Int J Pharm*, 519, 323-331.

- Ze Y, Zheng L, Zhao X, Gui S, Sang X, Su J, Guan N, Zhu L, Sheng L, Hu R, Cheng J, Cheng Z, Sun Q, Wang L & Hong F (2013) Molecular mechanism of titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative injury in the brain of mice. *Chemosphere*, Aug;92(9):1183-9.
- Zensi A, Begley D, Pontikis C, Legros C, Mihoreanu L & Wagner S (2009) Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. *J Control Release.*, 137(1):78 – 86.
- Zhang TT, Li W, Meng G, Wang P & Liao W (2016a) Strategies for transporting nanoparticles across the blood-brain barrier. *Biomater Sci.* , Feb;4(2):219-29.
- Zhang YN, Poon W, Tavares AJ, Mcgilvray ID & Chan WCW (2016b) Nanoparticle-liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *J Control Release*, 240, 332-348.
- Zhao Y, Song J & Zhang M (2014) Role of caveolin-1 in the biology of the blood-brain barrier. *Rev Neurosci.* , 25(2):247-54.
- Zweckberger K, Erös C, Zimmermann R, Kim SW, Engel D & Plesnila N (2006) Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice. *J Neurotrauma.* , Jul;23(7):1083-93.

---

## 8 Anhang

---

**Tabelle 10: Geräte und Instrumente**

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung, Hersteller</b>
Tierkäfige	Makrolon-Käfig Typ 4, Zoonlab; Castrop-Rauxel
Laborwaage	Scaltec SPO61, Labotec; Wiesbaden
Mikropipette	Rotilabo® TA21 und TA23, Carl Roth; Karlsruhe
Schermaschine	GT 104 favorita II, Aesculap; Tuttlingen
Wärmematte	Homeothermic Blanket Unit, Harvard Apparatus; Cambridge, UK
Präparationsschere, Pinzette, Nadelhalter, Dissektor, Overholtzklammern	Aesculap; Tuttlingen
Traumamaschine	Controlled Cortical Impact Device, L. Kopacz, Universitätsmedizin Mainz; Mainz
Operationsmikroskop	Zeiss OPMI pico, Carl Zeiss; Jena
Hochgeschwindigkeitsfräse	Microtron GD-850 DBP, Aesculap; Tuttlingen
Bohrkopf	GD890R, Aesculap; Tuttlingen
Stereotaktischer Rahmen	David Kopf Instruments; Tujunga, USA
Infrarot-Wärmelampe	Beurer IL11, Beurer; Ulm, DE
Färbekammer	Stain Tray, HA50.1, Carl Roth; Karlsruhe
Mikroskop	BZ-9000 Biorevo, Keyence; Osaka, JP
Objektiv 40x	Plan Apo x40 NA 0.95, Keyence; Osaka, JP
Objektträgerscanner	NanoZoomer 2.0 HT, Hamamatsu Photonics; Hamamatsu, JP
Kryostat	CM 1850 UV, Leica; Nussloch
Tiefkühlschrank -80°C	Heraeus Sepatech; Osterode

**Tabelle 11: Chemikalien, Medikamente und Lösungen**

<b>Substanz</b>	<b>Bezeichnung, Hersteller</b>
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1X, Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
Isofluran	Forene® 100% (v/v), AbbVie; Wiesbaden
Chloralhydrat	36 mg/ml, Apotheke der Universitätsmedizin Mainz; Mainz
Wasser zu Injektionszwecken	Aqua ad injectabilia, B. Braun; Tuttlingen
Augensalbe	Corneregel®, Dr. Mann Pharma; Berlin
Wund- und Schleimhautantiseptikum	Octenisept® farblos, Schülke&Mayr; Norderstedt
Wasserstoffperoxid 3%	Carl Roth; Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30%	Hedinger; Stuttgart
Gewebekleber	Histoacryl®, B. Braun; Melsungen
Tramadol	Tramadol-ratiopharm®100mg/mlTropfen, ratiopharm; Ulm
PBST	1000ml PBS + 3ml Triton X 100
Triton X 100	Merck Millipore; Burlington, USA
BSA	Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
Normalserum	Normal donkey serum, Sigma-Aldrich; St. Louis, USA Normal horse serum, Vector Laboratories; Burlingame, USA Normal rabbit serum, Vector Laboratories; Burlingame, USA
Eindeckmedium (IF)	IS Mounting Medium DAPI, Dianova; Hamburg
Eindeckmedium (IHC)	Eukitt®, ORSAtec; Bobingen
Avidin-Biotin-Komplex	Vectastain® ABC-Kit (HRP), Vector Laboratories; Burlingame, USA
DAB-Kit	DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit SK 4100, Vector Laboratories; Burlingame, USA
Isopropanol 99,9%	Hedinger; Stuttgart
Methanol 99,9%	Carl Roth; Karlsruhe
Ethanol 70%, vergällt	Carl Roth; Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA) 4%	Carl Roth; Karlsruhe
Xylol 98%	Carl Roth; Karlsruhe

Vollelektrolytlösung	Sterofundin® ISO, B. Braun; Melsungen
Trockeneis	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz; Mainz
Isopentan (2-Methylbutan)	Carl Roth; Karlsruhe

**Tabelle 12: Antikörper**

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
<b>Primärantikörper</b>		
Mouse Anti-NeuN (MAB377)	1:100	Merck Millipore; Burlington, USA
Mouse Anti-GFAP (556328)	1:100	BD Pharmingen; San Diego, USA
Mouse Anti-Iba1 (sc-32725)	1:200	Santa Cruz Biotechnology; Dallas, USA
Mouse Anti-CD 31 (ab24590)	1:10	Abcam; Cambridge, UK
Mouse Anti-GFAP (556327)	1:200	BD Pharmingen, San Diego, USA
Mouse Anti-TNF $\alpha$ (ab1793)	1:50	Abcam; Cambridge, UK
Goat Anti-Iba1 (sc-28528)	1:100	Santa Cruz Biotechnology; Dallas, USA
Goat Anti-IL1 $\beta$ (ab9787)	1:50	Abcam; Cambridge, UK
<b>Sekundärantikörper</b>		
Alexa Fluor® 546 donkey anti-mouse	1:500	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Mouse-IgG Vectastain® Elite® ABC-Kit (PK 6102)	1:100	Vector Laboratories; Burlingame, USA
Goat-IgG Vectastain® Elite® ABC-Kit (PK 6105)	1:100	Vector Laboratories; Burlingame, USA

**Tabelle 13: Nanopartikel**

Partikel	Polymer	Tensid	Farbstoff
PLLA-SDS	Poly(L-lactid)	Natriumdodecylsulfat	PMI
PLLA-Tw	Poly(L-lactid)	Polysorbat 80	PMI
PFDL-SDS	Poly(perfluorodecylacrylat)	Natriumdodecylsulfat	PMI
PFDL-Tw	Poly(perfluorodecylacrylat)	Polysorbat 80	PMI

**Tabelle 14: Verbrauchsmaterial**

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung, Hersteller</b>
Tierfutter	Altromin Standard Diät, Altromin Spezialfutter; Lage
Reaktionsgefäße	Rotilabo® Reaktionsgefäße schwarz, 1,5 ml, Carl Roth; Karlsruhe
Pipettenspitzen	10 ul und 100 ul, Carl Roth, Karlsruhe
Einmalspritze 1 ml	Injekt® F Tuberkulin, B. Braun; Melsungen, DE
Einmalspritze 5ml	Injekt® 5 ml, B. Braun; Melsungen
Kompresse 10x10 cm	B. Braun; Melsungen
Injektionskanüle	Sterican® G 23, B.Braun; Melsungen
Einmalskalpell	Feather Disposable Scalpel No. 23, Feather Safety Razor; Osaka, JP
Nahtmaterial	Prolene 4-0, Ethicon; Norderstedt
Deckgläser	Cover Slips no. 1, Waldemar Knittel; Braunschweig
Präparatemappen	Carl Roth; Karlsruhe
Infusionssystem	Intrafix® Primeline, B. Braun; Melsungen, DE
Venenverweilkatheter	Klinijekt®, 26G, Klinika Medical; Usingen, DE
Dreiwegehahn	B.Braun; Melsungen
Aluminiumfolie	Carl Roth; Karlsruhe
Klarsichtbeutel	Carl Roth; Karlsruhe
Mikrotomklingen	Microtome Blades C35 Type, Feather Safety Razor; Osaka, JP
Einbettmedium	Tissue-Tek® O.C.T. Compund, Sakura Finetek; Staufen im Breisgau
Objektträger	Superfrost Plus, Gerhard Menzel; Braunschweig
Objektträgerkästen	Rotilabo® Objektträgerkasten, Carl Roth; Karlsruhe

**Tabelle 15: Software**

<b>Programm</b>	<b>Bezeichnung, Hersteller</b>
Bildbearbeitungssoftware	NDPView 2.5.19, Hamamatsu Photonics; Hamamatsu, JP
Bildanalysesoftware	ImageJ 1.52n (Schindelin et al., 2012), NIH; Bethesda, USA
Tabellenkalkulationssoftware	Microsoft Excel 2019, Microsoft Corporation; Redmond, USA
Statistiksoftware	SigmaPlot 12.5, Systat Software; San Jose, USA

---

## **9 Danksagung**

---



---

## 10 Lebenslauf

---

