

Aus dem
CharitéCentrum für Grundlagenmedizin (CC 02)
Fächerverbund Anatomie
Institut für Zell- und Neurobiologie
Direktor: Prof. Dr. Victor Tarabykin

Habilitationsschrift

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Neurochirurgie
vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Jana Glumm
geboren in Eilenburg

Eingereicht: 03/2023

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim Spranger

1. Gutachter/in: Prof. Dr. Eike Budinger

2. Gutachter/in: Prof. Dr. Dominik von Elverfeldt

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einführung in die Thematik.....	5
1.1. spinale Läsionsmodelle	6
1.2. Interneurone	7
1.3. Nanopartikel	7
2. Zusammenfassung der eigenen Arbeiten	11
2.1. Ein neues Modell neuronaler Regeneration im ZNS	11
2.2. Interneurone in unserem Modell.....	26
2.3. Einfluss von SPIO in Mono- und Kokulturen	29
2.4. Einfluss von SPIO in organotypischen Schnittkulturen.....	48
2.5. Aus dem Blut abstammende Monozyten in der neuronalen Regeneration	65
3. Diskussion	72
4. Zusammenfassung	82
Literaturverzeichnis	84
Danksagung	89
Erklärung	90

Abkürzungsverzeichnis

C3 bot	C3 Transferase von Clostridium botulinum
CA3	Cornu Ammonis)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
DMDP	Dichlormethylendiphosphonische Salz (Dichloromethylenediphosphonic acid disodium salt)
ECM	extrazellulärer Matrix (extracellular matrix)
FDA	Food and Drug Administration
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor)
IL	Interleukin
MCP	Monozyten Chemoattraktionsprotein
mM	Millimol
MPS	magnetische Partikelspektroskopie
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
nm	Nanometer
NT-3	Neurotrophin-3
OHSC	organotypische hippocampale Schnittkulturen (organotypic hippocampal slice cultures)
Pvalb-GFP	Parvalbumin Promotor-GFP
PFA	Paraformaldehyd
RM	Rückenmark
SPIO	superparamagnetische eisenoxidhaltige Nanopartikel

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

TNF Tumor Nekrose Faktor

VSOP very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles

ZNS zentrales Nervensystem

1. Einführung in die Thematik

Das zentrale Nervensystem (ZNS) ist ein stark spezialisiertes Organ mit hochgradig differenziertem neuronalem Gewebe aus schlecht regenerationsfähigen, postmitotischen Zellen. Die Anzahl vorhandener Stammzellen ist gering und auf den Gyrus dentatus sowie die subventrikuläre Zone zur Regeneration von olfaktorischen Neuronen beschränkt (Bjorklund & Lindvall, 2000). Die traumatische Rückenmarkläsion ist, wie andere Läsionen im ZNS, gekennzeichnet durch einen primären, sofortigen, irreversiblen Verlust von Zellen und Nervenfasern im Bereich der Läsionszone. Stunden später kommt es zu einem sekundär auftretenden Zelltod umliegender Areale, welcher den primären Zelltod bei weitem übertrifft und für den zu erwartenden Funktionsverlust viel schwerwiegender ist (Bechmann et al., 2005). Wir wissen, dass neuronales Wachstum und Regeneration ein komplexes Zusammenspiel von intra- und extrazellulären Molekülen wie Wachstumsfaktoren, Neurotransmittern und extrazellulärer Matrix (ECM) Proteine benötigt (O'Donnell et al., 2009). Obwohl unser Wissen bezüglich der zugrunde liegenden Mechanismen ständig zunimmt, gibt es immer noch keine effektive Therapie nach einer Querschnittslähmung (Filli & Schwab, 2012), weder um durchtrennte Bahnen wieder herzustellen, die entstehende Narbe zu hemmen oder den sekundär auftretenden Schaden zu minimieren, welcher prinzipiell reversibel sein sollte (Peng et al., 2009). Ein durchtrennter kortikospinaler Trakt im Rückenmark (RM) resultiert in der Querschnittslähmung des Patienten mit all seinen psychologischen, ökonomischen und lebensverändernden Folgen.

1.1. spinale Läsionsmodelle

Es existieren zurzeit unterschiedliche spinale Läsionsmodelle *in vivo*, die aufgrund Ihrer Komplexität die Vergleichbarkeit und Anwendung ihrer Forschungsergebnisse erschweren (Steward et al., 2003). *In vitro* Untersuchungen einzelner Zelllinien sind allenfalls begrenzt anwendbar, da das entscheidende Mikroumfeld nicht mehr vorhanden ist (Bonnici & Kapfhammer 2009). Erst mit der Entwicklung von organotypischen Schnittkulturen, beginnend mit der organotypischen Monolayer Kultur (Gahwiler 1981), wurde es möglich die unmittelbare Umgebung der lädierten Fasern zu untersuchen. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist, dass die Zytoarchitektur des Gewebes erhalten bleibt und somit Moleküle und Komponenten der extrazellulären Matrix weiterhin ihre Wirkung entfalten können (Bonnici & Kapfhammer 2008). Im Allgemeinen werden heutzutage sowohl spinale als auch hippocampale Läsionsmodelle verwendet, um neuronale Regeneration *in vitro* zu untersuchen (Bonnici & Kapfhammer 2008, del Rio & Soriano 2010, Oishi et al., 2004, Stavridis et al., 2009).

Bei allen bisher existierenden Modellen zur Untersuchung spinaler Regeneration *in vitro* ist die Verfolgung der einwachsenden Neurone des Motorkortex erschwert, da diese nicht von den Rückenmarksneuronen unterschieden werden können. Vielfach wird deshalb die Methode des Tracings zur Darstellung einwachsender Fasern angewandt, wie zum Beispiel im Kokulturmodell des sensomotorischen Kortex mit Rückenmarkschnitten in der Ratte (Stavridis et al., 2009). Die Aufnahme des Tracers ist jedoch nur unregelmäßig, so dass hierdurch keinesfalls sämtliche auswachsende axonale Fasern darstellbar sind und somit die Interpretation des Behandlungserfolges zur Erhöhung des Aussprossens erschweren sowie die Bildung aller spezifischen synaptischen Kontakte schwieriger nach zu verfolgen sind. Mit einem Modell was diese Möglichkeiten verbessert befasst sich die erste Arbeit (P1).

1.2. Interneurone

Die Regeneration nach spinaler Läsion ist nur möglich, wenn drei wesentliche Schritte erfüllt sind: die Reduktion behindernder intrinsischer Faktoren (wie zum Beispiel die Zusammensetzung der ECM), der Aufbau neuer spinaler Netzwerke und die Unterstützung dieser sich entwickelnden Netzwerke (Dru & Hoh 2015). Hierbei spielen Interneurone eine entscheidende Rolle (Chédotal 2014), deren Einfluss auf die Erholung nach inkompletter Querschnittlähmung lange bekannt ist (Flynn et al., 2011) und bereits klinisch erfolgreich Anwendung findet (Angeli et al., 2014). Interneurone unterhalb der Läsion sind weiterhin mit den α -Motoneuronen zur Ansteuerung der Muskulatur verbunden; wenn es gelingt wiederaussprossende Neurone zu Konnektionen mit diesen Interneuronen zu veranlassen, könnten diese im Sinne eines Nerveninterponates motorischen Funktionen ermöglichen. Mit unserem Modell lassen sich Interneurone sehr gut untersuchen (P2).

1.3. Nanopartikel

Mit dem Beginn der Herstellung von Nanopartikeln in den 80iger Jahren begann ihre zunehmende Verbreitung. Nanopartikel werden seit Jahren eingesetzt um die Qualität im Essen, in pharmazeutischen Produkten und in Kosmetika zu erhöhen, wie zum Beispiel in Zahnpasta (Carrouel et al., 2020). Selbstverständlich haben Nanopartikel auch Eingang in medizinische Bereiche gefunden. Insbesondere die heutzutage nahezu jedem bekannten mRNA (Boten-Ribonukleinsäure) Impfstoffe gegen COVID-19 basieren auf einer Technik Lipid-ummantelter Nanopartikel als Träger der mRNA (Thi et al., 2021). Insbesondere das hohe Potential kleiner superparamagnetischer eisenoxidhaltiger Nanopartikel (SPIO, superparamagnetic ironoxide nanoparticles) in den Grundlagenwissenschaften als auch für diagnostische und therapeutische medizini-

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

sche Zwecke konnte zu Beginn niemand erahnen. Aktuell werden SPIO für die Markierung und Verfolgung von Zellen in vivo verwendet (Li et al., 2013), als Transporter für Medikamente oder Gensequenzen (Wahajuddin & Arora, 2012), in der Tumorbekämpfung mittels magnetischer Hyperthermie (Mahmoud & Hadjipanayis, 2014) und in der neuronalen Regeneration (Riggio et al., 2014). Aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften wurden SPIO auch bald als Kontrastmittel in der Bildgebung erprobt.

SPIO haben eine Größe bis 150 nm. SPIO über 100 nm werden nach intravenöser Injektion von Makrophagen erkannt und hauptsächlich in der Leber eliminiert (Ittrich, Peldschus, Raabe, Kaul, & Adam, 2013). Im Gegensatz dazu können SPIO kleiner als 50 nm den Makrophagen entkommen und weisen eine deutlich höhere Halbwertszeit im Blut auf (Roohi et al., 2012). SPIO bestehen aus einem kristallinen eisenhaltigen Kern aus Magnetit (Fe_3O_4) und Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Aufgrund ihrer geringen Größe entwickeln SPIO superparamagnetische Eigenschaften. Dies bedeutet, dass sie nur unter dem Einfluss eines externen magnetischen Feldes magnetische Eigenschaften haben und diese nach Beendigung des magnetischen Feldes wieder verlieren (Hendrick & Haacke 1993, Di Marco et al., 2007). Um SPIO als Kontrastmittel in der MRT (Magnetresonanztomographie) verwenden zu können, jedoch gleichzeitig Interaktionen des bioaktiven Eisenkerns mit dem Blutplasma zu verhindern, müssen sie in ein biokompatibles Oberflächenmaterial gehüllt werden. Dies sind zum einen die sterische Stabilisierung mittels einer Hülle aus Polymeren wie z.B. Dextran, Albumin oder Polyethylenglykol sowie zum anderen elektrostatisch stabilisierte Nanopartikel, welche monomer mit einer Citrat- oder Dimercaptosuccinathülle beschichtet werden (Wang et al., 2001, Taupitz et al., 2003, Gupta & Gupta 2005). Neben der Größe bestimmt ebenfalls das Hüllmaterial sowie integrierte Liganden, wie zum Beispiel Antikörper, die pharmakokinetischen Eigenschaften. Es gibt aktuell nur wenige

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

durch die Food and Drug Administration (FDA) der Vereinigten Staaten von Amerika für den Einsatz am Menschen zugelassene SPIO. Beispielhaft genannt seien hier Ferucarbotran, welches als leberspezifische Kontrastmittel zugelassen ist, sowie Ferumoxytol, welches für die Behandlung von Eisenmangelanämien bei chronischer Niereninsuffizienz eingesetzt wird (Anselmo & Mitragotri 2019). Letzteres wird allerdings auch im off-label use z.B. in der MRT zur Darstellung von Hirntumoren eingesetzt (Thomson et al., 2012).

Selbstverständlich haben sich die medizinischen Einsatzmöglichkeiten der SPIO ebenfalls mit der Verbesserung der Regeneration nach spinalem Trauma befasst. Hier konnte gezeigt werden, dass die auswachsenden Fasern auf molekularer Ebene beeinflusst werden können (Polak & Shefi, 2015). Die Beeinflussungsmöglichkeiten sind vielfältig und erstrecken sich von der neuronalen Differenzierung, auf das Überleben der Neurone, über die Förderung des Wachstums bis zur Regulation elektrischer Aktivität (Polak & Shefi, 2015). Insbesondere die Möglichkeit, sich die magnetischen Eigenschaften der Nanopartikel zu Nutze zu machen steht hierbei im Vordergrund. Das axonale Wachstum wird durch die Filopodien, föhlerartigen Ausstülpungen des Wachstumskegels, bestimmt. Diese reagieren unter anderem auf mechanische Zugkraft und molekulare Wachstumsfaktoren. Eine Akkumulation von SPIO in den Filopodien von primären, retinalen Ganglienzellen konnte nach Anlage eines externen magnetischen Feldes ein gezieltes, paralleles Wachstum der Filopodien in Richtung des Magneten auslösen, während nach Ausschalten desselbigen das Wachstum stoppte bzw. ungerichtet war (Pita-Thomas et al., 2015). Zusätzlich ließ sich auch durch Erhöhung der Zugkraft im Sinne eines stärkeren magnetischen Feldes die Wachstumsrate erhöhen bzw. durch Verringerung des magnetischen Feldes reduzieren (Pita-Thomas et al., 2015). Dieses gezielte Wachstum birgt ein ungeheu-

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

res Potential um die wiederaussprossenden Axone nach einer Querschnittlähmung gezielt um die entstandene Narbe zu dirigieren.

Dennoch muss man sich frühzeitig mit der Frage befassen, was mit den SPIO passiert, welche Abbauprozesse sie durchlaufen und welche potenziellen zytotoxischen Effekte diese auslösen können. In der Literatur wird der Einfluss der SPIO kontrovers diskutiert. Zum einen gibt es eine nicht unerhebliche Anzahl von Publikationen die keine zytotoxischen Effekte von SPIO zum Beispiel auf mesenchymale (Hsiao et al., 2007), neuronale (Guzman et al., 2007) oder embryonale Mäusestammzellen (Arai et al., 2006) gefunden haben. Zum anderen gibt es jedoch vor allem in aktuellen Publikationen Hinweise darauf, dass die SPIO doch negative Einflüsse haben. So kann zum Beispiel auch das von uns weiter untersuchte Ferucarbotran die Proliferation von neuronalen Progenitorzellen verringern, das Zytoskelett als auch die Ausdifferenzierung beeinflussen (Soenen et al., 2010).

Zusätzlich entscheidet ebenfalls die Größe der SPIO und deren Hüllmaterial die Blutkinetik (Roohi et al., 2012). Die Integrität und Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke wird durch die Oberflächenladung verändert und herabgesetzt (Lockman et al., 2004). Auch wenn bei den SPIO der eisenhaltige Kern gewählt wurde, da Eisen im menschlichen Körper vorkommt, ist dennoch bekannt, dass zu hohe Eisenablagerungen die Neurodegeneration erhöhen (Andersen et al., 2014) und die mitochondrialen Funktionen negativ beeinflussen können (Urrutia et al., 2014).

Insgesamt jedoch sind die Auswirkungen von Nanopartikeln, insbesondere bei ihrer breiten Verwendung auf neuronale Strukturen, nicht ausreichend untersucht. Zusätzlich fehlen weitere Hintergrundinformationen, um ihr volles Potential, zur gezielten Steuerung des neuronalen Auswachsens, einsetzen zu können. Deshalb haben wir in unseren nächsten Studien diese Auswirkungen näher untersucht (P3, P4 und P5).

2. Zusammenfassung der eigenen Arbeiten

2.1. Ein neues Modell neuronaler Regeneration im ZNS

Durch die Verwendung von heterozygoten Bl6.GFP-Mäusen, die GFP (grün fluoreszierendes Protein) unter der Kontrolle des β -Actin Promoters in allen Zellen exprimieren, war es uns erstmals möglich, sämtliche einwachsende Nervenfasern in das Wildtyp-RM zu erkennen. Hierzu wurden aus postnatalen, ein bis drei Tage alten Babymäusen der Motorcortex extrahiert und in 300 μ m dicken Schnitten im Zellkulturmedium mit einer semipermeablen Membran kultiviert. Anschließend wurde ebenfalls ein bis drei Tage alten C57BL/6 Babymäusen das zervikale RM entnommen und ebenfalls 300 μ m dicken longitudinale Schnitte präpariert und auf die semipermeable Membran transferiert. Wir konnten zeigen, dass der grünfluoreszierende kortikospinale Trakt in das zervikale RM bereits nach einem Tag spezifisch einwuchs. Durch Aufnahmen alle 20 Minuten für zwölf Stunden konnten wir das Wachstum gut mitverfolgen. Diese Fasern bilden funktionierende synaptische Kontakte. Dies konnten wir zum einen mittels Immunfluoreszenz durch die Kolo-kalisation von prä- und post-synaptischen Kontakten darstellen und zum anderen elektrophysiologisch, durch Nachweis eines Calciumflusses in postsynaptischen Wildtyp-Neuronen des zervikalen RM nach Stimulation im GFP Motorcortex. Außerdem lassen sich durch dieses neu entwickelte Modell auch erstmals alle einwandernden Zellen detektieren, da diese ebenfalls das GFP exprimieren. Diese Zellen haben wir begonnen zu untersuchen und konnten zeigen, dass es sich hierbei teilweise um neuronale Vorläuferzellen handelt, welche einige Zeit nach dem Eindringen in das RM weiter ausreifen. Zusätzlich validierten wir unser Modell mit Neurotrophin-3 (NT-3) und C3 Transferase von Clostridium botulinum (C3 bot). Sowohl NT-3 (Oishi et al., 2004) als auch C3 bot (Schnell et al., 1994) sind etablierte Substanzen für die Erhöhung der neuronalen Regeneration.

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

Auch mit unserem Modell zeigte sich ein vermehrtes Auswachsen von Fasern des kortikospinalen Traktes in das Wildtyp-RM und entspricht somit den Erwartungen. Folglich hat unser neu entwickeltes Modell außerordentliches Potential zahlreiche Modulatoren der Beeinflussung des neuronalen Wachstums besser zu beurteilen. Aufgrund der Einfachheit unseres Modells können selbstverständlich auch neue, potenziell wirksame Substanzen, schnell und effizient getestet werden. Insbesondere da sich in dem von uns entwickelten Kokulturmodell neue, funktionsfähige Synapsen nachweisen lassen, ist es geeignet, den Einfluss von Nanopartikeln zu untersuchen, da diese in den Synapsen akkumulieren.

Eigene Publikation:

P1 Pohland M, Glumm R, Stoenica L, Höltje M, Kiwit J, Ahnert-Hilger G, Strauss U, Bräuer AU, Paul F, **Glumm J**. Studying Axonal Outgrowth and Regeneration of the Corticospinal Tract in Organotypic Slice Cultures. J Neurotrauma. 2015 Oct 1;32(19):1465-77

DOI: [10.1089/neu.2014.3467](https://doi.org/10.1089/neu.2014.3467)

2.2. Interneurone in unserem Modell

Anschließend wollten wir die einwachsenden Zellen in unserem Modell näher charakterisieren und insbesondere herauszufinden, ob auch Interneurone einwandern. Hierfür haben wir zwei Herangehensweisen gewählt. Als erstes konnten wir mit transgenen GFP unter dem Parvalbumin Promotor (Pvalb-GFP) exprimierenden Mäusen zeigen, dass Pvalb-EGFP positive Interneurone bis zu 300µm in das Wildtyp Rückenmark einwachsen. Die so delektierten Zellen zeigten einen typischen Zellkörper und viele Dendriten. Des Weiteren identifizierten wir die Interneurone mittels zusätzlicher immunhistologischen Färbungen. Mittels einer Dreifachfärbung konnten wir die Interneurone eindeutig identifizieren. Somit konnten wir mit Hilfe unseres neuen Modells zeigen, dass auch GFP positive Interneurone in das Wildtyp RM einwachsen. Zusammenfassend ist die gezielte Erforschung der spinalen Interneurone und deren gezielte Beeinflussung mit unserem Modell exemplarisch durchführbar.

Eigene Publikation:

P2 Pohland M, **Glumm J**. Propriospinal interneurons in the spotlight for anatomical and functional recovery after spinal cord injury. Neural Regen Res. 2015 Nov;10(11):1737-8.

DOI: [10.4103/1673-5374.170295](https://doi.org/10.4103/1673-5374.170295)

2.3. Einfluss von SPIO in Mono- und Kokulturen

Um den Einfluss von SPIO genauer zu untersuchen, haben wir die klinisch relevanten Ferumoxytol und Ferucarbotran mit den VSOP (very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles, sehr kleinen superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln) verglichen.

Für unsere Zellkulturen wurden null bis zwei Tage alten C57BL/6 Babymäuse verwendet und die Präparationen nach Standardprotokollen durchgeführt (Velmans et al., 2013). Wir konnten anhand immunzytochemischer Färbungen und anschließender fluoreszenzmikroskopischer Auswertung nachweisen, dass es in Abhängigkeit von der Komposition, d.h. Größe, Beschichtung und Oberflächenladung sowie der Konzentration zu morphologischen Veränderungen von Mikroglia und Neuronen aus Monokulturen kommt. Mikroglia transformierten nach Nanopartikelaufnahme zu einer amöboiden Form und wurden demnach aktiviert. Nach Berliner Blau Färbung zur Visualisierung der Eisenoxid-Nanopartikel wurde deutlich, dass Mikroglia bestimmte Partikel bevorzugt aufnehmen bzw. extrazellulär binden. Dies korrelierte mit der Anzahl der mittels Propidiumiodid-Färbung quantifizierter toter Zellen. Hierbei gab es Unterschiede bei den verwendeten Nanopartikeln, so wurde zum Beispiel Ferumoxytol kaum von den Mikroglia aufgenommen und hatte folglich kaum Auswirkung auf deren Vitalität. Wir konnten dennoch gravierende Auswirkungen auf die Morphologie dieser Mikroglia nachweisen.

Neurone aus Monokulturen zeigten, in einer aufwendigen Sholl-Analyse von insgesamt 750 Neuronen, infolge der Nanopartikel-Exposition eine reduzierte Zahl an neuronalen Fortsätzen sowie deutliche Degenerationserscheinungen. Letztere insbesondere bei hohen Partikelkonzentrationen von 3.0 mM und zwar bei allen verwendeten Nanopartikeltypen. Dies entspricht erwarteten negativen Auswirkungen der al-

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

leinigem Exposition von Neuronen mit SPIO ohne schützende phagozytierende Zellen. Interessanterweise konnten wir bei Neuronen von Neuron-Glia Co-Kulturen feststellen, dass es in Abhängigkeit von der Konzentration und des Partikeltyps teilweise gegenteilige Effekte gab. So verhinderte die anwesenden Mikrogliazellen nicht nur das Absterben der Neurone aufgrund der SPIO Exposition, sondern die Nanopartikel schienen die neuronale Regeneration zu unterstützen. Unter bestimmten Inkubationsbedingungen kam es bei Anwesenheit von Nanopartikeln zu einem verstärkten Auswachsen neuronaler Fortsätze sowie einer deutlich verminderten Degeneration. So kam es bei hohen Konzentrationen von VSOP-R2 zu einem deutlich gesteigerten Auswachsen der Neuriten im Vergleich zu Kontrollen ohne Nanopartikelexposition. Mit weiterführenden Zytokin- und Chemokinanalysen zum besseren Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen haben wir begonnen; die vorläufigen Ergebnisse lassen auf eine starke Abhängigkeit vom physiologischen System schließen.

Eigene Publikation:

P3 Neubert J, Wagner S, Kiwit J, Bräuer AU*, **Glumm J***. New findings about iron oxide nanoparticles and their different effects on murine primary brain cells. Int J Nanomedicine. 2015 Mar 13;10:2033-49.

DOI: [10.2147/IJN.S74404](https://doi.org/10.2147/IJN.S74404)

2.4. Einfluss von SPIO in organotypischen Schnittkulturen

Wir haben die OHSC nach etablierten Protokollen (Stoppini et al., 1991) mit null bis drei Tage alten C57 B6/J Babymäusen hergestellt. Nach Präparation der OHSC wurden diese zunächst eine Woche in Kultur ohne weitere Behandlung gehalten. Durch diese Äquilibrationszeit wurden die apoptotischen Zellen auf ein Minimum reduziert. Wir haben die Viabilität, Zytokinsekretion und die Eisenaufnahme von VSOP-R1 und VSOP-R2 mit unterschiedlichen Konzentrationen für verschiedene Zeiträume untersucht. Wir konnten hierbei feststellen, dass VSOP auch in die tiefen hippocampalen Schichten eindringen können. Während kurzer Expositionsdauern von zwei Tagen beeinflussten beide VSOP die OHSC ähnlich, bei längeren Inkubationszeiten von bis zu zwölf Tagen zeigte VSOP-R2 eine deutlich vermehrte Sterberate von Zellen im Gyrus dentatus als VSOP-R1. Eine Depletion der Mikroglia mit DMDP (Dichloromethylenediphosphonic acid disodium salt) führte zu einem deutlich erhöhten Zelltod hippocampaler Neurone und einer verminderten Aufnahme von Eisen in die Zellen. Dies deckte sich mit unseren früheren Ergebnissen aus Kokulturen, dass die Mikroglia Population bis zu einem gewissen Grad in der Lage ist, die Neurone vor dem toxischen Eisengehalt der Nanopartikel zu schützen (P3). In einer ersten Analyse der Zytokinausschüttung in den Überständen der Kulturen, zeigte sich zunächst kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten SPIO. Wir haben CXCL1/KC, GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor), Interleukin (IL)-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, IL-18, Interferon γ , Monozyten Chemoattraktionsprotein (MCP)-1 und den Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) mittels Immunoassay (FlowCytomix) untersucht. Im Vergleich zu unseren positiv-Kontrollen mit Lipopolysaccharid (LPS), bei denen sich eine signifikante Immunantwort unserer OHSC zeigte, ist somit die Inkubation mit den verwendeten SPIO sicher.

Eigene Publikation:

P4 Pohland M, Glumm R, Wiekhorst F, Kiwit J, **Glumm J**. Biocompatibility of very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles in murine organotypic hippocampal slice cultures and the role of microglia. Int J Nanomedicine. 2017 Feb 27;12:1577-1591

DOI: [10.2147/IJN.S127206](https://doi.org/10.2147/IJN.S127206)

2.5. Aus dem Blut abstammende Monozyten in der neuronalen Regeneration

Wir wollten somit mit unserer nächsten Studie untersuchen, inwieweit sich Vitalität, Zytokin- und Chemokinsekretion und der Gehalt der Eisenaufnahme von Monozyten bei Carboxydextran umhüllten SPIO von den Citrat umhüllten VSOP voneinander unterscheiden.

Wir haben weiblichen adulten sechs bis acht Wochen alten C57 Bl/6 Mäusen das Blut entnommen und nach bei uns etablierten Protokollen die peripheren Monozyten aus dem Blut isoliert, mit CD11b Microbeads inkubiert und mittels magnetischer Zellseparation gewonnen (Kaminski et al., 2012). Anschließend wurden die Zellen für eine, drei, sechs, zwölf oder 24 Stunden mit einer Konzentration von jeweils 0,75 nM der Nanopartikel inkubiert. Somit wurden die Monozyten jeweils mit demselben Eisengehalt über die gleiche Zeit inkubiert. Dennoch konnten wir Unterschiede in der Vitalität der inkubierten Monozyten beobachten. Nach einem Tag Inkubationszeit stellten wir bei VSOP-R1 die geringste Zelltodrate mit knapp 29 Prozent fest, während VSOP-R2 zu einer fast 50prozentigen Sterberate führte. Resovist lag mit 35 Prozent näher an VSOP-R1. Diese Unterschiede in der Vitalität der Monozyten müssen somit auf die unterschiedliche Größe und Oberflächenkomposition zurückzuführen sein. Unsere Positivkontrolle mit durch vierprozentigem Paraformaldehyd (PFA) induziertem Zelltod führte im Vergleich zu einem Absterben von fast 92 Prozent der Monozyten. Die Eisenaufnahme aller Nanopartikel in die Monozyten konnten wir eindrucksvoll mittels Berliner Blau Färbung nachweisen. Wir bestimmten diesen Eisengehalt mittels magnetischer Partikel Spektroskopie (MPS). MPS ist eine schnelle, sensitive und zellerhaltende Quantifizierungsmethode, welche Informationen über die Aufnahmemenge, Bindungscharakteristiken und Abbau aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften bestimmt (Ludwig et al., 2013, Poller et al., 2020). Diese zeigte jedoch bei

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

den beiden VSOP eine schnellere Eisenaufnahme mit einem höheren Eisengehalt pro Monozyt als bei Resovist, welches maximal einen Eisengehalt von 0,001 pg/Zelle erreichte. Im Gegensatz dazu nahm die Eisenaufnahme bei VSOP-R1 kontinuierlich über die untersuchten Zeitpunkte zu und erreicht nach 24 Stunden einen Gehalt von über 0,008 pg/Zelle. Die Eisenaufnahme von VSOP-2 erreichte nach sechs Stunden den Höhepunkt und schien anschließend eine Sättigung erreicht zu haben. Anhand unserer Berliner Blau Aufnahmen ist sowohl eine intra- als auch extrazelluläre Eisenablagerung wahrscheinlich.

Bemerkenswert ist, dass unsere primären murinen Monozyten sensitiver auf SPIO Exposition reagieren als beispielsweise humane Zelllinien. So zeigten bei ähnlichen Inkubationsbedingungen VSOP und Resovist auf THP-1 abstammende Monozyten keinen Effekt (Ludwig et al., 2013). Auf der anderen Seite zeigten murine Mikroglia nach einer sechsstündigen Exposition die oben dargestellten Effekte (P3).

In unserem Zytokin Assay fanden wir eine zeitabhängige Zunahme der Zytokinproduktion, welche die Immunkompetenz unserer Monozyten nachweist. Keine Unterschiede zeigten sich jedoch bei verschiedenartigen Nanopartikeln. Somit hatte die oben dargelegte Eisenaufnahme der Nanopartikel in die Zelle keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die von uns untersuchten Zytokine CXCL1/KC, IL-6, PI-10, MIP-1 α , MIP-1 β sowie TNF- α . Auch dies passt zu unseren früheren Ergebnissen (P4).

P5 Pohland M, Pohland C, Kiwit J, **Glumm J**. Magnetic Labeling of Primary Murine Monocytes using Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. Neural Regen Res. 2022 Oct;17(10):2311-2315.

DOI: [10.4103/1673-5374.336873](https://doi.org/10.4103/1673-5374.336873)

3. Diskussion

In den letzten Jahren wurden einige in vitro Modelle etabliert um das axonale Wachstum, die Regeneration und Wegfindung von Axonen als auch die Bildung synaptischer Verbindungen zu untersuchen (Stoppini et al., 1991, Stavridis et al., 2009). Bei einer eleganten Methode aus dem Jahr 2004 wird der sensomotorische Kortex mit longitudinalen Schnitten des thorakalen Rückenmarkes kokultiviert (Oishi et al., 2004). Wie in ähnlichen Modellen, musste auch hier, um das Auswachsen der Fasern zu quantifizieren, ein Tracer appliziert werden, das Gewebe fixiert und dann erst einer biochemischen Behandlung unterzogen werden, um es auszuwerten. Somit konnten lediglich Momentaufnahmen erhoben werden. Wir hatten uns zum Ziel gesetzt, ein Modell zu erstellen, welches es uns ermöglicht alle einwachsenden Axone sowie emigrierende Zellen ohne zusätzliche Manipulation kontinuierlich zu beobachten. Genau diese Vorgaben erfüllt unser neu etabliertes Modell, bei welchem der Motorkortex von neugeborenen GFP Mäusen mit dem RM aus neugeborenen Wildtyp Mäusen ko-kultiviert wird (P1). Gerade die Möglichkeit, die einwachsenden, GFP-exprimierenden Fasern über eine gewisse Zeit innerhalb eines Schnittes nachzuverfolgen, ermöglichte es uns, das Aussprossen und die Bildung von Synapsen mittels Live-Imaging zu beobachten.

Wie viele andere Forscher haben auch wir neugeborene Mäuse verwendet, da die altersbedingte Verringerung der Regenerationsfähigkeit lange bekannt ist (Stavridis et al., 2009), insbesondere bei neugeborenen Mäusen älter als sechs Tage (Bonnici & Kapfhammer, 2008 May). Dies ist eine der wichtigsten Einschränkungen, denen man sich bewusst sein sollte. Dennoch stellt unser Modell in einigen Aspekten sehr gut die in vivo Situation dar. Die von uns verwendeten Babymäuse sind drei Tage alt, zu diesem Zeitpunkt hat der kortikospinale Trakt bereits das zervikale RM erreicht.

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

Somit stellt die Präparation des Motorkortex eine Durchtrennung des kortikospinalen Traktes im Sinne einer kompletten Querschnittlähmung dar und ermöglicht es, die Wegfindung und Bildung neuer Konnektionen direkt nachzuverfolgen und auch Interneutone sind detektierbar. Modulatoren der Immunantwort können in unserem Modell untersucht werden, wie das Validieren mit bereits bekannten Modulatoren zeigte. Andererseits sind systemische immunologische Antworten in der „Petrischale“ per se ausgeschlossen. Dadurch kann man sich zunächst auf die Untersuchung der Wegfindung ohne die äußeren Einflüsse des Immunsystems konzentrieren. Durch anschließende Experimente, in welchen aus dem Blut abstammende Monozyten hinzugegeben werden, welche sich zu ortsständigen Mikroglia umwandeln können (Bechmann et al., 2005), kann letztendlich auch, zumindest teilweise, dieser Aspekt betrachtet werden.

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass ebenfalls Nanopartikel aufgrund ihrer Eigenschaften die Regeneration beeinflussen können. Diese hatten ursprünglich ihren Forschungsschwerpunkt als Kontrastmittel in der MRT zum Zweck der nicht-invasiven Diagnostik und Therapie verschiedener Erkrankungen des ZNS. Das ferromagnetische und pharmakokinetische Verhalten sowie die Komposition bestimmter Nanopartikel, sogenannter SPIOs, ermöglichen durch gezielte Akkumulation im ZNS eine spezifische Darstellung von Gewebeveränderungen mit Hilfe der MRT (Rümenapp et al., 2012, Weinstein et al., 2010). Obwohl die pharmazeutische Industrie ihre Forschung zum Einsatz von Nanopartikeln für diagnostische und therapeutische Zwecke weitestgehend eingestellt hat, gibt es eine große Vielfalt akademischer Ansätze im Sinne der Pharmaentwicklung in sehr frühen Stadien. Es werden kontinuierliche neue SPIOs synthetisiert und entsprechend modifiziert, um z.B. unter pathologischen Bedingungen von bestimmten Zellen, wie Tumorzellen oder Immunzellen

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

aufgenommen und im MRT visualisiert zu werden (Chen et al., 2014, Li et al., 2013, Oude Engberink et al., 2007, Rausch et al., 2002, Wuerfel et al., 2011). Die Bildgebung mittels SPIOs ist insbesondere dann von Vorteil, wenn die Blut-Hirn-Schranke (BHS) im Zuge von neuropathologischen Erkrankungen, wie bei Multiple Sklerose, Morbus Alzheimer oder infolge von Hirntraumata, funktionell beeinträchtigt ist und es zu einem erleichterten Übertritt von SPIOs in das ZNS kommt. Dies könnte für die frühzeitige Diagnostik von neurodegenerativen Erkrankungen oder auch für therapeutische Ansätze genutzt werden, wie im Fall der magnetischen Hyperthermie zur Zerstörung inoperabler Hirntumore (Chatterjee et al., 2011, Maier-Hauff et al., 2011). Darüber hinaus sind SPIOs als Träger von Wirkstoffen von großem Interesse, da durch interstitielle Injektionen eine zielgerichtete Verabreichung ermöglicht werden kann (Bhaskar et al., 2010, Yang 2010). Generell sind die potenziellen Einsatzbereiche von Nanopartikeln sehr vielfältig und vor allem aufgrund ihrer geringen Größe sehr vielversprechend.

Trotz vieler Fortschritte im Bereich der Forschung birgt der Einsatz von Nanopartikeln bisher noch nicht abschätzbare Risiken für die Gesundheit, vor allem dann, wenn unerwünschte Partikelanreicherungen die Physiologie von gesunden Zellen des ZNS beeinflussen und potenzielle Schädigungen erst im Rahmen von Spätfolgen auftreten. Wie MRT-Pilotstudien an Patienten zur Visualisierung von Gefäßveränderungen im Gehirn zeigten, fanden sich unerwartet noch mehrere Tage nach einmaliger Gabe Anreicherungen des Partikels Ferumoxytol im Hirngewebe (Hasan et al., 2012). Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass es durch die entsprechende Oberflächenkomposition der Nanopartikel selbst bei intakter BHS zu Wechselwirkungen mit Partikeln kommen und damit die Integrität der BHS beeinflusst werden kann (Lockman et al., 2004).

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

Fundamental für zytotoxische Effekte ausgelöst durch Nanopartikel sind deren Komposition und Größe sowie deren Abbauprozess (Karlsson et al., 2009, Magdolenova et al., 2015). Nanometer-große Partikel werden leicht über endozytotische Mechanismen von Zellen des ZNS aufgenommen, können aber auch außerhalb der Zelle mit der extrazellulären Matrix und dem neuronalen Netzwerk interagieren und damit die Zellphysiologie beeinträchtigen (Rausch et al., 2002, Venneti et al., 2013, Zhang et al., 2009). Die Freisetzung freier Eisen-Ionen aus den Partikelkernen wirkt sich insofern höchstwahrscheinlich schädigend aus, da die Bildung freier Sauerstoffradikale zu mitochondrialen Funktionsstörungen führt (Urratia et al., 2014). Außerdem könnten infolge des Abbaus von Eisenoxid-Nanopartikel Eisenablagerungen auftreten, welche stoffwechselbedingt bestimmte degenerativer Erkrankungen des Gehirns, wie Parkinson oder Alzheimer, verursachen können.

Dennoch nimmt die potenzielle Nutzbarkeit von Eisenoxid-Nanopartikel aufgrund ihrer besonderen magnetischen Eigenschaften in zahlreichen technischen und medizinischen Anwendungen stetig zu (Rümenapp et al., 2012).

Das Gehirn als Zielorgan magnetischer Eisenpartikel zum Zweck der Therapie und Diagnostik stellt eine große Herausforderung dar. Aufgrund der möglichen Beeinflussung der geistigen und eventuell physischen Fähigkeiten durch partikelinduzierte Veränderungen des Gewebes und Hirnstoffwechsels, müssen die absolute Verträglichkeit gewährleistet und Spätfolgen ausgeschlossen sein. Da zur Erfassung der Toxikologie klinisch relevanter Partikel im Rahmen von *in vivo* Studien lediglich grob der Einfluss auf das klinische Erscheinungsbild gefordert wird, wurden mögliche funktionelle Auswirkungen auf physiologische Vorgänge im ZNS bisher unzureichend berücksichtigt.

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

In unseren Experimenten zeigt sich, dass sowohl VSOP, als kleinste und elektrostatisch stabilisierte Nanopartikel sowie Resovist, als größter und sterisch stabilisierter Nanopartikel, schnell in Mikroglia akkumulieren. Letzteres erfolgt über eine Clathrin Rezeptor vermittelte Endozytose (Yang et al., 2011). Die Aufnahme von VSOP ist im Gegensatz dazu viel schneller aufgrund der geringeren Größe von 7 nm, der größeren Oberflächen-zu-Volumen Relation und der Bindung an extrazelluläre Glycosaminoglykane vor der Aufnahme (Ludwig et al., 2013). Die von uns verwendeten VSOP wurden und werden vom Institut der Radiologie der Charité-Universitätmedizin Berlin hergestellt; hierbei wurde der monokristalline Eisenkern mittels einer Zitrahülle sterisch stabilisiert. Diese VSOP werden zum Beispiel in Studien zur Visualisierung von artherosklerotischen Plaques (Poller et al., 2016) oder zur Darstellung von Entzündungsherden bei der experimentellen Autoimmunenzephalitis (Millward, et al., 2013), dem Mausmodell der Multiple Sklerose, eingesetzt. Das von uns verwendete VSOP-R1 hat einen Durchmesser von 6,5-7,5 nm mit einem Eisengehalt von 26.4 g/L. Währenddessen ist das VSOP-R2 etwas größer mit einem Durchmesser von 7,5-8,7 nm und hat einen Eisengehalt von 27.2 g/L. Ein weiterer Unterschied ist unter anderem die Relaxationszeit R2.

Die schnelle Aufnahme der Nanopartikel führt zur Aktivierung der Mikroglia, erkennbar an der morphologischen Formänderung von stark verzweigten, viele Ausläufer besitzenden hinzu kleinen geballten Mikroglia (P3). Wir nehmen an, dass die Nanopartikel intrazellulär gespeichert werden. Durch lysosomale Zersetzung kommt es zu freien Eisenionen innerhalb der Mikroglia. Dies führt zu mitochondrialer Funktionsstörung (Urrutia et al., 2014) und somit zu dem von uns beobachteten erhöhtem mikroglialen Zelltod.

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

Der direkte Effekt von SPIO auf Neurone, insbesondere der VSOP, ist ebenfalls noch nicht ausreichend bekannt. Neurone degenerieren bei direktem Kontakt mit SPIO. Dies konnte in unseren Neuron-Glia-Kokulturen nicht nur aufgehalten werden, sondern führte in unseren Studien zu einer vermehrten, partikel- und dosisabhängigen Verzweigung der Neuriten wie unsere Auswertung durch die Scholl-Analyse erkennbar war. Zum Beispiel zeigten niedrige Dosen von Resovist und hohe Dosen von VSOP-R2 ein erhöhtes neuronales Wachstum. Dies könnte durch die zuvor beschriebenen verschiedenen Aufnahmewege der SPIO durch die aktivierten Mikroglia bedingt sein. Die dadurch verschieden beeinflusste mikrogliale Physiologie kann wiederum unterschiedlich auf die Vitalität der Neurone wirken. Aktivierte Mikroglia können zum einen neuronalen Schaden verursachen, in dem sie zytotoxische Faktoren wie TNF α , nitric oxides und reaktive Sauerstoffspezies bilden (Ye et al., 2013). Zum anderen können aktivierte Mikroglia das neuronale Überleben über topische und antiinflammatorische Faktoren positiv beeinflussen (Smith et al., 2012). Zusätzlich führt die Eisenablagerung in Neuronen und Mikroglia zur vermehrten Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie TNF α und IL-6, welche zur mitochondrialen Dysfunktion führen und die phagozytotische Aktivität der Mikroglia verringern (Urrutia et al., 2014). Dennoch haben bereits andere Forscher genau wie wir festgestellt, dass bestimmte Nanopartikel die neuronale Differenzierung, das Überleben und das Wachstum dosisabhängig positiv beeinflussen können (Kim et al., 2011).

Untersuchungen in der Einzelzellkultur oder auch in Neuron-Glia Kokulturen lassen nur bedingt Rückschlüsse auf die Vorgänge in einem vielschichtigen Organismus zu. Insbesondere die dreidimensionale Wirklichkeit ist nicht ausreichend abgebildet, es fehlt die ECM, deren Einfluss auf die Nanopartikel und umgekehrt nicht zu unter-

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

schätzen ist. Somit haben wir anschließend die Auswirkungen von SPIO in gut etablierten OHSC (organotypic hippocampal slice cultures, hippocampalen organotypischen Schnittkulturen) untersucht. OHSC eignen sich hervorragend, um in vitro Regeneration und Degeneration zu untersuchen. Die neuronale Organisation des Hippocampus ist im Vergleich zum Neokortex, relativ einfach, jedoch sind verschiedene Zelltypen vorhanden und gut zu unterscheiden. Wie seit langem bekannt ist, entwickelt sich in der Kultur der Hippocampus fast wie in vivo weiter und ermöglicht es damit die Neurogenese, neuronale Spezifität und die Synapsenbildung zu untersuchen (Zimmer & Gähwiler 1984). Darüber hinaus sind OHSC einfach herzustellen sowie mit geringem Aufwand über einen langen Zeitraum in Kultur zu halten (Stoppini et al., 1991). Durch die erhaltene Zytoarchitektur schließen OHSC die Lücke zwischen primären Zellkulturen und Tierexperimenten und eignen sich damit für unsere weiterführenden Fragen, um zusätzliche Informationen der Wirkungsweise von SPIO in dreidimensionalen Strukturen zu erheben.

Zusätzlich lässt sich durch Mikroglia-depletion die Rolle der Mikroglia in unserem Setup untersuchen. Mikroglia sind als ortsständige Makrophagen die größte Gruppe myelo-poetischer Zellen des gesunden ZNS Parenchyms, deren wichtige neuroprotektive Rolle, vor allem zu Beginn einer Virusinfektion, bekannt ist (Spiteri et al., 2022). Zu den myelo-poetischen Zellen zählen außerdem nicht ortsständige Makrophagen, welche in perivaskuläre Makrophagen, meningeale Makrophagen, Makrophagen des Choroidplexus und aus dem blutabstammenden Monozyten eingeteilt werden können (Prinz et al., 2011). Nach einer Äquilibrierungszeit von sieben Tagen wurden die OHSC mit einer klinisch relevanten Dosis von 3 nM SPIO inkubiert. Auch hier wurden die ortsständigen phagozytierenden Zellen, die Mikroglia, aktiviert und zeigten die typischen morphologischen Veränderungen wie den Verlust ihrer zahlrei-

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

chen Fortsätze hinzu der runden Form sowie ihre Akkumulation in Regionen höherer SPIO Dichte (Stenge et al., 2001). Um den protektiven Effekt der Mikroglia einschätzen zu können, wurden die Mikroglia mit DMDP zu über 90 Prozent eliminiert. Dies führte insgesamt zu einer erhöhten Rate von sterbenden Zellen. Interessanterweise fanden sich hierbei Unterschiede der SPIO. So fand sich nach Behandlung mit VSOP-R1 ein ubiquitär erhöhter Zelltod, während VSOP-R2 nur die CA3 (Cornu Ammonis) Region beeinflusste. Dies ist konsistent mit unseren Monokulturergebnissen, in denen es unter VSOP-R1 zu einer deutlichen höheren mikroglialen Degeneration kommt (P3). Obwohl wir und andere Forscher zeigen konnten, dass SPIO die Zytokin-Homöostase in Monozyten, Mikroglia und OHSC nicht zu beeinflussen scheinen (Wang et al., 2011, Ludwig et al., 2013, P4), bleibt eine Restunsicherheit. Insbesondere deshalb, da Resovist seit Jahren von der FDA für die Anwendung am Menschen für die Behandlung der Eisenmangelanämie genehmigt ist, jedoch erst kürzlich festgestellt wurde, dass es fatale gegensätzliche Folgen haben kann, wie starken Hypertonus und Anaphylaxie nach intravenöser Gabe (Alsaleh & Brown, 2020). Dies zeigt einmal mehr, dass unser Wissen über die Beeinflussung von SPIO im ZNS bei weitem noch nicht suffizient ist und weitere Studien notwendig sind.

Dennoch eignen sich meines Erachtens aus dem blutabstammende Monozyten theoretisch aufgrund ihrer Eigenschaften hervorragend zur Beeinflussung der Regeneration nach einer Querschnittlähmung. Zum einen nehmen sie durch ihre phagozytierenden Eigenschaften relativ einfach Modulatoren auf, zum anderen ergibt sich durch ihre Fähigkeit nach einer Querschnittlähmung einzuwandern, die Möglichkeit selbige schnell vor Ort zu bringen und die Regeneration gezielt zu beeinflussen.

Durch unsere oben dargestellten Ergebnisse wurde erneut deutlich, welche wichtige Rolle phagozytierende Zellen zur Aufrechterhaltung der Homöostase innehaben. Al-

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

lerdings spielen Entzündungsprozesse ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Regeneration unter pathophysiologischen Bedingungen. So können zum Beispiel nach mechanischen Läsionen aus dem Blut abstammende Monozyten in die Zonen der akuten, anterograden axonalen Degeneration infiltrieren und sich dort zu Mikroglia ähnlichen Zellen umwandeln (Bechmann et al., 2005). Ebenso werden sie nach spinalen Läsionen, zum Beispiel einer Querschnittlähmung, in das verletzte RM rekrutiert und sind dort Modulatoren der Erholung des Gewebes (Schwartz, 2010). Monozyten können die postläsionale Plastizität modulieren sowie zusätzlich als Träger fungieren, um Substanzen in das ZNS einzuschleusen, die normalerweise nicht über die BHS eingelassen worden wären (Abbott et al., 2010). Allerdings spielen Monozyten hierbei eine duale Rolle. Sie können genauso pathophysiologische Prozesse unterhalten (Mammana et al., 2018) und zum Beispiel im Rahmen der Multiplen Sklerose zu Axonverlust, Astrogliose und Neurodegeneration beitragen (Sklavin et al., 2010).

Da wir im Rahmen unserer Kokulturrexperimente ebenfalls eine erhöhte Vitalität der Neurone bei gleichzeitiger Anwesenheit von Mikroglia bei der Inkubation mit VSOP zeigen konnten (P3), wollten wir die Effekte der Inkubation von aus dem Blut abstammenden Monozyten mit VSOP untersuchen. Deren Fähigkeit unter pathologischen Bedingungen ins ZNS eindringen (Bechmann et al., 2005) und dabei gleichzeitig Substanzen ins ZNS zu transportieren zu können (Abbott et al., 2010), machen diese Zellen zu einem wichtigen Werkzeug, um Einfluss auf die Prozesse der Regeneration nehmen zu können. Selbstverständlich sollten hierbei die Monozyten durch die Inkubation so wenig wie möglich beeinflusst werden. Dies ist von der Partikelgröße, dem Hüllmaterial und der verwendeten Inkubationskonzentration abhängig (Tong et al., 2016).

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

Erst wenn wir alle Prozesse genau verstanden haben, wird es möglich sein die schwerwiegenden Folgen einer Querschnittlähmung zu überwinden. Dieses Potential gezielt zu nutzen, wird uns einen großen Schritt weiterbringen, um die Querschnittlähmung zu überwinden.

4. Zusammenfassung

Neuronale Regeneration im ZNS gezielt beeinflussen zu können, birgt enormes Potential für Patienten, die eine Querschnittlähmung erlitten haben. Die dahinterstehenden Prozesse sind vielschichtig und gewählte Ansätze müssen auf ihre eigenen potentiellen Gefahren hin untersucht werden. Wie in den meisten Organen, führt eine Läsion im ZNS zu einem „Kollateralschaden“, d.h. dass nicht nur der primäre Schaden, wie z.B. der initiale Verlust durchtrennter Bahnen des Rückenmarkes, sondern auch das zunächst noch organspezifische gesunde Gewebe wird von diesen Reparaturprozessen beeinflusst. Gerade im ZNS ergibt sich jedoch eine spezielle Situation. Der sekundäre Schaden führt hier, aufgrund der nur spärlich ausgeprägten Eigenschaft der Geweberegeneration zu einem irreversiblen Verlust der Neurone (Bechmann et al., 2005). Die entstehende Narbe verhindert, dass wiederaussprossende Neurone die notwendigen Kontakte zu den α -Motoneuronen tieferer Rückenmarksegmente wiederherstellen können und somit eine gezielte Ansteuerung der Muskeln durch die Patienten möglich ist.

Wir haben zunächst ein neues Läsionsmodell für die Beurteilung neuronaler Regeneration in vitro etabliert. Dieses Modell erlaubt erstmals sämtliche einwachsende Neurone gezielt verfolgen zu können. Wir haben gezeigt, dass sich funktionale Synapsen des einwachsenden kortikospinalen Traktes zu im RM vorhandenen Neuronen bilden. Zusätzlich haben wir es mit bekannten, die Regeneration unterstützenden Substanzen validiert.

Nanopartikel und insbesondere SPIO haben das Potential, nicht zuletzt auch aufgrund ihrer Größe, Neurone auf molekularer Ebene zu erreichen. So ist es mittlerweile zum Beispiel möglich in Anwesenheit eines externen magnetischen Feldes neuronales Wachstum zielgerichtet zu beeinflussen (Pita-Thomas, et al., 2015). Die vorlie-

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

gende Arbeit befasst sich in Ihrem zweiten Teil vornehmlich mit der Verträglichkeit verwendeter Nanopartikel, welche im Hinblick möglicher potenzieller Nebenwirkungen nicht außer Acht gelassen werden darf. Der Einfluss von SPIO auf Neurone, Mikroglia und Astrozyten wurde intensiv untersucht. Wir konnten zeigen, dass die morphologischen Änderungen der Neurone und Mikroglia von den verwendeten Nanopartikeln abhängen. Interessanterweise wurde in Neuron-Glia Kokulturen zusätzlich das neuronale Auswachsen stimuliert. In Abhängigkeit der Konzentration der verwendeten Nanopartikel fanden wir eine Zunahme der aussprossenden Neuriten. In OHSC konnten wir zeigen, dass verschiedene SPIO unterschiedliche Effekte aufweisen. In beiden experimentellen Ansätzen, Zell- sowie Schnittkulturen, wurde einmal mehr die Bedeutung phagozitierender Zellen, wie Mikroglia und aus dem Blut abstammender Makrophagen, deutlich. Nach Depletion von Mikroglia konnten wir einen toxischen Effekt der eingesetzten SPIO auf die Neurone beobachten. Diese konnten wir in ersten Zytokin- und Chemokinuntersuchungen jedoch noch nicht statistisch signifikant evaluieren.

Letztendlich ist der Traum, wiederaussprossende Axone gezielt durch die Narbe einer Querschnittlähmung leiten zu können und funktionale Konvektionen wiederherzustellen, um so eine motorische Funktion zu ermöglichen, auch nach jahrelanger Forschungsarbeit in dieser Komplexität immer noch dasselbe - nämlich eine Vision. Denn obwohl unser Verständnis für die zugrunde liegenden Mechanismen wächst und kleine Erfolge erzielt werden können, sind wir aktuell noch nicht in der Lage, eine komplette Querschnittlähmung zu heilen und müssen weiterhin intensiv an Möglichkeiten forschen.

Literaturverzeichnis

- 1 Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010 Jan;37(1):13-25.
- 2 Alsaleh NB, Brown JM. Engineered Nanomaterials and Type I Allergic Hypersensitivity Reactions. *Front Immunol.* 2020 Feb 14;11:222.
- 3 Andersen HH, Johnsen KB, Moos T. Iron deposits in the chronically inflamed central nervous system and contributes to neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2014 May;71(9):1607-22.
- 4 Angeli CA, Edgerton VR, Gerasimenko YP, Harkema SJ. Altering spinal cord excitability enables voluntary movements after chronic complete paralysis in humans. *Brain.* 2014 May;137(Pt 5):1394-409.
- 5 Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioeng Transl Med.* 2019 Sep 5;4(3):e10143.
- 6 Arai T, Kofidis T, Bulte JW, de Bruin J, Venook RD, Berry GJ, McConnell MV, Quertermous T, Robbins RC, Yang PC. Dual in vivo magnetic resonance evaluation of magnetically labeled mouse embryonic stem cells and cardiac function at 1.5 t. *Magn Reson Med.* 2006 Jan;55(1):203-9.
- 7 Bechmann I, Goldmann J, Kovac AD, Kwidzinski E, Simbürger E, Naftolin F, Dirnagl U, Nitsch R, Priller J. Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J.* 2005 Apr;19(6):647-9.
- 8 Bhaskar S, Tian F, Stoeger T, Kreyling W, de la Fuente JM, Grazú V, Borm P, Estrada G, Ntziachristos V, Razansky D. Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. *Part Fibre Toxicol.* 2010 Mar 3;7:3.
- 9 Björklund A, Lindvall O. Self-repair in the brain. *Nature.* 2000 Jun 22;405(6789):892-3, 895.
- 10 Bonnici B, Kapfhammer JP. Spontaneous regeneration of intrinsic spinal cord axons in a novel spinal cord slice culture model. *Eur J Neurosci.* 2008 May;27(10):2483-92.
- 11 Bonnici B, Kapfhammer JP. Modulators of signal transduction pathways can promote axonal regeneration in entorhino-hippocampal slice cultures. *Eur J Pharmacol.* 2009 Jun 10;612(1-3):35-40.
- 12 Carrouel F, Viennot S, Ottolenghi L, Gaillard C, Bourgeois D. Nanoparticles as Anti-Microbial, Anti-Inflammatory, and Remineralizing Agents in Oral Care Cosmetics: A Review of the Current Situation. *Nanomaterials (Basel).* 2020 Jan 13;10(1):140.
- 13 Chatterjee DK, Diagaradjane P, Krishnan S. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Ther Deliv.* 2011 Aug;2(8):1001-14.
- 14 Chédotal A. Development and plasticity of commissural circuits: from locomotion to brain repair. *Trends Neurosci.* 2014 Oct;37(10):551-62.
- 15 Chen L, Fan X, Jin G, Wan X, Qiu R, Yi G, You Y, Xu Q. Treatment of rat with traumatic brain injury and MR tracing in vivo via combined transplantation of bone marrow stromal cells labeled with superparamagnetic iron oxide and Schwann cells. *J Biomed Nanotechnol.* 2014 Feb;10(2):205-15.
- 16 del Río JA, Soriano E. Regenerating cortical connections in a dish: the entorhino-hippocampal organotypic slice co-culture as tool for pharmacological screening of molecules promoting axon regeneration. *Nat Protoc.* 2010 Feb;5(2):217-26.
- 17 Di Marco M, Sadun C, Port M, Guilbert I, Couvreur P, Dubernet C. Physicochemical characterization of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO) for biomedical application as MRI contrast agents. *Int J Nanomedicine.* 2007;2(4):609-22.
- 18 Dru AB, Hoh DJ. Activating Spinal Interneurons for Neural Repair After Spinal Cord Injury. *World Neurosurg.* 2015 Nov;84(5):1185-8.
- 19 Filli L, Schwab ME. The rocky road to translation in spinal cord repair. *Ann Neurol.* 2012 Oct;72(4):491-501.

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

- 20 Flynn JR, Graham BA, Galea MP, Callister RJ. The role of propriospinal interneurons in recovery from spinal cord injury. *Neuropharmacology*. 2011 Apr;60(5):809-22.
- 21 Gahwiler BH. Labeling of neurons by intracellular injection of fluorescent dyes. *JAMA*. 1981 May 15;245(19):1957.
- 22 Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(18):3995-4021.
- 23 Guzman R, Uchida N, Bliss TM, He D, Christopherson KK, Stellwagen D, Capela A, Greve J, Malenka RC, Moseley ME, Palmer TD, Steinberg GK. Long-term monitoring of transplanted human neural stem cells in developmental and pathological contexts with MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 12;104(24):10211-6.
- 24 Hasan DM, Amans M, Tihan T, Hess C, Guo Y, Cha S, Su H, Martin AJ, Lawton MT, Neuwelt EA, Saloner DA, Young WL. Ferumoxytol-enhanced MRI to Image Inflammation within Human Brain Arteriovenous Malformations: A Pilot Investigation. *Transl Stroke Res*. 2012 Jul;3(Suppl 1):166-73.
- 25 Hendrick RE, Haacke EM. Basic physics of MR contrast agents and maximization of image contrast. *J Magn Reson Imaging*. 1993 Jan-Feb;3(1):137-48.
- 26 Hsiao JK, Tai MF, Chu HH, Chen ST, Li H, Lai DM, Hsieh ST, Wang JL, Liu HM. Magnetic nanoparticle labeling of mesenchymal stem cells without transfection agent: cellular behavior and capability of detection with clinical 1.5 T magnetic resonance at the single cell level. *Magn Reson Med*. 2007 Oct;58(4):717-24.
- 27 Ittrich H, Peldschus K, Raabe N, Kaul M, Adam G. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biomedicine: applications and developments in diagnostics and therapy. *Rofo*. 2013 Dec;185(12):1149-66.
- 28 Kaminski M, Bechmann I, Kiwit J, Glumm J. Migration of monocytes after intracerebral injection. *Cell Adh Migr*. 2012 May-Jun;6(3):164-7.
- 29 Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett*. 2009 Jul 24;188(2):112-8.
- 30 Kim JA, Lee N, Kim BH, Rhee WJ, Yoon S, Hyeon T, Park TH. Enhancement of neurite outgrowth in PC12 cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2011 Apr;32(11):2871-7.
- 31 Li L, Jiang W, Luo K, Song H, Lan F, Wu Y, Gu Z. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as MRI contrast agents for non-invasive stem cell labeling and tracking. *Theranostics*. 2013 Jul 31;3(8):595-615.
- 32 Lockman PR, Koziara JM, Mumper RJ, Allen DD. Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *J Drug Target*. 2004;12(9-10):635-41.
- 33 Ludwig A, Poller WC, Westphal K, Minkwitz S, Lättig-Tünnemann G, Metzkwow S, Stangl K, Baumann G, Taupitz M, Wagner S, Schnorr J, Stangl V. Rapid binding of electrostatically stabilized iron oxide nanoparticles to THP-1 monocytic cells via interaction with glycosaminoglycans. *Basic Res Cardiol*. 2013 Mar;108(2):328.
- 34 Magdolenova Z, Drlickova M, Henjum K, Rundén-Pran E, Tulinska J, Bilanicova D, Pojana G, Kazimirova A, Barancokova M, Kuricova M, Liskova A, Staruchova M, Ciampor F, Vavra I, Lorenzo Y, Collins A, Rinna A, Fjellsbø L, Volkovova K, Marcomini A, Amiry-Moghaddam M, Dusinska M. Coating-dependent induction of cytotoxicity and genotoxicity of iron oxide nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2015 May;9 Suppl 1:44-56.
- 35 Mahmoudi K, Hadjipanayis CG. The application of magnetic nanoparticles for the treatment of brain tumors. *Front Chem*. 2014 Dec 3;2:109.
- 36 Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, Orawa H, Budach V, Jordan A. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 2011 Jun;103(2):317-24.
- 37 Mammana S, Fagone P, Cavalli E, Basile MS, Petralia MC, Nicoletti F, Bramanti P, Mazzon E. The Role of Macrophages in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Pathways of Alzheimer's

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

- Disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Multiple Sclerosis: Pathogenetic Cellular Effectors and Potential Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar 13;19(3):831.
- 38 Millward JM, Schnorr J, Taupitz M, Wagner S, Wuerfel JT, Infante-Duarte C. Iron oxide magnetic nanoparticles highlight early involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. *ASN Neuro.* 2013;5(1):e00110.
- 39 Neubert J, Wagner S, Kiwit J, Bräuer AU, Glumm J. New findings about iron oxide nanoparticles and their different effects on murine primary brain cells. *Int J Nanomedicine.* 2015 Mar 13;10:2033-49.
- 40 O'Donnell M, Chance RK, Bashaw GJ. Axon growth and guidance: receptor regulation and signal transduction. *Annu Rev Neurosci.* 2009;32:383-412.
- 41 Oishi Y, Baratta J, Robertson RT, Steward O. Assessment of factors regulating axon growth between the cortex and spinal cord in organotypic co-cultures: effects of age and neurotrophic factors. *J Neurotrauma.* 2004 Mar;21(3):339-56.
- 42 Oude Engberink RD, van der Pol SM, Döpp EA, de Vries HE, Blezer EL. Comparison of SPIO and USPIO for in vitro labeling of human monocytes: MR detection and cell function. *Radiology.* 2007 May;243(2):467-74.
- 43 Peng W, Cotrina ML, Han X, Yu H, Bekar L, Blum L, Takano T, Tian GF, Goldman SA, Nedergaard M. Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jul 28;106(30):12489-93.
- 44 Poller WC, Löwa N, Schleicher M, Münster-Wandowski A, Taupitz M, Stangl V, Ludwig A, Wiekhorst F. Initial interaction of citrate-coated iron oxide nanoparticles with the glycocalyx of THP-1 monocytes assessed by real-time magnetic particle spectroscopy and electron microscopy. *Sci Rep.* 2020 Feb 27;10(1):3591.
- 45 Pita-Thomas W, Stekete MB, Moysidis SN, Thakor K, Hampton B, Goldberg JL. Promoting filopodial elongation in neurons by membrane-bound magnetic nanoparticles. *Nanomedicine.* 2015 Apr;11(3):559-67.
- 46 Pohland M, Glumm J. Propriospinal interneurons in the spotlight for anatomical and functional recovery after spinal cord injury. *Neural Regen Res.* 2015 Nov;10(11):1737-8.
- 47 Pohland M, Glumm R, Stoenica L, Höltje M, Kiwit J, Ahnert-Hilger G, Strauss U, Bräuer AU, Paul F, Glumm J. Studying Axonal Outgrowth and Regeneration of the Corticospinal Tract in Organotypic Slice Cultures. *J Neurotrauma.* 2015 Oct 1;32(19):1465-77.
- 48 Pohland M, Glumm R, Wiekhorst F, Kiwit J, Glumm J. Biocompatibility of very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles in murine organotypic hippocampal slice cultures and the role of microglia. *Int J Nanomedicine.* 2017 Feb 27;12:1577-1591.
- 49 Pohland M, Pohland C, Kiwit J, Glumm J. Magnetic labeling of primary murine monocytes using very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Neural Regen Res.* 2022 Oct;17(10):2311-2315.
- 50 Polak P, Shefi O. Nanometric agents in the service of neuroscience: Manipulation of neuronal growth and activity using nanoparticles. *Nanomedicine.* 2015 Aug;11(6):1467-79.
- 51 Poller WC, Löwa N, Schleicher M, Münster-Wandowski A, Taupitz M, Stangl V, Ludwig A, Wiekhorst F. Initial interaction of citrate-coated iron oxide nanoparticles with the glycocalyx of THP-1 monocytes assessed by real-time magnetic particle spectroscopy and electron microscopy. *Sci Rep.* 2020 Feb 27;10(1):3591.
- 52 Poller WC, Ramberger E, Boehm-Sturm P, Mueller S, Möller K, Löwa N, Wiekhorst F, Wagner S, Taupitz M, Schellenberger E, Baumann G, Stangl K, Stangl V, Ludwig A. Uptake of citrate-coated iron oxide nanoparticles into atherosclerotic lesions in mice occurs via accelerated transcytosis through plaque endothelial cells. *Nano Research* 2016 Oct 14; 9/3437-3452.
- 53 Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2011 Sep 27;14(10):1227-35.
- 54 Rausch M, Baumann D, Neubacher U, Rudin M. In-vivo visualization of phagocytotic cells in rat brains after transient ischemia by USPIO. *NMR Biomed.* 2002 Jun;15(4):278-83.

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

- 55 Riggio C, Calatayud MP, Giannaccini M, Sanz B, Torres TE, Fernández-Pacheco R, Ripoli A, Ibarra MR, Dente L, Cuschieri A, Goya GF, Raffa V. The orientation of the neuronal growth process can be directed via magnetic nanoparticles under an applied magnetic field. *Nanomedicine*. 2014 Oct;10(7):1549-58.
- 56 Roohi F, Lohrke J, Ide A, Schütz G, Dassler K. Studying the effect of particle size and coating type on the blood kinetics of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:4447-58.
- 57 Rügenapp C, Gleich B, Haase A. Magnetic nanoparticles in magnetic resonance imaging and diagnostics. *Pharm Res*. 2012 May;29(5):1165-79.
- 58 Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, Barde YA, Schwab ME. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature*. 1994 Jan 13;367(6459):170-3.
- 59 Schwartz M. "Tissue-repairing" blood-derived macrophages are essential for healing of the injured spinal cord: from skin-activated macrophages to infiltrating blood-derived cells? *Brain Behav Immun*. 2010 Oct;24(7):1054-7.
- 60 Slavin A, Kelly-Modis L, Labadia M, Ryan K, Brown ML. Pathogenic mechanisms and experimental models of multiple sclerosis. *Autoimmunity*. 2010 Nov;43(7):504-13.
- 61 Soenen SJ, Nuytten N, De Meyer SF, De Smedt SC, De Cuyper M. High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling. *Small*. 2010 Apr 9;6(7):832-42.
- 62 Spiteri AG, Wishart CL, Pamphlett R, Locatelli G, King NJC. Microglia and monocytes in inflammatory CNS disease: integrating phenotype and function. *Acta Neuropathol*. 2022 Feb;143(2):179-224.
- 63 Stavridis SI, Dehghani F, Korf HW, Hailer NP. Cocultures of rat sensorimotor cortex and spinal cord slices to investigate corticospinal tract sprouting. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009 Nov 1;34(23):2494-9.
- 64 Stence N, Waite M, Dailey ME. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*. 2001 Mar 1;33(3):256-66.
- 65 Steward O, Zheng B, Tessier-Lavigne M. False resurrections: distinguishing regenerated from spared axons in the injured central nervous system. *J Comp Neurol*. 2003 Apr 21;459(1):1-8.
- 66 Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*. 1991 Apr;37(2):173-82.
- 67 Taupitz M, Schmitz S, Hamm B. Superparamagnetische Eisenoxidpartikel: Aktueller Stand und zukünftige Entwicklungen [Superparamagnetic iron oxide particles: current state and future development]. *Rofo*. 2003 Jun;175(6):752-65.
- 68 Thi TTH, Suys EJA, Lee JS, Nguyen DH, Park KD, Truong NP. Lipid-Based Nanoparticles in the Clinic and Clinical Trials: From Cancer Nanomedicine to COVID-19 Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2021 Apr 8;9(4):359.
- 69 Thompson EM, Guillaume DJ, Dósa E, Li X, Nazemi KJ, Gahramanov S, Hamilton BE, Neuwelt EA. Dual contrast perfusion MRI in a single imaging session for assessment of pediatric brain tumors. *J Neurooncol*. 2012 Aug;109(1):105-14.
- 70 Tong HI, Kang W, Shi Y, Zhou G, Lu Y. Physiological function and inflamed-brain migration of mouse monocyte-derived macrophages following cellular uptake of superparamagnetic iron oxide nanoparticles-Implication of macrophage-based drug delivery into the central nervous system. *Int J Pharm*. 2016 May 30;505(1-2):271-82.
- 71 Urrutia PJ, Mena NP, Núñez MT. The interplay between iron accumulation, mitochondrial dysfunction, and inflammation during the execution step of neurodegenerative disorders. *Front Pharmacol*. 2014 Mar 10;5:38.
- 72 Velmans T, Battefeld A, Geist B, Farrés AS, Strauss U, Bräuer AU. Plasticity-related gene 3 promotes neurite shaft protrusion. *BMC Neurosci*. 2013 Mar 19;14:36.

Der Einfluss superparamagnetischer Nanopartikel auf die neuronale Regeneration

- 73 Venneti S, Lopresti BJ, Wiley CA. Molecular imaging of microglia/macrophages in the brain. *Glia*. 2013 Jan;61(1):10-23.
- 74 Wahajuddin, Arora S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:3445-71.
- 75 Wang YX, Hussain SM, Krestin GP. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol*. 2001;11(11):2319-31.
- 76 Wang Y, Wang B, Zhu MT, Li M, Wang HJ, Wang M, Ouyang H, Chai ZF, Feng WY, Zhao YL. Microglial activation, recruitment and phagocytosis as linked phenomena in ferric oxide nanoparticle exposure. *Toxicol Lett*. 2011 Aug 10;205(1):26-37.
- 77 Weinstein JS, Varallyay CG, Dosa E, Gahramanov S, Hamilton B, Rooney WD, Muldoon LL, Newell EA. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: diagnostic magnetic resonance imaging and potential therapeutic applications in neurooncology and central nervous system inflammatory pathologies, a review. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010 Jan;30(1):15-35.
- 78 Wuerfel E, Smyth M, Millward JM, Schellenberger E, Glumm J, Prozorovski T, Aktas O, Schulze-Toppoff U, Schnorr J, Wagner S, Taupitz M, Infante-Duarte C, Wuerfel J. Electrostatically Stabilized Magnetic Nanoparticles - An Optimized Protocol to Label Murine T Cells for in vivo MRI. *Front Neurol*. 2011 Dec 16;2:72.
- 79 Yang CY, Tai MF, Lin CP, Lu CW, Wang JL, Hsiao JK, Liu HM. Mechanism of cellular uptake and impact of ferucarbotran on macrophage physiology. *PLoS One*. 2011;6(9):e25524.
- 80 Yang H. Nanoparticle-mediated brain-specific drug delivery, imaging, and diagnosis. *Pharm Res*. 2010 Sep;27(9):1759-71.
- 81 Ye L, Huang Y, Zhao L, Li Y, Sun L, Zhou Y, Qian G, Zheng JC. IL-1 β and TNF- α induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *J Neurochem*. 2013 Jun;125(6):897-908.
- 82 Zhang S, Li J, Lykotrafitis G, Bao G, Suresh S. Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. *Adv Mater*. 2009;21:419-424.
- 83 Zimmer J, Gähwiler BH. Cellular and connective organization of slice cultures of the rat hippocampus and fascia dentata. *J Comp Neurol*. 1984 Sep 20;228(3):432-46.

Danksagung

Mein Dank gilt allen denjenigen, die mich auf dem Weg zur Habilitation begleitet und unterstützt haben. Insbesondere trifft das auf Herrn Prof. Dr. Ingo Bechmann, Herrn Prof. Dr. Victor Tarabykin, Prof. Dr. Ulf Strauss, Prof. Dr. Robert Nitsch und Frau Prof. Dr. Anja Bräuer zu. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Kiwit für meine klinische Ausbildung und die Zeit, die er mir für meine Arbeiten an der Charité gegeben hat.

Herzlich danke ich meiner Familie und ganz besonders Robert für seine Liebe und Geduld. Mein Dank gilt Franzi, ohne deren ständige Erinnerungen, diese Zeilen nie beendet worden wären.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Hohen Neuendorf, den 28.03.2023

Dr. med. Jana Glumm