

Aus der Klinik für Neurochirurgie
(Prof. Dr. med. V. Rohde)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Ultraschall-gesteuerte Freisetzung von an
Nanopartikeln gebundenem Nimodipin
und deren Anwendung zur Therapie von
experimentell erzeugten Vasospasmen an
der Chorioallantoismembran des
embryonalen Eis**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Katja Döring

aus

Hildesheim

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in PD Dr. med. V. Malinova

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. T. R. Döppner

Prüfungskommission

Referent/in: PD Dr. med. V. Malinova

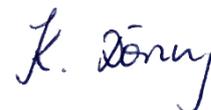
Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. T. R. Döppner

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. Ralf Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 13.12.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Ultraschall-gesteuerte Freisetzung von an Nanopartikeln gebundenem Nimodipin und deren Anwendung zur Therapie von experimentell erzeugten Vasospasmen an der Chorioallantoismembran des embryonalen Eis“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 31. März 2022



.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Subarachnoidalblutung.....	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie	1
1.1.2 Pathogenese	1
1.1.3 Klinische Symptome der SAB	4
1.1.4 Diagnostik	5
1.1.5 Klassifikation der SAB	7
1.1.6 Therapie	7
1.1.7 Komplikationen im Verlauf nach einer SAB.....	11
1.1.7.1 Vasospasmen und sekundäre Ischämien	11
1.2 Nimodipin	12
1.3 Nanopartikel.....	13
1.3.1 Ultraschallgesteuerte Medikamentenfreisetzung	14
1.4 Hintergrund der Dissertation.....	15
1.4.1 Rationale der Arbeit.....	15
1.4.2 Umsetzung	16
2 Materialien und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Software	19
2.2 Methodik	20
2.2.1 <i>In-vitro</i> -Experimente	20
2.2.1.1 Herstellung von Mizellen	20
2.2.1.2 Herstellung Nimodipin-beladener Mizellen	20
2.2.1.3 Morphologische Untersuchung der Mizellen	21
2.2.1.4 <i>In-vitro</i> -Wirkstofffreisetzung aus Nimodipin-beladenen Mizellen... ..	22
2.2.1.5 Spontane Nimodipin-Freisetzung aus den Mizellen.....	22
2.2.1.6 Gezielte Nimodipin-Freisetzung durch Ultraschallanwendung	23
2.2.2 <i>In-vivo</i> -Experimente	24
2.2.2.1 Vasospasmeninduktion durch Ultraschallanwendung im CAM-Modell	24
2.2.2.2 Vorbereitung des CAM-Modells.....	24
2.2.2.3 Vasospasmusinduktion	26
2.2.2.4 Qualitative und quantitative Auswertung der Vasospasmen.....	26
2.2.2.5 <i>In-vivo</i> -ultraschallinduzierte Nimodipin-Freisetzung von den Mizellen	27

2.2.2.6	Wirkung von Nimodipin (pur, verdünnt) auf die CAM-Gefäße - Kontrollgruppe	27
2.2.2.7	Wirkung der Nimodipin-beladener Mizellen auf die CAM-Gefäße in Abwesenheit von Vasospasmen (+/- Ultraschall) – Behandlungsgruppe ohne Vasospasmen	27
2.2.2.8	Wirkung der Nimodipin-beladener Mizellen auf die CAM-Gefäße in Gegenwart von Vasospasmen (+/- Ultraschall) – Behandlungsgruppe mit Vasospasmen	28
2.2.3	Statistik	28
3	Ergebnisse	29
3.1	<i>In-vitro</i> -Experimente	29
3.1.1	Herstellung nicht-beladener Mizellen.....	29
3.1.2	Herstellung Nimodipin-beladener Mizellen	29
3.1.3	Spontane Nimodipin-Freisetzung	32
3.1.4	Gezielte Nimodipin-Freisetzung durch Ultraschallanwendung.....	32
3.2	<i>In-vivo</i> -Experimente.....	33
3.2.1	Vasospasmeninduktion im CAM-Modell durch Ultraschallanwendung..	33
3.2.2	Reine Nimodipin-Wirkung auf die CAM-Gefäße - Kontrollgruppe	36
3.2.3	Wirkung Nimodipin-beladener Mizellen auf die CAM-Gefäße in Abwesenheit von Vasospasmen (+/- Ultraschall) – Behandlungsgruppe ohne Vasospasmen	36
3.2.4	Wirkung Nimodipin-beladener Mizellen auf die CAM-Gefäße in Gegenwart von Vasospasmen (+/- Ultraschall) – Behandlungsgruppe mit Vasospasmen	38
4	Diskussion.....	40
4.1	Experimentelle Vasospasmeninduktion und Evaluation.....	40
4.1.1	Evaluation von Vasospasmen im murinen SAB-Modell.....	40
4.1.2	Evaluation von Vasospasmen im SAB-Modell bei der Ratte.....	42
4.1.3	Evaluation von Vasospasmen im CAM-Modell.....	43
4.1.4	Limitationen des CAM-Modells.....	45
4.2	Gezielte Wirkstofffreisetzung des Nimodipins aus den Mizellen.....	46
4.2.1	Limitationen der Wirkstofffreisetzung durch Ultraschallanwendung	47
5	Zusammenfassung	50
6	Literaturverzeichnis	52

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prädilektionsstellen der Aneurysmen	4
Abbildung 2: Diagnostisches CCT	6
Abbildung 3: Diagnostische Angiographie.....	6
Abbildung 4: Intraoperative mikroskopische Bilder	9
Abbildung 5a: Planung des interventionellen Prozederes	10
Abbildung 5b: Planung und Coiling	10
Abbildung 6: Komplikationen nach SAB	11
Abbildung 7: Herstellung Nimodipin-beladener Mizellen	21
Abbildung 8: Versuchsaufbau unter dem Mikroskop.....	25
Abbildung 9: Schematischer Versuchsaufbau	25
Abbildung 10: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs	26
Abbildung 11: Morphologie der nicht-beladenen Mizellen	31
Abbildung 12: Morphologie der Nimodipin-beladenen Mizellen	31
Abbildung 13: Freisetzungsprofil von Nimodipin.....	33
Abbildung 14: Vasospasmusverlauf nach Induktion	34
Abbildung 15: Videomikroskopische Beobachtung.....	35
Abbildung 16: Auswertung des Kontrollkollektivs	36
Abbildung 17: Auswertung des Kollektivs <u>ohne</u> Vasospasmus, <u>ohne</u> Ultraschall..	37
Abbildung 18: Auswertung des Kollektivs <u>ohne</u> Vasospasmus, <u>mit</u> Ultraschall	37
Abbildung 19: Gefäßdurchmesser <u>ohne</u> Ultraschallanwendung	38
Abbildung 20: Gefäßdurchmesser <u>nach</u> Ultraschallanwendung.....	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PHASES-Score	3
Tabelle 2: 5-Jahres-Rupturrisiko nach dem PHASES-Score.....	3
Tabelle 3: Einteilung des Schweregrads der SAB nach Hunt und Hess.....	7
Tabelle 4: Einteilung des Schweregrads der SAB nach WNFS	7
Tabelle 5: Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien.....	17
Tabelle 6: Chemikalien und Medien.....	18
Tabelle 7: Puffer und Lösungen.....	18
Tabelle 8: Strukturformel der Materialien	19
Tabelle 9: Software	19
Tabelle 10: Experimentensetting zur Herstellung der Mizellen	20
Tabelle 11: Probenvorbereitung für die TEM-Analyse	22
Tabelle 12: Mizellengröße	29
Tabelle 13: Qualitative Beurteilung der Mizellen	30
Tabelle 14: Stabilität der Mizellen.....	30

Abkürzungsverzeichnis

a.u.	<i>arbitrary unit</i>
ACA	Arteria cerebri anterior
ACI	Arteria carotis interna
aSAB	aneurysmatische Subarachnoidalblutung
BA	Arteria basilaris
BRAT	Barrow Ruptured Aneurysm Trial
CCT	Craniale Computertomographie
CTA	Computer-Angiographie
DCI	<i>delayed cerebral ischemia</i>
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DI	<i>deionized water</i>
DL	<i>drug loading</i>
DSA	Digitale Subtraktionsangiographie
EE	<i>entrapment efficiency</i>
EVD	Externe Ventrikel Drainage
Hb	Hämoglobin
ICP	Intrakranielle Druck
KHK	Koronare Herzkrankheit
MAD	Mittlerer arterieller Druck
MCA	Arteria cerebri media
MVD	<i>mean vessel diameter</i>
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
PD	<i>precipitated drug</i>
SAB	Subarachnoidalblutung
TCD	Transkranieller Druck
TEM	Transelektronenmikroskop
TPA	Wolframatophosphorsäure
w/v	Verhältnis Gewicht zu Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

„Liquere hoc tibi, Lucili, scio, neminem posse beate vivere, ne tolerabiliter quidem, sine sapientiae studio, et beatam vitam perfecta sapientia effici, ceterum tolerabilem etiam inchoata. Sed hoc quod liquet firmandum et altius cotidiana meditatione figendum est: plus operis est in eo ut proposita custodias quam ut honesta proponas. Perseverandum est et assiduo studio robur addendum, donec bona mens sit quod bona voluntas est.“

SENECA, EPISTULAE MORALES AD LUCILIUM 16 (1, 3-5)

1 Einleitung

1.1 Subarachnoidalblutung

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Bei der Subarachnoidalblutung (SAB) handelt es sich um eine akut einsetzende intrakranielle Blutung in den mit Liquor gefüllten Raum zwischen *Arachnoidea* und *Pia mater*. Nach ihrer Ätiologie wird die SAB in traumatische und nicht traumatische (spontane SAB) unterteilt. In 60 – 90 % der polytraumatisierten Patienten liegt ein Schädelhirntrauma vor. Bei 40 % dieser Patienten lässt sich in der initialen Bildgebung eine traumatische SAB (Zylka-Menhorn 1996; Lier et al. 2005; Steudel et al. 2005; Maegele et al. 2011) feststellen. Die spontane SAB macht 5 % aller Schlaganfälle aus (van Gijn et al. 2007). In Mitteleuropa und den Vereinigten Staaten wird die jährliche Inzidenz der spontanen SAB auf 6 – 9/100 000 Personen geschätzt (Steinmetz et al. 2015). Frauen sind von einer spontanen SAB häufiger betroffen als Männer (Poeck und Hacke 2006). Innerhalb der letzten Jahre ist die 30-Tage-Letalität der spontanen SAB von vormals 50 % auf 35 % gesunken, die Morbidität ist allerdings weiterhin hoch (Feigin 2005; Connolly et al. 2012; Steiger et al. 2015).

1.1.2 Pathogenese

Die Ruptur eines intrakraniellen Aneurysmas ist mit 85 % die häufigste Ursache der spontanen SAB (van Gijn et al. 2011). In diesen Fällen sprechen wir von einer aneurysmatischen SAB (aSAB), die von der nicht-aneurysmatischen SAB zu unterscheiden ist. Letztere tritt in etwa 15 % der Fälle auf und wird unter anderem durch Ruptur einer arteriovenösen Malformation (AVM) oder einer duralen arteriovenösen Fistel (dAVF) verursacht. Eine Sonderstellung nimmt die perimesenzephalale oder präpontine SAB ein. Diese ist hinsichtlich ihrer Ausdehnung auf die präpontine Zisterne begrenzt ist und hat mutmaßlich eine primär venöse Blutungsquelle zur Ursache (van Gijn et al. 2011).

Wesentliche Risikofaktoren für die Entstehung eines zerebralen Aneurysmas sind Nikotinabusus, Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie und Alkoholkonsum (Athanasios et al. 2017). Weitere prädisponierende Faktoren sind neben erworbenen Gefäßveränderungen durch Arteriosklerose oder Entzündungsprozesse auch kongenitale Strukturchwäche der Gefäßwand, wie sie bei Bindegewebserkrankungen (Ehlers-Danlos-Syndrom, Marfan-Syndrom) zu finden sind.

Infolge erhöhter Druckbeanspruchung der Gefäße im Rahmen eines bestehenden arteriellen Hypertonus kommt es zu einer Ektasie der Gefäßwände (Athanasios et al. 2017; Steinmetz et al. 2012). Dieser Mechanismus erklärt, warum insbesondere Gefäßgabelungen, die einer strömungsmechanischen Mehrbelastung ausgesetzt sind, Prädilektionsstelle eines Aneurysmas darstellen (Poeck und Hacke 2006). Bei den zerebralen Aneurysmen werden sakkuläre, fusiforme und mykotische Aneurysmen unterschieden (Poeck und Hacke 2006; Wiebers et al. 2003). Zu lokalisieren sind 80 – 85 % der Aneurysmen im vorderen Kreislauf des Circulus arteriosus Willisii. Folgende Lokalisationen sind in absteigender Häufigkeit zu nennen: A. communicans anterior und A. cerebri anterior (40 – 45 %), A. carotis interna (15 – 20 %), A. cerebri media (15 – 20 %) sowie A. communicans posterior, A. basilaris und A. vertebralis (etwa 15 %) (Abbildung 1, Poeck und Hacke 2006).

Einige Risikofaktoren für die Ruptur von zerebralen Aneurysmen sind bereits identifiziert worden: Greving et al. (2014) erstellte hierzu über eine Analyse von sechs prospektiven Kohortenstudien den PHASES-Score zur Evaluation des individuellen Rupturrisikos von nicht-rupturierten Aneurysmen. Prädiktoren für eine Ruptur sind neben Patientenalter, geografische Lage und Hypertonus u.a. auch stattgehabte SAB, Aneurysmagröße und Aneurysmalage. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren kann das 5-Jahres-Rupturrisiko einschließlich Morbidität und Mortalität abgeschätzt werden (Tabellen 1, 2).

Tabelle 1. PHASES-Score (Mariß und Maurer 2018).

Risikofaktor	Punkte
(P) Geografische Herkunft	
Nordamerika, Europa (ohne Finnland)	0
Japan	3
Finnland	5
(H) Arterielle Hypertonie	
nein	0
ja	1
(A) Alter	
< 70 Jahre	0
≥ 70 Jahre	1
(S) Größe des Aneurysmas	
< 7,0 mm	0
7,0–9,9 mm	3
10,0–19,9 mm	6
≥ 20 mm	10
(E) Stattgefundene SAB eines anderen Aneurysmas	
nein	0
ja	1
(S) Aneurysma Lokalisation	
A. carotis interna	0
A. cerebri media	2
A. cerebri anterior/A. communicans posterior/hinterer Kreislauf	4

Die Summe der vergebenen Punkte für jeden Faktor ergibt den PHASES-Score (Spannbreite 0-22 Punkte).

Tabelle 2. 5-Jahres-Rupturrisiko nach dem PHASES-Score (Mariß und Maurer 2018).

Punktezahl PHASES-Score	5-Jahres-Rupturrisiko in % (Spannbreite)
≤ 2	0,4 (0,1–1,5)
3	0,7 (0,2–1,5)
4	0,9 (0,3–2,0)
5	1,3 (0,8–2,4)
6	1,7 (1,1–2,7)
7	2,4 (1,6–3,3)
8	3,2 (2,3–4,4)
9	4,3 (2,9–6,1)
10	5,3 (3,5–8,0)
11	7,2 (5,0–10,2)
≥12	17,8 (15,2–20,7)

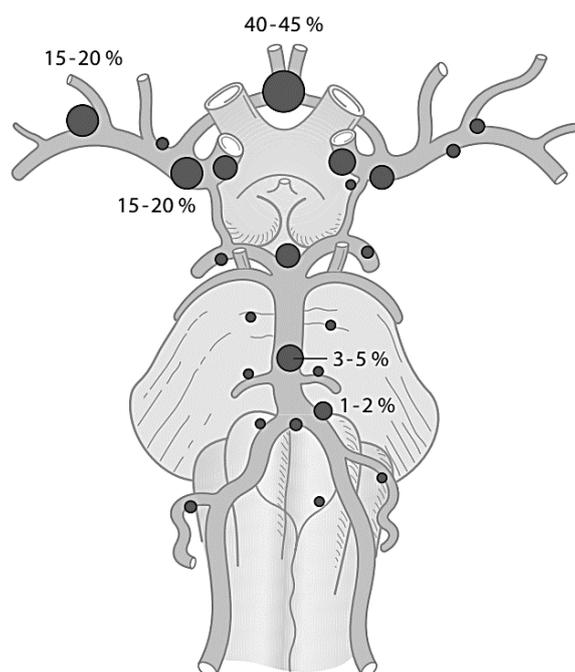


Abbildung 1. Prädisloktionsstellen. Prädisloktionsstellen von Aneurysmen im Bereich des Circulus arteriosus Willisii an Aufzweigungen der Arterien (Poeck und Hacke 2006, mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags).

1.1.3 Klinische Symptome der SAB

Akutes Leitsymptom der SAB ist der plötzlich einsetzende Vernichtungskopfschmerz, der häufig in den Nacken und/oder Rücken ausstrahlt (Athanasios et al. 2017). Auch vegetative Symptome, u.a. Übelkeit, Erbrechen oder eine Bewusstseinsstörung stellen sich zumeist begleitend ein. Weiteres Kardinalsymptom ist der Meningismus, der durch eine meningeale Reizung, u.a. durch die Steigerung des intrakraniellen Druckes, verursacht wird. Über 90 % der von einer SAB Betroffenen weisen elektrokardiographische Veränderungen auf (Athanasios et al. 2017), diese Veränderungen des Herz-Kreislaufsystems sind Ausdruck einer Störung der neuro-kardialen Interaktionen (Athanasios et al. 2017). Häufig führen diese Veränderungen im Rahmen der Notfalldiagnostik zur Verdachtsdiagnose eines Herzinfarktes, die konsekutiv in eine verzögerte neurologische Diagnostik mündet und die Prognose der Patienten beeinträchtigen kann (Rose 2011; van Gijn et al. 1982). Auch neurologische Defizite oder epileptische Anfälle können zum Zeitpunkt der Manifestation einer SAB auftreten (van Gijn et al. 1982).

1.1.4 Diagnostik

Besteht der klinische Verdacht auf eine SAB, ist die native craniale Computertomographie (CCT) die diagnostische Methode der ersten Wahl. Liegt eine SAB vor, stellt sich diese typischerweise hyperdens mit Ausdehnung in den basalen Zisternen dar. In einzelnen Fällen kommt es zum begleitenden Einbruch der Blutung ins Hirnparenchym und/oder in das Ventrikelsystem. Die CCT hat zum Zeitpunkt des Blutungsereignisses eine hohe Sensitivität von 95 % für die Diagnosestellung einer SAB (Abbildung 2) (Verma et al. 2013). Sofern nur eine leichte Blutung (*minor leak*) vorliegt, die als solche mittels CCT nicht darstellbar ist (sog. CCT-negative SAB), jedoch der klinische Verdacht besteht, sollte im nächsten Schritt eine Lumbalpunktion zum Ausschluss einer SAB erfolgen (Athanasios et al. 2017). Die spektrometrische Bilirubinbestimmung und der Nachweis von Siderophagen im Liquor können hierbei diagnostisch zielführend sein. Der Nachweis von drei Gläserproben blutigen Liquors gilt dabei als beweisend für das Vorliegen einer SAB. Darüber hinaus ist die Lumbalpunktion nützlich, um wesentliche Differenzialdiagnosen (bspw. einer Meningitis) auszuschließen (Verma et al. 2013).

Mit zunehmender, zeitlicher Latenz zum Blutungsereignis fällt die Sensitivität der CCT deutlich ab, nach einer Woche ist sie nur noch bei etwa der Hälfte der Patienten positiv (Athanasios et al. 2017). In diesen Fällen kann eine Magnetresonanztomographie (cMRT) hilfreich sein, wobei die Blutabbauprodukte sowohl in den T1- als auch in T2-gewichteten Sequenzen eine Signalanhebung aufweisen (Poeck und Hacke 2006). Der Goldstandard zur Detektion des Aneurysmas und der Darstellung der Blutungsquelle ist die digitale Subtraktionsangiographie (DSA) (Wiebers et al. 2003). Sie dient gleichzeitig als Grundlage für die Planung des Aneurysma-Verschlusses (Athanasios et al. 2017; Poeck und Hacke 2006).

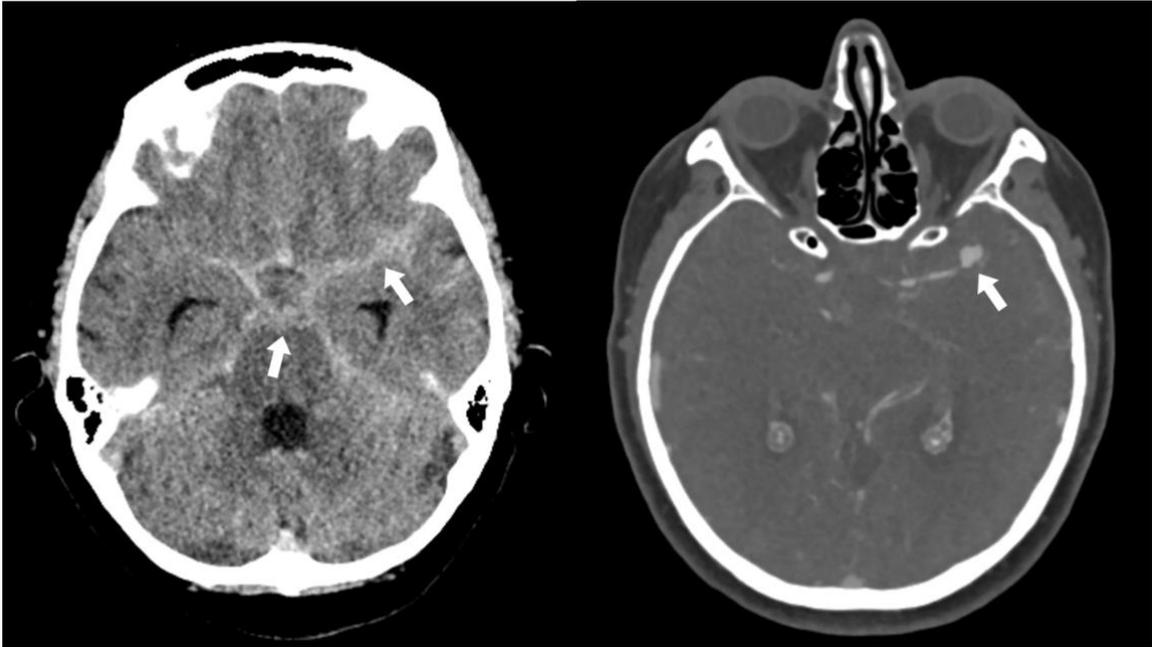


Abbildung 2. Diagnostisches CCT. a. CCT: Links betonte SAB mit sichtbarem Blut in der Sylvischen Fissur links und in den basalen Zisternen. b. CTA: Sakkuläres Mediabifurkationsaneurysma (7 x 6,8 x 4,5mm) links (Pfeil). (Mit freundlicher Genehmigung der Abteilung für Neuroradiologie der UMG).

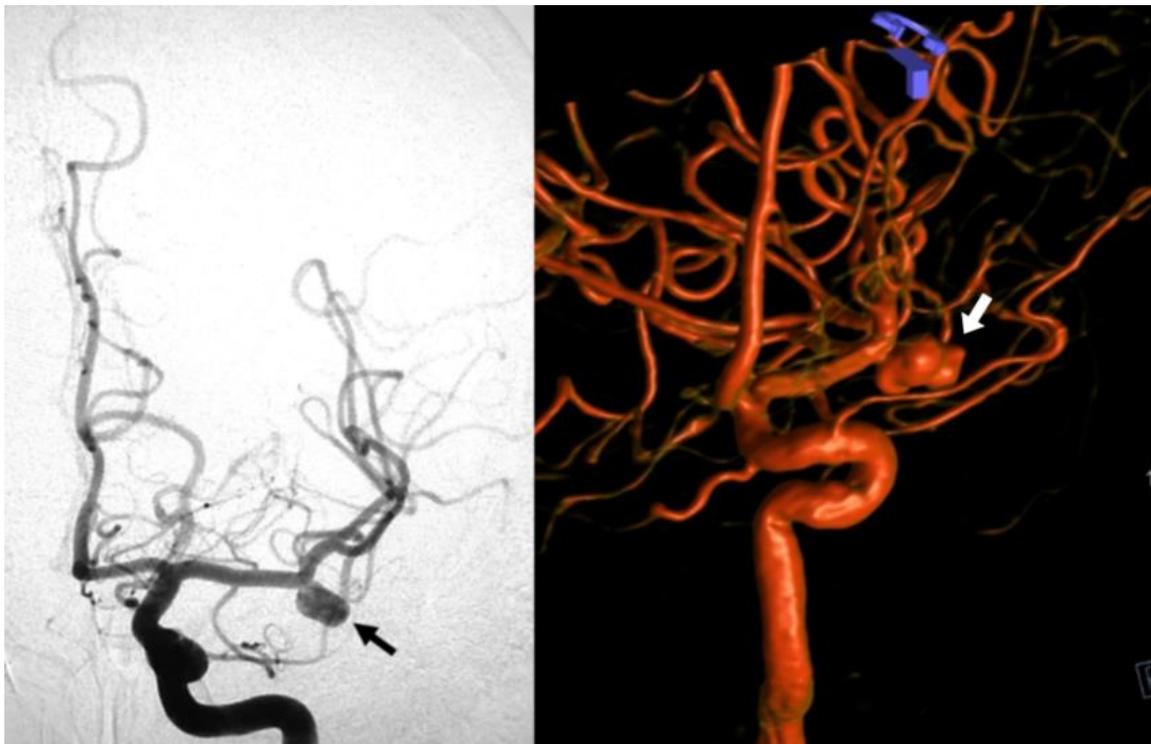


Abbildung 3. Diagnostische Angiographie. a. DSA in antero-posteriorer Projektion mit Nachweis eines 8 x 5 mm großen sakkulären Mediabifurkationsaneurysmas links. b. DSA-Rekonstruktion: 3D-Rekonstruktion mit Darstellung des Mediabifurkationsaneurysmas in lateraler Projektion. (Mit freundlicher Genehmigung der Abteilung für Neuroradiologie der UMG).

1.1.5 Klassifikation der SAB

Die Einteilung des klinischen Schweregrads der SAB erfolgt anhand der Klassifikation nach Hunt und Hess (Tabelle 3). Die Graduierung der SAB ist von prognostischer Bedeutung. Je niedriger der initiale Schweregrad, desto höher ist die Überlebensrate und desto größer sind die Genesungschancen (Poeck und Hacke 2006; Frontera et al. 2007). Gebräuchlicher ist heutzutage die Klassifikation der World Federation of Neurosurgical Societies (WFNS). Sie richtet sich nach dem Glasgow Coma Scale (GCS), einem Bewertungsschemata für Bewusstseins- und Hirnfunktionsstörungen nach einem erlittenen Schädel-Hirn-Trauma. Dieser unterscheidet wiederum fünf Grade (Tabelle 4).

Tabelle 3. Einteilung des Schweregrads der SAB nach Hunt und Hess (Poeck und Hacke 2006).

Grad	Kriterien
I	Asymptomatisch, leichte Kopfschmerzen, leichter Meningismus
II	Starke Kopfschmerzen, Meningismus
III	Somnolenz, Verwirrtheit, leichte Fokalneurologie
IV	Sopor, mäßig bis schwere Hemiparese, vegetative Störungen
V	Koma, Zeichen der Einklemmung

Tabelle 4. Einteilung des Schweregrads der SAB nach WFNS (Mariß und Maurer 2018).

Grad	GCS	Begleitendes Defizit
0	15	Nicht-rupturiertes Aneurysma, kein motorisches Defizit
I	15	Kein motorisches Defizit
II	13-14	Kein motorisches Defizit
III	13-14	Motorisches Defizit vorliegend
IV	7-12	Mit oder ohne motorisches Defizit
V	3-6	Mit oder ohne motorisches Defizit

1.1.6 Therapie

Da es sich bei einer SAB um einen akuten medizinischen Notfall handelt, sollten die Betroffenen einer sofortigen Behandlung in einem neurovaskulären Zentrum zugeführt werden. Van Lieshout et al. (2017) bewies, dass mit verlängerter zeitlicher Latenz zwischen dem initialen Auftreten der Symptome und dem Eintreffen in einem neurovaskulären Zentrum, die Mortalität signifikant ansteigt. Gründe für verlängerte Transportzeiten sind neben Erstvorstellungen in Krankenhäusern ohne neurochirurgische Versorgungszentren, auch fehlgeleiteten Verdachtsdiagnosen wie beispielsweise einer kardialen Ursache der Symptome. Gerade die Diagnose der koronaren Herzkrankheit (KHK), wie eingangs erwähnt, führt dabei zu einem Anstieg der Mortalität auf bis zu 75 % (Van Lieshout et al.

2017). Der Behandlungsalgorithmus von Patienten mit noch nicht ausgeschalteter Blutungsquelle zielt primär darauf, Nachblutungen, lebensbedrohliche Komplikationen und Folgeschäden zu verhindern bzw. diese zu reduzieren. Alle Patienten werden daher einer intensivmedizinischen Überwachung unterzogen. Diese erfolgt mittels kontinuierlicher Überwachung der Vitalparameter und der permanenten Erfassung des neurologischen Status, u.a. durch Überprüfung der Vigilanz und des Pupillenstatus (Athanasios et al. 2017). Bei erhöhtem intrakraniellm Druck wird zur Neuroprotektion eine Sedierung angestrebt. Außerdem wird Bettruhe mit einer Oberkörperhochlagerung und die Vermeidung körperlicher Belastung empfohlen (Poeck und Hacke 2006; Steinmetz et al. 2012). Entscheidend ist zudem, Blutdruckspitzen von >160 mmHg systolisch zu verhindern, um das Risiko der frühen Nachblutung zu minimieren. Die Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) sieht daher vor, bis zur finalen Versorgung des Aneurysmas den mittleren arteriellen Blutdruck (MAD) auf einen Zielwert von 60–90 mmHg zu bringen. Weiteres Therapieziel ist neben der Aufrechterhaltung der Normoglykämie und Normovolämie auch der Ausgleich von Elektrolytstörungen (Steinmetz et al. 2012).

Nach angiografischem Nachweis eines Aneurysmas als Blutungsquelle ist eine frühzeitige Versorgung dessen indiziert, um das Risiko einer Nachblutung zu begrenzen (Kassell et al. 1990). Empfohlen wird ein frühes Ausschalten des Aneurysmas innerhalb der ersten 72 Stunden nach Aneurysma Ruptur (Kassell et al. 1990; Mahaney et al 2011; Van Lieshout et al. 2017). Mit dem mikroneurochirurgischen Aneurysma-Clipping und dem endovaskulären Coiling stehen zwei Therapieoptionen zur Versorgung des Aneurysmas zur Verfügung. Das mikrochirurgische Clipping ist ein Verfahren, das erstmals 1937 durch Walter E. Dandy initiiert und über die Jahre im Zuge der Anwendung kontinuierlich optimiert wurde (Dandy 1938). Das Prinzip des Clippings besteht darin, einen chirurgischen Verschluss durch Anbringen eines Metallclips zu erzielen. Hierzu wird der Clip um den Hals des Aneurysmas positioniert (Abbildung 4) (Dandy 1938; Guglielmi et al. 1991). Das Coiling liegt in neuroradiologischer Hand: Platinspiralen (Coils) werden endovaskulär in das Aneurysma eingebracht, diese thrombosieren im Verlauf und schalten somit das Aneurysma funktionell aus (Abbildung 5) (Guglielmi et al. 1991).

Die Leitlinie der DGN empfiehlt, eine individuelle Therapieentscheidung nach interdisziplinärer Falldiskussion zwischen Neuroradiologen und Neurochirurgen unter Berücksichtigung verschiedener patientenspezifischer sowie Aneurysma-spezifischer Faktoren zu treffen (Steinmetz et al. 2012). Ziel ist eine langfristig anhaltende und vollständige Ausschaltung des Aneurysmas mit Elimination des Blutungsrisikos.

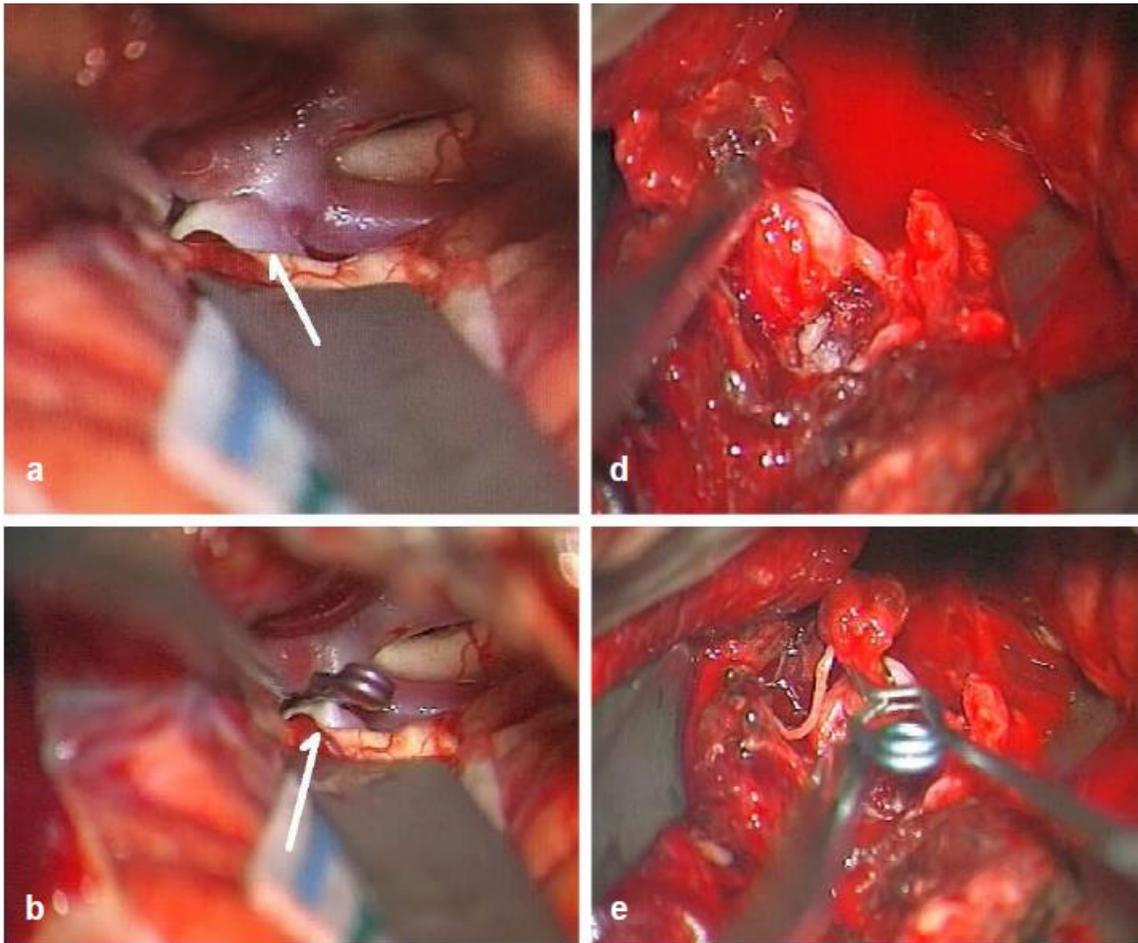


Abbildung 4. Intraoperative mikroskopische Bilder vom Clipping eines Aneurysmas. a. Operationssitus unter Mikroskop nach Präparation eines innozenten Aneurysmas der A. cerebri media ohne SAB vor dem Clipping; b. Operationssitus unter dem Mikroskop nach Clipping des Aneurysmas. c. Operationssitus nach Präparation eines rupturierten Aneurysmas der A. pericallosa mit SAB vor dem Clipping. d. Operationssitus nach Clipping des rupturierten Aneurysmas der A. pericallosa (Athanasios et al. 2017, mit freundlicher Genehmigung des Deutschen Ärzteblatts).

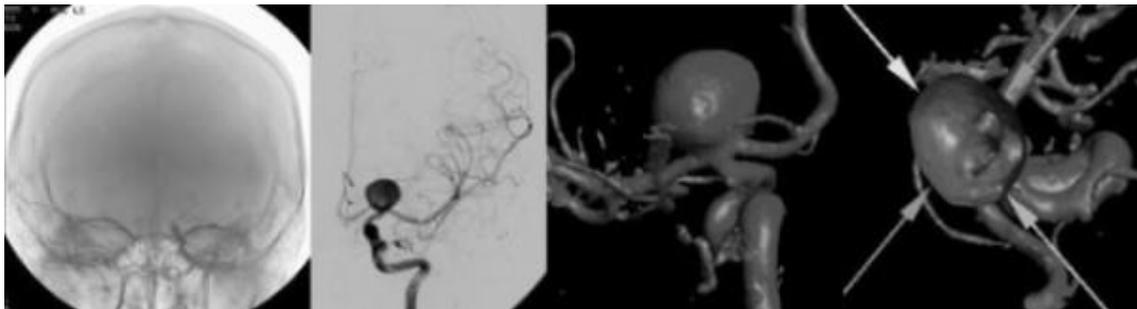


Abbildung 5a. Planung des interventionellen Prozederes (von rechts nach links): Angiographische Darstellung eines Basilariskopfaneurysmas. Subtraktionsangiographie. 3D-Rekonstruktion des Basilariskopfaneurysmas. (Mit freundlicher Genehmigung der Abteilung Neuroradiologie des Uniklinikums Düsseldorf).



Abbildung 5b. Planung und Coiling (von rechts nach links): Angiographische Darstellung eines Basilariskopfaneurysmas vor endovaskulärer Therapie. In der Arteria basilaris einliegender Katheter sowie erstes Absetzen eines Coils. Mit Coils vollständig „bepacktes“ Aneurysma. Angiographische Kontrollserie ohne Nachweis eines residuellen Blutflusses im Aneurysma. (Mit freundlicher Genehmigung der Abteilung Neuroradiologie des Uniklinikums Düsseldorf).

1.1.7 Komplikationen im Verlauf nach einer SAB

Der klinische Verlauf einer spontanen SAB wird durch Komplikationen erschwert, die mitunter ursächlich für die hohe Letalität des Krankheitsbildes sind. Folgende Komplikation treten häufig nach einer SAB auf: Nachblutung, Hydrozephalus und Vasospasmen (Abbildung 6).

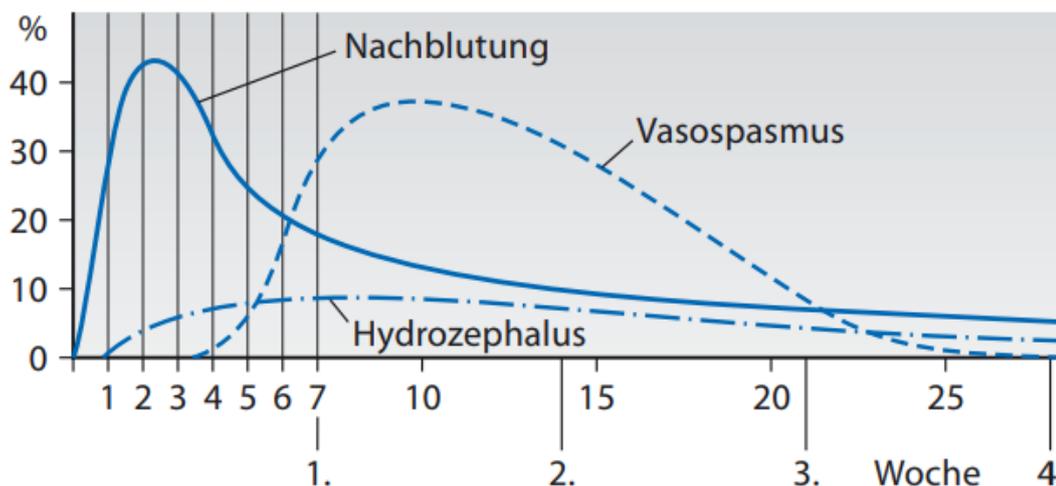


Abbildung 6. Darstellung der Häufigkeit und des Zeitpunkts von Komplikationen nach SAB (Poeck und Hacke 2006, mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags).

1.1.7.1 Vasospasmen und sekundäre Ischämien

Bei etwa 30–70 % der Patienten treten im Verlauf nach einer aSAB Vasospasmen auf. Das Häufigkeitsmaximum liegt im Zeitraum zwischen dem 4ten und 14ten Tag nach Blutungsereignis (Steinmetz et al. 2012). In circa 30 % der Fälle wird der Vasospasmus symptomatisch. Zerebrale Vasospasmen sind einer von multiplen Faktoren, die zu verzögerten zerebralen Ischämien führen können. Die verzögerte zerebrale Ischämie ist ein potenziell reversibler Prozess, der zu Infarkten mit permanenten neurologischen Defiziten führen kann, wenn diese nicht behandelt oder zu spät behandelt werden. Die Pathogenese der verzögerten zerebralen Ischämie ist multifaktoriell. Bisherige pathophysiologische Überlegungen fußen unter anderem auf folgende Mechanismen: Unter Einfluss von Blutabbauprodukten kommt es zur Freisetzung vasokonstriktiver Faktoren, die Vasospasmen evozieren. Diese bedingen eine Hypoperfusion und sekundäre ischämische Hirninfarkte. Die dabei diskutierten spasmogenen Substanzen kommen aus der Gruppe der Endotheline, Polypeptide, Plasmine sowie Prostaglandine (Steinmetz et al. 2012). Zum anderen werden lokale Entzündungsreaktionen an den Gefäßwänden für das Auftreten der Vasos-

pasmen verantwortlich gemacht. Dafür sprechen nachgewiesene Spiegel aktivierter Komplementfaktoren im Plasma und im Liquor der Betroffenen (Steinmetz et al. 2012). Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse viele experimenteller und klinischer Studien wurde der Begriff der verzögerten zerebralen Ischämie (DCI) etabliert (Athanasios et al. 2017). Diese werden als eine neu aufgetretene klinisch-neurologische Verschlechterung (Vigilanzminderung mit Abnahme von >2 Punkte auf der GCS und/oder fokale-neurologische Defizite wie Hemiparese oder Aphasie) nach Ausschluss anderer Ursachen definiert (Frontera et al. 2009).

1.2 Nimodipin

Die Leitlinien der DGN empfehlen die systemische Gabe von Nimodipin ab Aufnahmezeitpunkt des Patienten zur Vasospasmusprophylaxe und Verbesserung der klinischen Prognose (Steinmetz et al. 2015). Nimodipin ist das einzige Medikament mit nachgewiesenem, prognostischem Nutzen, sowohl zur Prophylaxe als auch in der Therapie der DCI (Dorhout et al. 2007; Vergouwen 2011). Nimodipin ist ein L-Typ-Kalziumantagonist aus der Gruppe der Dihydropyridine, das parenteral (Infusionslösung, 10 mg/50 ml) oder oral (Lacktablette, 30 mg) appliziert wird. Es handelt sich um ein stark lipophiles Racemat, welches die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und daher vorwiegend in der Neurologie und Neurochirurgie zum Einsatz kommt (Abernethy 1988). Nimodipin bewirkt eine Vasodilatation der zerebralen Gefäße durch Blockade der spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanäle. Infolgedessen wird der Ca^{2+} -Einstrom in die glatten Muskelzellen der Gefäße gehemmt und eine Herabsetzung des Muskeltonus evoziert (Abernethy 1988). Entsprechend kommt es zur Vasodilatation. Nach oraler Gabe kommt es zu einer raschen Resorption des Arzneistoffs. Bedingt durch den First Pass-Effekt beträgt die orale Bioverfügbarkeit von Nimodipin im Mittel nur 5–30 %, die Plasmahalbwertszeit liegt bei einer Stunde (Abernethy 1988). Nimodipin wird über das CYP3A4-Isoenzym in der Leber verstoffwechselt und zum Großteil renal ausgeschieden (Gengo et al. 1987). Ein Nachteil der systemischen Gabe des Kalziumantagonisten ist die arterielle Hypotonie. Diese kann die zerebrale Perfusion verschlechtern und infolgedessen ursächlich für ischämischer Schlaganfälle werden. Zur Umgehung dieser Gefahr, wurde in experimentellen Studien eine intrathekale Applikation induziert.

Die direkte intrathekale Gabe ermöglicht es, größere Mengen von Nimodipin in den Sub-

arachnoidalraum zu verabreichen, ohne dabei einen signifikanten Effekt auf den systemischen Blutdruck zu provozieren (Bilati et al. 2005).

1.3 Nanopartikel

Das Präfix „*nano*“ leitet sich aus dem Griechischen „*nanos*“ ab und bedeutet „*Zwerg, zwerghaft*“. Der Eigenname bezieht sich auf die Strukturgröße der Nanopartikel, die zwischen 1 und 100 nm liegt.

Nanopartikel können Arzneimittel enkapsulieren und die Wirksubstanz zum gewünschten Zielort transportieren. Hier erfolgt dann eine kontrollierte, kontinuierliche Wirkstofffreisetzung über einen definierten Zeitraum (Chow et al. 2008). Diese Technologie ist schon seit längerer Zeit Gegenstand klinischer und experimenteller Forschung, insbesondere im Bereich der Onkologie lassen sich hierzu schon aussichtsreiche Studien lesen (Chow et al. 2008; Kreuter et al. 1983).

Nanopartikel werden der Gruppe der festen kolloidalen Arzneistoffträger (Poloxamere) zugeordnet. Die Arzneistoffe können entweder in Cluster eingebettet oder an der Oberfläche der Nanopartikel gebunden werden. Synthetische Polymere oder natürliche Makromoleküle wie Proteine bilden die Ausgangsmaterialien für der Nanopartikel (Chow et al. 2008). Aufgrund der geringen Größe der nanoskalierten Trägersysteme (100 bis 200-fach kleiner als die Zellen des menschlichen Körpers) ist eine gezielte Anreicherung des Wirkstoffs in erkrankten Organen möglich. Diese gezielte Wirkstofflieferung kann durch oberflächliche Modifizierung der Trägersubstanzen mit biologisch aktiven Adhäsionsmolekülen - beispielsweise Antikörper oder Lektine - zusätzlich vereinfacht werden, um biologische Barrieren, wie die der Blut-Hirn-Schranke, zu überwinden (Langer et al. 2009).

Neben dem gerichteten Transport zum Einsatzort, muss auch die Freisetzung des Arzneistoffs vom Trägersystem in der notwendigen Dosis und zum richtigen Zeitpunkt sichergestellt werden, um die erwünschte pharmakologische Wirkung zu erzielen (Kreuter et al. 1983). Die Freisetzungskinetik des Wirkstoffs hängt dabei entscheidend von verwendetem Ausgangsmaterial des Trägersystems und der Art der Bindung an den Nanoträger ab. Bei der Einbettung des Arzneistoffs in den Nanopartikel, ist die Diffusion durch die Matrix die Voraussetzung für die Wirkstofffreisetzung. Dies bedingt im Gegensatz zur oberflächlichen Bindung an den Nanopartikel eine verlangsamte Freisetzung (Parisi et al. 2014). Die besonderen Eigenschaften der Nanopartikel liegen neben der Biokompa-

tibilität, der Bioabbaubarkeit und der Thermosensivität vor allem auch im geringen Nebenwirkungsspektrum und in der Unschädlichkeit. Aufgrund dieser Eigenschaften eignen sich Nanopartikel als Arzneimittel-Träger für nahezu jede Form der Applikation, sei es oral, intranasal, ocular oder parenteral (Lee et al. 2013; Schmolka 1972).

1.3.1 Ultraschallgesteuerte Medikamentenfreisetzung

Der von uns verwendete therapeutische Ultraschall (Physioson Expert 1 MHz multi frequency ultrasonic treatment system with power of 0,4 W, Physiomed Elektromedizin AG, Deutschland) mit Frequenzen von 1-3 MHz wirkt über seinen gekrümmten Transducer wie ein Brennglas. Die Bündelung der Schallwellen lässt einen konvergenten Strahl entstehen, dessen Energiedichte je nach Frequenz bis 1.7 W/cm^2 beträgt. Das im Fokus des Transducers stehende Gewebe kann über diesen Weg auf bis zu $100 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt werden (Kempe et al. 2009). Diese hohe Energie ist dabei präzise auf den Brennpunkt begrenzt, wobei in unmittelbar benachbarten Bereichen die Energie massiv abfällt. Das Anwendungsspektrum für den fokussierten Ultraschall ist breit gefächert. Je nach Therapieparameter (Schallart, Dosis, Behandlungsdauer) steht bei der Ultraschalltherapie eine andere Wirkung im Fokus. Zu der Vielzahl therapeutischer Optionen werden u.a. die Thermoablation zur Behandlung von Prostatakrebs, Stimulierung einer Frakturheilung und Schmerzlinderung gezählt (Kempe et al. 2009). Ein sich neu eröffnender Forschungsschwerpunkt des fokussierten Ultraschalls fällt in den Bereich der Sonodrugs (Van Gijn et al. 2011). Dabei werden nanoskalierte Systeme – mit Wirkstoffen beladene Nanopartikel – intravenös verabreicht. Sind diese beladenen Drug Carrier am Zielort angekommen, wird anschließend über gezielte niederfrequente MHz-Ultraschallimpulse eine Freisetzung des Wirkstoffes vom Nanopartikel (kontrollierte Wirkstofffreisetzung) induziert (Kempe et al. 2009). Der Vorteil dieser innovativen Technik liegt insbesondere in der Potenzierung der Wirkstofffreisetzung und –menge, der Reduktion der im Rahmen der Arzneimittelapplikation auftretenden Nebenwirkungen und der auf das zu behandelnde Organ fokussierten Therapie, die größere Heilungschancen verspricht.

1.4 Hintergrund der Dissertation

1.4.1 Rationale der Arbeit

Nimodipin ist bislang das einzige Medikament, das nachweislich nicht nur zerebralen Vasospasmen vorbeugt, sondern auch die funktionelle Prognose der Patienten nach einer SAB verbessert (Diringer et al. 2011). Die prophylaktischen und therapeutischen Effekte von oral verabreichtem Nimodipin sind jedoch durch eine geringe orale Bioverfügbarkeit limitiert. Ursächlich hierfür ist der dem Nimodipin eigenen hohen First-Pass-Effekt.

Die häufig unter Nimodipingabe auftretende arterielle Hypotonie, die eine Dosisreduktion oder Absetzen von Nimodipin nötig macht, unterbindet eine suffiziente intrathekale Nimodipinkonzentration (Sandow et al. 2016; Hernandez-Duran et al. 2019). Zur Überwindung dieser Limitation, ist die lokale, intrathekale Anwendung von Nimodipin zunehmend ins Zentrum der Forschung gerückt (Newton-II/III-Studie; Hänggi et al. 2012; Macdonald et al. 2012). Im Zuge dessen wurden auch Nanoträgersysteme entwickelt, in denen Nimodipin in Nanopartikeln gebunden wurde (Etminan et al. 2015). Diese innovative Technik birgt ein enormes therapeutisches Potential: Wie eingangs erwähnt gehen Nanoträgersysteme mit einer immensen Zunahme der Oberfläche einher. Man spricht auch von größeninduzierter Funktionalität (Chow et al. 2008). Block-Copolymere sind aufgrund ihrer Eigenschaften mit einem hydrophoben Kern (Reservoir) und mit umgebenden Polyethylenoxid-Ketten ideale Wirkstoffträger für hydrophobe Substanzen wie Nimodipin (Pampaloni et al. 2019). Zwar berichteten bereits verschiedene Studien über eine kontinuierliche intrathekale Wirkstofffreisetzung aus Nimodipin-beladenen Nanopartikeln (Etminan et al. 2015; Hänggi et al. 2017; Carlson et al. 2020), eine kontrollierte und bedarfsorientierte Wirkstofffreisetzung zum Zeitpunkt der Entwicklung von Vasospasmen ist allerdings noch nicht möglich. Das primäre Ziel dieser Studie war es, eine kontrollierte bedarfsorientierte Freisetzung von an Nanopartikeln gebundenem Nimodipin durch gezielte Ultraschallanwendung *in-vitro* und *in-vivo* zu etablieren. Prognostisch hat dies für die Prävention und Therapie von zerebralen Vasospasmen und verzögerter zerebraler Ischämie nach aSAB eine hohe klinische Relevanz.

1.4.2 Umsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung eines Nimodipin-beladenen Nanocarriers und die Evaluation einer gezielten Freisetzung unter Verwendung therapeutischen Ultraschalls. Hierzu wird zunächst die Bindung des Nimodipins an den Nanopartikeln etabliert. Anschließend erfolgt die Beurteilung der Ultraschall-gesteuerten Wirkstofffreisetzung. Bei dem verwendeten Nanopartikel handelt es sich um das Pluronic® F-127. Die Freisetzung des Nimodipins erfolgt kontrolliert mittels Ultraschallanwendung im niederfrequenten MHz-Bereich in einem *in-vitro*- und *in-vivo*-Setting. Mittels Dialyseverfahren wird dazu *in-vitro* die kontrollierte Freisetzung des Nimodipins untersucht. Das Ziel hierbei ist es, das geeignetste Verhältnis des dispersen Systems zu extrahieren und die probaten Modalitäten zur Ultraschall-gesteuerten Freisetzung zu bestimmen.

Darauf aufbauend erfolgt die *in-vivo*-Studie: Hierzu wird am embryonalen Ei ein experimenteller Vasospasmus evoziert. Zur Ermittlung der Auswirkungen auf den Vasospasmus, werden die beladenen Nanopartikel appliziert und die Wirkstofffreisetzung mittels Ultraschallanwendung kontrolliert induziert. Zum leichteren Verständnis werden im Folgenden die Materialien und Methoden, die Ergebnisse und Diskussionen für jeden Versuchsaufbau im Einzelnen beschrieben.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Tabelle 5. Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien.

Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	Produktionsfirma
Deionisiertes Aqua	Neurochirurgisches Labor, UMG Göttingen
Eierbecher	Karl Hammacher GmbH, Solingen
Embryonales Ei, Bresse Gauloise	Poulets-de-France, Hildesheim
Erlenmeyerkolben	Simax GmbH, Selb
Filterpapier, Chromatography Paper 3MM	Whatman, Maldstone
Inkubator BSS 420 Nürnberg	Grumbrach GmbH & Co.KG, Nürnberg
Innova 4000, Inkubator und Schüttler	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Leica® MC170 HD	Leica Kamera AG, Wetzlar
Leukotape®	BSN Medical, Hamburg
Massenspektrometer LC-MS 7 Göttingen	Klinische Chemie, UMG, Göttingen
NanoSight, LM10-HS vern	Malvern Instruments, Malvern
PARAFILM®	Pechiney Plastic Packaging, Ohio
PHYSIOSON-Expert	Physiomed ®, Paderborn
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
pluriStrainer®, 1µm mesh size	pluriSelect®, Leipzig
Präparationsnadel	Karl Hammacher GmbH, Solingen
Präparationsschere	Karl Hammacher GmbH, Solingen
Sonosid®	Asid Bonz GmbH, Herrenberg
Spectrum™ Labs Spectra/Por™ 6 3500 D MWCO	Fisher Scientific, Schwerte
TEM EM 10C	Zeiss, Oberkochen
TEM Grid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Vortex-Genie 2	Electro Scientific Industries, Portland
Zentrifugenröhrchen, 50ml	Fisher Scientific, Schwerte

Tabelle 6. Chemikalien und Medien.

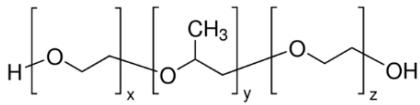
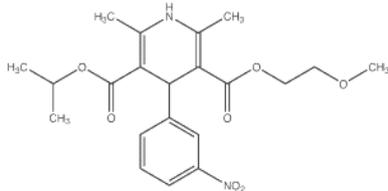
Chemikalien und Medien	Produktionsfirma
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Formaldehyd	BASF Corporation, New Jersey
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Methanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Nimodipin Pulver	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Nimotop® S	Bayer AG, Leverkusen
Phosphat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Pluronic® F127	BASF Corporation, New Jersey
Tween® 80	Fluka Chemicals Company, Seelze
Wolframphosphorsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Tabelle 7. Puffer und Lösungen.

Die Herstellung der Puffer und Lösungen erfolgt mit bidestilliertem Wasser.

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	Volumina
Dialysat	PBS	200 ml
	Tween 80®	0,1% w/v
Kontrolle	Nimotop S®	0,2 mg/mL
Negativfärbung	Wolframphosphorsäure	2,0 % w/v
PBS pH 7,4	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
15% Pluronic Lösung	Pluronic® F127	15 % w/v
	Deionisiertes Aqua	10 ml
	Nimodipin Pulver	2 mg
10% Pluronic Lösung	Pluronic® F127	10 % w/v
	Deionisiertes Aqua	10 ml
	Nimodipin Pulver	2 mg
5% Pluronic Lösung	Pluronic® F127	10 % w/v
	Deionisiertes Aqua	10 ml
	Nimodipin Pulver	2 mg

Tabelle 8. Strukturformel der Materialien.

Material	Strukturformel ^a	Konstitutionsformel ^a
Pluronic® F-127		$\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_x(\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3))_y(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_z\text{OH}$
Nimodipin		$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7$

^a Die Angaben wurden von dem Hersteller bezogen.

2.1.1 Software

Die in dieser Studie verwendete Software ist in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 9. Software.

Software	Application	Source
Fiji	Quantitative Messung der Gefäße der CAM	ImageJ
GraphPad Prism® 6.0	Statistische Analyse und Graphische Illustration	GraphPad Software Inc.
MS Office Excel 2010	Statistische Analyse und Graphische Illustration	Microsoft
MS Office Word 2010	Text, Editieren	Microsoft
NanoSight Tracking Analyse 2.3	Größe, Größenverteilung der Nanopartikel	Malvern Instruments

2.2 Methodik

2.2.1 *In-vitro*-Experimente

Die *In-vitro*-Versuche beinhalten die Herstellung von leeren sowie mit Nimodipin beladenen Mizellen und die gezielte Nimodipin Freisetzung von den Nanopartikeln durch Ultraschallanwendung.

2.2.1.1 Herstellung von Mizellen

Pluronic® F-127 Block-Copolymere wurden ohne zusätzliche Reinigung als Nanocarrier verwendet. Pluronic® F-127 ist ein Tri-Block-Copolymer aus Poly-Ethylen-Oxid und Poly-Propylen-Oxid (PEO-PPO-PEO) mit einem Molekulargewicht von 12600 Da (alle Angaben stammen vom Hersteller, Tabelle 5). Zur Herstellung der Mizellen wurde das von Sotoudegana et al. (2016) beschriebene Verfahren der direkten Auflösung verwendet. Unter kontinuierlichem Schütteln mittels Innova 4000 bei 100 U/min wurde Pluronic® F-127 in verschiedenen Konzentrationen (5 %, 10 %, 15 %) zu 10 ml deionisiertem Wasser gegeben. Die dispersen Phasen wurden anschließend drei Stunden bei 25 °C miteinander gemischt. Die Experimente wurden für jede, der in Tabelle 10 aufgeführten Bedingungen, dreimal wiederholt.

Tabelle 10. Experimentensetting zur Herstellung der Mizellen.

Experimente	Kondition	Pluronic® F-127 (% w/v)	Nimodipin [2mg/10ml]
Herstellung nicht-beladener Mizellen	K1	5	-
	K2	10	-
	K3	15	-
Herstellung Nimodipin-beladener Mizellen	K4	5	X
	K5	10	X
	K6	15	X

2.2.1.2 Herstellung Nimodipin-beladener Mizellen

Das Verfahren zur Herstellung von Nimodipin-beladenen Mizellen umfasste folgende Schritte: 1 - Herstellung Nimodipin-beladener Mizellen unter Verwendung der direkten Auflösungs-methode; 2 - Bestimmung der Einschlusskapazität (encapsulation efficiency, EE) der Polymere, des prozentualen Anteils des ausgefällten Wirkstoffs (precipitated drug, PD) und der Wirkstoffbeladung (drug loading, DL) (Abbildung 7, Sotoudegana et al. 2016).

Wie der Tabelle 8 zu entnehmen ist, wurde gleichzeitig jeweils eine definierte Menge Pluronic® F-127 (5 %, 10 %, 15 %) mit 2 mg Nimodipin-Pulver zu 10 ml deionisiertem Wasser gegeben. Anschließend wurde die Suspension bei 100 U/min für 3 Stunden bei Raumtemperatur (25 °C) gerührt. Danach wurde das ausgefällte Nimodipin durch Filtration (pluriStrainer® Filter, Maschenweite von 1 µM) von der Mizellensuspension getrennt. Die Filtersedimente wurden in 1 ml deionisiertes Wasser gelöst und zusammen mit der filtrierten Lösung für die Bestimmung der Partikelgröße, PD, EE und DL verwendet (Abbildung 7). Mittels fluorometrischen Assays (Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie) wurden die Anteile an freiem und verkapseltem Wirkstoff ohne vorherige Fällung gemessen. Hierzu wurden die Proben 1:1000 in 50/50 MeOH/H₂O verdünnt. Als interner Standard wurde D3-Trimipramin verwendet (200 µl Probe + 10 µl einer 1 mg/L-Lösung von D3-Trimipramin). Die Nimodipin-Konzentration wurde jeweils in der ungefilterten Suspension, im Filtrat und im Sediment gemessen.

$$DL (\%) = \frac{\text{Gewicht des Nimodipins}}{\text{Gewicht der beladenen Mizellen}} \times 100$$

$$EE (\%) = \frac{\text{Gewicht des Nimodipins}}{\text{Gewicht des Pluronic® F-127}} \times 100$$

$$PD (\%) = \frac{\text{Gewicht des Nimodipins in den Mizellen}}{\text{Gewicht des Pluronic® F-127 und des Nimodipins}} \times 100$$

Abbildung 7: Herstellung Nimodipin-beladener Mizellen. Bestimmung der Einschlusskapazität (EE), Ausgefällter Wirkstoff (PD) und Wirkstoffbeladungskapazität (DL) (Sotoudegana et al. 2016).

2.2.1.3 Morphologische Untersuchung der Mizellen

Die Morphologie der nicht-beladenen und der beladenen Mizellen wurde mittels Transelektronenmikroskopie (TEM) sowie mittels Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) evaluiert. Für die TEM-Untersuchungen erfolgte eine Negativfärbung mit Wolfram-Phosphorsäure (TPA): Dazu wurde eine Probe der Mizellensuspension in gleicher Menge mit TPA (2 % w/v) gemischt. Anschließend wurde ein Tropfen dieses Gemischs auf ein mit Pioloform beschichtetes Kupfergitter gegeben. Nach vollständiger Trocknung

wurde das benetzte Gitter unter dem TEM (Zeiss, EM10C) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV untersucht.

Die Partikelgröße und die Größenverteilung der arzneimittelbeladenen Mizellen wurden mittels NTA (NanoSight®, LM10-HS) bestimmt. Die Nanopartikel-Tracking-Analysen wurden bei einem Erfassungswinkel von 175°, einer Raumtemperatur von 25 °C und einer Analysedauer von 60 Sekunden durchgeführt. Aus Gründen der Reproduzierbarkeit erfolgte eine fünfmalige Wiederholung.

Zur Evaluation der Stabilität der Mizellen wurden die Lösungen zusätzlich für drei Monate bei Raumtemperatur und bei 4 °C gelagert. Zu definierten Zeitpunkten (1 Woche, 1 Monat und 3 Monate) wurden die Lösungen hinsichtlich ihrer Morphologie mittels TEM, ihrer Größe mittels NTA und ihrer Phasenstabilität anhand makroskopischer Veränderungen bewertet. Es wurden keine besonderen Vorkehrungen getroffen, um die Stabilität der Mizellen zu beeinflussen.

Tabelle 11. Probenvorbereitung für die TEM-Analyse.

Schritte	Materialien: Stammlösung der Probe (ca. 1mg/ml), etwas Parafilm, Wolframphosphoräure (2%) zum Kontrastieren, die Träger (Kupfergrid für TEM) und eine kleine saubere Brussel-Edelstahlpinzette vor.
I	Kontrastierung der Probe (1mg/ml) mit Wolframphosphoräure (2%) im Tube.
II	Deposit eines Grids auf den Parafilm (bei den Gittern muss die Kupferseite nach oben gerichtet sein). Gabe eines Tropfens von 15 µl. Probe 1 bis 2 Minuten eintrocknen lassen.
III	Trocknen der Probe mit einem Stück Löschpapier.
IV	Waschen des Grids mit 300µl deionisiertes Wasser und Trocknen der Probe mit Löschpapier.
V	Trocknen der Probe. Anschließend TEM-Analyse.

2.2.1.4 *In-vitro*-Wirkstofffreisetzung aus Nimodipin-beladenen Mizellen

2.2.1.5 Spontane Nimodipin-Freisetzung aus den Mizellen

Das Wirkstofffreisetzungprofil von gebundenem Nimodipin in polymeren Mizellen wurde mittels Dialyseverfahren untersucht. Dazu wurde der Dialysebeutel (Spectrum™ Labs Spectra/Por™ 6 3500 D MWCO) zunächst über 24 Stunden in deionisiertem Wasser getränkt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gekühlt. Um perfekte Sinkbedingungen für hydrophobe Substanzen zu generieren, wurde ein Dialysat hergestellt, welches sich aus 200 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Medium, pH 7,4, 0,2 M) und 0,1 %

w/v Tween80® zusammensetzt (Chiapetta et al. 2013; Batrakov et al. 2008). Jeweils 10 ml der Nimodipin-beladenen Mizellenlösung wurden für die weiteren Versuche in den Dialysebeutel gegeben. Der Dialysebeutel wurde anschließend mittels Clips an beiden Enden verschlossen und in das Dialysat gegeben. Das gesamte Setup wurde mittels Innova 4000 bei 100 U/min für 24 Stunden und 37 °C gerührt. Zu vorgegebenen Zeitpunkten (0, 5, 15 und 30 Minuten, 2 und 24 Stunden) wurde ein Aliquot von 300 µl aus dem Dissolutionsmedium entnommen. Die erhaltenen Proben wurden dann ohne weitere Verdünnung mittels Massenspektrometer analysiert. Die Menge der Wirkstofffreisetzung im Medium wurde über eine Kalibrierkurve berechnet. Eine hydroalkoholische Lösung von Nimodipin (Nimotop S®) mit einer Konzentration von 0,2 mg/ml diente als Kontrolle. Aus Gründen der Reproduzierbarkeit und zur Ermittlung eines validen Mittelwerts wurde die Analyse pro Bedingung dreimal durchgeführt.

2.2.1.6 Gezielte Nimodipin-Freisetzung durch Ultraschallanwendung

Die Ultraschallwellen wurden durch PHYSIOSON-Expert (Physiomed®) appliziert. Wie oben beschrieben, wurden 10 ml der verschiedenen Konzentrationen der Nimodipin-beladenen Mizellenlösung in die Dialysebeutel und in ein Dialysat aus 200 mL PBS-Medium und 0,1 % w/v Tween80® gegeben. Im Gegensatz zu den Experimentenreihen der spontanen Nimodipin Freisetzung wurde der Aufbau zur gezielten Freisetzung zunächst mit Ultraschall (kontinuierlicher Ultraschall mit einer Frequenz von 1 MHz und einer Intensität von 1,7 W/cm²) behandelt und anschließend noch einmal bei 100 U/min für 24 Stunden bei 37 °C gerührt. Die Ultraschall-Behandlung wurde mit einer Dauer von jeweils 30 bzw. 60 Sekunden durchgeführt. Danach wurde entsprechend der oben angegebenen Zeitpunkte (0, 5, 15 und 30 Minuten, 2 und 24 Stunden) jeweils ein Aliquot von 300 µl aus dem Dissolutionsmedium entnommen und ohne weitere Verdünnung mit dem Massenspektrometer untersucht. Anschließend wurde die Menge der Wirkstofffreisetzung im Medium via Kalibrierkurve gemessen. Das Experiment wurde für jede Bedingung dreimal wiederholt, um die Mittelwerte zu bestimmen. Aufgrund der hohen Viskosität der Mizellenlösung entschieden wir, die 15%ige Lösung im Hinblick auf die ultraschall-induzierte Freisetzung des Wirkstoffs nicht weiter zu untersuchen.

2.2.2 *In-vivo*-Experimente

Die *In-vivo*-Versuche beinhalten die Vasospasmeninduktion durch Ultraschallanwendung am CAM-Modell und die ultraschallinduzierte Nimodipin-Freisetzung von den Mizellen.

2.2.2.1 Vasospasmeninduktion durch Ultraschallanwendung im CAM-Modell

2.2.2.2 Vorbereitung des CAM-Modells

Zur Verwendung kamen weiße, befruchtete Eier der Hühnerrasse Bresse Gauloise (Poulets-de-France, Hildesheim, Deutschland). Unter Verwendung des Inkubators BSS 420, Artnummer 8301/01 (Grumbach®) erfolgte die vierzehntägige Bebrütung. An Tag 0 wurden die Eier bei 37,7 °C mit einer konstanten Luftfeuchtigkeit von 65 % unter stets konstanten Bedingungen bebrütet. An Tag 4 der Inkubation wurde gemäß einer von Leighton et al. beschriebenen Technik die Schale am unteren Pol, im Bereich der Luftkammer, durchstoßen. Das Fenster wurde mit Leukotape® fixiert und stabilisiert, dann mit einer feinen Nadel imprägniert und mit einer Schere gefensterter. Anschließend wurde das Ei bis zum nächsten Schritt mit transparentem Klebeband (Parafilm®) verschlossen. Am 13. Tag wurde das Klebeband entfernt. Nachdem das Überleben des Hühnerembryos sichergestellt war, starteten die Experimente. Hierzu wurden die Eier in einem Becher stabilisiert, die CAM wurde durch Abdecken mit einem Streifen Parafilm® geschützt (Abbildung 8, 9).

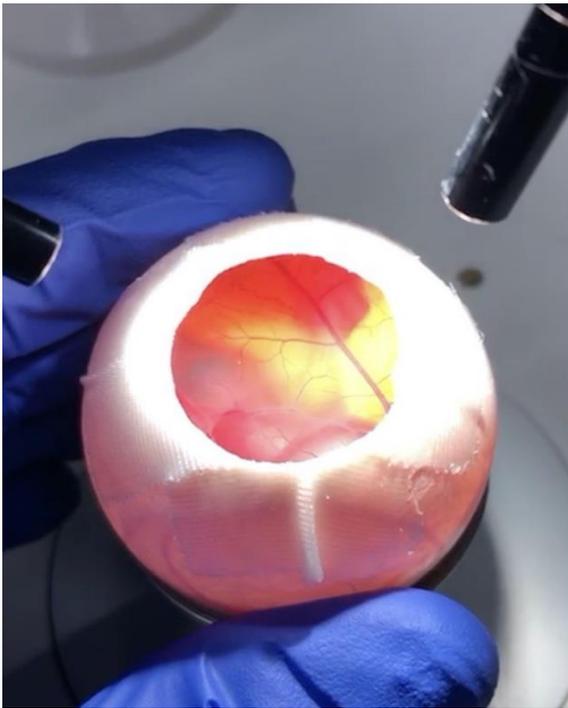


Abbildung 8. Versuchsaufbau unter dem Mikroskop. Gefensterter embryonales Ei mit makroskopischer Darstellung der CAM vor Vasopasmusinduktion.

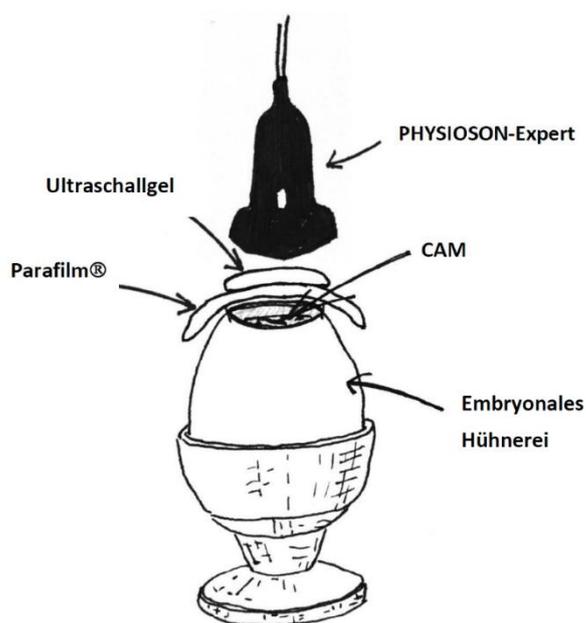


Abbildung 9. Schematischer Versuchsaufbau. Darstellung des Versuchsaufbaus am CAM-Modell.

2.2.2.3 Vasospasmusinduktion

Die *In-vivo*-Vasospasmus-Induktion im CAM-Modell (Abbildung 10) basiert auf der Anwendung von Ultraschall. Der Ultraschall (Physiomed®) fand dabei unter folgenden Konditionen Einsatz: Maximal wirksame Fläche der Ultraschallsonde 5 cm², kontinuierliche Ultraschallwellen, Frequenz von 3 MHz, Intensität von 1,0 W/cm². Am 13. Tag der Inkubation erfolgte die Vasospasmeninduktion via Ultraschallapplikation für 60 Sekunden. Thermostabiles Ultraschallgel (Sonosid®) wurde dazu auf das die CAM-schützende Tape gegeben (Abbildung 9, 10).

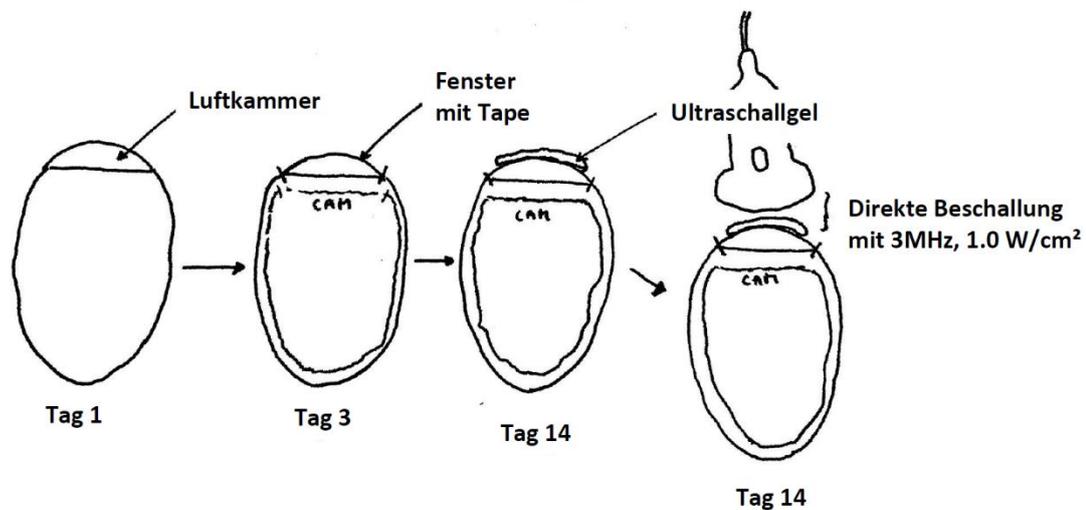


Abbildung 10. Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes. Versuchsaufbau zur Vasospasmusinduktion am CAM-Modell.

2.2.2.4 Qualitative und quantitative Auswertung der Vasospasmen

Die zeitlichen Veränderungen des Gefäßdurchmessers an der CAM wurden mit einer 5 Megapixel HD-Mikroskopkamera (Leica® MC170 HD) festgehalten. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit Fiji Image J (Fischer et al. 2010) zu prädefinierten Zeitpunkten (Abbildung 13). Da es sich um eine vergleichende Messung handelt und der absolute Wert methodisch schwer zu bestimmen ist, werden die Werte als willkürliche Einheit ausgedrückt, entsprechend definierten Standards (Olesen 1995). Der vor Vasospasmusinduktion gemessene Gefäßdurchmesser wurde als Maximum (100 %) definiert und eine dazu relative Verringerung des Gefäßdurchmessers über die Zeit erhoben: Der erfasste Zeitraum betrug 20 Minuten. Innerhalb dieses Zeitraums wurde im 1-Minutenintervall ein Bild aufgenommen, anhand dessen die mikroskopischen Veränderungen dokumentiert und quantitativ ausgewertet wurden. Die Bestimmung der Stelle, an der die Messung durchgeführt werden sollte, basierte auf dem makroskopischen Eindruck des

am stärksten ausgeprägten Vasospasmus. Die Messungen wurden nur an einem Gefäß, jeweils reproduzierbar an der gleichen Stelle, durchgeführt. Für die qualitative mikroskopische Bewertung wurde folgende Kriterien herangezogen: Beobachten einer Retraktion der umgebenden CAM und eines Aufplatzens von Gefäßen. Zusätzlich wurden makroskopische Untersuchungen durch Beobachtung des embryonalen Verhaltens (Veränderung der embryonalen Motilität) durchgeführt.

2.2.2.5 *In-vivo*-ultraschallinduzierte Nimodipin-Freisetzung von den Mizellen

Die ultraschallinduzierte Wirkstofffreisetzung umfasste drei Vorgänge: 1 - Bestimmung der reinen Nimodipin-Wirkung (Kontrolle) auf die CAM-Gefäße (unverdünntes Nimotop®, 1:50 verdünntes Nimotop®, deionisiertes Wasser), 2 - Bestimmung der Wirkung Nimodipin-beladener Mizellen auf die CAM-Gefäße in Abwesenheit von Vasospasmen (+/- Ultraschall), 3 - Bestimmung der Wirkung Nimodipin-beladener Mizellen auf CAM-Gefäße in Gegenwart von Vasospasmen (+/- Ultraschall).

Die ultraschallgesteuerte Wirkstofffreisetzung erfolgte mit demselben Gerät (PHYSIOSON-Expert (Physiomed ®)), das für die Vasospasmus-Induktion verwendet wurde, jedoch unter Anwendung anderer Geräteeinstellungen (kontinuierlicher Schall, Frequenz 1.0 MHz, Intensität 1,7 W/cm²). Die Ultraschall-Behandlung wurde mit einer Dauer von 60 Sekunden durchgeführt, da diese in den vorausgegangenen *In vitro* Versuchen eine effizientere Wirkstofffreisetzung gezeigt haben.

2.2.2.6 Wirkung von Nimodipin (pur, verdünnt) auf die CAM-Gefäße - Kontrollgruppe

Die Wirkung von unverdünntem Nimodipin S® 10 mg/50 ml, verdünntem Nimodipin S® 10 mg/50 ml (1:50 in deionisiertem Wasser) und deionisiertem Wasser auf die CAM wurde in einer Kontrollgruppe ohne Vasospasmen untersucht. Dazu wurde 1µl jeder Lösung direkt auf die CAM appliziert und die Wirkung auf die Gefäße in einminütigem Intervall über 20 Minuten mittels Life-Imaging via HD-Mikroskopkamera aufgezeichnet. Aus Gründen der Validität wurde der Versuch pro Bedingung drei Mal wiederholt.

2.2.2.7 Wirkung der Nimodipin-beladener Mizellen auf die CAM-Gefäße in Abwesenheit von Vasospasmen (+/- Ultraschall) – Behandlungsgruppe ohne Vasospasmen

In Abwesenheit von Vasospasmen bewerteten wir die Wirkung von Nimodipin-beladenen Mizellen unter den folgenden Bedingungen: 1 - Ohne ultraschallgesteuerte Freisetzung und 2 - mit ultraschallgesteuerter Freisetzung von Nimodipin aus dem Nanocarrier.

Die Experimente wurden unter Verwendung von Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (5 %, 10 % und 15 %) von Pluronic® F-127 durchgeführt. Pro Bedingung wurden zwei embryonale Eier getestet, wobei 1 µl jeder Lösung direkt auf die CAM aufgetragen wurde. Für Bedingung 1 wurden die Veränderungen an der CAM im 1-Minutenintervall in einem Zeitraum von 20 Minuten aufgezeichnet. Für Bedingung 2 haben wir zunächst 1 µl der Lösungen appliziert, dann ein Bild aufgenommen und anschließend die ultraschallgesteuerte Freisetzung des Medikaments mittels Ultraschalls (kontinuierlicher Schall, 1 MHz, 1.7 W/cm²) für 60 Sekunden durchgeführt. Es folgten Bildaufnahmen in einminütigen Abständen über einen Zeitraum von 20 Minuten.

2.2.2.8 Wirkung der Nimodipin-beladener Mizellen auf die CAM-Gefäße in Gegenwart von Vasospasmen (+/- Ultraschall) – Behandlungsgruppe mit Vasospasmen

Die Auswertung im Kollektiv mit Vasospasmus wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 1 - Ohne ultraschallgesteuerte Wirkstofffreisetzung und 2 - mit ultraschallgesteuerter Wirkstofffreisetzung. Sobald der maximale Vasospasmus sichtbar war, wurde 1 µl der Lösung appliziert, gefolgt von einer ultraschallgesteuerten Nimodipin-Freisetzung. Anschließend wurde die Nimodipinwirkung in einminütigen Intervallen bis zur 20. Minute hin beobachtet. Für jede Bedingung wurden drei embryonale Eier unter Verwendung von 5 % - und 10 % igen Lösungen untersucht. Nachdem die 15 % ige Lösung in den vorausgegangenen Versuchen eine starke Viskosität aufgewiesen hat, verzichteten wir in diesem Protokoll auf die Verwendung dieser Lösung.

2.2.3 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit der Statistiksoftware GraphPad Prism Version 9.0 durchgeführt. Ein p-Wert von <0,05 wurde als Signifikanzniveau angenommen. Alle Daten wurden als Mittelwert ± SD angegeben. Um die Vergleiche zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen zu validieren, wurde eine ANOVA-Analyse durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 *In-vitro*-Experimente

3.1.1 Herstellung nicht-beladener Mizellen

Die mittlere Größe der leeren Mizellen, gemessen via NTA, betrug $110 \text{ nm SD} \pm 10,6 \text{ nm}$ mit einer Spannweite von 92 bis 138 nm. Die mittels TEM gemessene mittlere Partikelgröße betrug $114 \text{ nm SD} \pm 7,5 \text{ nm}$, Spannweite von 90 bis 153 nm (Tabelle 12). Mit Zunahme der Konzentration von Pluronic® F-127 nahm die Größe der Mizellen ab, demnach besteht eine inverse Korrelation. Die leeren Pluronic® F-127-Blockcopolymer-Mizellen wiesen eine sphärische Morphologie mit unscharfen Kanten auf (Abbildung 12, 13). Weder die Partikelgröße noch die Morphologie der hergestellten Mizellen hat sich nach einer Woche, einem Monat oder nach drei Monaten verändert (Tabelle 14). Mit zunehmender Konzentration des Pluronic® F-127 wurde die Suspension jedoch zunehmend zähflüssiger und geleeartig (Tabelle 12). Nach drei Monaten zeigte sich ein biphasischer Zustand die Lösung, welcher sich über Schütteln wieder homogenisieren ließ.

Tabelle 12. Größe der nicht-beladenen und Nimodipin-beladenen Mizellen, gemessen mittels TEM und NTA.

Größenbestimmung				
	Kondition	Mizellengröße	Mizellengröße	p-Wert
		TEM Mean \pm SD in nm	NTA Mean \pm SD in nm	
Nicht-beladene Mizellen	K1	$153,4 \pm 7,2$	$138,5 \pm 18,2$	0,85
	K2	$100,2 \pm 9,1$	$98,8 \pm 7,9$	
	K3	$90,4 \pm 6,2$	$92,1 \pm 5,6$	
Nimodipin-beladene Mizellen	K4	$122,4 \pm 12,3$	$127,8 \pm 14,8$	0,84
	K5	$134,3 \pm 6,6$	$129,0 \pm 3,1$	
	K6	$157,0 \pm 7,1$	$149,3 \pm 5,6$	

3.1.2 Herstellung Nimodipin-beladener Mizellen

Die berechneten DL, EE und PD sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Während die EE bei allen drei Konditionen ähnlich war, wurde die niedrigste Ausfällungsrate in der 10 % igen Mizellenlösung (K5) gefunden. Die durchschnittliche Partikelgröße lag unter $<150 \text{ nm}$. Mit steigender Pluronic® F-127-Konzentration von 5 % auf 15 % stieg die Partikelgröße von 127 nm auf 149 nm (Tabelle 14, Abbildung 11) an. Es gab keinen signifikanten

Unterschied zwischen der mittels NTA und der via TEM (Tabelle 13, 15) gemessenen Partikelgröße (ANOVA-Test, $p = 0,85$). Die wirkstoffbeladenen Mizellen wiesen genauso wie die leeren Mizellen eine sphärische Form mit glatter Oberfläche auf (Abbildung 11,12). Sowohl die Größe als auch die Morphologie der Nimodipin-beladenen Mizellen sind im zeitlichen Verlauf stabil geblieben. Ähnlich wie bei den leeren Mizellen stieg mit zunehmender Konzentration von Pluronic® F-127 die Viskosität der Suspension Nimodipin-beladener Mizellen an.

Tabelle 13. Qualitative Beurteilung der Mizellen. Bestimmung der Einschlusskapazität (EE), Ausgefällter Wirkstoff (PD) und Wirkstoffbeladungskapazität (DL) von Nimodipin-beladenen Mizellen.

	Konditionen	DL (%)	EE (%)	PD (%)
Nimodipin-beladene Mizellen	K4	0,038	46	59,58
	K5	0,019	47	39,63
	K6	0,013	47	69,33

Tabelle 14. Stabilität der Mizellen, im kurz- und langfristigen Intervall (NTA).

Experiment	Kondition	1 Woche Größe Mean \pm SD in nm	1 Monat Größe Mean \pm SD in nm	3 Monate Größe Mean \pm SD in nm	p- Wert
Leere Mizellen	K1	138,5 \pm 18,2	147,3 \pm 12,2	142,6 \pm 10,8	0,98
	K2	98,8 \pm 7,9	100,2 \pm 6,3	97,8 \pm 8,1	
	K3	92,1 \pm 5,6	94,1 \pm 6,0	93,8 \pm 5,9	
Nimodipin-beladene Mizellen	K4	127,8 \pm 14,8	118,7 \pm 12,4	121,5 \pm 17,4	0,95
	K5	129,0 \pm 3,1	130,4 \pm 3,8	129,7 \pm 4,5	
	K6	149,3 \pm 5,6	147,5 \pm 7,5	154,3 \pm 8,1	

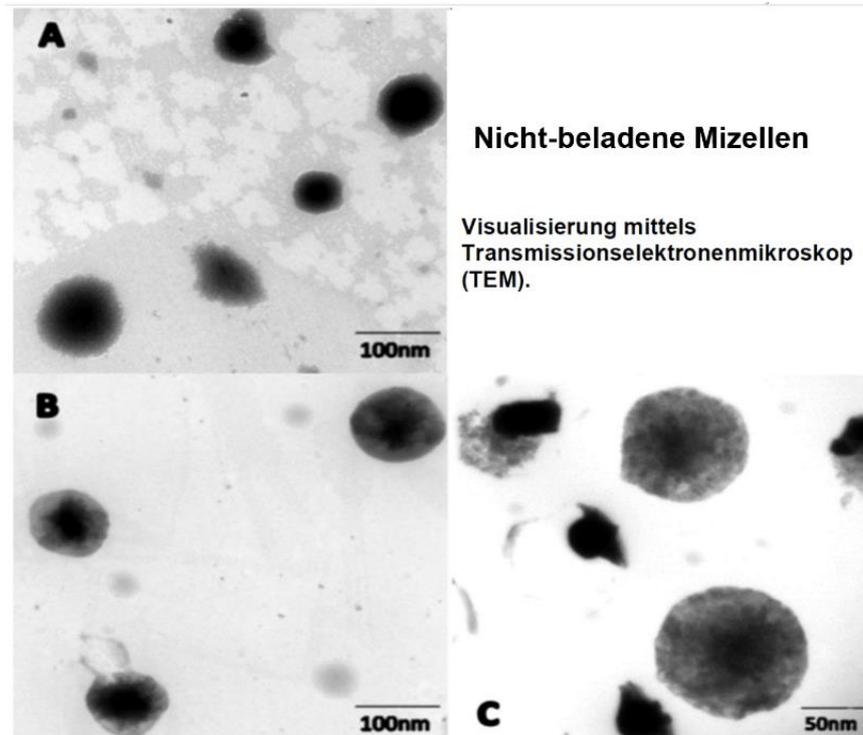


Abbildung 11. Morphologie der nicht-beladenen Mizellen. Gemessen mittels TEM. A. 5 % Pluronic. B. 10 % Pluronic. C. 15 % Pluronic.

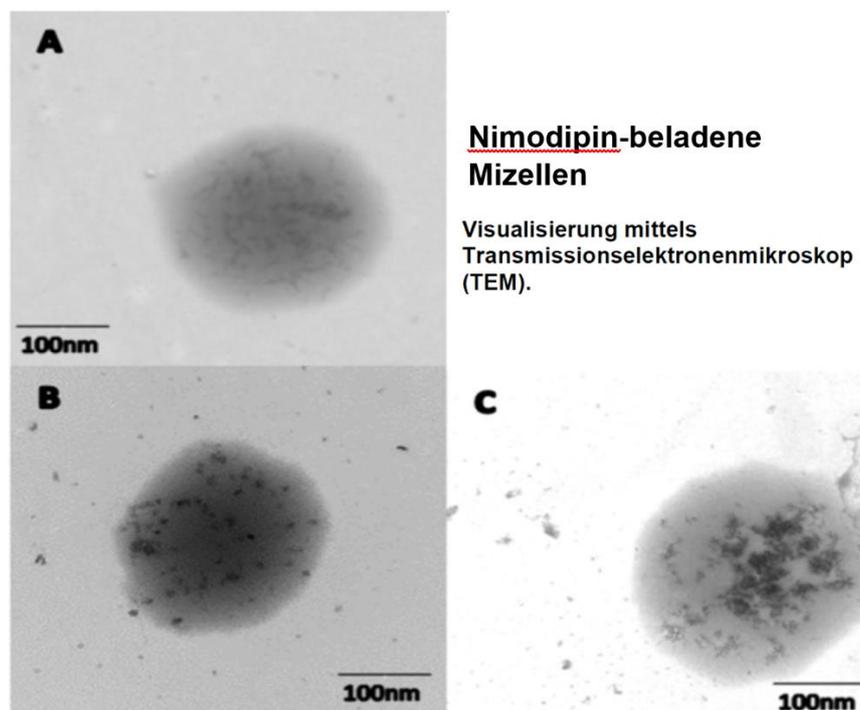


Abbildung 12. Morphologie der Nimodipin-beladenen Mizellen. Gemessen mittels TEM. A. 5 % Pluronic. B. 10 % Pluronic. C. 15 % Pluronic.

3.1.3 Spontane Nimodipin-Freisetzung

Die spontane Freisetzung von Nimodipin konnte in allen drei Lösungen mit unterschiedlichen Pluronic® F-127-Konzentrationen gezeigt werden, die ihr Maximum nach 24 Stunden erreichte. Die Freisetzungsrates variierte jedoch zwischen den Lösungen. Die stärkste Freisetzung wurde nach 24 Stunden in der 10 %igen Lösung (Mittelwert 40 % ± 4,6; Spannweite 35 – 44 %) gefunden, gefolgt von der 15 %igen Lösung (Mittelwert 21,3 % ± 0,6; Spannweite 21 – 22 %) und der 5 %igen Lösung (Mittelwert 14,7 % ± 3,5; Spannweite 11 – 18 %) signifikant höher war (ANOVA, $p = 0,0002$). Im Gegensatz dazu, wurde in der 5 %igen Lösung nach 2 Stunden eine signifikant höhere spontane Wirkstofffreisetzung (Mittelwert 7,7 % ± 1,2; Spannweite 7 – 9 %) im Vergleich zur 10 %igen Lösung (Mittelwert 2,7 % ± 0,6; Spannweite 2 – 3 %) und zur 15%igen Lösung (Mittelwert 1 %, Spannweite 0,3 – 1 %) gefunden (ANOVA, $p < 0,0001$). Über den erfassten Beobachtungszeitraum konnte eine langsame, jedoch kontinuierliche spontane Nimodipin-Freisetzung von den Nimodipin-beladenen Mizellen dokumentiert werden.

3.1.4 Gezielte Nimodipin-Freisetzung durch Ultraschallanwendung

Eine signifikante Erhöhung der Nimodipin-Freisetzung konnte durch Ultraschall-Anwendung sowohl nach 30 als auch nach 60 Sekunden Behandlungsdauer induziert werden. Die längere Ultraschallbehandlung führte allerdings zu einer schnelleren Nimodipin-Freisetzung. Bereits fünf Minuten nach einer Ultraschallbehandlung der 10 %igen Lösung über 30 Sekunden konnte die Nimodipin-Freisetzung vervierfacht werden. Zwei Stunden nach einer Ultraschallbehandlung der 5 %igen Lösung über 30 Sekunden konnte die Nimodipin-Freisetzungsrates im Vergleich zur unbehandelten Lösung verdoppelt werden. Die maximale Wirkstofffreisetzungsrates 24 Stunden nach der Ultraschallbehandlung war in der 5 %- und 15 %igen Lösung signifikant höher als die spontane Wirkstofffreisetzungsrates (ANOVA, $p = 0,004$). In der 10 %igen Lösung war dies hingegen nicht der Fall. Im Vergleich der beiden Kollektive (30 vs. 60 Sekunden) wurde eine signifikant höhere Wirkstofffreisetzung in der Gruppe mit einer Behandlungsdauer von 60 Sekunden nach 5 Minuten (t-Test, $p = 0,0002$), nach 15 Minuten (t-Test, $p = 0,0005$) und nach 30 Minuten (t-Test, $p = 0,0003$) in der 5 %- und 10 %igen Lösung gefunden. Insgesamt war die Freisetzungsrates jedoch in der Gruppe mit einer Behandlungsdauer von 60 Sekunden am höchsten. Das Freisetzungsprofil von Nimodipin ist in Abbildung 13 dargestellt.

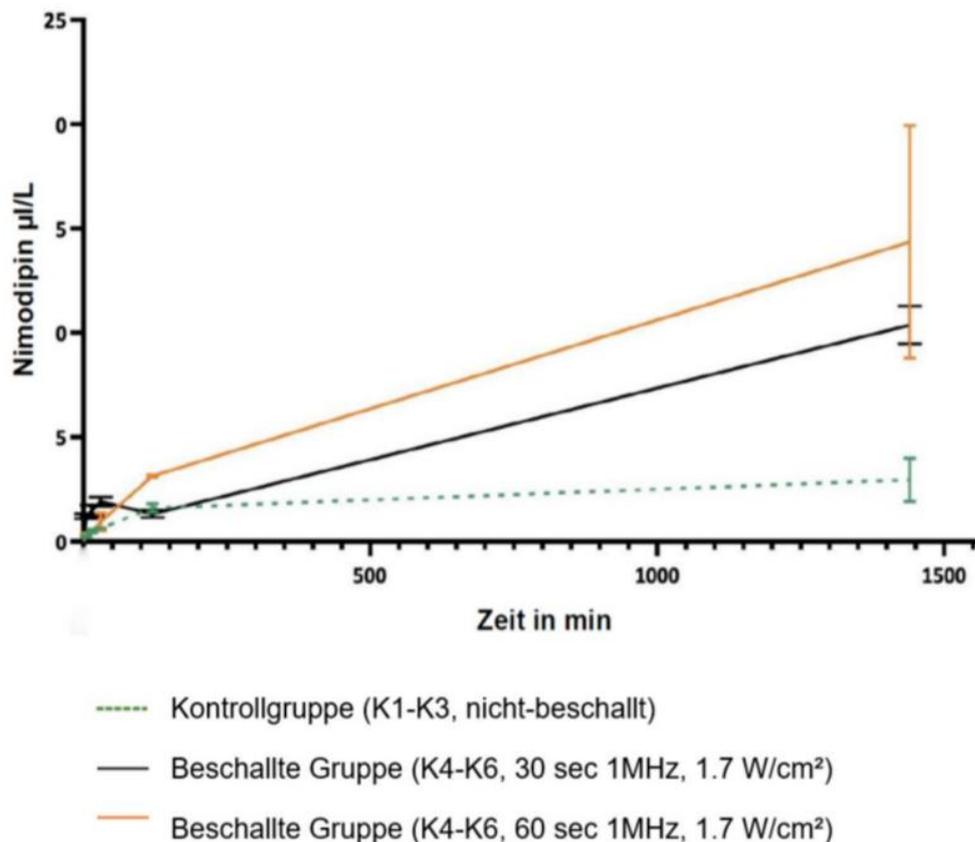


Abbildung 13. Freisetzungprofil von Nimodipin zu unterschiedlichen Konditionen.

3.2 *In-vivo*-Experimente

3.2.1 Vasospasmeninduktion im CAM-Modell durch Ultraschallanwendung

Der ultraschall-induzierte Vasospasmus war in allen 10 Eiern zuverlässig reproduzierbar. Der mittlere Gefäßdurchmesser vor der Vasospasmusinduktion betrug 0,21 a.u. (Spannweite 0,08–0,36 a.u.).

Die erste signifikante Reduktion des Gefäßdurchmessers wurde nach drei Minuten mit einer durchschnittlichen Abnahme des Gefäßdurchmessers auf 77 % festgestellt (mittlere relative Durchmesserreduktion von 23 %, Spannweite 58–88 %). Die maximale Reduktion des Gefäßdurchmessers wurde acht Minuten nach der Ultraschall-Applikation mit einer durchschnittlichen Abnahme des Gefäßdurchmessers auf 57 % (mittlere relative Durchmesserreduktion von 43 %, Spannweite 44–61 %) erreicht, ANOVA, $p = 0,0002$. Die zeitliche Entwicklung der Vasospasmen ist in Abbildung 13 dargestellt. Es konnten Vasospasmen mit unterschiedlicher Ausprägung induziert werden. Die relative Reduktion des Gefäßdurchmessers acht Minuten nach erfolgter Ultraschall-Behandlung reichte von 19–83 %.

Nach Ultraschallanwendung wurde eine Reduktion des Kapillarnetzes und eine Zunahme der embryonalen Motilität beobachtet. Eine Verletzung der Gefäße und des Kapillarnetzes im Sinne einer Hämorrhagie wurden nicht festgestellt.

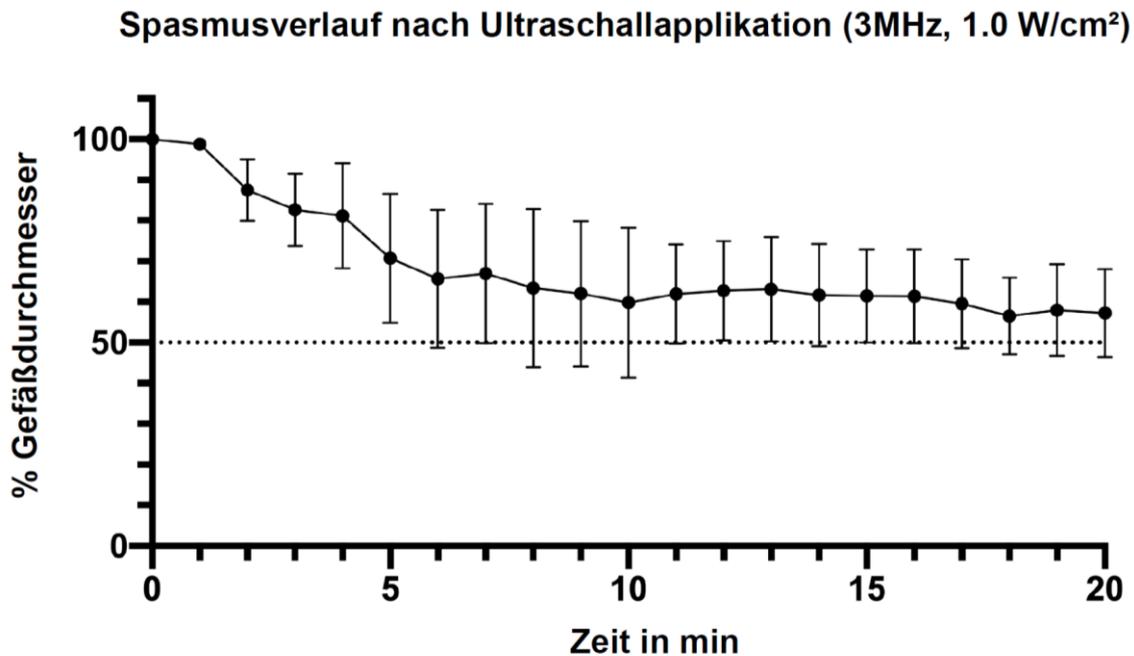


Abbildung 14. Vasospasmusverlauf nach Induktion durch Ultraschall (3MHz, 1.0 W/cm²).

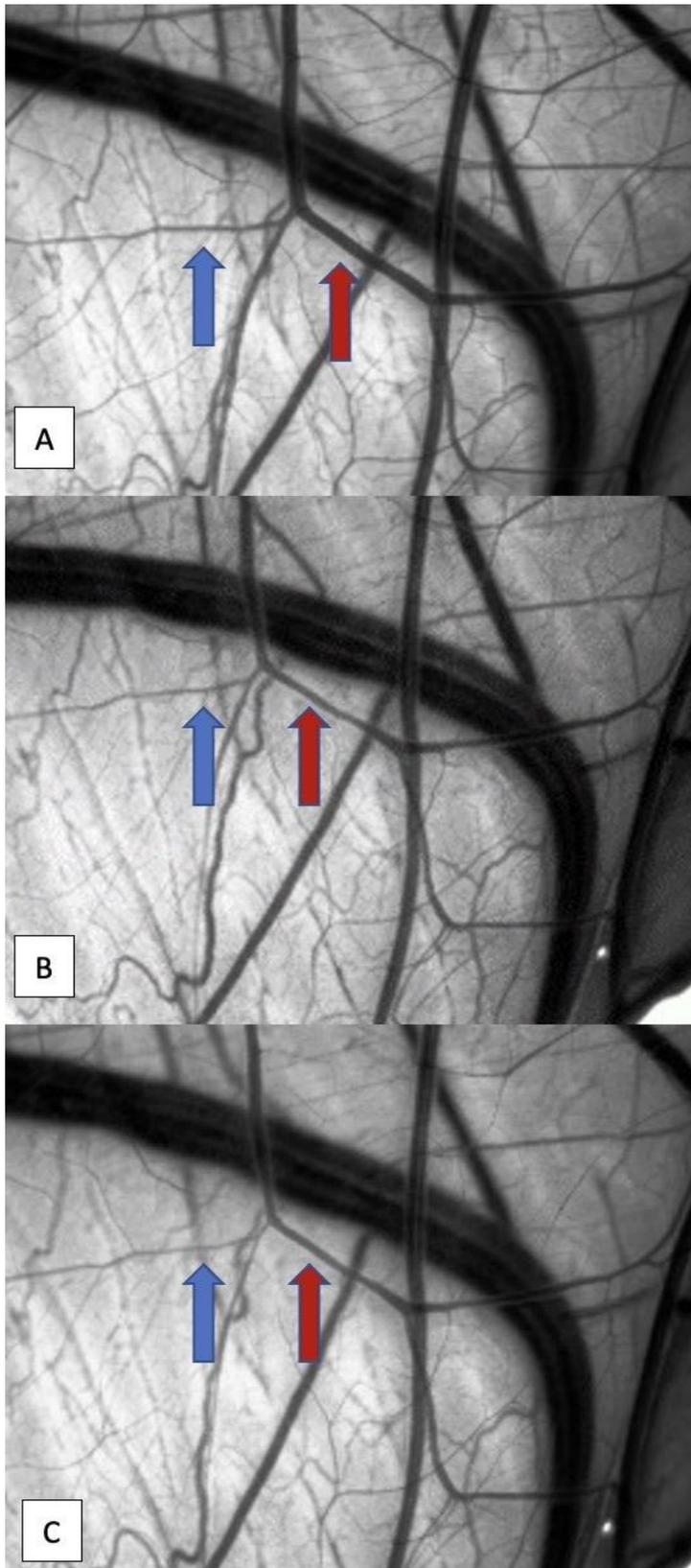


Abbildung 15. Videomikroskopische Beobachtung des ultraschallinduzierten Vasospasmus. A. CAM GefäÙe vor der Ultraschallapplikation. B. 3 min nach Ultraschallapplikation. C. 8 min nach Ultraschallapplikation

Nach Etablierung der Vasospasmeninduktion an der CAM des embryonalen Eis (s.o.) erfolgte die Umsetzung dessen zur Überprüfung der Anwendbarkeit der ultraschallgesteuerten Freisetzung Nimodipin-beladener Nanopartikel zur Behandlung der Vasospasmen.

3.2.2 Reine Nimodipin-Wirkung auf die CAM-Gefäße - Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe umfasst pro Kondition (Nimodipin pur, verdünntes Nimodipin, deionisiertes Wasser) 3 Eier. Die Gesamtzahl beläuft sich demnach auf 9 Eier.

Weder die Zugabe von 1 μ l deionisiertem Wasser noch die Zugabe von 1 μ l Nimodipin S® 10 mg/50 ml (1:50) führte zu mikroskopisch sichtbaren und quantitativ messbaren Veränderungen des Gefäßdurchmessers. Im Gegensatz dazu wurde nach Applikation von 1 μ l unverdünntem Nimodipin S® 0,2 mg/ml eine beinahe sofortige Gefäßruptur mit nachfolgender Hämorrhagie beobachtet (Abbildung 16).

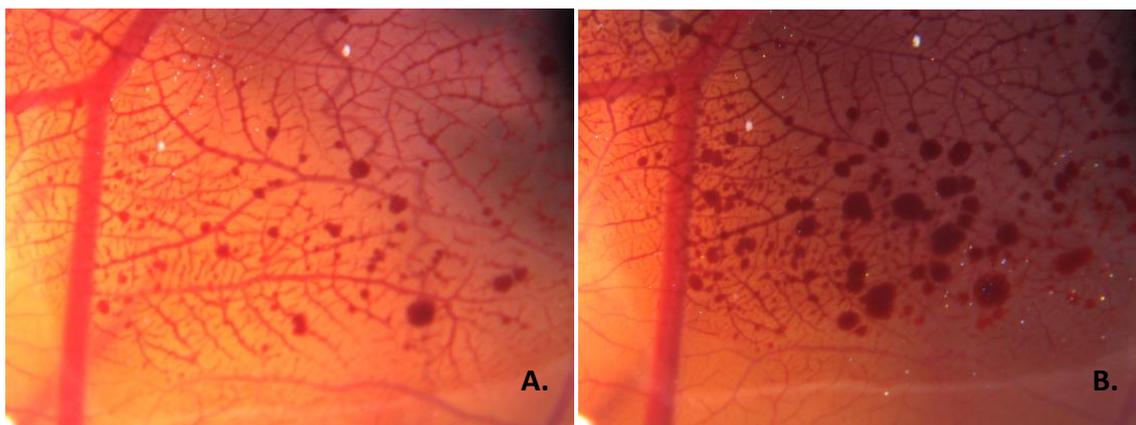


Abbildung 16. Auswertung des Kontrollkollektivs. Kapilläre Mikrohämorrhagien nach Applikation von unverdünntem Nimodipin S®. A. 4 min nach Applikation. B. 10 min nach Applikation.

3.2.3 Wirkung Nimodipin-beladener Mizellen auf die CAM-Gefäße in Abwesenheit von Vasospasmen (+/- Ultraschall) – Behandlungsgruppe ohne Vasospasmen

Pro Kondition (5 %, 10 %, 15 %) wurden drei Eier zur Replizierbarkeit untersucht. Unter Anwendung +/- ultraschallgesteuerter Freisetzung des Nimodipins wurden in dieser Studie 18 Eier eingeschlossen.

Über den Beobachtungszeitraum von 20 Minuten wurde weder eine makroskopische Veränderung noch eine quantitativ messbare Veränderung des Gefäßdurchmessers festgestellt. Dies war in allen untersuchten Lösungen der Nimodipin-beladenen Mizellen der Fall (Abbildung 17) und betraf auch die CAM-Modelle, bei denen eine ultraschallgesteuerte Freisetzung des Nimodipins erfolgte (Abbildung 18).

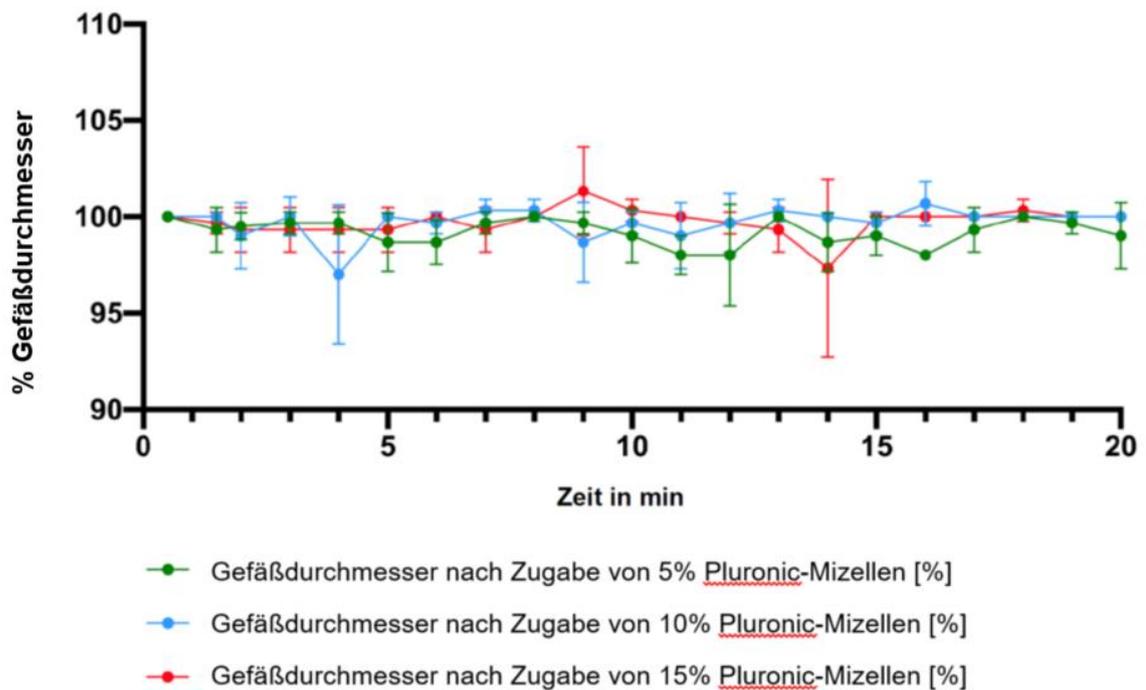


Abbildung 17. Auswertung des Kollektivs ohne Vasospasmus und ohne Ultraschall.

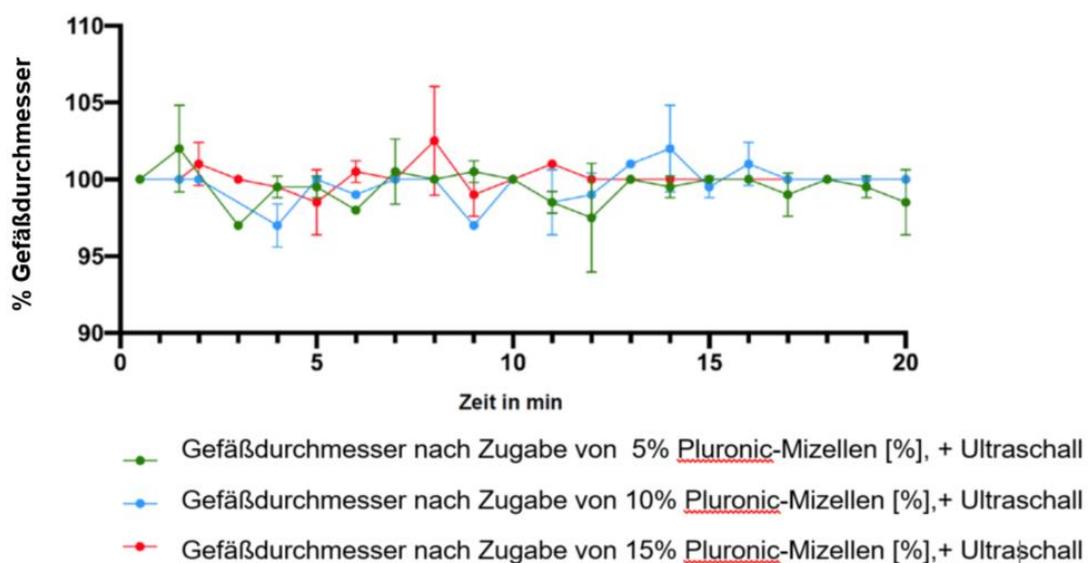


Abbildung 18. Auswertung des Kollektivs ohne Vasospasmus und mit Ultraschall.

3.2.4 Wirkung Nimodipin-beladener Mizellen auf die CAM-Gefäße in Gegenwart von Vasospasmen (+/- Ultraschall) – Behandlungsgruppe mit Vasospasmen

Pro Kondition (5 %, 10 %) wurden drei Eier untersucht, sodass insgesamt 12 Eier für die Evaluation der ultraschallgesteuerten Nimodipin-Freisetzung verwendet wurden.

Nach der Vasospasmus-Induktion veränderte sich der mittlere Gefäßdurchmesser auf 57 % (Spannweite 44–61 %) im Vergleich zum initialen Gefäßdurchmesser (100 %). Weder mikroskopisch sichtbare noch quantitativ messbare Veränderungen des Gefäßdurchmessers konnten nach Zugabe der Nimodipin-beladenen Mizellen ohne Wirkstofffreisetzung bei ausbleibender Ultraschallanwendung nachgewiesen werden (Abbildung 19). Nach der ultraschallinduzierten Wirkstofffreisetzung stieg der mittlere Gefäßdurchmesser der vasospastischen Gefäße wieder auf 89 % (Spannweite 83–91 %) des ursprünglichen Gefäßdurchmessers an, was statistisch signifikant war (ANOVA, $p = 0,0002$). Die 10%ige Lösung lieferte hierbei die besten Ergebnisse (Abbildung 20).

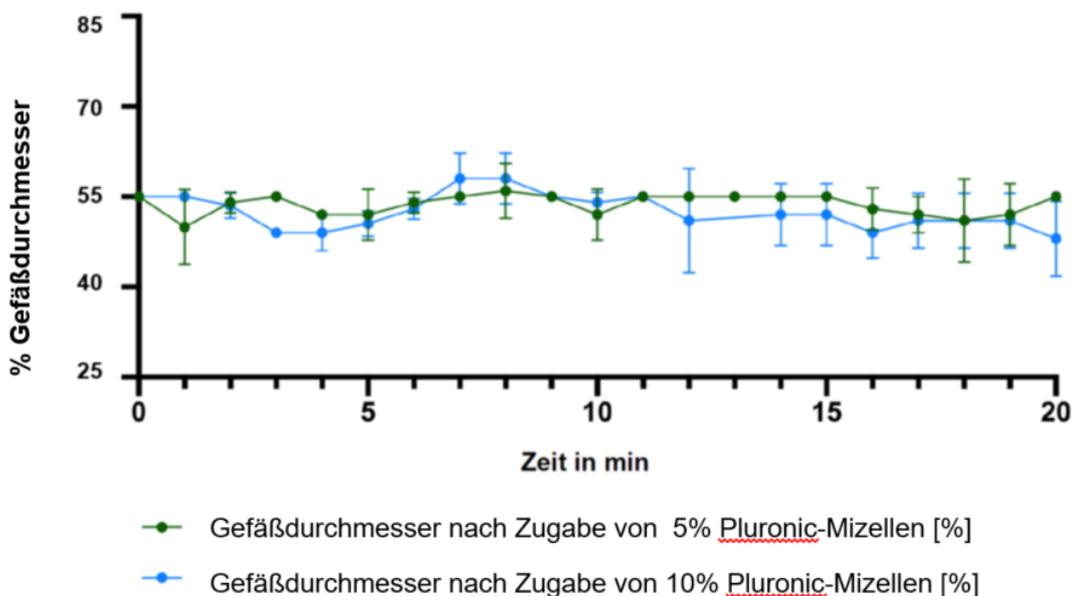
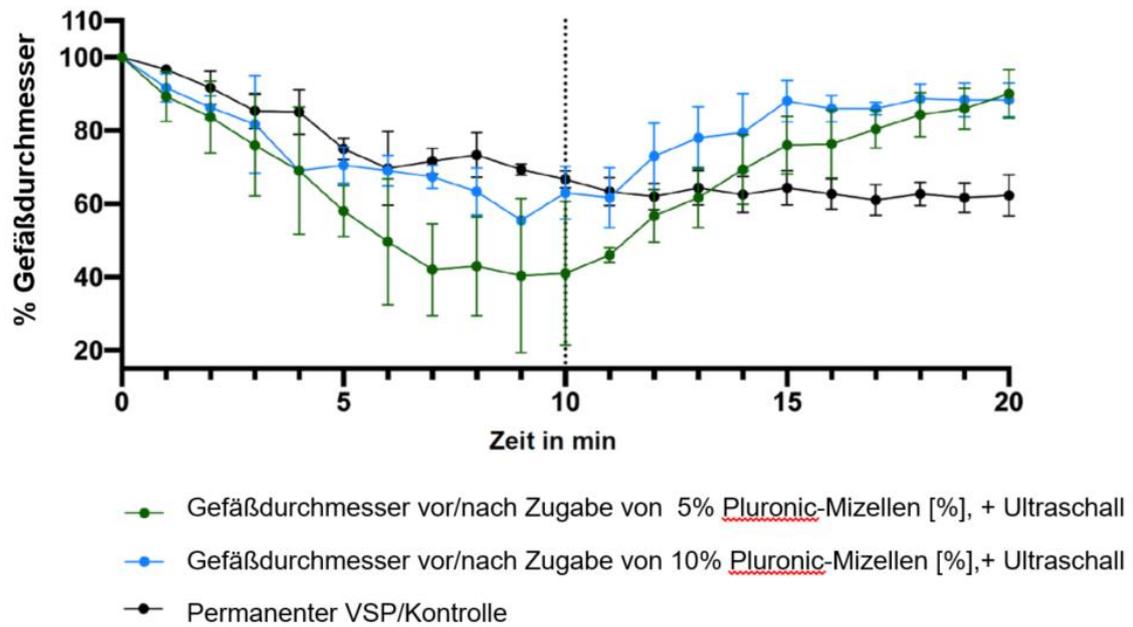


Abbildung 19. Veränderung des Gefäßdurchmessers ohne Ultraschallanwendung. Wirkung der Nimodipin-beladener Mizellen auf die CAM-Gefäße in Gegenwart von Vasospasmen ohne Ultraschallanwendung.



Die gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Zugabe der Mizellenlösung und des Ultraschalls.

Abbildung 20. Veränderung des Gefäßdurchmessers nach Ultraschallanwendung. Wirkung der Nimodipin-beladener Mizellen auf die CAM-Gefäße in Gegenwart von Vasospasmen nach ultraschallgesteuerter Nimodipin-Freisetzung.

4 Diskussion

Die Herstellung von Nimodipin-beladenen Nanopartikeln und die gezielte ultraschallinduzierte Wirkstofffreisetzung waren das Ziel dieser experimentellen Arbeit.

Im Rahmen von *In-vitro*-Versuchen konnten im ersten Schritt stabile Nimodipin-beladene Nanopartikel unter Anwendung der direkten Auflösungsmethode erzeugt werden. In einem zweiten Schritt bestätigten wir *In-vitro* eine signifikante Erhöhung der Wirkstofffreisetzung durch Ultraschallanwendung. Basiert auf den aus diesen Experimenten gewonnenen Erkenntnissen konnte dann die direkte therapeutische Wirkung des freigesetzten Nimodipins auf Ultraschall-induzierten Vasospasmen im CAM Modell *In-vivo* demonstriert werden.

4.1 Experimentelle Vasospasmeninduktion und Evaluation

Experimentelle SAB-Tiermodelle sind sowohl bei der Evaluation der Pathophysiologie der SAB als auch bei der Entwicklung neuer Therapien von essenzieller Bedeutung. Die ersten dokumentierten SAB-Tiermodelle wurden 1982 durch Bagley beschrieben (Bagley 1982). Auf der Basis dessen wurden in den nachfolgenden Jahren weitere Tiermodelle zur Erforschung zerebraler, SAB – induzierter Vasospasmen etabliert. Methodisch werden zwei Hauptmodelle unterschieden, das sogenannte Injektions- und das Perforationsmodell. Wie von der jeweiligen Bezeichnung abzuleiten ist, wird bei den Injektionsmodellen eine bestimmte Menge an Blut direkt in den Subarachnoidalraum injiziert. Bei den Perforationsmodellen hingegen wird ein intrakranielles Gefäß perforiert, woraufhin es zu einem direkten Blutaustritt in den Subarachnoidalraum kommt (Bagley 1928). Beide SAB-Induktionsmodelle wurden bei verschiedenen Tieren etabliert, die diverse Vor- und Nachteile mit sich bringen und je nach Fragestellungen Anwendung finden. In den nachfolgenden Abschnitten sind die Stärken und Limitationen der gängigsten SAB-Tiermodelle an der Maus und der Ratte für die Evaluation von Vasospasmen dargelegt.

4.1.1 Evaluation von Vasospasmen im murinen SAB-Modell

Über die Injektion autologen Blutes via Bohrlochtrepanation rechts parietal wurde in einer Studie unter Leitung von Matz et al. (2000) eine SAB induziert. Ziel dieser Studie war es, mehr über die Rolle des Blutes und Hämoglobins (Hb) bei der Vermittlung von zellulären Schädigungen zu erfahren. Hierzu untersuchte Matz et al. den Grad der Apoptose nach kortikaler Exposition gegenüber subarachnoidalen Hämolysats, da Hb und

Hämolyt mit der Erzeugung oxidativen Stresses und Zellverletzungen in Verbindung gebracht werden (Matz et al. 2000). Kochsalzlösung-injizierte Mäuse wurden als Kontrollen verwendet. Die Tiere wurden nach 24 h durch transkardiale Perfusion fixiert. Die Schnitte wurden mit der terminalen Desoxyuridin-Nick-End-Labeling (TUNEL/Apoptosemarker) - Methode auf Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Fragmentierung angefärbt und auch für das Hämoxigenase-1 (HO-1)-Protein immungefärbt, um die Blutverteilung zu beurteilen. Die Ergebnisse der DNA-Fragmentierung waren bei der TUNEL - Färbung eindeutig (Matz et al. 2000): TUNEL-positive Zellen waren am häufigsten in der Nähe der Stelle der kortikalen SAB zu finden, was durch die HO-1-Immunreaktivität belegt wurde (Matz et al. 2000). TUNEL-positive Zellen wurden auch distal im Hippocampus und im basalen Vorderhirn gesehen. Darüber hinaus wurde das Vorhandensein von Apoptose mittels DNA-Laddering in der Elektrophorese evaluiert. Bei Kochsalz-injizierten Tieren ließ sich hingegen kein Laddering nachweisen (Matz et al. 2000). Diese Ergebnisse liefern den Beweis, dass das Vorhandensein von subarachnoidalen Blutprodukten mit DNA-Fragmentierung und apoptotischem Zelltod verbunden ist.

Das aus dem endovaskulären Perforationsmodell bei Ratten bekannte SAB-Induktionsmodell wurde von Kamii et al. für die Anwendung bei Mäusen modifiziert, indem er die Filamentgröße zur Perforation der Arteria cerebri anterior anpasste (Kamii et al. 1999). Das Ergebnis war eine diffuse Blutverteilung in der Pentagonzisterne des Gehirns, mit besonderer Gewichtung im Bereich der perforierten Arteria cerebri anterior (McGirt et al. 2002; Mino et al. 2003). Die Sterblichkeitsrate, die in einer Versuchsgruppe nach 72 Stunden gemessen wurde, lag bei 10 – 29 % (McGirt et al. 2002; Mino et al. 2003; Saito et al. 2001). Die Spasmen wurden mittels cerebravaskulären casting (Auswahlverfahren) gemessen. Dabei wurden die schwersten Vasospasmen an der Arteria cerebri media 72 Stunden nach SAB-Induktion erfasst (57 % Reduktion des Durchmessers). Am siebten Tag nach Induktion bildeten sich die Vasospasmen wieder zurück (Kader et al. 1990; McGirt et al. 2002). Mit der schnellen und sicheren Durchführbarkeit bietet diese Methodik deutliche Vorteile, die Ausfallrate durch eine hohe Sterblichkeit ist jedoch hoch. Aufgrund einer punktuell gesetzten Perforation ist zudem nur eine kurze Blutungszeit gesetzt. Die milde Blutung induziert demnach auch nicht schwere Vasospasmen.

Lin et al. entwickelte zur Umgehung dieser Limitation ein murines Cisterna magna – Blutinjektionsmodell, das auf dem der Ratten beruht. Der Hauptvorteil ist die niedrigere

Sterblichkeit gegenüber dem Perforationsmodell (Lin et al. 2003). Methodisch wird autologes Hämolysat in die Cisterna magna injiziert. Zur Detektion von Vasospasmen wurden die Gefäße in einer Suspension aus Tinte und Gelatine zeitgleich gefärbt und fixiert. Vasospasmen an den Hirnbasisarterien wurden dabei zuverlässig beobachtet. Der Höhepunkt dieser Vasospasmen konnte zu zwei Phasen beobachtet werden: Erster Höhepunkt der Vasospasmen war 6 – 12 Stunden nach SAB-Induktion; der zweite Höhepunkt war zwischen dem ersten und vierten Tag nach SAB-Induktion (Lin et al. 2003). Ab dem siebten Tag ließen sich keine weiteren gefäßalterierenden Effekte mehr nachweisen (Parra et al. 2002; Lin et al. 2003).

Im Vergleich zu dem Perforationsmodell nach Kamii et al. erhält man mit dem murinen Cisterna magna - Modell schwerere Vasospasmen mit zwei klar zu beobachtenden zeitlichen Höhenpunkten. Im Perforationsmodell sind die Vasospasmen meist begrenzt mit einem einzigen Höhepunkt 72 Stunden nach Induktion. Die Rückbildung der Vasospasmen fand in beiden Modellen um den siebten Tag statt (Parra et al. 2002; Lin et al. 2003). Wegen technischer Schwierigkeiten, nicht zuletzt bedingt durch die winzigen anatomischen Verhältnisse, waren verlässliche murine Modelle für SAB-induzierte zerebrale Vasospasmen lange Zeit undenkbar. Reale oder nahe realzeitliche Untersuchungen der Vasospasmen werden immer noch erforscht. Die oben beschriebenen experimentellen Ansätze sind jedoch ermutigend für weitere Studien von Vasospasmen am murinen Modell.

4.1.2 Evaluation von Vasospasmen im SAB-Modell bei der Ratte

Ratten sind die gängigsten Versuchstiere für die Untersuchung SAB-assoziiierter intrazerebraler Pathomechanismen. Im Zuge der bewährten Anwendung der SAB-Modelle bei Ratten, wurden eine Vielzahl von Techniken für die Untersuchung zerebraler Vasospasmen evaluiert. Verwendung finden unter anderem die digitale Subtraktions-Angiographie (Vora et al. 1999), die zerebrale Computertomographie (Turrowski et al. 2007) und die Magnetresonanztomographie (Van den Bergh et al. 2005). Auch bei den SAB-Modellen der Ratte wird primär zwischen Perforationsmodellen und Injektionsmodellen unterschieden.

Bederson et al. und Veelken et al. beschrieben nahezu zeitgleich unabhängig voneinander das heute gängigste Punktionsmodell bei der Ratte (Bederson et al. 1995, Veelken et al. 1995). Hierbei wird die Arteria carotis interna nahe ihrer intrakraniellen Bifurkation mittels spitzen Drahts durchstoßen. Das Perforationsmodell benötigt keine Kraniotomie und gilt als repräsentativ für die klinische Situation, da ein Riss der Arteria carotis interna

imitiert wird. Die Sterblichkeit liegt zwischen 37,5 % und 50 % nach 24 Stunden (Veelken et al. 1995). Limitationen liegen zum einen in einer hohen Fehlerquote von 12,5 % (Vatter et al. 2006), in einer Induktion großvolumiger intrazerebraler Blutungen (etwa 11 %) (Bederson et al. 1995) und einer unkontrollierbare Blutverteilung. So hat Schwartz et al. im Rahmen einer Studie den Nachweis erbracht, dass eine veränderte Filamentgröße dazu führen kann, dass sich das Blutungsvolumen verändert (Schwartz et al. 2000). Am zweiten Tag ist mit einer 20 % igen Reduktion des zerebralen Gefäßdurchmessers zu rechnen (Gules et al. 2002), womit sich dieses Modell als nutzbar für Studien früher Vasospasmen erweist (Cahill et al. 2006).

Bei den Injektionsmodellen wurden einfache und doppelte Blutinjektionsmodelle beschrieben. Nach einfacher Blutinjektion beschrieb Delegado et al. biphasische Vasospasmen, deren zeitliches Auftreten sich auf den zweiten Tag post Injektion und nach einer sich anschließenden Erholung am fünften Tag fokussieren ließ. Die periinterventionelle Sterblichkeitsrate lag bei 11,5 %, wobei die totale Zahl der Versuchstiere nicht erfasst wurde (Delegado et al. 1985). Suzuki et al. haben eine zweizeitige, d.h. doppelte, im Intervall von 48h durchzuführende intrazisternale Injektion von hämolysierten Eigenblut als SAB-Modell beschrieben (Suzuki et al. 1999). Die Vasospasmen wurden radiologisch gesichert und biphasisch beobachtet. Initial nach 10 Minuten und am 5. bis 7. Tag nach SAB-Induktion (Gules et al. 2002). Die Sterblichkeitsrate lag bei 4–9 % (Gules et al. 2002). Diese Methodik ist hinsichtlich der unkontrollierten Blutverteilung (Menge und Ausdehnung), dem hohen Risiko der mechanischen Verletzung des zerebralen Gewebes und der hohen Mortalitätsrate (Doczi et al. 1985) problembehaftet.

4.1.3 Evaluation von Vasospasmen im CAM-Modell

Die CAM ist eine nicht-innervierte, extraembryonale Gefäßmembran, die Ähnlichkeiten zur humanen Plazenta aufweist und als *In-vivo*-Modell im Rahmen von experimentellen Studien mit verschiedenen Fragestellungen Einsatz findet (Nowak-Sliwinska et al. 2014; Ribatti et al. 2016). Da aviane Embryonen lebende Wirbeltiere mit einem Kreislaufsystem und organischen Funktionen sind, kann das CAM-Modell als Bindeglied zwischen *In-vitro*- und *In-vivo*-Versuchen fungieren (Ribatti et al. 2016; Eckrich et al. 2020): Anwendungsbereiche des CAM-Modells finden sich unter anderem auf dem Gebiet der Onkologie. Bereits 1912 beschrieben Murphy et al. die Implantation von Tumoren *in-ovo*. Seitdem wurde das CAM-Modell bei der Erforschung diverser Tumorentitäten, unter anderem unter Anwendung von Sarkom-, Kolonkarzinom- und Prostatakarzinomzelllinien

eingesetzt (Cho et al. 2011; Kunz et al. 2019). Außerdem eignet sich das CAM-Modell ausgesprochen gut zur Untersuchung der Angiogenese (Ribatti et al. 2016). Das CAM-Modell kann *Ex-ovo* (außerhalb des Eis) oder *In-ovo* (innerhalb des Eis) durchgeführt werden (Ribatti et al. 2016). Beim *Ex-ovo*-CAM-Modell wird die Eischale aufgebrochen, gefolgt von einem Transfer des Eiinhalts in ein alternatives Gefäß (Dohle et al. 2009). Beim *In-ovo*-CAM-Modell erfolgt eine Fensterung der Eischale (Ribatti et al. 2016). Wesentliche Vorteile des *Ex-ovo*- gegenüber dem *In-ovo*-CAM-Modell ist die erleichterte Zugänglichkeit der CAM-Oberfläche und eine dadurch bedingt bessere Visualisierung der Gefäße (Ribatti et al. 2016). Das *In-ovo*-CAM-Modell birgt Vorteile im simplen Aufbau und in den wesentlich geringeren Ausfallraten (Ribatti et al. 2016). Für die Evaluation von Vasospasmen am CAM-Modell wurde eine Punktionsmethode entwickelt. Am 3. Tag wird nach Entfernung von 2 – 3 ml Eiweiß ein quadratisches Fenster in der Schale geöffnet, um die CAM von der Schale selbst zu lösen und die darunter liegenden CAM-Gefäße freizulegen. Das Fenster wird mit einem Glas verschlossen und die Inkubation geht bis zum nächsten Versuchstag weiter. Am fünften Tag wird das Ei an einem durch die Schale scheinenden Gefäß punktiert. Ab dem 11. – 12. Tag sollten dann Vasospasmen ersichtlich sein, jedoch sind diese fluktuierend und reversibel, sodass eine sichere Durchführung zu einem gewünschten Zeitpunkt x nicht verlässlich möglich ist. Hinzu kommen auch bei dieser Methodik der Vasospasmus-Induktion hohe Dropout-Raten vor (Ribatti et al. 2016). Diese Technik kann eine physiologischere Umgebung bewahren und hat den Vorteil einer hohen Lebensfähigkeit in der Langzeitinkubation. Allerdings verlangt dieses Setting eine hohe zeitliche Personalbindung, da die Eier permanenter visueller Kontrolle unterliegen müssen, technisches Equipment und Fingerfertigkeit. Zur quantitativen Erfassung der Vasospasmen im CAM-Modell sind unter anderem Bezugsgrößen wie Gefäßgröße und Gefäßdichte zu beurteilen (Dehelaen et al. 2013; Freye-Fonseca et al 2018). Darüber hinaus können histologische und immunhistochemische Auswertungen der CAM zur Bestimmung der Gefäßdichte vorgenommen werden (Shereema et al. 2015; Jilani et al. 2003).

Die CAM ist ein verhältnismäßig einfaches, schnelles und kostengünstiges Modell, das das Screening einer großen Anzahl von Eiern in kurzer Zeit ermöglicht. Sie bindet keine administrativen Verfahren zur Einholung einer Genehmigung der Ethikkommission für Tierversuche, da das embryonale Ei erst ab Tag 17 der Entwicklung als lebendes Tier angesehen wird. So legten das Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC), das National Institute of Health, USA sowie das New England Medical Center in einem

gemeinsamen Entscheid fest, dass ein Küken-Embryo, der den 14. Tag seiner Inkubation noch nicht erreicht hat, bedenkenlos ohne ethische Einschränkungen oder vorherige Protokollgenehmigung für Experimente verwendet werden kann (Ribatti et al. 2016; EU 2010). Grund hierfür ist die Annahme, dass die CAM bis zu diesem Zeitpunkt nicht innerviert und die nozizeptiven Zentren, die mit der Schmerzwahrnehmung in Verbindung stehen, noch nicht vollständig ausgereift sind (Toman et al. 2015; Schlenk et al. 2017). Weiterer Vorteil dieses Modells ist die Kostenreduktion (Eckrich et al. 2020): Befruchtete Hühnereier stellen eine weitaus geringere finanzielle Belastung dar als Mäuse. Die Kosten für Kaninchen, Schweine et cetera, bedingt durch den laufenden Bedarf an Nahrung, Unterbringung und Personal, sind immens und übersteigen bei Weitem die laufenden Kosten des CAM-Modells. Diese Vorteile bieten die Option auf einen sehr hohen quantitativen Output, der sich in einer besseren Standardisierung und Quantifizierung niederschlägt und das CAM-Modell als Vermittler im Transferprozess zwischen *In-vitro*- und *In-vivo*-Forschung etabliert. Entsprechend dem wissenschaftlich-ethische Standards des „3R-Prinzip“ (reduce, replace, refine) (Russell et al. 1959) lassen sich die Erkenntnisse aus dem CAM-Modell auf das Tiermodell übertragen und ermöglichen so, eine bessere Planung weiterer Tierversuche und damit eine Reduktion (reduce) der Anzahl der hierfür notwendigen Tiere.

4.1.4 Limitationen des CAM-Modells

Die Hauptlimitation des CAM-Modells stellt der sehr kurze Untersuchungszeitraum von maximal zwei Tagen dar. Der Beobachtungszeitraum ist durch das Schlüpfen der Embryonen an Tag 21 und durch die notwendige Beendigung der Experimente an Tag 14 aufgrund von reifender Nozizeption begrenzt (Bellairs et al. 2014; Yuan et al. 2016). Hühner sind keine Säugetiere, sodass die gewonnenen Ergebnisse folglich nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragbar sind (Nowak-Sliwinska et al. 2016). Diese Limitation ist allerdings mit variierendem Ausmaß auch bei anderen Tiermodelle vorhanden (Marbacher et al. 2010; Bhat 2017; Leclerc et al. 2018). Darüber hinaus ist die CAM gegenüber Veränderungen durch Umweltfaktoren wie unter anderem durch Änderungen der Sauerstoffsättigung, pH-Wert, Osmolarität und das Ausmaß der Keratinisierung sehr empfindlich (Auerbach et al. 2000). Tiermodelle bilden insgesamt eine realistischere Darstellung der Prozesse, die einer SAB nachfolgen ab und ermöglichen so eine zuverlässigere Evaluation der Pathophysiologie. Etablierte tierexperimentelle SAB-Modelle können daher durch das CAM-Modell nicht vollständig ersetzt werden (Gules et al. 2002).

4.2 Gezielte Wirkstofffreisetzung des Nimodipins aus den Mizellen

Die medikamentöse Behandlung neurologischer Erkrankungen ist nach wie vor eine Herausforderung, da nur eine begrenzte Anzahl von Medikamenten die Blut-Hirn-Schranke in ausreichender Konzentration passieren kann, um dort eine hinreichende Wirkung zu entfalten (Opris et al. 2020).

Im Rahmen einer aSAB ist Nimodipin, wie eingangs erwähnt, das Medikament, mit nachgewiesenem Nutzen sowohl in der Prophylaxe als auch in der Therapie von DCI (Dorhout et al. 2007; Vergouwen 2011). Die Voraussetzung dafür ist jedoch eine ausreichende intrathekale Wirkstoffkonzentration (Diringer et al. 2011; Riva et al. 2019). Das Erzielen einer ausreichend hohen intrathekalen Konzentration ist durch einige Faktoren, wie unter anderem dem Nebenwirkungsspektrum und geringer oraler Bioverfügbarkeit limitiert. Mit der Idee der intrathekalen Medikamentenverabreichung soll diese Limitation überwindbar werden (Hänggi et al. 2016; Macdonald et al. 2019). Hinsichtlich der Löslichkeit und der Pharmakokinetik (Householder et al. 2019) bestehen jedoch auch Einschränkungen. Hydrophile Substanzen, wie auch Nimodipin, werden nach intrathekaler Injektion aufgrund des Liquorumsatzes so schnell abgebaut, dass wiederholte Medikamentengaben erforderlich sind, um die Zielkonzentrationen zu erreichen und aufrechtzuerhalten (Householder et al. 2019).

Wirkstoffträger wie Nanopartikel könnten die Lösung für dieses Problem sein. Diese ermöglichen eine nachhaltige und kontinuierliche Wirkstofffreisetzung, die auf freier Diffusion basiert. Um die Wirkstofffreisetzung modifizierbar und bedarfsorientiert (on-demand) zu gestalten, machten wir uns zusätzlich die Anwendung des Ultraschalls zunutze. Diese Idee ist nicht neu, sondern bereits Gegenstand diverser Studien (Rapoport 2012; Phenix et al. 2014; Xia et al. 2016). Nanopartikel wurden bereits als sogenannte Drug-Delivery-Systeme zur Umgehung der Blut-Hirn-Schranke erfolgreich eingesetzt (Silva 2008; Furtado et al. 2018). Die Fähigkeit von Nanopartikeln, hydrophobe Wirkstoffe wie Nimodipin zu verkapseln, wurde bereits getestet (Basalious et al. 2015; Salgarella et al. 2018). Entsprechend wissenschaftlichen Standards wurde in unserer Studie Nimodipin in Nanopartikel via direkter Auflösungsmethode verkapselt und anschließend die Struktur der Mizellen mittels NTA und TEM evaluiert. Auch die Partikelgröße wurde anhand dieser Verfahren bestimmt und bewertet. Im Gegensatz zu der Arbeit von Basalious et al. waren die von uns hergestellten Mizellen etwa ein Drittel kleiner. Dieses Ergebnis ist wahrscheinlich auf die verwendete Herstellungsmethode zurückzuführen. Während wir die direkte Auflösungsmethode verwendeten, wurde in der Arbeit von Basalious et al. die

Dünnschichthydratationsmethode eingesetzt (Basalious et al. 2015). Im Rahmen der direkten Auflösungs-methode gehen wir von einer mechanischen Reaktion aus, die in der Regel zu einer spontanen langsamen Wirkstoff-freisetzung führt. Dieses Ergebnis wurde auch im Rahmen unserer *In-vitro*-Studie bestätigt: Die spontane Freisetzung des Wirkstoffs im Laufe der Zeit wurde bei allen untersuchten Bedingungen festgestellt und erreichte nach 24 Stunden ein Maximum. Die Wirkstoff-freisetzungsrates variierte jedoch zwischen den Lösungen. Zudem ließ sich ein wiederkehrendes Profil der Wirkstoff-freisetzung beobachten: So ist die Freisetzungsrates initial schneller und nimmt mit der Zeit ab. Insgesamt kann eine kontinuierliche spontane Freisetzung dokumentiert werden. Durch eine gezielte Ultraschallanwendung auf die Nimodipin-beladenen Mizellen konnte eine signifikante Steigerung der Wirkstoff-freisetzung erzielt werden. Die *In-vitro*-Ergebnisse bestätigten sich im anschließenden *In-vivo*-Setting. Erstmals wurde die *In-vivo*-Vasospasmus-Therapie dazu an der CAM des embryonalen Eis angewendet.

4.2.1 Limitationen der Wirkstoff-freisetzung durch Ultraschallanwendung

Ultraschallinduzierten Effekten können prinzipiell thermische und nicht-thermische (mechanische) Wirkmechanismen unterliegen (Dyson 1982; O'Brien 2007). Limitationen der Ultraschallanwendung bestehen folglich unter anderem auf die Thermosensitivität des beschallten und peripheren Gewebes. Mit der Dauer der Anwendung und Zunahme der Frequenz und der Leistungsdichte, steigt die Temperatur der beschallten Region (Zhong-gao et al. 2004). Dazu beschreibt Martin et al. unter anderem frequenzabhängige, ultraschallinduzierte Veränderungen hinsichtlich des Gefäßtonus (Martin et al. 2010): Während für niederfrequenten Ultraschall (20 kHz) eine Dilatation von Blutgefäßen *In-vitro* nachgewiesen wurde, führte die *In-vitro*-Applikation von Ultraschall im MHz-Frequenzbereich an der Arteria carotis zu einer Vasokonstriktion (Martin et al. 2010). Auf Grundlage der Reversibilität des Effekts, besteht die Annahme, dass der Ultraschall jedoch keine dauerhaften Schäden an der Gefäßwand verursacht. Mechanische Scherbeanspruchung, Strahlungskräfte und lokale Erwärmung werden als Pathomechanismen der durch Ultraschallwellen induzierten Gefäßtonusveränderungen diskutiert (Martin et al. 2010; Phenix et al. 2014). So schlussfolgert O'Brien (2007) entsprechend physikalischen Gesetzmäßigkeiten, dass die Ausbreitung der Ultraschallwellen in einem Gewebe, eine mechanische Dehnung induziert, die zu einer relativen Änderung der Abmessungen oder der Form des beanspruchten Körpers führt. Bisher ergaben Studien, dass kleine Gefäße wie Arteriolen mit einem höheren Anteil an glatter Muskulatur in ihren Wänden eine stärkere

Reaktion auf Ultraschall zeigen (Martin et al. 2010). Diese Beobachtungen wurden auch in unserer Studie unterstützt, denn auch hier zeigte sich, dass die Intensität der ultraschallinduzierten Effekte umgekehrt proportional von der Gefäßgröße abhängig ist. In Anbetracht dessen scheint auch unser neu etabliertes CAM-Modell vor allem für die Beurteilung von Vasospasmen innerhalb der Mikrozirkulation geeignet zu sein. Sowohl thermische als auch nicht-thermische Effekte könnten zu den beobachteten Effekten in unserer Studie beigetragen haben. In dieser Versuchsanordnung waren wir aufgrund methodischer Einschränkungen nicht in der Lage, quantitative Messungen thermischer oder mechanischer Effekte durchzuführen. Eine Ultraschalldosimetrie wäre notwendig, um die Ultraschallenergie zu messen und ihre Wechselwirkung mit biologischen Materialien zu bewerten. In unserer Studie haben wir Ultraschall mit einer Intensität von 1.0 W/cm^2 angewendet und keine Nebenwirkungen beobachtet. Weitere Experimente einschließlich histologischer Analyse sind notwendig, um die Mechanismen aufzuklären, die den ultraschallinduzierten Effekten zugrunde liegen.

Im Rahmen unserer Studie muss jedoch neben der Temperatursensitivität des beschallten Gewebes auch die der Mizellen berücksichtigt werden. Derzeit geht man davon aus, dass die Wirkstofffreisetzung bei konventionellen Mizellen durch die mechanische Wirkung des Ultraschalls vermittelt wird (Marin et al. 2001; Marin et al. 2002; Hussein et al. 2005). Inwieweit ein thermischer Pathomechanismus zugrunde liegt, ist derzeit noch unklar. Bekannt und beschrieben ist eine vereinfachte Emulgierung von Arzneimittel und Trägerstoff (Nanopartikel) durch den Einsatz erhöhter Temperaturen während des Herstellungsprozess (Nicolai et al. 201; Zhang et al. 2014). Der Unimer-zu-Mizellen-Übergang werde durch das Vorhandensein thermischer Energie beschleunigt und die Barriere für Dissoziation zurück zu Unimeren stabilisiert. Mit steigender Temperatur werde die Bindung stärker (Rapoport 2012). Polymere Mizellen erhöhen somit ihre Stabilität bei steigender Temperatur. Da wir 1- eine Erhöhung der Mizellen Stabilität verhindern und 2- eine tiefe Penetration der Schallwellen erzeugen wollten, haben wir uns in Anbetracht der gewünschten intrathekalen Applikation des Medikaments in zukünftigen *in vivo*-Studien auf die Verwendung von 1.0 MHz , 1.7 W/cm^2 konzentriert. Unsere Ergebnisse hierzu sind vielversprechend: Nach der ultraschallinduzierten Wirkstofffreisetzung stieg der mittlere Gefäßdurchmesser der vasospastischen Gefäße von vormals 57% (Spannweite $44 - 61 \%$) wieder auf 89% (Spannweite $83 - 91 \%$), (ANOVA, $p = 0,0002$). Aufgrund von begrenzten, labortechnischen Möglichkeiten, können wir hinsichtlich thermischer Effekte auf die Nimodipin-beladenen Mizellen keine weiteren Aussagen tätigen.

Von einem komplexen Zusammenspiel zwischen Ultraschallphysik und biologischen Effekten, Partikelformulierung, Pharmakokinetik und Biodistribution ist auszugehen (Boissenot et al. 2016). Eine generelle Risikobewertung ist daher nicht möglich.

Trotz der noch fehlenden Evidenz der bei der Anwendung von Ultraschall wirkenden Mechanismen, bestätigt sich auch in unserer Studie die Vielseitigkeit und Wirksamkeit des Ultraschalls zur aktiven Induktion (on-demand) von Drug-Delivery-Systemen (Rapport 2012; Phenix et al. 2014). Durch die Bündelung der Schallwellen im Niederfrequenzbereich ist nicht nur eine tiefe Weichteilpenetration, sondern auch eine fokussierte lokal begrenzte Applikation möglich (Xia et al. 2016).

5 Zusammenfassung

Die aSAB stellt ein schweres neurologisches Krankheitsbild dar. Die Gesamtmortalität liegt bei 51 % (Bederson et al. 2000). Die Prognose wird überwiegend durch das Ausmaß der initialen Blutung und das Auftreten von DCIs bestimmt. DCI sind dabei als sekundäre und damit potenziell reversible Komplikationen zu werten. Die DCI beruht auf multifaktorieller Genese. Bei bis zu 70 % der von einer SAB betroffenen Patienten treten zerebrale Vasospasmen im akuten Verlauf der Erkrankung auf. In 20 – 30 % der Fälle werden diese symptomatisch und im Sinne einer DCI klinisch relevant. Trotz multimodaler Therapieansätze stellt die DCI weiterhin eine interdisziplinäre Herausforderung dar. Das einzige Pharmakon mit nachgewiesenem Nutzen zur Verbesserung des funktionellen Outcomes ist Nimodipin (Diringer et al. 2011; Dorhout et al. 2008; Vergouwen et al. 2011). Neue Forschungsansätze zur Untersuchung von Präventionsmaßnahmen und neuer Therapieoptionen sind daher von großem Interesse.

Ziel dieser Studie war es, eine neue Therapieoption zur Behandlung von Vasospasmen zu etablieren. Dies umfasst eine kontrollierte und bedarfsorientierte intrathekale Freisetzung von Nimodipin-beladenen Mizellen durch eine fokussierte Ultraschallanwendung. Die Versuche erfolgten *In-vitro* und *In-vivo*.

Die hohe klinische Relevanz zur Prävention und aussichtsreicher, Outcome verbessernder Therapie begründet die Initiative für die Durchführung dieser Studie. Im Rahmen der Methodenetablierung erfolgte 1 – die Herstellung Nimodipin-beladener Mizellen, 2 – Vasospasmeninduktion an der CAM und 3 – ultraschallgesteuerte Freisetzung des Nimodipins aus den Mizellen in einem initial *In-vitro*- und nachfolgenden *In-vivo*-Setting. Anschließend wurde die Wirksamkeit der ultraschallgesteuerten Freisetzung in Bezug auf die Auflösung des Vasospasmus untersucht. Unter Verwendung der Programme Image J, GraphPad und Excel erfolgte die qualitative und quantitative Auswertung der Vasospasmen. Unter Verwendung der direkten Auflösungs-methode nach Sotoudegana et al. konnte erfolgreich ein Verfahren zur Enkapsulierung des Nimodipins in die Mizellen etabliert werden (Sotoudegana et al. 2016).

Im *In-vitro*-Setting, dessen Kernprozess auf dem Dialyseverfahren beruht, wurde die erwartete kontinuierliche Wirkstofffreisetzung bestätigt. Eine gezielte, signifikante Steigerung der Wirkstoffabgabe konnte mithilfe gerichteter Energie in Form Ultraschalls (1 MHz, 1.7 W/cm², 60 sec) erzielt werden. Unter Verwendung, hochintensiven Ultraschalls

zu den Konditionen von 3 MHz, 1.0 W/cm², 60 sec etablierten wir ein neues Verfahren zur Induktion von Vasospasmen am CAM-Modell. Auf Basis dieses neu etablierten CAM-Modells erfolgten die *In-vivo*-Umsetzung unserer *In-vitro*-Erkenntnisse der ultraschallvermittelten Wirkstoffabgabe. Hierbei bestätigten sich die Ergebnisse der gezielten und bedarfsorientierten, im Sinne eines „on-demand“ Wirkstoffabgabe. Bestehende Vasospasmen ließen sich reproduzierbar signifikant binnen weniger Minuten auflösen.

Da unser labortechnisches Setting methodisch limitiert war, können wir hinsichtlich der zugrundeliegenden Pathomechanismen keine Aussagen treffen. Detaillierte Auswertungen der Mechanismen, die bei der ultraschallvermittelten Wirkstofffreisetzung von Nanocarrier und der Vasospasmusinduktion wirksam werden, sind nötig, um Risiken hinsichtlich unerwünschter Wirkungen und des toxikologischen Profils abzuschätzen.

Dennoch ermutigen die neu gewonnenen Erkenntnisse zur weiteren Evaluierung der nanoskalierten, ultraschallunterstützten Arzneimitteltherapie zur Prävention und Therapie Vasospasmen-assoziiertes DCI in einem Ratten-SAH-Modell und können als solide Grundlage für die Planung zukünftiger Experimente angesehen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abernethy DR, Schwartz JB (1988): Pharmacokinetics of calcium. *Clin Pharmacokin* 15, 1-14
- Athanasios KP, Marcel A, Kamp JF, Cornelius T, Beseoglu K, Turowski B, et al. (2017): Aneurysmatische Subarachnoidalblutung - Diagnostik und Therapie. *Dtsch Arztebl Int* 114, 226-236
- Bagley C (1928): Blood in the cerebrospinal fluid: Resultant functional and organic alterations in the central nervous system – Part A: Experimental data. *Arch Surg* 17, 18-38
- Basalious EB, Shamma EN (2015): Novel self-assembled nano-tubular mixed micelles of Pluronic P123, Pluronic F127 and phosphatidylcholine for oral delivery of nimodipine: In vitro characterization, ex vivo transport and in vivo pharmacokinetic studies. *Int J Pharm* 493, 347-356
- Batrkov E, Kabanov A (2008): Pluronic blockcopolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Control Release* 130, 98–106
- Bederson JB, Awad IA, Wiebers DO, Piepgras D, Haley EC Jr, Brott T, Hademenos G, Chyatte D, Rosenwasser R, Caroselli C (2000): Recommendations for the management of patients with unruptured intracranial aneurysms: A statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. *Stroke* 31, 2742–2750
- Bederson JB, Germano IM, Guarino L (1995): Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new non-craniotomy model of SAH in the rat. *Stroke* 26, 1086-1091
- Bellairs R, Osmond M (Hrsg.): *Atlas of Chick Development*. Academic Press, Oxford 2014
- Bhat DI (2017): Animal models for cerebral vasospasm: Where do we stand? *Neuro India* 65, 1043-1045
- Bilati U, Alléman E, Doelker E (2005): Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur J Pharm Sci* 24, 67–75
- Böcker W, Denk H, Heitz PH U, Höfler G, Kreipe H, Moch H (Hrsg.): *Pathologie*. Elsevier, 5. Auflage, Urban & Fischer, München 2012
- Cahill J, Calvert JW, Solaroglu I, Zhang JH (2006): Vasospasm and P53-induced apoptosis in an experimental model of SAH. *Stroke* 37, 1868-1874
- Carlson AP, Hänggi D, Wong GK, Etmnan N, Mayer SA, Aldrich F, Diringer MN, Schmutzhard E, Faleck HJ, Ng D et al. (2020): Single-dose intraventricular nimodipine microparticles versus oral nimodipine for aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 51, 1142-1149

-
- Chiappetta D, Sosnik A (2007): Poly (ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 66, 303–317
- Cho CF, Ablack A, Leong HS, Zijlstra A, Lewis J (2011): Evaluation of nanoparticle uptake in tumors in real time using intravital imaging. *J Vis Exp* 52, 2808
- Chow EKH, Pierstorff E, Cheng G, Ho D (2008): Copolymeric Nanofilm Platform for Controlled and Localized Therapeutic Delivery. *ACS Nano* 2, 33–40
- Connolly ES, Rabinstein AA, Carhuapoma JR, Derdeyn CP, Dion J, Higashida RT, L Hoh B, Kirkness CJ, Naidech AM, Ogilvy CS (2012): Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 43, 1711–1737
- Dandy WE (1938): Intracranial aneurysm of the internal carotid artery: cured by operation. *Ann Surg* 107 654–659
- Diringer MN, Bleck TP, Claude Hemphill J 3rd, Menon D, Shutter L, Vespa P, Burder N, Connolly ES, Citerio G, Gress D (2011): Critical care management of patients following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: recommendations from the Neurocritical Care Society’s Multidisciplinary Consensus Conference. *Neurocrit Care* 15, 211-240
- Doczi T (1985): The pathogenetic and prognostic significance of blood-brain barrier damage at the acute stage of aneurysmal SAH. Clinical and experimental studies. *Acta Neurochir* 77, 110-132
- Dorhout Mees SM, Rinkel GJ, Feigin VL, Algra A, van den Bergh WM, Vermeulen M, van Gijn J (2008): Calcium antagonists for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Stroke* 39, 514-515
- Dyson M (1982): Non-thermal cellular effects of ultrasound. *Br J Cancer* 5, 165-171
- Eckrich J, Kugler P, Buhr CR, Ernst BP, Mendler S, Baumgart J, Brieger J, Wiesmann N (2020): Monitoring of tumor growth and vascularization with repetitive ultrasonography in the chicken chorioallantoic-membrane-assay. *Sci Rep* 10, 18585
- Etminan N, Macdonald RL, Davis C, Burton K, Steiger HJ, Hänggi D (2015): Intrathecal application of the nimodipine slow-release microparticle system eg-1962 for prevention of delayed cerebral ischemia and improvement of outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* 120, 281-286
- Feigin VL (2005): Stroke epidemiology in the developing world. *Lancet* 365, 2160–2161
- Frontera JA, Claassen J, Schmidt JM, Wartenberg KE, Temes R, Connolly ES, MacDonal RL, Mayer SA (2006): Prediction of symptomatic vasospasm after subarachnoid hemorrhage: the modified fisher scale. *Neurosurgery* 59, 21-27
- Frontera JA, Fernandez A, Schmidt JM, Claassen J, Wartenberg K, Badjatia N, Connolly ES, Mayer SA (2009): Defining vasospasm after subarachnoid hemorrhage: what is the most clinically relevant definition? *Stroke* 40, 1963-1968

-
- Furtado D, Björnmalm M, Ayton S, Bush AI, Kempe K, Caruso F (2018): Overcoming the blood-brain-barrier: the role of nanomaterials in treating neurological diseases. *Adv Mater* 30, e1801362
- Gengo FM, Fagan SC, Krol G, Bernhard H (1987): Nimodipine disposition and haemodynamic effects in patients with cirrhosis and age-matched controls. *Br J Clin Pharmacol* 23, 47
- Greving JP, Wermer MJ, Brown RD et al. Development of the PHASES score for prediction of risk of rupture of intracranial aneurysms (2014): a pooled analysis of six prospective cohort studies. *Lancet Neurol* 13, 59–66
- Guglielmi G, Vinuela F, Dion J, Duckwiler G (1991): Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach. Part 2: Preliminary clinical experience. *J Neurosurg* 75, 8–14
- Gules I, Satoh M, Clower BR, Nanda A, Zhang JH (2002): Comparison of three rat models of cerebral vasospasm. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H2551-H2559
- Hänggi D, Etminan N, Steiger HJ, Johnson M, Peet MM, Tice T, Burton K, Hudson B, Turner M, Stella A, Heshmati P, Davis S, Faleck HJ, Macdonald RL (2016): A side-specific, sustained-release drug delivery system for aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurotherapeutics* 13, 439-449
- Hänggi D, Perrin J, Eicker S, Beseoglu K, Etminan N, Kamp MA, Heiroth HJ, Bege N, Macht S, Frauenknecht K, Sommer C, Kissel T, Steiger HJ (2012): Local delivery of nimodipine by prolonged-release microparticles- feasibility, effectiveness and dose-finding in experimental subarachnoid hemorrhage. *PLOS One* 7, e42597
- Hernandez-Duran S, Mielke D, Rohde V, Malinova V (2019): Does nimodipine interruption due to high catecholamine doses lead to a greater incidence of delayed cerebral ischemia in the setting of aneurysmal subarachnoid hemorrhage? *World Neurosurg* 132, e834-e840
- Householder KT, Dharmaraj S, Sandberg DI, Wechsler-Reya RJ, Sirianni RW (2019): Fate of nanoparticles in the central nervous system after intrathecal injection in healthy mice. *Sci Rep* 9, 12587
- Husseini GA, Diaz de la Rosa MA, Richardson ES, Christensen DA, Pitt WG (2005): The role of cavitation in acoustically activated drug delivery. *J Control Release* 107, 253–261
- Jilani SM, Murphy TJ, Thai SN, Eichmann A, Alva, JA, Iruela-Arispe ML (2003): Selective binding of lectins to embryonic chicken vasculature. *J Histochem Cytochem* 51, 597–604
- Kader A, Krauss WE, Onesti ST, Elliott JP, Solomon RA (1990): Chronic cerebral blood flow changes following experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke* 21, 577- 581

-
- Kamii H, Kato I, Kinouchi H, Chan PH, Epstein CJ, Akabane A, Okamoto H, Yoshimoto T (1999): Amelioration of vasospasm after SAH in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Stroke* 30, 867-871
- Kassell NF, Torner JC, Haley EC, Jane JA, Adams HP, Kongable GL (1990): The international cooperative study on the timing of aneurysm surgery. Part 1: Overall management results. *J Neurosurg* 73, 18–36
- Kempe L (2009): Ultraschall, Teil 2. Therapie – Schritte zur nicht invasiven Chirurgie. *Dtsch Arztebl* 46, 24
- Kreuter J (1983): Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems - preparation methods. *Pharm. Acta Helv.* 58, 196-209
- Langer K, Müller R (2009): Nanotechnologie. Nanopartikel bringen Arzneistoffe sicher ans Ziel. *Pharmazeutische Zeitung* 4, 12-15
- Leclerc JL, Garcia JM, Diller MA, Carpenter AM, Kamat PK, Hoh BL, Dore S (2018): A comparison of pathophysiology in humans and rodent models of subarachnoid hemorrhage. *Front Mol Neurosci* 11, 71
- Lee HJ, Koo AN, Kwon IK, Lee SC (2013): Biomaterials for Cancer Therapeutics. Diagnosis, Prevention and Therapy. Polymer therapeutics for treating cancer. Woodhead publishing 6, 113-133
- Leighton J, Nassauer J, Tchao R (1985): The chick embryo in toxicology: An alternative to the rabbit eye. *Food Chem Toxicol* 23, 293–298
- Lier H, Krep H, Schöchl H (2009): Coagulation management in the treatment of multiple trauma. *Anaesthesist* 58, 1110-1126
- Lin CL, Calisaneller T, Ukita N, Dumont AS, Kassell NF, Lee KS (2003): A murine model of SAH induced cerebral vasospasm. *J Neurosci Methods* 123, 89-97
- Macdonald RL, Hänggi D, Strange P, Steiger HJ, Mocco J, Miller M, Mayer SA, Hoh BL, Faleck HJ, Etminan N, Diringer MN, Carlson AP; Aldrich (2019): Nimodipine pharmacokinetics after intraventricular injection of sustained-release nimodipine for subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 6, 1-7
- Macdonald RL, Leung M, Tice T (2012): Intracranial drug delivery for subarachnoid hemorrhage. *Ther Deliv* 3, 91-103
- Maegle M, Paffrath T, Bouillon (2011): Acute traumatic coagulopathy in severe injury – incidence, risk stratification, and treatment options. *Dtsch Arzteblatt Int* 108, 827-835
- Mahaney KB, Todd MM, Torner JC, INHAST Investigators I (2011): Variation of patient characteristics, management, and outcome with timing of surgery for aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 114, 1045–1053
- Marbacher S, Fandino J, Kitchen ND (2010): Standard intracranial in vivo animal models for delayed cerebral vasospasm. *Br J Neurosurg* 24, 415-434

-
- Marin A, Muniruzzaman M, Rapoport N (2001): Acoustic activation of drug delivery from polymeric micelles: Effect of pulsed ultrasound. *J Control Release* 71, 239–249
- Marin A, Sun H, Hussein GA, Pitt WG, Christensen DA, Rapoport NY (2002): Drug delivery in Pluronic micelles: Effect of high-frequency ultrasound on drug release from micelles and intracellular uptake. *J Control Release* 84, 39–47
- Mariß J, Maurer C (Hrsg.): *Neuroradiologische Messverfahren, Klassifikationen und Zeichen*. 1. Auflage; Thieme, Stuttgart 2018
- Martin EM, Duck FA, Ellis RE, Winlove CP (2010): Ultrasound-induced contraction of the carotid artery in vitro. *Ultrasound Med Biol* 36, 166-172
- Mino M, Kamii H, Fujimura M, Kondo T, Takasawa S, Okamoto H, Yoshimoto T (2003): Temporal changes of neurogenesis in the mouse hippocampus after experimental SAH. *Neurol Res* 25, 839-845
- Murphy JB, Rous P (1912): The Behavior of Chicken Sarcoma Implanted in the Developing Embryo. *J Exp Med* 15, 119-132
- Nicolai T, Colombani O, Chassenieux C (2010): Dynamic polymeric micelles versus frozen nanoparticles formed by block copolymers. *Soft Matter* 6, 3111–3118
- Nowak-Sliwinska P, Segura T, Iruela-Arispe ML (2014): The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis* 17, 779–804
- O’Brian WD (2007): Ultrasound-biophysics mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 93, 215-255
- Olesen H (1995): Properties and units in the clinical laboratory sciences. I. Syntax and semantic rules IUPAC-IFCC Recommendations. *Clin Chim Acta* 28, 5-21
- Opris I, Lebedev MA, Pulgar VM, Vidu R, Enachescu M, Casanova MF (2020): Nanotechnologies in neuroscience and neuroengineering. *Front Neurosci* 14, 33
- Pampaloni NP, Giugliano M, Scaini D, Ballerini L, Rauti R (2019): Advances in nano neuroscience: from nanomaterials to nanotools. *Front Neurosci* 12, 953
- Paris JL, Villaverde G, Gomez-Grana S, Vallet-Regi M (2020): Nanoparticles for multimodal antivascular therapeutics: Dual drug release, photothermal and photodynamic therapy. *Acta Biomater* 101, 459–468
- Parisi O, Puoci F, Restuccia D, farina G, Iemma F, Picci N (2014): Polyphenols in Human Health and Disease. *Academic Press* 4, 29-45
- Parra A, McGirt MJ, Sheng H, Laskowitz DT, Pearlstein RD, Warner DS (2002): Mouse model of SAH associated cerebral vasospasm: Methodological analysis. *Neurol Res* 24, 510-516

-
- Phenix CP, Togtema M, Pichardo S, Zehbe I, Curiel L (2014): High intensity focused ultrasound technology, its scope and applications in therapy and drug delivery. *J Pharm Pharm Sci* 17, 136-153
- Poeck K, Hacke W (Hrsg.): *Neurologie*. 12. Auflage; Springer, Heidelberg 2006
- Rapoport N (2012): Ultrasound-mediated micellar drug delivery. *Int J Hyperthermia* 28, 374-385
- Ribatti D (2016): The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev* 141, 70–77
- Riva R, Pegoli M, Contin M, Perrone A, Mohamed S, Zanello M (2019): Cerebrospinal fluid concentrations of nimodipine correlate with long-term outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage: pilot study. *Clin Neuropharmacol* 42, 157-162
- Russell WMS, Burch RL (Hrsg.): *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen & Co. Ltd., London 1959
- Saito A, Kamii H, Kato I, et al. (2001): Transgenic CuZn-superoxide dismutase inhibits NO synthase induction in experimental SAH. *Stroke* 32, 1652-1657
- Salgarella AR, Zahoranova A, Sramkova P, Majecikova M, Pavlova E, Luxenhofer R, Kronek J, Lacik I, Ricotti L (2018): Investigation of drug release modulation from poly(2-oxazoline) micelles through ultrasound. *Sci Rep* 8, 9893
- Sadow N, Diesing D, Sarrafzadeh A, Vajkoczy P, Wolf S (2016): Nimodipine dose reductions in the treatment of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care* 25, 29-39
- Schlenk F, Werner S, Rabel M, Jacobs F, Bergemann C, Clement JH, Fischer D (2017): Comprehensive analysis of the in vitro and ex ovo hemocompatibility of surface engineered iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Arch Toxicol* 91, 3271–3286
- Schmolka IR (1972): Artificial skin. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J Biomed Mater Res* 6, 571–582
- Schwartz AY, Masan A, Sehba FA, et al. (2000): Experimental models of SAH in the rat. A refinement of the endovascular filament model. *J Neurosci Methods* 96, 161-167
- Shereema RM, Sruthi TV, Kumar, VB, Rao TP, Shankar SS (2014): Angiogenic Profiling of Synthesized Carbon Quantum Dots. *Biochemistry* 54, 6352–6356
- Sotoudegana F, Aminib M, Faizic M, Aboofazelia R (2016): Nimodipine-loaded Pluronic® block copolymer micelles: preparation, characterization, in-vitro and in-vivo-studies. *Iran J Pharm Res* 15, 641-661
- Steinmetz (2015): Subarachnoidalblutung. (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie) S1-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie.

https://www.amwf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-0731_S1_Subarachnoidalblutung_2020_abgelaufen.de; abgerufen am 27.01.2021

- Stedel WI, Cortbus F, Schwerdtfeger K (2005): Epidemiology and prevention of fatal head injuries in Germany—trends and the impact of the reunification. *Acta Neurochir* 147, 231–242
- Suzuki H, Kanamaru K, Tsunoda H, et al. (1999): Heme oxygenase-1 gene induction as an intrinsic regulation against delayed cerebral vasospasm in rats. *J Clin Invest* 104, 59-66
- Toman P, Lien CF, Ahmad Z, Dietrich S, Smith JR, An Q, Molnar E, Pilkington GJ, Gorecki DC, Tsibouklis J et al. (2015): Nanoparticles of alkylglyceryl-dextran-graft-poly(lactic acid) for drug delivery to the brain: Preparation and in vitro investigation. *Acta Biomater* 23, 250–262
- Turrowski B, Hanggi D, Beck A, Aurich V, Steiger H, Moedder U (2007): New angiographic measurement tool for analysis of small cerebral vessels: Application to a subarachnoid hemorrhage model in rat. *Neuroradiology* 49, 129-137
- Van den Bergh WM, Schepers J, Veldhuis WB, Nicolay K, Tulleken CA, Rinkel GJE (2005): Magnetic resonance imaging in experimental subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir* 147, 977-983
- Van Gijn J, Kerr RS, Rinkehal GJ (2009): Subarachnoid haemorrhage. *Lancet* 369, 306–318
- Van Lieshout JH, Bruland I, Fischer I, Cornelius JF, Kamo MA, Turowski B, Tortora A, Steiger HJ, Petridis AK (2017): Time is life. Increased mortality of patients with aneurysmatic subarachnoid hemorrhage caused by prolonged transport time to a high-volume neurosurgical unit. *Am J Emerg Med* 35, 45–50
- Vatter H, Weidauer S, Konczalla J, Dettmann E, Zimmermann M, Raabe A, Preibisch C, Zanella FE, Seifert V (2006): Time course in the development of cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage: Clinical and neurological assessment of the rat double hemorrhage model. *Neurosurgery* 58, 1190-1197
- Veelken JA, Laing RJ, Jakubowski J (1995): The Sheffield model of SAH in rats. *Stroke* 26, 1279-1283
- Vergouwen MD (2011): Vasospasm versus delayed cerebral ischemia as an outcome event in clinical trials and observational studies. *Neurocrit Care* 15, 308–11.
- Wiebers DO, Whisnant JP, Huston J 3rd, Meissner I, Brown Jr RD, Piegras DG, Forbes GS, Thielen K, Nichols D, O'Fallon WM, et al. (2003): Unruptured intracranial aneurysms: Natural history, clinical outcome, and risks of surgical and endovascular treatment. International study of unruptured intracranial aneurysms investigators. *Lancet* 362, 103–110
- Xia H, Zhao Y, Tong R (2016): Ultrasound-mediated polymeric micelle drug delivery. *Adv Exp Med Biol* 880, 365-384

- Yuan Y, Yang S, Li C, Xu K, Luo Q, Yu J (2016): The chicken embryo umbilical artery is a promising in vivo model system for the study of vasospasm. *Int J Clin Exp Med* 9, 1139-1149
- Zhang Y, Jeon M, Rich LJ, Hong H, Geng, J, Zhangn Y, Shi S, Barnhart TE, Alexandridis P, Huizinga JD, et al. (2014): Non-invasive, Multimodal Functional Imaging of the Intestine with Frozen Micellar Naphthalocyanines. *Nat Nanotechnol* 9, 631–638
- Zhonggao G, Heidi D, Rapaport N (2004): Ultrasound-enhanced tumor targeting of polymeric micellar drug carriers. *Mol Pharm* 1, 317-330
- Zylka-Menhorn V (1996): Traumatische Subarachnoidalblutung: Einfluß von Nimodipin durch Studie belegt. *Dtsch Arztebl* 93, A-2160 / B-1836 / C-1640

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einen besonderen Dank an diejenigen richten, die zu dem Erfolg dieser Promotionsschrift so wesentlich beigetragen haben:

Mein Dank gilt zunächst Frau PD Dr. Vesna Malinova, meiner Doktormama. Nicht nur hinsichtlich der Ideengebung, sondern insbesondere auch für die konstruktive Zusammenarbeit und den bereichernden Austausch, der mir einen wissenschaftlich-kritischen Blick auf die Thematik eröffnete, bin ich äußerst dankbar. Unsere Dialoge waren immer fortschrittsorientiert und haben mich stets motiviert und ermutigt, auch bei Niederschlägen beharrlich zu bleiben. Mit dir als Mentorin wurde mir der Einstieg in gute wissenschaftliche Praxis gelehrt und der Reiz für weitere Forschungsinitiativen gesetzt.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Veit Rohde, Chefarzt der Neurochirurgie, der uns stets mit kritischen Fragen forderte und durch seine wissenschaftliche Expertise immer Rückgrat war.

Ferner danke ich meinem Ko-Betreuer Herr Prof. Dr. med. Thorsten R. Döppner für die differenzierte und hilfsbereite Betreuung als Zweitgutachter.

Zweifelsohne gilt ein besonders herauszustellender Dank Swetlana Sperling. Du hast mir so viele Törchen eröffnet, Kontakte hergestellt und bist mir nicht nur Vorbild, sondern insbesondere auch Freundin geworden. Höhen und Tiefen haben dich gleichermaßen beflügelt und mir so Auftrieb und Motivation gegeben. Ohne deine mühevollen Geduld, deinen Humor und dein liebevolles Sein, wäre diese mühsame und intensive Zeit nicht so lebenswert geworden. In diesem Zuge zu nennen ist auch Dr. rer.nat. Milena Ninkovic, die für mich stets ein Fels in der Brandung war. Durch deine prüfenden Anmerkungen, deinen zweckdienlichen Empfehlungen und deine wissenschaftlichen Erfahrung, hast du stets Standfestigkeit und Ruhe ausgestrahlt, von der ich sehr gezehrt habe. Ihr zwei seid mir durch euren Beistand Freunde fürs Leben geworden.

Eine der wichtigsten Begegnungen, die ich im Rahmen meiner Promotionsarbeit gemacht habe, ist die mit Henning Schroeder. Mithilfe deines Erfahrungsschatzes und kritischen Betrachtungsweise hast du essentiell zum Fortschritt dieser Promotion beigetragen. Noch dazu, hat mir insbesondere dein moralischer Beistand und Halt, wieder und wieder Mut zur Vollendung dieser Arbeit gegeben.

Tief verbunden und dankbar bin ich meinen Freunden Fabienne Bühler, Vera Reuschel, meinem väterlichen Freund Dr. med. Hans-Heino Rustenbeck, Lewin Häselbarth, Lorenz Dilling, Konstantin Gast, Jonathan Benk, Carl-Jonas Böker und Jacqueline Possiel, die mich alle auf ganz unterschiedliche Weise während der Entstehung dieser Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester. Ihr habt mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht und mich maßgeblich zu der Person gemacht haben, die ich bin. Euch widme ich diese Arbeit.

Curriculum vitae

Am 09.01.1995 wurde ich in Hildesheim geboren. Von 2000 bis 2005 besuchte ich die Grundschule Achtum-Uppen, Hildesheim. Dieser Zeit schloss sich die Schulzeit am Bischöflichen Gymnasium Josephinum an.

Nach dem Abitur begann ich zunächst das Studium der Zahnmedizin an der MHH, welches ich jedoch nach dem Propädeutikum beendete. Da ich das Gefühl der Themenvielseitigkeit vermisste, wechselte ich zum Sommersemester 2014 in den Studiengang der Humanmedizin an der Universitätsmedizin Göttingen. Dieser Ort sollte nun für die nächsten Jahre meine Heimat werden. Die darauffolgende Zeit der Vorklinik war geprägt von intensivem Tutorendasein in der Histologie und Makroskopischen Anatomie. Unter der Leitung von Prof. Dr. Wilting war es mir möglich, als Präparations-Hilfswissenschaftler mehre Jahrgänge erfolgreich durch das Anatomie-Semester zu führen.

Seit Juni 2018 bin ich Doktorandin in der Neurochirurgie unter der Leitung und Betreuung von Prof. Dr. med. Rohde und PD Dr. med. Vesna Malinova. Zeitgleich begann ich in dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsmedizin Göttingen als Modulkoordinatorin für das Modul 2.1. Parallel nahm ich Tätigkeiten als Tutorin im STÄPS und im Rahmen von POLEMA auf.

Im Sommer 2019 begann für mich das Praktische Jahr, welches ich in Gänze an der Universitätsmedizin in Göttingen absolvierte. An dieser Stelle ist ein Dank an PD Dr. Hammerstein-Equord und Prof. Dr. Hinterthaler unumgänglich – die Zeit bei Ihnen in der Thoraxchirurgie hat mir gutes „ärztliches Dasein“ gelehrt. Solch feinsinniger, akkurater Umgang mit den Patienten und mit uns heranreifenden Ärzten ist mir Vorbild und wird für mich immer Korrektiv sein.

Am 25.05.2020 beendete ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität mit der Approbation.

Seit dem 01.06.2020 bin ich als Assistenzärztin in der Neuroradiologie der Universitätsmedizin Göttingen tätig. Zeitgleich begann ich meine Dozententätigkeit für Anatomie, Physiologie und Geburtkunde an der Hebammenschule der Universitätsmedizin in Göttingen, des St. Bernwardskrankenhauses in Hildesheim und am Gesundheitscampus der Hochschule für Angewandte Wissenschaften (HAWK) in Göttingen.