

**Charakterisierung und *ex vivo* Untersuchung
eines künstlichen Sauerstoffträgers für den
Einsatz zur Konservierung von Nieren**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

der Fakultät für Chemie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Johannes Jägers
geboren in Oberhausen

Universität Duisburg-Essen

2021

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG (30.06.2021)

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden im Institut für Physiologie am Universitätsklinikum Essen durchgeführt:

1. Gutachterin: Prof. Dr. Katja B. Ferenz
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Kirsch
3. Gutachter: Prof. Dr. Rafael Stoll

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Mathias Ulbricht

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/74545

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20230508-113042-5

Alle Rechte vorbehalten.

Für Ester und Helge

The truth is the only dictator
I respect and obey
- Enter Shikari -

Inhalt

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Nierentransplantation.....	1
1.2.	Perfusionsrelevante Aspekte der Nierenphysiologie und -anatomie	2
1.3.	Unterschiede zwischen künstlichen Sauerstoffträgern und Erythrozyten.....	4
1.4.	Maschinenperfusion der Niere.....	5
1.5.	Perfluorcarbone.....	6
1.6.	Perfluorcarbone im Einsatz als Sauerstoffträger.....	9
1.7.	Emulsionen, Mikroemulsionen und Nanoemulsionen	10
1.8.	Hochruck-Homogenisierung.....	13
1.9.	Albumin	14
1.10.	Zelluläre Aufnahme von Partikeln	15
1.11.	Analysemethoden von Nanopartikeln.....	17
2.	Material/Methoden.....	20
2.1.	Verwendetes Medium für die Herstellung von Sauerstoffträgern	20
2.2.	Standard-Herstellung des Sauerstoffträgers	21
2.3.	Herstellung des TG-Sauerstoffträgers	21
2.4.	Aufreinigung des Sauerstoffträgers.....	22
2.5.	Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	22
2.6.	UV/VIS Spektroskopie.....	23
2.7.	Quantifizierung der Verdunstung des PFDs aus der Suspension	24
2.8.	Bromkresolgrün-Färbung (BKG)	24
2.9.	Tiere.....	25
2.10.	<i>Ex vivo</i> normotherme Perfusion der Niere.....	25
	Operation	25
	Herstellung des Perfusionsmediums.....	26
	Perfusion.....	26
2.11.	Sauerstoffkapazität.....	28
	Amperometrische Sauerstoffmessung mit Hilfe des Oxygraph-2k.....	28
	Messung des Sauerstofftransfers ins Gewebe durch HIF-Quantifizierung	30
2.12.	Anthron Methode (Bestimmung der GFR)	31
2.13.	Zellschädigung	31
	Aspartat-Aminotransferase/ Laktat-Dehydrogenase	31

Nachweis Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen (TBARS)	32
2.14. Histologie.....	32
TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)-Assay.....	33
Periodsäure-Schiff-Reaktion Färbung (PAS)	34
Befundung	34
2.15. Zellkultur.....	37
2.16. Statistik	37
3. Ergebnisse.....	38
3.1. Einflussfaktoren im Herstellungsprozess der Sauerstoffträger.....	38
3.2. Charakterisierung der Standard-Sauerstoffträger	43
Verlust des PFDs aus den Sauerstoffträgern durch Verdunstung	43
Partikelgrößenverteilung der Sauerstoffträger	44
Oberflächenbeschaffenheit des Sauerstoffträgers:	47
Sauerstoffkapazität der Sauerstoffträger.....	49
3.3. Charakterisierung des TG-Sauerstoffträgers.....	51
Physikalische Eigenschaften des TG-Sauerstoffträgers.....	51
Partikelgrößenverteilung der TG-Sauerstoffträger	52
Sauerstoffkapazität der TG-Sauerstoffträger.....	54
Biokompatibilität der TG-Sauerstoffträger	55
3.4. Einsatz unterschiedlicher Volumen-Fractionen an Sauerstoffträgern in der EVNP.....	58
Sauerstoffversorgung des Gewebes.....	58
Physiologische Funktion	59
Zellschäden innerhalb der Niere	60
3.5. Funktionalitätstest von 4 % Sauerstoffträgern in der EVNP gegen Erythrozyten	63
Zellschäden innerhalb der Niere	63
Histologie.....	64
4. Diskussion.....	65
4.1. Herstellungsprozess der Sauerstoffträger.....	66
Einfluss der Albuminkonzentration in der Stammlösung.....	66
Einfluss des Drucks, der Temperatur und der Passagenzahl auf die Albuminhülle	67
4.2. Charakterisierung der eingesetzten Sauerstoffträger.....	70
Verdunstung	70
Partikelgrößenverteilung.....	70
Oberflächenbeschaffenheit.....	73
Sauerstoffkapazität der Sauerstoffträger.....	74

4.3.	Herstellung und Charakterisierung der TG-Sauerstoffträger	75
	Einfluss des Temperaturgradienten	75
	Partikelgrößenverteilung.....	77
	Sauerstoffkapazität	77
	Aufnahme in Makrophagen und Tubulusepithelzellen.....	78
4.4.	Auswirkung verschiedener Volumen-Fractionen der Sauerstoffträger in der EVNP	81
	Gewebeoxygenierung.....	81
	Physiologische Funktion	82
	Zelluntergang.....	83
	Oxidativer Stress.....	84
4.5.	Vergleich zwischen Sauerstoffträgern und Erythrozyten in der EVNP.....	85
	Biochemische Marker für Zellschäden	85
	Glomerulärer Kollaps.....	86
	Ausprägung von Tubulusnekrosen in Nierenrinde und -mark	87
	Endogene Energiereserven der Niere	88
5.	Fazit	90
6.	Ausblick.....	91
7.	Zusammenfassung.....	92
8.	Referenzen	94
9.	Anhang.....	106
	9.1. Abkürzungsverzeichnis	106
	9.2. Publikationen.....	108
	9.3. Wissenschaftliche Vorträge.....	109
	9.4. Posterpräsentationen.....	110
	9.5. Lebenslauf	111
	9.6. Erklärung	113
	9.7. Danksagung	114

1. Einleitung

Demographische Veränderungen zwingen die Transplantationsmedizin dazu, neue Wege zu finden, um Organe, besonders Nieren, für eine Transplantation nutzbar zu machen. Der Schwerpunkt momentaner Forschung liegt dabei darauf, die Qualität marginaler Organe zu verbessern, indem die Organe nach Entnahme aus dem Spender oxygeniert und normotherm, *ex vivo* perfundiert werden.¹⁻⁵

Die folgende Arbeit ist Teil der Bemühungen der Transplantationsmedizin, den Pool transplantierbarer Organe zu vergrößern, um das Leiden von Menschen mit einer terminalen Nierenerkrankung zu mindern, indem ihnen der Zugang zu qualitativ hochwertigen Organen ermöglicht wird.

1.1. Nierentransplantation

In Fällen von terminaler Niereninsuffizienz ist trotz des großen Forschungsaufwands der letzten Jahrzehnte und neu zugelassener Medikamente die einzige Möglichkeit der dialyseunabhängigen Therapie die Transplantation einer Niere. Im Vergleich zur Hämodialyse lindert die Transplantation die Begleiterscheinungen wie die Verschlechterung der Zahngesundheit, Gefäßverkalkungen, aber auch die emotionale Belastung, die die Abhängigkeit von der Hämodialyse mit sich bringt.⁶⁻¹⁰ Laut aktuellen Zahlen des „Global Observatory on Donation and Transplantation“ lag die Zahl an Patienten, die Bedarf an transplantierbaren Nieren hatten, im Jahr 2019 bei 70.000 Patienten in Europa. Weniger als ein Drittel dieser Patienten konnte eine Niere transplantiert werden. Auch wenn die Gründe für eine nicht erfolgte Nierentransplantation vielschichtig sind, ist hervorzuheben, dass in Europa etwa 6500 Nieren entweder aufgrund schlechter Prognosen kurz vor der Transplantation verworfen oder erst gar nicht zur Transplantation freigegeben wurden.¹¹ Weil die Wartezeiten für eine Organtransplantation bei Nieren die längsten unter allen Organen sind, wurde bereits Mitte der 1990er Jahre eine gesonderte Kategorie eingeführt, um Spenden von Spendern mit Vorerkrankungen zu ermöglichen, bei deren Nieren eine eher marginale Qualität erwartet wird.^{12,13} Diese Erweiterung des Spenderpools (expanded criteria donors, ECD) führte zu einem Anstieg des durchschnittlichen Alters sowohl der Organspender als auch der Organempfänger. Damit verbunden, vergrößerte sich die Zahl der Komorbiditäten sowohl im Spender als auch im

Empfänger. Generell kommt es in ECD-Nieren gehäuft zu verzögerter Organfunktion (delayed graft function, DGF) oder terminaler Organabstoßung (graftloss, GL).¹⁴⁻¹⁸ Ein weiterer Aspekt ist die Zeitspanne des Blutstillstandes in verstorbenen Spendern. In Deutschland dürfen gemäß des 1997 verabschiedeten Transplantationsgesetzes Organe nur nach eindeutiger Feststellung des Hirntods und unter künstlicher Aufrechterhaltung des Herz-Kreislauf-Systems entnommen werden, um die Versorgung der Organe mit Nährstoffen und Sauerstoff zu gewährleisten.^{18,19} Diese Methode schützt nicht vollends vor DGF und GL.²⁰ Die in Entnahmezentren standardisierte Lagerungspraxis von Organen beinhaltet das Freispülen der Organe mit kristallinen Lösungen und die anschließende Lagerung auf Eis für teilweise mehrere Stunden. Dabei wird die Kerntemperatur des Organs schnell auf $< 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt, um die metabolische Aktivität zu senken, damit die Adenosintriphosphat-(ATP) Spiegel der Zellen erhalten werden, was wiederum die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive Oxygen species, ROS) minimieren soll.²¹⁻²³ Tatsächlich kann der Metabolismus nicht komplett abgeschaltet werden, und die geringe Temperatur führt zu einer ROS-Induktion an den Mitochondrien, die zu oxydativem Stress und endothelialen Schäden führt.²⁴⁻²⁶ Das Abkühlen führt zur Beeinträchtigung der Na^+/K^+ -ATPase, besonders in den Epithelzellen des proximalen Tubulus, wodurch es zu einer Verschiebung des Ionengleichgewichts und dadurch zu einem zellulären Anschwellen und Zelltod kommt.²⁷ Deshalb zeigt die Methode der statischen Kaltlagerung abhängig von der Lagerungszeit, eine Erhöhung der Inzidenz von DGF und GL.²⁸⁻³²

1.2. Perfusionsrelevante Aspekte der Nierenphysiologie und -anatomie

Die Niere ist auf Grund ihrer Funktion in verschiedene Kompartimente aufgeteilt, die optisch voneinander unterschieden werden können. Der außenliegende Bereich, die Nierenrinde, ist optisch sehr dicht und gut durchblutet. In der Nierenrinde befinden sich die Nierenkörperchen, die den Filter der Niere ausmachen. Dieser dreistufige Filter, bestehend aus gefensterter Endothel, der Basalmembran und den Podozyten ist dafür zuständig, Zellen, große Proteine und stark geladene Teilchen davon abzuhalten, über den Urin ausgeschieden zu werden. Im Plasma gelöste, kleine, nicht negativ geladene Teilchen treten über den Filter und werden in der Bowman-Kapsel wie in einem Trichter aufgefangen und in ein komplexes Tubulus-System geleitet. Das

Tubulussystem ist aufgeteilt in einen proximalen Teil, der in das Nierenmark, und in einen distalen Teil, der vom Nierenmark zurück in die Nierenrinde führt. Der erste Teil des proximalen Tubulus besitzt große Zellen mit sehr vielen Mitochondrien, die sauerstoffabhängig Energie liefern, um über die Na^+/K^+ -ATPasen einen Gradienten aufzubauen, der genutzt wird, um lebenswichtige Substanzen wie Glukose, Aminosäuren und auch Bikarbonat aus dem Urin zurückzugewinnen. Die Zellen des proximalen Tubulus haben den größten Energiebedarf aller Zellen in der Niere und sind gleichzeitig nicht in der Lage, sauerstoffunabhängig ATP zu synthetisieren. Dadurch reagieren sie sehr empfindlich auf Sauerstoffmangel (Hypoxie) und erfahren erhebliche Schäden schon bei kurzen Ischaemiezeiten.^{33,34} Im weiteren Verlauf des Tubulussystems nimmt die Durchblutung stetig ab und damit der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) des Organs und die Anzahl der Mitochondrien in den Tubuluszellen. Die Abnahme der Durchblutung basiert auf zwei Effekten: Zum einen existiert in der Niere ein arteriovenöser Kurzschluss, auch *Shunting* genannt, innerhalb der Nierenrinde, in dem arterieller Sauerstoff direkt auf venöses Blut übertragen wird.^{35,36} Dieser Kurzschluss wird durch den sogenannten Bohr-Effekt beschleunigt, bei dem CO_2 an die N-Termini des Hämoglobins unter Bildung eines Carbamates gebunden wird. Die daraus resultierende Konformationsänderung des Hämoglobins senkt die Affinität zu Sauerstoff, sodass dieser einfacher abgegeben werden kann.³⁷ Zum anderen unterliegt Blut dem sogenannten Fåhræus-Lindqvist-Effekt, d.h. Erythrozyten strömen in der Mitte der Blutbahn, wodurch sie bei Verzweigungen zum größten Teil im größeren Gefäß verbleiben und das Kapillarbett nicht erreichen (Abbildung 1.2.1).^{38,39}

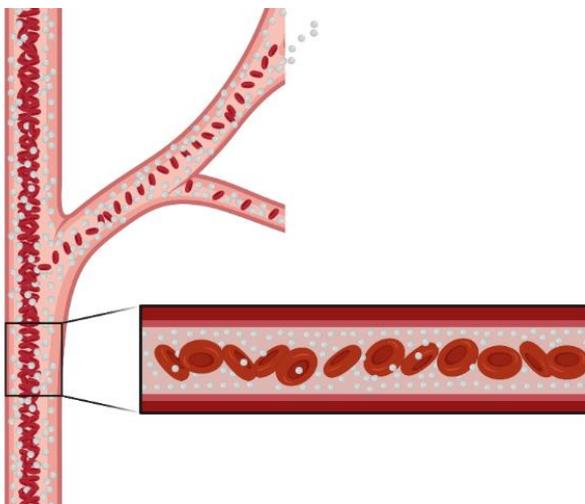


Abbildung 1.2.1: Darstellung des Verhaltens der Sauerstoffträger im Kapillarbett. A Im Gegensatz zu Erythrozyten unterliegen partikuläre Sauerstoffträger nicht dem Fåhræus-Lindqvist-Effekt und verbleiben nicht in der Mitte des Blutgefäßes. An Abzweigungen von größeren in kleinere Gefäße nimmt die Volumen-Fraktion des Sauerstoffträgers daher nicht ab.⁴⁰

Dadurch herrscht im Nierenmark ein pO_2 von etwa 21 mmHg. Im Gegensatz dazu liegt der pO_2 in der Nierenrinde bei etwa 50 mmHg.⁴¹ Die Zellen des Tubulusepithels sind daher an die „hypoxischen“ Bedingungen (Es handelt sich um physiologische Sauerstoffpartialdrücke, die unterhalb der in anderen Organen gemessenen Partialdrücke liegen. Daher wird im Weiteren von physoxischen Bedingungen gesprochen.) angepasst und können sauerstoffunabhängig ATP synthetisieren. Eine Anpassung dieser niedrigen physoxischen Bedingungen ist die durchgehende Akkumulation von HIF-2 α in den interstitiellen Fibroblasten.⁴² Diese physiologische Anpassung der Zellen führt zu einem verringerten Schutz vor Hyperoxie und damit verbundenem oxidativem Stress.

1.3. Unterschiede zwischen künstlichen Sauerstoffträgern und Erythrozyten

Der Einsatz der richtigen Dosis an Sauerstoffträgern ist wichtig, um sowohl eine Hypoxie als auch eine Hyperoxie zu verhindern und die Niere dadurch im gewissen Rahmen vor perfusionsbedingten Schäden zu schützen. Der physiologische Sauerstoffträger des Blutes ist Hämoglobin und es hat teilweise grundlegend andere physikalische und biologische Eigenschaften, die eine Rolle bei der Oxygenierung von Gewebe spielen und auf die an dieser Stelle genauer eingegangen werden soll. Der auffälligste Unterschied ist wohl die Größe. Der Erythrozyt ist mit 6-9 μm ca 20 mal

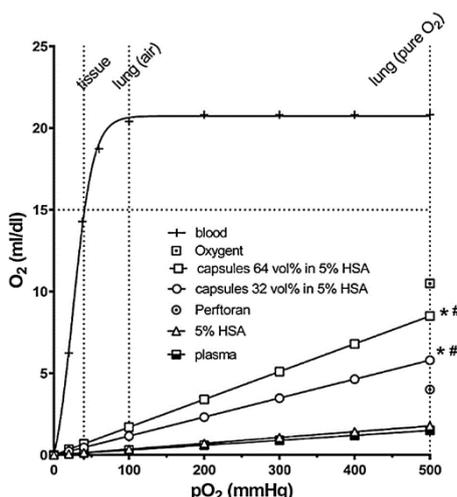


Abbildung 1.3.1 Sauerstofftransportkapazität verschiedener Perfluorcarbon-basierter Sauerstoffträger im Vergleich zu Erythrozyten (Wrobeln et al. 2017)

größer als der durchschnittliche hier eingesetzte Sauerstoffträger (Abbildung 3.2.3).⁴³ Die Größe bewirkt den in Abschnitt 4.3 beschriebenen Fåhræus-Lindqvist-Effekt, dem Erythrozyten, aber nicht Sauerstoffträger unterliegen und bei dem es zum sogenannten *plasma-skimming* kommt (Abbildung 1.2.1).

Der Sauerstoffträger löst, wie in Abschnitt 1.5 beschrieben, Sauerstoff rein physikalisch und somit abhängig vom vorherrschenden Partialdruck. Die Sauerstoffabgabe an das Gewebe erfolgt linear, und kleine Unterschiede im Partialdruck haben großen Einfluss auf die Abgaberate.⁴⁰ Im Gegensatz dazu wird Sauerstoff von Hämoglobin als

physiologischem Sauerstoffträger chemisch gebunden, und die Abgabe an das Gewebe kann vom Körper durch die Bindung von CO₂ und 2,3-Bisphosphoglycerat reguliert werden, wodurch es zu einer in Abbildung 1.3.1 dargestellten Bindungskurve kommt.

1.4. Maschinenperfusion der Niere

In der Transplantationsmedizin verbreitet sich in den letzten Jahren die Erkenntnis, dass die statische Kaltlagerung trotz der Entwicklung neuer Lagerungs-Lösungen, nicht die optimale Möglichkeit zur Konservierung von Organen ist.^{22,44} Die maschinelle Perfusion der Organe nach der Explantation beweist sich immer öfter als eine Verbesserung der Lagerungsmethode mit signifikanter Reduzierung von DGF und GL durch die Verkürzung langer kalter bzw. warmer Ischämie, und damit einhergehend verringertem oxidativem Stress.⁴⁵ Dabei ist die am häufigsten in klinischen Studien bereits angewendete Methode die kalte Maschinenperfusion von ECD-Nieren bei 4 °C.^{44,46-49} Die kalte Perfusion kann die Anlieferung minimaler Sauerstoffmengen bei gleichzeitiger Reduzierung der metabolischen Aktivität gewährleisten, jedoch kann sie den ATP-Gehalt der Zellen und die Funktion der Na⁺/K⁺-ATPase nur unzureichend aufrechterhalten, was zu Zellschwellung und Zelltod führt. Eine Erweiterung der subnormothermen oder kalten maschinellen Perfusionen ist die Perfusion bei 37 °C (ex vivo normotherme Perfusion, EVNP). Erste Studien zeigen Erfolge bei der Transplantation von ECD Nieren nach EVNP.^{1,50} Bei dieser Lagerungsmethode werden die metabolischen Prozesse aufrecht erhalten, um sowohl intrazelluläres ATP als auch die Ionen-Homöostase der Zellen zu erhalten. Diese Methode benötigt jedoch komplexere Perfusionslösungen, die mit einer großen Bandbreite an Nährstoffen und vor allem auch Sauerstoffträgern versetzt sein müssen. Das Langzeitüberleben eines Organs ist unbedingt abhängig von der ausreichenden Sauerstoffversorgung des Organs während der EVNP.^{51,52} In klinischen Studien werden der Perfusionslösung Erythrozyten hinzugefügt, um die Aufgabe des Sauerstofftransports zu erfüllen. Studien zeigen, dass der Zusatz von Erythrozyten sogar wichtiger ist als der pO₂ innerhalb des für die Oxygenierung der Perfusionslösung eingesetzten Gases.⁵²⁻⁵⁵ Der Einsatz von Erythrozyten impliziert die Nutzung von Blut, einer knappen und dadurch wertvollen Ressource, die eine potentielle Quelle für Kontaminationen und Erkrankungen sein kann. Der Einsatz von künstlichen Sauerstoffträgern auf der Basis

von Perfluorcarbonen (PFC) oder hämoglobinbasierten Nanopartikeln kann eine sterile und in ausreichendem Maße vorhandene Alternative zu Vollblut oder Erythrozytenkonzentraten bilden.⁵⁶

1.5. Perfluorcarbone

Perfluorcarbone sind Kohlenwasserstoffe, deren Wasserstoffatome entweder komplett oder teilweise durch Fluoratome und weitere Halogenatome ersetzt sind (Abbildung 1.5.1 **A**). In dieser Arbeit wird mit Perfluordecalin (PFD) gearbeitet, bei dem es sich um Decalin (Bicyclo[4.4.0]decan) handelt, bei dem alle Wasserstoffe durch Fluoratome ersetzt wurden (Abbildung 1.5.1). Dieser Austausch der Atome ändert die physikalischen Eigenschaften dieser organischen Substanzen radikal. Fluor als Element der zweiten Periode und siebten Hauptgruppe hat einen Atomradius, der in etwa doppelt so groß ist wie der des Wasserstoffs bei gleichzeitig 20facher Masse. Von allen Elementen ist Fluor das elektronegativste, was zu einer Verkürzung der kovalenten Bindung zum Kohlenstoff und zu einer Versteifung des gesamten Kohlenstoffgerüsts der Moleküle führt. Die Fluor-Kohlenstoff-Bindung ist sehr stark (~484 kJ/mol) und extrem polar, nahezu ionisch (Abbildung 1.5.1 **B**).^{40,57} Diese Polarität führt jedoch nicht zu einer Wasserlöslichkeit, weil die innere Symmetrie des Moleküls die Polarität der C-F-Bindungen ausgleicht und das gesamte Molekül unpolar erscheinen lässt. Die engen Bindungen des Kohlenstoffgerüsts geben den Perfluorcarbonen eine sperrigere Erscheinung (im Falle des PFDs linsenförmig), wodurch sie mehr Raum in Wasser einnehmen und die Hydratisierungsenergie erhöht wird. Dieser Effekt reduziert die Wasserlöslichkeit, verglichen mit den entsprechenden Kohlenwasserstoff-Derivaten.⁵⁸ Demgegenüber sorgt die extreme Polarität der Bindungen dafür, dass sich durch annähernde Solvenzien keine Dipole induzieren lassen, wodurch die Van-der-Waals-Kräfte stark vermindert sind, die notwendig für die Löslichkeit in unpolaren Lösungsmitteln sind. Daher sind Perfluorcarbone Teil der sehr seltenen Spezies, die sowohl lipo- als auch hydrophob ist.⁴⁰

Perfluorcarbone sind in der Lage, enorme Mengen an Gasen physikalisch zu lösen.^{59,60} Tabelle 1.5-1 zeigt die Löslichkeit der für den Einsatz als Sauerstoffträger relevanten Perfluorcarbone. Dabei kommt es zu keiner direkten Interaktion der Fluoratome mit den Gasen. Vielmehr ist der Grund für die Löslichkeit ihre geringe

molekulare Dichte, die die Bildung großer Hohlräume oder Tunnel ermöglicht.⁶¹ Diese Hohlräume erlauben es den Gasen, sich nahezu frei in Perfluorcarbonen zu bewegen, was sich in einer nahezu temperaturunabhängigen Löslichkeit widerspiegelt (Abbildung 1.5.1 C)^{60,62}.

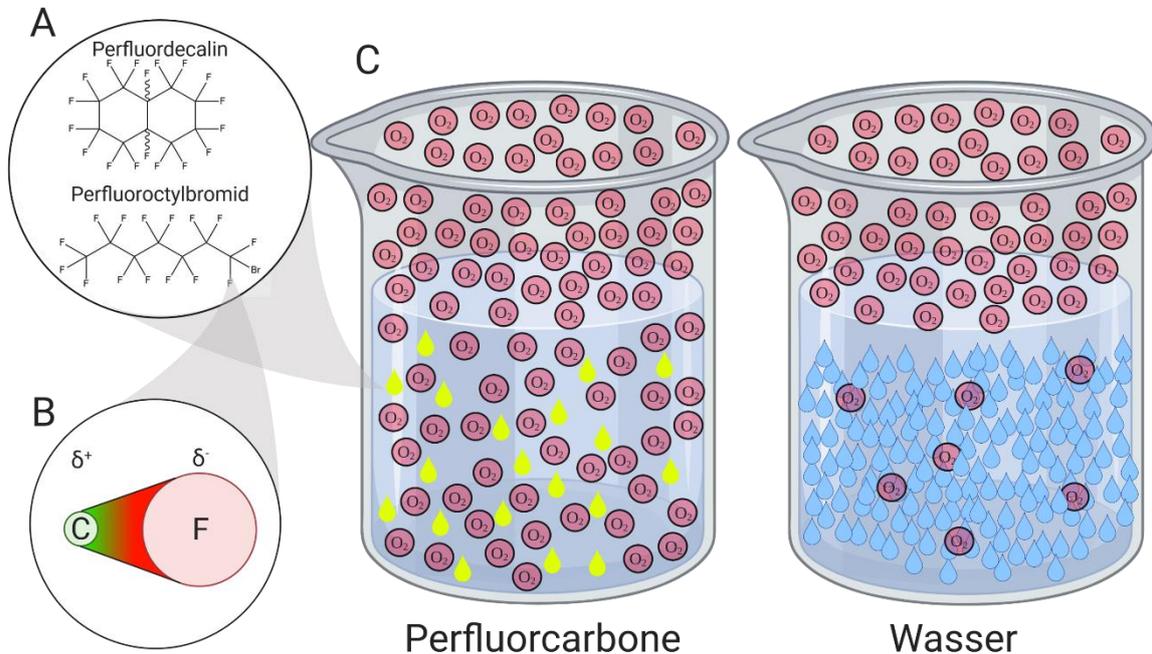


Abbildung 1.5.1: **A:** PFD und Perfluorocetyl bromid sind im Einsatz als Sauerstoffträger, die am weitest verbreiteten Vertreter der Perfluorcarbonen. **B:** Die Fluor-Kohlenstoff-Bindung ist extrem polarisiert; die Aufenthaltswahrscheinlichkeits-Dichte des Elektrons liegt stark verschoben in lokaler Nähe des Fluoratoms. **C:** Veranschaulichung der Sauerstoffkapazität von Wasser und von Perfluorcarbonen, bei gleichem pO_2 ist die Menge an gelöstem Sauerstoff in Perfluorcarbonen erheblich höher als die in Wasser.⁴⁰

Tabelle 1.5-1: Vergleich der relevanten physikalischen Eigenschaften von Wasser, PFD, Perfluorooctylbromid, Perfluorpentan ^{40,59,63,64}

	Wasser	Perfluordecalin	Perfluorooctylbromid (PFOB)	Dodecafluoropentan (DDFP)
Formel	H ₂ O	C ₁₀ F ₁₈	C ₈ BrF ₁₇	C ₅ F ₁₂
Molare Masse	18 g/mol	462 g/mol	499 g/mol	288 g/mol
Dichte	0,997 g/cm ³	1,946 g/cm ³	1,89 g/cm ³	1,63 g/cm ³ (flüssig, 25 °C) 0,04166 g/cm ³ (gasförmig, 37 °C)
Molare Dichte	55,4 mol/L	4,2 mol/L	3,8 mol/L	4,25*10 ⁻⁶ mol/L (gasförmig, 37 °C)
Sauerstoffkapazität (25 °C)	6,3 mL _{O2} /L _{H2O}	403 mL _{O2} /L _{PFD}	527mL _{O2} /L _{PFOB}	29,4*10 ³ mL _{O2} /L _{DDFP} (gasförmig, 37 °C)
Molare Sauerstoffkapazität	0,11 mL _{O2} /mol _{H2O}	95,68 mL _{O2} /mol _{PFD}	139,14 mL _{O2} /mol _{PFOB}	7,06*10 ⁵ mL/mol _{DDFP} (gasförmig, 37 °C)
Molares Verhältnis (Sauerstoff/Lösungsmittel)	0,005 mol _{O2} /mol _{H2O}	4,27 mol _{O2} /mol _{PFD}	6,21 mol _{O2} /mol _{PFOB}	31,52 mol _{O2} /mol _{DDFP} (gasförmig, 37 °C)

1.6. Perfluorcarbone im Einsatz als Sauerstoffträger

Die Grundlage für den Einsatz von Perfluorcarbonen als Sauerstoffträger bilden die Experimente von Leland C. Clark und Frank Gollan im Jahr 1966. Sie belegten als erste Wissenschaftler überhaupt, dass flüssiges Perfluorbutyltetrahydrofuran (FX-80), das mit 100 % Sauerstoff äquilibriumiert ist, in der Lage ist, von anästhesierten Mäusen für eine Dauer von 4 Stunden eingeatmet zu werden.⁶⁵ In der gleichen Publikation beschrieben sie ein vielleicht für die Eignung als Blutersatzstoff noch wichtigeres Experiment. Sie platzierten

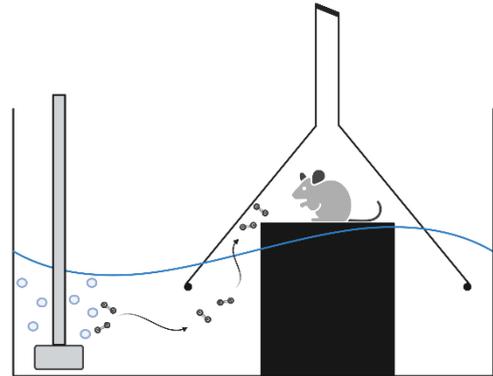


Abbildung 1.6.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus von Clark und Gollan von 1966.

Mäuse so unter einem umgedrehten Trichter, dass sich die breite Seite unter der Oberfläche einer Flüssigkeit befand. Die Flüssigkeit war entweder Wasser oder FX-80 und wurde mit 100 % Sauerstoff äquilibriumiert. Der Aufbau ermöglichte sicherzustellen, dass die Mäuse unter dem Trichter ausschließlich mit Sauerstoff versorgt wurden, der aus der Flüssigkeit austrat (Abbildung 1.6.1). Im Aufbau mit Wasser starben die Mäuse nach wenigen Minuten, wohingegen sie im Aufbau mit FX-80 keinerlei Anzeichen einer Sauerstoffunterversorgung zeigten. Das Experiment verdeutlicht, dass die Gasleitfähigkeit von Perfluorcarbonen grundsätzlich ausreicht, um Hypoxien zu verhindern und entstehendes CO₂ abzutransportieren.⁶⁵

Bereits ein Jahr später beschrieben Clark und Gollan eine Anwendung von FX-80 bei der Perfusion von Langendorff-Herzen. Dabei zeigten sie, dass reines mit 100 % Sauerstoff äquilibriumiertes FX-80 in der Lage ist, ein *ex vivo* perfundiertes Rattenherz am Schlagen zu halten.⁶⁶ Ein weiteres Jahr später kommentierte Slovirer in einer Studie: „Wasser und polare Substanzen wie Glukose und Salze sind nahezu unlöslich (in Perfluorcarbonen)“.⁶⁷ In dieser Studie perfundierte er isolierte Rattengehirne und verwendete dafür eine Perfluorcarbonemulsion (Emulgator: Bovines Serum Albumin), was einen weiteren grundlegenden Schritt in Richtung intravaskulärer Einsatz von Perfluorcarbonen darstellte.⁶⁸ In den folgenden Jahrzehnten schafften es Fluosol DA und Perftoran, eine Zulassung der *U.S. Drug and Food Administration* bzw. der verantwortlichen russischen Administration für die Anwendung in Fällen von

Koronarangioplastie (Fluosol DA) und für die Behandlung von hohem Blutverlust (Perftoran) im Menschen zu erhalten.^{69,70} Die ersten Formulierungen führten wegen ihrer Neigung zur Flokkulation zu Lungenembolien, und Fluosol DA wurde relativ zügig wieder vom Markt genommen.⁴⁰ Perftoran ist bislang nur in Russland, Kasachstan, Kirgistan und der Ukraine erhältlich. Die neue Generation perfluorcarbonbasierter Sauerstoffträger brachte die beiden meistversprechenden Produkte Oxycyte und Oxygent hervor, die jedoch bisher in keinem Land der Welt eine Zulassung für die Anwendung im Menschen erhalten haben.⁷¹

1.7. Emulsionen, Mikroemulsionen und Nanoemulsionen

Eine Emulsion ist laut Definition ein flüssiges kolloidales (fein verteiltes) System, in dem flüssige Tropfen und/oder flüssige Kristalle in einer weiteren Flüssigkeit dispergiert sind. Die Tropfen überschreiten dabei oft die gewöhnlichen Grenzen der Größe für Kolloide.⁷² Solide Nanomaterialien stehen im Verdacht, im Menschen gesundheitsschädliche Nebenwirkungen zu erzeugen, weshalb die EU-Kommission 2011 eine Empfehlung für die Definition von Nanomaterialien gab. Dabei bezieht sie sich ausschließlich auf Feststoffe und nicht auf Emulsionen.⁷³ Da auch die IUPAC keine eindeutige Definition für die Termini Mikro- und Nanoemulsion liefert, gibt es mehrere Deutungen dieser Begriffe. Anton et al. legen großen Wert darauf, dass für die Herstellung von Nanoemulsionen der Emulgator vorab in der öligen Phase gelöst sein muss und dass ansonsten trotz Partikelgrößen unter 100 nm von einer Mikroemulsion gesprochen werden muss.⁷⁴ Generell unterscheiden sich Mikro- und Nanoemulsionen dadurch, dass bei der Herstellung von Nanoemulsionen mechanischer Stress eingesetzt werden muss, wohingegen Mikroemulsionen spontan entstehen.⁷⁵⁻⁷⁷ Dadurch bilden Mikroemulsionen im Gegensatz zu Nanoemulsionen trotz gleicher Partikelgröße thermodynamisch stabile Systeme.⁷⁸ Parameter, die alle Definitionen enthalten sind: Partikelgrößen von 10 – 100 nm, thermodynamische Instabilität, kinetische Stabilität und Transparenz.^{75,79,80}

Die Erzeugung von Emulsionen ist ein thermodynamischer Prozess der durch die Gibbs-Helmholtz-Gleichung beschrieben werden kann.⁸¹

$$\Delta G = (\gamma A) - (\Delta S * T)$$

ΔG = Gibbs-Enthalpie,

γ = Oberflächenspannungsdifferenz an der Phasengrenze,

A = Fläche der Phasengrenze,

ΔS = Änderung der Entropie,

T = Energie (Temperatur, Hochdruck, Bewegung)

In Kürze ist die Gleichung wie folgt erklärt: Die Gibbs-Enthalpie ist ein Maß für die energetischen Kosten der ablaufenden Reaktion. Damit eine Reaktion spontan ablaufen kann, muss diese negativ sein. Wie in der Gleichung abzulesen ist, ist das größte Hindernis bei der Emulgierung die Entstehung einer riesigen Phasengrenzfläche (wenige Milliliter einer Emulsion können eine Phasengrenzfläche von der Größe eines Fußballfeldes haben). Die dort herrschende, große Oberflächenspannungsdifferenz kommt durch das Fehlen von Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptoren zustande, was die innere Energie des Systems ansteigen lässt. Im Falle von Perfluorcarbonen hängt die Oberflächenspannung sowohl vom Molekulargewicht als auch der molekularen Struktur des Moleküls ab.⁸² Emulgatoren können an der Grenzfläche adhären und dort als Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor dienen, um den unerwünschten Anstieg der inneren Energie während des Herstellungsprozesses zu minimieren.⁸³ Dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik folgend, strebt jedes System zu höherer Entropie (Unordnung). Das Lösen von Molekülen, die als Emulgatoren wirken können, senkt die Entropie des Systems vor der Emulgierung, da sich um die Moleküle Hydrathüllen bilden. Die Adsorption der Emulgatoren an Grenzflächen kann daher die Entropie steigern, begünstigt die Reaktion und erklärt, weshalb die Adsorption an hydrophoben Grenzflächen gegenüber der Luft/Wasser Grenzfläche schneller abläuft.^{79,84,85}

Der Zerfall einer Emulsion wird durch zwei Hauptprozesse vorangetrieben. Der erste Effekt ist die sogenannte Koaleszenz, in der sich, getrieben von der Brown'schen Bewegung, zwei Emulsionströpfchen annähern und fusionieren. Das berühmteste

makroskopische Beispiel für Koaleszenz sind Regentropfen, die Fensterscheiben herablaufen, sich annähern und fusionieren. Dieser Prozess findet bei unzureichender Abstoßung zweier Tropfen und bei instantan einsetzendem Ausdünnen der Emulgatorschicht statt, wenn sich die Tropfen berühren.⁸⁶

Der zweite Prozess ist die sogenannte Ostwald-Reifung. In der Ostwald-Reifung lösen sich kleinere Partikel auf und die dabei freigesetzten Moleküle werden von größeren Partikeln aufgenommen, die dadurch wachsen. Die treibende Kraft hinter diesem Prozess ist die Verkleinerung der Grenzfläche und der damit verbundene thermodynamische Ausgleich gemäß der oben gezeigten Gleichung.⁸⁷

Wie oben erwähnt, sind Nanoemulsionen thermodynamisch instabil, aber kinetisch stabilisiert. Die thermodynamische Instabilität ist durch die gegebene Gleichung leicht zu erklären, da das Minimum der Gibbs-Enthalpie erst durch vollständige Phasentrennung und damit die Minimierung der Grenzfläche zu erreichen ist. In Mikroemulsionen ist die Gibbs-Enthalpie negativ, und auch während langer Lagerungszeiten werden Mikroemulsionen nicht beginnen zu zerfallen. Daher entstehen sie spontan, ohne dass Energie aufgewendet werden muss.⁷⁴

Die kinetische Stabilisierung von Emulsionen ist abhängig von Emulgatoren, die zum einen thermodynamisch wirken, indem sie, wie bereits beschrieben, an der Phasengrenze adhären und die Oberflächenspannungsdifferenzen senken. Des Weiteren sorgen sie für interpartikuläre, repulsive Kräfte, die immer dann auftreten, wenn zwei Emulsionströpfchen sich auf eine Distanz von weniger als die doppelte Schichtdicke des Emulgators annähern. Dieser Effekt wird mit steigendem Quotienten aus Schichtdicke und Partikelgröße gesteigert. Dadurch sind Nanoemulsionen mit enger Partikelgrößenverteilung stabiler als Emulsionen mit breiter Partikelgrößenverteilung.⁷⁹ Die Stabilisierung geht soweit, dass in modernen Nanoemulsionen die Ostwald-Reifung als einziger degradierender Einfluss angesehen wird.⁷⁴ Die kinetische Stabilisierung ist unabhängig von der elektrostatischen Stabilisierung einer Emulsion, die auftritt, wenn ionische Emulgatoren wie z.B. Proteine eingesetzt werden. Die elektrostatische Stabilisierung durch Ladungen auf der Außenseite der Partikel verstärkt die Repulsion und kann Emulsionen dadurch stabilisieren. Die Nettoladung eines Partikels wird Zetapotential genannt und es besitzt die SI-Einheit mV.^{88,89}

In Emulsionen kommen zwei weitere Effekte zum Tragen, die einen Zerfall vorantreiben. Emulsionen mit breiter Partikelgrößenverteilung neigen je nach Dichte der emulgierten Substanz zum sogenannten *Creaming* bzw. zur Sedimentation. Dabei handelt es sich um partikelgrößenabhängiges Auftreiben bzw. Absinken der Partikel, was nicht mit einer Phasentrennung gleichzusetzen ist. Diese Effekte können durch die erzwungene räumliche Annäherung von Partikeln zu einer Flokkulation und im Endeffekt zu einer Koaleszenz der Partikel führen. Nanoemulsionen zeichnen sich dadurch aus, dass sie diesen Effekten nicht unterliegen.⁹⁰

1.8. Hochdruck-Homogenisierung

Hochdruck-Homogenisierung ist in der Lebensmittelindustrie, Arzneimittel- und Kosmetika-Herstellung weitverbreitet zur Erzeugung stabiler Nanoemulsionen und -partikel.⁹¹ Es handelt sich dabei um einen rein physikalischen Prozess, in dem eine Suspension wie z.B. Milch mittels Druck stark beschleunigt und durch sehr schmale Kanäle mit einem Durchmesser im Mikrometerbereich, daher auch Mikrokanäle genannt, geleitet wird. Bei dem Eintritt in diese Mikrokanäle kommt es zu einer drastischen Beschleunigung der Flüssigkeit und dadurch zu heftigen Verwirbelungen innerhalb der Flüssigkeiten, die zu einem Zerreißen der dispergierten Partikel und zu einer Homogenisierung der Partikelgröße führen.

Innerhalb der Mikrokanäle wird die turbulente Suspension bei hohen Geschwindigkeiten gezwungen, der Form des Kanals zu folgen, was zu hohen Scherkräften führt, die auf die Suspension einwirken. Kollisionen mit der Kanalwand und der Mikropartikel

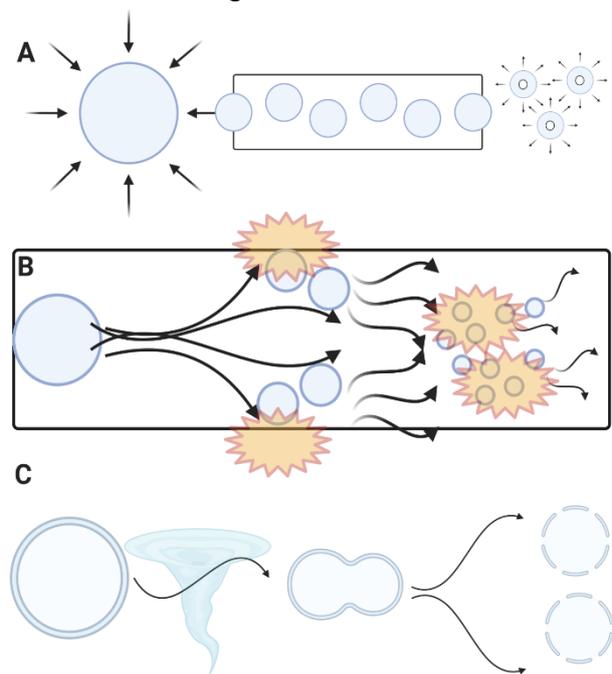


Abbildung 1.8.1: Prozesse innerhalb der Hochdruck-Homogenisierung: **A:** Druckbedingte Kompression vor Eintritt in den Mikrokanal und Expansion bei Austritt unter Bildung von Hohlräumen. **B:** Kollision an Außenwand und mit anderen Partikeln. **C:** Scherkräfte führen zum Zerreißen der Partikel.

untereinander lassen die suspendierten Partikel weiter zerreißen. Die andauernde Kollision der Partikel führt zu einer Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit, wodurch

die kinetische Energie der Suspension in Form von Hitze an die Umgebung abgegeben wird und die Flüssigkeit sich abhängig von der Dichte und dem eingesetzten Druck erwärmt. Nach Passage der Mikrokanäle kommt es zu einem schnellen Druckabfall und einer Verlangsamung der Flüssigkeit. Der rasante Druckabfall führt zur Entstehung von Hohlräumen innerhalb der Flüssigkeit, die schnell kollabieren. Diese drei Phänomene, die Verwirbelung, die Scherkräfte und die Entstehung von Hohlräumen samt deren Kollaps verkleinern die Partikelgröße und die Partikelgrößenverteilung (Abbildung 1.8.1).^{92,93}

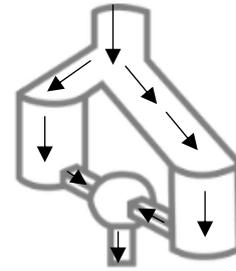


Abbildung 1.8.2: Schematische Darstellung einer Y-Interaktionskammer, wie sie im Microfluidics LM20 verbaut ist. www.microfluidics-mpt.com/de-de/microfluidizer-interaction-chambers

Der für die Herstellung der Sauerstoffträger eingesetzte Homogenisator besitzt zwei aufeinander folgende Einheiten, die eine Vielzahl an Mikrokanaleinheiten mit Y-Interaktionskammer enthalten, wie sie in Abbildung 1.8.2 dargestellt ist. Die erste Kammer enthält Mikrokanäle mit einem Durchmesser von 75 μm und die darauffolgende Kammer Mikrokanäle mit 125 μm .

1.9. Albumin

Diese Arbeit basiert auf Vorarbeiten, in denen mit Hilfe von Ultraschall humanes Serumalbumin genutzt wurde, um PFD basierte Sauerstoffträger herzustellen.⁹⁴⁻⁹⁷

Albumin liegt im humanen Blutplasma in einer Konzentration von ungefähr 4-5 gew% vor und macht dadurch einen Massenanteil von ca. 40-60 % aller Plasmaproteine aus.⁹⁸ Es ist geformt wie ein Stäbchen mit einer Länge von ca. 7 nm und einer Breite von ca. 4 nm, besitzt ein Proteingewicht von etwa 66 kDa und ist in der Lage, bereits in geringen Konzentrationen als Emulgator zu fungieren und ausreichende Schichtdicken auszubilden.^{89,99} Albumin ist sehr resistent gegenüber hohen Drücken und denaturiert aufgrund seiner 17 intramolekularen Disulfidbindungen erst bei langanhaltenden hohen Drücken und Temperaturen.¹⁰⁰

Weitere wichtige biologische Aufgaben des Albumins liegen im Transport von hydrophoben Substanzen wie Lipiden, Fettsäuren, Hormonen und Xenobiotika, sowie im Transport von Ionen, dabei vornehmlich Calcium.¹⁰¹⁻¹⁰⁴ Albumin fungiert im menschlichen Organismus als Anti-Akute-Phase-Protein und damit antiinflammatorisch. Zudem hat es antioxidative Wirkung.^{105,106}

Eine für die Niere wichtige Funktion des Albumins ist es, den onkotischen Druck des Blutes konstant zu halten. Eine Verringerung der Albuminkonzentration kommt der Herabsetzung des onkotischen Drucks gleich und muss von der Niere durch Wasserausscheidung kompensiert werden. Der onkotische Druck ist essentiell, um die Filtrationsleistung der Niere konstant zu halten.³³

Die Struktur des Albumins ermöglicht einen so breit gefächerten Aufgabenbereich, da es zum einen viele negativ geladene Seitengruppen trägt, was die Bindung von Ionen ermöglicht, und es gleichzeitig große hydrophobe Areale besitzt, an die sich hydrophobe Ketten anlagern können.

In nanopartikulären Systemen wird Albumin eingesetzt, um die Stabilität von soliden Nanopartikeln zu erhöhen, indem es das Zetapotential der Partikel erhöht.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Es besitzt außerdem einen hohen Emulgations-Aktivitäts-Index, der in der Lebensmittelindustrie bei Öl-in-Wasser Emulsionen genutzt wird.¹¹⁰ Es lagert sich an die Grenzschicht an, indem es sich mit der hydrophoben Seite zum Öl wendet und somit die Grenzschicht stabilisiert.^{89,111}

1.10. Zelluläre Aufnahme von Partikeln

Emulgierte oder verkapselte Perfluorcarbone können vom Immunsystem des Körpers erkannt und von Makrophagen aufgenommen werden. Langfristig lagert sich das Perfluorcarbon dann in Milz und Leber ein und ist dort in der Lage, mit Enzymen zu interagieren. Unterschreiten die prozessierten Perfluorcarbone eine Größe von

150 nm, werden sie auch von Zellen außerhalb des Immunsystems aufgenommen.^{40,112-115}

Zellen sind in der Lage, Albumin aber auch Nanopartikel aus ihrer Umgebung aktiv durch Clathrin und Caveolar-vermittelte Endozytose, Pinocytose, Makropinozytose und Phagozytose zu inkorporieren (Abbildung 1.10.1).¹¹⁶⁻¹¹⁸ Dabei spielen die Größe, Form, Elastizität und Oberflächenbeschaffenheit von Nanopartikeln für die Geschwindigkeit, mit der diese Aufnahme stattfindet, eine große Rolle.¹¹⁹ Kurz kann gesagt werden, dass sphärische Partikel schneller als stäbchenförmige Partikel und kleine Partikel schneller als große Partikel aufgenommen werden.^{120,121} Studien, in denen Perfluorcarbon-basierte Sauerstoffträger von humanen Nabelvenen-Endothelzellen in Zellkultur aufgenommen wurden, konnten bisher keine schädliche Wirkung nachweisen.¹²² In Abbildung 1.10.1 sind vier verschiedene Wege der zellulären Aufnahme von Partikeln dargestellt. Kurz beschrieben, handelt es sich bei der Phagozytose um die Fähigkeit von Makrophagen, Partikel unabhängig von Größe und Form aufzunehmen, um sie aus der Blutbahn oder dem Gewebe zu entfernen. Die Oponierung, d.h. die Markierung von Partikeln mit Antikörpern oder Komplementfaktoren, beschleunigt die Phagozytose um den Faktor eintausend.³³ Des Weiteren können Partikel Rezeptor-vermittelt (Clathrin- oder Caveolar-vermittelter Weg) in die Zelle eindringen.¹²¹ Dieser Weg ist besonders von der Elastizität eines Partikels abhängig, da ein weicher Partikel, wie es die Sauerstoffträger sind, eine größere Auflagefläche bei Berührung der Zelle aufweist und die Wahrscheinlichkeit,

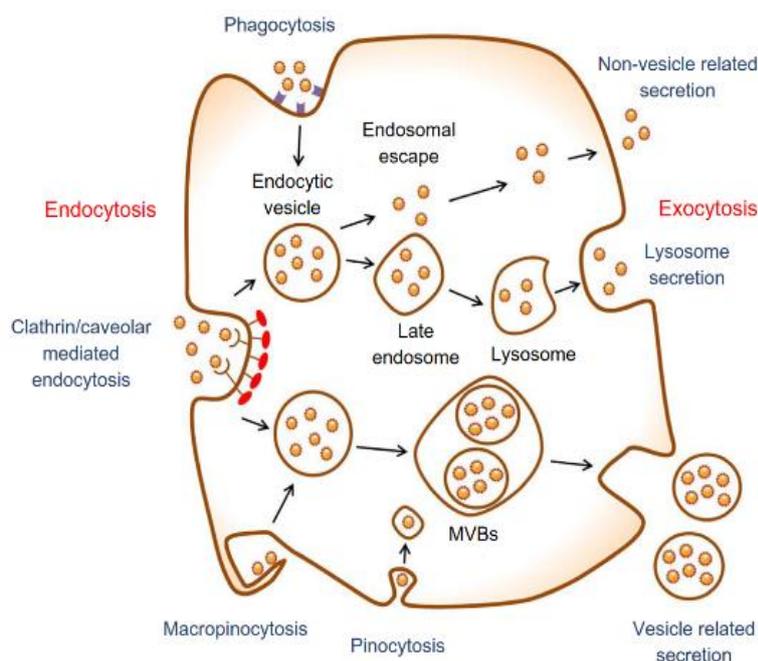


Abbildung 1.10.1 Schematische Darstellung der Endozytose und Exocytose von Nanopartikeln. Nanopartikel betreten die Zelle über vier mögliche Wege: Clathrin/Caveolar-vermittelt, Phagozytose, Macropinocytose und Pinocytose. Nanopartikel verlassen die Zelle über drei Wege: Lysosome-Sekretion, Vesikel-assoziierte Sekretion, nicht-Vesikel-assoziierte Sekretion. (Oh et al., *Int J Nanomedicine*(2014))

einen Rezeptor zu aktivieren, dadurch steigt.^{123,124} Im Beispiel von Zellen des proximalen Tubulus der Niere bindet Albumin am Rezeptor (Megalin) und ermöglicht eine gesteigerte Partikelaufnahme. Das bindende Albumin kann dabei an der Partikeloberfläche immobilisiert sein.^{125,126} Ein größenabhängiger Weg zur Aufnahme von Partikeln sind die Pinozytose und Makropinozytose, bei der über Vakuolen kleine Volumina des umgebenden Mediums samt aller darin gelösten oder dispergierten Substanzen und Partikel von der Zelle aufgenommen werden. Eine solche Aufnahme ist bei der Makropinozytose bis zu einer Partikelgröße von 500 nm und bei der Pinozytose bis 100 nm beschrieben.^{121,127}

1.11. Analysemethoden von Nanopartikeln

Die biologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften von Nanopartikeln sind nicht ausschließlich bestimmt von dem Material, aus dem sie bestehen, sondern auch zu einem großen Teil durch ihre Größe und Form.^{128,129} Daher ist es wichtig, nanopartikuläre Suspensionen möglichst genau charakterisieren zu können. Die Grenze für die Distanz zweier mittels eines Lichtmikroskops voneinander unterscheidbarer Punkte wurde 1873 von Ernst Abbe als ca. die Hälfte der Wellenlänge des eingesetzten Lichtes definiert.¹³⁰ Die sogenannte Abbe-Grenze bedeutet, dass die kleinste bei sichtbarem Licht erkennbare Struktur je nach Intensität nicht kleiner als 200 – 350 nm sein kann.¹³¹ Wie bereits erwähnt, werden Nanostrukturen derart definiert, dass in mindestens einer Dimension ihre Ausmaße den Bereich von 1-100 nm nicht überschreiten. Dadurch ist die bildgebende Analytik mittels eines Lichtmikroskops nicht ohne Weiteres anwendbar in der Beobachtung und Analyse der Partikelgrößenverteilung von Nanopartikeln. Aus diesem Grund wurden Methoden entwickelt, die sich die besonderen Eigenschaften nanopartikulärer Objekte zu eigen machen.

Auch wenn es zur mikroskopischen Beobachtung biologischer Systeme seit Abbe erhebliche Fortschritte gab, ist die am weitesten verbreitete Methode zur Messung von Nanopartikeln die Messung der dynamischen Lichtstreuung (DLS). Hierbei werden die spezifischen Lichtstreuungseigenschaften von Nanostrukturen genutzt, um den hydrodynamischen Durchmesser zu bestimmen. Bei dieser Methode wird eine sphärische Form der Partikel angenommen. Da Nanopartikel aber auch stäbchenförmig oder kantig sein können, liegt bei solchen anisotropen Partikeln ein

systemischer Fehler vor. Partikel, deren Radius kleiner als $1/10$ der Wellenlänge eines in eine Probe eingestrahlten monochromatischen Lasers ist, streuen das Licht unabhängig vom Einstrahlungswinkel (Rayleigh-Streuung). Bei Partikeln, die größer als das Zehntel der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes sind, tritt Mie-Streuung auf, bei der die Streuung winkelabhängig auftritt und am intensivsten in Richtung des eingestrahlten Lichtstrahls weitergeleitet wird (Abbildung 1.11.1). Das eingestrahlte Licht wird vom Partikel proportional zur sechsten Potenz des Partikelradius gestreut, wobei der Lichtbrechungsindex die Streuungsintensität wellenlängenabhängig und damit auch partikelgrößenabhängig beeinflusst.^{132,133} Das gestreute Licht fluktuiert, bedingt durch die Brown'sche Bewegung der Partikel, und korreliert daher mit der Größe der Partikel, wobei die Brown'sche Bewegung auch abhängig ist von der Viskosität und damit der Temperatur des umgebenden Mediums.¹³⁴ Das Interferenzmuster wird anschließend computerbasiert mit der Stokes-Einstein-Gleichung in Partikelgrößenverteilungen umgerechnet, wobei mit dieser Gleichung nur in monodispersen Suspensionen korrekte Werte berechnet werden können.¹³⁵ Die Partikelgrößenverteilungsbreite wird dabei als Polydispersions-Index (PDI) angegeben, der mit der Autokorrelationsfunktion zusammenhängt.¹³³ Wichtig dabei ist, dass ein $PDI = 0$ für höchste Monodispersität steht und eine $PDI=1$ eine höchst heterogene Partikelgrößenverteilung widerspiegelt.¹³⁴ Polydispersität von Suspensionen mit Nanopartikeln sowohl im Nano- als auch im Mikrobereich limitiert die Genauigkeit der DLS, und diese Suspensionen können nicht eindeutig charakterisiert werden, wodurch die biologischen Eigenschaften einer solchen Suspension nicht allein von DLS-Messungen abgeleitet werden können.^{129,134,136}

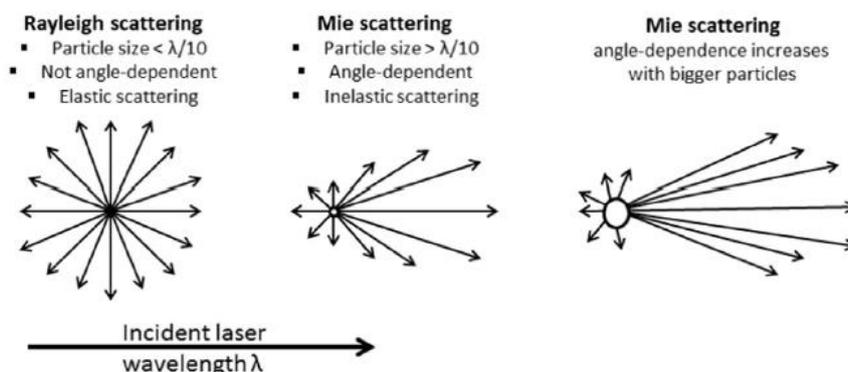


Abbildung 1.11.1: Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen den an Partikeln auftretenden Lichtstreuungen.¹³⁵

Während in der dynamischen Lichtstreuung die Partikelgröße über die Brown'sche Bewegung ermittelt wird, wird in der statischen Lichtstreuung (SLS) die Fähigkeit des Partikels, Licht zu streuen, genutzt. Wie in Abbildung 1.11.1 sind basierend auf der Mie-Theorie, die Winkel, mit denen Licht von Partikeln gebrochen wird, von dem Verhältnis zwischen Partikelgröße und Wellenlänge des eingestrahlten Lichts abhängig.

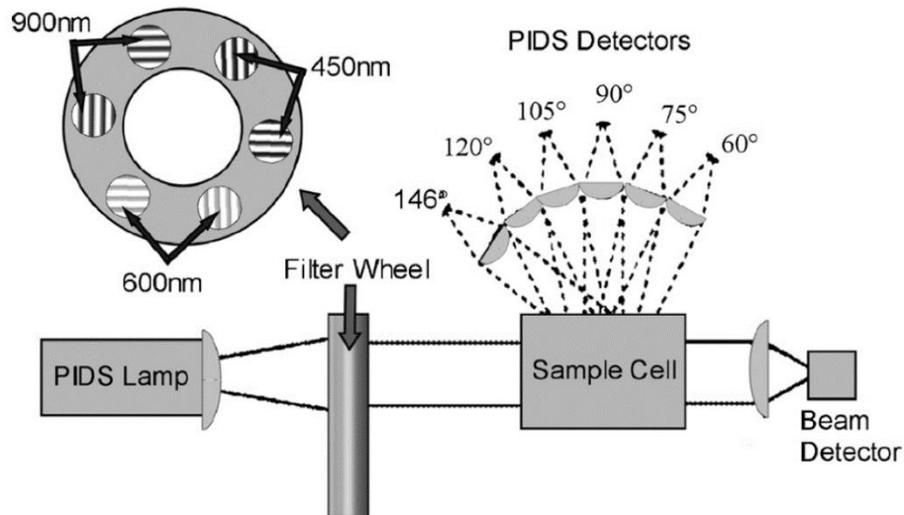


Abbildung 1.11.2: Aufbau einer Messapparatur für die statische Lichtstreuung mit Hilfe der PIDS-Technologie.¹³⁷

Für die SLS wird gestreutes Licht in verschiedenen Winkeln zum eingestrahlten monochromatischen Laser gemessen. Eine Erweiterung der Technologie nutzt im Weiteren die Abhängigkeit des Streuwinkels von der Polarisierung aus, indem vertikal und horizontal polarisiertes Licht bei verschiedenen Wellenlängen getrennt voneinander eingestrahlt wird. Dieser Aufbau wird Polarization Intensity Differential Scattering (PIDS) (Abbildung 1.11.2)) genannt. Trifft Licht auf einen Partikel, so werden bei jeder Wellenlänge und Polarisierung unterschiedliche Intensitäten an den Detektoren gemessen, aus denen die Größen der jeweiligen Partikelpopulationen berechnet werden. Diese Methode ermöglicht im Gegensatz zur DLS die Partikelgrößenbestimmung von polydispersen Suspensionen.^{137,138}

2. Material/Methoden

2.1. Verwendetes Medium für die Herstellung von Sauerstoffträgern

Beim Sauerstoffträger handelt es sich um Perfluorcarbon-Partikel, die in einem umgebenden wässrigen Medium hergestellt wurden. Die Zusammensetzung des umgebenden Mediums variierte in den verschiedenen Versuchen, wobei jedes Medium zwangsweise mindestens 5 gew-% Albumin (bovin bzw human) enthielt. Welche Zusammensetzung für den jeweiligen Versuch verwendet wurde, ist in Tabelle 2.1-1 dargestellt.

Tabelle 2.1-1: Zusammensetzung des jeweils verwendeten Mediums zur Herstellung der Sauerstoffträger

Versuch	Medium	Hersteller
Einflussfaktoren im Herstellungsprozess, Charakterisierung der Sauerstoffträger (Standard und TG)	bidestilliertes Wasser	Destille des Instiuts für Physiology, Universität DuE
Biokompatibilität der TG- Sauerstoffträger	STEEN-solution ©	XVIVO Perfusion A, Göteborg, Schweden
Nierenperfusion mit unterschiedlicher Volumen- Fraktion	NaCl (147 mM) KCl (4 mM) CaCl (2,3 mM)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
6-stündige Nierenperfusion	Medium 199 (modifiziert mit Earle's Salzen, ohne Bicarbonat) Neomycin (9 mg/L) HEPES (35 mM)	Sigma-Aldrich CHEMIE, Steinheim, Deutschland/ Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.2. Standard-Herstellung des Sauerstoffträgers

Für die Herstellung der Sauerstoffträger wurden 4 mL eisgekühltes PFD (Fluorochem Chemicals, Derbyshire, Vereinigtes Königreich) in 20 mL einer eisgekühlten Lösung aus 5 gew.-% bovinem Serumalbumin (BSA, AppliChem, GmbH, Darmstadt, Deutschland) in bidestilliertem Wasser bzw. für die sechsstündige Nierenperfusion in Medium199 (zugesezte Salze werden im entsprechendem Abschnitt unter „Herstellung des Perfusionsmediums“ spezifiziert) mit Hilfe eines Ultra-Turrax® (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) für 30 Sekunden auf Geschwindigkeitsstufe 6 voremulgiert. Die voremulgierte Suspension wurde unter verschiedenen Drücken (690 bar (10.000 PSI), 1380 bar (20.000 PSI) und 2070 bar (30.000 PSI), der jeweils eingesetzte Druck wird im entsprechendem Abschnitt spezifiziert) und einer unterschiedlichen Anzahl an Passagen (1, 5, 10 oder 20, die genaue Anzahl wird im entsprechendem Abschnitt spezifiziert) mit Hilfe eines Hochdruck-Homogenisators (Microfluidics, Westwood, MA) Hochdruck-homogenisiert. Dabei wurde die Kühlspirale mit Eis gekühlt, sodass die Temperatur der Suspension während des Prozesses konstant knapp über dem Gefrierpunkt gehalten wurde. Die erhaltene Suspension enthielt eine Volumen-Fraktion von ~16,7 % Sauerstoffträgern. Die Suspension wurde für alle Lagerungstests in einem bis zum Rand gefüllten Reagiergefäß (Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) entsprechender Größe (1,5 mL, 2 mL, 5 mL) bei 4 °C gelagert.

Eine stabile Suspension ließ sich herstellen, indem eine Präemulsion bei 0-4 °C eine einzige Passage durch den Hochdruck-Homogenisator erfuhr. Diese Art der Herstellung wurde für alle weiteren Anwendungen als Standard definiert und bei abweichender Behandlung gekennzeichnet.

2.3. Herstellung des TG-Sauerstoffträgers

Die Herstellung der Sauerstoffträger wurde modifiziert, indem ein Temperaturgradient (TG) angelegt wurde. Die dabei entstehenden Sauerstoffträger haben teilweise grundlegend andere physikalische Eigenschaften und werden ab hier als TG-Sauerstoffträger bezeichnet.

Die Herstellung verläuft bis zur Präemulgierung mit dem Ultraturrax wie in Abschnitt 2.2 beschrieben. Die Präemulsion wurde anschließend direkt auf Eis auf

4 °C abgekühlt und in den Hochdruck-Homogenisator gegeben. Der Druck wurde auf 20.000 PSI eingestellt. In den Stutzen wurde ein Thermometer gehalten, mit dem der Temperaturanstieg (Erklärung in Abschnitt 1.8) während der Homogenisierung beobachtet werden kann. Die Suspension wurde in einem ungekühlten und rezyklisierenden System homogenisiert, indem ein Teilstück eines Perfusionsschlauchs (Braun, Meselungen, Deutschland) die Strecke vom Auslass zum Stutzen überbrückte. Erreichte die Suspension eine Temperatur von 40 °C, wurde der Druck auf 30.000 PSI erhöht. Der Prozess wurde fortgeführt, bis eine Temperatur von 49-50°C erreicht wurde und die Suspension keine mit dem Auge erkennbare Trübung mehr aufwies (Abbildung 3.3.1). Nach Prozessende wurde die Suspension sofort auf Eis gekühlt.

2.4. Aufreinigung des Sauerstoffträgers

Für einige Analysemethoden war es notwendig, die Sauerstoffträger von überschüssigem Albumin, das nicht während der Herstellung an die Grenzfläche zwischen PFD und Wasser gebunden wurde, zu befreien, ohne die an die Grenzfläche gebundenen Albuminmoleküle mit zu entfernen. Hierfür wurden die Suspensionen bei 4 °C für 9 Stunden bei einer Zentrifugalkraft von 1000 xG zentrifugiert und anschließend in bidestilliertem Wasser resuspendiert.¹³⁹ Hierfür wurde das Pellet mit Hilfe einer Pipettenspitze vom Rand des verwendeten Gefäßes gelöst. Die Pipettenspitze verblieb in dem Gefäß, das bis zur Hälfte mit bidestilliertem Wasser gefüllt und anschließend 60 s bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Vortex Mixers gerührt wurde. Anschließend wurde die Pipettenspitze aus dem Gefäß entfernt, und das Gefäß wurde bis zum Rand mit bidestilliertem Wasser gefüllt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C für 3 h und 1000 xG. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Der Erfolg der Aufreinigung wurde mit Hilfe der BKG-Färbung kontrolliert (Abschnitt 2.8).

2.5. Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung innerhalb der Sauerstoffträgersuspension wurde eine DLS-Messung durchgeführt (Nano-flex®, Particle Metrix GmbH, Inning, Deutschland). Zu diesem Zweck wurde vorab der Brechungsindex der Sauerstoffträger bestimmt. Die Messung wurde von Dr. Anne Hartwig im innoFSPEC

Potsdam durchgeführt, und die Ergebnisse sind in Abbildung 2.5.1 dargestellt. Die Messung ergab einen Brechungsindex von 1,328 für die in der dynamischen Lichtstreuung verwendete Wellenlänge von 780 nm. Dieser Brechungsindex konnte für die Partikelgrößenbestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung nicht verwendet werden, da er sich nicht ausreichend von dem des umgebenden Wassers mit 1,329 unterscheidet.¹⁴⁰ Daher wurden die Messungen der dynamischen und der statischen Lichtstreuung mit einem Brechungsindex von 1,3 durchgeführt.

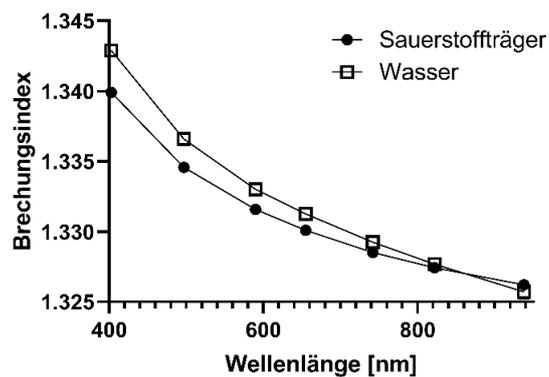


Abbildung 2.5.1: Die Brechungsindizes des Sauerstoffträgers in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichtes. Die Unterschiede zwischen den Brechungsindizes des Sauerstoffträgers und des Wassers sind nicht substantiell und können daher von der Software des DLS-Gerätes nicht verwendet werden.

Für die DLS-Messung wurden 500 μL der Suspension blasenfrei in ein 2 mL Reagiergefäß überführt. Die Messung fand unverdünnt statt. Das Reagiergefäß wurde unter den Laser gestellt, und der Laser wurde bis zu Markierung in die Suspension eingetaucht, ohne dass sich Blasen unterhalb des Lasers bildeten. Die Messungen wurden grundsätzlich im Modus *Intensity* durchgeführt. Die Standard-Durchführungsparameter beinhalteten: Setzero Time: 300 sec, Messungsdauer: 300 sec, automatische Messungswiederholungen: 3, Brechungsindex (Partikel): 1,30, Form des Partikels: sphärisch, Brechungsindex (Medium): 1,35, Viskosität (20 °C): 2,232, Viskosität (25 °C): 1,974.

2.6. UV/VIS Spektroskopie

Für die UV/VIS Spektroskopie wurde 1 mL der Sauerstoffträger-Suspension in eine Kunststoff-Küvette (Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) gefüllt. Die Küvette wurde in den Strahlengang eines UV-VIS-Spektrometers (Genova Bio Life

Science Spectrophotometer, Jenway, Staffordshire, UK) gestellt. Es wurde ein Spektrum des gesamten möglichen Spektralbereichs aufgenommen (200 nm-800 nm).

2.7. Quantifizierung der Verdunstung des PFDs aus der Suspension

Der Verlust des PFDs aus der Sauerstoffträgersuspension wurde über 5 Minuten in Form des Gewichtsverlustes beobachtet und mit der Verdunstung von freiem und einem mit 5 %iger BSA-Lösung überschichteten PFD verglichen. Hierfür wurde der Deckel eines 15 mL Reagiergefäßes (Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) mit der Öffnung nach oben auf einer Präzisionswaage (Ohaus, Nänikon, Schweiz) platziert. In den inneren Ring des Deckels wurde ein Milliliter Suspension pipettiert, und die kontinuierliche Abnahme des Gewichts wurde bis auf die vierte Stelle hinter dem Komma notiert. Für die Kontrollen wurde 167 µL PFD in den Deckel pipettiert und entweder mit 5% iger BSA Lösung in bidestilliertem Wasser überschichtet oder nebeneinander gelagert. Das Gewicht zu den einzelnen Zeitpunkten wurde auf den Startwert normiert (0 Minuten).

2.8. Bromkresolgrün-Färbung (BKG)

Die Albuminkonzentration einer Lösung wurde mit Hilfe einer Bromkresolgrün-Färbung quantifiziert. Für die Herstellung des benötigten Essigsäure-Acetat-Tween-Puffers wurden 485 mL bidestilliertes Wasser mit 3 mL konzentrierter Essigsäure (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) versetzt. In die verdünnte Essigsäure wurden 14 mL NaOH (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gegeben (End-pH ~4). Die Spitze einer Pipettenspitze wurde mit einer Schere abgeschnitten und es wurden 850 µL Tween 20 aufgezogen. Die Pipettenspitze wurde mitsamt des Tweens in den fertigen Puffer abgeworfen und geschüttelt, bis sich alles Tween gelöst hatte.

Für die Herstellung der BKG-Stammlösung wurden 16,76 mg BKG (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) in 0,4 mL NaOH (1 M) gelöst und anschließend mit bidestilliertem Wasser auf 20 mL aufgefüllt.

Für die Herstellung der Gebrauchslösung wurden 15 mL BKG-Stammlösung mit 165 mL Essigsäure-Acetat-Tween-Puffer verdünnt.

Für die Albumin-Quantifizierung wurde 1 mL BKG-Gebrauchslösung in einem 1,5 mL Reagiergefäß vorgelegt, mit 5µL Probe versetzt und auf dem Vortex 20 Sekunden gerührt. Anschließend wurde die Absorption von 100 µL Probe in einer 96-Well-Plate mit Hilfe eines Plate-Readers (µQuant Gen5 Software Features for Detection /, BioTek INC., Bad Friedrichshall, Deutschland) bei 595 nm gemessen. Für die Kalibriergerade wurden BSA-Lösungen (AppliChem, GmbH, Darmstadt, Deutschland) in den Konzentrationen: 0,05 %, 0,1 %, 0,25 %, 0,5 %, 0,75% und 1 % hergestellt.

2.9. Tiere

Weibliche Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus*, ~250 g) wurden vom zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen erworben. Die Tiere wurden bei standardisierter Temperatur (22 ± 1 °C), Luftfeuchtigkeit (55 ± 5 %) und 12/12 h hell/dunkel Rhythmus mit freiem Zugang zu Futter (ssniff-Spezialdiäten, Soest, Deutschland) und Trinkwasser gehalten. Alle Tiere erhielten Tierpflege nach der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere.¹⁴¹ Die Organe wurden unter Einhaltung der gesetzlichen Bestimmungen im Rahmen von Tötungen zu wissenschaftlichen Zwecken gemäß § 4 Absatz 3 Tierschutzgesetz gewonnen.

2.10. *Ex vivo* normotherme Perfusion der Niere

Operation

Die Ratten wurden mittels einer Inhalation von 7 % Isofluran (Isofluran Primal Critical Care, Halbergmoos, Deutschland) in 100 % medizinischem Sauerstoff bei einem Fluss von 4 L/min durch einen Verdampfer (Isofluran Vet. Med. Vapor, Draeger Lübeck, Deutschland) anästhesiert und anschließend mit einer Guillotine enthauptet. Der Körper wurde entlang der *Linea alba* eröffnet. In die *Arteria renalis*, die *Vena renalis* und den Urether der linken Niere wurden innerhalb von fünf Minuten nach Enthauptung, Katheter eingelegt. Danach wurde die Niere mit einer Schere aus dem Körper geschnitten und für die Perfusion bei 37 °C gelagert.

Nach der Entnahme der linken Niere wurde die rechte Niere entnommen und für die spätere Normierung verschiedener Parameter auf das Feuchtgewicht auf 10 mg genau gewogen und anschließend verworfen.

Herstellung des Perfusionsmediums

Die eingesetzten Sauerstoffträger wurden, wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, vor der Perfusion einer Niere frisch bei einem Druck von 20.000 PSI und einer Passage durch den Homogenisator hergestellt. Das verwendete Medium ist in Tabelle 2.1-1: Zusammensetzung des jeweils verwendeten Mediums zur Herstellung der Sauerstoffträger aufgelistet. Für die verschiedenen Fragestellungen wurde die Sauerstoffträger-Suspension mit dem entsprechenden Medium zum Perfusionsmedium mit entsprechenden Volumen-Fractionen verdünnt. Es wurden für die Perfusion 200 mL Perfusionsmedium verwendet. Zur Gewinnung der Erythrozyten für die Kontrollgruppe der sechsständigen Perfusion wurde freiwilligen erwachsenen Männern im Alter zwischen 18 und 50 Jahren 20 mL Vollblut entnommen (Safety-Multifly®-Kanüle B.Braun Melsungen AG, Frankfurt, Deutschland; Li-Heparin-S-Monovetten® Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht, Deutschland). Die darin enthaltenen Erythrozyten wurden durch dreifache Zentrifugation bei 1000 xG für 20 Minuten bei 4 °C gewaschen. Der Überstand wurde samt Leukozytenschicht, die oberhalb der Erythrozyten erkennbar war, abgenommen. Anschließend wurden die Erythrozyten durch vorsichtiges Schwenken in isotonischer Kochsalzlösung (B.Braun Melsungen AG, Frankfurt, Deutschland) resuspendiert. Der Vorgang der Gewinnung von Erythrozyten wurde dreimal wiederholt, um sicher zu gehen, dass sich im späteren Perfusionsmedium weder humanes Plasma noch humane Leukozyten befanden. Die Blutentnahme zum Zwecke experimenteller Studien wurde durch den Ethikrat des Universitätsklinikums Essen autorisiert. Studien wurde durch den Ethikrat des Universitätsklinikums Essen autorisiert (Aktenzeichen 19-8600-BO).

Perfusion

Abbildung 2.10.1 zeigt den experimentellen Aufbau der *ex vivo* Perfusion. Die Perfusionslösung wurde für die *ex vivo* Perfusion der Nieren mittels Peristaltik-Pumpen über zwei Kreisläufe geleitet. Der gesamte Aufbau speziell für die Rattennierenperfusion inklusive gasdichter Schläuche, Reservoir, temperierbarer Perfusionskammer, Blasenfänger, Barometer, Kanülen, Peristaltikpumpen und Druckkontrolleinheit wurde bei Harvard Apparatus, Hugo-Sachs Elektronik, Mach-Hugstett, Deutschland erworben.

Der eine Kreislauf diente der Oxygenierung der Perfusionslösung, indem sie, aus einem temperierten Reservoir kommend, in einen Kugelrohroxygenator (Auftragsarbeit der Glasbläserei der Universität Duisburg-Essen, Campus Essen) geleitet wurde. Dort floss sie an der Innenseite eines durch einen Kühlmantel auf 37 °C temperierten Kugelrohrs vertikal herab, während in das Innere des Rohres mit einem Strom von 0,5 L/min konstant 100 % medizinischer Sauerstoff (Air liquide, Paris, Frankreich) eingeleitet wurde. Die so oxygenierte Perfusionslösung wurde über eine weitere Peristaltik-Pumpe zurück in das Reservoir geleitet. Von dort wurde die Perfusionslösung über einen Blasenfänger durch den Katheter, der in der *Arteria renalis* eingelegt wurde, in die Niere eingeleitet. Der Perfusionsdruck wurde konstant auf 80 ± 2 mmHg eingestellt (nicht-pulsatile Perfusion). Die Perfusionslösung trat aus dem Organ durch den Katheter aus, der in die *Vena renalis* eingelegt worden war, und tropfte ohne Druck in eine unterhalb des Organs aufgestellte Flasche. Von dort wurde die Perfusionslösung zurück in das Reservoir gepumpt. Proben wurden an den Zeitpunkten 0 min, 30 min, 60 min, 90 min und 120 min entnommen und bei -80 °C gelagert.

Urin wurde über den in den Urether eingelegten Katheter in einem 5 mL Reagiergefäß (Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen. Proben wurden an den Zeitpunkten 30 min, 60 min, 90 min und 120 min entnommen und bei -80 °C gelagert.

Nach der Perfusion wurde das Organ mit einem Skalpell (W. Söhngen GmbH, Taunusstein, Deutschland) halbiert, und eine Hälfte wurde in 10 %igem Formalin (RotiHistofix, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Die andere Hälfte wurde in ein 2 mL Reagiergefäß (Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

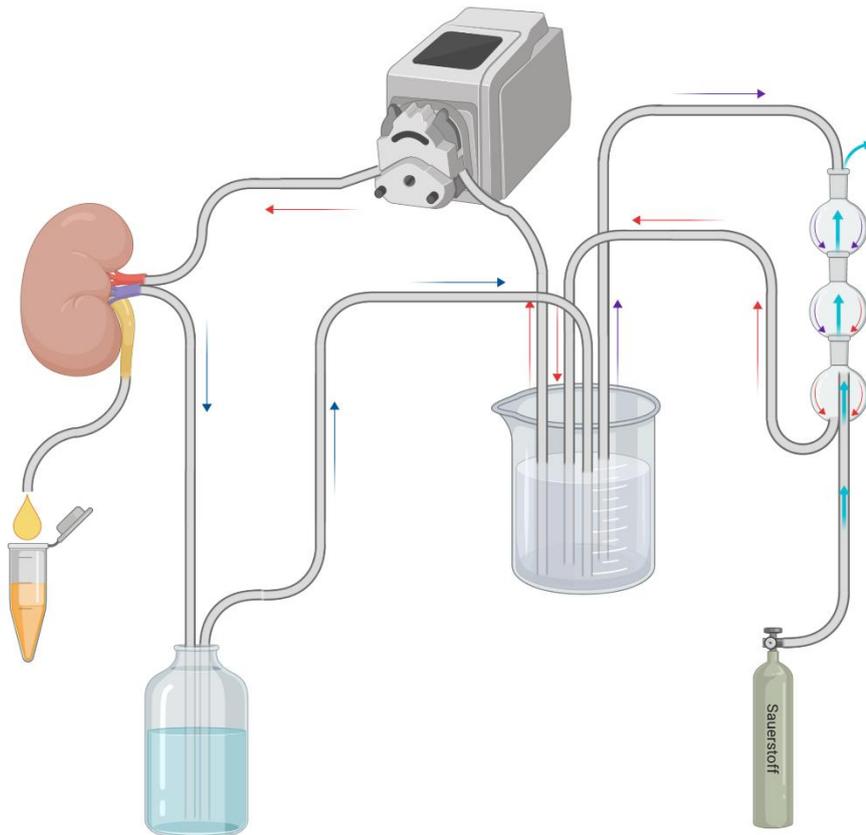


Abbildung 2.10.1: Schematische Abbildung des Perfusionsaufbaus

2.11. Sauerstoffkapazität

Amperometrische Sauerstoffmessung mit Hilfe des Oxygraph-2k

Die Sauerstoffkapazität der Perfusionslösung wurde ohne Sauerstoffträger und bei den Volumen-Fractionen 2 %, 4 % und 8 % mit Hilfe eines Oxygraph-2k (Oroboros Instruments GmbH, Innsbruck, Österreich) ermittelt. Der Oxygraph-2k bestimmt die Sauerstoffkonzentration einer Flüssigkeit, indem er mittels einer Clark-Elektrode amperometrisch den pO_2 in einer Messkammer mit definiertem Füllvolumen misst, die mit Hilfe von speziellen Stopfen verschlossen und mit einer 50 μ L-fassenden gasdichten Spritze (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) befüllt werden kann, ohne dass ein Gasaustausch stattfindet. Die Clark-Elektrode besteht aus einer Platinkathode und einer Silberanode. Sauerstoff wird an der Platinkathode zu Wasserstoffperoxid reduziert, das bei seinem Zerfall zwei weitere Elektronen aufnimmt und Hydroxidionen freisetzt, die an der Silberanode oxidiert werden. Der dadurch fließende Strom ist proportional zum herrschenden pO_2 , der, weil das spezifische

Volumen der Messkammer bekannt ist, von der Gerätesoftware in eine Sauerstoffkonzentration umgerechnet werden kann.

Um die genaue Sauerstoffkapazität der Sauerstoffträger messen zu können, musste vorab die Messkammer von Sauerstoff befreit werden. Hierfür wurden 2 mL einer Hefesuspension (80 mg/ml) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) in die Messkammer gefüllt und solange inkubiert, bis die Sauerstoffkonzentration auf nahe dem Nullpunkt gesunken war. Die Hefen wurden dann mit Kaliumcyanid deaktiviert. Währenddessen wurde die Perfusionslösung mit Hilfe eines Kugelrohroxygenators, wie in Abschnitt 2.10 „*ex vivo* normotherme Perfusion“ beschrieben, oxygeniert. Mit Hilfe einer Hamilton Spritze wurden 50 μ L der oxygenierten Sauerstoffträger-Suspension in die Messkammer injiziert und der dadurch verursachte Sauerstoffanstieg in der Kammer detektiert. Die Rohdaten wurden mit nachfolgender Gleichung auf das injizierte Volumen umgerechnet und in $\text{mL}_{\text{O}_2}/(\text{L}_{\text{H}_2\text{O}} \cdot \text{ATM})$ angegeben:

$$x * c / 1000 * g = y$$

X= gemessener Wert [nmol/mL]

c = Korrekturfaktor von 50 μ L auf 2 mL = 40

g = Gasmolvolumen = 22,4 L/mol

y = Sauerstoffkapazität der Suspension [$\text{mL}_{\text{O}_2}/(\text{L}_{\text{H}_2\text{O}} \cdot \text{ATM})$]

Messung des Sauerstofftransfers ins Gewebe durch HIF-Quantifizierung

Um die Fähigkeit der Sauerstoffträger, Gewebe mit Sauerstoff zu versorgen, quantifizieren zu können, wurde die Reaktion des Körpers auf akute und langfristige Hypoxie untersucht. Das schockgefrorene Nierengewebe wurde auf Eis aufgetaut und in Lysepuffer (cOmplete Lysis M[®], Roche diagnostics, Basel, Schweiz) aufgenommen. Das Gewebe wurde mittels eines Ultra Turrax homogenisiert und 60 min auf Eis inkubiert. Die Homogenisate wurden bei 13.000 xG und 4 °C für 30 min zentrifugiert, und der Überstand wurde für die weiteren Analysen verwendet. Die Proteinkonzentration wurde mit einem kommerziell erhältlichen Protein-Quantifizierungs-Assay bestimmt (DC Protein Assay, Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland; Epoch Microplate Spectrophotometer/ Gen5 Software Features for Detection, BioTek INC., Bad Friedrichshall, Deutschland).

Zur Auftrennung der Proteine wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyakrylamid-Gel-elektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt.

Der Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF-1 α und HIF-2 α wurden im Western-Blot-Verfahren (WB) nach Lämmli quantifiziert. Hierfür wurden 50 μ g Protein pro Spur (Marker: PAGE Ruler Protein, Thermo Scientific[™], Waltham, MA) in ein 7,5 %iges Gel (10 mL H₂O, 5 mL Bisacrylamid, 5 mL Trennpuffer (Tris-OH 181 g/L, SDS 4 g/L pH:8,8), 200 μ L Ammonium-Persulfat, 20 μ L N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine) gegeben und für 60 min bei 120 mV laufen gelassen. (Laufpuffer: Tris-HCl 25 mM, SDS 0,1 gew-%, Glycin 192 mM) Für den Transfer auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran wurde ein Turbo-Blot Kit (Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit, Boi-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland) verwendet. Anschließend wurde die Membran mit Milchpulver für 60 min blockiert. Darauf folgte eine Übernachtinkubation mit polyklonalem HIF-1 α Antikörper (1:1000) (Invitrogen, Waltham, USA) bzw. HIF-2 α Antikörper (Novus, Wiesbaden, Deutschland). Anschließend wurde 3 mal 5 min mit Tris gepufferte Salzlösung mit Tween (*Tris buffered saline-Tween*, TBS-T) (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,2 vol-% Tween20, pH: 7,6) gewaschen und 60 min mit, mit Meerrettich-Peroxidase modifiziertem Anti-Maus Antikörper (1:10.000, Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Nach einer erneuten dreimaligen Waschung mit TBS-T wurde das markierte Protein mit Hilfe eines Chemolumineszenz-Kit (SuperSignal[™] West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific[™], Waltham, MA) sichtbar gemacht.

Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet (1:10.000) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland).

2.12. Anthron Methode (Bestimmung der GFR)

Die Berechnung der GFR erfolgte nach der Formel: $GFR = (c_u/c_p) * V_u$ (c_u = Inulinkonzentration im Urin [$\mu\text{g/mL}$], c_p =Inulinkonzentration in der Perfusionslösung [$\mu\text{g/mL}$], V_u = Urinvolumen pro Minute [mL/min]).¹⁴² Für die Bestimmung der Inulinkonzentration in der Perfusionslösung und im Urin wurde Inulin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) mit Anthron (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) angefärbt und photometrisch bestimmt. Für die Färbung wurde zunächst eine 70 %ige Schwefelsäure hergestellt, indem konzentrierte Schwefelsäure (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) langsam in eisgekühltes Wasser getropft wurde. In 20 mL dieser Schwefelsäure wurden 40 mg Anthron gelöst, indem sie unter Lichtabschluss 2h auf Eis gerührt wurde. Aus den Proben wurden unterdessen 5 μL entnommen, mit 30 μL 3 %iger Trichloressigsäure (TCA, AppliChem, GmbH, Darmstadt, Deutschland) versetzt und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dem Überstand wurden 30 μL entnommen, in 200 μL der Anthron-Schwefelsäurelösung aufgenommen und in einem Überkopfschüttler (Labquake, Thermo Scientific™, Waltham, MA) für 15 min bei 57 °C in einem Heizschrank inkubiert. Die Absorption wurde bei 620 nm in einem Platerreader ($\mu\text{Quant/ Gen5}$ Software Features for Detection, BioTek INC., Bad Friedrichshall, Deutschland) gemessen.

2.13. Zellschädigung

Aspartat-Aminotransferase/ Laktat-Dehydrogenase

Für die Bestimmung der Aktivität der Aspartat-Aminotransferase im Urin und in der Perfusionslösung bzw. der Laktat-Dehydrogenase in der Perfusionslösung wurde ein vollautomatischer klinische-Chemie Analysator mit kommerziell erhältlichen Reagenz-Kits verwendet. (Respons® 920, DiaSys, Holzheim, Germany).

Nachweis Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen (TBARS)

Für den quantitativen Nachweis von Thiobarbitursäure-reaktiven Spezies wurde eine 30 %ige TCA (3 g / 10 mL bidestilliertem Wasser) und eine 1 %ige Thiobarbitursäure (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) (100 mg / 10 mL bidestilliertem Wasser) hergestellt. Von der 30 %igen TCA wurden 50 µl mit 100 µl der Proben gemischt und 5 min bei 13.000 RPM bei Raumtemperatur zentrifugiert. Es wurden 100 µl des Überstandes abgenommen, mit je 50 µl der 1%igen Thiobarbitursäure versetzt und 10 min bei 100 °C inkubiert (Thermomix, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die Proben wurden auf Raumtemperatur abkühlen gelassen und in einer 96 Well-Plate mit Hilfe eines Plateraders (µQuant/ Gen5 Software Features for Detection, BioTek INC., Bad Friedrichshall, Deutschland) bei 532nm fotometrisch gemessen. Für die Kalibriergerade wurde 1,1,3,3-Tetramethoxy-Propan (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) in den Konzentrationen: 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 7,5µM und in 10 µM verwendet.

2.14. Histologie

Die Organe wurden nach Entnahme mindestens 24h in 10 %igem Formaldehyd (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Die Entwässerung der Organe lief automatisiert mit einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (2h 70 %, 2h 90 %, 2h 96 %, 2h 100 %, 3x2h Xylol) (Entwässerungsautomat TP12/ TP14, Weinkauf Medizintechnik, Hallerndorf, Deutschland). Nach der Entwässerung wurden die Organe in Paraffin eingebettet. Aus den entwässerten Organen wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (HISTOCORE Biocut, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) 1 µm Dünnschnitte angelegt. Die Dünnschnitte wurden entparaffiniert in Xylol und rehydriert in einer absteigenden Ethanol-Reihe (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 0 %) (1-3 Minuten pro Schritt). Anschließend wurde eine Refixierung in 10 % Formaldehyd für 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt.

TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)-Assay

Die refixierten Dünnschnitte wurden in einer feuchten Inkubationskammer für ≤ 30 min bei 37°C mit Proteinase K-Lösung (Thermo Scientific™, Waltham, MA) (20 µg/mL in 10 mM Tris/HCl pH 7,4-8) (ca. 1,5 mL für 10 Schnitte) inkubiert. Anschließend wurden sie 2x 5 min mit Phosphat-gepufferter-Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) (13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 0,2 mM KH₂PO₄, pH: 7,4) gewaschen. Die positiv-Kontrollen wurden in einer feuchten Inkubationskammer für 10 min bei Raumtemperatur mit DNase I (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) (3000 – 3 U/mL in 50 nM Tris-HCl (pH:7,5) 1 mg/ml BSA) inkubiert. Es folgte 2x 5 min Waschen mit PBS. Die TUNEL-Färbung wurde nach den Angaben des In Situ Cell Death Detection Kit mit Fluorescein (Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt.

Anschließend wurden die Dünnschnitte für 2:30 min mit DAPI bei Raumtemperatur inkubiert (1:10.000 Verdünnung). Es folgte 3x 5 min Waschen mit PBS. Zum Eindecken wurde DAKO Fluorescence Mounting Medium (DAKO GmbH, Jena, Deutschland) verwendet.

Zur Auswertung wurden von jeweils fünf Gesichtsfeldern in 10facher Vergrößerung von Nierenrinde und Nierenmark fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. (Axiovert 200M / AxioCam 305 mono, Zeiss; Jena, Deutschland) Fluorescein wurde mit Licht der Wellenlänge von 475 nm und das DAPI mit Licht einer Wellenlänge von 380 nm angeregt.

Die Auswertung erfolgte Computer-basiert (open source: Fiji. Image J). Die monochromatischen Bilder wurden gefärbt (DAPI: blau, Fluorescein: orange) und die beiden Aufnahmen desselben Organausschnittes übereinandergelegt, die mit den jeweilig unterschiedlichen Wellenlängen angeregt wurden. TUNEL-positive Zellen wurden definiert als Zellen, in denen ein violettes Signal (Mischung aus blau und orange als eindeutiges Zeichen für Kernfärbung) detektiert wurde. Diese Zellen wurden mit dem Zähl-tool des Programms markiert und automatisch gezählt. Auf diese Weise wurden 5 Gesichtsfelder pro Organ und Nierenabschnitt ausgewertet. Die absoluten Zahlen der TUNEL-positiven Zellen wurden anschließend miteinander verglichen.

Periodsäure-Schiff-Reaktion Färbung (PAS)

Die in den refixierten Dünnschnitten befindlichen Zucker wurden für 15 min bei Raumtemperatur in einer 1 %igen Periodsäure (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) zu Aldehyden oxidiert. Danach wurden die Schnitte für 5 Minuten unter fließendem VE-Wasser gespült. Es folgte eine 15-minütige Inkubation in Schiff'schem Reagenz bei Raumtemperatur, bei der die Aldehyde sich rot färbten (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten unter fließendem, lauwarmem Leitungswasser gespült. Als Gegenfärbung wurden die Objektträger für 15 s mit 25 % Hämatoxylin-Lösung gefärbt und anschließend unter lauwarmem Wasser 5 min gebläut. Die Organschnitte wurden anschließend mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und eingedeckt.

Für die Auswertung wurden die Schnitte digitalisiert (Aperia Image Scope, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland).

Befundung

Die Nieren wurden vor der Befundung verblindet, und jedes Organ wurde, wie in Abbildung 2.14.1 gezeigt, in drei Zonen unterteilt: Nierenrinde (orange), äußeres Nierenmark (blau), inneres Nierenmark (gelb). Bei jedem Organ wurden in jeder der Zonen 5 Gesichtsfelder bewertet und anschließend ein Mittelwert gebildet. Die Glomeruli wurden bei 10facher, die Tubuli und das Glykogen bei 20facher Vergrößerung bewertet.

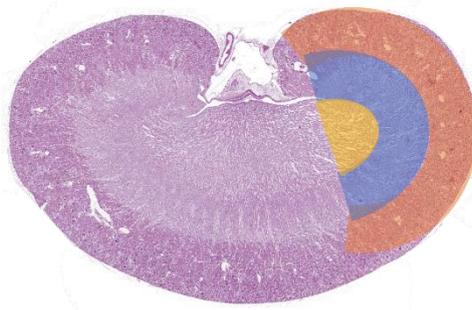


Abbildung 2.14.1 Einteilung der Niere in Nierenrinde (orange), äußeres Nierenmark (blau) und inneres Nierenmark (gelb)

Glomeruli

In der Nierenrinde wurden die Glomeruli auf einen Kollaps, der eine glomeruläre Nekrose anzeigt, untersucht (Abbildung 2.14.2 D schwarzer Pfeil). Der prozentuale Anteil der geschrumpften Glomeruli wurde unter den Gruppen verglichen.

Tubuli

Um den Zustand der Nierentubuli zu befunden, wurde der Score von Oh et al. angepasst, der den prozentualen Anteil an geschädigten Tubuli einer Score-Zahl zuordnet.¹⁴³ Dabei wurde nicht unterschieden, ob es sich um tatsächlich nekrotisches oder apoptotisches Gewebe handelt (Abbildung 2.14.2 D-F blauer bzw. gelber Pfeil).

Der Score folgte folgender Einteilung:

Tabelle 2.14-1: Score zur histologischen Befundung der Nierentubuli

Score-Zahl	prozentualer Anteil geschädigter Tubuli
1	0-1 %
2	2-10 %
3	11-20 %
4	21-30 %
5	>30 %

Glykogenspeicher

Einen weiteren Wert für die Befundung stellt das Vorhandensein von Glykogen in den Tubuluszellen der Nierenrinde dar (Abbildung 2.14.2 A grüner Pfeil). Es wurde in jedem Tubulus des gesamten Gesichtsfelds nach Glykogen geschaut und bei Vorhandensein wurde das Gesichtsfeld als Glykogen-positiv definiert. Wurden 3 oder mehr Glykogen-positive Gesichtsfelder gezählt, galt die Niere als Glykogen-positiv.

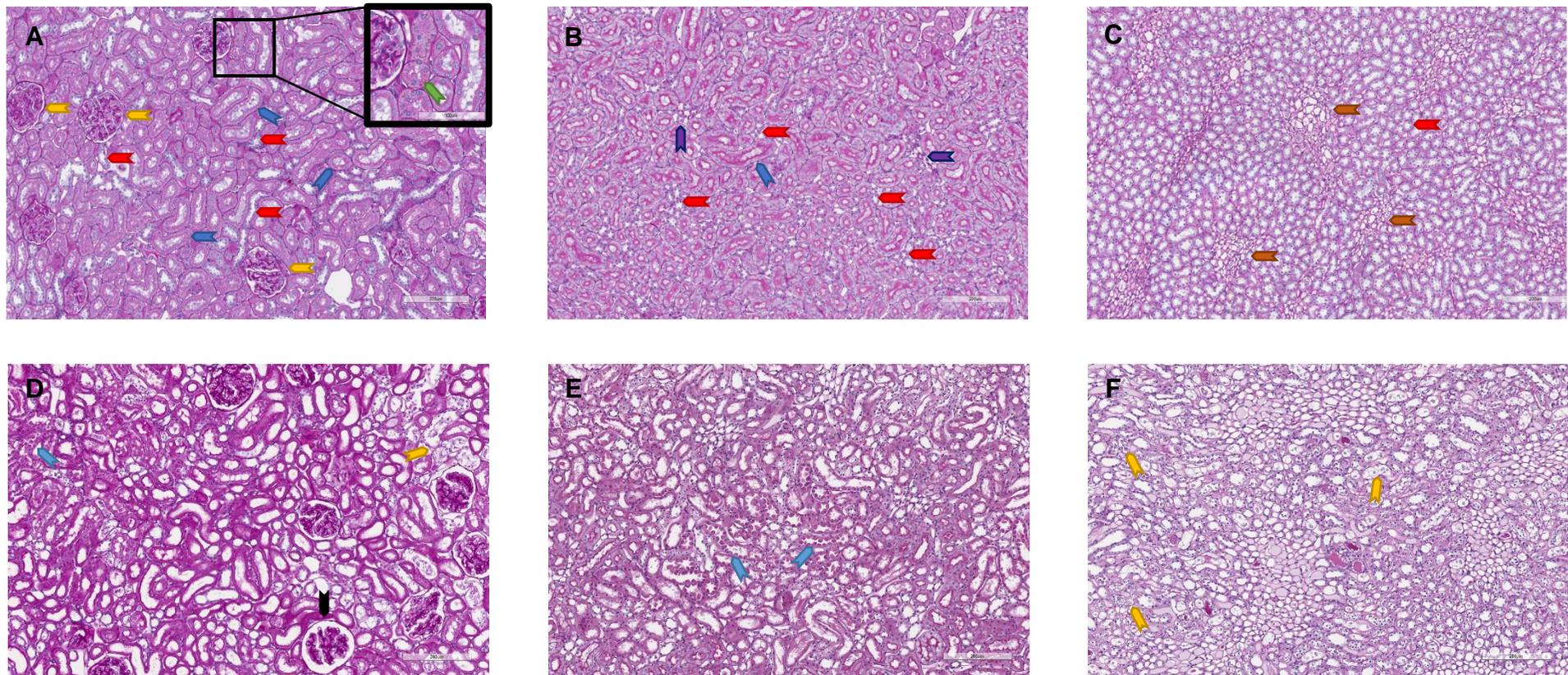


Abbildung 2.14.2: Gesunde Rattenniere **A**: Nierenrinde, **B**: äußeres Nierenmark, **C**: inneres Nierenmark. Proximaler Tubulus (blauer Pfeil), distaler Tubulus (roter Pfeil) Glomerulus (gelber Pfeil), dünner Schenkel des absteigenden oder aufsteigenden Teils der Henle-Schleife (violetter Pfeil), Gefäßbündel (brauner Pfeil), Glykogen (grüner Pfeil) Geschädigte Rattenniere **D**: Nierenrinde, **E**: äußeres Nierenmark, **F**: inneres Nierenmark. Apoptotischer Tubulus (blauer Pfeil), nekrotischer Tubulus (gelber Pfeil) kollabierter Glomerulus (schwarzer Pfeil)

2.15. Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und in einer Atmosphäre von 20 % O₂ und 5 % CO₂ gezüchtet. Für die THP-1- Zelllinie wurde Gibco™ RPMI-1640 Medium verwendet und für die HK2-Zelllinie Gibco™ DMEM/F12 Medium (Invitrogen, Waltham, USA) mit jeweils 10% FBS (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) und 1% Penicillin/Streptomycin-Mix (Invitrogen, Waltham, USA).

Vier Tage vor Versuchsbeginn wurden die THP-1 Zellen in Glasboden-Petrischalen (IBIDI, Martinsried, Deutschland) überführt und dem Medium 10 nM Phorbol-12-myristat-13-acetat (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) zugesetzt, um eine Ausdifferenzierung zu Makrophagen zu bewirken. Die eingesetzte Zellzahl betrug sowohl bei THP-1 als auch bei HK2 ca. 1 Mio Zellen pro Schale.

Die TG-Sauerstoffträger wurden aus Steen-Solution® nach der in Abschnitt 2.3 beschriebenen Anleitung hergestellt und für 2 Wochen bei 4 °C gelagert. Das Zellmedium wurde zu Beginn des Versuchs durch Steen-Solution® mit einer Volumenfraktion von 4 % der Sauerstoffträger ersetzt und für 4 Stunden bei 37 °C und 20% O₂ und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden anschließend vom umgebenden Medium befreit und ohne weiteres Abwaschen mit Glutaraldehyd und Formaldehyd in PHEM-Puffer (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂ 4% Glutaraldehyd, 1% Formaldehyd) fixiert. Nach vier Stunden wurde der Puffer gewechselt zu PHEM-Puffer ohne Glutaraldehyd.

2.16. Statistik

In Graphen wurden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Vergleiche zwischen Gruppen wurden bei Normalverteilung der Ergebnisse mit Hilfe des multiple t-Tests zusammen mit der Holm-Sidak post hoc Methode oder einer one way ANOVA, gefolgt von einem Dunnett`s post-hoc Test, durchgeführt, und bei nicht normalverteilten Daten wurde der Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunn`s post hoc Test analysiert, um eine statistische Signifikanz zu bestimmen. Ein p-Wert <0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Ausreißer wurden mit dem Ausreißer-Test nach Rout mit einem p-Wert < 0,5 bestimmt. Die Analysen wurden computerbasiert durchgeführt (GraphPad Prism 8 for Windows, Version 8.0.2, GaphPad Software, Inc, Januar 2019)

3. Ergebnisse

3.1. Einflussfaktoren im Herstellungsprozess der Sauerstoffträger

Albuminkonzentration der Stammlösung

Die Sauerstoffträger wurden bei einem Druck von 20.000 PSI, bei 4 °C und einer einzigen Passage durch den Homogenisator aus Albuminlösungen unterschiedlicher Konzentrationen (2 %, 5 % und 10 %) hergestellt. In Abbildung 3.1.1 ist die daraus resultierende durchschnittliche Partikelgröße (MI) in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration der Lösung dargestellt. Eine deutliche Abnahme der mittleren Partikelgröße mit steigender Albuminkonzentration kann beobachtet werden.

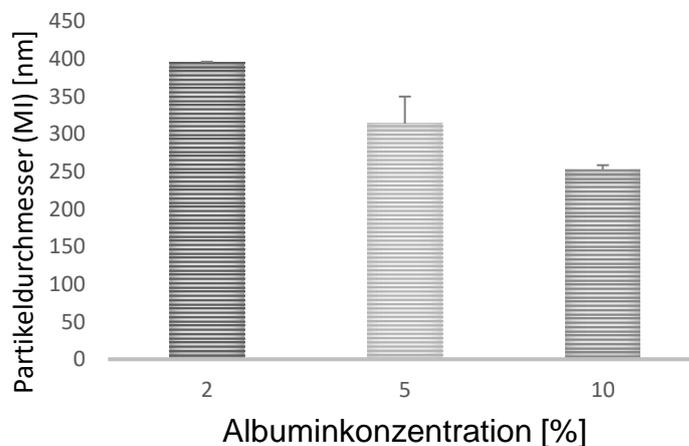


Abbildung 3.1.1 Der durchschnittliche Partikeldurchmesser in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration der Stammlösung aus der Sauerstoffträger hergestellt wurden. Die Sauerstoffträger wurden bei 20.000 PSI und in einer Homogenisatorpassage hergestellt und die Intensität der dynamischen Lichtstreuung wurde unmittelbar nach der Synthese gemessen. Die Steigerung der Albuminkonzentration führte zu einer Abnahme des Partikeldurchmessers. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SD aus $n=2$ Messungen.

Druck während der Homogenisierung

Die Sauerstoffträger wurden in allen weiteren Versuchen aus einer 5 %igen Serumalbumin-Lösung hergestellt.

Um zu verstehen, wie sich der Sauerstoffträger formiert, wurden drei verschiedene Drücke von 690 bar (10.000 PSI), 1380 bar (20.000 PSI) und 2070 bar (30.000PSI) getestet und die Auswirkung auf die Größe und die Lagerungsstabilität beobachtet. Mittels der dynamischen Lichtstreuung wurde die durchschnittliche Partikelgrößenverteilung der Sauerstoffträger ermittelt und in Abbildung 3.1.2 gegen

die Lagerungszeit aufgetragen. Die Größe der Sauerstoffträger nimmt proportional zum eingesetzten Druck ab, wobei der Größenunterschied zwischen den Synthesen bei 10.000 PSI und 20.000 PSI doppelt so groß ist wie der zwischen 20.000 PSI und 30.000 PSI. Das Wachstum der Sauerstoffträger über die Zeit konnte in zwei Phasen eingeteilt werden, eine Phase des schnellen Wachstums (etwa bis Tag 5) und eine folgende Phase des langsamen Wachstums. Zu beobachten war, dass die Sauerstoffträger, die mit niedrigerem Druck synthetisiert wurden, generell langsamer wuchsen und einen geringen Zuwachs erfuhren. Nach 23 Tagen erreichten die Sauerstoffträger aller Synthesemodi ungefähr den gleichen Durchmesser von ca. 330 nm.

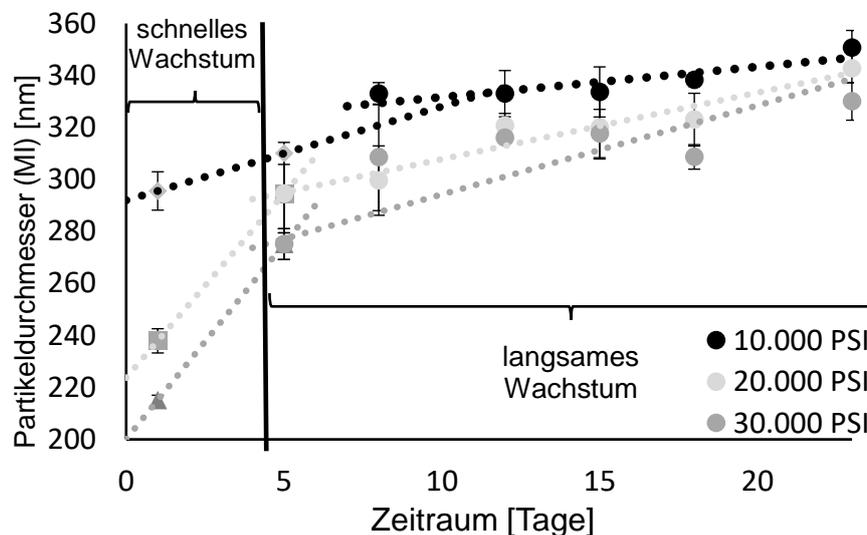


Abbildung 3.1.2: Dargestellt sind die Änderungen der Partikelgrößenverteilungen von Sauerstoffträgern, die eine Passage bei unterschiedlichen Drücken (10.000 PSI, 20.000 PSI, 30.000 PSI) durch den Homogenisator erfahren haben über die Zeit. Aufgetragen ist die durchschnittliche Partikelgrößenverteilung der Sauerstoffträger, ermittelt durch die Intensitätsmessung der dynamischen Lichtstreuung über einen Zeitraum von 23 Tagen. Die Wachstumskinetik kann in zwei Phasen unterteilt werden: Die Phase des schnellen Wachstums und die Phase des langsamen Wachstums. Die Sauerstoffträger, die mit niedrigerem Druck hergestellt wurden, zeigen generell ein langsames Wachstum im Vergleich zu den Sauerstoffträgern, die mit hohen Drücken hergestellt wurden. Nach 23 Tagen gleicht sich die durchschnittliche Größe bei allen drei Drücken an und beträgt ca. 330 nm. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus $n=5$ Messungen

Anzahl der Passagen durch den Homogenisator

Im Weiteren wurde der Einfluss der Passagen durch den Homogenisator auf die Stabilität der Sauerstoffträger in wässriger Lösung untersucht. Bei 30.000 PSI wurden

die Proben nach einer sowie nach 20 Passagen entnommen und ihre Partikelgrößenverteilung mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung ermittelt. Abbildung 3.1.3 zeigt, dass direkt nach Herstellung die Suspension, die 20 Passagen erfahren hatte, eine nur halb so große durchschnittliche Partikelgröße aufwies im Vergleich zur gleichen Suspension nach nur einer Passage (1 Passage = 215 nm; 20 Passagen = 114 nm). Das Wachstum der Sauerstoffträger direkt nach der Synthese fiel nach 20 Passagen erheblich steiler aus als nach einer Passage. Die Phase des schnellen Wachstums endete nach fünf Tagen, wobei sich die Größe der bei den beiden verschiedenen Passagenzahlen hergestellten Sauerstoffträger nach fünf Tagen angeglichen. Anschließend erreichten die Sauerstoffträger, die 20 Passagen erfahren hatten, signifikant größere Durchmesser.

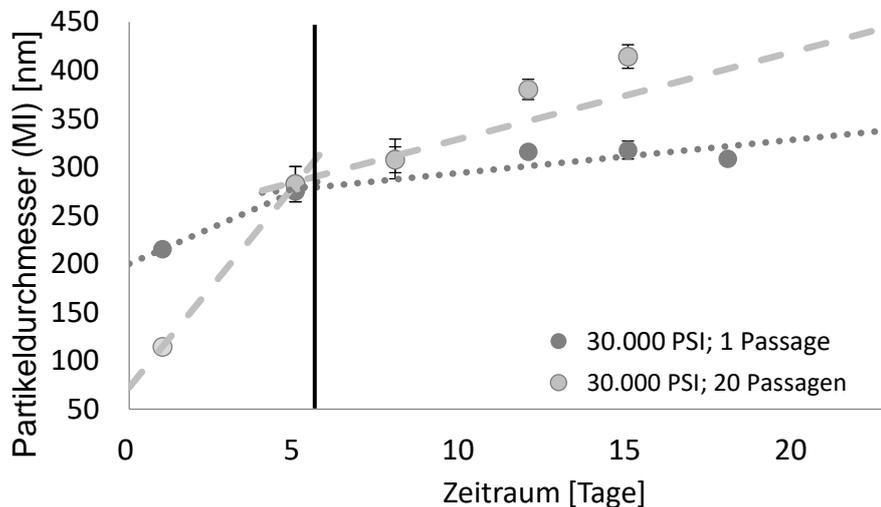


Abbildung 3.1.3: Der Vergleich der Größenänderung der Sauerstoffträger über die Zeit in Abhängigkeit von der Passagenzahl durch den Homogenisator. Aufgetragen ist die durchschnittliche Partikelgrößenverteilung der Sauerstoffträger, ermittelt durch die Intensitätsmessung der dynamischen Lichtstreuung über einen Zeitraum von 23 Tagen. Die Erhöhung der Passagenzahl führt zu einer deutlichen Verminderung der Partikelgröße, aber verstärktem Partikelwachstum und ab dem achten Tag zu einer absoluten größeren Partikelgröße. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SD aus $n=5$ Messungen.

Albuminverbrauch bei der Herstellung

Die Sauerstoffträger wurden direkt nach der Herstellung mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung vermessen und anschließend zentrifugiert. Im Überstand wurde die Albuminkonzentration mit Hilfe einer BKG-Färbung photometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1.4 dargestellt. Wie bereits in

Abbildung 3.1.2 und Abbildung 3.1.3 gezeigt, verringerte sich die Größe der Sauerstoffträger sowohl mit steigendem Druck als auch mit steigender Passagenzahl. Mit zunehmender Passagenzahl konnte reziprok zur sinkenden Partikelgröße ein Mehrverbrauch an Albumin festgestellt werden. Bei zunehmendem Druck verhielt sich der Albuminverbrauch entgegengesetzt (er verminderte sich).

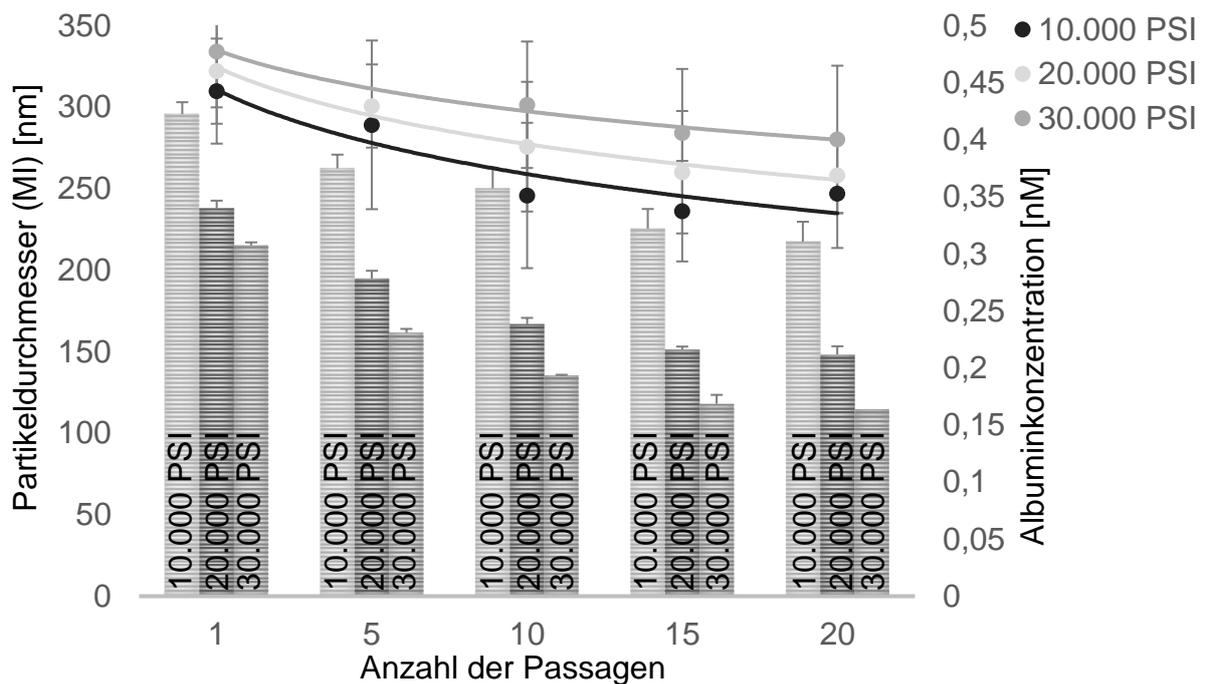


Abbildung 3.1.4: Zusammenhang zwischen dem Druck, der während der Herstellung benötigt wird, bzw. der eingesetzten Passagenzahl und sowohl der Partikelgröße als auch der für die Herstellung benötigten Stoffmenge an Albumin. Aufgetragen sind die mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelten durchschnittlichen Partikelgrößenverteilungen (Balken) und der mittels BKG-Färbung und anschließender photometrischer Bestimmung ermittelte Verbrauch an Albumin (Punkte) in Abhängigkeit von Druck und Passagenzahl. Mit steigendem Druck und steigender Passagenzahl verringert sich die durchschnittliche Partikelgröße. Der Verbrauch an Albumin vergrößert sich mit steigender Passagenzahl und verringert sich mit zunehmendem Druck. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SD aus $n=5$ Messungen.

Wie zu sehen ist, liegen die durchschnittlichen Partikelgrößen im Nanobereich, jedoch sind die daraus resultierenden Suspensionen, wie in Abbildung 3.1.5 zu sehen, nicht transparent.

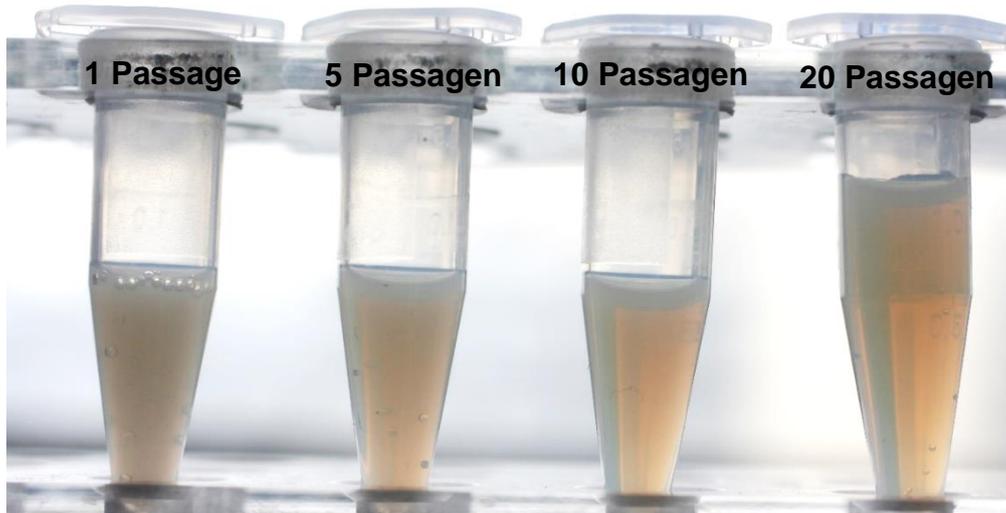


Abbildung 3.1.5: Fotografie von Sauerstoffträgern, die mit 20.000 PSI 1, 5, 10 bzw. 20 Passagen durch den Homogenisator erfahren haben, frisch nach der Synthese. In allen Proben ist mit bloßem Auge eine Trübung zu erkennen.

Der Polydispersionsindex als Maß für die Einheitlichkeit der Partikelgrößenverteilung wird bei der DLS-Messung automatisch berechnet und ist in Abbildung 3.1.6 in Abhängigkeit der durchgeführten Passagen aufgetragen. Mit zunehmender Passagenzahl kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Polydispersions-Index.

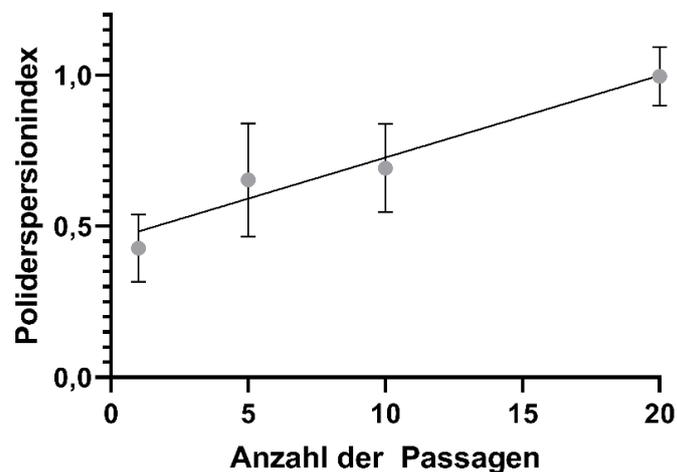


Abbildung 3.1.6: Auftragung der Polydispersionsindizes in Abhängigkeit von der Anzahl der Passagen die die Suspension durch den Homogenisator erfahren hat.

3.2. Charakterisierung der Standard-Sauerstoffträger

Basierend auf den bisher gezeigten Daten, wurde die Standard-Herstellung mit einem Druck von 20.000 PSI, einer Albuminkonzentration von 5 % und einer Passage durch den Homogenisator definiert. Die folgende Charakterisierung der Sauerstoffträger bezieht sich auf diese standardisierte Herstellung.

Verlust des PFDs aus den Sauerstoffträgern durch Verdunstung

Die Verdunstung des PFDs aus den Sauerstoffträgern wurde als Gewichtsverlust der Suspension beobachtet. Die Werte wurden auf den Startwert (0 Minuten) normiert und in Abbildung 3.2.1 gegen die Zeit aufgetragen. Als Vergleichsgruppe dient PFD, das mit 5 %iger BSA-Lösung in bidestilliertem Wasser entweder nebeneinander gelagert oder überschichtet wurde. Der gemessene Gewichtsverlust war in der Gruppe, in der das PFD in Form von Sauerstoffträgern vorlag, nach 60 Sekunden bereits signifikant geringer als in den Vergleichsgruppen. Die Überschichtung des PFDs mit Albuminlösung und die dabei entstehende Albuminschicht an der Grenzfläche hatten keinen Einfluss auf die Verdunstung.

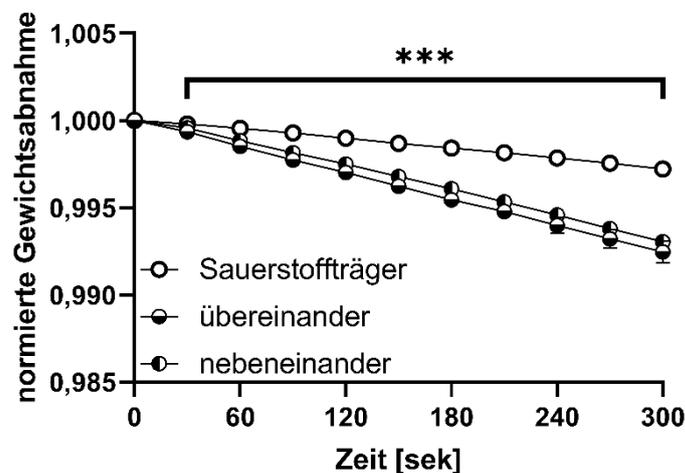


Abbildung 3.2.1: Verdunstung des PFDs aus den Sauerstoffträgern im Vergleich zu freiem PFD (nebeneinander) und mit 5%iger BSA-Lösung überschichtetem PFD (übereinander). Normiert auf den jeweiligen Startwert (0 Sekunden Mittelwert \pm SD, $n=5$, $p < 0,001$, two way ANOVA, Dunnett's post hoc Test)

Partikelgrößenverteilung der Sauerstoffträger

Kryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Kryo-TEM)

In der Kryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Kryo-TEM) wurde keine Kontrastierung durchgeführt, wie sie in anderen TEM-Verfahren verwendet wird. Daher ist es nicht möglich, den Kern des Sauerstoffträgers von seiner Albuminhülle zu unterscheiden, wodurch der gesamte Sauerstoffträger als schwarze Kreise erkennbar ist (Abbildung 3.2.2). Die Suspension wurde mittels des Plunge-Freeze-Verfahrens schockgefroren. Zwischen den einzelnen Sauerstoffträgern ist deutlich ein Abstand in Form einer hellen Linie zu erkennen. Die Annäherung zweier Sauerstoffträger führt zu deren Verformung. Die Sauerstoffträger liegen sowohl vereinzelt als auch in Gruppen zusammengelagert vor. Die in Abbildung 3.2.2 dargestellten Sauerstoffträger besitzen Größen zwischen 40 und 670 nm.

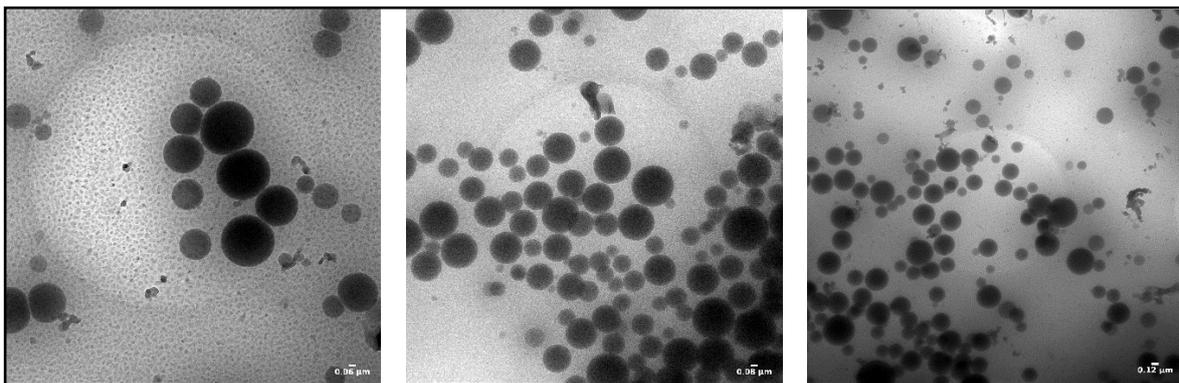


Abbildung 3.2.2: In der Kryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie wird der Kern der Sauerstoffträger schwarz dargestellt. Die Sauerstoffträger verbleiben durch die Schockgefrierung in ihrer nativen Form. Zwischen den Sauerstoffträgern ist ein kleiner Abstand zu erkennen. Die Annäherung zweier Sauerstoffträger führt zu einer Verformung. (Aufnahme: PD Holger Jastrow, Bernd Walkenforst; IMCES Uni-DUE)

DLS, SLS, Lichtmikroskopie

Unmittelbar nach Herstellung der Sauerstoffträger wurde die Partikelgrößenverteilung mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung ermittelt.

Die Messung der Intensität der Lichtstreuung ergab die in Abbildung 3.2.3 dargestellte Gauß'sche Größenverteilung. Aufgetragen ist der hydrodynamische Durchmesser des Sauerstoffträgers gegen den prozentualen Anteil der Gesamtintensität der Lichtbrechung der Suspension. Der D50, d.h. der Durchmesser, den 50% der

Sauerstoffträger unterschreiten, liegt bei 232 nm, wobei der D95, d.h. der Durchmesser, den 95% der Sauerstoffträger unterschreiten, bei 349 nm liegt. Der Polydispersionsindex liegt bei 0,607. Basierend auf der in Abbildung 3.2.3 gezeigten Partikelgrößenverteilung, wurde das Zetapotential einer von jeglichem ungebundenen Albumin befreiten Probe bestimmt. Das Zetapotential wurde in Köln von Dipl.-Ing. Daniel Moog in der Firma Pulveranalyse GbR durch Messung der elektrokinetischen Schallamplitude (ESA) bestimmt. Die Messung ergab eine ESA von $0,7 \text{ m}^3\text{Pa}\cdot\text{mV}^{-1}$, aus der mit Hilfe des bekannten durchschnittlichen Durchmessers das Zetapotential von -21 mV berechnet werden konnte.

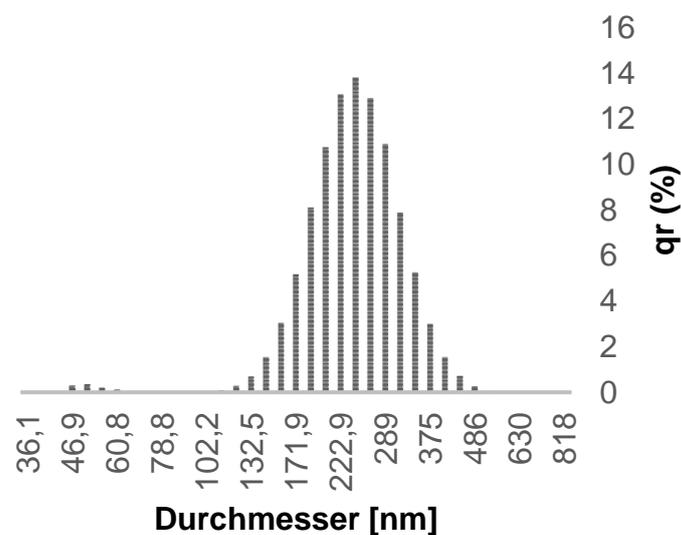


Abbildung 3.2.3: Exemplarisches Histogramm der Partikelgrößenverteilung der Sauerstoffträger unmittelbar nach der Herstellung, ermittelt durch die Messung der Intensität der dynamischen Lichtstreuung. Aufgetragen ist der Durchmesser des Sauerstoffträgers gegen den prozentualen Anteil an der Intensität, den die Partikel der einzelnen Größen haben (qr [%])

Zur Validierung der DLS Messungen wurden von Dr. Sven Haferkamp von der SOLID-CHEM GmbH in Bochum statische Lichtstreuungsmessungen von Proben durchgeführt, die nach der standardisierten Herstellungsprozedur hergestellt wurden. Die Messungen ergaben die in Abbildung 3.2.4 dargestellte Größenverteilung. Die dabei beobachteten Partikel besaßen einen D50 von durchschnittlich 191 nm, jedoch einen D90 von 5684 nm. Wie in Abbildung 3.2.4 zu sehen, existiert neben der in der DLS beobachteten Population eine weitere Population mit größeren Partikeln, deren durchschnittliche Größe bei über 6000 nm liegt, deren Zahl gering ist, deren Volumen aber nicht zu vernachlässigen ist.

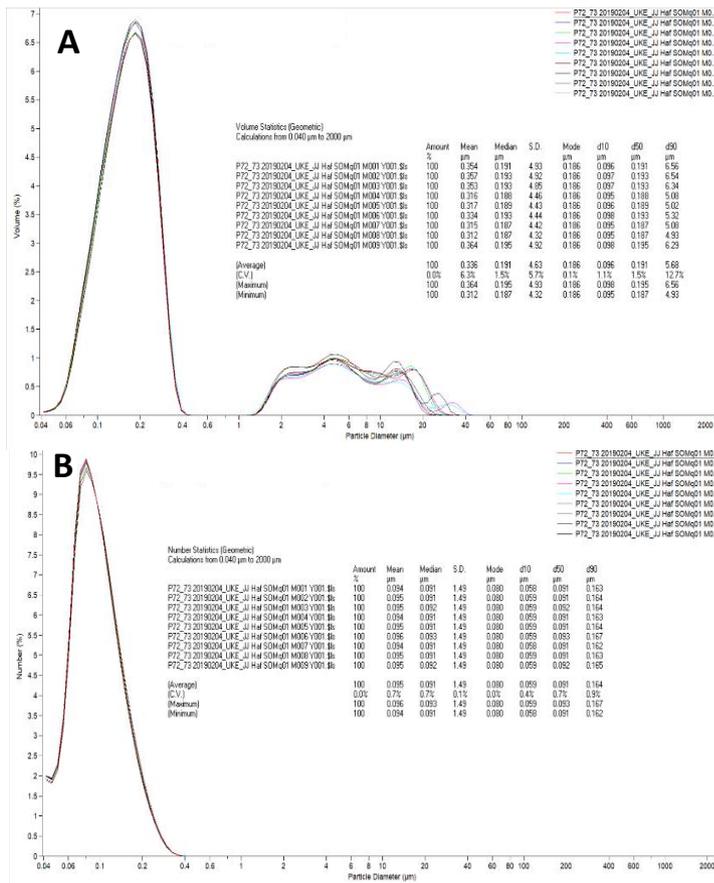


Abbildung 3.2.4: Partikelgrößenverteilung der Sauerstoffträger an Tag 2 nach der Herstellung, ermittelt durch die Messung der SLS. **A:** Aufgetragen wurde der prozentuale Anteil am Gesamtvolumen aller Partikel, den Sauerstoffträger bestimmter Partikelgröße haben. Zu sehen ist eine bimodale Größenverteilung mit einem D50 von 191 und einem D90 von 5684. **B:** Aufgetragen ist die Anzahl der Partikel, die abhängig von ihrer Größe den jeweiligen Anteil an der Intensität der statischen Lichtstreuung haben. In dieser Messung wurde eine monomodale Partikelgrößenverteilung mit einem D50 von 91 nm und einem D90 von 164 nm detektiert. Jede Linie stellt die gemittelte Messung zweier Proben dar, die in kurzem zeitlichem Abstand gemessen wurden.

Die in der SLS beobachtete Population von Sauerstoffträgern mit einer Größe über 1 µm wurde für die vollständige Charakterisierung mikroskopisch analysiert.

Abbildung 3.2.5 A zeigt die Sauerstoffträger als helle kugelförmige Partikel.

Eine Immersionsmikroskopie wurde von Dr. Karl-Heinz Schäffner in der Labor Dr. Schäffner GmbH in Solingen durchgeführt, um qualitativ höherwertige Daten für die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung zu generieren. Dabei wird durch seitliche Einstrahlung kurzwelliges Licht in Form von ultrakurzen Laserblitzen das Abbe-Limit überwunden, und Partikel im Submikronbereich werden sichtbar gemacht. Eine mit dieser Technik angefertigte mikroskopische Aufnahme ist exemplarisch in *Abbildung 3.2.5 B* dargestellt. Die ermittelten Partikelgrößen der Sauerstoffträger, lagen im Bereich von 270 nm-1140 nm. Für eine statistische Auswertung oder die Anfertigung eines Histogramms reichten, aufgrund der geringen zu beobachtenden Partikelzahl die Daten beider mikroskopischer Messmethoden nicht aus.

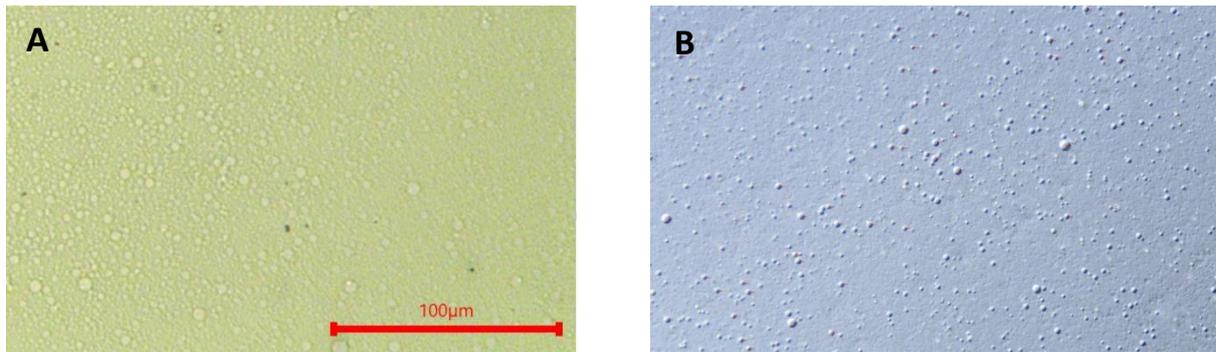


Abbildung 3.2.5: **A** Exemplarische Darstellung einer lichtmikroskopischen Aufnahme einer Sauerstoffträgersuspension. Die Sauerstoffträger sind klar zu erkennen und liegen im Größenbereich zwischen $1 \mu\text{m}$ und $5 \mu\text{m}$. **B** Exemplarische Immersionsmikroskopieaufnahme einer Sauerstoffträgersuspension. Das blaue, seitlich eingeblickte Licht ermöglicht Partikel, die kleiner sind als das Abbe-Limit, sichtbar zu machen. Die auf diese Art detektierten Partikelgrößen liegen im Bereich von 270 nm – 1140 nm . Die Aufnahme wurde angefertigt von Dr. Karl-Heinz Schäffner in der Labor Dr. Schäffner GmbH in Solingen.

Oberflächenbeschaffenheit des Sauerstoffträgers:

Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance, NMR)

In Zusammenarbeit mit dem Institut für biomolekulare NMR an der Ruhr-Universität Bochum wurden ^1H -NMR-Spektren der Sauerstoffträger aufgenommen. Hierfür wurden die zwei Messungen einer Probe durchgeführt. Die entstandenen Spektren sind in Abbildung 3.2.6 gezeigt. Für das Spektrum in **A** wurde eine unbehandelte Probe einen Tag nach der Herstellung gemessen. Im Bereich zwischen $6,5$ und $8,5 \text{ ppm}$ sind die für Proteine typischen Banden zu sehen. Die Probe wurde durch vierfaches Zentrifugieren und Resuspendieren in bidestilliertem Wasser von überschüssigem Albumin befreit, und es wurde erneut ein Spektrum aufgenommen, das in **B** gezeigt ist. Die Banden im Bereich von $6,5$ bis $8,5 \text{ ppm}$ sind nicht mehr zu erkennen. **C** zeigt eine Serie von ^1H -NMR-Spektren von einer gewaschenen Probe, die auf sechs einzelne verschlossene Reagiergefäße aufgeteilt wurde und von denen ein Gefäß zu unterschiedlichen Zeitpunkten geöffnet und auf freigesetztes Albumin untersucht wurde. Es kommt zu einer geringen Freisetzung. **D** zeigt eine Serie von ^1H -NMR-Spektren, die von der geöffneten und offen gelagerten Probe aus **B** zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgenommen wurden. Das Signal für freigesetztes Albumin ist ab Tag 3 zu erkennen.

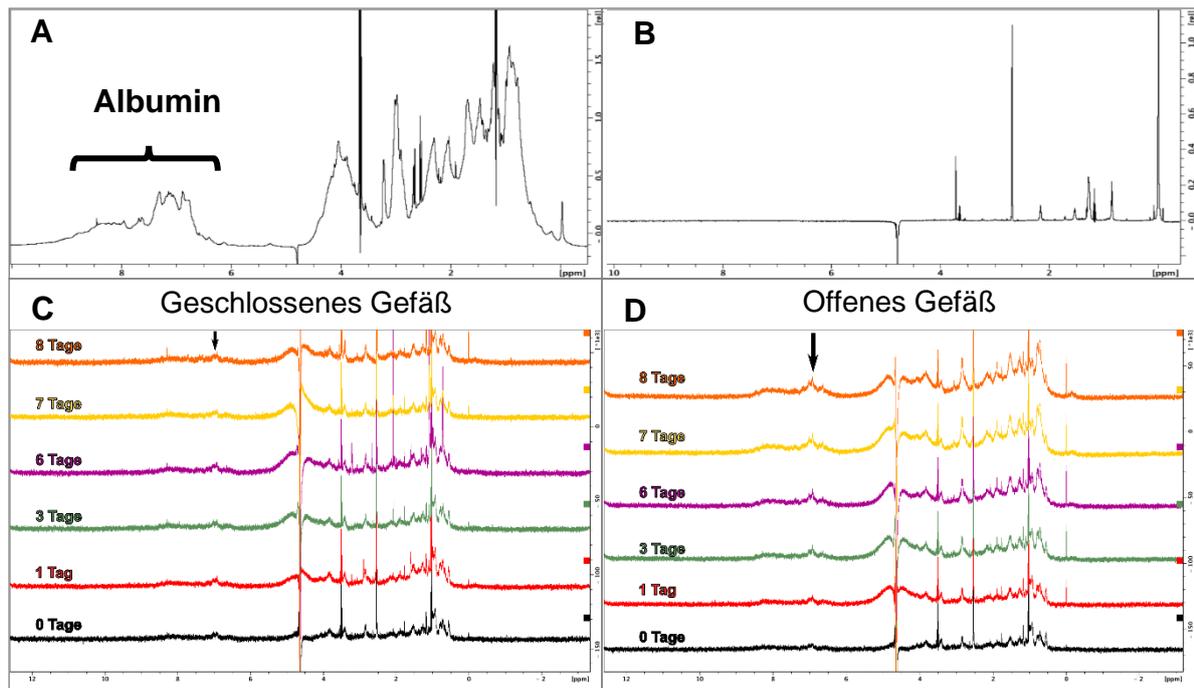


Abbildung 3.2.6: **A** $^1\text{H-NMR}$ Spektrum einer unbehandelten Sauerstoffträgersuspension. Die Banden die durch frei bewegliches Albumin hervorgerufen werden sind deutlich zu erkennen. **B** Durch viermaliges Zentrifugieren und Resuspendieren in destilliertem Wasser wurden alle Albuminmoleküle die nicht an der Oberfläche der Sauerstoffträger adhärirt waren aus der Probe entfernt. Die in A zu erkennenden Banden sind in B nicht mehr detektierbar. **C** Proben wurden für 8 Tage bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ in verschlossenen Reagiergefäßen gelagert und es wurden täglich $^1\text{H-NMR}$ -Spektren aufgenommen. **D** Die in B dargestellte Probe wurde im geöffneten NMR-Messröhrchen über 8 Tage bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und es wurde täglich ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen. Die Messungen wurden von Dr. Oliver Arnolds im Institut für biomolekulare NMR aufgenommen.

Kryo-Raster-Elektronenmikroskopie (*Kryo-REM*)

Kryo-Raster-elektronenmikroskopische-Aufnahmen der Sauerstoffträger wurden von Dr. Karl-Heinz Schöffner in der Labor Dr. Schöffner GmbH in Solingen aufgenommen. Die Sauerstoffträger wurden mittels Plunge-Freeze-Verfahren schockgefroren und das umgebende Wasser wurde bei -100 °C im Hochvakuum sublimiert. Die getrockneten Sauerstoffträger wurden dann mit einer stromleitenden Schicht (in diesem Falle Gold) überzogen. Die Aufnahmen zeigen Kugeln, die aufgeplatzt zu sein scheinen. Die Dicke der Risskanten als Maß für die Albuminschichtdicke wurde gemessen und ergab Werte zwischen 5 und 10 nm.

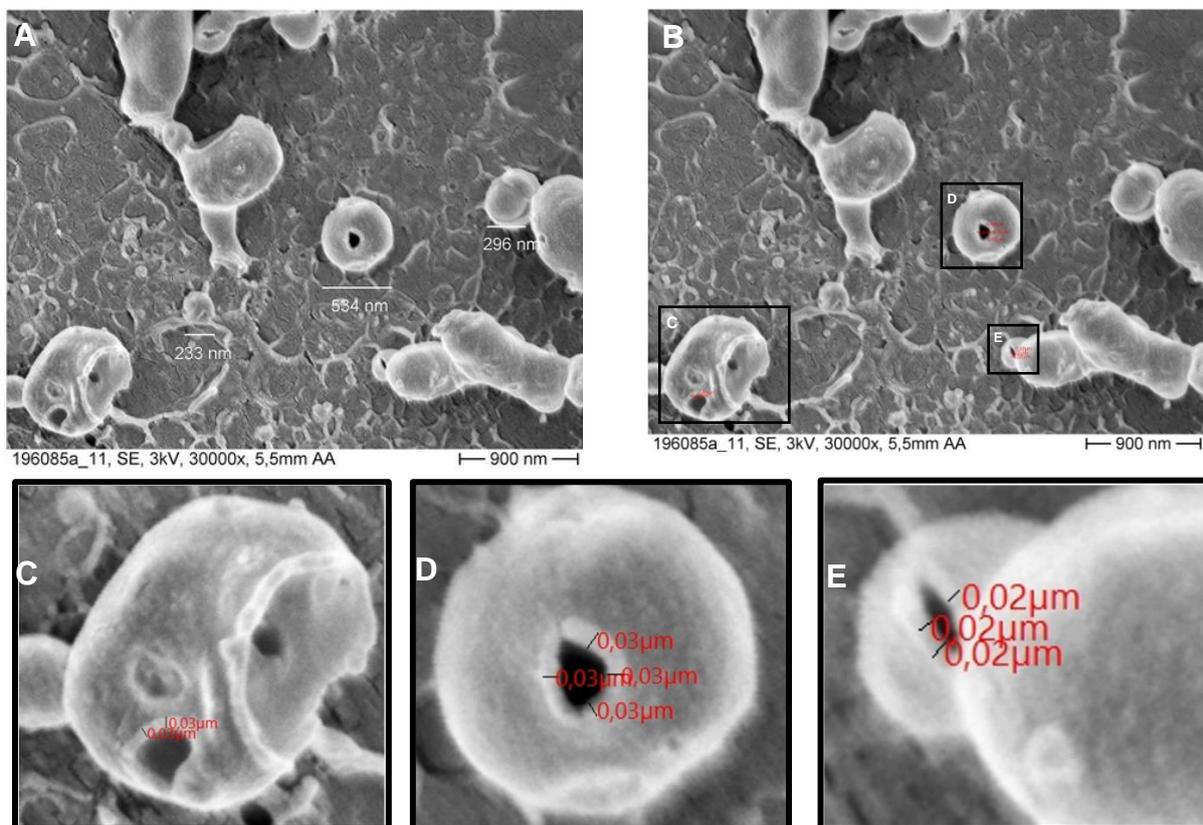


Abbildung 3.2.7: Kryo-Rasterelektronenmikroskop Aufnahmen. A Die kugelförmigen Objekte sind aller Wahrscheinlichkeit nach die Sauerstoffträger, deren Perfluorcarbon-Kern beim Sublimieren der Probe bei -100 °C entwich und dabei ein Loch in die Albumin-Hülle riss. Die Sauerstoffträger im Bild liegen in einem Partikelgrößenbereich von $233\text{ nm} - 534\text{ nm}$. B/C/D/E Die Schichtdickenbestimmung am aufgerollten Rand der Austrittsstelle des PFDs ergab in C und D eine Dicke von 30 nm in E 20 nm . Abzüglich einer 10 nm dicken Goldschicht und unter der Annahme, dass sich an dieser Stelle die Hülle doppelt gelegt hat, ist in C und D eine Schichtdicke von 10 nm in E von 5 nm anzunehmen. Das entspricht einer dreilagigen bzw. einlagigen Albuminschicht als Hülle. Die Aufnahme wurde angefertigt von Karl-Heinz Schöffner in der Labor Dr. Schöffner GmbH in Solingen

Sauerstoffkapazität der Sauerstoffträger

Amperometrische Sauerstoffmessung mit Hilfe des Oxygraph-2k

Abbildung 3.2.8 zeigt die mit Hilfe eines Oxygraph O2K bestimmte Sauerstoffkapazität der Sauerstoffträger in Abhängigkeit von ihrer Volumen-Fraktion in der Suspension. Die Sauerstoffkapazität steigert sich signifikant und proportional mit steigender Volumen-Fraktion der Sauerstoffträger. Die Messungen ergaben gegenüber der Kontrolle ohne Sauerstoffträger eine Steigerung von ungefähr 2-2,5 mL O₂ pro L Suspension pro 1 %iger Steigerung der Sauerstoffträgerkonzentration bei Atmosphärendruck.

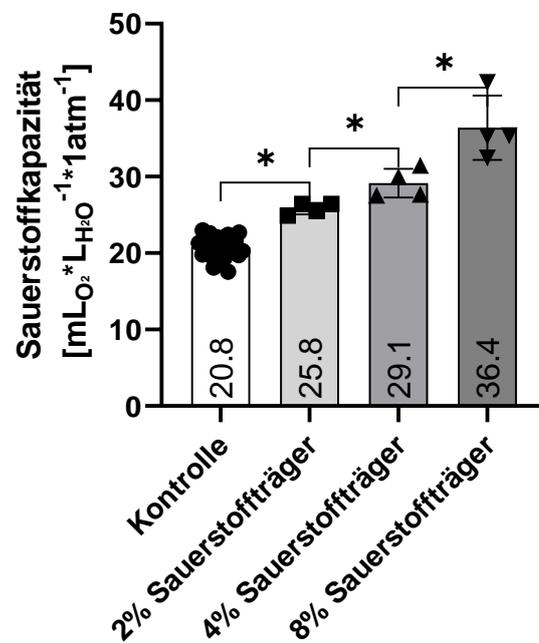


Abbildung 3.2.8: Die Sauerstoffkapazität der Sauerstoffträger Suspension wurde in Abhängigkeit von der eingesetzten Volumen-Fraktion, mit Hilfe eines Oxygraph O2K bestimmt. Die Sauerstoffkapazität steigerte sich mit steigender Volumen-Fraktion signifikant. Mittelwert \pm SD, * $p < 0,0001$, one way ANOVA gefolgt von einem Dunnett's post hoc Test

3.3. Charakterisierung des TG-Sauerstoffträgers

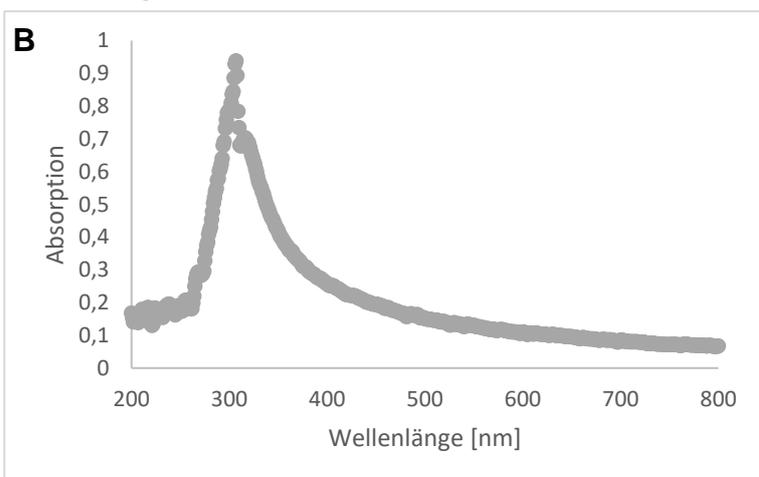
Physikalische Eigenschaften des TG-Sauerstoffträgers

Die Größe des TG-Sauerstoffträgers wurde mit unterschiedlichen optischen und streuungsbasierten Methoden untersucht. Abbildung 3.3.1 **A** ist eine Fotografie der Sauerstoff-Suspension am Tag der Herstellung. Es ist mit dem bloßen Auge im Durchlicht keine Lichtstreuung an den Sauerstoffträgern zu erkennen.

Ein am ersten Tag nach der Herstellung aufgenommenes UV/Vis – Spektrum im Spektralbereich von 200-800 nm ist in Abbildung 3.4.1 **B** dargestellt. Eine deutliche Absorptionsbande im UV-Bereich des Spektrums zwischen 300 und 400 nm mit dem *Peak* bei 307 nm ist zu sehen. Diese Absorptionsbande ist zu längeren Wellenlängen verschoben im Vergleich zu nativem gelöstem Albumin. Der beobachtete *Peak* weist ein *tailing* in Richtung größerer Wellenlängen auf. Es gibt keine Hinweise auf eine durch Lichtstreuung verursachte Interferenz.



Abbildung 3.3.1: **A** Fotografie der nanopartikularen Sauerstoffträger-Suspension am Tag der Herstellung. Im Durchlicht ist mit bloßem Auge keine Streuung durch die Sauerstoffträger in der Suspension zu erkennen. **B** UV/Vis Spektrum (200 – 800 nm) einer TG-Sauerstoffträger-Suspension am Tag der Herstellung. Eine Absorptionsbande mit dem Peak bei 307 nm und einem tailing in Richtung größerer Wellenlängen.



Partikelgrößenverteilung der TG-Sauerstoffträger

DLS

Zur Partikelgrößen-Bestimmung wurde direkt nach der Synthese eine Messung der Intensität der dynamischen Lichtstreuung durchgeführt. Abbildung 3.3.2 zeigt das bestimmte Histogramm für die TG-Sauerstoffträger-Suspension. Die durchschnittliche Partikelgröße liegt bei 172 nm.

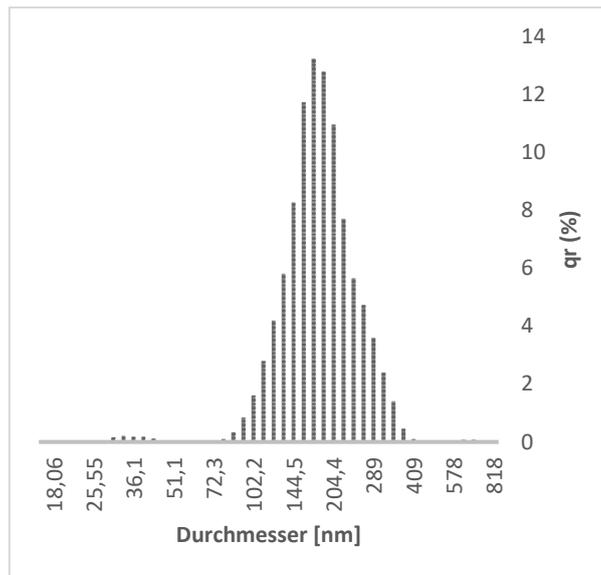


Abbildung 3.3.2: Exemplarisches Histogramm der Partikelgrößenverteilung der Sauerstoffträger unmittelbar nach der Herstellung, ermittelt durch die Messung der Intensität der dynamischen Lichtstreuung. Aufgetragen ist der Durchmesser des Sauerstoffträgers gegen den prozentualen Anteil an der Intensität, den die Partikel der einzelnen Größen haben

In der DLS wurde eine bimodale Verteilung detektiert mit einer kleinen Population von Partikeln mit einer Größe zwischen 25 und 45 nm und einer großen Population mit einer Partikelgröße von 80 bis 410 nm. Unter dem Mikroskop konnten keine Sauerstoffträger detektiert werden.

SLS

Zur Verifizierung des in der DLS gemessenen Histogramms wurden von Dr. Sven Haferkamp in der SolidChem GmbH in Bochum Messungen der statischen Lichtstreuung durchgeführt (Abbildung 3.3.3). Es konnte in jeder Probe einen Tag nach der Herstellung nur eine Population mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von ~150 nm bzw. ~180 nm in der Anzahl-Partikelgrößenverteilung und bei der Volumen-Partikelgrößenverteilung bei ~180 nm bzw. ~200 nm gefunden werden. Nach ~ 5

Monaten der Lagerung bei 4 °C liegt die durchschnittliche Partikelgröße in der Anzahl-Partikelgrößenverteilung bei ~300 nm und in der Volumen-Partikelgrößenverteilung bei ~380 nm. Die maximale Partikelgröße liegt in beiden Fällen unter 650 nm.

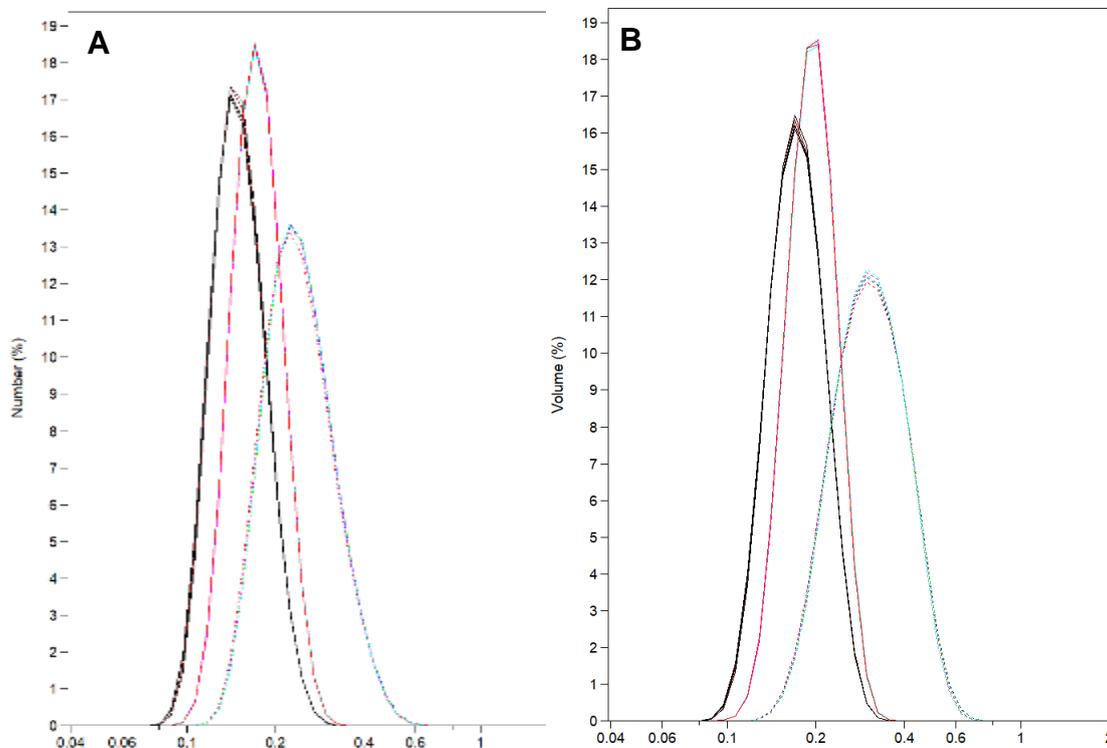


Abbildung 3.3.3: Messung der statischen Lichtstreuung einer TG-Sauerstoffträger-Suspension einen Tag nach der Herstellung (durchgängige Linie) und ~ 5 Monate nach der Synthese (gestrichelte Linie). **A** Anzahl-Partikelgrößenverteilung; **B** Volumen-Partikelgrößenverteilung

Transmissions-Elektronenmikroskopie

TG-Sauerstoffträger wurden aus humanem Serumalbumin-haltiger Lösung hergestellt und nach einer zweiwöchigen Lagerung mit Makrophagen (aus THP-Zellen gereift) bzw. humanen Nieren-Tubulus-Epithelzellen (HK2) bei 37 °C für 4h inkubiert. Abbildung 3.3.4 zeigt die im Extrazellularraum befindlichen Sauerstoffträger nach der Inkubation. Gelbe Pfeile indizieren die größten Sauerstoffträger, die in den Aufnahmen gefunden wurden, mit einem Durchmesser von unter 200 nm. Grüne Pfeile indizieren kleinere Sauerstoffträger bis hin zu einem Durchmesser von 20 nm. Die ovale Form der Sauerstoffträger ist artifiziell bei der Herstellung der Ultradünnschnitte entstanden.

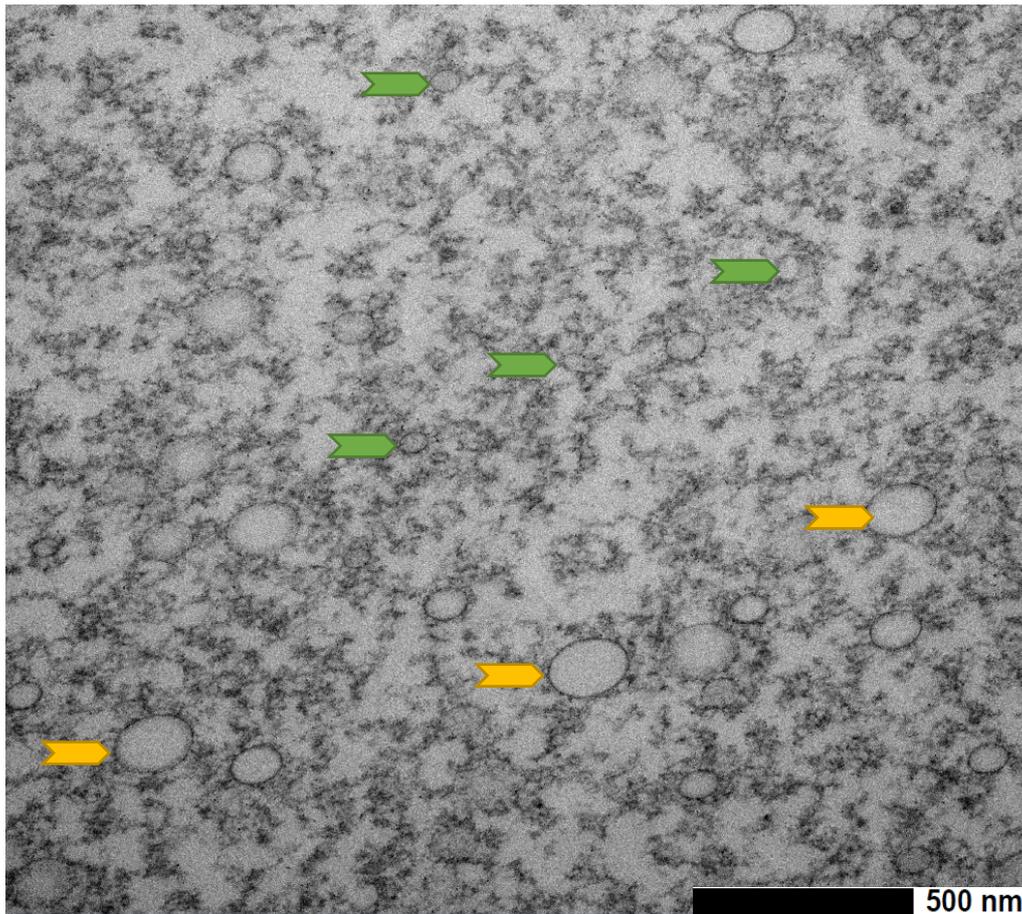


Abbildung 3.3.4: Sauerstoffträger mit humanem Serumalbumin als Hüllmaterial nach 2-wöchiger Lagerung bei 4 °C und 4 stündiger Inkubation bei 37 °C. Gelbe Pfeile: Partikel mit einem Durchmesser von knapp unter 200 nm. Grüne Pfeile: Partikel mit einem Durchmesser von ~ 20 nm.

Sauerstoffkapazität der TG-Sauerstoffträger

Die mit Hilfe eines Oxygraph O2K bestimmte Sauerstoffkapazität der TG-Sauerstoffträger-Suspension bei einer Volumen-Fraktion von 16,66 vol% lag einen Tag nach Herstellung der Suspension bei $56,6 \pm 5,18 \text{ mL}_{\text{O}_2} \cdot \text{mL}_{\text{H}_2\text{O}}^{-1} \cdot 1 \text{ atm}^{-1}$.

Biokompatibilität der TG-Sauerstoffträger

Die Versuche hinter den gezeigten TEM-Aufnahmen wurden von Dr. Miriam Cantore durchgeführt, und die Aufnahmen wurden unter Mithilfe von PD Dr. Holger Jastrow angefertigt. Makrophagen zeigten sich als sehr potent, die Sauerstoffträger zu inkorporieren. Abbildung 3.3.5 **A** zeigt eine Makrophage, die große Mengen der Sauerstoffträger aufgenommen hat und diese innerhalb eines Phagosoms und später eines (Hetero-) Lysosoms gespeichert hat. Gelbe Pfeile: Sauerstoffträger; rote Pfeile: Risse im Objektträger (vielleicht durch Sauerstoffträger verursacht). Innerhalb der Vesikel sind die Sauerstoffträger noch immer umhüllt von einer feinen Schicht. Abbildung 3.3.5 **B** zeigt die Aktivität an der Zellmembran der Makrophagen. Es sind Pseudopodien zu sehen, die bei der Aufnahme von Fremdpartikeln helfen. **C** zeigt inkorporierte Sauerstoffträger. Der Einschluss in ein Vesikel sowie der Erhalt der ursprünglichen Gestalt und Größe sind zu erkennen.

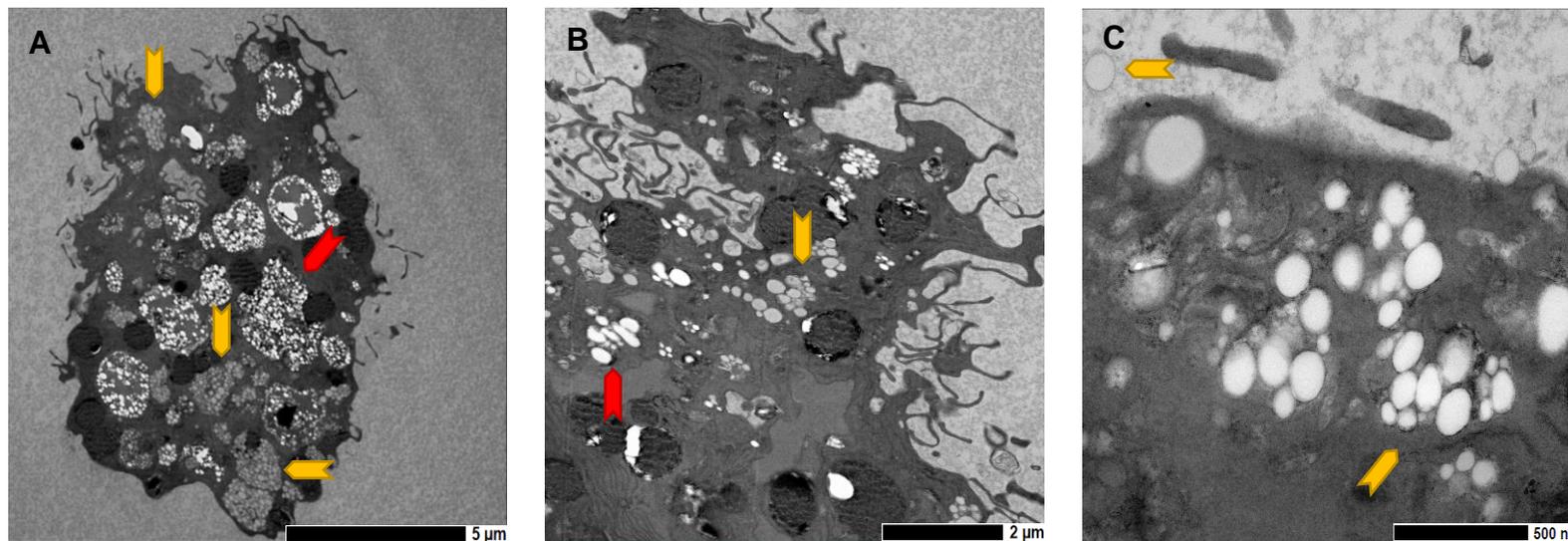


Abbildung 3.3.5: **A** Makrophage (aus THP-Zellen gereift) mit inkorporierten Sauerstoffträgern; **B** Aktivität an der Membran der Makrophagen. Pseudopodien helfen bei der Aufnahme der Sauerstoffträger; **C**: Sauerstoffträger sind innerhalb der Zelle von einer sichtbaren Membran umhüllt. Gelbe Pfeile: Sauerstoffträger, rote Pfeile: artifizielle Risse und Löcher im Gewebe

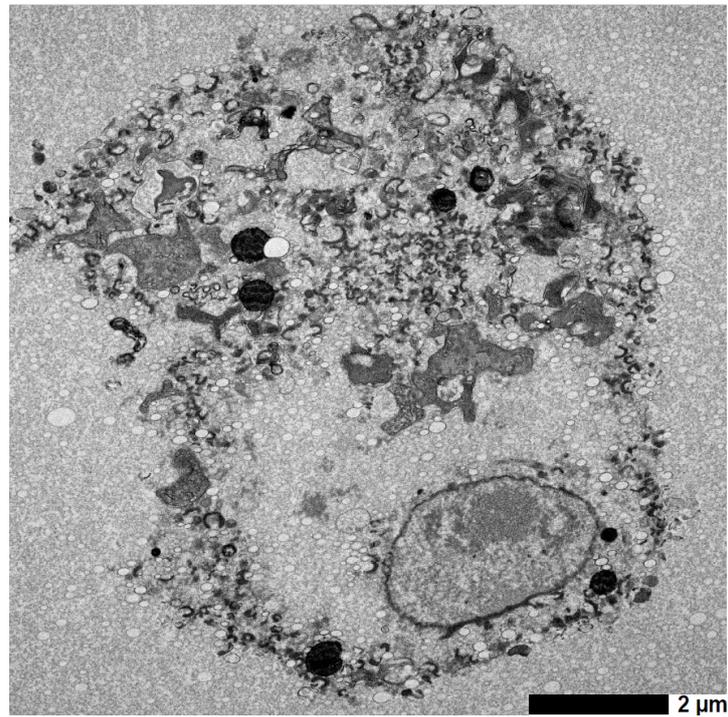


Abbildung 3.3.7 Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme einer abgestorbenen Macrophage. Sauerstoffträger in und um die Makrophage sind deutlich zu erkennen.

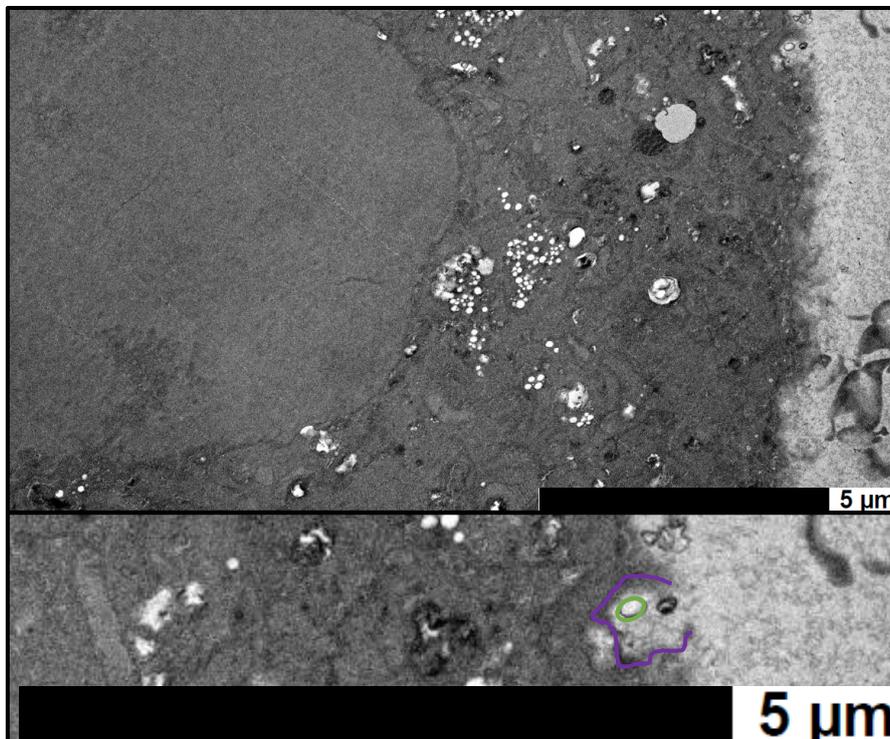


Abbildung 3.3.6: Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme einer proximalen Tubuluszelle (HK2) nach Inkubation mit Sauerstoffträgern. Der Sauerstoffträger (grün) befindet sich in einer Membraneinstülpung (violett)

Die biologische Interaktion der Sauerstoffträger wurde auch in HK2 Zellen untersucht. In Abbildung 3.3.8 **A** ist exemplarisch das Vorkommen intrazellulärer Sauerstoffträger dargestellt. **B** zeigt die Aufnahme mehrerer Sauerstoffträger (gelber Pfeil) zusammen mit dem umgebenden Medium, erkennbar an dem grauen Schleier aus Albuminmolekülen. **C** Zeigt eine direkte Berührung der Sauerstoffträger mit der Außenseite der Zellen. Im Inneren der Zelle ist eine Vakuole zu erkennen.

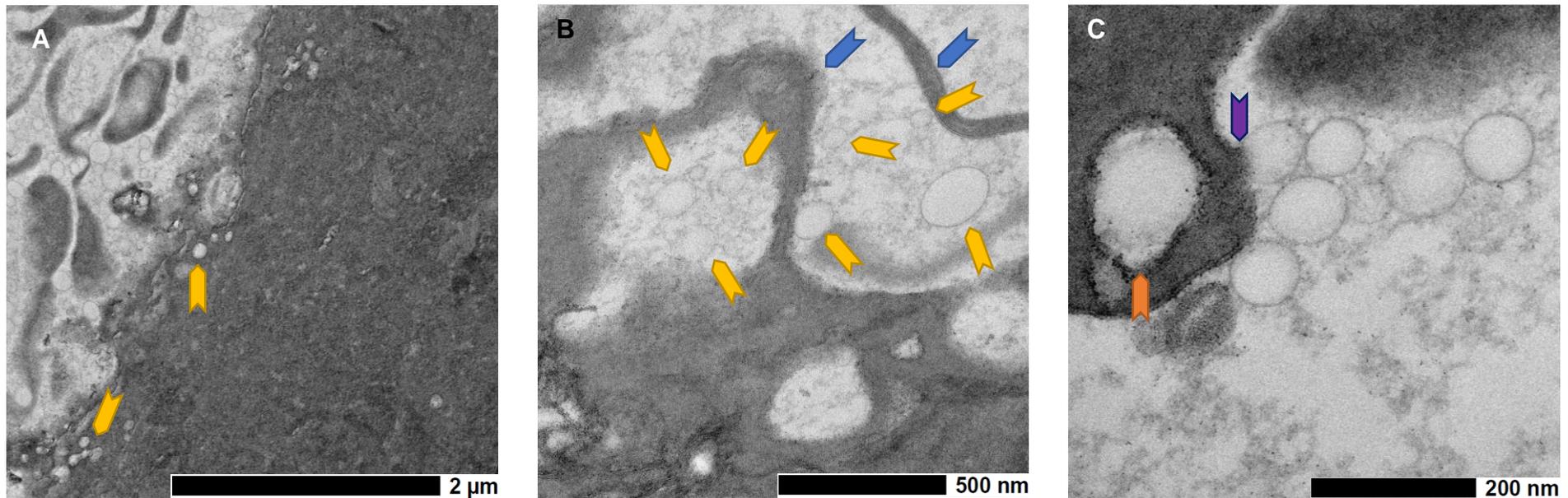


Abbildung 3.3.8 **A** HK2 (proximale Tubulusepithel-Krebszelllinie) mit inkorporierten Sauerstoffträgern (gelbe Pfeile). Extrazellulär ist eine hohe Anzahl an Sauerstoffträgern im Medium erkennbar.; **B** Sauerstoffträger (gelbe Pfeile) werden samt umgebendem Medium von der Zelle umschlossen (blaue Pfeile) und in das Zellinnere aufgenommen.; **C**: Sauerstoffträger kommen in direkten Kontakt mit der Außenseite der Zellen (orangener Pfeil); auf der Innenseite der Membran befindet sich ein Hohlraum

3.4. Einsatz unterschiedlicher Volumen-Fractionen an Sauerstoffträgern in der EVNP

Sauerstoffversorgung des Gewebes

Die Versorgung eines *ex vivo* perfundierten Organs mit ausreichenden Mengen an Sauerstoff bedarf bei physiologischen Flussraten der Oxygenierung der Perfusionslösung mit 100% Sauerstoff des Einsatzes von Sauerstoffträgern. In Abbildung 3.2.8 sind die Sauerstoffkapazitäten der Sauerstoffträger in Abhängigkeit von der verwendeten Volumen-Fraktion aufgetragen. Um daraus eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Gewebes abzuleiten, wurden WB Analysen von stabilisiertem HIF-1 α und HIF-2 α als Indikatoren für eine Hypoxie des Nierengewebes durchgeführt. Es wurden signifikant geringere Mengen an HIF-1 α in der Anwesenheit von 4 % ($p < 0,05$) und 8 % ($p < 0,01$) Sauerstoffträgern nachgewiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Sauerstoffträger. Hingegen reichte die Anwesenheit von 2 % Sauerstoffträgern nicht aus, um die Akkumulation des Faktors signifikant zu verhindern (Abbildung 3.4.1 A/C). Signifikant geringere Mengen an HIF-2 α wurden nur in der Anwesenheit von 8 % nachgewiesen, aber weder in der Anwesenheit von 2% noch in der Anwesenheit von 4% Sauerstoffträgern (Abbildung 3.4.1 B/C).

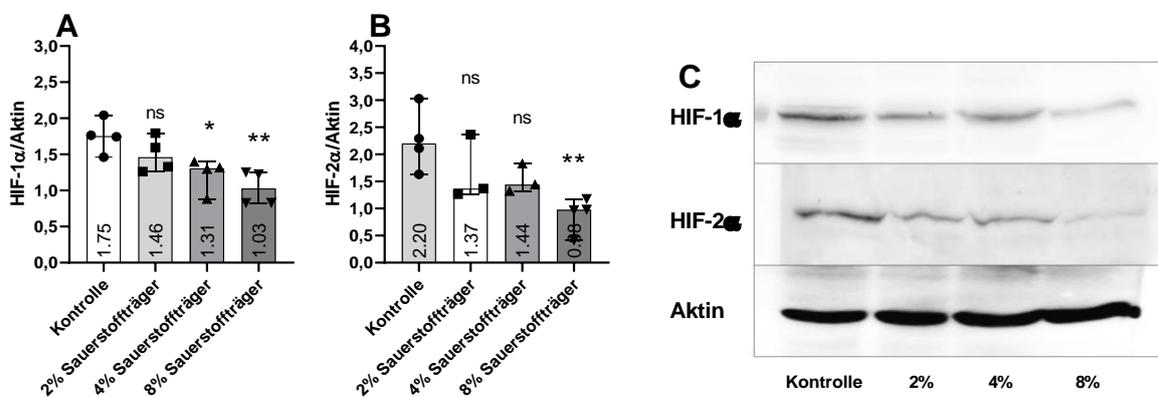


Abbildung 3.4.1: Quantifizierung der Akkumulation des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 alpha (HIF-1 α) und 2 alpha (HIF-2 α) in *ex vivo* perfundierten Nieren mittels WB Analyse. A: Eine signifikant geringere Menge von HIF-1 α wurde in der Anwesenheit von 4 % und 8 % Sauerstoffträgern beobachtet. B: Es wurden ausschließlich in Anwesenheit von 8 % Sauerstoffträgern signifikant geringere Mengen von HIF-2 α nachgewiesen. C: WB von HIF-1 α , HIF-2 α und Aktin als Ladekontrolle. Median \pm 95%CI, * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$, ns nicht signifikant Kruskal-Wallis Test Kontrolle als Vergleichsgruppe, gefolgt von einem Dunn's post-hoc Test. Die WB-Analyse wurde von Dr. Miriam Cantore durchgeführt.

Physiologische Funktion

Abbildung 3.4.3 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der GFR mit Hilfe der Messung von Inulin im Urin und in der Perfusionslösung. Sie ergab eine mit $300 \pm 36 \mu\text{L}/(\text{min}\cdot\text{g})$ signifikant höhere Rate in Anwesenheit von 4 % Sauerstoffträgern im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $156 \pm 37 \mu\text{L}/(\text{min}\cdot\text{g})$ über den gesamten Zeitraum des Versuchs. Die Anwesenheit von 2 % Sauerstoffträgern zeigte eine anfangs signifikant geringere GFR im Vergleich zur Kontrollgruppe, die sich über die Zeit steigerte, jedoch nicht die GFR der Kontrollgruppe überstieg. Die Anwesenheit von 8% Sauerstoffträgern verursachte eine Verringerung der GFR nach 60 Minuten und eine geringere GFR über den gesamten Zeitraum der Perfusion im Vergleich zur Kontrollgruppe.

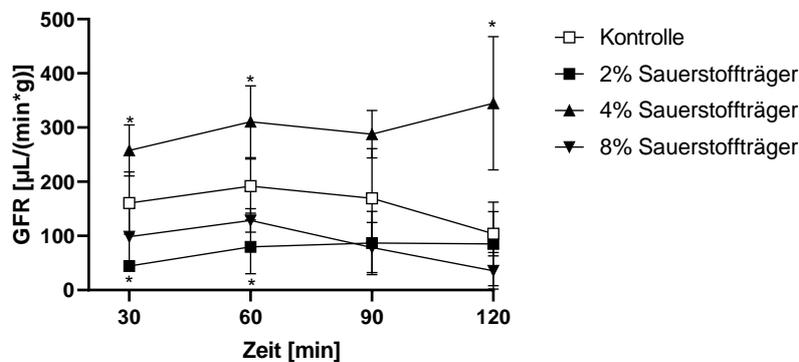


Abbildung 3.4.2: Die Anwesenheit von 4 % Sauerstoffträgern war in der Lage, die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) signifikant und substantiell gegenüber der Kontrollgruppe zu steigern. $n=6 \pm SD$, $*p<0,05$, two way ANOVA gegen Kontrolle, gefolgt von Dunnett's post-hoc Test.

Zellschäden innerhalb der Niere

AST-Aktivität in Perfusionslösung und Urin

Die Aktivität der Aspartat-Aminotransferase (AST) wurde durch Substratumsatz in der Perfusionslösung und Urin der *ex vivo* perfundierten Nieren nach 120 min bestimmt. In den Proben der Gruppe, die mit 4 % Sauerstoffträgern perfundiert wurde, zeigt sich in beiden Flüssigkeiten eine signifikant geringere Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Anwesenheit von 2 % und 8 % Sauerstoffträgern führte zu keiner geringeren AST Aktivität, weder in der Perfusionslösung noch im Urin (Abbildung 3.4.3).

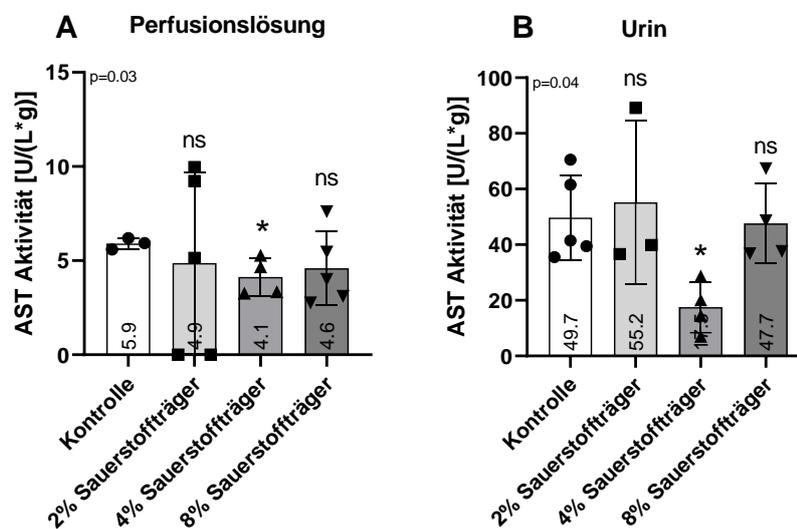


Abbildung 3.4.3: AST-Aktivität, wurde sowohl in der Perfusionslösung (A) als auch im Urin (B) bestimmt. Die Anwesenheit von 4 % Sauerstoffträgern, nicht aber die Anwesenheit von 2 % und 8 % Sauerstoffträgern, war in der Lage, eine signifikant geringere AST-Aktivität in beiden Flüssigkeiten zu erzeugen. Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$, ns nicht signifikant one way ANOVA gegen Kontrolle, gefolgt von Dunnett's post hoc Test.

TUNEL-Assay

Mit Hilfe der TUNEL-Methode wurden abgestorbene Zellen sowohl in der Nierenrinde als auch im Nierenmark markiert.

Abbildung 3.4.4 **A** zeigt die aus 5 Gesichtsfeldern pro Gewebedünnschnitt gemittelte Zahl toter Zellen in der Nierenrinde (A) und dem Nierenmark (B). Die Zählung abgestorbener Zellen ergab in Anwesenheit von 4% Sauerstoffträgern sowohl in der Nierenrinde als auch im Nierenmark nur 35 TUNEL-positive Zellen, wohingegen alle anderen Gruppen substantiell mehr TUNEL-positive Zellen aufwiesen. Die Anwesenheit von 2% und 8 % Sauerstoffträgern erhöhte die Anzahl TUNEL-positiver Zellen sowohl in der Nierenrinde als auch im Nierenmark. Zu vermerken ist, dass in der Kontrollgruppe sowie in Anwesenheit von 2 % und 8 % Sauerstoffträgern das Nierenmark mehr TUNEL positive Zellen aufwies als die Nierenrinde.

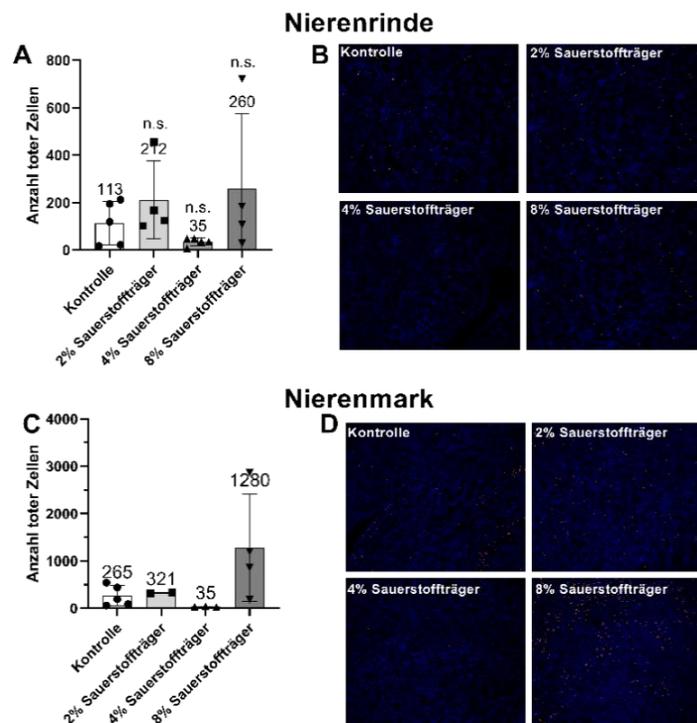


Abbildung 3.4.4: Die Markierung fragmentierter DNA mittels TUNEL-Methode zeigte sowohl in Zellen der Nierenrinde (A) als auch im Nierenmark (C) den geringsten Zelltod in der Anwesenheit von 4% Sauerstoffträgern. Die Anwesenheit von 2 % und 8 % Sauerstoffträgern verursachte in beiden Organabschnitten eine höhere Anzahl an TUNEL-positiven Zellen (B, orange gefärbt). Die Anzahl an positiven Zellen in der Kontrollgruppe in Anwesenheit von 2% und in Anwesenheit von 8% Sauerstoffträgern liegt im Nierenmark höher als in der Nierenrinde. $n=5$ Mittelwert \pm SD, nicht signifikant, one way ANOVA, gefolgt von Dunnett's-post hoc Test

TBARS wurden im Urin quantifiziert und zeigten signifikant und substantiell erhöhte Werte in Anwesenheit von 2 % und 8 % Sauerstoffträgern (Abbildung 3.4.5). Die Kontrollgruppe unterschied sich in den Werten nicht von der 4 % Gruppe.

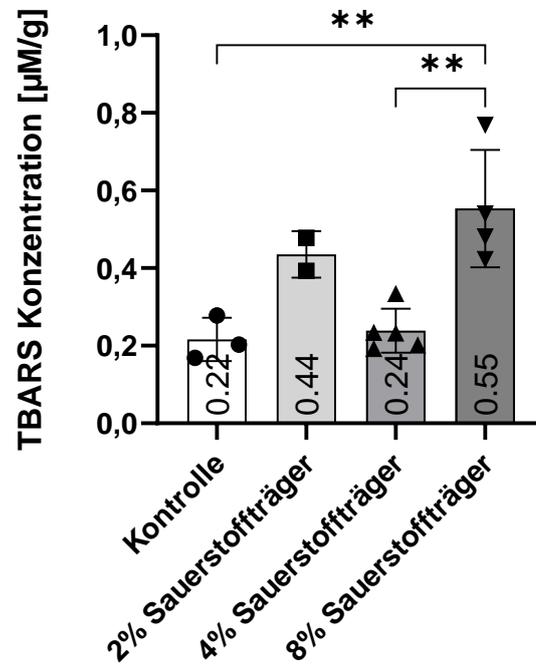


Abbildung 3.4.5: Die Konzentration Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen (TBARS) im Urin war signifikant höher in der Anwesenheit von 2 % und 8 % Sauerstoffträgern. Die Kontrolle und die 4% Gruppe zeigten vergleichbar niedrige Konzentrationen. Mittelwert \pm SD, * $p < 0.001$ one way ANOVA multiple comparison, gefolgt von Dunnett's post-hoc Test.

3.5. Funktionalitätstest von 4 % Sauerstoffträgern in der EVNP gegen Erythrozyten

Zellschäden innerhalb der Niere

Rattennieren wurden sechs Stunden mit einem komplexen Medium perfundiert, das entweder Erythrozyten oder Sauerstoffträger enthielt. Um die Zellschädigung im Verlauf der Perfusion beurteilen zu können, wurde in der Perfusionslösung die Aktivität von LDH und von AST bestimmt. Beide Parameter steigen in den Nieren, die mit Erythrozyten perfundiert wurden, deutlich an, während die Nieren, die mit Sauerstoffträgern perfundiert wurden, nur einen Anstieg von AST im Perfusionsmedium zeigen. (Abbildung 3.5.1)

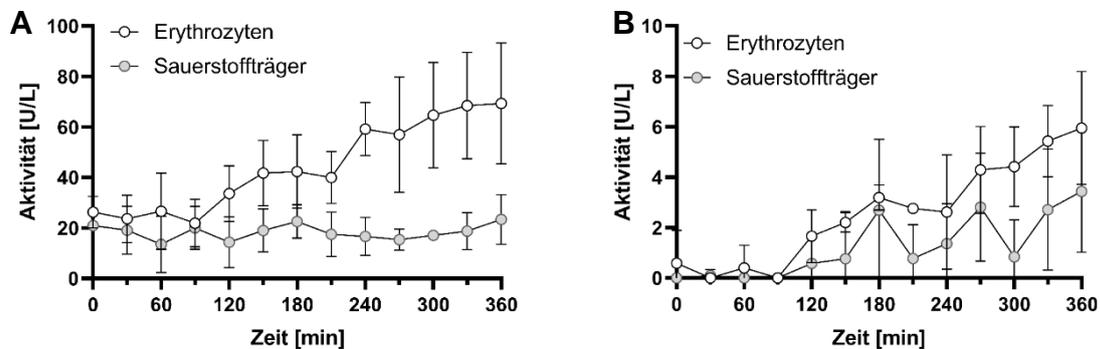


Abbildung 3.5.1: **A:** LDH-Aktivität im zeitlichen Verlauf der Perfusion. Mittelwert \pm SD, $n=4$; **B:** AST-Aktivität im zeitlichen Verlauf der Perfusion. Mittelwert \pm SD, $n=4$

Histologie

Für eine histologische Auswertung wurden die perfundierten Nieren mit Hilfe der PAS-Färbung gefärbt. Die Nieren wurden auf Basis ihrer histologischen Eigenschaften in Nierenrinde, inneres Nierenmark und äußeres Nierenmark unterteilt und befundet. Dabei wurde der prozentuale Anteil nekrotischer oder apoptotischer Tubuli bestimmt. In der Nierenrinde wurden die Glomeruli begutachtet und deren Kollaps als Zeichen einer Schädigung festgehalten (Abbildung 3.5.2). Es wurden tendenziell weniger kollabierte Glomeruli in der Erythrozyten-Gruppe beobachtet (**A**) und tendenziell weniger Nekrosen im inneren Nierenmark in der Sauerstoffträger-Gruppe (**D**). Die Daten aus den Abbildungsteilen **B-D** wurden in **E** zusammengetragen. Es wurden generell mehr Nekrosen im äußeren Nierenmark beobachtet als in den anderen Kompartimenten. Nur in etwa einem Drittel der Nieren der Sauerstoffträger-Gruppe konnte noch Glykogen nachgewiesen werden, wohingegen es in allen Nieren der Erythrozyten-Gruppe möglich war.

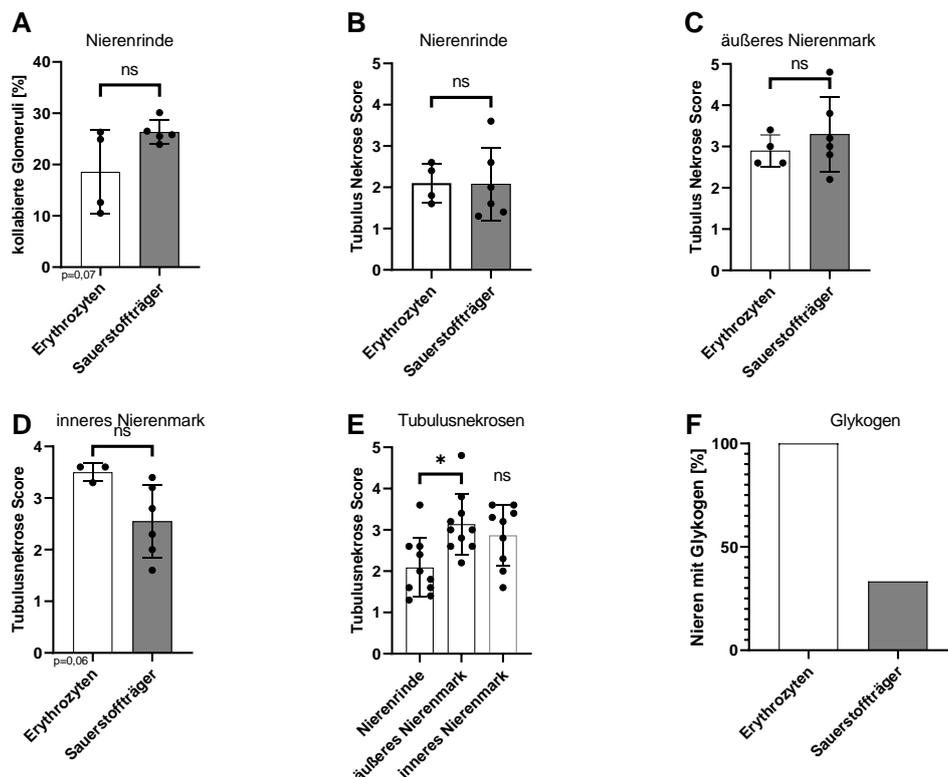


Abbildung 3.5.2: Histologische Befundung der Nieren, die 6 Stunden mit Erythrozyten bzw. Sauerstoffträgern perfundiert wurden. Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$, ns = nicht signifikant, one way ANOVA, gefolgt von Dunnett's post-hoc Test

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, eine zellfreie Perfusionslösung für den klinischen Einsatz bei der normothermen *ex vivo* Perfusion von Nieren zu entwickeln. Die zentrale Aufgabe dieser Arbeit bezog sich darauf, einen albuminstabilisierten Sauerstoffträger auf Perfluorocarbonbasis mit Hilfe von Hochdruck-Homogenisierung herzustellen, der auf der einen Seite in der Lage ist, das Organ zufriedenstellend mit Sauerstoff zu versorgen, und auf der anderen Seite eine klinisch relevante Haltbarkeit erreicht. Hierfür wurden im ersten Schritt Untersuchungen angestellt, die das Verhalten der entstehenden Partikel während der Hochdruck-Homogenisierung aufklären. Die gewonnenen Informationen dienten dazu, den optimalen Herstellungsprozess zu entwickeln. Der auf diese Weise hergestellte Sauerstoffträger wurde in Zusammenarbeit mit der SolidChem GmbH aus Bochum, der Physikalischen Chemie der Universität Potsdam, dem Institut für Biomolekulare NMR-Spektroskopie der Ruhr-Universität Bochum und der Pulveranalyse GbR in Köln detailliert charakterisiert.

Der Sauerstoffträger wurde auf seine Anwendbarkeit in der *ex vivo* perfundierten Niere getestet, wobei der Hauptfokus auf der optimalen Volumen-Fraktion lag, um das Organ im physiologischen Zustand zu erhalten. Hierfür wurde über einen kurzen Zeitraum ein sehr simples Mangelmedium eingesetzt, um ausschließlich die Wirkung der Sauerstoffträger identifizieren zu können.

Anschließende Untersuchungen, in denen die Funktionalität der Sauerstoffträger gegen den physiologischen Sauerstoffträger, die Erythrozyten, getestet wurde, wurden mit einem sehr komplexen Medium durchgeführt.

4.1. Herstellungsprozess der Sauerstoffträger

Für die Herstellung der Sauerstoffträger wurde die Hochdruck-Homogenisierung verwendet. Die dabei auftretenden Prozesse sind in Abschnitt 1.8 „Hochdruck-Homogenisierung“ beschrieben und in Abbildung 1.8.1 dargestellt.

Einfluss der Albuminkonzentration in der Stammlösung

Während des Entstehens von Emulsionstropfen kommt es zu einem Ungleichgewicht zweier Kräfte. Zum einen zerreißen die Scherkräfte große Partikel aus PFD, zum anderen versuchen die neu entstandenen Partikel, direkt wieder zu fusionieren (Rekoaleszenz).¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Genauer betrachtet, kommt es bei der Entstehung kleinerer Sauerstoffträger aus einem größeren Sauerstoffträger zu einem Albumindichtegradienten entlang der Oberfläche und aufgrund eines veränderten Verhältnisses zwischen dem Volumen und der Oberfläche des Partikels zu Besetzungslücken. Diese Lücken verringern die repulsiven Kräfte zweier Partikel und können zu einer direkten Rekoaleszenz führen.⁸⁶ Die Schließung der Lücken hängt zum einen von den Fließeigenschaften des Albumins entlang der Grenzfläche ab und wird durch die Marangoni-Konvektion beschrieben. Die treibende Kraft von der Verschiebung des Albumins ist der Grenzflächenspannungsunterschied zwischen besetzten und unbesetzten Besetzungslücken. Dem wirkt die Trägheit des zu bewegendes Teilchens entgegen und verlangsamt die Verschiebung. Zum anderen muss gelöstes Albumin aus der Umgebung nachrücken. Eine weitere Quelle für Albumin, die die Besetzungslücken schließt, ist das umgebende Albumin, wobei die Diffusionsgeschwindigkeit des Albumins aus der Lösung an die Grenzfläche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.^{93,147-149}

Für die Herstellung der Sauerstoffträger wurde eine Konzentration von 50 g/L Albumin eingesetzt, was sehr hoch ist im Vergleich zur angegebenen Literatur, in der meist wenige mg/L eingesetzt wurden.¹⁴⁷⁻¹⁵² Diese hohen Konzentrationen haben eine biologische Funktion im späteren Einsatz, sie sollen aber auch helfen die Diffusionsstrecke im Herstellungsprozess zu minimieren. In Abbildung 3.1.1 ist die durchschnittliche Partikelgröße in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration, die im Herstellungsprozess eingesetzt wurde, bei sonst gleichen Herstellungsbedingungen dargestellt. Die aus der gesteigerten Konzentration resultierende verringerte

Diffusionsstrecke zeigt eine signifikant beschleunigte Absättigung der Besetzungslücken und eine daraus resultierende kleinere Partikelgröße bei steigender Albuminkonzentration (Abbildung 3.1.1). D.h. die Besetzung der Besetzungslücken im Entstehungsprozess der Sauerstoffträger ist in erster Linie von der Diffusion des Albumins aus dem umgebenden Medium abhängig, und die Marangoni-Konvektion an der Grenzschicht spielt scheinbar nur eine untergeordnete Rolle. Das kann an der in Abbildung 3.2.6 gezeigten Immobilisierung des Albumins an der Grenzfläche liegen. Trotz der sehr hohen Albuminkonzentration scheint die Diffusionsstrecke noch immer zu lang zu sein, um bei niedrigen Temperaturen eine maximale Besetzungsgeschwindigkeit der Besetzungslücken zu gewährleisten.

Um also einer direkten Rekoaleszenz vorzubeugen, muss die Diffusionsstrecke noch weiter verkürzt und/oder die Diffusionsgeschwindigkeit erhöht werden.

Wird größerer Druck angewendet um die Sauerstoffträger herzustellen, kommt es zu einer größeren Fließgeschwindigkeit und, daraus resultierend, zu größeren Scherkräften und mehr Kollisionen (Abbildung 1.8.1 **B+C**). In Abbildung 3.1.2 ist der Einfluss des eingesetzten Drucks auf die durchschnittliche Partikelgröße in Abhängigkeit vom Lagerungszeitraum dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein größerer Druck auf Grund der gesteigerten Geschwindigkeit innerhalb der Mikrokanäle und den daraus resultierenden größeren Verwirbelungen und Scherkräften zu kleineren Partikelgrößen bereits nach einer Passage durch das Gerät führt. Während der Lagerung bei 4 °C wachsen die Sauerstoffträger in den ersten 5 Tagen schnell und in den folgenden 18 Tagen langsamer, bis sich die Partikelgrößen aus allen drei angewandten Drücken angleichen.

Einfluss des Drucks, der Temperatur und der Passagenzahl auf die Albuminhülle

Beim Einsatz höherer Drücke werden die Partikel bei Eintritt in die Mikrokanäle reversibel komprimiert (Abbildung 1.8.1 **A**) und die an der Grenzfläche adhärennten Albuminmoleküle bieten weniger Raum zur Anlagerung weiterer Proteine.

Wie in Abbildung 3.1.4 zu sehen ist, werden trotz größerer Oberfläche der entstehenden Sauerstoffträger bei höheren Drücken geringere Mengen an Albumin zur Herstellung der Sauerstoffträger verbraucht. Das könnte der Grund sein, weshalb die entstandenen Partikel eine verringerte Lagerstabilität zeigen. Wiederholt man den Prozess nun bei geringerer Temperatur, kommt es zu den in Abbildung 3.1.3

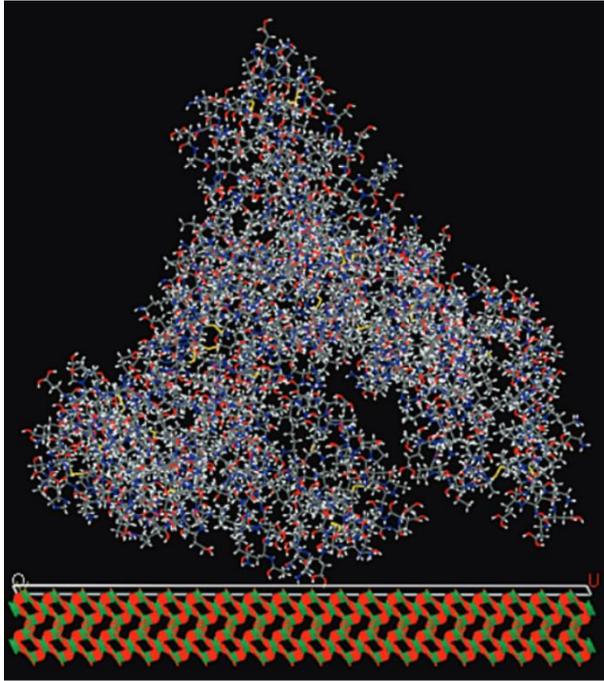


Abbildung 4.1.1: Optimierter Komplex von BSA auf einer hydrophoben GeO_2 Oberfläche. Die Bindung an die Oberfläche geschieht bei irreversibler Bindung über Methylgruppen von α -Helixes der Subdomänen I und II. Diese Domänen sind bevorzugte Ligandenbindestellen. (Jeyachandran et al. *Langmuir* (2009); Rezwan et al. *Langmuir* (2004); He et al. *Nature* (1992))

dargestellten Beobachtungen. Die Steigerung der Passagen erzeugt unmittelbar nach Herstellung der Partikel signifikant kleinere Sauerstoffträger, aber sie sind instabiler und wachsen erheblich schneller als die Sauerstoffträger, die mit nur einer Passage hergestellt wurden. Nach 8 Tagen übersteigen sie deren Größe. Dieses Wachstumsverhalten ist möglicherweise auf die Temperaturen während der Herstellung zurückzuführen. Die Präemulsion wurde vor dem Befüllen des Homogenisators auf Eis gekühlt, um einer Denaturierung des Albumins durch die im Prozess auftretende Erhitzung der Suspension vorzubeugen. Die stete Abkühlung bis nah an den Gefrierpunkt sorgt dafür, dass sich an den Herstellungsbedingungen während mehrerer Passagen nichts ändert. Die Hochdruck-Homogenisierung erzeugt im Mittel immer kleinere Partikel, die mit der gleichen Trägheit besetzt werden und zusätzlich durch die steigende Oberflächenkrümmung der Partikel schwieriger zu besetzen sind. Die Beladung der Partikel mit Albumin stagniert zu einem gewissen Grad, und die wiederholte Anwendung des Hochdrucks sorgt dadurch nicht für eine stabilere Grenzschicht.^{149,151} Des Weiteren ist eine wichtige Eigenschaft des Albumins, dass es in seiner Form anisotrop ist.¹⁵⁰ Es existiert eine hydrophile Seite und eine Seite, die sich der wässrigen Phase zu entziehen versucht. Dadurch kommt es zu einer favorisierten und einer weniger favorisierten Besetzung an der Außenseite des Sauerstoffträgers. Der favorisierte Zustand bedeutet, dass die Albumin-Subdomänen I und II die Grenzfläche berühren, während die Subdomäne III Richtung wässriger Phase zeigt (Abbildung 4.1.1). Durch diese Ausrichtung wird die Enthalpie des gesamten Systems soweit gesenkt, dass die Albuminmoleküle irreversibel an die

Grenzfläche gebunden sind und diese stabilisieren und somit den favorisierten Zustand des Albumins einnehmen. Ist das Albumin an der Grenzfläche anders orientiert, handelt es sich um einen weniger favorisierten Zustand, der die Enthalpie nicht weit genug senkt und dadurch reversibel ist. Dieser reversible Zustand kann nicht durch Rotieren im adhärten Zustand in den favorisierten Zustand überführt werden. Es muss also zu einer Desorption des Albumins mit direkter Readsorption an der gleichen Besetzungslücke kommen. Die Geschwindigkeit dieses Prozesses ist invers proportional zur Wurzel der frei zu besetzenden Fläche am Partikel, die mit sinkender Oberfläche des jeweiligen Partikels abnimmt.¹⁵² Das bedeutet, im Falle unseres Experiments könnten die niedrigen Temperaturen und wiederholte Homogenisierung dazu führen, dass die Albuminmoleküle nicht frei de- und readsorbieren können. Dadurch könnte es aufgrund der sinkenden zu besetzenden freien Fläche (durch die Partikelverkleinerung) dazu kommen, dass die Reorganisation der reversibel adhärten Albuminmoleküle erschwert wird. Diese fehlende Reorganisation könnte die in Abbildung 3.1.3 gezeigte Instabilität der Sauerstoffträger erklären.

Sind die Albuminmoleküle zu einem großen Teil reversibel an der Oberfläche gebunden, können sie spontan nach dem Herstellungsprozess resorbieren und die instantane Koaleszenz ermöglichen, die eine breite Partikelgrößenverteilung erzeugt. Eine breite Partikelgrößenverteilung spiegelt sich gemäß der Lorentz-Mie-Theorie in reduzierter linearer Transmission wider, die sich zum einen durch eine deutliche Trübung der Suspensionen ausdrückt (Abbildung 3.1.5) und zum anderen in einem steigenden Polidispersionsindex (Abbildung 3.1.6).¹⁵³

Zusammengefasst, führen mehrfache Passagen der Suspension durch den Hochdruck-Homogenisator bei niedrigen Temperaturen direkt nach der Herstellung zu einer kleineren Partikelgröße, jedoch aufgrund einer suboptimalen Oberflächenbesetzung des Sauerstoffträgers mit Albumin nach einigen Tagen der Lagerung zu größeren Partikeln im Vergleich mit Partikeln nach nur einer Passage.

4.2. Charakterisierung der eingesetzten Sauerstoffträger

Verdunstung

Eine einzige Passage durch den Hochdruck-Homogenisator bei 0-4 °C wurde aufgrund der in 4.1 diskutierten Einflüsse auf die Herstellung einer Suspension der Sauerstoffträger für alle weiteren Anwendungen als Standard definiert und bei abweichender Behandlung gekennzeichnet.

Die dabei entstandene Suspension enthält mindestens zu einem gewissen Teil Partikel, die unter die Definition von Nanopartikeln fallen. Solche Partikel sind somit in ihren physikalischen, chemischen und auch biologischen Eigenschaften nicht mehr nur noch abhängig von dem Material, aus dem sie bestehen, sondern die Eigenschaften eines Materials verändern sich, wenn es nanopartikulär vorliegt.^{128,129} Für das in den Sauerstoffträgern verwendete PFD bedeutet diese Veränderung, dass wir es nicht mehr als grundsätzlich chemisch inert ansehen können.

Reine Perfluorcarbone wechseln ihren Aggregatzustand aufgrund ihres hohen Dampfdrucks innerhalb des Blutgefäßsystems zu Dampf und führen zu Embolien. Der Sauerstoffträger in seiner partikulären Form zeigt eine stark verminderte Verdunstung und ermöglicht damit erst den Einsatz in einem normothermen System (Abbildung 3.2.1). Zur Erklärung dieser verminderten Verdunstung gibt es zwei Theorien. Gemäß der ersten Theorie führt ein erhöhter Druck (Laplace Druck) innerhalb des Partikels zu einer Verschiebung des Phasendiagramms.^{154,155} Die andere Theorie geht von homogenen Kristallisationspunkten aus, die dafür sorgen, dass Nanotropfen erhöhte Siedepunkte besitzen.^{76,156}

Partikelgrößenverteilung

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass es durch den Einsatz von Sauerstoffträgern in nanopartikulärer Form zu einer Interaktion mit den zellulären und gelösten Bestandteilen des Bluts kommt, wodurch die genaue Charakterisierung der Größe, Morphologie, Oberflächenladung und Oberflächenbeschaffenheit notwendig wird.¹⁵⁷

Das Mischen zweier unlöslicher Flüssigkeiten erzeugt sphärische Emulsionströpfchen, die mit einem Emulgator ummantelt sind.

Im Falle der untersuchten Sauerstoffträger handelt es sich um Albumin als Emulgator, das sich um einen PFD-Tropfen legt. Um diese Annahme zu verifizieren, wurden

Proben für eine Kryo-TEM-Aufnahme, wie in Abschnitt 2.4. beschrieben, gereinigt. Der Vorteil einer Kryo-TEM liegt darin, dass die Probe keinerlei artifizierlicher Fixierung oder sonstiger Behandlung unterzogen werden muss. Die in Abbildung 3.2.2 gezeigten Sauerstoffträger wurden durch das Plunge-Verfahren schockgefroren. Dabei wird ein Tropfen der Suspension mit einer Geschwindigkeit von 10.000 K/s abgekühlt, damit der tatsächliche Zustand der Sauerstoffträger, wie sie in der Suspension vorliegen, aufgenommen werden kann.¹⁵⁸ Die kugelförmigen Sauerstoffträger sind fein verteilt und zeigen nur eine geringe Neigung zur Agglomeration. Auf jedem der Bilder ist eine feine weiße Linie zu erkennen, die sowohl auf eine ausreichende Schichtdicke des Albumins schließen lässt als auch darauf, dass ein Zetapotential von -21 mV ausreicht, um repulsive Kräfte zu bewirken, die eine Koaleszenz verhindern.⁷⁹ Das Zetapotential von -21 mV ist jedoch erheblich geringer als bei vergleichbaren Suspensionen mit Grenzflächen an lipophilen Flüssigkeiten.¹⁵⁹ Besonders hervorzuheben ist das leichte Eindringen der Sauerstoffträger bei Annäherung an einen weiteren Sauerstoffträger, was auf eine weiche und leicht verformbare Natur schließen lässt, die beim Durchfließen von kleinen Kapillarschlingen, wie sie im Glomerulus der Niere vorkommen, von Vorteil ist.

Die aus diesen Aufnahmen abgelesenen Größenverteilungen liegen im sub-Mikrometer Bereich, und zusammen mit der sphärischen Form der Partikel wurde zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung zunächst eine Verifizierung der Messungen mit der DLS als komplementierende Methode in Betracht gezogen.¹⁶⁰

Um mit der DLS eine möglichst akkurate Korrelation zwischen der Lichtstreuung und der Partikelgrößenverteilung zu erreichen, müssen vorab die Lichtbrechung des Partikels und die Viskosität der Suspension für die Hinterlegung in der Gerätesoftware bestimmt werden. Der eingesetzte monochromatische Laser strahlt mit einer Wellenlänge von 780 nm. Der von Anne Hartwig im innoFSPEC bestimmte Brechungsindex der Sauerstoffträger für diese Wellenlänge lag bei 1,328; das umgebende Medium besitzt einen Brechungsindex von 1,329. Die Brechungsindizes liegen zu nah beieinander, um sie für die DLS verwenden zu können. Deshalb wurde ein Brechungsindex von 1,30 eingesetzt. Daraus ist abzulesen, dass die Messung der Partikelgrößenverteilung mit der DLS mit einem großen Fehler behaftet ist. Die mittels DLS gemessenen Partikelgrößenverteilungen sind beispielhaft in Abbildung 3.2.3 dargestellt. Es zeigten sich in der DLS meist zwei Populationen, eine kleine Population

mit einer durchschnittlichen Größe von ca. 50 nm und eine große Population mit einer durchschnittlichen Partikelgröße zwischen 220 nm und 230 nm. Da die Aufnahmen des Kryo-TEMs für ein zufriedenstellendes Histogramm nicht ausreichen und uns diese Technologie nicht weiter zu Verfügung steht, wurden zur Kontrolle der DLS-Messungen, Messungen der statischen Lichtstreuung von Dr. Sven Haferkamp in der SOLIDCHEM GmbH in Bochum durchgeführt (Abbildung 3.2.4). In den Messungen zeigten sich bei der Betrachtung der Strahlungsintensität (Abbildung 3.2.4 **A**) zwei Populationen, darunter eine Population mit Sauerstoffträgern, deren Größe zwischen 1- 40 μm liegt. Auch wenn die Population so wenige Partikel enthält, dass sie in Abbildung 3.2.4 **B** nicht dargestellt werden können, sollten Sauerstoffträger dieser Größe unter dem Mikroskop erkennbar sein. Lichtmikroskopische Aufnahmen, wie sie in Abbildung 3.2.5 gezeigt sind, belegen eindeutig, dass die DLS nicht in der Lage ist, die gesamte Partikelgrößenverteilung darzustellen. Um eine verbesserte Auflösung zu erlangen, wurde eine dünne Schicht der Probe mit blauen Lichtblitzen im 90° Winkel beleuchtet. Blaues Licht ist kurzwelliger und führt, wie in Abschnitt 1.11 beschrieben, zu einer verbesserten Auflösung. Das seitliche Einstrahlen in die Probe sorgt für einen Schattenwurf der Partikel und dadurch zu einer besseren Kontrastierung.^{161,162} Diese Methode ist sehr aufwendig und kann von unserem Institut nicht standardisiert eingesetzt werden, obwohl sie die beste lichtmikroskopische Erweiterung der Analytik darstellt. Für ein belastbares Histogramm einer frisch hergestellten Suspension konnten daher zu wenige Daten gesammelt werden. Die Rückschlüsse aus den gewonnen Bildern sind, dass die Sauerstoffträger nicht größer als 1200 nm zu sein scheinen und dass die unterschiedliche Größenverteilung der Sauerstoffträger in den anderen mikroskopischen Aufnahmen auf die Schwierigkeit zurückzuführen ist, die Probe auf Grund ihrer schwachen Lichtbrechung akkurat zu fokussieren. Die SLS scheint auf Grund der schwachen Lichtbrechung der Sauerstoffträger auch fehlerhafte Ergebnisse im Bereich oberhalb eines Mikrometers zu generieren. Alle Methoden zusammengenommen, ist eine eindeutige Charakterisierung des gesamten Größenbereichs nicht ohne Fehlerbehaftung möglich. Eine Mischung aus Methoden mit überschneidender Größenpräferenz scheint notwendig zu sein.

Oberflächenbeschaffenheit

Eine weitere wichtige Information, um die biologische Aktivität der Sauerstoffträger zu charakterisieren, ist ihre Oberflächenbeschaffenheit. Abhängig von der Oberfläche können Proteine angelagert werden oder sich der intrazelluläre Verdau der Sauerstoffträger und damit die Wirkdauer verlängern. Zur Beantwortung der Frage, wie fest das Albumin an der Grenzfläche gebunden ist, wurden von Dr. Oliver Arnolds am Institut für Biomolekulare NMR $^1\text{H-NMR}$ -Spektren aufgenommen. Hierfür wurden die Sauerstoffträger vorab von allem überschüssigen Albumin befreit. In Abbildung 3.2.6 **A** ist das Spektrum von ungereinigten Sauerstoffträgern zu sehen, in denen Albumin in Lösung frei schwingen kann und spezifische Banden für das Protein erkennbar sind. In Abbildung 3.2.6 **B** wurde alles überschüssige Albumin entfernt, und nur das als Hüllmaterial an der Oberfläche der Sauerstoffträger befindliche Albumin war noch in der Suspension erhalten. Die Albumin-spezifischen Banden sind nicht mehr zu erkennen. Die Albuminmoleküle sind an der Grenzfläche in ihrer Mobilität stark eingeschränkt. Sie verlieren ihre Fähigkeit, frei zu schwingen, und schwingen als ein großer Komplex aus vielen Albuminmolekülen, deren Schwingungen nicht mit einem $^1\text{H-NMR}$ detektiert werden können.¹⁶³ Es kann daher davon ausgegangen werden, dass keine dynamische Interaktion der Albumine mit dem Medium stattfindet und dass Proteine, die dort gebunden sind, nicht ohne weitere Einwirkung wieder freigesetzt werden und vermutlich sogar in ihrer Funktion eingeschränkt sind. Abbildung 3.2.6 **C** und **D** zeigen $^1\text{H-NMR}$ Spektren von Sauerstoffträgersuspensionen, die über einen zeitlichen Verlauf entweder in einem geschlossenen oder in einem offenen Gefäß bei 4 °C gelagert wurden. Das Auftreten von Albumin-spezifischen Banden kann bei der offen gelagerten Probe nach 3 Tagen beobachtet werden, wobei in den Spektren der geschlossenen Probe auch nach 8 Tagen kaum ein Signal erkennbar ist. Das bedeutet, dass die Sauerstoffträger nach standardisierter Herstellung nicht zur Albumin-Desorption neigen, solange die Verdunstung als treibende Kraft verhindert wird. Diese Eigenschaft spiegelt sich auch in der in Abbildung 3.1.3 gezeigten Stabilität wider. Dass die kleineren Sauerstoffträger, die mehr Passagen durch den Homogenisator erfahren haben, länger wachsen und größer werden, kann an der stärker gekrümmten Oberfläche liegen, die vielleicht nicht in ausreichendem Maße in der Lage ist, reversibel gebundene Albuminmoleküle zu halten (siehe auch Abschnitt 4.1). Die Hülle der Sauerstoffträger dünnt dadurch

vielleicht stärker aus, wodurch die Sauerstoffträger instabiler werden, was sich in verstärktem Wachstum ausdrückt.

Ein damit zusammenhängender Aspekt ist die Schichtdicke des Albumins. In den von Dr. Karl-Heinz Schäffner mittels Plunge-Freeze angefertigten Kryo-Raster-elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde der Sauerstoffträger aus technischen Gründen mit einer stromleitenden Goldschicht überzogen und das umgebende Trägermedium bei -100°C im Hochvakuum sublimiert. Wie in Abbildung 3.2.7 gezeigt, scheint das Perfluordecalin im Inneren der Sauerstoffträger dem geringen Druck nicht standzuhalten und explosionsartig durch die Albuminschicht zu platzen. Das ermöglichte, unter folgenden Annahmen die Schichtdicke an den Bruchstellen zu bestimmen: 1. Die Goldschicht beträgt ca. 10 nm und 2. Die Albuminschicht an den Bruchkanten klappt zu einer dualen Lage um. Die Dicke der „Rolle“ betrug an den gemessenen Bruchstellen zwischen 20 und 30 nm. Abzüglich einer 10 nm dicken Goldschicht lassen diese Messungen eine einfache bis doppelte Schichtung des Albumins an der Außenseite des Sauerstoffträgers vermuten.⁸⁹ Damit ist das Verhalten des Albumins an der PFD-Wasser Grenzfläche mit dem an Öl-Wasser Grenzflächen vergleichbar.⁸⁹

Sauerstoffkapazität der Sauerstoffträger

Die wichtigste Eigenschaft des Sauerstoffträgers ist zweifellos die Kapazität, Sauerstoff zu transportieren. Hierfür wurden die Sauerstoffträger in Volumen-Fractionen von 2 %, 4 % und 8 % verdünnt und mit 100 % medizinischem Sauerstoff in einem Kugelrohxygenator (wie er auch in dem Perfusionsaufbau der EVNP in Abbildung 2.10.1 gezeigt wird) oxygeniert. Die Menge an Sauerstoff, die von den Sauerstoffträgern aufgenommen wurde, wurde mittels eines Oroboros® Oxygraph 2K quantifiziert. Die Messungen ergaben gegenüber der Kontrolle ohne Sauerstoffträger eine Steigerung von ungefähr 2-2,5 mL O₂ pro L Suspension pro 1 %iger Steigerung der Sauerstoffträgerkonzentration bei Atmosphärendruck. Eine Aussage, welche Sauerstoffträgerkonzentration für den Einsatz in der EVNP geeignet ist, kann aus dieser Messung nicht abgeleitet werden, aber Messungen von z.B. Wrobeln et al. identifizierten eine 4 vol-%-haltige PFC-Kapselsuspension als optimal für die Anwendung im Langendorff-Herz-Modell.⁹⁷ Für die Anwendung in der EVNP der Niere wurden die zellulären Sauerstoffsensoren, die Hypoxie-induzierbaren Faktoren 1 α und

2 α in *ex vivo* perfundierten Nieren untersucht (Abbildung 3.4.1) und in Abschnitt 4.4 diskutiert.

4.3. Herstellung und Charakterisierung der TG-Sauerstoffträger

Einfluss des Temperaturgradienten

Wie in 4.1 ausführlich beschrieben, folgt die Adsorption von Proteinen an einer Öl/Wasser Grenzfläche während der Emulgierung einer spezifischen Kinetik, die in drei Regime unterteilt werden kann: Regime I kann als Induktionszeit angesehen werden, in der sich die Albuminmoleküle an der Oberfläche anlagern, sich aber die Oberflächenspannung über längere Zeiträume nicht ändert. Die Dauer der Anlagerung hängt von der Hydrophobizität des Öls und der Diffusionsgeschwindigkeit des Albumins ab.¹⁴⁹ Die Diffusionsgeschwindigkeit wiederum hängt von der Temperatur ab, wobei sich die Geschwindigkeit bei einem Temperaturanstieg stark steigert.¹⁶⁴ Bei der Adsorption von Proteinen an einer Grenzfläche kommt es zu einer teilweisen Denaturierung des Proteins, was eine thermodynamische Stabilisierung zur Folge hat. Dies ist in einem gewissen Grad auch für Albumin nachgewiesen, jedoch ist Albumin aufgrund seiner 17 intramolekularen Disulfidbrücken um den isoelektrischen pH-Bereich herum sehr resistent gegenüber partieller Denaturierung.^{85,100,149} Dadurch wird das in Abschnitt 4.1 beschriebene Invertieren von reversibler zu irreversibler Adsorption an der Grenzfläche bei niedrigen Temperaturen erschwert.

Regime II tritt nach einer 99 %igen Besetzung der Besetzungslücken an der Oberfläche ein und zeichnet sich durch eine stark verlangsamte Kinetik aus. In diesem Regime ist die Diffusionsgeschwindigkeit der Proteine nicht mehr geschwindigkeitsbestimmend, sondern die Reorientierung der Proteine an der Oberfläche, die unabhängig von der Proteinkonzentration abläuft. Die Ausbildung von Mehrfachlagen beginnt. Darauf folgt Regime III, in dem es zur Ausbildung mehrerer Proteinlagen kommt und durch einsetzende Denaturierung ein diffuses Netzwerk aus Proteinen entsteht. Geschwindigkeitsbestimmend wird die Fähigkeit des Proteins, an Grenzflächen zu denaturieren und Netzwerke auszubilden. Erst nach Regime III kann von einer stabilen Grenzfläche mit ausreichender Verringerung der Oberflächenspannung ausgegangen werden.^{111,149,165} Bei niedrigen Proteinkonzentrationen ($\mu\text{g/mL}$) spielt sich Regime I in einer zeitlichen Größenordnung

von Sekunden, Regime II innerhalb von Minuten und Regime III innerhalb von Stunden ab. Die Prozesse während der Hochdruck-Homogenisierung dauern nur Bruchteile von Sekunden, wodurch hohe Proteinkonzentrationen (mg/mL) eingesetzt werden müssen, um die Trägheit der Proteine auszugleichen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Adsorption initial bei hohen Konzentrationen zwar beschleunigt ist, aber das Erreichen des steady state sogar verzögert wird.¹⁶⁶

Bei niedrigen Temperaturen kommt es nicht zu einem Auftreten von Regime II und III während der Hochdruck-Homogenisierung. Aufgrund der Beobachtung, dass Albumin über die Zeit dazu neigt, sich von der Sauerstoffträgeroberfläche zu lösen (Abbildung 3.2.6 C), wird an dieser Stelle davon ausgegangen, dass ein späteres Anlagern von weiterem Albumin nicht stattfindet. Dadurch könnte die Stabilität und die Partikelgrößenverteilung bei niedrigen Herstellungstemperaturen suboptimal ausfallen (Abbildung 3.1.3, siehe auch Abschnitt 664.1).

Aus den bisher aufgeführten Gründen wurde eine Temperaturerhöhung zur Verdichtung der Hüllschicht und einer damit einhergehenden Stabilisierung mittels der Senkung der Oberflächenspannung der Sauerstoffträger und der weiteren Verengung der Partikelgrößenverteilung eingesetzt.^{166,167} Für die spätere physiologische Anwendung der Sauerstoffträger müssen hohe Proteinkonzentrationen eingesetzt werden, von denen über 90 % zur Herstellung der Sauerstoffträger nicht genutzt werden (Abbildung 3.1.4). Dieser Anteil an Albumin darf während des Prozesses nicht von der Denaturierung betroffen sein, da denaturiertes Albumin gerade in der Nierenkonservierung zu Schäden des Endothels führen kann.¹⁶⁸ Zu diesem Zweck wurde ein bisher in der Literatur für die Herstellung stabiler Emulsionen noch nicht beschriebener zeitlich aufgelöster Druck- und Temperaturgradient während der Herstellung angelegt. Die Temperatur überschritt während der Synthese nicht den Wert von 50 °C, wodurch das freie Albumin gemäß den Angaben von Sharma et al., trotz Einwirkung von Scherkräften nicht denaturieren sollte.¹⁶⁹

Die in Abbildung 3.3.1 A gezeigte Fotografie der frisch hergestellten Suspension zeigt eine klare Flüssigkeit ohne mit bloßem Auge erkennbare Trübung, die durch Lichtstreuung an den Sauerstoffträgern entstände. In der Abbildung nicht gezeigt ist die Trübung der Suspension, wenn das Licht in einem 90 °C Winkel zum Betrachter einfällt. Diese Trübung ist auf den Tyndall-Effekt zurückzuführen, der durch die Rayleigh-Streuung hervorgerufen wird. Diese Art der Streuung lässt eine grobe

Abschätzung zu, dass die in der Suspension enthaltenen Partikel eine Partikelgrößenverteilung unterhalb von 80 nm aufweisen.⁷⁹ Zur Bestätigung wurde ein UV/Vis-Spektrum im Spektralbereich von 200 – 800 nm aufgenommen (Abbildung 3.3.1 **B**) Es konnte eine Absorptionsbande detektiert werden, die sich im Vergleich zu gelöstem Albumin zu größeren Wellenlängen verschoben hatte. Eine solche hypsochromatische Verschiebung wird durch den Bruch von Disulfidbrücken innerhalb des Albumins verursacht.¹⁷⁰ Ob das *tailing* der Absorptionsbande durch Lichtstreuung an den Partikeln oder durch die Absorption des Albumins hervorgerufen wurde, konnte durch diese Messung nicht geklärt werden.

Partikelgrößenverteilung

Die Partikelgröße wurde mit Hilfe einer Kombination aus DLS und SLS bestimmt. Die Histogramme werden in Abbildung 3.3.2 bzw. Abbildung 3.3.3 dargestellt und zeigen entgegen dem, was durch die Transparenz der Suspension erwartet wurde, eine relativ breite Partikelgrößenverteilung mit einer durchschnittlichen Partikelgröße zwischen 170 und 200 nm. Dennoch ist diese Suspension sehr stabil, sodass nach 5-monatiger Lagerung keine Partikel oberhalb einer Größe von 600 nm detektiert werden konnten. Die Messung der statischen Lichtstreuung ergab eine vergleichbare Partikelgrößenverteilung. Die Messung nach 5 Monaten der Lagerung bei 4 °C beweist eine hohe Stabilität der Emulsion. Die maximale Partikelgröße verblieb auch nach dieser langen Lagerung im submikron-Bereich. In einer lichtmikroskopischen Untersuchung (Daten nicht gezeigt) konnten keine Partikel detektiert werden, was die DLS und SLS Messungen bestätigt. Diese Daten zeigen eine im Vergleich mit anderen, auch klinisch zugelassenen PFC-Suspensionen erstaunlich hohe Stabilität, ohne dass höhermolekulare oder bromierte PFCs zugesetzt werden mussten.¹⁷¹⁻¹⁷³

Sauerstoffkapazität

Durch die Erhitzung der Sauerstoffträger während der Herstellung kann es zu einer gesteigerten Volatilität des PFD kommen, die die Verminderung der Sauerstoffkapazität bedeuten würde. Die Sauerstoffkapazität einer 16,66 %igen Sauerstoffträger-Suspension sollte, entsprechend der in Abbildung 3.2.8 dargestellten Messungen, eine Sauerstoffkapazität zwischen 53 und 61 mL_{O₂}*mL_{H₂O}⁻¹*1 atm⁻¹

besitzen. Die Messungen ergaben einen Wert von $56,63 \text{ mL}_{\text{O}_2} \cdot \text{mL}_{\text{H}_2\text{O}}^{-1} \cdot 1 \text{ atm}^{-1}$ und geben damit keinen Anlass zur Annahme, dass PFD bei dem veränderten Herstellungsprozess verdampfte.

Aufnahme in Makrophagen und Tubulusepithelzellen

Die Hauptaufgabe des Sauerstoffträgers ist es, den aufgenommenen Sauerstoff an Zellen im Gewebe abzugeben. Dabei ist es wichtig für eine lange Verweildauer in den Blutgefäßen und einer kurzen Retention im Organ, dass die Sauerstoffträger nicht in die Zellen innerhalb des Gewebes aufgenommen werden, sondern nur den Sauerstoff dorthin abgeben (Abschnitt 1.10). Emulgierte oder verkapselte Perfluorcarbone können vom Immunsystem des Körpers erkannt und von Makrophagen aufgenommen werden. Langfristig lagert sich das Perfluorcarbon dann in Milz und Leber ein und ist dort in der Lage, mit Enzymen zu interagieren. Unterschreiten die prozessierten Perfluorcarbone eine Größe von 150 nm, werden sie auch von Zellen außerhalb des Immunsystems aufgenommen.^{40,112-115} Um die zelluläre Aufnahme zu quantifizieren, wurden die Sauerstoffträger aus einer in der Klinik bereits für die EVNP von Lungen zugelassenen und in präklinischen Studien in der Perfusion von menschlichen Nieren und Lebern eingesetzten Perfusionslösung (Steen®), die humanes Serumalbumin enthält, nach der weiter oben beschriebenen Methode hergestellt.^{1,174,175} Die in Abbildung 3.3.4 gezeigten Sauerstoffträger besaßen eine maximale Partikelgröße von ca. 200 nm, und lagen damit auch nach der Lagerung im nanopartikulären Bereich, wodurch die endo- und pinozytotische Aufnahme in Tubulus-Zellen zu erwarten war.^{116,122,127} Die Untersuchung in Makrophagen diente als positiv-Kontrolle, da die Aufnahme von PFC-Partikeln als zuverlässige Methode zur *in vitro* und *in vivo* Markierung von Immunzellen eingesetzt wird.^{176,177} Auch in diesem Versuch waren die Makrophagen in der Lage, große Mengen der Sauerstoffträger während der Inkubation zu inkorporieren (Abbildung 3.3.5 A). Die in Abbildung 3.3.5 B gezeigte Reaktion der Makrophagen auf die Anwesenheit der Sauerstoffträger ist die Ausbildung von Pseudopodien, die die Partikel aufnehmen und in das Phagosom überführen. Die aus diesem Weg resultierende Verteilung in der Zelle ist gleichmäßig und scheinbar ungerichtet (Abbildung 3.3.5 A). Die Phagosomen fusionieren mit den Lysosomen, in denen Proteasen und Peptidasen enthalten sind, mit denen die aufgenommenen Partikel zersetzt werden sollten. Doch interessanterweise sind die Proteasen nicht in

der Lage, in einem Zeitraum von bis zu 4 Stunden die Hülle der Sauerstoffträger in einem Maße zu zersetzen, dass sie ihre Form verlieren und zu großen Partikeln fusionieren. Die in Abbildung 3.3.5 C inkorporierten Sauerstoffträger zeigen eine bemerkenswerte Stabilität gegenüber dem Verdau, wobei zu klären bleibt, ob es sich beim Hüllmaterial weiterhin um intaktes Albumin handelt, oder ob die durch den Verdau entstehenden Peptidfragmente an der Grenzfläche adhären und die Partikel stabilisieren. Das einzige, was aus den Beobachtungen geschlossen werden kann, ist, dass die Sauerstoffträger nach Aufnahme in die Zellen destabilisiert werden und Koaleszenz auftritt. In der Literatur ist beschrieben, dass Makrophagen nicht in der Lage sind, Perfluorcarbo- basierte Nanopartikel wieder auszuscheiden, wodurch sie erst nach dem Zelluntergang der Makrophagen wieder freigesetzt werden, um dann von anderen Makrophagen wieder aufgenommen zu werden.⁴⁰ Abbildung 3.3.7 zeigt eine abgestorbene Makrophage, die nach ihrem Zelluntergang die Sauerstoffträger in nahezu unveränderter Größe wieder freigibt.¹⁷⁸ Die auf diese Weise freigesetzten Partikel könnten nach der Freisetzung vermutlich von benachbarten Makrophagen aufgenommen werden und auf diese Weise für längere Zeit im Körper verweilen.

Millis et al. zeigte, dass proximale Tubuluszellen in der EVNP in der Lage sind, Perfluorcarbon-Partikel aufzunehmen.¹⁷⁹ Wie in Abbildung 3.3.8 A zu sehen ist, kommt es auch in den Zellkultur-Versuchen mit Tubulusepithelzellen zu einer Aufnahme der Sauerstoffträger. Die Quantität unterschreitet die der Makrophagen um ein Vielfaches, und es kommt nicht zu vergleichbar großen Ansammlungen an Sauerstoffträgern. Welche Mechanismen eine Rolle bei der Aufnahme spielen, kann aus dieser Studie nicht mit endgültiger Sicherheit gesagt werden, aber es konnten zwei verschiedene Wege beobachtet werden. In Abbildung 3.3.8 B konnte die (Makro-) Pinozytose von Sauerstoffträgern festgehalten werden.¹⁸⁰ Dabei werden die Sauerstoffträger (gelbe Pfeile) samt umgebendem Medium, das in diesem Fall durch einen aus überschüssigem Albumin hervorgerufenen grauen Schleier erkennbar ist, von der Zelle umgeben (blaue Pfeile) und aufgenommen.

Der zweite Weg, der beobachtet werden konnte, ist in Abbildung 3.3.8 C festgehalten. Die Sauerstoffträger berühren die Außenseite der Zelle (violetter Pfeil), während sich im inneren der Zelle ein Hohlraum bildet, der eine Vakuole darstellen könnte, die sich bildet, um gezielt die Sauerstoffträger aufzunehmen. Wie schon erwähnt, exprimieren proximale Tubuluszellen der Niere das Membranprotein Megalin, das bei Aktivierung

eine Rezeptor-vermittelte Endozytose von Albumin initiiert. Die Aktivierung des Megalins ist sogar durch an der Oberfläche von Nanopartikeln adhäriertes Albumin noch möglich. Die Aktivierung des Megalins führt in diesem Fall dann dazu, dass auch der Nanopartikel mit inkorporiert wird.¹²⁵ Die Berührung zwischen Zelle und Sauerstoffträger, die in Abbildung 3.3.8 C zu sehen ist, könnte eine solche Rezeptorbindung bedeuten, und ihr könnte eine gezielte Aufnahme der Sauerstoffträger folgen. In diesen beiden beobachteten Wegen werden Partikel mit Zellmembran umhüllt und kommen nicht in Kontakt mit dem Cytoplasma.¹²⁴ Beiden Wegen ist gemein, dass die anfangs gebildeten Transportvesikel sich mit dem Lysosom vereinen und der verwertbare Teil der aufgenommenen Fracht verdaut und ggf. zur Energiegewinnung genutzt werden soll. Kann die Zelle die aufgenommene Fracht nicht verdauen, kommt es zu Lysosomensekretion, durch die diese Reste die Zelle verlassen können.

In Abbildung 3.3.6 ist eine Situation zu sehen, bei der es sich um eine Exozytose handeln könnte. Sollte dies der Fall sein, könnte das den Einsatz der Sauerstoffträger in der isolierten Nierenperfusion sicherer machen und die Organretention verkürzen.

4.4. Auswirkung verschiedener Volumen-Fractionen der Sauerstoffträger in der EVNP

In dieser Studie wurde untersucht, in welcher Volumen-Fraktion die Sauerstoffträger, die in Abschnitt 4.2 beschrieben wurden, genutzt werden können, um die Oxygenierung der Niere zu bewerkstelligen.

Gewebeoxygenierung

Die Sauerstoffträger erhöhen signifikant die Sauerstoffkapazität der Perfusionslösung in einer dosisabhängigen Art und Weise, wie in Abbildung 3.2.8 gezeigt. Dadurch ist das Perfusionsmedium in der Lage, genügend Sauerstoff in die Niere zu transportieren und die Zellen des gesamten Organs zu versorgen, wenn 4 % oder 8 % Sauerstoffträger eingesetzt werden. Zur Einschätzung dieser Sauerstoffanlieferung wurde die Akkumulation der beiden Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und HIF-2 α quantifiziert. Die α -Untereinheiten der Hypoxie-induzierbaren Faktoren werden von allen Zellen in fast allen Organismen ununterbrochen synthetisiert, um direkt von einer sauerstoffabhängigen Prolylhydroxylase hydroxyliert zu werden, um dann ubiquitiniert und anschließend im Proteasom abgebaut zu werden.¹⁸¹ Kommt es zu einem Abfall des pO₂ im Gewebe, kann die jeweilige α -Untereinheit nicht hydroxyliert und somit nicht abgebaut werden, wodurch sich das Protein anreichert und in den Zellkern transloziert. Dort dimerisiert die α -Untereinheit mit der kernständigen β -Untereinheit, sodass der Transkriptionsfaktorkomplex nach Bindung weiterer Faktoren dann Zielgene aktiviert, die der Zelle helfen, an hypoxische Umstände zu adaptieren und so ein Zellüberleben zu ermöglichen.¹⁸¹ In der Niere sind die beiden Transkriptionsfaktoren in unterschiedlichen Kompartimenten zu finden. HIF-1 α akkumuliert bei akuter Hypoxie in den Epithelzellen des proximalen Tubulus in der Nierenrinde, wobei HIF-2 α bereits bei milder Hypoxie in den interstitiellen Fibroblasten sowohl in der Nierenrinde als auch im Nierenmark akkumuliert.^{42,182,183} Dadurch, dass sich die beiden Faktoren unterschiedlich verhalten und in unterschiedlichen Kompartimenten der Niere akkumulieren, können sie dabei helfen, die angemessene Sauerstoffanlieferung im Organ zu definieren. Die angemessene Dosis an Sauerstoffträgern sollte dazu führen, dass eine HIF-1 α Akkumulation verhindert wird, wobei die Akkumulation von HIF-2 α nicht unterbunden werden soll, die eine Aufhebung der physiologisch auftretenden geringen Sauerstoffpartialdrücke des Nierenmarks

bedeuten würde.¹⁸⁴ Im Modell der Hämodilution, in der das Blut einer Ratte fast vollständig durch einen Blutersatzstoff ersetzt wurde, wurde bereits beobachtet, dass der Einsatz einer PFD-basierten Kapsel-Suspension die HIF-abhängige Erythropoetin-Expression unterdrückte.⁹⁴ Die Akkumulation der HIF-Isoenzyme nach dem Einsatz von Hämoglobin-basierten Sauerstoffträgern hängt von der Sauerstoffaffinität des Sauerstoffträgers ab. Sauerstoffträger mit hoher Affinität verhindern die Akkumulation, wohingegen Sauerstoffträger mit niedriger Sauerstoffaffinität zu einer Akkumulation führen.¹⁸⁵

Es wurden in den Experimenten vier verschiedene Volumen-Fractionen der Sauerstoffträger eingesetzt. In Abbildung 3.4.1 ist zu sehen, dass sowohl ein Fehlen als auch der Einsatz von nur 2 % Sauerstoffträgern eine HIF-1 α Akkumulation nicht unterbinden. Es ist also anzunehmen, dass der sehr stark sauerstoffabhängige Teil der Niere trotz Präoxygenierung mit 100 % Sauerstoff bei 1 ATM nicht mit ausreichenden Mengen an Sauerstoff versorgt wurde. Im Gegensatz dazu führte der Einsatz einer Volumen-Fraktion von 8 % zur signifikanten und substantiellen Verringerung sowohl der HIF-1 α als auch der HIF-2 α Akkumulation. Die noch auftretende geringe HIF-1 α Akkumulation kann darauf zurückgeführt werden, dass in der Perfusionslösung keine Glukose zugesetzt wurde.¹⁸⁶ Das gewünschte Muster (Abbau von HIF-1 α , Präsenz von HIF-2 α) konnte ausschließlich bei einer Volumen-Fraktion von 4% beobachtet werden. Die zu beantwortende Frage lautete nun, ob diese Sauerstoffanlieferung im Organ auch zu einem Erhalt der physiologischen Funktion führt.

Physiologische Funktion

Der wichtigste Parameter zur Bewertung der physiologischen Funktionalität der Niere ist die GFR die ein Maß für die Menge der über den Filter tretenden Perfusionslösung ist. Eine zu niedrige GFR ist ein Anhaltspunkt für ein akutes oder chronisches Nierenversagen.³³ Abbildung 3.4.2 zeigt zeitabhängig die GFR der einzelnen Gruppen im Verlauf des Experiments. Der Einsatz einer Volumen-Fraktion von 4 % zeigte mit etwa 300 $\mu\text{L}/(\text{g} \cdot \text{min})$ über den gesamten Verlauf der Perfusion eine deutlich höhere GFR als alle anderen eingesetzten Volumen-Fractionen. Das Fehlen von Energiesubstraten hat einen starken Einfluss auf die GFR, wodurch es schwierig ist, die gemessene GFR in die Literatur einzuordnen.¹⁸⁷ Im Allgemeinen kann gesagt

werden, dass während einer EVNP der Rattenniere eine GFR zwischen 300 und 1000 $\mu\text{L}/(\text{g}\cdot\text{min})$ in der Literatur angegeben ist.^{54,188-191} Bemerkenswert hierbei ist, dass der Verzicht auf Sauerstoffträger die GFR in etwa gleichem Maße beeinträchtigte wie der Einsatz einer anscheinend zu hohen (8 %) oder zu niedrigen (2 %) Volumen-Fraktion. Dieses Ergebnis ist kongruent mit der Messung von Zellschädigungsparametern in der Perfusionslösung und im Urin.

Zelluntergang

In Abbildung 3.4.3 ist zu sehen, dass die Konzentration der AST nur in den Nieren, die mit einer Volumen-Fraktion von 4 % Sauerstoffträgern perfundiert worden waren, in beiden Flüssigkeiten signifikant niedriger war als in der Kontrollgruppe. Die beobachtete physiologische Funktion der Nieren korreliert daher mit dem in den Nieren auftretenden Zelluntergang.

Da die Niere, wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, in den unterschiedlichen Kompartimenten unterschiedliche Bedürfnisse nach Sauerstoff besitzt, wurde der Zelluntergang zusätzlich räumlich aufgelöst untersucht.

Abbildung 3.4.4 zeigt exemplarisch die hierfür mit Hilfe eines TUNEL-Assays angefärbten Zellen, die als Zeichen beginnenden Zelluntergangs fragmentierte DNA aufweisen. Wie zuvor schon durch die AST Messungen in der Perfusionslösung und Urin gezeigt wurde, bestätigte sich auch hier eine sehr niedrige Zahl untergegangener Zellen in den Nieren, die mit 4 % Sauerstoffträgern perfundiert worden waren. Ein interessanter Effekt ist, dass die Anzahl toter Zellen in den anderen Gruppen im Nierenmark generell höher war als in der Nierenrinde. Diese Beobachtung ist mit dem in Abschnitt 1.2 beschriebenen anatomischen Aufbau der Niere zu begründen. Die Perfusionslösung fließt zuerst durch die Nierenrinde, wo ohne Sauerstoffträger und mit einer Volumen-Fraktion von 2 % die Menge des angelieferten Sauerstoffs und die endogene Hypoxieadaptation (Abbildung 3.4.1) genügen, um das Ausmaß des Zelluntergangs zu vermindern. Im weiteren Verlauf verringert sich der Sauerstoffgehalt und, wie oben beschrieben, die Durchblutung des Gewebes drastisch, wodurch die Sauerstoffkapazität der Perfusionslösung ohne Sauerstoffträger und mit einer Volumen-Fraktion von 2 % nicht mehr ausreicht, um den physioxischen pO_2 von etwa 20 mmHg im Nierenmark zu stabilisieren.¹⁹² Das spiegelt sich auch in dem in

Abbildung 3.4.1 gezeigten HIF-2 α -Akkumulation wider. In der 8 %-Gruppe hingegen kam es zu einem massiven Anstieg der Zahl toter Zellen im Nierenmark. Diese um ein Vielfaches höhere Zahl ist zwingend mit der übermäßigen Sauerstoffanlieferung verknüpft. Wie bereits erwähnt, ist das Nierenmark an niedrige Sauerstoffpartialdrücke adaptiert und kann bei Abwesenheit sowohl von Glukose als auch ausreichenden Mengen an Sauerstoff aus endogenen Glykogenspeichern des proximalen Tubulus für die sauerstoffunabhängige ATP-Synthese versorgt werden.¹⁹³ Ein hyperphysoxischer pO₂ scheint zu einem massiven oxidativen Stress zu führen, der zum Zelluntergang in der Nierenrinde, aber besonders im Nierenmark führt.

Oxidativer Stress

Um diesen oxidativen Stress nachzuweisen, wurden Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) im Urin quantifiziert, da sie Rückschlüsse auf Produkte der Peroxidation der Zellmembran durch reaktive Sauerstoffspezies zulassen. In Abbildung 3.4.5 sind die Ergebnisse dieser Quantifizierung zusammengefasst. Es konnte ein hochsignifikanter Anstieg der TBARS im Urin nachgewiesen werden, wenn Nieren mit einer Volumen-Fraktion von 8 % der Sauerstoffträger perfundiert worden waren. Diese Hyperphysoxie beruht auf dem Fehlen der zwei bereits erwähnten Effekte. Die künstlichen Sauerstoffträger zeigen keinen vergleichbaren Anstieg der Sauerstoffabgabe bei Aufnahme von CO₂, wodurch mehr Sauerstoff bis tief ins Nierenmark transportiert wird. Zum anderen unterliegen die künstlichen Sauerstoffträger nicht dem Fåhræus-Lindqvist-Effekt, da sie sich durch ihre sehr geringe Größe gleichmäßig verteilt im Blutgefäß befinden.⁴⁰ Es könnte daher zu einer verstärkten Sauerstoffanlieferung im Kapillarbett kommen im Vergleich zu erythrozytenhaltigen Perfusionsmedien.

4.5. Vergleich zwischen Sauerstoffträgern und Erythrozyten in der EVNP

Im Folgenden wurde die Eignung des Sauerstoffträgers zur Oxygenierung der EVNP im Vergleich mit Erythrozyten während einer 6-stündigen Nierenperfusion getestet.

Wie in Abschnitt 1.2 und 1.3 beschrieben, besitzen die Sauerstoffträger und Erythrozyten zum Teil grundlegend andere physikalische und physiologische Eigenschaften, die erheblichen Einfluss auf die Gewebeoxygenierung nehmen. Erythrozyten als Träger des physiologischen Sauerstoffträgers Hämoglobin sind mit der Sauerstoffbindekurve optimal angepasst an ihre Aufgabe. Im Abschnitt 4.4 wurden ausführlich die Auswirkungen der linearen Sauerstoffabgabe der Sauerstoffträger diskutiert, die bei einer Überdosierung zu oxidativem Stress der Nierenzellen führen.

Biochemische Marker für Zellschäden

Das Perfusat wurde im Falle der Erythrozyten auf einen Hämatokrit von 5% eingestellt und im Falle der Sauerstoffträger auf eine Volumenfraktion von 4 %.

Betrachtet man die im Plasma bestimmten Zellschädigungsparameter, so ist klar ersichtlich, dass die Nieren, die mit Erythrozyten perfundiert worden waren, nach 120 Minuten die ersten Anzeichen von Zellschädigung zeigten (Abbildung 3.5.1). LDH als verwendeter Schädigungsmarker ist jedoch auch in Erythrozyten vorhanden, kann daher auch auf beginnende Hämolyse hinweisen und indiziert daher vielleicht nur den Untergang der Erythrozyten.¹⁹⁴ Das freigesetzte Hämoglobin in Verbindung mit Phospholipiden der Erythrozyten-Zellmembran ist erwiesenermaßen nephrotoxisch.¹⁹⁵ Um die Schädigung der Nierenzellen genauer zu spezifizieren, wurde die Aktivität von AST im Perfusat gemessen. AST ist ein hauptsächlich mitochondriales Enzym und kommt nur in geringen Mengen in Erythrozyten vor. Zu bemerken ist, dass die gemessenen Werte in beiden Gruppen erheblich niedriger liegen als die in Abschnitt 4.4 diskutierten AST-Werte der Perfusion mit Ringerlösung (Abbildung 3.5.1/Abbildung 3.4.3). Das bedeutet, dass die Steigerung der Komplexität des Perfusionsmediums zu einem zufriedenstellenden Schutz der Zellen führte.

Aber auch bei AST zeigte sich eine erste Zellschädigung nach zwei Stunden. Im Gegensatz zu den LDH-Messungen kommt es in der Sauerstoffträger-Gruppe zu einem Anstieg der AST nach ca. vier Stunden. Für EVNP-Nieren ist beschrieben, dass die perfusionsbedingten Schäden hauptsächlich im Übergang von Nierenrinde zu

Nierenmark auftreten.¹⁹⁶ In dieser Zone liegt das S3 Segment des dicken aufsteigenden Tubulus, der auf Sauerstoff angewiesen ist. Jedoch ist der physiologische pO_2 recht gering, was das S3 Segment anfällig für hypoxischen Zelluntergang macht. Auch wenn die Zahl geringer ist, enthalten die Zellen in diesem Bereich Mitochondrien, die AST freisetzen können.¹⁹⁷

Glomerulärer Kollaps

In der histologischen Auswertung wurden die in der Nierenrinde befindlichen Glomeruli auf eine Größenveränderung untersucht. Eine Schädigung des Glomerulus ist für die Funktion der Niere katastrophal, da die dort befindlichen Zellen keine regenerativen Fähigkeiten haben.^{198,199} Ein Kollaps der Glomeruli lässt auf einen glomerulären Zelluntergang schließen.²⁰⁰ Nach einer 6-stündigen Perfusion mit Erythrozyten bzw. mit Sauerstoffträgern, war ca. jeder fünfte Glomerulus von einem Kollaps betroffen ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 3.5.2 A). Eine leichte Tendenz, dass die Sauerstoffträger mehr kollabierte Glomeruli verursachen, konnte beobachtet werden. Unter physiologischen Bedingungen koordiniert die Niere als blutdruckregulierendes Organ viele hormonelle und nervale Prozesse, um den Blutdruck über Vasokonstriktion und Vasodilatation zu regulieren.³³ In der EVNP ist diese Autoregulation stark limitiert. Die Regulation des Blutdrucks über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist in der EVNP nicht möglich, weil die Nebenniere als Ort der Aldosteronsynthese und die Leber als Ort der Angiotensinsynthese nicht mehr in Verbindung mit der Niere stehen. Die renale Perfusion wird von einer Maschine vorgegeben und kann nicht über die Nieren-Herz-Achse reguliert werden. Der Zusatz von Angiotensin II zum Perfusionsmedium könnte eine extreme Vasodilatation in dem Modell verhindern und den mechanischen Stress innerhalb des Glomerulus reduzieren.²⁰¹ Da, wie soeben beschrieben, die Niere den Blutdruck bei einer EVNP nicht mehr über das Zusammenspiel mehrerer Organe beeinflussen kann, spielt die regulative Funktion des Endothels eine umso größere Rolle. Endothelzellen schütten Stickoxide aus, die als direktes Signal für eine Vasodilatation dienen. Es ist beschrieben, dass perfluorcarbonhaltige Emulsionen zu einer reversiblen Vasodilatation führen.²⁰² Im Gegensatz dazu ist zellfreies Hämoglobin in der Lage, diese Stickoxide quantitativ zu binden und damit, neben allen nephrotoxischen Effekten für eine leichte Vasokonstriktion im Glomerulus zu sorgen.²⁰³ Freies

Hämoglobin könnte in diesem Fall vielleicht durch die Induktion eines Muskeltonus die Kapillarschlingen widerstandsfähiger gegenüber mechanischem Stress machen und somit den Zelluntergang in einem sehr geringen Maß verringern.

Ausprägung von Tubulusnekrosen in Nierenrinde und -mark

Obwohl die in Abbildung 3.5.2 **B-D** gezeigten Tubulusnekrosen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen aufwiesen, schien das innere Nierenmark tendenziell weniger nekrotisch zu sein, wenn Nieren mit Sauerstoffträgern perfundiert wurden. Die entstandenen Nekrosen betreffen im Schnitt weniger als 20 % der Tubuli, wobei das äußere Nierenmark, in dem sich das S3 Segment befindet, signifikant mehr geschädigte Tubuli aufwies als die Nierenrinde und das innere Nierenmark (Abbildung 3.5.2 **E**). Diese Beobachtung könnte Grund für den gemessenen Anstieg der AST-Aktivität in der Perfusionslösung sein. Nekrosen im S3 Segment werden in der Literatur oft in Verbindung mit Hypoxie in der EVNP beschrieben.^{187,204-206} Dieser Bereich der Niere besitzt im Gegensatz zu Zellen des glomerulären Filters die Fähigkeit zur Regeneration. Dabei dedifferenzieren adulte postmitotische Epithelzellen bei Läsionen zu proliferativen Vorläuferzellen und können untergegangene Zellen in der Umgebung ersetzen.²⁰⁷⁻²⁰⁹

Das aus den Erythrozyten freigesetzte Hämoglobin wird im Gegensatz zu den Sauerstoffträgern über den glomerulären Filter filtriert und durch Megalin-vermittelte Endozytose von den Tubuluszellen des S3 Segments aufgenommen. Innerhalb der Zellen reagiert intrazellulärer Sauerstoff am Eisenzentrum des Hämoglobins zu ROS, das schlussendlich Ferroptose auslöst.²¹⁰⁻²¹²

Für die Sauerstoffträger konnte, wie in

Abbildung 3.4.4 dargestellt, gezeigt werden, dass die eingesetzte Volumenfraktion von 4 % ausreicht, diese Schäden bei einer 2-stündigen Perfusion zu verhindern. Bei einer 6-stündigen Perfusion traten diese trotz komplexer Nährstoffversorgung der Niere wieder auf. Es könnte sein, dass sich nach vier Stunden (Anstieg der AST-Aktivität) entweder die Sauerstoffkapazität des Sauerstoffträgers änderte und die Zellen unterversorgt wurden oder der Sauerstoffbedarf der Zellen gestiegen war.

Endogene Energiereserven der Niere

In der PAS-Färbung oxydiert Periodsäure Alkohole (Hydroxyl-Gruppen) zu Aldehyden, die im nächsten Schritt mit dem Schiff'schen Reagenz zu einem roten Imin reagieren. Damit ist es möglich, Polyalkohole wie Zucker, der in Zellen an Glykoproteinen gebunden oder als Glykogen vorliegen kann, anzufärben.²¹³ Glykogen ist ein intrazelluläres Polysaccharid, das bei abfallendem Blut-Glukosespiegel zu Glukose-1-Phosphat abgebaut werden kann, um kurzfristig den Energiebedarf zu decken.²¹⁴ In der Niere werden die Glykogenspeicher in der Nierenrinde gebraucht, um im Falle eines Glukoseabfalls Zellen im Nierenmark mit Glukose zu versorgen.²¹⁵

In der histologischen Befundung wurde das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Glykogen in der Nierenrinde begutachtet. In den Nierenrinden jeder Niere, die mit Erythrozyten perfundiert worden war, konnte Glykogen gefunden werden. Im Gegensatz dazu wurde nur in einem Drittel der Nieren, die mit Sauerstoffträgern perfundiert worden waren, Glykogen gefunden (Abbildung 3.5.2 F). Die in Abbildung 3.4.1 gezeigte Quantifizierung von HIF-1 α lässt keine übermäßige Hypoxie im Nierenmark erwarten, die einen exzessiven Verbrauch des Glykogens zur Versorgung der Medulla erklären könnte. Ein weiterer Grund für den Glykogenabbau kann die Einspeisung des in der Glykogenolyse mobilisierten Glukose-6-Phosphats in den Pentosephosphat-Weg als Antwort auf oxidativen Stress sein.^{216,217} Wie die in Abbildung 3.4.5 dargestellten Daten zeigen, löst eine Volumenfraktion der Sauerstoffträger von 4 % keinen übermäßigen oxidativen Stress aus, der einen kompletten Verbrauch der Glykogenreserven begründen würde, zumal die Perfusionslösung in der 6-stündigen Perfusion Antioxidantien wie z.B. Glutathion enthielt.

In der Literatur wird ausgiebig beschrieben, dass der Einsatz von PFD-basierten Sauerstoffträgern eine Entkopplung von Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP450) verursacht, die den NADPH-Pool erschöpft.^{113,218-224} Dabei wurde der Phenobarbital-induzierbare Typ der Cyp450, dessen physiologisches Substrat Sexualhormone sind, als entkoppelbar identifiziert.²²⁵⁻²²⁸ In der Niere sind verschiedene Isoformen von Phenobarbital-induzierbaren Cyp450 bekannt.²²⁹ Akut kann eine Cyp450 Entkopplung zu einer Erschöpfung des zellulären NADPH-pools führen, der über den Pentosephosphat-Weg regeneriert wird. Als Substrat dient Glukose-6-Phosphat, das während der Glykogenolyse entweder direkt freigesetzt wird oder anschließend aus

dem entstandenen Glukose-1-Phosphat isomerisiert werden kann. Diese Regeneration bewirkt den exzessiven Abbau von Glykogen.^{40,94} Die Entkopplung speziell dieses CYP450-Typs führt zur Generierung von ROS, die intrazellulären oxidativen Stress auslösen, der bei Erschöpfung des Glutathions im Perfusionsmedium zu dem beobachteten Zelluntergang führen kann.^{230,231} Sollte es tatsächlich zu einer Entkopplung und Induktion von CYP450 des phenobarbitalinduzierbaren Typs kommen, kann das für eine folgende Transplantation relevant sein. Beim Abkoppeln der Niere von der EVNP kommt es präoperativ zwangsweise zu einer Ischämie, bis die Arterie des Empfängers mit der Niere verbunden ist. Nach der Reperfusion sind aufgrund der Kürze der warmen Ischämie nur wenige Reperfusionsschäden zu erwarten, jedoch steht die Induktion phenobarbitalinduzierbarer CYP450 im Verdacht, warme Ischämie-Reperfusionsschäden zu verschlimmern.²³²

Inwiefern die Steigerung der Glykogenolyse mit der tendenziellen Milderung der Schäden in der inneren Medulla in Zusammenhang steht, kann aus den bekannten Fakten nicht eindeutig gesagt werden. Es könnte sein, dass Produkte aus dem Pentosephosphat-Weg wie z.B. Glycerin-3-Aldehyd oder Fructose-6-Phosphat als Energiesubstrate für die Tubuli des inneren Nierenmarks dienen und ihnen helfen, sich dem Zelluntergang zu entziehen.²³³

Im Vergleich zwischen Sauerstoffträgern und Erythrozyten wurde ein Anstieg in LDH- und AST-Aktivität detektiert, der im Falle der Erythrozyten vermutlich aus lysierten Erythrozyten stammte, sodass anhand dieses Parameters nicht eindeutig gesagt werden kann, ab wann die Niere messbare Zellschäden erfuhr. In der Histologie zeigte sich, dass die Erythrozyten den Glomeruli tendenziell weniger Schäden zuführen als die Sauerstoffträger, was am Einfangen von Stickoxiden und einer damit verbundenen Vasokonstriktion liegen könnte. Das S3 Segment ist in beiden Gruppen das am stärksten von Nekrosen betroffene, wobei sich der Grund dafür unterscheiden könnte. Ist es im Falle der Erythrozyten vermutlich das freigesetzte Hämoglobin, das intrazellulär Ferroptose auslöst, könnte es bei den Sauerstoffträgern an der Entkopplung der CYP450 liegen, die Sauerstoffradikale erzeugen. Die mit der Entkopplung einhergehende Aktivierung des Pentosephosphat-Wegs könnte ein Grund dafür sein, dass das innere Nierenmark in der Sauerstoffgruppe tendenziell weniger von Zelluntergang betroffen war.

5. Fazit

Diese Arbeit zeigt eindrücklich, dass der zukünftige Einsatz geringer Volumenfraktionen (4 %) von Perfluordecalin-basierten albuminummantelten Sauerstoffträgern für den Einsatz zur Konservierung von Nieren durch EVNP eine Alternative zu Erythrozyten darstellen könnte.

Die Herstellung mittels einfacher Passage durch einen Hochdruck-Homogenisator erzeugte Sauerstoffträger mit einer ausreichenden Stabilität, um kurzfristig EVNP von Rattennieren über einen Zeitraum von bis zu sechs Stunden durchzuführen. Der Vergleich mit Erythrozyten ergab tendenziell weniger Nekrosen des Tubulussystems, jedoch tendenziell mehr kollabierte Glomeruli unter Verwendung der Sauerstoffträger. Der angelegte Temperatur- und Druckgradient während des Herstellungsprozesses führte zu einer erheblich verbesserten Lagerstabilität. Alterungsprozesse wie Partikelwachstum konnten durch die Optimierung auf ein Maß reduziert werden, das den Einsatz im klinischen Alltag erlauben könnte.

6. Ausblick

Die in dieser Arbeit entwickelte Perfusionslösung enthält bisher Salze, Energieträger, Antioxidantien und Sauerstoffträger, um Schäden der Niere während der EVNP zu mindern. Eine Weiterentwicklung der Lösung sollte bioaktive Substanzen enthalten, die aktiv in den Nierenzellen wirken und therapeutische Wirkung entfalten. Medikamente, die Entzündungen hemmen oder aktiv in den Zellzyklus eingreifen und pro-proliferativ wirken, stellen eine sinnvolle Ergänzung dar.

Des Weiteren sollte tiefergehend der Einfluss des PFD auf Nierenzellen erforscht werden. Die tendenzielle Linderung von Tubulus-Nekrosen im inneren Nierenmark wurde bisher nicht beschrieben. Ein Sauerstoff-unabhängiger Pfad zum Schutz der Tubuli, wie er in dieser Arbeit möglicherweise beschrieben wird, sollte aufgeklärt und sowohl positive als auch negative Auswirkungen müssen weiter evaluiert werden, um die Sicherheit der Perfusionslösung gewährleisten zu können.

Die hier entwickelten TG-Sauerstoffträger bedürfen einer ausgiebigen physikalischen und biologischen Charakterisierung. Durch NMR-Messungen könnte der Alterungsprozess dieser Partikel weiter beobachtet und durch Bestimmungen des Zetapotentials der Herstellungsprozess weiter charakterisiert werden. Die gewonnenen Erkenntnisse müssen genutzt werden, um den Herstellungsprozess hochskalierbar zu machen. Die zelluläre Aufnahme der Partikel muss weiter erforscht werden, da eventuelle Rezeptor-vermittelte Endozytose vielleicht durch Rezeptorblockaden inhibiert werden könnten, bzw. eine Exozytose der Sauerstoffträger induziert werden könnte. Dadurch könnte die Organretentionszeit verkürzt werden. Immunogold-Färbungen in der TEM könnten einen eventuellen Rezeptorkontakt aufklären, bzw. das Ausschalten dieser Rezeptoren auf genetischer Ebene im Zellkulturversuch kann helfen, den Signalweg aufzuklären.

Im perfundierten Organ können TEM-Aufnahmen aufklären, ob die Sauerstoffträger in der Lage sind, den subendothelialen Raum zu verlassen, und, wenn es so ist, welcher der Zelltypen am meisten betroffen ist von einer Inkorporierung der Sauerstoffträger.

7. Zusammenfassung

Diese Arbeit erzählt von der Entwicklung einer zellfreien Perfusionslösung für den klinischen Einsatz bei der normothermen *ex vivo* Perfusion von Nieren. Hauptaugenmerk lag dabei auf der Entwicklung eines albuminummantelten künstlichen Sauerstoffträgers, der auf Perfluordecalin basiert. Seine Aufgabe ist es, das perfundierte Organ mit angemessenen Mengen an Sauerstoff zu versorgen. Als Modell für die spätere Anwendung diente die isoliert perfundierte Rattenniere.

Für die Herstellung des Sauerstoffträgers wurde die Hochdruck-Homogenisierung verwendet, ein in der Anwendung sehr einfacher, in den ablaufenden physikalischen Reaktionen aber hochkomplexer Prozess, bei dem viele Faktoren auf die entstehenden Sauerstoffträger Einfluss nehmen. Es wurden die Einflüsse von Albuminkonzentration, Druck und wiederholtem Passagieren auf die Formierung des Sauerstoffträgers während der Homogenisierung und der Lagerung beschrieben und interpretiert. Die Charakterisierung dieser Sauerstoffträger erfolgte mit dynamischer Lichtstreuung, statischer Lichtstreuung, Transmissionselektronenmikroskopie, Raster-Elektronenmikroskopie, Kernspinresonanz, Lichtmikroskopie und nasschemischen Methoden. Erst die Nutzung dieses breit gefächerten Methodenspektrums ergab ein umfassendes Bild dieser polydispersen Suspension der Sauerstoffträger. Eine leicht durchzuführende und zu standardisierende Herstellungsprozedur ergab eine Suspension, die stabil genug war, um im Modell der normothermen *ex vivo* Nierenperfusion getestet zu werden. Eine Optimierung der Lagerstabilität der Sauerstoffträger konnte mittels eines Temperatur- und Druckgradienten bewerkstelligt werden. Die Veränderung des Herstellungsprozesses änderte die physikalischen Eigenschaften der Sauerstoffträger teilweise drastisch, ohne deren Sauerstoffkapazität zu beeinflussen. Bei einer Lagerung über 5 Monate kam es nur zu minimalem Partikelwachstum. Allerdings wurden diese Partikel von Immun- und Tubuluszellen in Zellkultur aufgenommen.

Die Oxygenierung von Nieren, die mit unterschiedlichen Volumenfraktionen der Sauerstoffträger perfundiert wurden, wurde durch die Quantifizierung von Hypoxie-induzierbaren Faktoren im Gewebe überprüft. Messungen der glomerulären Filtrationsrate, der biochemischen Zellschädigungsparameter in Perfusionslösung und Urin, die histochemische Untersuchung des Organs und die Quantifizierung von Malondialdehyd im Urin identifizierten eine Volumenfraktion von 4 % als die optimale

Konzentration von Sauerstoffträgern für diesen Einsatz. Bei dieser Volumenfraktion wurde sowohl eine Hypoxie als auch eine Hyperoxie verhindert. Verglichen mit Erythrozyten als physiologischem Sauerstoffträger zeigten Nieren, die mit dem aus Perfluordecalin hergestellten Sauerstoffträger sechs Stunden perfundiert worden waren, mäßige Schädigungsparameter. So zeigten diese Nieren einen vermehrten Abbau von Glykogen und tendenziell weniger Nekrosen im inneren Nierenmark. Während der Perfusion mit Erythrozyten trat Hämolyse auf, die zwei Effekte hervorrief. Zum einen konnte das Abfangen von Stickoxiden durch freies Hämoglobin und ein resultierender Muskeltonus die Glomeruli schützen. Zum anderen konnte ein gesteigerter Hämoglobin-induzierter Zelltod in den Zellen des äußeren Nierenmarks beobachtet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse der hier verwendeten Sauerstoffträger trotz einiger Probleme einen Einsatz in der klinischen normothermen *ex vivo* Perfusion nicht ausschließen. Die Sauerstoffversorgung des Organs wird über viele Stunden hinweg gewährleistet. Die Veränderung des Herstellungsprozesses führt zu einer ausreichenden Lagerstabilität, die den Einsatz im klinischen Alltag ermöglicht.

8. Referenzen

- 1 Minor, T. *et al.* First-in-man controlled rewarming and normothermic perfusion with cell-free solution of a kidney prior to transplantation. *American Journal of Transplantation* **20**, 1192-1195 (2020).
- 2 Kvietkauskas, M., Leber, B., Strupas, K., Stiegler, P. & Schemmer, P. Machine Perfusion of Extended Criteria Donor Organs: Immunological Aspects. *Frontiers in Immunology* **11** (2020).
- 3 Urbanellis, P. *et al.* Normothermic Ex Vivo Kidney Perfusion Improves Early DCD Graft Function Compared With Hypothermic Machine Perfusion and Static Cold Storage. *Transplantation* **104**, 947-955 (2020).
- 4 Chandak, P. *et al.* Dissemination of a novel organ perfusion technique: ex vivo normothermic perfusion of deceased donor kidneys. *Artificial organs* **43**, E308-E319, doi:10.1111/aor.13499 (2019).
- 5 Rijkse, E. *et al.* Safety and feasibility of 2 h of normothermic machine perfusion of donor kidneys in the Eurotransplant Senior Program. *BJS Open* **5**, zraa024 (2021).
- 6 Oniscu, G. C., Brown, H. & Forsythe, J. L. Impact of cadaveric renal transplantation on survival in patients listed for transplantation. *J Am Soc Nephrol* **16**, 1859-1865, doi:10.1681/asn.2004121092 (2005).
- 7 Sorlí, M. L. *et al.* Chronic kidney disease prevalence and risk factors among HIV-infected patients. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **48**, 506-508 (2008).
- 8 Jansz, T. T. *et al.* Progression of coronary artery calcification in conventional hemodialysis, nocturnal hemodialysis, and kidney transplantation. *Plos one* **15**, e0244639 (2020).
- 9 Oduncuoğlu, B. F., Alaaddinoğlu, E. E., Çolak, T., Akdur, A. & Haberal, M. in *Transplantation proceedings*. 785-792 (Elsevier).
- 10 Rotella, A. A. F., Nascimento, R. A. d., Camargo, M. F. C. d. & Nogueira, P. C. K. Emotional repercussions and quality of life in children and adolescents undergoing hemodialysis or after kidney transplantation. *Revista Paulista de Pediatria* **38** (2020).
- 11 Venkataraman, S. & Kendrick, J. in *Seminars in dialysis* (Wiley Online Library, 2020).
- 12 Gridelli, B. & Remuzzi, G. Strategies for making more organs available for transplantation. *New England Journal of Medicine* **343**, 404-410 (2000).
- 13 Perico, N., Ruggenenti, P., Scalamogna, M. & Remuzzi, G. Tackling the shortage of donor kidneys: how to use the best that we have. *American journal of nephrology* **23**, 245-259 (2003).
- 14 Wu, C. *et al.* Kidney transplantation in elderly people: the influence of recipient comorbidity and living kidney donors. *J Am Geriatr Soc* **56**, 231-238, doi:10.1111/j.1532-5415.2007.01542.x (2008).
- 15 Noble, J., Jouve, T., Malvezzi, P., Süsal, C. & Rostaing, L. Transplantation of marginal organs: immunological aspects and therapeutic perspectives in kidney transplantation. *Frontiers in Immunology* **10**, 3142 (2020).
- 16 Han, F. *et al.* Delayed graft function is correlated with graft loss in recipients of expanded-criteria rather than standard-criteria donor kidneys: a retrospective, multicenter, observation cohort study. *Chinese medical journal* **133**, 561 (2020).
- 17 Yarlagadda, S. G., Coca, S. G., Formica Jr, R. N., Poggio, E. D. & Parikh, C. R. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrology dialysis transplantation* **24**, 1039-1047 (2009).
- 18 Wong, G. *et al.* The impact of total ischemic time, donor age and the pathway of donor death on graft outcomes after deceased donor kidney transplantation. *Transplantation* **101**, 1152-1158 (2017).
- 19 <<https://www.organspende-info.de/organspende/ablauf-einer-organspende/klaerung-voraussetzungen.html>> (

- 20 Zwaini, Z. *et al.* Comparative Analysis of Risk Factors in Declined Kidneys from Donation after Brain Death and Circulatory Death. *Medicina* **56**, 317 (2020).
- 21 Cavaillé-Coll, M. *et al.* Summary of FDA workshop on ischemia reperfusion injury in kidney transplantation. *American journal of transplantation* **13**, 1134-1148 (2013).
- 22 Parsons, R. F. & Guarrera, J. V. Preservation solutions for static cold storage of abdominal allografts: which is best? *Current opinion in organ transplantation* **19**, 100-107 (2014).
- 23 Rauen, U., Elling, B. & De Groot, H. Injury to cultured liver endothelial cells after cold preservation: mediation by reactive oxygen species that are released independently of the known trigger hypoxia/reoxygenation. *Free Radical Biology and Medicine* **23**, 392-400 (1997).
- 24 Gracia-Sancho, J. *et al.* Flow cessation triggers endothelial dysfunction during organ cold storage conditions: strategies for pharmacologic intervention. *Transplantation* **90**, 142 (2010).
- 25 Hendriks, K. D. *et al.* Renal temperature reduction progressively favors mitochondrial ROS production over respiration in hypothermic kidney preservation. *Journal of translational medicine* **17**, 265 (2019).
- 26 Nath, J. *et al.* Metabolic differences between cold stored and machine perfused porcine kidneys: A 1H NMR based study. *Cryobiology* **74**, 115-120 (2017).
- 27 Lee, C. Y. & Mangino, M. J. Preservation methods for kidney and liver. *Organogenesis* **5**, 105-112 (2009).
- 28 Debout, A. *et al.* Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation. *Kidney international* **87**, 343-349 (2015).
- 29 Legeai, C., Durand, L., Savoye, E., Macher, M. A. & Bastien, O. Effect of preservation solutions for static cold storage on kidney transplantation outcomes: A National Registry Study. *American Journal of Transplantation* **20**, 3426-3442, doi:10.1111/ajt.15995 (2020).
- 30 Quiroga, I. *et al.* Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival. *Nephrology Dialysis Transplantation* **21**, 1689-1696 (2006).
- 31 van der Vliet, J. A. & Warlé, M. C. The need to reduce cold ischemia time in kidney transplantation. *Current opinion in organ transplantation* **18**, 174-178 (2013).
- 32 Summers, D. M. *et al.* Effect of donor age and cold storage time on outcome in recipients of kidneys donated after circulatory death in the UK: a cohort study. *The Lancet* **381**, 727-734 (2013).
- 33 Silbernagl, S. in *Physiologie* Vol. 9 Ch. 10, 383-442 (Georg Thieme Verlag, 2018).
- 34 Evans, R. G., Smith, D. W., Lee, C. J., Ngo, J. P. & Gardiner, B. S. What makes the Kidney susceptible to Hypoxia? *The Anatomical Record* (2019).
- 35 Levy, M. N. & Imperial, E. S. Oxygen shunting in renal cortical and medullary capillaries. *American Journal of Physiology-Legacy Content* **200**, 159-162 (1961).
- 36 Schurek, H., Jost, U., Baumgartl, H., Bertram, H. & Heckmann, U. Evidence for a preglomerular oxygen diffusion shunt in rat renal cortex. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **259**, F910-F915 (1990).
- 37 Lapennas, G. N. The magnitude if the Bohr coefficient: optimal for oxygen delivery. *Respiration physiology* **54**, 161-172 (1983).
- 38 O'Connor, P. M. Renal oxygen delivery: matching delivery to metabolic demand. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* **33**, 961-967 (2006).
- 39 Pallone, T. L., Edwards, A. & Kreisberg, M. S. The intrarenal distribution of blood flow. *Advances in Organ Biology* **9**, 75-92 (2000).
- 40 Jägers, J., Wrobeln, A. & Ferenz, K. B. Perfluorocarbon-based oxygen carriers: from physics to physiology. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **473**, 139-150, doi:10.1007/s00424-020-02482-2 (2021).

- 41 Brezis, M., Heyman, S. N. & Epstein, F. H. Determinants of intrarenal oxygenation. II. Hemodynamic effects. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **267**, F1063-F1068, doi:10.1152/ajprenal.1994.267.6.F1063 (1994).
- 42 Wiesener, M. S. *et al.* Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *The FASEB Journal* **17**, 271-273 (2003).
- 43 Bessman, J. D. & Johnson, R. K. Erythrocyte volume distribution in normal and abnormal subjects. *Blood* **46**, 369–379, doi:10.1182/blood.V46.3.369.369 (1975).
- 44 Tingle, S. J. *et al.* Hypothermic machine perfusion is superior to static cold storage in deceased donor kidney transplantation: A meta-analysis. *Clinical Transplantation* **34**, e13814 (2020).
- 45 Rijkse, E., IJzermans, J. N. & Minnee, R. C. Machine perfusion in abdominal organ transplantation: Current use in the Netherlands. *World Journal of Transplantation* **10**, 15 (2020).
- 46 Cannon, R. M. *et al.* To pump or not to pump: a comparison of machine perfusion vs cold storage for deceased donor kidney transplantation. *Journal of the American College of Surgeons* **216**, 625-633 (2013).
- 47 Moers, C. *et al.* Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *New England Journal of Medicine* **360**, 7-19 (2009).
- 48 Peng, P. *et al.* Hypothermic Machine Perfusion Versus Static Cold Storage in Deceased Donor Kidney Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Artificial organs* **43**, 478-489 (2019).
- 49 Summers, D. M. *et al.* Cold pulsatile machine perfusion versus static cold storage for kidneys donated after circulatory death: A multicenter randomized controlled trial. *Transplantation* **104**, 1019-1025 (2020).
- 50 Nicholson, M. & Hosgood, S. Renal transplantation after ex vivo normothermic perfusion: the first clinical study. *American Journal of Transplantation* **13**, 1246-1252 (2013).
- 51 Fontes, P. A. The Evolution of Oxygen Carrier Solutions for Machine Perfusion. *Transplantation* **101**, 2657-2658, doi:10.1097/tp.0000000000001857 (2017).
- 52 Lieberthal, W. *et al.* Effect of erythrocytes on the function and morphology of the isolated perfused rat kidney. *Kidney and Blood Pressure Research* **10**, 14-24 (1987).
- 53 Adams, T. D., Hosgood, S. A. & Nicholson, M. L. Physiological effects of altering oxygenation during kidney normothermic machine perfusion. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **316**, F823-F829 (2019).
- 54 Gronow, G., Kelting, T., Skrzek, C., Vd Plas, J. & Bakker, J. in *Oxygen transport to tissue IX Advances in Experimental Medicine and Biology* (ed A. Silver I. A. Silver) Ch. 14, 117-128 (Springer-Verlag US, 1987).
- 55 Hosgood, S. A. & Nicholson, M. L. Normothermic kidney preservation. *Current opinion in organ transplantation* **16**, 169-173 (2011).
- 56 Aburawi, M. M. *et al.* Synthetic hemoglobin-based oxygen carriers are an acceptable alternative for packed red blood cells in normothermic kidney perfusion. *American Journal of Transplantation* **19**, 2814–2824, doi:10.1111/ajt.15375 (2019).
- 57 Smart, B. E. in *Organofluorine Chemistry Topics in Applied Chemistry* (ed B. E. Smart R. E. Banks, J. C. Tatlow) Ch. 3, 57-88 (Springer-Verlag US 1994).
- 58 Dalvi, V. H. & Rossky, P. J. Molecular origins of fluorocarbon hydrophobicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 13603-13607, doi:10.1073/pnas.0915169107 (2010).
- 59 Wesseler, E. P., Iltis, R. & Clark Jr, L. C. The solubility of oxygen in highly fluorinated liquids. *Journal of Fluorine Chemistry* **9**, 137-146, doi:10.1016/S0022-1139(00)82152-1 (1977).
- 60 Gomes, M. C., Deschamps, J. & Menz, D.-H. Solubility of dioxygen in seven fluorinated liquids. *Journal of Fluorine Chemistry* **125**, 1325-1329 (2004).

- 61 Hamza, M. H. A., Serratrice, G., Stebe, M. J. & Delpuech, J. J. Solute-solvent interactions in perfluorocarbon solutions of oxygen. An NMR study. *Journal of the American Chemical Society* **103**, 3733-3738 (1981).
- 62 Dias, A. M. A., Freire, M., Coutinho, J. A. P. & Marrucho, I. M. Solubility of oxygen in liquid perfluorocarbons. *Fluid Phase Equilibria* **222-223**, 325-330, doi:10.1016/j.fluid.2004.06.037 (2004).
- 63 Johnson, J. L., Dolezal, M. C., Kerschen, A., Matsunaga, T. O. & Unger, E. C. In vitro comparison of dodecafluoropentane (DDFP), perfluorodecalin (PFD), and perfluorooctylbromide (PFOB) in the facilitation of oxygen exchange. *Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology* **37**, 156-162, doi:10.1080/10731190903043192 (2009).
- 64 Truesdale, G. & Downing, A. Solubility of oxygen in water. *Nature* **173**, 1236-1236, doi:10.1038/1731236a0 (1954).
- 65 Clark, L. C. & Gollan, F. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science* **152**, 1755-1756, doi:10.1126/science.152.3730.1755 (1966).
- 66 Gollan, F. & Clark, L. Organ perfusion with fluorocarbon fluid. *Physiologist* **9**, H292 (1966).
- 67 Sloviter, H. A. & Kamimoto, T. Erythrocyte substitute for perfusion of brain. *Nature* **216**, 458-460 (1967).
- 68 Clark, L. C. *et al.* Emulsions of perfluorinated solvents for intravascular gas transport. *Fed Proc* **34**, 1468-1477 (1975).
- 69 Lowe, K. C. Blood substitutes: from chemistry to clinic. *Journal of materials chemistry* **16**, 4189-4196, doi:10.1039/B604923K (2006).
- 70 Maevsky, E. *et al.* Clinical results of Perftoran application: present and future. *Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology* **33**, 37-46, doi:10.1081/BIO-200046654 (2005).
- 71 Ferenz, K. B. & Steinbicker, A. U. Artificial Oxygen Carriers—Past, Present, and Future—a Review of the Most Innovative and Clinically Relevant Concepts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **369**, 300-310, doi:10.1124/jpet.118.254664 (2019).
- 72 A. D. McNaught, A. W. *Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*, <<https://goldbook.iupac.org/terms/view/E02065>> (1997).
- 73 Commission, E. Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). *Official Journal of the European Communities: Legis* **275**, 38 (2011).
- 74 Anton, N. & Vandamme, T. F. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharmaceutical Research* **28**, 978-985, doi:10.1007/s11095-010-0309-1 (2011).
- 75 Kale, S. N. & Deore, S. L. Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review. *Systematic Reviews in Pharmacy* **8**, 39 (2017).
- 76 Bhattacharjee, K. in *Nanoemulsions-Properties, Fabrications and Applications* (ed Kai Seng Koh) <https://www.intechopen.com/books/nanoemulsions-properties-fabrications-and-applications/importance-of-surface-energy-in-nanoemulsion> (IntechOpen, 2019).
- 77 McClements, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft matter* **8**, 1719-1729 (2012).
- 78 Tan, T., Liu, S., Zhang, Y., Han, M.-Y. & Selvan, S. in *Comprehensive Nanoscience and Technology* Vol. 5 (ed Gregory D. Scholes and Gary P. David L. Andrews) Ch. 14, 399-441 (Elsevier, 2011).
- 79 Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J. & Solans, C. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci* **108-109**, 303-318, doi:10.1016/j.cis.2003.10.023 (2004).
- 80 Fryd, M. M. & Mason, T. G. Advanced nanoemulsions. *Annu Rev Phys Chem* **63**, 493-518, doi:10.1146/annurev-physchem-032210-103436 (2012).

- 81 Freire, M. G., Dias, A. M., Coelho, M. A., Coutinho, J. A. & Marrucho, I. M. Aging mechanisms of perfluorocarbon emulsions using image analysis. *J Colloid Interface Sci* **286**, 224-232, doi:10.1016/j.jcis.2004.12.036 (2005).
- 82 Yoon, J. K. & Burgess, D. J. Comparison of dynamic and static interfacial tension at aqueous/perfluorocarbon interfaces. *Journal of colloid and interface science* **151**, 402-409 (1992).
- 83 Bąk, A., Pilarek, M., Podgórska, W., Markowska-Radomska, A. & Hubacz, R. Surface properties of perfluorodecalin-containing liquid/liquid systems: The influence of Pluronic F-68 dissolved in the aqueous phase. *Journal of Fluorine Chemistry* **215**, 36-43, doi:10.1016/j.jfluchem.2018.09.002 (2018).
- 84 Freire, M. G., Carvalho, P. J., Queimada, A. J., Marrucho, I. M. & Coutinho, J. A. Surface tension of liquid fluorocompounds. *Journal of Chemical & Engineering Data* **51**, 1820-1824, doi:10.1021/jc060199g (2006).
- 85 Norde, W. Energy and entropy of protein adsorption. *Journal of dispersion science and technology* **13**, 363-377 (1992).
- 86 Marrucci, G. A theory of coalescence. *Chemical engineering science* **24**, 975-985 (1969).
- 87 Voorhees, P. W. The theory of Ostwald ripening. *Journal of Statistical Physics* **38**, 231-252 (1985).
- 88 Dichiarante, V., Milani, R. & Metrangolo, P. Natural surfactants towards a more sustainable fluorine chemistry. *Green Chemistry* **20**, 13-27, doi:10.1039/c7gc03081a (2018).
- 89 Haque, Z. A. & Kinsella, J. O. Emulsifying properties of food proteins: Bovine serum albumin. *Journal of Food Science* **53**, 416-420, doi:10.1111/j.1365-2621.1988.tb07719.x (1988).
- 90 Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N. & Garcia-Celma, M. J. Nano-emulsions. *Current opinion in colloid & interface science* **10**, 102-110 (2005).
- 91 Guo, X. *et al.* Modification of food macromolecules using dynamic high pressure microfluidization: A review. *Trends in Food Science & Technology* **100**, 223-234, doi:10.1016/j.tifs.2020.04.004 (2020).
- 92 Levy, R., Okun, Z. & Shpigelman, A. High-Pressure Homogenization: Principles and Applications Beyond Microbial Inactivation. *Food Engineering Reviews*, doi:10.1007/s12393-020-09239-8 (2020).
- 93 Hidajat, M. J., Jo, W., Kim, H. & Noh, J. Effective Droplet Size Reduction and Excellent Stability of Limonene Nanoemulsion Formed by High-Pressure Homogenizer. *Colloids and Interfaces* **4**, 5 (2020).
- 94 Wrobeln, A. *et al.* Albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers can avoid hypoxic tissue damage in massive hemodilution. *Scientific Reports (Nature Publisher Group)* **10**, doi:10.1038/s41598-020-68701-z (2020).
- 95 Wrobeln, A., Kirsch, M. & Ferenz, K. B. Improved Albumin-Derived Perfluorocarbon-Based Artificial Oxygen Carriers: In-vivo Evaluation of Biocompatibility. *Adv Biotech & Micro* **7**, doi:10.19080/aibm.2017.07.555714 (2017).
- 96 Wrobeln, A. *et al.* Albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers: A physico-chemical characterization and first in vivo evaluation of biocompatibility. *Eur J Pharm Biopharm* **115**, 52-64, doi:10.1016/j.ejpb.2017.02.015 (2017).
- 97 Wrobeln, A. *et al.* Functionality of albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers in the Langendorff-heart (dagger). *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **45**, 723-730, doi:10.1080/21691401.2017.1284858 (2017).
- 98 Kim, M.-R. & Kim, C.-W. Human blood plasma preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Chromatography B* **849**, 203-210 (2007).
- 99 Peters Jr, T. in *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications* Ch. 2, 9-75 (Academic press, 1995).
- 100 Markus, G. & Karush, F. The disulfide bonds of human serum albumin and bovine γ -globulin. *Journal of the American Chemical Society* **79**, 134-139 (1957).

- 101 Spector, A. A. Fatty acid binding to plasma albumin. *Journal of lipid research* **16**, 165-179 (1975).
- 102 Patil, G. V. Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery. *Drug development research* **58**, 219-247 (2003).
- 103 Czub, M. *et al.* Albumin-based transport of non-steroidal anti-inflammatory drugs in mammalian blood plasma. *Journal of Medicinal Chemistry* **63**do, 6847-6862, doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00225 (2020).
- 104 He, X. M. & Carter, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **358**, 209-215, doi:10.1038/358209a0 (1992).
- 105 Roche, M., Rondeau, P., Singh, N. R., Tarnus, E. & Bourdon, E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS letters* **582**, 1783-1787 (2008).
- 106 González, F. H. *et al.* Acute phase protein response in goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **20**, 580-584 (2008).
- 107 Bolaños, K., Kogan, M. J. & Araya, E. Capping gold nanoparticles with albumin to improve their biomedical properties. *International journal of nanomedicine* **14**, 6387 (2019).
- 108 Rezwan, K. *et al.* Bovine Serum Albumin Adsorption onto Colloidal Al₂O₃ Particles: A New Model Based on Zeta Potential and UV-Vis Measurements. *Langmuir* **20**, 10055-10061, doi:10.1021/la048459k (2004).
- 109 Dominguez-Medina, S., Blankenburg, J., Olson, J., Landes, C. F. & Link, S. Adsorption of a protein monolayer via hydrophobic interactions prevents nanoparticle aggregation under harsh environmental conditions. *ACS sustainable chemistry & engineering* **1**, 833-842 (2013).
- 110 Pearce, K. N. & Kinsella, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **26**, 716-723 (1978).
- 111 Campana, M. *et al.* Adsorption of bovine serum albumin (BSA) at the oil/water interface: a neutron reflection study. *Langmuir* **31**, 5614-5622 (2015).
- 112 Lutz, J., Kettemann, M., Racz, I. & Noth, U. Several methods utilized for the assessment of biocompatibility of perfluorochemicals. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* **23**, 407-415, doi:10.3109/10731199509117956 (1995).
- 113 Lutz, J. & Krafft, M. P. in *Oxygen Transport to Tissue XVIII* (eds Edwin M. Nemoto *et al.*) 391-394 (Springer US, 1997).
- 114 Lutz, J. & Metzner, P. Effects of potential blood substitutes (perfluorochemicals) on rat liver and spleen. *Pflügers Archiv* **387**, 175-181, doi:10.1007/BF00584269 (1980).
- 115 Okamoto, H., Yamanouchi, K. & Yokoyama, K. Retention of perfluorochemicals in circulating blood and organs of animals after intravenous injection of their emulsions. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **23**, 1452-1457, doi:10.1248/cpb.23.1452 (1975).
- 116 Manzanares, D. & Ceña, V. Endocytosis: The Nanoparticle and Submicron Nanocompounds Gateway into the Cell. *Pharmaceutics* **12**, 371 (2020).
- 117 Yumoto, R. *et al.* Clathrin-mediated endocytosis of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line RLE-6TN. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **290**, L946-L955 (2006).
- 118 Li, H.-H. *et al.* Caveolae-dependent and-independent uptake of albumin in cultured rodent pulmonary endothelial cells. *PLoS One* **8**, e81903 (2013).
- 119 Donahue, N. D., Acar, H. & Wilhelm, S. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Advanced drug delivery reviews* **143**, 68-96 (2019).
- 120 Zhao, J. & Stenzel, M. H. Entry of nanoparticles into cells: The importance of nanoparticle properties. *Polymer Chemistry* **9**, 259-272 (2018).
- 121 Ma, N. *et al.* Influence of nanoparticle shape, size, and surface functionalization on cellular uptake. *Journal of nanoscience and nanotechnology* **13**, 6485-6498 (2013).
- 122 Mathy-Hartert, M. *et al.* Effects of perfluorocarbon emulsions on cultured human endothelial cells. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* **25**, 563-575, doi:10.3109/10731199709117453 (1997).

- 123 Guo, P. *et al.* Nanoparticle elasticity directs tumor uptake. *Nature Communications* **9**, 130, doi:10.1038/s41467-017-02588-9 (2018).
- 124 Anselmo, A. C. *et al.* Elasticity of Nanoparticles Influences Their Blood Circulation, Phagocytosis, Endocytosis, and Targeting. *ACS Nano* **9**, 3169-3177, doi:10.1021/acsnano.5b00147 (2015).
- 125 Cui, S., Verroust, P., Moestrup, S. K. & Christensen, E. I. Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **271**, F900-F907 (1996).
- 126 Gradishar, W. J. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert opinion on pharmacotherapy* **7**, 1041-1053 (2006).
- 127 Oh, N. & Park, J.-H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International journal of nanomedicine* **9**, 51-63 (2014).
- 128 Pfeiffer, C. *et al.* Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles. *Journal of The Royal Society Interface* **11**, 20130931 (2014).
- 129 Oliveira, E. E., Barendji, M. & Vauthier, C. Understanding Nanomedicine Size and Biological Response Dependency: What Is the Relevance of Previous Relationships Established on Only Batch-Mode DLS-Measured Sizes? *Pharmaceutical Research* **37**, 1-16 (2020).
- 130 Abbe, E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie* **9**, 413-468 (1873).
- 131 Hell, S. W. Nanoscopy with focused light (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* **54**, 8054-8066 (2015).
- 132 Filipe, V., Hawe, A. & Jiskoot, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharmaceutical Research* **27**, 796-810, doi:10.1007/s11095-010-0073-2 (2010).
- 133 Stetefeld, J., McKenna, S. A. & Patel, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical reviews* **8**, 409-427 (2016).
- 134 Kumar, A. & Dixit, C. K. in *Advances in nanomedicine for the delivery of therapeutic nucleic acids* 43-58 (Elsevier, 2017).
- 135 Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential—what they are and what they are not? *Journal of controlled release* **235**, 337-351 (2016).
- 136 Madani, H. & Kaler, E. W. Measurement of polydisperse colloidal suspensions with quasielastic light scattering. *Particle & particle systems characterization* **8**, 259-266 (1991).
- 137 Keck, C. M. & Müller, R. H. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry—90% of the published measurements are false. *International journal of pharmaceuticals* **355**, 150-163 (2008).
- 138 Pencer, J. & Hallett, F. R. Effects of Vesicle Size and Shape on Static and Dynamic Light Scattering Measurements. *Langmuir* **19**, 7488-7497, doi:10.1021/la0345439 (2003).
- 139 Jeyachandran, Y., Mielczarski, E., Rai, B. & Mielczarski, J. Quantitative and qualitative evaluation of adsorption/desorption of bovine serum albumin on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Langmuir* **25**, 11614-11620 (2009).
- 140 Thormählen, I., Straub, J. & Grigull, U. Refractive index of water and its dependence on wavelength, temperature, and density. *Journal of physical and chemical reference data* **14**, 933-945 (1985).
- 141 Parlament, E. Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. *Amtsblatt der Europäischen Union*, 33-79 (2010).
- 142 Hellerstein, S., Berenbom, M., Alon, U. & Warady, B. A. The renal clearance and infusion clearance of inulin are similar, but not identical. *Kidney international* **44**, 1058-1061 (1993).

- 143 Oh, D.-J. *et al.* Fractalkine receptor (CX3CR1) inhibition is protective against ischemic acute renal failure in mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **294**, F264-F271 (2008).
- 144 Meleson, K., Graves, S. & Mason, T. G. Formation of concentrated nanoemulsions by extreme shear. *Soft Materials* **2**, 109-123 (2004).
- 145 Walstra, P. Principles of emulsion formation. *Chemical engineering science* **48**, 333-349 (1993).
- 146 Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y. & Bhandari, B. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food hydrocolloids* **22**, 1191-1202 (2008).
- 147 Graham, D. & Phillips, M. Proteins at liquid interfaces. *Journal of colloid and interface science* **70**, 403-414 (1979).
- 148 Tcholakova, S., Denkov, N. D., Sidzhakova, D., Ivanov, I. B. & Campbell, B. Interrelation between drop size and protein adsorption at various emulsification conditions. *Langmuir* **19**, 5640-5649 (2003).
- 149 Beverung, C. J., Radke, C. J. & Blanch, H. W. Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. *Biophysical Chemistry* **81**, 59-80, doi:[https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(99\)00082-4](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(99)00082-4) (1999).
- 150 Carter, D. C. & Ho, J. X. in *Advances in protein chemistry* Vol. 45 153-203 (Elsevier, 1994).
- 151 Graham, D. & Phillips, M. Proteins at liquid interfaces: II. Adsorption isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science* **70**, 415-426 (1979).
- 152 Kurrat, R., Ramsden, J. J. & Prenosil, J. E. Kinetic model for serum albumin adsorption: experimental verification. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **90**, 587-590 (1994).
- 153 Hříbalová, S. & Pabst, W. Light scattering in monodisperse systems—from suspensions to transparent ceramics. *Journal of the European Ceramic Society* **40**, 1522-1531 (2020).
- 154 Barber, E. J. & Cady, G. H. Vapor pressures of perfluoropentanes. *The Journal of Physical Chemistry* **60**, 504-505 (1956).
- 155 Rapoport, N. Phase-shift, stimuli-responsive perfluorocarbon nanodroplets for drug delivery to cancer. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **4**, 492-510 (2012).
- 156 Mountford, P. A. & Borden, M. A. On the thermodynamics and kinetics of superheated fluorocarbon phase-change agents. *Advances in colloid and interface science* **237**, 15-27 (2016).
- 157 Modena, M. M., Rühle, B., Burg, T. P. & Wuttke, S. Nanoparticle characterization: What to measure? *Advanced Materials* **31**, 1901556 (2019).
- 158 Dobro, M. J., Melanson, L. A., Jensen, G. J. & McDowall, A. W. in *Methods in enzymology* Vol. 481 63-82 (Elsevier, 2010).
- 159 Tabibiazar, M. *et al.* Design and fabrication of a food-grade albumin-stabilized nanoemulsion. *Food Hydrocolloids* **44**, 220-228 (2015).
- 160 Grapentin, C., Barnert, S. & Schubert, R. Monitoring the stability of perfluorocarbon nanoemulsions by Cryo-TEM image analysis and dynamic light scattering. *PLoS One* **10**, e0130674 (2015).
- 161 Prakasha, K. Laser-free super-resolution microscopy.
- 162 Purwar, P. *et al.* High-resolution cost-effective compact portable inverted light microscope. *Journal of microscopy* **273**, 199-209 (2019).
- 163 Mäkelä, H. I., Gröhn, O. H., Kettunen, M. I. & Kauppinen, R. A. Proton exchange as a relaxation mechanism for T1 in the rotating frame in native and immobilized protein solutions. *Biochemical and biophysical research communications* **289**, 813-818 (2001).
- 164 Gaigalas, A. K., Hubbard, J. B., McCurley, M. & Woo, S. Diffusion of bovine serum albumin in aqueous solutions. *The Journal of Physical Chemistry* **96**, 2355-2359 (1992).
- 165 Panjwani, B., Gupta, S. & Thareja, P. Ovalbumin at oil–water interfaces: Adsorption and emulsification. *Journal of Dispersion Science and Technology* **39**, 1126-1133 (2018).

- 166 McClellan, S. J. & Franses, E. I. Effect of concentration and denaturation on adsorption and surface tension of bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **28**, 63-75 (2003).
- 167 Park, J. H. *et al.* Temperature-induced denaturation of BSA protein molecules for improved surface passivation coatings. *ACS applied materials & interfaces* **10**, 32047-32057 (2018).
- 168 Southard, J. H., Senzig, K. A., Hoffmann, R. & Belzer, F. O. Denaturation of albumin: a critical factor in long-term kidney preservation. *Journal of Surgical Research* **30**, 80-85 (1981).
- 169 Sharma, L. G. & Pandey, L. M. Thermomechanical process induces unfolding and fibrillation of bovine serum albumin. *Food Hydrocolloids* **112**, 106294 (2021).
- 170 Donovan, J. W. Spectrophotometric observation of the alkaline hydrolysis of protein disulfide bonds. *Biochemical and biophysical research communications* **29**, 734-740 (1967).
- 171 Weers, J. G. *et al.* Room Temperature Stable Perfluorocarbon Emulsions with Acceptable Half-Lives in the Reticuloendothelial System. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* **22**, 1175-1182, doi:10.3109/10731199409138813 (1994).
- 172 Burgess, D. J. & Yoon, J. K. Influence of interfacial properties on perfluorocarbon/aqueous emulsion stability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **4**, 297-308 (1995).
- 173 Castro, O., Nesbitt, A. E. & Lyles, D. Effect of a perfluorocarbon emulsion (Fluosol-DA) on reticuloendothelial system clearance function. *American journal of hematology* **16**, 15-21, doi:10.1002/ajh.2830160103 (1984).
- 174 Selzner, M. *et al.* Normothermic ex vivo liver perfusion using steen solution as perfusate for human liver transplantation: First North American results. *Liver Transplantation* **22**, 1501-1508 (2016).
- 175 Steen, S. Evaluation and preservation solution. USA patent (2007).
- 176 Ahrens, E. T., Flores, R., Xu, H. & Morel, P. A. In vivo imaging platform for tracking immunotherapeutic cells. *Nature Biotechnology* **23**, 983-987, doi:10.1038/nbt1121 (2005).
- 177 Makela, A. V. & Foster, P. J. Preclinical 19F MRI cell tracking at 3 Tesla. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* **32**, 123-132, doi:10.1007/s10334-018-0715-7 (2019).
- 178 Majno, G. & Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* **146**, 3-15 (1995).
- 179 Millis, R. M., Barber, J. D., Anderson, W. A. & Dehkordi, O. Effects of a stroma-free hemoglobin and perfluorochemical combination on ultrastructure and function of the isolated rat kidney. *Renal failure* **17**, 675-687 (1995).
- 180 Swanson, J. A. & Watts, C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol* **5**, 424-428, doi:10.1016/s0962-8924(00)89101-1 (1995).
- 181 Fandrey, J., Schödel, J., Eckardt, K.-U., Katschinski, D. M. & Wenger, R. H. Now a Nobel gas: oxygen. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **471**, 1343-1358 (2019).
- 182 Rosenberger, C. *et al.* Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and-2 α in hypoxic and ischemic rat kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology* **13**, 1721-1732 (2002).
- 183 Wiesener, M. *et al.* Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **92**, 2260-2268 (1998).
- 184 Kapitsinou, P. P. *et al.* Endothelial HIF-2 mediates protection and recovery from ischemic kidney injury. *The Journal of clinical investigation* **124**, 2396-2409 (2014).
- 185 Kawaguchi, A. T. Artificial oxygen carrier to regulate hypoxic signal transduction. *Artificial organs* **38**, 617-620, doi:10.1111/aor.12372. (2014).
- 186 de Laplanche, E. *et al.* Low glucose microenvironment of normal kidney cells stabilizes a subset of messengers involved in angiogenesis. *Physiological reports* **3**, e12253 (2015).
- 187 Brezis, M., Rosen, S., Spokes, K., Silva, P. & Epstein, F. Substrates induce hypoxic injury to medullary thick limbs of isolated rat kidneys. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **251**, F710-F717 (1986).

- 188 Epstein, F. H., Silva, P., Spokes, K., Brezis, M. & Rosen, S. Renal medullary Na-K-ATPase and hypoxic injury in perfused rat kidneys. *Kidney international* **36**, 768-772 (1989).
- 189 Schurek, H.-J. & Alt, J. M. Effect of albumin on the function of perfused rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **240**, F569-F576 (1981).
- 190 Maack, T. Physiological evaluation of the isolated perfused rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **238**, F71-F78 (1980).
- 191 Baines, A., Christoff, B., Wicks, D., Wiffen, D. & Pliura, D. Cross-linked hemoglobin increases fractional reabsorption and GFR in hypoxic isolated perfused rat kidneys. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **269**, F628-F636 (1995).
- 192 Schurek, H. & Kriz, W. Morphologic and functional evidence for oxygen deficiency in the isolated perfused rat kidney. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **53**, 145-155 (1985).
- 193 Ito, M. *et al.* Prolyl hydroxylase inhibition protects the kidneys from ischemia via upregulation of glycogen storage. *Kidney International* **97**, 687-701, doi:<https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.10.020> (2020).
- 194 Perrotta, P. L. *et al.* Effects of methylene blue-treated plasma on red cells and stored platelet concentrates. *Transfusion* **39**, 63-69 (1999).
- 195 Feola, M., Simoni, J., Tran, R. & Canizaro, P. C. Nephrotoxicity of hemoglobin solutions. *Biomaterials, Artificial Cells and Artificial Organs* **18**, 233-249 (1990).
- 196 Heyman, S. N., Rosen, S., Epstein, F. H., Spokes, K. & Brezis, M. L. Loop diuretics reduce hypoxic damage to proximal tubules of the isolated perfused rat kidney. *Kidney International* **45**, 981-985, doi:<https://doi.org/10.1038/ki.1994.132> (1994).
- 197 Heyman, S. N., Rosenberger, C. & Rosen, S. Acute kidney injury: lessons from experimental models. *Experimental Models for Renal Diseases* **169**, 286-296 (2011).
- 198 Lasagni, L., Lazzeri, E., J Shankland, S., Anders, H.-J. & Romagnani, P. Podocyte mitosis-a catastrophe. *Current molecular medicine* **13**, 13-23 (2013).
- 199 Puelles, V. G., Bertram, J. F. & Moeller, M. J. Quantifying podocyte depletion: theoretical and practical considerations. *Cell and tissue research* **369**, 229-236 (2017).
- 200 Albaqumi, M., Soos, T. J., Barisoni, L. & Nelson, P. J. Collapsing glomerulopathy. *Journal of the American Society of Nephrology* **17**, 2854-2863 (2006).
- 201 Davalos, M., Frega, N. S., Saker, B. & Leaf, A. Effect of exogenous and endogenous angiotensin II in the isolated perfused rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **235**, F605-F610 (1978).
- 202 Ortiz, D., Cabrales, P. & Briceño, J. C. Transport of nitric oxide by perfluorocarbon emulsion. *Biotechnology progress* **29**, 1565-1572 (2013).
- 203 Donadee, C. *et al.* Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion. *Circulation* **124**, 465-476 (2011).
- 204 Shanley, P. F. *et al.* Hypoxic injury in the proximal tubule of the isolated perfused rat kidney. *Kidney international* **29**, 1021-1032 (1986).
- 205 Lieberthal, W., Rennke, H. G., Sandock, K. M., Valeri, R. & Levinsky, N. G. Ischemia in the isolated erythrocyte-perfused rat kidney. *Kidney and Blood Pressure Research* **11**, 60-69 (1988).
- 206 Brezis, M., Rosen, S., Silva, P. & Epstein, F. H. Transport activity modifies thick ascending limb damage in the isolated perfused kidney. *Kidney international* **25**, 65-72 (1984).
- 207 Schiessl, I. M. *et al.* Renal interstitial platelet-derived growth factor receptor- β cells support proximal tubular regeneration. *Journal of the American Society of Nephrology* **29**, 1383-1396 (2018).
- 208 Smeets, B. *et al.* Proximal tubular cells contain a phenotypically distinct, scattered cell population involved in tubular regeneration. *The Journal of pathology* **229**, 645-659 (2013).
- 209 Assmus, A. M., Mullins, J. J., Brown, C. M. & Mullins, L. J. Cellular plasticity: a mechanism for homeostasis in the kidney. *Acta Physiologica* **229**, e13447 (2020).

- 210 Chan, W. L., Tang, N. L. S., Yim, C. C. W., Mac-Moune Lai, F. & Tam, M. S. C. New Features of Renal Lesion Induced by Stroma Free Hemoglobin. *Toxicologic Pathology* **28**, 635-642, doi:10.1177/019262330002800501 (2000).
- 211 Van Avondt, K., Nur, E. & Zeerleder, S. Mechanisms of haemolysis-induced kidney injury. *Nature Reviews Nephrology* **15**, 671-692 (2019).
- 212 Borawski, B. & Malyszko, J. Iron, ferroptosis, and new insights for prevention in acute kidney injury. *Advances in Medical Sciences* **65**, 361-370 (2020).
- 213 Ovadia, M. & Stoward, P. Some quantitative histochemical studies of the periodic acid oxidation of glycogen in situ. *The Histochemical Journal* **3**, 233-240 (1971).
- 214 Berg, J. M., Tymoczko, J. L., jr., G. J. G. & Stryer, L. in *Stryer Biochemie* Vol. 8 Ch. 21, 723-754 (Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 2018).
- 215 Chen, Y., Fry, B. C. & Layton, A. T. Modeling glucose metabolism in the kidney. *Bulletin of mathematical biology* **78**, 1318-1336 (2016).
- 216 Kuehne, A. *et al.* Acute Activation of Oxidative Pentose Phosphate Pathway as First-Line Response to Oxidative Stress in Human Skin Cells. *Molecular Cell* **59**, 359-371, doi:<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.017> (2015).
- 217 Riganti, C., Gazzano, E., Polimeni, M., Aldieri, E. & Ghigo, D. The pentose phosphate pathway: An antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radical Biology and Medicine* **53**, 421-436, doi:<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.006> (2012).
- 218 Obratsov, V. V., Grishanova, A., Shekhtman, D. G., Sklifas, A. N. & Makarov, K. N. [Interaction of perfluorooctylbromide with liver microsomal monooxygenase]. *Biokhimiia* **58**, 1234-1239 (1993).
- 219 Obratsov, V. V., Grishanova, A., Gudkova, O. V. & Shekhtman, D. G. [Mechanism of inhibiting the cytochrome P-450-dependent monooxygenase system in liver with fluorocarbons]. *Biokhimiia* **57**, 1011-1020 (1992).
- 220 Ullrich, V. & Diehl, H. Uncoupling of monooxygenation and electron transport by fluorocarbons in liver microsomes. *European journal of biochemistry* **20**, 509-512, doi:10.1111/j.1432-1033.1971.tb01420.x (1971).
- 221 Obratsov, V. & Shekhtman, D. Effect of Perfluorochemicals on Liver Detoxication Enzymes. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* **22**, 1259-1266, doi:10.3109/10731199409138824. (1994).
- 222 Obratsov, V. V., Shekhtman, D. G., Sklifas, A. N. & Makarov, K. N. Analysis of the physico-chemical properties of fluorocarbon inducers of cytochrome P-450 in membranes of liver endoplasmic reticulum. *Biokhimiia* **53**, 613-619 (1988).
- 223 Maevisky, E. & Ivanitsky, G. in *Artificial Oxygen Carrier - Its Front Line Artificial Oxygen Carrier* (ed Koichi Kobayashi) Ch. 17, 221-228 (Springer Tokyo, 2005).
- 224 Blanck, J. *et al.* Cytochrome P-450 spin state and leakiness of the monooxygenase pathway. *Xenobiotica* **21**, 121-135 (1991).
- 225 Rong, H. *et al.* Alteration by perfluorodecalin of hepatic metabolism and excretion of phenobarbital. *Biochemical Pharmacology* **37**, 3761-3764, doi:[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90412-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90412-1) (1988).
- 226 Shrewsbury, R., Oliver, S. & White, L. The effect of moderately severe hemodilution with Fluosol-DA on cytochrome P-450 mediated antipyrine metabolism. *Biomaterials, artificial cells and artificial organs* **17**, 393-402 (1989).
- 227 Knox, S. S. *et al.* Implications of early menopause in women exposed to perfluorocarbons. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **96**, 1747-1753 (2011).
- 228 Ding, N. *et al.* Associations of Perfluoroalkyl Substances with Incident Natural Menopause: The Study of Women's Health Across the Nation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **105**, e3169-e3182 (2020).

- 229 Ogita, K., Kusunose, E., Yamamoto, S., Ichihara, K. & Kusunose, M. Multiple forms of cytochrome P-450 from kidney cortex microsomes of rabbits treated with phenobarbital. *Biochemistry international* **6**, 191-198 (1983).
- 230 Zangar, R. C., Davydov, D. R. & Verma, S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and applied pharmacology* **199**, 316-331 (2004).
- 231 Dostalek, M. *et al.* In vivo oxidative damage in rats is associated with barbiturate response but not other cytochrome P450 inducers. *Molecular pharmacology* **72**, 1419-1424 (2007).
- 232 Shaik, I. H. & Mehvar, R. Cytochrome P450 induction by phenobarbital exacerbates warm hepatic ischemia-reperfusion injury in rat livers. *Free radical research* **44**, 441-453 (2010).
- 233 Berg, J. M., Tymoczko, J. L., jr., G. J. G. & Stryer, L. in *Stryer Biochemie* Vol. 8 Ch. 20, 689-721 (Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 2018).

9. Anhang

9.1. Abkürzungsverzeichnis

AST	-	Aspartat-Aminotransferase
ATP	-	Adenosintriphosphat
BKG	-	Bromkresolgrün
BSA	-	Bovines Serumalbumin
CYP450	-	Cytochrom P450 Monooxygenase
DDFP	-	Dodecafluoropentan
DGF	-	Verzögerte Organfunktion (<i>delayed graft function</i>)
DLS	-	Dynamische Lichtstreuung
ECD	-	Spender erweiterter Kriterien (<i>expanded criteria donor</i>)
EVNP	-	<i>ex vivo</i> normotherme Perfusion
FX-80	-	Perfluorbutyltetrahydrofuran
GFR	-	glomeruläre Filtrationsrate
GL	-	Terminale Organabstoßung (<i>graftloss</i>)
HIF	-	Hypoxieinduzierbarer Faktor
LDH	-	Lactat-Dehydrogenase
NMR	-	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
PAS	-	Periodsäure-Schiff Reaktion (<i>periodic acid Schiff reaction</i>)
PBS	-	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline, TBS</i>)
PDI	-	Polydispersionsindex
PFC	-	Perfluorcarbon
PFD	-	Perfluordecalin
PFOB	-	Perfluorocetyl bromid
pO ₂	-	Sauerstoffpartialdruck
PSI	-	Pfund pro Quadratzoll (<i>pound per square inch</i>)
(Kryo-)REM	-	(Kryo-) Raster-Elektronenmikroskopie
ROS	-	Reaktive Sauerstoffspezies
SD	-	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)

SLS	-	Statische Lichtstreuung
TBARS	-	Thiobarbitursäure reaktive Substanzen (<i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TBS-T	-	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween (<i>Tris buffered saline-Tween</i> , TBS-T)
TG	-	Temperaturgradient
TUNEL	-	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
(Kryo-)TEM	-	(Kryo-) Transmissionselektronenmikroskopie
TUNEL	-	
UV	-	Ultravioletter Spektralbereich
VIS	-	Sichtbarer Spektralbereich (<i>visible</i>)

9.2. Publikationen

Perfluorocarbon-based oxygen carriers: from physics to physiology

J. Jägers, A. Wrobeln, K.B. Ferenz

Pflugers Archiv European Journal of Physiology, 473, pages 139–150 (2021)

DOI: 10.1007/s00424-020-02482-2

Albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers can avoid hypoxic tissue damage in massive hemodilution

A. Wrobeln, J. Jägers, T. Quinting, T. Schreiber, J. Fandrey, K.B. Ferenz

Scientific Reports, 2020, 10(1), 11950

DOI: 10.1038/s41598-020-68701-z

Protective Effects of Sodium Pyruvate during Systemic Inflammation Limited to the Correction of Metabolic Acidosis

K. Effenberger-Neidnicht, S. Brauckmann, J. Jägers, V. Patyk, IN Waack, M. Kirsch

Inflammation, 2019, 42(2), pp. 598-605

DOI: 10.1007/s10753-018-0917-1

Microvascular stasis and hemolysis: Coincidence or causality?

K. Effenberger-Neidnicht, S. Bornmann, J. Jägers, V. Patyk, M. Kirsch

Journal of Inflammation Research, 2019, 12, pp. 109-111

DOI: 10.2147/JIR.S197917

Moderate glucose supply reduces hemolysis during systemic inflammation

J. Jägers, S. Brauckmann, M. Kirsch, K. Effenberger-Neidnicht

Journal of Inflammation Research, 2018, 11, pp. 87-94

DOI: 10.2147/JIR.S155614

Therapeutic effects of physostigmine during systemic inflammation

K. Effenberger-Neidnicht, J. Jägers, R. Verhaegh, M. Kirsch

Journal of Inflammation Research, 2018, 11, pp. 465-475

DOI: 10.2147/JIR.S187201

Glycine selectively reduces intestinal injury during endotoxemia

K. Effenberger-Neidnicht, J. Jägers, R. Verhaegh, H. De Groot

Journal of Surgical Research, 2014, 192(2), pp. 592-598

DOI: 10.1016/j.jss.2014.06.016

9.3. Wissenschaftliche Vorträge

Isolated perfused kidneys - Opportunities and limitations

Bayer AG Research & Development, Pharmaceuticals Kidney Diseases,
Wuppertal, 22. Jan 2020

Albumin-basierte Nanokapseln im Einsatz als Sauerstoffträger in der isoliert perfundierten Rattenniere - ein Update

25. Workshop für Gewebe- und Zellschädigung, Xanten,
28. Nov 2019

Einsatz von Perfluorodecalin-Kapseln als künstliche Sauerstoffträger in der isoliert perfundierten Niere

Donnerstagsseminar medizinische Psychologie der Uni-Duisburg Essen,
Essen, 23. Mai 2019

The use of perfluorocarbon based artificial oxygen carriers is a promising approach to sustain physiological properties of the kidney during isolated warm perfusion

7th Symposium of the young Physiologists, Nürnberg,
14. März 2019

Albumin-basierte Nanokapseln im Einsatz als Sauerstoffträger in der isoliert perfundierten Rattenniere

24. Workshop für Gewebe- und Zellschädigung, Gießen,
29. Nov. 2018

9.4. Posterpräsentationen

About the characteristics of albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers under practical storage conditions

F. Nocke, J. Jägers, KB. Ferenz,

CENIDE Jahrestagung, Duisburg, 12. Nov 2019

Artificial oxygen carriers mitigate ischemia of the small intestine in vitro and in vivo

J. Jägers, A. Wrobeln, O. Karaman, KB Ferenz,

Essener Forschungstag, Essen, 1. Sept. 2019

Development of sphingosine-coupled oxygen carriers as novel drugs for treatment pneumonia

KA Becker, J. Jägers, J. Fandrey, KB Ferenz

98th Meeting of the German Physiology society, Ulm,

30. Sept - 02. Okt. 2019

Novel artificial oxygen carriers for normothermic preservation of explanted kidneys

J. Jägers, M. Kirsch, KB. Ferenz

8th congress of International Federation for Artificial Organs, Osaka, 13. – 15.

Nov. 2019

Characterizing albumin-nanoparticles:

Ever thought of combining nanophotonics and classical wet chemistry?

J. Jägers, M. Kirsch, KB. Ferenz,

CENIDE Jahrestagung, Essen, 26. Nov 2018

The impact of homogenization cycles on durability and stability of albumin-derived nanocapsules

J. Jägers, M. Kirsch, KB Ferenz

8th NRW Nano Conference, Dortmund, 21.+ 22. Nov. 2018

9.5. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen ist der Lebenslauf in der Online-Version nicht enthalten

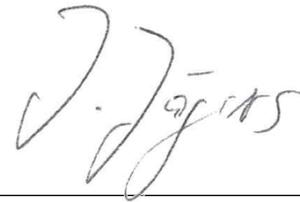
9.6. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Charakterisierung und ex vivo Untersuchung eines künstlichen
Sauerstoffträgers für den Einsatz zur Konservierung von Nieren“**

selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Arbeit sowie evtl. beigefügte Abbildungen, Zeichnungen oder Grafiken, die anderen Werken dem Wortlaut oder Sinn nach entnommen wurden, habe ich unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht. Die Arbeit ist noch nicht an anderer Stelle als Prüfungsleistung vorgelegt worden.

Essen, den 05.02.2021



Johannes Jägers

9.7. Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Ferez, die mir auf meinem Weg zur Promotion mit viel Geduld und vielen Freiheiten die Möglichkeit gegeben hat mich wissenschaftlich zu entfalten und zu entwickeln. Ich danke ihr besonders, für ihre Unterstützung beim Knüpfen von nationalen und internationalen Kontakten. Trotz vieler widriger Umstände waren wir über die letzten fünf Jahre ein gutes Team und es hat mir viel Freude bereitet mit ihr zusammen zu arbeiten.

Des Weiteren möchte ich Prof. Michael Kirsch für seine Bereitschaft danken, als Zweitgutachter zu fungieren. Er half mir während der Promotion mit Rat und hat mich vor manchem Irrgang bewahrt und mich auf den richtigen Wegen unterstützt.

Mein besonderer Dank geht an meine Projektpartner Carsten, Jochen, Oliver, Raphael, Steffi und ganz besonders Sven, die mir mit Messungen und viel wissenschaftlichem Beistand in langen Meetings und vielen Whatsapp-Nachrichten geholfen haben das gemeinsame Projekt zu einem guten Ende zu führen.

Ich möchte mich auch bei Herrn Prof. Christian Mayer bedanken, den ich ein ums andere Mal mit meinem begrenzten Verständnis für die Physik belästigt habe und der mir jedes Mal ausführlich half dieses Verständnis auf ein Vielfaches zu erweitern.

Anna Wrobeln möchte ich herzlich danken für die vielen Stunden die sich als Laborkollege und Freund genommen hat, um sie mit Fachgesprächen zu verbringen, in denen wir experimentelle Planungen und die Ergebnisse aus diesen Experimenten diskutiert haben. Ich danke auch für die vielen nichtwissenschaftlichen Gespräche bei denen ich Frust abladen und Motivation tanken konnte, um meine Arbeit zu einem guten Ende zu führen.

Ein gesonderter Dank für die Hilfe und Unterstützung bei vielen Experimenten und für viele befruchtende Gespräche gilt Dr. Miriam Cantore.

Ich möchte mich bei dem ganzen Institut der Physiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Fandrey und besonders bei der AG Ferez bedanken, für den Austausch und die Freude an der Arbeit!

Ich möchte mich außerdem bei den Mitarbeitern der physiologischen Chemie bedanken, in der ich das erste Jahr meiner Arbeit verbracht habe und davor schon etliche Jahre arbeiten durfte.

Ein weiterer Dank geht an PD Dr. Holger Jastrow und Bernd Walkenfort für die Durchführung der Elektronenmikroskopie.

Ich danke meiner Frau Romina für die Unterstützung im Alltag und mit den Kindern, die ich an jedem einzelnen Abend, den ich im Institut verbracht habe, anstatt bei meiner Familie zu sein, in guten Händen wusste. Ich danke meiner gesamten Familie, die, wo immer es ging, mich unterstützt haben und mir mit viel Geduld meinen Rücken freigehalten haben.