

Modifikation und Optimierung biologischer, physikalischer und
chemischer Eigenschaften Perfluorcarbon-basierter
Nanopartikel als künstliche Sauerstoffträger

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

der Fakultät für Chemie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Fabian Nocke

geboren in Essen

Universität Duisburg-Essen

2024

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2021 bis Juli 2024 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Katja B. Ferenz am Institut für Physiologie/Physiologische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachterin: Prof. Dr. Katja B. Ferenz
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Kirsch
3. Gutachter: Prof. Dr. Bastian Schmack

Datum der Disputation: 09.12.2024

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/82765

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20241218-070542-2

Alle Rechte vorbehalten.

We would accomplish many more things if we did not think of them as impossible.

Vince Lombardi

Erklärung

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Stelle der Arbeit sowie eventuell 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.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis	XI
Formelverzeichnis	XII
1. Einleitung.....	1
2. Theoretischer Hintergrund	3
2.1 Emulsionen	3
2.1.1 Aufbau von Emulsionen.....	4
2.1.2 Grenzschichten und ihre Bedeutung für Emulsionen.....	4
2.1.3 Stabilität von Emulsionen	5
2.1.4 Optische Eigenschaften.....	12
2.1.5 Physikalische und chemische Eigenschaften	13
2.2 Perfluorcarbone.....	15
2.3 Emulgatoren.....	17
2.3.1 Albumin.....	19
2.3.2 Lecithin	19
2.4 Herstellungs- und Analysemethoden.....	20
2.4.1 Hochdruckhomogenisation	20
2.4.2 Dynamische Lichtstreuung	22
2.4.3 Methoden zur Bestimmung der Viabilität und metabolischen Aktivität von kultivierten Zellen.....	24
2.4.4 Hypoxie-induzierter Faktor	26
2.5 Kardioplegie	26
3. Materialien und Methoden	29
3.1 Materialien	29

Inhaltsverzeichnis

3.1.1 Geräte	29
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	31
3.1.3 Chemikalien	32
3.1.4 Lösungen, Medien und Puffer	34
3.1.5 Kits	35
3.1.6 Software	36
3.2 Methoden	36
3.2.1 Synthesen	36
3.2.2 Dynamische Lichtstreuung	38
3.2.3 Sauerstoffbestimmung mittels Clark-Elektrode	40
3.2.4 Viskositätsmessung	40
3.2.5 Messung des Zeta-Potentials	42
3.2.6 Toxikologische Analysen	43
3.2.7 Bestimmung von HIF-1 α mittels Western Blot	44
3.2.8. Biochemische Analysen zur Bestimmung der metabolischen Zellaktivität und ROS-Bildung in der Zellkultur	45
3.2.9 Blutgasanalyse	46
3.2.10 Statistik	46
3.3 Versuchsdurchführungen	47
3.3.1 Basisdaten	47
3.3.2 Lagerungsstabilität	47
3.3.3 Kompatibilität mit klinisch relevanten kristalloiden und kolloidalen Lösungen	47
3.3.4 Simulierte normotherme Maschinenperfusion	48
3.3.5 Auswirkung auf eine biologische Umgebung	50
3.3.6 Modifikation für eine verlängerte Sauerstofffreisetzung	50
4. Ergebnisse	53
4.1 Basisdaten	53

Inhaltsverzeichnis

4.2 Lagerungsstabilität und -verhalten	56
4.3 Verhalten in klinisch relevanten kristalloiden und kolloidalen Lösungen	58
4.4 Simulierte normotherme Maschinenperfusion	60
4.5 Auswirkung auf eine biologische Umgebung.....	62
4.6 Sauerstoffträger mit einer verlängerten Sauerstofffreisetzung	63
5. Diskussion	70
5.1 Basis- und Lagerungsdaten	72
5.2 Kompatibilität mit klinisch relevanten kristalloiden und kolloidalen Lösungen .	75
5.3 Verhalten in einer simulierten normothermen Maschinenperfusion.....	77
5.4 Sauerstoffträger mit einer verlängerten Sauerstofffreisetzung	79
6. Zusammenfassung	88
7. Literatur	90
8. Anhang	109
8.1 Ergänzungen zur Arbeit.....	109
8.1.1 Messung der LENOX basic und von freiem PFD mittels gepulster Feldgradient-NMR	109
8.1.2 Zusammensetzung und Eigenschaften der verwendeten klinisch relevanten kristalloiden und kolloidalen Lösungen zur Herstellung der LENOX Emulsionen	110
8.2 Publikationsliste, Konferenzteilnahmen und Sonstiges	112
8.2.1 Patent.....	112
8.2.2 Publikationen	112
8.2.3 Konferenzteilnahmen.....	113
8.2.4 Preise und Sonstiges.....	114
Danksagung	117

Abkürzungsverzeichnis

A-AOC	<i>Albumin-basierte künstliche Sauerstoffträger</i>
ADP	<i>Adenosindiphosphat</i>
AOC.....	<i>künstlichen Sauerstoffträger</i>
ATP.....	<i>Adenosintriphosphat</i>
BGA.....	<i>Blutgasanalyse</i>
BNIP3.....	<i>BCL2 interacting protein 3</i>
COX.....	<i>Cytochrom C-Oxidase</i>
DLS	<i>dynamische Lichtstreuung</i>
DLVO-Theorie.....	<i>Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek-Theorie</i>
DMSO.....	<i>Dimethylsulfoxid</i>
E-ROC.....	<i>extended-release oxygen carrier</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GLUT1	<i>Glukosetransporter 1</i>
GOX	<i>Glukoseoxydase</i>
HBOC	<i>Hämoglobin-basierte Sauerstoffträger</i>
HIF.....	<i>Hypoxie-induzierter Faktor</i>
HKE.....	<i>Herz-Kreislauf-Erkrankungen</i>
HOX.....	<i>Hypoxie</i>
HPH.....	<i>Hochdruckhomogenisation</i>
HRE.....	<i>hypoxia response elements</i>
HRP	<i>Meerrettichperoxidase</i>
HSA.....	<i>humanes Serumalbumin</i>
IgG.....	<i>Anti-Kaninchen-Immunglobulin G</i>
LDH	<i>Laktatdehydrogenase</i>
LENOX	<i>Lecithin modifizierte nanoskalierte Sauerstoffträger</i>
LENOX-OFH	<i>LENOX-optimiert für Humanalbumin</i>
LSW-Theorie	<i>Lifshitz-Slyozov-Wagner-Theorie</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid</i>
NADH	<i>Nicotinamidadenindinukleotid</i>
NADPH.....	<i>Nicotinamidadenindinukleotidphosphat</i>
NOX.....	<i>Normoxie</i>

Abkürzungsverzeichnis

PC	<i>Phosphatidylcholin</i>
PE.....	<i>Phosphatidylethanolamin</i>
PFC	<i>Perfluorcarbone</i>
PFCOC.....	<i>Perfluorcarbon-basierte Sauerstoffträger</i>
PFD	<i>Perfluordecalin</i>
PFG-NMR.....	<i>gepulste Feldgradient-NMR</i>
PI.....	<i>Phosphatidylethanolamin</i>
ROS.....	<i>radikale Sauerstoffspezies</i>
SDS-PAGE	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>
TNF- α	<i>Tumornekrosefaktor-alpha</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Interaktionspotential nach der DLVO-Theorie.....	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Tropfenzerkleinerung nach dem Mechanismus der Rayleigh-Tomotika-Instabilität.....	22
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Syntheseprozesses von LENOX basic.	37
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Messablaufs zur Bestimmung der Viskosität und die Erklärung der einzelnen Aktionsblöcke.	41
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Perfusionsanlage zur simulierten Maschinenperfusion.	49
Abbildung 6: Graphische Darstellung der Partikelgrößenverteilungen und der Rheologie von LENOX basic, LENOX OFH und der Kontrollemulsion.	55
Abbildung 7: Physiko-chemische Analyse der LENOX basic und LENOX OFH Emulsionen während einer 42-tägigen Lagerung.	58
Abbildung 8: Verschiedene physiko-chemische Daten von LENOX (Wasser), LENOX (Custodiol) und LENOX (STEEN Solution) während einer simulierten normothermen Perfusion ohne Organ.....	62
Abbildung 9: Bestimmung der Kompatibilität von LENOX basic mit Hep 3b-Zellen..	63
Abbildung 10: Modifizierte Sauerstofffreisetzung der LENOX durch Änderung der Zusammensetzung des Perfusionsmediums.	64
Abbildung 11: HIF-1 α -Expression nach Inkubation mit E-ROC, Custodiol oder unbeladenen LENOX (ohne Oxy) über einen Zeitraum von 4 h.	66
Abbildung 12: Biochemische Analyse der E-ROC hinsichtlich ihrer Wirkung auf Kardiomyozyten (HL-1).....	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen kolloidalen Systeme.....	4
Tabelle 2: Prozesseinstellungen für die DLS-Messung.....	39
Tabelle 3: Standardarbeitsanweisung zur Bestimmung der Viskosität.....	42
Tabelle 4: Physiko-chemische Messwerte von LENOX basic, LENOX OFH und der Kontrollemulsion.....	56
Tabelle 5: Physiko-chemische Eigenschaften der LENOX basic Emulsion in verschiedenen klinisch relevanten kristalloiden und kolloidalen Lösungen.....	59

Formelverzeichnis

Formel 1: Benötigte Energie zur Vergrößerung der Grenzfläche.....	5
Formel 2: Young-Laplace-Gleichung.	5
Formel 3: Stokes-Gesetz zur Berechnung der Sedimentationsgeschwindigkeit.....	9
Formel 4: Kelvin-Gleichung zur Berechnung der Löslichkeit eines Tropfens in Abhängigkeit seines Radius.	11
Formel 5: Formel zur Berechnung der Geschwindigkeit der Ostwald-Reifung.	11
Formel 6: Formel zur Berechnung der Intensität von gestreutem Licht.	12
Formel 7: Beschreibung des Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit der Brown'schen Molekularbewegung.	23
Formel 8: Stokes-Einstein-Gleichung.	23
Formel 9: Berechnung der Spanne der Partikelgrößenverteilung.....	39
Formel 10: Berechnung der Toxizität durch LDH-Freisetzung.	43

1. Einleitung

Der menschliche Körper ist zu außergewöhnlichen Dingen fähig. Durch seinen anatomischen und physiologischen Aufbau, kann er bis zu 45 km/h schnell laufen^[1], ein über 260 kg schweres Gewicht mit den Händen heben^[2] oder 2,4 m hoch springen.^[3] Um diese besonderen Dinge tun als auch alltägliche Aufgaben bewältigen zu können, benötigt der menschliche Körper unter anderem Sauerstoff. Dieser wird aus der Umgebungsluft über die Lunge ins Blut übertragen und mit Hilfe des Hämoglobins zu den Zellen transportiert. Unter besonderen Umständen kann die Sauerstoffversorgung eingeschränkt sein. Der Zustand des Sauerstoffmangels wird Hypoxie genannt und hat erhebliche Einflüsse auf den Gesundheitszustand des Menschen. Bei plötzlicher Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr entwickelt sich in kurzer Zeit eine Sauerstoffarmut (Anoxie), da die im Körper vorhandenen Sauerstoffreserven stark limitiert sind. Der im menschlichen Organismus vorhandene Sauerstoff reicht für eine Versorgung von 4-5 min. Wird die Sauerstoffversorgung nach dieser Zeit nicht wiederhergestellt, kann umgehend der Exitus eintreten.^[4, 5] Durch exzessives Training und besonderen biologischen Voraussetzungen, wie ein überdurchschnittliches Lungenvolumen oder ein reduzierter Sauerstoffbedarf, kann die Hypoxietoleranzzeit verlängert werden.^[4] Der professionelle Apnoetaucher Stéphane Mifsud stellte 2009 mit einer Zeit von 11 min und 35 s den aktuellen Weltrekord für den längsten statischen Tauchgang ohne Sauerstoffzufuhr auf.^[6] Ein durchschnittlicher Mensch verliert bei Sauerstoffmangel, meistens innerhalb weniger Minuten das Bewusstsein, da das Gehirn am empfindlichsten auf Hypoxie reagiert.^[5]

Die Therapie von Hypoxie besteht aus der Behandlung der Hypoxie-verursachenden Pathologie. Beispielsweise wird bei einem Pneumothorax der intrapleurale Druck normalisiert oder bei einer Obstruktion der oberen Atemwege der Fremdkörper entfernt.^[4] Liegt die Hypoxie durch die verminderte Transportfähigkeit oder durch einen grundlegenden Mangel des Sauerstofftransporters Hämoglobin vor, so muss dieser partiell oder vollständig substituiert werden. Mit der Substitution von natürlichem Hämoglobin durch artifizielle Alternativen beschäftigt sich die Wissenschaft der künstlichen Sauerstoffträger (AOC). Das Ziel ist es, eine vollständig synthetische Alternative zur intravenösen Applikation zu entwickeln, die beispielsweise als Therapie bei Hypoxie angewendet werden kann. Über die Zeit haben sich zwei grundlegende Arten von AOC entwickelt. Neben den Blut-ähnlichen Hämoglobin-basierten

1. Einleitung

Sauerstoffträgern (HBOC) wird auch an den vielversprechenden Perfluorcarbon-basierten Sauerstoffträgern (PFCOC) geforscht. Von beiden Arten der AOC existieren Produkte, welche schon in klinischen Studien getestet wurden. Bei den HBOC wurden Hemopure, Hemospan und Hemo2life im Menschen getestet. Die PFCOC Oxygent, Perftoran und Oxycyte wurden ebenfalls klinisch getestet, wobei Perftoran sogar eine Zulassung zur klinischen Applikation in Russland, Mexiko, Kasachstan, Kirgistan und der Ukraine erhielt. Leider wurde keines dieser Produkte als AOC für Europa oder den USA zugelassen. Meistens führten Applikations- oder Sicherheitsprobleme während der Verwendung zum Abbruch der klinischen Studien.^[7, 8] Die aktuelle präklinische Forschung beschäftigt sich mit neuen Ansätzen zur Verbesserung der AOC-Wirkung und -Stabilität. Hemarin-M101 ist beispielsweise ein HBOC, wobei das Hämoglobin aus Wattwürmern gewonnen wird. Das Besondere an dem Wattwurm-Hämoglobin ist, dass es bis zu 156 Moleküle Sauerstoff pro Hämoglobinmolekül aufnehmen kann, wohingegen das menschliche Hämoglobin lediglich vier Moleküle aufnehmen kann. Somit benötigt Hemarina-M101 einen geringeren Sauerstoffpartialdruck, um die gleiche Menge an Sauerstoff zu tragen als menschliches Blut.^[9] Auf der Seite der PFCOC haben sich Albumin-basierte künstliche Sauerstoffträger (A-AOC) als vielversprechende Möglichkeit gezeigt. Durch die Verwendung von dem körpereigenen Albumin als Hüllmaterial, soll eine immunologische Reaktion minimiert werden und somit die Verträglichkeit der A-AOCs verbessert werden.^[7, 10]

Ziel dieser Arbeit ist es, die A-AOCs in ihrer Stabilität zu optimieren und zusätzlich ihre Funktionalität als künstliche Sauerstoffträger zu modifizieren. Durch diese Änderungen sollen neue Anwendungsgebiete erschlossen und gleichzeitig ihre bereits vorhandenen positiven Eigenschaften beibehalten werden. Speziell soll die Kurz- und Langzeitlagerungsstabilität verbessert werden und die Kompatibilität mit einem breiteren Spektrum an klinisch relevanten kristalloiden und kolloidalen Lösungen ermöglicht werden. Als neues Anwendungsgebiet wurde die Sauerstoffversorgung während einer Kardioplegie gewählt, wobei ein Mechanismus zu einer verlängerten Sauerstofffreisetzung der AOCs entwickelt werden soll. Die potenzielle Toxizität und die molekulare Funktionalität der AOCs sollen durch Zellkulturversuche bestimmt werden.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1 Emulsionen

Die Kolloid-Wissenschaft ist ein Beispiel für die enge Verbindung der Naturwissenschaften untereinander. In ihrem Kern ordnet sie sich im Bereich zwischen Physik und Chemie an und kann nur durch die Kombination aus Mechanik der Moleküle (Physik) und Reaktionen an Grenzflächen (Chemie) ausreichend beschrieben werden.^[11] Einer der ersten Kolloid-Wissenschaftler war der englische Chemiker Thomas Graham (1805 – 1869).^[12] In seiner Arbeit aus dem Jahr 1861 fand Graham heraus, dass Stoffe auf Grund ihrer Diffusionsfähigkeit in leicht diffundierende Stoffe (Zucker, Kochsalz) und in schwer diffundierende Stoffe (Eiweiß, Karamell) unterteilt werden können. Dabei gehörten die leicht diffundierenden Vertreter zu den gut kristallisierenden Stoffen, wohingegen die langsam diffundierenden zu den nichtkristallisierenden Stoffen gehörten. Somit konnte Graham aus den Diffusionseigenschaften zwei neue Stoffkategorien aufstellen: Kristalloide und Kolloide.^[13]

Kolloide bringen, auf Grund ihres Aufbaus, neue Eigenschaften mit sich. Sie besitzen gleichzeitig Ähnlichkeiten mit echten Lösungen und mit Mehrphasensystemen. Zusätzlich besitzen sie eine große spezifische Oberfläche, bilden elektrostatische Doppelschichten aus. Außerdem können Kolloide Adsorptionsprozesse an ihrer Grenzfläche ausführen und sind in der Lage, Cluster und Aggregate zu bilden.^[14] Bei einem kolloidalen System liegt eine Phase in Form kleiner Partikel vor (disperse Phase), die in einer weiteren Phase (kontinuierliche Phase) fein verteilt wird. Die Systeme werden nach den vorliegenden Aggregatzuständen der dispersen und kontinuierlichen Phasen unterschieden. Eine Übersicht der verschiedenen kolloidalen Systeme ist in Tabelle 1 dargestellt. Emulsionen sind, wie in Tabelle 1 gezeigt, ein kolloidales System aus zwei Flüssigkeiten. In dieser Arbeit werden hauptsächlich die Eigenschaften von Emulsionen behandelt. Somit werden alle nachfolgenden Beschreibungen und Beobachtungen auf Emulsionen bezogen, sofern es nicht anders angegeben wird.

2. Theoretischer Hintergrund

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen kolloidalen Systeme.^[15]

Disperse Phase	Kontinuierliche Phase	Kolloidales System
fest	flüssig	Suspension
flüssig	flüssig	Emulsion
gasförmig	flüssig	Schaum
flüssig	gasförmig	Aerosol
flüssig	fest	Gel
fest	gasförmig	Rauch
fest	fest	Komposit

2.1.1 Aufbau von Emulsionen

Damit eine Emulsion entstehen kann, müssen beide Flüssigkeiten unterschiedliche intermolekulare Kräfte ausbilden, sodass sie sich nicht mischen. Die bekanntesten Vertreter dieser nicht mischbaren Flüssigkeiten sind Öle und Wasser. Deswegen werden Emulsionen in Öl-in-Wasser und Wasser-in-Öl Emulsionen unterschieden, abhängig davon, welche der Flüssigkeiten die disperse und welche die kontinuierliche Phase darstellt. Als dritte Komponente wird ein Emulgator benötigt. Emulgatoren sind meist geladene, amphiphile Stoffe, die sich an der Grenzschicht zwischen disperser und kontinuierlicher Phase anlagern und das System somit stabilisieren.^[16]

2.1.2 Grenzschichten und ihre Bedeutung für Emulsionen

In einer Emulsion treffen zwei nicht mischbare Flüssigkeiten aufeinander, wobei die Tropfen der einen Flüssigkeit vollständig von der anderen Flüssigkeit umschlossen werden. Somit entsteht an der Kontaktfläche der beiden Flüssigkeiten eine Grenzfläche. Diese Grenzfläche erstreckt sich auf Grund der Geometrie der Flüssigkeitstropfen über die gesamte Oberfläche der Tropfen. In der Realität ist die Grenze zwischen den beiden Flüssigkeiten keine zweidimensionale Grenzfläche, sondern eine dreidimensionale Grenzschicht. Dabei ändern sich die Eigenschaften innerhalb der Grenzschicht kontinuierlich, wohingegen die Eigenschaften innerhalb der Kernphasen isotrop sind. An der Grenzfläche findet eine sprunghafte Änderung der Eigenschaften von der einen Flüssigkeit zur anderen statt.^[17, 18]

Ist ein Molekül im Hauptteil einer Phase, so wirken die intermolekularen Kräfte im zeitlichen Mittel von allen Seiten homogen auf das zentrale Molekül. Befindet sich hingegen das Molekül an der Grenzfläche, so wirken die Kräfte nicht mehr homogen

2. Theoretischer Hintergrund

auf das zentrale Molekül und es wird von der Grenzfläche in das Innere der Phase gezogen. Diese Wechselwirkung ist die Ursache für die Oberflächen- bzw. Grenzflächenspannung (γ). Um die Grenzfläche zu vergrößern, muss eine reversible Arbeit aufgewendet werden. Sind der Druck und die Temperatur konstant, so entspricht die aufzubringende Arbeit der freien Gibbs-Energie (dG).^[17-19]

Formel 1: Benötigte Energie zur Vergrößerung der Grenzfläche.^[19]

$$dG = \gamma \cdot dA \quad (1)$$

dG = Änderung der freien Gibbs-Energie, γ = Grenzflächenspannung, dA = Änderung der Grenzfläche

Die Grenzflächenspannung bewirkt eine spezifische räumliche Anordnung von Emulsionstropfen. Bei einer Emulsion bilden die Tropfen der dispersen Phase sphärische Kugeln, da diese von allen geometrischen Körpern das geringste Verhältnis von Oberfläche zu Volumen besitzen. Auf Grund dieser Kugelform werden die Grenzflächenmoleküle zum Mittelpunkt der Kugel gezogen und erzeugen somit einen Kompressionsdruck im Inneren des Tropfens. Befindet sich der Emulsionstropfen im Gleichgewicht, so ist der Innendruck genauso groß, wie die Summe der von außen wirkenden Drücke (Außendruck + Kompressionsdruck durch Oberflächenspannung). Die Young-Laplace-Gleichung beschreibt die Druckänderung innerhalb eines kugelförmigen Tropfens in Abhängigkeit seines Radius. Wie Formel 2 zeigt, steigt der Innendruck eines Tropfens mit Abnahme seines Radius. Das bedeutet, dass kleinere Emulsionstropfen einen größeren Innendruck besitzen und somit energetisch instabiler sind.^[18-20]

Formel 2: Young-Laplace-Gleichung.^[18]

$$\Delta p = \frac{2\gamma}{r} \quad (2)$$

Δp = Druckänderung im Emulsionstropfen, γ = Grenzflächenspannung, r = Tropfenradius

2.1.3 Stabilität von Emulsionen

Emulsionen sind ein thermodynamisch instabiles System und streben eine vollständige Phasentrennung bzw. Entmischung bei gleichzeitiger Minimierung der Grenzschicht an. Die Trennung der Phasen kann durch verschiedene Einzel- und Kombinationsprozesse erfolgen. Diese Phasentrennung wird bei Emulsionen Reifung genannt. Somit wird bei den Prozessen von Reifeprozessen gesprochen. Der Begriff Stabilität bezieht sich bei Emulsionen in der Regel auf die Vermeidung der

2. Theoretischer Hintergrund

Entmischung über einen gewissen Zeitraum. Die Stabilität eines kolloidalen Systems ist abhängig von dem Zusammenspiel stabilisierender und destabilisierender Kräfte. Mit Hilfe der Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek-Theorie (DLVO-Theorie) können diese Kräfte und ihre Wirkung innerhalb einer Emulsion beschrieben werden. Die DLVO-Theorie kann zur Einschätzung und Vorhersage der Emulsionsstabilität herangezogen werden.^[21, 22]

2.1.3.1 DLVO-Theorie

Die DLVO-Theorie bringt die zwischen Emulsionstropfen wirkenden Kräfte in einen Zusammenhang, wobei sich die Kräfte in zwei wesentliche Arten unterteilen lassen. Zum einen wirkt die anziehende Van-der-Waals-Kraft und zum anderen die repulsiven Kräfte. Um die repulsiven Kräfte zu verstehen, muss zuerst die Entstehung der elektrostatischen Doppelschicht erläutert werden.^[21]

In Kapitel 2.1.1 wurde bereits beschrieben, dass Emulsionstropfen aus einer Kernphase (Öl oder Wasser) und einem Emulgator bestehen. Dieser Emulgator ist vorwiegend ein geladenes Amphiphil und lagert sich auf Grund seiner Eigenschaften an der Grenzfläche zwischen den beiden Phasen an. Die geladenen Teilchen führen zu einer Potentialdifferenz an der Grenzfläche und erzeugen somit eine Ladung an der Oberfläche. Die Oberflächenladung zieht entgegengesetzt geladene Teilchen an, die wieder Co-Ionen anziehen, welche die gleiche Ladung besitzen wie der Emulgator. Dadurch entsteht eine diffuse elektrostatische Schicht, die sich bis zu einer gewissen Entfernung von der Grenzfläche erstreckt. Dabei fällt das Potential exponentiell mit der Entfernung ab. Diese rein diffuse Doppelschicht wurde nach den Wissenschaftlern Gouy und Chapman benannt. Das Modell der Gouy-Chapman-Doppelschicht wurde um eine starre geladene Schicht an der Grenzfläche erweitert. Diese entsteht durch die Adsorption von entgegengeladenen Ionen an die Grenzfläche bzw. den Emulgator. Das Potential in dieser starren Stern-Schicht, benannt nach dem Erfinder, nimmt mit steigender Entfernung von der Grenzfläche linear ab.^[21-24]

Nähern sich nun zwei Emulsionstropfen an, so wirken die elektrostatischen Doppelschichten der beiden Tropfen repulsiv. Bei der Annäherung überlappen die geladenen Schichten und verursachen eine coulombsche Abstoßungskraft, die gegen jede Oberfläche wirkt und den Abstand der zwei Emulsionstropfen vergrößert. Somit gehört die Doppelschicht zu den stabilisierenden Eigenschaften der Emulsionen, da sie die Phasentrennung verlangsamt.^[23]

2. Theoretischer Hintergrund

Eine weitere repulsive Kraft beruht auf der sterischen Abstoßung zweier Tropfen. Befinden sich an der Grenzfläche sterisch anspruchsvolle Emulgatormoleküle, so können diese ebenfalls eine Annäherung der Tropfen erschweren. Bei der räumlichen Annäherung zweier Tropfen, treffen ab einem bestimmten Zeitpunkt die Moleküle der Emulgatoren aufeinander und können sich entweder überlappen oder erfahren eine Kompression. Beide Prozesse führen zu einem Anstieg der lokalen Moleküldichte, was wiederum zur Folge hat, dass sich der osmotische Druck in der Region erhöht, als Resultat der unvorteilhaften Mischung gleicher Moleküle. Zusätzlich verringert sich die Konfigurationsentropie der Emulgatormoleküle in dem Kontaktbereich. Die Reduktion der Konfigurationsentropie entsteht durch die Abnahme des vorhandenen Volumens auf Grund der Überlappung und der Kompression der Moleküle.^[25-27]

Den repulsiven Kräften steht die Anziehungskraft entgegen, welche auf der van-der-Waals-Kraft beruht. Sie sorgt dafür, dass sich die Kerne der Emulsionstropfen so lange gegenseitig anziehen, bis sich die Tropfen überlappen. Die van-der-Waals-Kraft gehört zu den weitreichenden Kräften und nimmt bei kurzen Entfernungen stark zu.^[23]

Üblicherweise ist die anziehende Kraft weitreichender als die Abstoßungskraft, wodurch sich zwei Emulsionstropfen zunächst anziehen (Abbildung 1 (2)). Ab einer gewissen Distanz wirkt die repulsive Kraft dieser Anziehung entgegen (Abbildung 1 (3)). Unterschreiten die beiden Tropfen einen bestimmten Abstand, wirkt die Van-der-Waals-Kraft stärker als die coulombsche Abstoßungskraft und die beiden Emulsionstropfen können sich trotz geladener Grenzfläche überlappen (Abbildung 1 (4)). In Abbildung 1 wird dieser Sachzusammenhang bildlich dargestellt.^[21-23, 28, 29]

2. Theoretischer Hintergrund

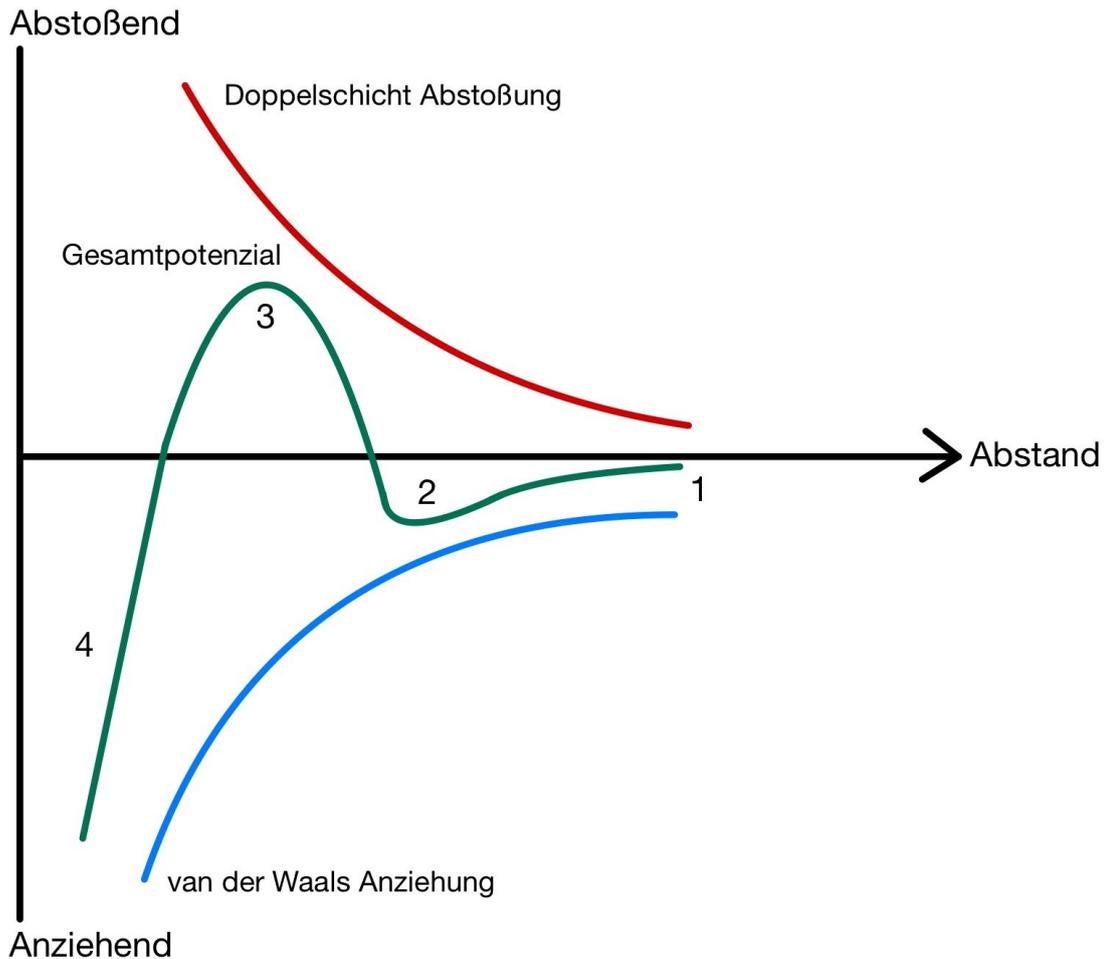


Abbildung 1: Interaktionspotential nach der DLVO-Theorie. Es wurde das Potential gegen den Partikelabstand aufgetragen. Der rote Graph zeigt die repulsiven Kräfte und der blaue Graph die Anziehungskräfte. Die Summe beider Kräfte und somit das Gesamtpotenzial ist durch den grünen Graphen dargestellt. Eigene Darstellung angelehnt an ^[28].

2.1.3.2 Sedimentation und Aufrahmung

Die Sedimentation bzw. Aufrahmung ist das Resultat der Auswirkung äußerer Kräfte, wie der Schwerkraft und der Zentrifugalkraft, auf die Emulsionstropfen. Überschreiten diese Kräfte die Diffusionskraft, entsteht im System ein Konzentrationsgefälle, wobei sich die Tropfen in Abhängigkeit ihres Dichteunterschieds zur kontinuierlichen Phase am Boden oder an der Flüssigkeitsoberfläche sammeln. Bei der Sedimentation spielt die Tropfengröße eine zentrale Rolle. Bilden größere Tropfen eine Rahmschicht auf Grund von Sedimentation, können sich die kleineren Tropfen in den Zwischenräumen anlagern und somit die Sedimentschicht verdichten. Dies führt zu einem engeren Kontakt zwischen den einzelnen Tropfen, das wiederum weitere Reifeprozesse begünstigt. Um eine Einschätzung über die Sedimentationsgeschwindigkeit tätigen zu können, wird das Stokes-Gesetz herangezogen. Wie die Formel (3) zeigt, ist die Stokes-Geschwindigkeit (v_0) maßgeblich vom Radius (r) des Emulsionstropfen

2. Theoretischer Hintergrund

abhängig. Demnach besagt das Stokes-Gesetz, dass größere Tropfen schneller sedimentieren als kleinere.^[16, 30-33]

Formel 3: Stokes-Gesetz zur Berechnung der Sedimentationsgeschwindigkeit.^[32]

$$v_0 = \frac{2 \Delta \rho r^2}{9 \eta_0} \quad (3)$$

v_0 = Stokes-Geschwindigkeit, $\Delta \rho$ = Dichteunterschied zwischen beiden Phasen,
 r = Tropfenradius, η_0 = Viskosität der kontinuierlichen Phase

Aus dem Stokes-Gesetz können Maßnahmen zur Prävention gegen die Sedimentation abgeleitet werden. Um die Sedimentationsgeschwindigkeit zu verlangsamen, kann die Partikelgröße reduziert oder die Dichten der beiden vorliegenden Phasen angeglichen werden. Dafür können sogenannte Verdickungsmittel verwendet werden, um die Geschwindigkeit der Sedimentation zu reduzieren. Verdickungsmittel sind hochmolekulare Stoffe natürlichen Ursprungs (Cellulose, Alginat) oder synthetisch hergestellte Polymere. Sie haben die Eigenschaft, die Viskosität der kontinuierlichen Phase proportional ihrer Konzentration zu erhöhen und somit die Stokes-Geschwindigkeit zu reduzieren. Hierbei gilt eine besondere Prüfung des Anwendungsgebiets, da die Fließeigenschaft der Emulsion durch die Verdickungsmittel stark beeinträchtigt werden kann. Deswegen ist diese Möglichkeit der Prävention nicht für alle Anwendungsgebiete sinnvoll.^[32, 33]

2.1.3.3 Flockung, Agglomerate und Aggregate

Abbildung 1 zeigt, dass die Anziehungskräfte zweier Emulsionstropfen über eine größere Entfernung wirken als die abstoßenden Kräfte. Nähern sich Tropfen in einer hochkonzentrierten Emulsion so weit an, dass die Anziehungskräfte die Abstoßungskräfte übersteigen, so ballen sie sich zu einem Agglomerat zusammen, ohne die primäre Tropfengröße zu verändern. Dieser reversible Prozess wird Ausflockung genannt.^[26, 34, 35] Nähern sich die Tropfen weiter an, so können sich Brücken zwischen den inneren Phasen ausbilden und es entsteht ein Aggregat. Dieser Vorgang ist irreversibel und gilt als stark destabilisierend für die Emulsion, da dieses Aggregat sich wie ein großer Partikel verhält und die Sedimentation und andere Reifeprozesse begünstigt.^[16, 34]

2. Theoretischer Hintergrund

2.1.3.4 Koaleszenz

Die bisher beschriebenen Destabilisierungsprozesse gehören, mit Ausnahme der Aggregation, zu der Art, bei denen die Größe der Tropfen unverändert bleibt. Ein destabilisierender Prozess, bei der sich die primäre Partikelgröße irreversibel ändert, ist die Koaleszenz. Bei der Koaleszenz treffen zwei Emulsionstropfen aufeinander und verschmelzen zu einem größeren Tropfen. Die Triebkraft der Koaleszenz ist die Oberflächenspannung. Wie die Formel (1) zeigt, wird die Oberflächenspannung durch Vergrößerung der Oberfläche verringert. Befinden sich zwei Tropfen auf Grund von beispielsweise Flockung, Sedimentation, Agglomeration oder Aggregation, in räumlicher Nähe zueinander, so bildet sich ein dünner Flüssigkeitsfilm zwischen den Tropfen. Dieser Film dient als eine Art Schutzschicht, die einen direkten Kontakt zwischen den inneren Phasen der Tropfen verhindert. Kommt es innerhalb des Flüssigkeitsfilms zu einer lokalen thermischen oder mechanischen Fluktuation der Filmdicke, so findet eine Filmruptur statt. An der Bruchstelle entsteht eine Flüssigkeitsbrücke zwischen den inneren Phasen. Erreicht diese Flüssigkeitsbrücke eine kritische Größe, erzeugt sie einen Flüssigkeitsstrom auf Grund des stark gekrümmten Meniskus zwischen den Tropfen. Folglich können die ungeschützten Kernphasen ungehindert interagieren und verschmelzen, sodass aus den zwei Tropfen ein einzelner, vergrößerter entsteht.^[36-40]

Um die Langlebigkeit und damit die Stabilität der Emulsion zu gewährleisten, muss die Koaleszenz auf ein Minimum reduziert werden. Dies geschieht durch eine bessere Abschirmung der einzelnen Tropfen. Die Folge ist eine verringerte Wahrscheinlichkeit, dass der Flüssigkeitsfilm zwischen zwei Tropfen rupturiert. Dazu muss die Grenzfläche mit ausreichend vielen Emulgatormolekülen bedeckt sein. Hierbei kann die Kombination von unterschiedlichen Emulgatoren hilfreich sein. Werden kleinmolekulare Emulgatoren mit großmolekularen kombiniert, können die kleineren Moleküle die Lücken zwischen den großen Emulgatormolekülen an der Grenzfläche besetzen und somit den Emulsionstropfen besser abschirmen. Zusätzlich sorgt eine höhere Konzentration von Emulgatormolekülen an der Grenzfläche für eine stärkere repulsive Kraft zwischen zwei Tropfen, was eine Annäherung erschwert.^[36, 41]

2.1.3.5 Ostwald-Reifung

Ein weiterer destabilisierender Prozess, welcher die primäre Tropfengröße ändert, ist die Ostwald-Reifung. Grundlegend findet ein Massentransfer von kleineren

2. Theoretischer Hintergrund

Emulsionstropfen zu größeren statt, wobei sich der kleinere Tropfen vollständig auflöst und der größere um den gleichen Betrag anwächst. Die treibende Kraft für die Ostwald-Reifung ist die Löslichkeit der Tropfen in Abhängigkeit von Ihrer Größe. Die Kelvin-Gleichung (4) beschreibt die Änderung der Löslichkeit von Tropfen mit einem Radius $S(r)$ und Tropfen mit einem unendlichen Radius ($S(\infty)$).^[42, 43]

Formel 4: Kelvin-Gleichung zur Berechnung der Löslichkeit eines Tropfens in Abhängigkeit seines Radius.^[42]

$$S(r) = S(\infty) \cdot e^{\frac{2\gamma \cdot V_m}{r \cdot RT}} \quad (4)$$

$S(r)$ = Löslichkeit eines Tropfens mit Radius r , $S(\infty)$ = Löslichkeit eines Tropfens mit unendlichem Radius, γ = Oberflächenspannung, V_m = molares Volumen der dispersen Phase, r = Radius des Tropfens, R = ideale Gaskonstante, T = absolute Temperatur

Die Kinetik der Ostwald-Reifung wird durch die Lifshitz-Slyozov-Wagner-Theorie (LSW-Theorie), beschrieben und lässt sich in vier Hauptpunkte zusammenfassen. Als erstes wird angenommen, dass der Massentransport auf Grund molekularer Diffusion durch die kontinuierliche Phase erfolgt. Des Weiteren werden die Tropfen als kugelförmig und im Raum fixiert angenommen. Zusätzlich soll es keine Wechselwirkung zwischen benachbarten Tropfen geben, da diese durch einen Abstand getrennt sind, welcher deutlich größer ist als ihr eigener Durchmesser. Zuletzt ist die Konzentration der gelösten Spezies als konstant anzunehmen, mit Ausnahme der Tropfengrenze. Basierend auf diesen Voraussetzungen ergibt sich für die Geschwindigkeit der Ostwald-Reifung (ω) folgender Zusammenhang.^[42, 44]

Formel 5: Formel zur Berechnung der Geschwindigkeit der Ostwald-Reifung.^[42]

$$\omega = \frac{d}{dr}(r_c^3) = \frac{4DS(\infty)\alpha}{9} \cdot f(\phi) \quad (5)$$

ω = Geschwindigkeit der Ostwald-Reifung, r_c = Radius eines weder wachsenden noch schrumpfenden Tropfen, D = Diffusionskoeffizient der dispersen Phase, $\alpha = \frac{2\gamma \cdot V_m}{RT}$, $f(\phi)$ = Faktor zur Beschreibung der Abhängigkeit von ω und dem dispersen Volumenanteil

Anhand der Formel (5) kann nur nachvollzogen werden, dass Tropfen mit $r > r_c$ anwachsen während Tropfen mit $r < r_c$ sich auflösen.^[42]

Die Ostwald-Reifung im Ganzen zu verhindern, gilt als äußerst schwierig. Da dieser Reife-Prozess durch unterschiedliche Tropfengrößen getrieben wird, führt eine geringere Differenz zwischen den Radien der Tropfen zu einer verlangsamte Ostwald-

2. Theoretischer Hintergrund

Reifung und somit zu einer erhöhten Stabilität der Emulsion. Emulsionen mit nur einer Tropfengröße weisen somit keine Ostwald-Reifung auf.^[42-46]

2.1.4 Optische Eigenschaften

Kolloidale Systeme sind allgemein bekannt für ihre optischen Eigenschaften. Durch ihre kleine Größe interagieren Emulsionstropfen mit einfallenden Lichtstrahlen besonders charakteristisch. Trifft das Licht auf die Tropfen, so können die einzelnen Lichtstrahlen entweder absorbiert oder gestreut werden. Die Lichtstreuung von kolloidalen Systemen ist für viele Erscheinungen im Alltag verantwortlich. Dazu zählt unter anderem die weiße Farbe von Wolken, Milch und Bierschaum, sowie die Blaufärbung des Himmels.^[47]

Die Lichtstreuung ist von mehreren Faktoren abhängig und sorgt somit für unterschiedliche Ergebnisse, wie verschiedenen Farben und Intensitäten. John William Strutt, 3. Baron Rayleigh, stellte eine Formel zur Berechnung der gestreuten Lichtenergie auf.

Formel 6: Formel zur Berechnung der Intensität von gestreutem Licht.^[48]

$$I = \frac{24 c \pi^2 v^2 A^2}{\lambda^4} \left(\frac{n_1^2 - n_2^2}{n_1^2 + 2 n_2^2} \right)^2 \quad (6)$$

I = Lichtintensität, c = Teilchenkonzentration, λ = Wellenlänge des einfallenden Lichts
 v = Teilchenvolumen, A = Schwingungsamplitude des einfallenden Lichts,
 n_1 = Brechungskoeffizient der kontinuierlichen Phase, n_2 = Brechungskoeffizient der dispersen Phase

Aus dem Zusammenhang (6) lässt sich ableiten, dass die Intensität des gestreuten Lichts proportional zur Teilchenkonzentration, dem Quadrat des Teilchenvolumens und antiproportional zur vierten Potenz der Wellenlänge des einfallenden Lichts ist. Hieraus ergibt sich, dass Licht mit kürzerer Wellenlänge stärker gestreut wird als Licht mit längerer Wellenlänge. Zusätzlich lässt sich ableiten, dass größere Partikel stärker streuen als kleinere. Es gibt zwei verschiedene Streuungen, die bei Emulsionen von Interesse sind. Ist der Tropfenradius deutlich kleiner als die Wellenlänge des einfallenden Lichtes, so liegt die Rayleigh-Streuung vor. Liegt der Tropfenradius hingegen im Bereich der Wellenlänge des einfallenden Lichts, so liegt die Mie-Streuung vor. Charakteristisch für die Rayleigh-Streuung ist eine symmetrische Intensitätsverteilung sowie eine starke Abhängigkeit von der Wellenlänge und der Tropfengröße. Die Mie-Streuung hingegen zeigt eine leicht asymmetrische

2. Theoretischer Hintergrund

Intensitätsverteilung und eine geringe Abhängigkeit von sowohl der Wellenlänge als auch von der Partikelgröße.^[47-50]

2.1.5 Physikalische und chemische Eigenschaften

Neben den optischen Eigenschaften besitzen Emulsionen auch besondere physikalische und chemische Eigenschaften. Eine dieser Eigenschaften ist die Partikelgröße und -form. Bei der Herstellung von Emulsionen entstehen häufig nicht nur Tropfen mit einer einzigen Größe, sondern es entstehen Tropfen unterschiedlicher Größe. Die Größe von Emulsionstropfen wird meistens in Form des Durchmessers oder des Radius angegeben. Es ergibt sich somit für eine Emulsion immer eine Verteilung von Tropfengrößen, die als Partikelgrößenverteilung bezeichnet wird. Diese Verteilung gibt alle Tropfengrößen und die Anzahl an Tropfen mit dieser Größe an, woraus statistische Größen, wie der mittlere Partikeldurchmesser, bestimmt werden können.^[51] Wie schon im Kapitel 2.1.3 erläutert, gilt die Tropfengröße als wichtigster Marker für die Stabilität der Emulsion und wird immer wieder als Kriterium zur Charakterisierung kolloidaler Systeme verwendet.^[49]

2.1.5.1 Ab- und Adsorptionsprozesse

Eine zentrale chemische Eigenschaft von Emulsionen ist das Vermögen, Ab- und Adsorptionsprozesse an der Grenzfläche durchführen zu können. Durch die sehr kleine Größe der Emulsionstropfen wird die Oberfläche gleichzeitig größer und sorgt damit für eine erhöhte Reaktivität gegenüber nicht dispergierten Systemen. Ein Beispiel für diese Aktivierung ist Gold. Gediegenes Gold gilt als chemisch inert, wohingegen kolloidales Gold hoch reaktiv ist und als Katalysator eingesetzt werden kann.^[52] Für die Stabilität der Emulsion ist das Wichtigste die Adsorption von Emulgatormolekülen an die Grenzfläche. Für eine hohe Stabilität muss die Adsorption so effektiv sein, dass eine eng besetzte Grenzschicht entsteht. Eine Methode, um dies zu erreichen, ist die Kombination von zwei oder mehreren Emulgatoren. Es ist dabei wichtig, dass die Emulgatoren synergistisch wechselwirken, damit die Stabilität erhöht und nicht verringert wird. Sie sollten gleich geladen sein und es ist vorteilhaft, wenn sie unterschiedlich molekulare Massen besitzen. Folglich können die Lücken zwischen den großen Molekülen mit den kleineren besetzt werden. Dadurch entsteht eine dichte Hülle um den Emulsionstropfen und schützt die Emulsion vor der Reifung.^[41, 53]

2. Theoretischer Hintergrund

2.1.5.2 Rheologie

Die Rheologie behandelt die Deformation und Fließeigenschaften von Materie und gilt als ein wichtiger Bestandteil der Analyse von Nanoemulsionen. Auf Grund des makroskopischen Fließverhaltens, kann auf den Zustand und die strukturelle Organisation der Nanoemulsionstropfen geschlossen werden. Dabei haben sowohl die Tropfengröße, die Tropfenkonzentration, die Tropfengrößenverteilung als auch die Eigenschaften der Edukte selbst, einen Einfluss auf die Rheologie der finalen Emulsion. Zusätzlich können diese Eigenschaften gezielt gewählt werden, um dem Produkt die gewünschten Eigenschaften zu geben.^[54]

Die rheologischen Eigenschaften einer Emulsion werden hauptsächlich durch die Messung der Viskosität in Abhängigkeit der Scherrate bestimmt. Bei der Viskosität handelt es sich um die innere Reibung in einer Flüssigkeit. Bewegen sich zwei Flüssigkeitsschichten aneinander vorbei, reiben die einzelnen Moleküle, Partikel oder sonstigen Bestandteile der Flüssigkeit aneinander und erzeugen zwischen den Schichten eine zur Bewegungsrichtung parallelen Kraft. Die Größe der Kraft ist proportional abhängig von der inneren Reibung, weswegen die Viskosität als Maß für die Fließfähigkeit einer Flüssigkeit gilt.^[55]

Das Fließverhalten einer Nanoemulsion ist stark von der Konzentration der Tropfen abhängig. Die Viskosität von Emulsionen mit niedriger Tropfenkonzentration steigt meist linear mit steigender Scherrate an und folgt somit dem Einstein-Gesetz.^[56] Damit das Einstein-Gesetz gültig ist, wird angenommen, dass die kontinuierliche Phase eine ideale Flüssigkeit ist, die Tropfen isoliert voneinander sind und die Form einer festen Kugel haben. Vor allem die Annahme der isolierten Tropfen gilt nur bei verdünnten Emulsionen, da nur dort die Interaktion der Tropfen untereinander minimal ist.^[56, 57] In konzentrierten Emulsionen (> 5 %) interagieren die Tropfen untereinander und die Viskosität ändert sich nicht mehr proportional zur Scherrate. Häufig wird ein scherverdünnendes Verhalten der Emulsionen beobachtet, da bei niedrigen Scherraten die Brown'sche Molekülbewegung die dominierende Molekülbewegung ist. Dies führt zu einer ungerichteten Verteilung der Tropfen. Daraus resultiert ein größerer Widerstand in der Flüssigkeit, das sich in einer höheren Viskosität zeigt. Wird die Scherrate erhöht, so nehmen die hydrodynamischen Kräfte zu und richten die Tropfen entlang des Flüssigkeitsstroms aus. Dies führt zu einer Abnahme des Widerstandes in der Flüssigkeit und somit zur Abnahme der Viskosität.^[57] Neben der räumlichen

2. Theoretischer Hintergrund

Ordnung der Tropfen, haben auch die Kräfte zwischen den Tropfen einen Einfluss auf das Fließverhalten der Emulsion. Bilden sich Agglomerate in einer Emulsion, wirken sie grundsätzlich viskositätserhöhend bei niedrigen Scherraten. Wird die Scherrate erhöht, so können die Agglomerate durch die höheren Scherkräfte aufbrechen und die Viskosität verringert sich sprunghaft. Grundsätzlich haben Emulsionen mit hoher Tropfenkonzentration eine höhere Viskosität als Emulsionen mit geringeren Tropfenkonzentration, solange das Volumenverhältnis zwischen disperser und kontinuierlicher Phase identisch bleibt. [54, 56, 57]

Als ein weiterer Einflussfaktor für die Viskosität ist die Tropfengröße und die Tropfengrößenverteilung. Bei der Betrachtung einer Emulsion mit lediglich einer Tropfengröße lässt sich ein antiproportionaler Zusammenhang zwischen Viskosität und Tropfengröße feststellen. Emulsionen mit kleineren Tropfen besitzen eine größere Viskosität, solange das Volumenverhältnis zwischen kontinuierlicher und disperser Phase konstant bleibt. Hierbei besitzt die Emulsion mit kleineren Tropfen eine höhere Tropfenkonzentration gegenüber der Emulsion mit größeren Tropfen. Dies führt zu einer höheren Viskosität. Bei einer breiteren Größenverteilung der Tropfen ändert sich die Viskosität im Vergleich zur Emulsion mit nur einer Tropfengröße in Abhängigkeit zu den Anteilen der Tropfen pro Tropfengröße. Hierbei haben wieder kleinere Tropfen eine viskositätserhöhende Wirkung, wohingegen größere Partikel die Viskosität verringern.[58]

2.2 Perfluorcarbone

Das Atmen in einer Flüssigkeit ist schon seit den 1960er Jahren keine Science-Fiction mehr. Leland Clark zeigte 1966, dass Mäuse in einem mit Flüssigkeit gefüllten Tank durch die sogenannte Flüssigkeitsatmung überleben konnten. Bei der Flüssigkeitsatmung findet der Sauerstoffaustausch nicht zwischen der Luft und dem Blut statt, sondern zwischen einer oxygenierten Flüssigkeit und dem Blut. Bei dieser besonderen Flüssigkeit handelt es sich um Perfluorcarbone (PFCs).[59]

PFCs sind strukturell betrachtet Halogenalkane, bei denen alle Wasserstoffatome durch Halogenatome substituiert wurden. Bei den Halogenatomen handelt es sich hauptsächlich um Fluor. Somit entsteht ein organisches Kohlenstoffgerüst mit einer Art Hülle aus dem stark elektronegativen Fluor. Durch diese Substitution entstehen neue Eigenschaften für die PFCs gegenüber den komplementären Alkanen. PFCs mit den Kohlenstoff-Fluor-Bindungen enthalten deutlich stärkere Bindungen als die Alkane. Mit

2. Theoretischer Hintergrund

530 kJ/mol ist die Kohlenstoff-Fluor-Bindung um 20 % stärker als die Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindung mit 439 kJ/mol. Zusätzlich sorgt die größere Elektronegativitätsdifferenz (1,6 für die Kohlenstoff-Fluor-Bindung und 0,3 für die Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindung)^[60] dafür, dass die Orbitale des Kohlenstoffskelets schrumpfen und die Bindungen nicht mehr polarisierbar sind. Somit nimmt die Reaktivität der Kohlenstoffkette ab. Die Fluoratome schützen das Kohlenstoffrückrad sterisch wie eine Hülle. Außerdem sind PFCs metabolisch inert, da die benötigten Enzyme zum Abbau nicht existieren. Aus der Kombination der räumlichen Struktur und der Elektronenverteilung entsteht die Eigenschaft, dass PFCs sowohl hydrophob als auch lipophob sind. Sie lassen sich somit nicht mit polaren oder unpolaren Stoffen mischen was dazu führt, dass eine Anwendung in Kombination mit anderen Flüssigkeiten nicht möglich ist. Um die Anwendung dennoch möglich zu machen, müssen die PFCs emulgiert und als stabile Emulsion verwendet werden.^[61]

Die größte Bekanntheit haben PFCs jedoch als Gastransporter erlangt. Auf Grund der hohen Elektronendichte um die Fluoratome, findet eine starke elektrostatische Abstoßung zwischen den einzelnen PFC-Molekülen statt und es entstehen große Bereiche zwischen den Molekülen. Dies führt zu einer erhöhten Gaslöslichkeit aller Arten. Hämoglobin als Sauerstoffträger des Blutes bindet den Sauerstoff koordinativ an sein zentrales Eisen-Atom und kann dieses nur durch Änderung der Affinität wieder abgeben. Dafür benötigt das Hämoglobin das organischen Phosphat 2,3-Bisphosphoglycerat, welches für die Freisetzung der chemisch gebundenen Gase in ausreichender Konzentration vorliegen muss. PFCs hingegen lösen Gase physikalisch nach dem Gesetz von Henry. Somit besitzen PFCs keinen Sättigungsbereich, indem Gase nicht mehr aufgenommen werden können, wohingegen Hämoglobin auf Grund seiner Bindungsstellen eine maximale Aufnahmemenge besitzt. Die Freisetzung des Gases erfolgt bei den PFCs entlang eines Partialdruckgradienten. Ist der Partialdruck des Gases außerhalb des PFC größer als innerhalb, so löst sich das Gas im PFC bis sich die Partialdrücke angeglichen haben. Liegt der umgekehrte Fall vor, dass der Partialdruck im PFC höher ist als außerhalb, so wird das Gas so lange freigesetzt, bis die Partialdruckgradient abgebaut wurde. ^[61-66]

PFC ist eine Bezeichnung für eine Stoffgruppe und steht für unterschiedliche Moleküle. Die einzelnen Moleküle werden hauptsächlich in der Molekülmasse unterschieden.

2. Theoretischer Hintergrund

Dabei hat die molekulare Masse einen sehr wichtigen Einfluss auf die Anwendbarkeit in medizinischen Fragestellungen. Bei einer potenziellen Anwendung in der Medizin ist die Zeit des Verbleibs der PFCs im Organismus, die sogenannte Organretentionszeit, ein wichtiger Aspekt. Bei den PFC gilt, dass Moleküle mit höherer Molekülmasse auch eine höhere Organretentionszeit aufweisen. So besitzt beispielsweise Perfluordecalin (PFD) mit einer molekularen Masse von 462 g/mol eine Halbwertszeit von 7 Tagen, wohingegen Perfluortripropylamin mit 521 g/mol eine Halbwertszeit von 65 Tagen aufweist.^[67, 68]

2.3 Emulgatoren

Wie schon zuvor beschrieben, ist die Anwesenheit eines Emulgators für die Bildung einer stabilen Emulsion von größter Wichtigkeit. Der Emulgator sorgt dafür, dass die Oberflächenspannung abgebaut wird und die Emulsionsreifung gehemmt wird (vgl. Kapitel 2.1.3). Die Wahl des Emulgators ist keine triviale Fragestellung und muss für jede Emulsion neu getroffen werden. Die Entscheidung ist abhängig von dem Anwendungsgebiet, der Zusammensetzung, der Stabilitätsanforderung sowie möglichen regulatorischen Bestimmungen für die Emulsion, bei beispielsweise Medikamenten oder Nahrungsmitteln.^[69]

Emulgatoren sind amphiphile und grenzflächenaktive Substanzen. Somit besitzt das Emulgatormolekül einen lipophilen und einen hydrophilen Bereich und lagert sich an Wasser-Öl-Grenzflächen an, indem es sich räumlich so anordnet, dass der lipophile Bereich zur Öl-Phase gerichtet ist und der hydrophile Teil in Richtung der Wasserphase zeigt. Dieser Vorgang beruht auf dem Prozess der Adsorption. Zur Beschreibung des Adsorptionsvorgangs können unterschiedliche Sorptionsisotherme verwendet werden, unter anderem die Freundlich-Isotherme, die Langmuir-Isotherme, das Brunauer-Emmett-Teller-Modell oder das Gibbs-Modell. Alle Modelle lassen sich grundlegend auf zentrale Eigenschaften und Prozesse zusammenfassen. Die Triebkraft der Adsorption bei Emulgatoren ist die Reduktion der Oberflächenspannung. Durch diese Abnahme wird die Energie des gesamten Systems gesenkt (vgl. Formel (1)) und somit ein thermodynamisch stabilerer Zustand geschaffen. Die Rate bzw. Geschwindigkeit der Adsorption ist von mehreren Parametern abhängig. Zum einen wird die Adsorptionsgeschwindigkeit von der Bewegungsgeschwindigkeit der Emulgatormoleküle durch die Phase beeinflusst. Zum anderen hat die Emulgatorkonzentration und somit die Besetzung an der Grenzfläche einen Einfluss.

2. Theoretischer Hintergrund

Befinden sich schon Moleküle an der Grenzfläche und nehmen somit Platz an der Oberfläche ein, so wird die Adsorptionsgeschwindigkeit für weitere Stoffe reduziert. Aus diesem Grund nimmt die Geschwindigkeit der Adsorption im Verlauf des Prozesses ab, bis ein stationärer Zustand erreicht wird.^[70-72]

Wie bereits erwähnt, gehört die Auswahl des Emulgators zu einer der wichtigsten Aufgaben bei der Entwicklung einer Emulsion. Hierbei bilden die Anforderungen an den Emulgator das Zentrum des Entwicklungsprozesses und müssen von Beginn definiert werden. Grundsätzlich müssen alle Emulgatoren gewisse Grundeigenschaften mitbringen, wie eine Amphiphilität und eine gute Mischbarkeit mit der kontinuierlichen Phase. Zusätzlich können sich geladene Emulgatormoleküle positiv auf die Stabilität der Emulsion auswirken. Somit werden die verschiedenen Emulgatoren in anionische, kationische und amphotere Moleküle unterschieden. Soll die Emulsion in einem medizinischen Kontext zur Anwendung kommen und beispielweise intravenös appliziert werden, so dürfen nur biokompatible Emulgatoren verwendet werden, die vorteilhaft bereits eine klinische Zulassung für diese Anwendung besitzen.^[69, 73, 74]

Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Stabilität der Emulsion, ist die Kombination von unterschiedlichen Emulgatoren. Die Wahl der Emulgatoren führt zu Synergie- und Dyssynergieeffekten. Ein wichtiger Faktor für positive Wechselwirkungen ist die Molekülladung. Sind die verwendeten Emulgatoren unterschiedlich geladen, so können sich die Moleküle zwar leichter an der Grenzfläche annähern und verweilen dort, auf Grund von anziehenden Coulomb-Kräften, länger, jedoch reduziert sich die Gesamtladung des Emulsionstropfen und begünstigt somit Koaleszenz. Sind die Ladungen von gleicher Polarität, so ist die Anlagerung an der Grenzfläche erschwert aber das Zeta-Potential steigt an. Um die Anlagerung zu verbessern und gleichzeitig das erhöhte Zeta-Potential beizubehalten, kann eine Kombination von unterschiedlichen Molekülgrößen gewählt werden. Größere Moleküle können oft größere Ladungen tragen und zusätzlich einen größeren Teil der Oberfläche der Emulsionstropfen bedecken. Jedoch bewegen sie sich langsamer durch die kontinuierliche Phase als kleinere Moleküle. Somit ist die Adsorption von größeren Molekülen langsamer als von kleineren. Zusätzlich bedürfen größere Emulgatoren mehr Zeit zur räumlichen Anordnung an der Grenzfläche als kleinere, was ebenfalls einen Einfluss auf die Adsorptionsgeschwindigkeit hat.^[41, 75]

2. Theoretischer Hintergrund

In dieser Arbeit werden zwei unterschiedliche Emulgatoren verwendet. Zum einen wird das Serumprotein Albumin verwendet und zum anderen das Phospholipid Lecithin. Beide Stoffe sind bekannte Emulgatoren und finden in medizinischen Produkten sowie in der Lebensmittelindustrie Anwendung. Sie sind amphiphil, bilden unter physiologischen Bedingungen Anionen und sind anwendbar als Emulgatoren für Wasser-Öl-Emulsionen. Somit erfüllen sie die Grundvoraussetzung für die synergistische Anwendung als gemischte Emulgatoren für AOC zur medizinischen Applikation.^[10, 76]

2.3.1 Albumin

Albumin gehört mit 45 – 65 % zu den am häufigsten im Blutplasma vorkommenden Proteinen und ist dort auf Grund der hohen Konzentration ein wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks. Wie die meisten Serumproteine wird Albumin von der Leber ins Blut abgegeben. Eine der Hauptaufgaben des Proteins ist der Transport von Ionen, Vitaminen, Hormonen, Spurenelementen, Toxine, Bilirubin sowie freien Fettsäuren. Daraus ergibt sich auch der amphiphile Charakter von Albumin, ohne diesen ist der Transport von so vielen unterschiedliche Molekülen nicht möglich.^[77, 78] Albumin ist als Emulgator schon bekannt und auch bereits erfolgreich bei PFC-Emulsionen eingesetzt worden.^[79, 80] Zusätzlich ist humanes Serumalbumin (HSA) für die intravenöse Anwendung beim Menschen bereits zugelassen.^[81]

2.3.2 Lecithin

Lecithin ist keine Bezeichnung für einen Reinstoff, sondern bezeichnet ein Gemisch aus mehreren Phospholipiden. Jedoch besteht kommerziell erworbenes Lecithin hauptsächlich aus Phosphatidylcholin und wird häufig synonymhaft dafür verwendet. Sie besitzen eine polare, hydrophile Phosphat-Gruppe und die meisten Phospholipide weisen bei physiologischem pH-Wert eine negativ Nettoladung auf. Somit bildet Lecithin in Wasser Anionen. Neben der Phosphat-Gruppe bestehen Phospholipide aus einem zentralen Glycerin-Gerüst und zwei Fettsäuren. Im Fall von Phosphatidylcholin ist an der Phosphat-Gruppe noch ein Cholin gebunden. Lecithin besitzt eine hohe Löslichkeit in Ölen und bildet in Wasser Mizellen. Wie Albumin wurde Lecithin auch schon als Emulgator bei Perfluorcarbonemulsionen eingesetzt und ist als Nahrungsergänzungsmittel zugelassen.^[74, 82]

2. Theoretischer Hintergrund

2.4 Herstellungs- und Analysemethoden

Bei der Synthese von Dispersionen spielt der Herstellungsprozess eine essenzielle Rolle und hat ebenfalls einen Einfluss auf die Eigenschaften des Produkts. Der Prozess wird in zwei Kategorien unterschieden. Bei dem Bottom-up-Verfahren wird das Produkt von Grund auf aufgebaut. Dabei bilden einzelne Moleküle, Atome oder Cluster die Grundlage und bauen mit Hilfe von Selbstorganisationsprozessen die Struktur des finalen Produkts. Das Verfahren ermöglicht die Herstellung von einheitlichen Formen, Größen und Verteilungen in vielen verschiedenen nanoskaligen Materialien. Das Bottom-up-Verfahren wird häufig bei der kontinuierlichen Synthese von anorganischen Nanopartikeln verwendet. Durch schnelles Mischen zweier Vorläuferlösungen lassen sich verschiedene Nanopartikel wie Zinkoxid oder Magnetit herstellen.^[83-86]

Das Top-down-Verfahren ist das genaue Gegenteil des Bottom-up-Verfahrens und startet mit einem Blockmaterial, das dieselbe Zusammensetzung besitzt wie das Produkt. Durch das Zerkleinern des Blockmaterials lassen sich kleinere Partikel herstellen, die bis zu einer Größe im Nanomaßstab zerkleinert werden können. Bei der Synthese von Emulsionen wird vor allem die Mikrofluidik als Methode gewählt, da diese eine genaue Einstellung der gewünschten Eigenschaften der fertigen Emulsion erlaubt. Als eine Art der Mikrofluidik hat sich die Hochdruckhomogenisation (HPH) besonders in der Kosmetik- und Lebensmittelindustrie etabliert. In dieser Arbeit wurde zur Herstellung der Emulsion die HPH gewählt. Deswegen wird sich im weiteren Verlauf der Arbeit nur noch auf die HPH bezogen.^[86-89]

2.4.1 Hochdruckhomogenisation

Ein Hochdruckhomogenisator besteht meistens aus einer pneumatisch oder elektrisch gesteuerten Hochdruckpumpe sowie der eigentlichen Hochdruckemulgierereinheit. Die verschiedenen Hochdruckemulgierereinheiten unterscheiden sich in ihrer Strömungsführung, wodurch sich drei verschiedene HPH-Systeme etabliert haben. Zum einen gibt es die Radialdiffusoren. Die auch unter Homogenisierungsventil bekannten Radialdiffusoren enthalten als einziges der drei Systeme ein bewegliches Bauteil, das sie in ihrem Prozessdruck einschränkt. Sie bestehen aus einem Ventilsitz, der eine Umlenkung der Fließrichtung um 90 ° ermöglicht und einem axial beweglichen Ventilstempel. Durch diesen beweglichen Stempel lässt sich ein variabler Homogenisierungsdruck bei gleichbleibendem Volumenstrom realisieren. Die

2. Theoretischer Hintergrund

Zerkleinerung der Emulsionstropfen geschieht durch den rapiden Abfall des Drucks innerhalb der Emulgierereinheit und der daraus resultierenden Kavitationsblasen.^[90, 91]

Das zweite HPH-System besitzt keinen beweglichen Stempel und wird unter dem Oberbegriff Düsenaggregat geführt. Dabei handelt es sich ebenfalls um eine axial durchströmte Emulgierereinheit, welche jedoch aus einer Blende mit scharfkantigem Ein- und Auslass besteht. Auf Grund der Bauweise des Systems lassen sich höhere Homogenisierungsdrücke im Vergleich zum Radialdiffusor realisieren. Die Tropfenzerkleinerung erfolgt hinter der Blendbohrung infolge des Umschlags der Strömungsbedingungen im Kern des Freistrahls von einer laminaren zu einer turbulenten Strömung.^[90]

Die dritte Form von HPHs ist der Gegenstrahldispergator. Hierbei wird der Flüssigkeitsstrom aufgespalten und in einem 180 ° Winkel wieder zusammengeführt. Somit treffen die durch den Homogenisierungsdruck beschleunigten Flüssigkeitsströme, mit hoher Geschwindigkeit frontal aufeinander. Wie auch im Düsenaggregat wird bei einem Gegenstrahldispergator kein beweglicher Stempel benötigt, was höhere Prozessdrücke ermöglicht. Der in dieser Arbeit verwendete Microfluidizer gehört zu den Gegenstrahldispergatoren. Die Besonderheit bei einem Microfluidizer ist die patentierte Interaktionskammer, die als Hochdruckemulgierereinheit fungiert. Im Inneren der Interaktionskammer befinden sich Mikrokanäle, welche den Flüssigkeitsstrom aufspalten und wieder zusammenführen (Y-Kammer). Dabei haben die Kanäle einen Durchmesser von 75 – 100 µm. Auf Grund der Bauart und der geringen Größe der Kanäle ändert sich die Strömungsbedingung der Emulsion von einer laminaren zu einer stark turbulenten Strömung. Eine weitere Bauart der Interaktionskammer ist die Z-Kammer. In dieser Kammer wird der Flüssigkeitsstrom nicht aufgeteilt, sondern mit hoher Geschwindigkeit in einem Winkel gegen eine Wand geleitet, sodass die Emulsion beim Durchfließen der Kammer immer wieder gegen die Wand stößt. Bei einer Kombination beider Bauarten kann ein noch besseres Ergebnis erzielt werden als bei einzelner Anwendung. In dieser Arbeit wurde ein Microfluidizer des Modells LM-20 verwendet, der in der Fließrichtung erst eine Z-Interaktionskammer mit einer Größe von 200 µm besitzt, gefolgt von einer Y-Interaktionskammer mit einer Größe von 75 µm.^[90, 92]

Die Zerkleinerung der Emulsionstropfen erfolgt nicht, wie häufig in der Literatur beschrieben, ausschließlich durch den Zusammenprall der beiden Flüssigkeitsströme

2. Theoretischer Hintergrund

und somit der Emulsionstropfen selbst, sondern durch eine Kombination mehrerer Prozesse. In einem Microfluidizer haben Scherung, Energiedissipation, laminare Dehnungsströmung und Zusammenstöße einen Effekt auf den Zerkleinerungsprozess.^[90, 92] Die Arbeit von Kiefer und Treiber zeigt, dass die Zusammenstöße zwischen den Tropfen sowie von Tropfen und den Interaktionskammerwänden bei „üblichen“ Homogenisierungsbedingungen keinen nennenswerten Einfluss auf die Zerkleinerung haben.^[93] Jedoch wurden dabei nur Prozessdrücke bis 150 bar untersucht, wohingegen bei einem Microfluidizer Drücke bis 2000 bar realisiert werden können. Daraus folgt, dass Zusammenstöße in der Interaktionskammer nicht als Hauptprozess zur Zerkleinerung der Emulsionstropfen gilt aber ein zusätzlicher Mechanismus Tropfengrößenreduktion ist.^[90, 92-94]

Als Hauptprozess der Tropfenzerkleinerung gilt die laminare Dehnströmung. Ändert sich die Strömungsbedingung schlagartig von laminar zu turbulent, erfahren die Emulsionstropfen eine Deformation durch Scher- und Dehnströmungen. Da die Scherströmung bei ausreichend hohem Viskositätsverhältnis zwischen kontinuierlicher und disperser Phase den Tropfen rotieren lässt, hat die Dehnströmung einen größeren Einfluss auf die Emulsionstropfenzerkleinerung. Der Energieeintrag durch die Dehnströmung sorgt nicht für eine Tropfenrotation und ist somit stärker an der Deformation beteiligt. Überschreitet die Tropfendeformation eine kritische Schwelle, so unterliegt der Zerfall des Tropfens dem Mechanismus der Rayleigh-Tomotika-Instabilität. Diese besagt, dass der ausgebildete (newtonische) Flüssigkeitszylinder plötzlich in eine Vielzahl kleinerer Tropfen zerfällt, unter Ausbreitung von sinusförmigen Kapillarwellen. Die Kapillarwellen entstehen durch statistische thermische Fluktuationen auf Grund der Brown'schen Molekularbewegung in den Tropfen.^[95-98] Eine schematische Darstellung der Tropfenzerkleinerung ist in Abbildung 2 dargestellt.

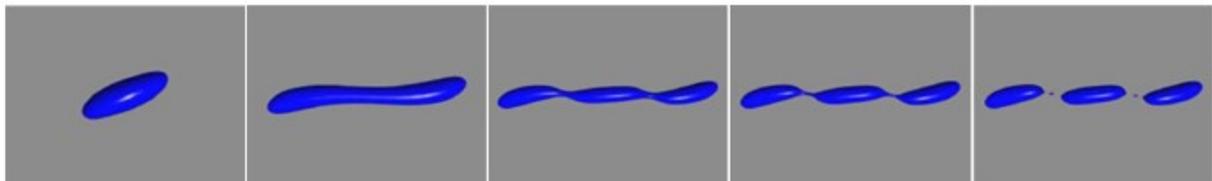


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Tropfenzerkleinerung nach dem Mechanismus der Rayleigh-Tomotika-Instabilität.^[99]

2.4.2 Dynamische Lichtstreuung

Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS) kann die Dynamik einer Emulsion analysiert und daraus die Größenverteilung der Emulsionstropfen bestimmt werden.

2. Theoretischer Hintergrund

Wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben, interagieren die Emulsionstropfen mit Licht, indem sie die Lichtstrahlen streuen. Werden diese Tropfen mit kohärentem Laserlicht bestrahlt, so entsteht eine zeitliche Fluktuation des Streulichts in Abhängigkeit der Emulsionstropfendynamik. In einer Emulsion befinden sich häufig mehrere Tropfen unterschiedlicher Größen und Dynamiken. Somit wird das Licht an einer Vielzahl von Tropfen gestreut. Wird nun die Intensität der Streuung in einem bestimmten Punkt gemessen, so ist das Resultat die Interferenz der einzelnen Streuungen in dem Streuvolumen. Das Streulicht zwischen den Emulsionstropfen besitzen einen Gangunterschied, sodass die Intensität des Streulichts abhängig von den Positionen der Tropfen zueinander ist. Die Vielzahl der Interferenzen bilden ein Fleckenmuster der Streuintensitäten, das sogenannte „Speckle-Muster“. Dieses Muster kann mit Hilfe eines geeigneten Detektors aufgenommen werden. Das Speckle-Muster enthält Informationen zu der exakten räumlichen Verteilung der Emulsionstropfen. Aus diesem Grund ändert sich das Speckle-Muster, wenn die einzelnen Tropfen durch Molekülbewegungen, wie der Brown'sche Molekularbewegung, ihre Position verändern. Diese Änderung kann analysiert werden und somit lässt sich die Dynamik der Emulsion bzw. die Partikelgrößenverteilung beschreiben.^[100, 101]

Befindet sich die Konzentration der Emulsionstropfen in einem für die Messmethode zulässigen Größenbereich, so ist die Tropfenbewegung lediglich von der Brown'schen Molekularbewegung abhängig und der Diffusionskoeffizient lässt sich wie folgt beschreiben.^[102]

Formel 7: Beschreibung des Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit der Brown'schen Molekularbewegung.^[102]

$$D = \frac{L^2}{6 \tau_D} \quad (7)$$

D = Diffusionskoeffizient, L = Diffusionslänge, τ_D = Diffusionszeit

Kleinere Tropfen bewegen sich schneller als größerer, was sich wiederum auf den Diffusionskoeffizienten auswirkt. Einen Zusammenhang zwischen Diffusion und Tropfengröße gibt die Stokes-Einstein-Gleichung (8).^[102]

Formel 8: Stokes-Einstein-Gleichung.^[102]

$$D = \frac{k_B T}{3\pi \eta d_H} \quad (8)$$

D = Diffusionskoeffizient, k_B = Boltzmann-Konstante, T = Temperatur, η = Viskosität der Flüssigkeit, d_H = hydrodynamische Durchmesser

2. Theoretischer Hintergrund

Aus der Gleichung (8) lässt sich mit Hilfe der DLS die Partikelgrößenverteilung einer Emulsion bestimmen.

2.4.3 Methoden zur Bestimmung der Viabilität und metabolischen Aktivität von kultivierten Zellen

Kolloidale Systeme haben neben ihren vielen positiven Eigenschaften eine besondere Bedeutung bei der Einwirkung auf den Menschen und die Umwelt. Aerosole stehen beispielsweise häufig in Zusammenhang mit Lungenschäden.^[103] Anorganische und metallische Nanopartikel können auf Grund ihrer geringen Größe in der ganzen Umwelt verteilt werden und verbleiben dort, da sie nicht biologisch abgebaut werden können.^[104] Bei der medizinischen Verwendung von nanoskalierten Substanzen gilt besondere Vorsicht, da die hochaktive Wirkung von beispielsweise Nanopartikel erheblichen Schaden anrichten kann. Gold-Nanopartikel können zum Beispiel durch ihre hohe katalytische Wirkung die Bildung von radikalen Sauerstoffspezies fördern, welche einer der Hauptgründe für Zelltoxizität ist.^[105] Aus diesen Gründen ist eine toxikologische Untersuchung von neuen Nanomaterialien, vor allem bei der Verwendung als Medizinprodukt, von höchster Wichtigkeit.

Zur Untersuchung der potenziell toxischen Wirkung von Nanoemulsionen können verschiedene Tests durchgeführt werden. Dabei wird primär die metabolische Aktivität der Zellen oder die Integrität der Zellmembran, zur Einschätzung der Zellviabilität als Analysepunkt, gewählt.^[106] Ein Test zur Bestimmung der Zellviabilität ist der Nachweis der extrazellulären Laktatdehydrogenase (LDH). LDH katalysiert die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat und wandelt dabei NAD^+ zu NADH (Nicotinamidadenindinukleotid) um. Der Nachweis der LDH findet auf Grund einer Umsetzungsreaktion von dem Tetrazoliumsalz (Iodnitrotetrazolium, violett) zu rotem Formazan statt. Für diese Umsetzung wird das von der LDH gebildete NADH benötigt. Somit lässt sich über die quantitative Bestimmung des gebildeten Formazans einen direkten Rückschluss auf die LDH-Konzentration ziehen. Da die Bestimmung im zellfreien Zellkulturmedium durchgeführt wird, wird die Konzentration der extrazellulären LDH bestimmt. Das Enzym ist unter physiologischen Bedingungen ausschließlich intrazellulär vorhanden und muss durch die normalerweise undurchlässige Zellmembran diffundieren. Dies geschieht nur, wenn die Zellmembranintegrität auf Grund pathologischer Bedingungen reduziert ist. Daher kann dieser Nachweis als Test auf die Zellviabilität verwendet werden.^[107, 108]

2. Theoretischer Hintergrund

Ein weiterer kolorimetrischer Test zur Bestimmung der Zellviabilität, der ebenfalls auf der Detektion von Formazan beruht, ist der MTT-Test. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ist ein gelber, wasserlöslicher Farbstoff, der zum violetten, wasserunlöslichen Formazan reduziert wird. Katalysiert wird die Reaktion durch intrazelluläre Coenzyme wie NADH oder NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat). Die benötigten Coenzyme werden im Mitochondrium produziert und ins Zytoplasma abgegeben. Wie bei dem LDH-Test findet die Nachweisreaktion mit MTT extrazellulär statt, womit die intrazellulären Coenzyme durch die Zellmembran diffundieren müssen. Dies ist nur bei geringer Membranintegrität der Fall. Somit kann durch die quantitative Bestimmung des gebildeten Formazans die Zellviabilität bestimmt werden.^[109, 110]

Als eine Methode zur Analyse der metabolischen Aktivität von Zellen wird der Nachweis von ATP (Adenosintriphosphat) durchgeführt. ATP dient als allgemeiner Energieträger für viele unterschiedliche biologische Prozesse und gilt somit als direkter Marker für die Stoffwechsel-bezogene Aktivität, da alle Zellen ATP zum Überleben benötigen. Zelluläres ATP wird nach vollständiger Lyse der Zellen und Zugabe von Luceferin und dem benötigten Enzym Luciferase bestimmt. Mit dem vorhandenen Luftsauerstoff reagiert das Luceferin zu Oxyluceferin und erzeugt dabei ein Chemilumineszenzsignal. Die Intensität dieses Signals kann gemessen werden und ist direkt proportional zur vorhandenen ATP-Konzentration. Liegt eine hohe Signalintensität vor, waren die Zellen zum Zeitpunkt der Lyse aktiv und es spricht für eine hohe metabolische Aktivität. Bei geringer ATP-Konzentration waren die Zellen metabolisch inaktiver und es kann zusätzlich auf eine geringere metabolische Aktivität geschlossen werden.^[111]

Die Bildung von radikalen Sauerstoffspezies (ROS) ist vor allem bei der Anwendung von künstlichen Sauerstoffträgern ein wichtiger Analyseparameter. AOCs auf PFC-Basis neigen durch ihr hervorragendes Oxygenierungspotentials häufig zur Überoxygenierung (Hyperoxie). Diese Tatsache wird beispielsweise in der Tumor-Therapie genutzt, indem ROS (induziert durch PFCOC) in der Tumorzelle gebildet werden und somit die Effektivität von manchen Tumorsuppressoren steigert. In der Oxygenierung von gesunden Zellen führt die Bildung von ROS zu Zellschädigungen und wirkt in diesem Fall gegen den Behandlungszweck.^[106, 112, 113] ROS entstehen bei oxidativem Stress und werden durch die mitochondriale Atmung gebildet. Phagozyten,

2. Theoretischer Hintergrund

wie Makrophagen und Neutrophile, produzieren ebenfalls ROS für die Verdauung von phagozytierten organischen Substanzen.^[114, 115] Der Nachweis von ROS erfolgt über die Detektion von Wasserstoffperoxid, die als ein Signalmolekül für ROS gelten. Bei der Nachweisreaktion wird über die Bildung eines Zwischenprodukts Luciferin gebildet, was quantitativ bestimmt werden kann. Die Konzentration von Luciferin ist dabei direkt proportional zur Wasserstoffperoxid-Konzentration und kann somit als Nachweis für ROS verwendet werden.^[116]

2.4.4 Hypoxie-induzierter Faktor

Ein direkter zellulärer Marker für Hypoxie ist der Hypoxie-induzierte Faktor (HIF), ein α/β -Dimer, wobei nur die HIF-1 α und HIF-2 α -Untereinheiten für die Hypoxie relevant sind. Fällt der durch die Fibroblasten der Niere gemessene Sauerstoffpartialdruck, dann bindet HIF an *hypoxia response elements* (HRE) und stabilisiert sich somit. Im stabilisierten Zustand bindet HIF an die DNA und wirkt dort als Transkriptionsfaktor für die Expression des Erythropoetins, ein Hormon, das die Bildung von Erythrozyten im Knochenmark stimuliert. Befindet sich die Zelle unter physiologischen Sauerstoffbedingungen wird die HIF- α -Untereinheit ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. HIF-1 α und HIF-2 α liegen somit nur vor, wenn die Zelle hypoxisch ist und können daher als zellulärer Marker für den Sauerstoff-bezogenen Zustand der Zelle analysiert werden.^[117]

2.5 Kardioplegie

Herz-Kreislauf-Erkrankungen (HKE) gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Im Jahr 2022 starben alleine in Deutschland über 350.000 Menschen an HKE, wozu weitere 125.000 Todesfälle durch ischämische Herzerkrankungen hinzukamen.^[118] Hauptsächlich betroffen sind bei HKE die Koronararterien, welche den Myokard mit Nährstoffen und lebenswichtigem Sauerstoff versorgen, da sie für die Durchblutung des gesamten Herzmuskels verantwortlich sind.^[119] Zur Behandlung der Koronararterien-Erkrankungen ist neben der konservativen Therapie (mehr Bewegung, Ernährungsumstellung, Medikation) die invasive Therapie in Form einer chirurgischen Operation die am häufigsten angewendete Behandlungsmethode. Für diesen chirurgischen Eingriff muss der Brustkorb geöffnet werden, sodass die Operation am offenen Herzen stattfinden kann. Damit der Chirurg die Korrektur vornehmen kann, muss die Kontraktion des Myokards vollständig gestoppt werden. Dies geschieht entweder durch das Abklemmen der Aorta mit einer

2. Theoretischer Hintergrund

Aortenkreuzklemme oder auf chemische Weise durch Verwendung einer kardioplegen Lösung. In beiden Fällen wird das Herz vollständig von der Blutversorgung getrennt und der Blutfluss im restlichen Körper maschinell über eine Herz-Lungen-Maschine aufrechterhalten. Somit ist das Myokard bis zur Beendigung des Eingriffs mangelversorgt und wird ischämisch.^[120, 121]

Das Wort Kardioplegie setzt sich aus den Worten „kardio“ (Herz) und „plegie“ (Paralyse) zusammen und beschreibt die beabsichtigte, temporäre Unterbrechung der Herzmuskelkontraktion. Dazu wird heutzutage häufig die chemische Methode mit kardioplegen Lösungen wie Custodiol bevorzugt, da sie die ischämischen Reperfusionsschäden nach dem Eingriff reduzieren und das Myokard während der Operation besser schützen als bei der Verwendung einer Aortenkreuzklemme, die eine vollständige Entfernung jeglicher Flüssigkeit aus dem Herzen voraussetzt.^[122] Bei der chemischen Kardioplegie wird der Herzstillstand durch eine Hyperkaliämie verursacht, indem ein neues positives Ruhemembranpotenzial erzeugt wird, welches gegenüber dem Normalwert depolarisiert ist und somit die Bildung eines Aktionspotenzials zur Kontraktion des Herzmuskels nicht mehr möglich ist.^[121, 123, 124]

Wie bereits erwähnt, wird das Myokard während der Kardioplegie nicht mit Blut und somit nicht mit Sauerstoff versorgt. Durch den Sauerstoffmangel wechseln die Myokardzellen von einem aeroben zu einem anaeroben Stoffwechsel, was eine Zunahme der Lactatkonzentration und eine Erhöhung des pH-Werts zur Folge hat. Bei anhaltender Ischämie, durch beispielsweise länger dauernde Operationen, nimmt das Ausmaß der Myokardschädigung zu bis zum vollständigen Zelltod. Dieser Zelltod kann zum einen über Zelltyp unspezifische Marker wie LDH oder für Myokard spezifische Marker wie Troponin bestimmt werden.^[121, 122] Die Reperfusion der Koronararterien nach dem Eingriff ist ein weiteres Problem der Kardioplegie, da durch das Reperfundieren mit frischem Blut irreversible Reperfusionsschäden verursacht werden können. Diese zeigen sich in der Bildung von ROS, in der Freisetzung von pro-inflammatorischen Faktoren wie dem Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) oder in der Dysfunktion der Myokardzellen. Zur Verbesserung der Kardioplegie müsste somit eine Versorgung mit Sauerstoff über den Zeitraum der Operation erfolgen, die sowohl in der verwendeten kardioplegen Lösung als auch ohne regelmäßiges Oxygenieren der Flüssigkeit stattfinden kann. Da bei einer Perfusion das Myokard wieder anfangen würde zu schlagen wie bei dem Modell des Langendorff-Herzens^[125], ist ein

2. Theoretischer Hintergrund

wiederholendes Oxygenieren eines Sauerstoffträgers nicht möglich. Stattdessen muss der Sauerstoffträger nach einmaliger Beladung mit Sauerstoff diese über einen Zeitraum sukzessive an die kardioplege Lösung und somit an die Myokardzellen abgeben. Dabei darf keine Hyperoxygenierung oder Hypooxygenierung verursacht werden. Diese speziellen Anforderungen konnten bis jetzt weder natürliche noch künstliche Sauerstoffträger erfüllen.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blutgasanalysator	ABL 800 Flex	Radiometer GmbH, Krefeld, DE
Dispergierer	Ultra-Turrax T25 Basic	IKA-Werke, Staufen, DE
Dispergierwerkzeug	S 25 N – 25 F	IKA-Werke, Staufen, DE
Messgerät zur Partikelgrößenbestimmung	Stabino Nano-Flex	Particle Metrix, Inning am Ammersee, DE
Eismaschine	ZBE 70-35	Ziegra, Isernhagen, DE
Elektrophoresekammer	Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Kalifornien, USA
Feinwaage	ABT 220-5DNM	Kern, Balingen- Frommern, DE
Fusion	Fusion FX700	Biotec PEQLAB- Lifescience, VWR, Erlangen, DE
Hamiltonspritzen	50 µL, 100 µL	Hamilton, Bonaduz, SUI
Heizblock	TM 130-6	Liebisch GmbH & Co. KG, Bielefeld, DE
Hypoxiewerkbank	Whitley H35	Don whitley scientific, West Yorkshire, UK
Inkubator	MCO-18AIC(UV)	SANYO, Osaka, JPN
Kühlschrank	Gastro line	Liebherr-International Deutschland, Biberach ab der Riß, DE
Luminometer	BioTek Synergy HAT	Agilent Technologies, Kalifornien, USA
Microfluidizer	LM-20	Microfluidics, Massachusetts, USA
pH-Meter	765 Calimatic	Knick, Berlin, DE

3. Materialien und Methoden

Photometer	BioTek Epoch	Agilent Technologies, Kalifornien, USA
PreSens-Messgerät	SDR SensorDish Reader	PreSens, Regensburg, DE
Repetitive Pipette	HandyStep S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Respirometer	Oroboros O2k	Oroboros Instruments Corp, Innsbruck, AUT
Rheometer	MCR 92	Anton Paar Germany GmbH Ostfildern, DE
Rollerpumpe	Rotarus standard 50	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Schraubdeckelglas mit Septum	10 mL	neoLab Migge, Heidelberg, DE
Schüttelplatte	Celloshaker variospeed	Biotec-Fischer, Reiskirchen, DE
Sicherheitswerkbank	HERAsafe	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Spannungsquelle	PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories Inc., Kalifornien, USA
Turboblot	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories Inc., Kalifornien, USA
Vibrationsmischer	GLW L46	Oehmen Labortechnik, Essen, DE
Wasserbad	1004	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, DE
Zentrifuge	Varifuge 3.OR	Hereaus, Hanau, DE
Zeta-Potential	Microtrac Stabino	Particle Metrix, Inning am Ammersee, DE

3. Materialien und Methoden

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Gegenstand	Beschreibung	Hersteller
Ansaugspritze	PICO 70	Radiometer GmbH, Krefeld, DE
Handschuhe	Peha-soft-nitril	Hartmann, Heidenheim, DE
Konisches Zentrifugenröhrchen	15 mL, 50 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Papiertücher	Prestige super soft	WEPA Professional, Arnsberg, DE
Perfusionsschläuche	ID: 6 mm, 1,5 mm	Deutsch & Neumann, Berlin, DE
Perfusor-Leitung	ID: 6 mm, 3 mm, 1,5 mm	B.Braun, Melsungen, DE
Pipettenspitzen	10 µL, 200 µL, 1000 µL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
PreSens-Well-Platten	24-Well Platten mit Lumineszenzsensoren	PreSens, Regensburg, DE
Reagiergefäße	1,5 mL, 2 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Serologische Pipetten	5 mL, 10 mL, 25 mL	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, DE
TC-Einsatz	6-Well, 0,4 µM, PET	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Well-Platten	6-Well-Platten, 24-Well- Platten, 96-Well-Platten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Zellkulturflaschen	T25, T75	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Zellschaber		Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE

3. Materialien und Methoden

3.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
0,05 % Trypsin in 0,02 % EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories Inc., Kalifornien, USA
β Aktin-Antikörper (Ursprung: Hase) Artikelnummer: A2103	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Anti-Caspase 3/p17/p19 Artikelnummer: 19677-1-AP	Proteintech Germany GmbH, Planegg- Martinsried, DE
Anti-Hase-HRP (Ursprung: Ziege) Artikelnummer: A0545	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Bisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Custodiol	Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, DE
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
DMEM	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Entsalztes Wasser aus einer MilliQ-Anlage	Merck-Millipore, Darmstadt, DE
Ethanol	Apotheke des Universitätsklinikum Essen, Essen, DE
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 500 mM	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Fibronektin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Gelatine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Glycerin	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Glycin	PanReac AppliChem, Darmstadt, DE

3. Materialien und Methoden

Hefe (Quelle: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
HIF-1-Antikörper (Ursprung: Hase) Artikelnummer: 10006421	Cayman Chemical, Michigan, USA
Hydroxy-Ethyl-Stärke (6 %)	B.Braun, Melsungen, DE
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Kaliumcyanid	Merck-Millipore, Darmstadt, DE
Lecithin aus Soja	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Milchpulver	Apotheke des Universitätsklinikum Essen, Essen, DE
Natriumchlorid (0,9 %)	B.Braun, Melsungen, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS) Tabletten/Pellets	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Norepinephrin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Penicillin-Streptomycin (PS)	Sigma-Aldrich / Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Perfluordecalin HP	F2 Chemicals, Lancashire, UK
Prestained Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Ringer-Lösung	B.Braun, Melsungen, DE
Salzsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Salzsäure ≥ 37 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
STEEN Solution	XVIVO, Göteborg, SWE
Sterofundin ISO	B.Braun, Melsungen, DE
Terralin	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, DE
Tetramethylethyldiamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
TRIS Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE

3. Materialien und Methoden

3.1.4 Lösungen, Medien und Puffer

Lösung/Puffer/Medium	Zusammensetzung
Blockierlösung	5 % entrahmtes Milchpulver in 1x TBST-T
Laufpuffer; 10x	25 mM Tris-Base 190 mM Glycerin 0,1 % SDS pH 8,3
Lower buffer; 4x	181,1 g Tris-Base 4 g SDS pellets 900 mL destilliertes Wasser pH 8,8 (mit konzentrierter Salzsäure)
Lyse-Puffer	150 mM Natriumchlorid 0,5 % NP-40 10 mM Tris-Base (pH 7,9) 2 mM EDTA 1x PBS 10 % Proteaseinhibitor
Phosphatgepufferte Saline Lösung (PBS); 10x	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄
Phosphatpuffer (50 mM, pH = 6,8)	1,7745 g Na ₂ HPO ₄ 1,7249 g NaH ₂ PO ₄ 500 mL destilliertes Wasser
Sammelgel; 2 Gele, 7,5 %	6 mL destilliertes Wasser 2 mL Bisacrylamid 30 % 2,5 mL upper buffer (4x) 100 µL APS 10 % 10 µL TEMED
SDS-Puffer (Laemmli- Probenpuffer); 4x	200 mM Tris, pH 6,8 8 % SDS 10 % β-Mercaptoethanol 0,02 Bromphenolblau 4 % Glycin
<i>Starving</i> Medium	Claycomb Medium 1 % Penicillin 1 % Glutamin
Sublimiertes Claycomb Medium	Claycomb Medium 10 % FBS 1 % Penicillin-Streptomycin 1 % Glutamin 1 % Norepinephrin

3. Materialien und Methoden

TBS-T	100 mL TBS (10x) 900 mL destilliertes Wasser 1 mL Tween 20
Transfer-Puffer	25 mM Tris-Base 190 mM Glycerin 20 % Methanol pH 8,3
Trenngel; 2 Gele, 7,5 %	10 mL destilliertes Wasser 5 mL Bisacrylamid 30 % 5 mL lower buffer (4x) 200 µL APS 10 % 20 µL TEMED
Tris gepufferte Salinlösung (TBS); 10x	24 g Tris-Base 88 g Natriumchlorid 900 mL destilliertes Wasser pH 7,6 (mit Natronlauge) und auf 1 L mit destilliertem Wasser auffüllen
Upper buffer; 4x	30,5 g Tris-Base 2 g SDS pellets 300 mL destilliertes Wasser pH 6,8 (mit konzentrierter Salzsäure)

3.1.5 Kits

Kit	Hersteller
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories Inc., Kalifornien, USA
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega GmbH, Walldorf, DE
CytoTox 96 Non-Radioactive Assay	Promega GmbH, Walldorf, DE
Glucose Uptake-Glo Assay	Promega GmbH, Walldorf, DE
ROS-Glo H ₂ O ₂ Assay	Promega GmbH, Walldorf, DE
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit	Bio-Rad Laboratories Inc., Kalifornien, USA

3. Materialien und Methoden

3.1.6 Software

Software	Version
Anton Paar RheoCompass	1.26
DatLab	7.4.0.4
FIJI ImageJ	1.53c
Gen 5	1.11
GraphPad Prism	10.2.3
Microtrac FLEX Software	11.0.0.5
PreSens SDR	4.0.0
SDR	4.0.0
Stabino Zeta	4.00.01

3.2 Methoden

3.2.1 Synthesen

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Synthesen verwendet, die sich sowohl im Herstellungsprozess als auch in den Edukten unterschieden. In den folgenden Abschnitten werden die unterschiedlichen Syntheseprozesse beschrieben.

3.2.1.1 LENOX basic Synthese

Zur Herstellung der LENOX basic Emulsion wurden 20 mL einer 5 % Albuminlösung, 4 mL PFD und 0,4 g Lecithin in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Dieses drei-Phasen-Gemisch wurde zuerst intensiv mit einem Vibrationsmischer vermischt und anschließend mit einem Ultra-Turrax bei 13.500 rpm für 5 s präemulgiert. Die Präemulsion wurde danach in den Microfluidizer LM-20 überführt und bei 20.000 psi unter geeigneter Kühlung (Eisbad) 30 Stöße (ca. 7-8 Zyklen) rezyklisierend emulgiert. Die Rezyklisierung der Emulsion wurde realisiert, indem der Probenausgang des Microfluidizers über ein Schlauchsystem mit dem Probeneingang verbunden wurde. Die finale Emulsion musste abschließend mindestens 20 min in einem Eisbad ruhen, bevor sie analysiert oder weiterverarbeitet werden konnte. In Abbildung 3 ist der Syntheseprozess schematisch dargestellt.

3. Materialien und Methoden

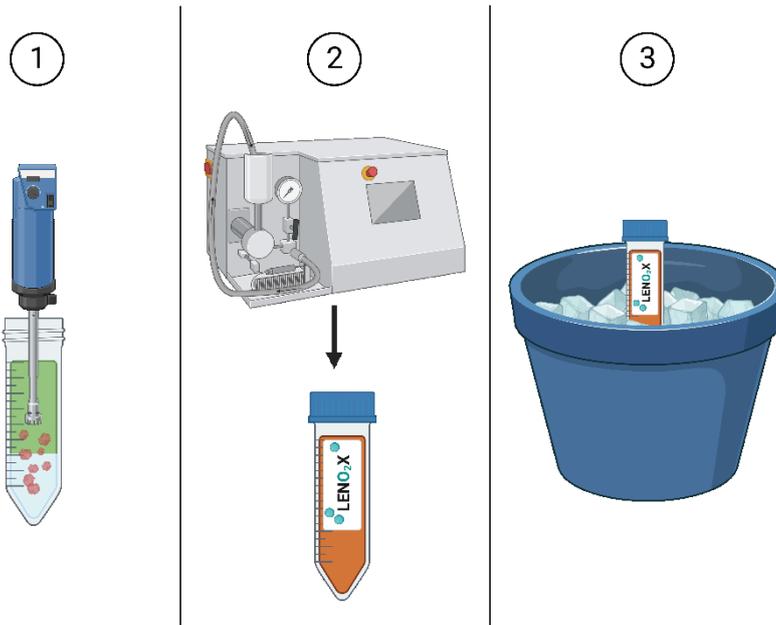


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Syntheseprozesses von LENOX basic.

3.2.1.2 Kontrollemlusion

Die Kontrollemlusion diente als Vergleich für die neu entwickelte LENOX basic Emulsion. Sie wurde nach dem gleichen Syntheseprotokoll (siehe 3.2.1.1) hergestellt wie LENOX basic. Der einzige Unterschied war, dass kein Lecithin zugesetzt wurde.

3.2.1.3 LENOX-OFH

Die Verwendung von HSA als klinische Fertiglösung führte zu einem Problem. Den HSA-Fertiglösungen werden N-Acetyl-DL-Tryptophan und Octansäure als Stabilisatoren zugesetzt.^[126] Diese beiden Substanzen sorgen dafür, dass die mit HSA synthetisierten LENOX-Emulsionen eine geringere Stabilität aufwiesen. Aus diesem Grund musste eine Optimierung des LENOX basic-Syntheseprotokolls vorgenommen werden. Das Ziel dieser Optimierung war es, eine stabile und für verschiedene Verwendungsmöglichkeiten anwendbare Synthesemethode zu entwickeln, in der die HSA-Fertiglösungen verwendet werden konnten, ohne diese selbst zu verändern. Des Weiteren sollten keine weiteren Hilfsstoffe hinzugefügt werden und die Synthesezeit sollte sich nicht maßgeblich erhöhen, sodass eine Scale-up der Synthese immer noch möglich ist. Deshalb wurde folgendes Syntheseprotokoll entwickelt:

In einem 50 mL Zentrifugenröhrchen wurden 20 mL einer 5 % HSA-Lösung und 4 mL PFD vorgelegt und mit einem Ultra-Turrax bei 9.500 rpm präemulgiert. Die Präemulsion wurde in den Microfluidizer überführt und rezyklisierend 20 Stöße

3. Materialien und Methoden

(5 Zyklen) bei 20.000 psi unter geeigneter Kühlung prozessiert. Nach den 20 Stößen wurde das gesamte Volumen aufgefangen und es wurden dem Intermediat 0,4 g Lecithin zugefügt. Das Gemisch wurde daraufhin intensiv mit einem Vibrationsmischer und anschließend mit einem Ultra-Turrax bei 13.500 rpm emulgiert. Zur weiteren Verfeinerung der Emulsion wurde das Gemisch wieder in den Microfluidizer überführt und bei 20.000 psi für 10 Stöße (ca. 2-3 Zyklen) unter gleichbleibender Kühlung prozessiert. Das fertige Produkt wurde, wie die ursprüngliche LENOX basic Emulsion nach dem Syntheseprozess, für mindestens 20 min in einem Eisbad gelagert, bevor sie analysiert werden konnte.

Alle Emulsionen, die nach diesem Protokoll synthetisiert wurden, sind eine modifizierte Variante der ursprünglichen LENOX basic Emulsion (3.2.1.1) und werden als LENOX OFH (LENOX optimiert für Humanalbumin) bezeichnet.

3.2.1.4 LENOX in kristalloiden und kolloidalen Lösungen

Um die Kompatibilität der LENOX basic Emulsion mit klinisch relevanten kristalloiden und kolloidalen Lösungen zu untersuchen, wurden die Emulsionen direkt in den jeweiligen Lösungen hergestellt. Dazu wurde das zuvor beschriebene LENOX basic-Syntheseprotokoll verwendet (Kapitel 3.2.1.1). Die einzige Änderung zum Basisprotokoll war, dass das benötigte Albumin nicht in Wasser gelöst wurde, sondern in der jeweiligen kristalloiden oder kolloidalen Lösung. Die Verwendung von Zellkulturmedien als Trägerlösung ist ebenfalls möglich gewesen.

3.2.2 Dynamische Lichtstreuung

Zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung wurde der Stabino Nano-flex verwendet. Zu Beginn wurde eine Nullwert-Kalibrierung durchgeführt. Dazu wurde 1 mL Wasser in einem 2 mL Reagiergefäß vorgelegt, die Lasersonde zu 2/3 eingetaucht und die softwareinterne Kalibrierung durchgeführt. Nach der Kalibrierung konnte die Analyseprobe gemessen werden. Dafür wurde 1 mL Probe in ein 2 mL Reagiergefäß überführt und die Lasersonde zu 2/3 eingetaucht. Anschließend konnte der Messzyklus gestartet werden und die Partikelgrößenverteilung nach der Messung eingesehen werden. Alle verwendeten Prozesseinstellungen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

3. Materialien und Methoden

Tabelle 2: Prozesseinstellungen für die DLS-Messung.

Parameter	Wert
Brechungsindex Medium	1,35
Transparenz	transparent
Form	sphärisch
Brechungsindex Partikel	1,30
Niedrige Temperatur	20,0 °C
Hohe Temperatur	37,0 °C
Analysetyp	Verteilung
Verteilung	Intensität
Untere Grenze	0,8 nm
Obere Grenze	6540 nm
Restwerte	deaktiviert
Dauer Nullwert-Kalibriermessung	300 s
Messdauer	300 s
Anzahl der Messdurchläufe	3

Die Auswertung der DLS-Messungen erfolgte auf zwei Arten. Zum einen wurde die Partikelgrößenverteilung und ggf. die kumulative Funktion als Grundlage der Auswertung verwendet. Dabei wurden beide Funktionen mit Hilfe eines geeigneten mathematischen Modells angepasst und bildlich dargestellt. Zum anderen wurden die Analysedaten nach den Normen DIN ISO 9276-1 und DIN ISO 9276-2^[127, 128] ausgewertet. Dabei wurden aus der kumulativen Funktion die Perzentile d10, d50 und d90 berechnet und zusätzlich die Spanne (S) der Verteilung mit Hilfe der Formel 9 bestimmt.

Formel 9: Berechnung der Spanne der Partikelgrößenverteilung.^[127, 128]

$$S = \frac{d90 - d10}{d50} \quad (9)$$

Die Kombination aus den drei Perzentilen (d10, d50 und d90) und der Spanne ermöglicht eine Beschreibung der gesamten Partikelgrößenverteilung und eine aussagekräftige Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen.

3. Materialien und Methoden

3.2.3 Sauerstoffbestimmung mittels Clark-Elektrode

Die Bestimmung der Sauerstoffkapazität erfolgte über eine Clark-Elektrode, wozu das Respirometer O2k verwendet wurde. Nachdem das Gerät mit dem internen Protokoll gereinigt wurde, ist eine Tageskalibrierung durchgeführt worden, um tagesaktuelle Luftdruckunterschiede zu kompensieren. Die Messung fand in einer luftdichten Kammer mit einem Volumen von 2 mL statt. Zum Start der Messung wurde die Kammer mit Hefe (2 mg/mL) in Natriumphosphat-Puffer (50 mM) befüllt und solange gewartet, bis der Messwert ein Minimum erreicht hat. Um den aeroben Metabolismus der Hefe zu stoppen, wurden 50 µL Kaliumcyanid (100 mM) zugegeben. Um die Analyseprobe mit Sauerstoff zu beladen wurden 2 mL Proben in ein Schraubdeckelglas mit Septum vorgelegt und bei einer Flussrate von 0,5 L/min für 15 min mit 100 % Sauerstoff begast. Nach der Oxygenierung wurden 50 µL der Probe mit einer gasdichten Spritze in die Messkammer injiziert und die Sauerstofffreisetzung über die Software aufgezeichnet. Die finale Sauerstoffkapazität ergab sich aus der Differenz zwischen dem Messwert vor und nach der Zugabe der oxygenierten Analyseprobe.

3.2.4 Viskositätsmessung

Zur Bestimmung der Viskosität der verschiedenen Emulsionen und Medien wurde ein Rheometer verwendet. Nach dem softwareinternen Start- und Kalibrierungsprozess wurde 1 mL der Analyseprobe auf den Probenhalter aufgetragen und das Messprotokoll gestartet. Abbildung 4 zeigt den durchgeführten Messablauf mit allen Arbeitsschritten. Es ist zu sehen, dass nach Erreichen der Messposition und jeweils vor den eigentlichen Viskositätsmessungen ein Kontrollschritt durchgeführt wurde. Dieser war nötig, damit die angegebenen Temperaturen über den gesamten Messprozess unverändert blieben.

3. Materialien und Methoden

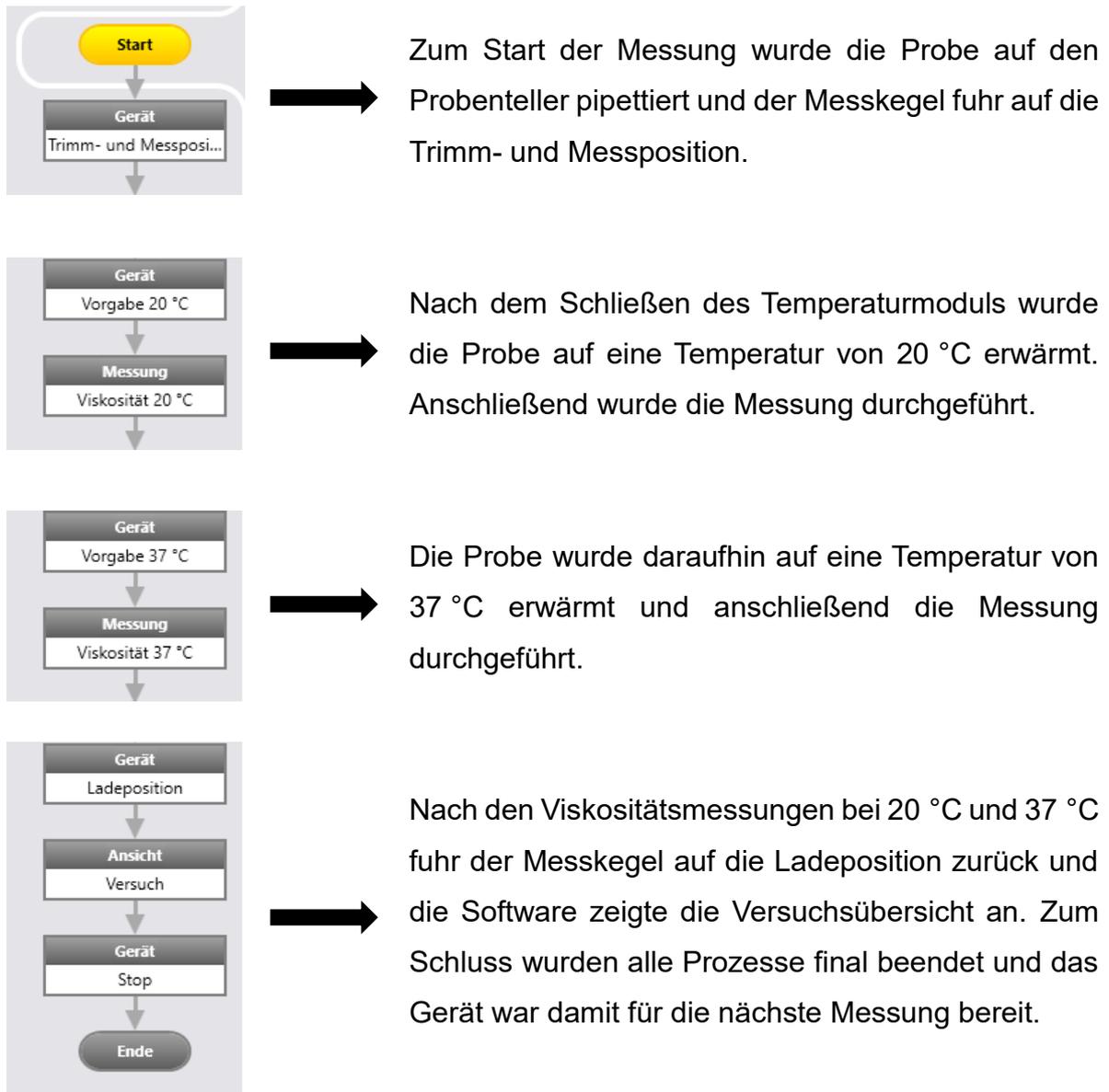


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Messablaufs zur Bestimmung der Viskosität und die Erklärung der einzelnen Aktionsblöcke.

Bei der Messung wurde die Viskosität bei vorgegebenen Scherraten bestimmt, wobei die Messzeit pro Datenpunkt konstant blieb (30 s). Die gewählten Scherraten (50 – 800 s⁻¹) entsprachen physiologischen Werten, die auch in menschlichen Blutgefäßen vorkommen.^[129] Es wurde ein „Anfahrtsmesspunkt“ (10 s⁻¹) bestimmt, welcher keine Bedeutung für die Auswertung der Versuche hat. Dieser sorgte dafür, dass der rotierende Messkegel das anfängliche Trägheitsmoment überwinden konnte, ohne die Messung dabei zu beeinflussen. Alle Messparameter sind als Standardarbeitsanweisung in Tabelle 3 zusammengefasst.

3. Materialien und Methoden

Tabelle 3: Standardarbeitsanweisung zur Bestimmung der Viskosität.

Parameter	Wert
Temperatureinstellung	
Temperatur	20 °C bzw. 37 °C
Toleranz	± 0,2 °C
Überwachungszeit	2 min
Viskositätsmessung	
Profil	Werteliste
Anzahl der Datenpunkte	7
Zeitprofil	Konstant
Messdauer pro Punkt	30 s
Vorgabegröße	Scherrate
Vorgegebene Werte	10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 s ⁻¹

3.2.5 Messung des Zeta-Potentials

Um das Zeta-Potential der reinen Emulsion bestimmen zu können, mussten die Emulsionstropfen erst von freien, nicht an der Grenzfläche angelagerten, Ionen getrennt werden, da sie sonst das Messergebnis beeinflussen können. Der Trennvorgang bestand aus drei Zentrifugationsschritten. 24 mL der Emulsion wurde in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen in eine Zentrifuge bei 2.000 g und 4 °C für 3 h zentrifugiert. Anschließend wurde der flüssige Überstand so weit abgenommen, dass neben dem Sediment auch der leicht trübe Überstand in dem Zentrifugenröhrchen verblieb, da in dieser Phase kleinere Emulsionstropfen vorhanden waren. Der Probe wurde so viel Wasser zugesetzt, bis ein Gesamtvolumen von 50 mL erreicht wurde. Das Sediment wurde resuspendiert und das Zentrifugenröhrchen wurde wieder in die Zentrifuge gestellt. Im zweiten Zentrifugationsschritt betragen die Parameter 1.000 g, 4 °C und 1 h. Die Aufbereitung der Proben erfolgte äquivalent zum vorherigen Schritt. Der letzte Zentrifugationsschritt wurde ebenfalls bei 1.000 g, 4 °C und 1 h durchgeführt. Anschließend wurde der Überstand wieder abgenommen und die Probe nur mit 24 mL MilliQ-Wasser aufgefüllt, um die Ausgangskonzentration wiederherzustellen. Das Sediment wurde intensiv resuspendiert und die Probe war somit final aufgereinigt.

3. Materialien und Methoden

Zur Messung des Zeta-Potentials wurde der Stabino Zeta verwendet. Es wurden 10 mL der zu analysierende Probe in den Messbecher gegeben und der Messstößel (0,2 µm) eingesetzt. Das gesamte Konstrukt wurde an das Analysegerät angeschlossen. Die Analyseprobe wurde zehnmal für jeweils 10 s bei Raumtemperatur und konstantem pH gemessen und aus den zehn Messungen das arithmetische Mittel gebildet.

3.2.6 Toxikologische Analysen

3.2.6.1 LDH-Assay

Um die Freisetzung von LDH zu bestimmen, wurde der *CytoTox 96 Non-Radioactive Assay* verwendet. Die aus den Versuchen abgenommenen zellfreien Überstände (50 µL) wurden in eine neue 96-Well-Platte überführt und mit 50 µL des CytoTox 96-Reagenz versetzt. Anschließend wurde die Platte lichtgeschützt für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 50 µL der Stopp-Lösung zugegeben. Die Messung fand abschließend in einem Photometer bei einer festen Wellenlänge von 490 nm (OD 490) statt. Die Positivkontrolle (maximale LDH-Freisetzung) wurde bestimmt, indem 10 µL Lysierungspuffer zu den Zellen zugegeben wurden und dann 50 µL Analyseprobe gewonnen wurde. Die Toxizität wurde mit der Formel 10 bestimmt.

Formel 10: Berechnung der Toxizität durch LDH-Freisetzung.^[130]

$$\text{Toxizität [\%]} = \frac{\text{experimentelle LDH-Freisetzung (OD 490)}}{\text{maximale LDH-Freisetzung (OD 490)}} \cdot 100 \quad (10)$$

3.2.6.2 MTT-Assay

Zur Bewertung der Lebensfähigkeit der Zellen wurde ein MTT-Test durchgeführt. Nach Zugabe von Zellkulturmedium (DMEM) und den Analyseproben wurden 20 µl MTT-Stammlösung (5 mg/mL) in jede Vertiefung gegeben und anschließend 4 h lang bei 37 °C inkubiert, damit sich der gelbe Farbstoff in blaue Kristalle umwandeln konnte. Der nicht umgesetzte Farbstoff wurde durch Absaugen entfernt, und 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden in jede Vertiefung gegeben, um die dunkelblauen Kristalle aufzulösen. Die Extinktion wurde mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die Werte wurden mit dem Zellkulturmedium ohne Zellen normalisiert.

3. Materialien und Methoden

3.2.6.3 Caspase 3-Assay

Um die Anhäufung des Apoptose-bezogenen Proteins Caspase 3 zu bestimmen, wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Für die Durchführung der Gelelektrophorese wurden Polyacrylamidgele mit einer Konzentration von 7,5 % verwendet. Zunächst wurden die Vorläuferverbindungen für das Trenngel in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen vereint und dann rasch in die vorbereitete Apparatur transferiert. Um eine gleichmäßige Oberfläche zu gewährleisten und das Austrocknen des Gels zu verhindern, wurde das Gemisch mit Isopropanol überdeckt. Nach Abschluss der Polymerisationsreaktion wurde das Isopropanol entfernt, und die Edukte für das Sammelgel wurden in einem separaten Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Das Trenngel wurde unmittelbar mit dem Gemisch für das Sammelgel überschichtet und der Kamm für die Probenaschen wurde in das flüssige Sammelgel eingeführt. Während der Polymerisation des Sammelgels wurden die Proben für die Gelelektrophorese vorbereitet.

Die Proteinkonzentrationen der lysierten Proben wurden mit einem Bicinchoninsäure-Protein-Assay bestimmt. 50 µg Gesamtprotein wurden in Laemmli-Probenpuffer für 5 min bei 95 °C inkubiert und zur Proteintrennung einer 7,5 %igen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unterzogen. Die Proteine wurden anschließend mit der Semi-Dry-Blot-Methode (Trans-Blot Turbo Transfer System) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membranen wurden mit 5 % BSA in T-TBS 1 h lang bei Raumtemperatur blockiert und dann über Nacht bei 4 °C mit den primären Antikörpern inkubiert. Es wurden die folgenden Antikörper verwendet: Anti-Caspase 3 (p17/p19) und anti-β-Actin. Anschließend wurden die Membranen in T-TBS gewaschen und 1 h lang bei Raumtemperatur mit Meerrettichperoxidase (HRP) Anti-Kaninchen-Immunglobulin G (IgG)-Sekundärantikörper im Blocking-Puffer inkubiert. Die Signale wurden mit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate verstärkt und mit einem Fusion FX System nachgewiesen. Die Immunoblot-Bandendichten wurden mit der Software ImageJ analysiert und die relativen Intensitäten wurden unter Verwendung von β-Actin als Ladekontrolle berechnet und als *fold change* ausgedrückt.

3.2.7 Bestimmung von HIF-1α mittels Western Blot

Zur Bestimmung von HIF-1α wurde das Zelllysat mit Hilfe einer Gelelektrophorese (7,5 %igen SDS-PAGE) aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot das HIF-1α

3. Materialien und Methoden

bestimmt. Hierbei wurde die benötigte Menge an Probe entsprechend der Ergebnisse der Proteinkonzentrationsbestimmung berechnet, um eine Proteinkonzentration von 50 µg pro Probenflasche zu realisieren. Zu jeder Probe wurde daraufhin ein Lyse-Puffer hinzugefügt, um ein Gesamtvolumen von 30 µL zu erreichen. Zur Denaturierung der Proteine wurden zusätzlich 10 µL eines 4-fachen SDS-Puffers zugegeben und anschließend das Gemisch für 15 min bei 95 °C erhitzt, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Für die Gelelektrophorese wurde ein 10-facher Laufpuffer verwendet, der vor der Anwendung auf ein Verhältnis von 1:10 verdünnt wurde. Die Elektrophoresekammer wurde präpariert und das vollständig ausgehärtete Gel wurde eingesetzt. Die Kammer wurde mit dem verdünnten Laufpuffer gefüllt und der Kamm vorsichtig aus den Probenflaschen entfernt. 30 µL der denaturierten Proben wurden in jede Probenflasche des Gels pipettiert. Zur leichteren Identifizierung der Fragmente wurde ein Proteinmarker in einer Probenflasche vorbereitet. Anschließend wurde eine Spannung von 120 V für eine Dauer von 70 min angelegt, wodurch sich die Proteine durch das Gel trennten.

3.2.8. Biochemische Analysen zur Bestimmung der metabolischen Zellaktivität und ROS-Bildung in der Zellkultur

3.2.8.1 Bestimmung der Glukoseaufnahme

Der *Glucose Uptake-Glo Assay* ist eine nicht-radioaktive Methode zur Messung der Glukoseaufnahme in Säugetierzellen durch den Nachweis von 2-deoxyglukose-6-phosphat mittels Biolumineszenz. Nach der Inkubation wurden 50 µL des 2DG6P-Standards (1 mM) pro Vertiefung zugegeben und die Zellen 10 min inkubiert. Daraufhin wurden 25 µL Stopppuffer und 25 µL Neutralisationspuffer zugegeben und die Platte leicht geschüttelt. Anschließend wurden 100 µL des 2DG6P-Nachweisreagenz zugegeben und die Zellen in diesem Gemisch für mindestens 30 min inkubiert. Danach konnte die Platte in einem Luminometer gemessen werden.

3.2.8.2 Messung der ATP-Konzentration zur Bestimmung der metabolischen Aktivität

Eine Methode zur Bestimmung der Zellviabilität von kultivierten Zellen ist die quantitative Analyse von vorhandenem ATP als Marker für die metabolische Aktivität. Dazu wurde der *CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay* verwendet. Nach der Inkubation der Zellen mit den Versuchslösungen wurde eine äquivalente Menge des Nachweisreagenzes zur vorhandenen Menge an Medium gegeben (beispielsweise 100 µL des Nachweisreagenz auf 100 µL Medium) und die Platte für 2 min auf einem

3. Materialien und Methoden

Schüttler platziert, um die Lyse der Zellen zu induzieren. Anschließend wurde die Platte für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach die Lumineszenz in einem Luminometer gemessen.

3.2.8.3 Bestimmung der Bildung von radikalen Sauerstoffspezies

Zum Nachweis von gebildeten ROS wurde der *ROS-Glo H₂O₂-Assay* verwendet. Bei diesem Test wurde die vorhandene Menge an Wasserstoffperoxid (H₂O₂) mittels Lumineszenz durch das Hinzufügen eines Nachweisreagenzes gemessen. Vor dem Versuch wurden die Zellen mit einem H₂O₂-Substrat versetzt, sodass die finale Konzentration von H₂O₂ bei 25 µM lag. Anschließend wurden die Zellen mit den Versuchslösungen inkubiert (siehe Kapitel 3.3.6). Nach dem Versuch wurden 100 µL des ROS-Glo Nachweisreagenz in jede Vertiefung gegeben und die Platte für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die relative Lumineszenz konnte danach mit einem Luminometer gemessen werden.

3.2.9 Blutgasanalyse

Die Blutgasanalyse (BGA) wurde durchgeführt, um typische klinische Parameter wie pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Kationen und Anionen zu bestimmen. Für die Analyse wurde ein Blutgasanalysator verwendet. 1 mL der Analyseprobe wurde entweder in eine Pico-Spritze oder in ein Reagiergefäß überführt. Daraus wurden 90 µL von dem Gerät aufgenommen und das Analyseergebnis konnte nach der Messung als Ausdruck erhalten werden.

3.2.10 Statistik

Die statistische Auswertung, sowie die grafische Darstellung der Versuchsdaten wurde mit Hilfe des Statistikprogramms Graphpad Prism durchgeführt. Abhängig von den erzeugten Daten wurde entweder ein t-Test oder ein ANOVA Test durchgeführt. Bei der Verwendung eines ANOVA Test wurde zusätzlich eine post hoc-Analyse durchgeführt. Welche Tests genau verwendet wurden, wird im Kapitel 4 beschrieben. Signifikante Unterschiede werden nach folgenden p-Werten unterschieden: $p > 0.05$ (ns), $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***) und $p \leq 0.0001$ (****). Die Daten sind, wenn nicht anders beschrieben, als arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung angegeben, wobei die Standardabweichung als Fehlerbalken dargestellt wird.

3. Materialien und Methoden

3.3 Versuchsdurchführungen

3.3.1 Basisdaten

Da es sich bei LENOX um ein völlig neues Produkt handelte, wurden zuerst grundlegende Eigenschaften der Emulsion bestimmt. Dazu wurde das Produkt nach den in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Protokollen synthetisiert und direkt nach der Herstellung analysiert. Es wurden Viskositätsmessungen und Partikelgrößenbestimmungen mittels DSL durchgeführt. Als Funktionstest wurde die Sauerstofffreisetzung mit Hilfe des Oroboros bestimmt. Um die Stabilität der Emulsion einschätzen zu können, wurde das Zeta-Potential der Emulsionstropfen ermittelt. Bei allen dieser Analysen wurde die Kontrollemulsion (Kapitel 3.2.1.2) als Vergleichsprobe verwendet.

Da LENOX als medizinisches Produkt in lebenden Organismen verwendet werden soll, wurde die Emulsion auf ihre toxikologische Wirkung untersucht. Dazu wurden, mit Hilfe von Dr. Miriam Cantore, LDH-Tests, MTT-Tests und Bestimmungen der Caspase 3-Bildung in Hep 3B-Zellen durchgeführt. Für die Analysen wurde LENOX direkt im Zellkulturmedium synthetisiert (Kapitel 3.2.1.4). Als Kontrolle diente hier Zellkulturmedium ohne LENOX.

3.3.2 Lagerungsstabilität

Eine sehr wichtige Voraussetzung von künstlichen Sauerstoffträgern ist eine hohe Lagerungsstabilität. Um die Stabilität der neuen Emulsion während einer Langzeitlagerung zu bestimmen, wurde mit der Unterstützung von Marina Penzel LENOX synthetisiert und in 2 mL Reagiergefäße aliquotiert, sodass diese vollständig gefüllt waren und das Luftpolster über der Flüssigkeit minimal war. Die Proben wurden statisch bei 4 °C und lichtgeschützt gelagert. Von der Emulsion wurde über einen Zeitraum von 42 Tagen, im Abstand von sieben Tagen, die Viskosität und die Partikelgrößenverteilung bestimmt. Zusätzlich wurde die Änderung der Funktionalität bestimmt, indem die Sauerstoffkapazität mit Hilfe des Oroboros direkt nach Herstellung und am letzten Messtag (Tag 42) gemessen wurde.

3.3.3 Kompatibilität mit klinisch relevanten kristalloiden und kolloidalen Lösungen

Die Kompatibilität von künstlichen Sauerstoffträgern mit salinen Lösungen, vor allem mit klinisch relevanten kristalloiden und kolloidalen Lösungen, war eine der wichtigsten Anforderungen an die LENOX Emulsion. Um die Anwendbarkeit der LENOX in verschiedenen Trägermedien zu untersuchen, wurden folgende sechs klinisch

3. Materialien und Methoden

relevante Lösungen ausgewählt: Hydroxy-Ethyl-Stärke 6 % (HES 6 %), physiologische Natriumchlorid-Lösung 0,9 % (NaCl 0,9 %), Ringer-Lösung, Sterofundin ISO, STEEN Solution und Custodiol.

Alle Emulsionen wurden direkt in diesen Medien synthetisiert (Kapitel 3.2.1.4) und nach der Synthese sofort analysiert. Als Messparameter wurde die Partikelgrößenverteilung und Viskosität sowie die Sauerstoffkapazität gewählt. Die gewonnenen Analysedaten wurden immer mit LENOX in Wasser (mit Sternen markiert) und mit LENOX in STEEN Solution (mit Pluszeichen markiert) verglichen.

3.3.4 Simulierte normotherme Maschinenperfusion

Ein mögliches Anwendungsgebiet für LENOX ist die Maschinenperfusion. Dabei soll der AOC in einem pumpengesteuerten Kreislauf zirkulieren und bei jedem Durchgang über einen Oxygenator mit Sauerstoff beladen werden. Der beladene Sauerstoff wird dann an einen Verbraucher, z.B. ein isoliertes Organ, wieder abgeben. Damit dies möglich ist, darf die Zirkulation keinen negativen Effekt auf die Emulsionstropfen selbst haben. Um den Einfluss einer möglichen Maschinenperfusion auf die Stabilität und Funktionalität der LENOX Emulsion zu bestimmen, wurde eine schematische, normotherme Maschinenperfusion simuliert, wobei kein Verbraucher in Form eines Organs verwendet wurde. Der Aufbau der schematischen Perfusionsanlage orientierte sich an der Arbeit von Yuzefovych *et al.*^[131] Der Aufbau ist in Abbildung 5 dargestellt und zeigt neben einer Rollerpumpe, einem Wärmetauscher und einem Reservoir auch einen selbstgebauten Oxygenator.

3. Materialien und Methoden

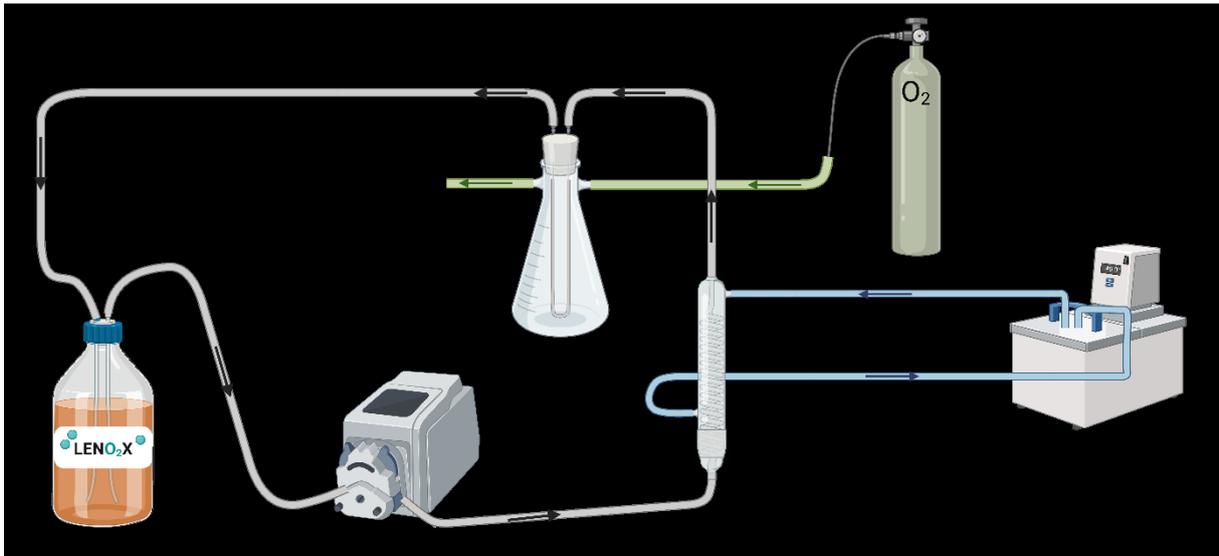


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Perfusionsanlage zur simulierten Maschinenperfusion.

Das Trägermedium mit LENO₂X wurde von der Rollerpumpe aus dem Reservoir angesaugt und durch den Wärmetauscher bewegt, welcher das Perfusat auf 37 °C erwärmte. Anschließend erfolgte die Sauerstoffbeladung. Dazu wurde das Perfusat durch einen gasdurchlässigen Schlauch bewegt, der sich wiederum in einem Erlenmeyerkolben befand. Dieser Erlenmeyerkolben wurde mit Sauerstoff durchflutet, sodass sich Sauerstoff im Glaskörper anreicherte. Auf Grund der höheren Sauerstoffkonzentration diffundierte der Sauerstoff durch den Schlauch und konnte somit den Sauerstoffträger beladen. Das Perfusat wurde nach der Beladung wieder in das Reservoir geführt und der Kreislauf konnte wieder von vorne beginnen.

In diesem System wurde die LENO₂X Emulsion mit drei unterschiedlichen Trägermedien getestet. Neben LENO₂X in Wasser wurde der Sauerstoffträger auch in den klinisch- und forschungsrelevanten Perfusionsmedien STEEN Solution und Custodiol synthetisiert und analysiert. Für die Anwendung in der Perfusionsanlage wurde LENO₂X basic mit dem Trägermedium auf eine Konzentration von 4 vol.% verdünnt und der Sauerstofffluss für den Oxygenator auf 0,5 L/min eingestellt. Das Wasserbad zur Erwärmung des Perfusats hatte eine Temperatur von 40 °C, sodass die zirkulierende Flüssigkeit eine Temperatur von 37 °C aufwies. Die Rollerpumpe wurde für eine kontrollierte und gleichmäßige Bewegung auf eine Geschwindigkeit von 10 rpm eingestellt.

3. Materialien und Methoden

In Zeitintervallen von 30 min wurde mit Hilfe einer Spritze 2 mL des Perfusats entnommen und sowohl die Viskosität und die Partikelgrößenverteilung bestimmt als auch eine Blutgasanalyse durchgeführt.

3.3.5 Auswirkung auf eine biologische Umgebung

Um letztendlich als künstlicher Sauerstoffträger in einem Organismus zum Einsatz kommen zu können, darf LENOX keine toxische Wirkung auf Gewebe und Zellen haben. Um eine mögliche Toxizität bestimmen zu können, wurden drei unterschiedliche toxikologische Untersuchungen durchgeführt. Der LDH-Test diente als Parameter für Zellschädigung, der MTT-Test bestimmte die Zellviabilität und Caspase 3 wurde als Marker für apoptotische Zellen bestimmt. Für die toxikologischen Analysen wurde eine menschliche hepatische Zelllinie verwendet (Hep-3B). Die Hep-3B wurden in DMEM, ergänzt mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS), Streptomycin (100 mg/mL) und Penicillin (100 U/mL) bei 37 °C unter 21 % O₂ und 5 % CO₂ kultiviert. Nachdem eine Konfluenz von 80 % in den Zellkulturflaschen erreicht war, wurden die Zellen mit einem Gemisch aus phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), 0,25 % Trypsin und 0,03 % EDTA trypsinisiert und in 6-Well- oder 96-Well-Kulturplatten bei Dichten von 250.000 Zellen bzw. 100.000 Zellen pro Well ausgesät. Nach 24 h wurde vor dem Experiment die LENOX-Emulsion auf 4 vol.% in DMEM (ohne FBS) verdünnt. Die Zellen wurden jeweils für 4 h mit und ohne LENOX basic inkubiert, gefolgt von einer anschließenden Analyse der Zytotoxizität (LDH), Zellviabilität (MTT) und apoptosis-bezogener Proteine (Caspase 3). Die toxikologischen Versuche wurden mit der Unterstützung von Dr. Miriam Cantore durchgeführt.

3.3.6 Modifikation für eine verlängerte Sauerstofffreisetzung

3.3.6.1 Physikalische Sauerstofffreisetzung der E-ROC

Wie in Kapitel 2.2 beschrieben, erfolgt die Sauerstofffreisetzung abhängig vom Sauerstoffpartialdruckgradienten zwischen dem PFC und dem umgebenden Medium. Ziel dieses Experimentes war es, die Sauerstofffreisetzung über einen längeren Zeitraum realisieren zu können und gleichzeitig eine ausreichende Menge Sauerstoff zu liefern, um lebende Zellen zu oxygenieren bzw. hypoxische Zellen zu reoxygenieren. Im ersten Schritt sollte die Dauer der reinen Sauerstofffreisetzung ohne Zellen verlängert werden. Dazu wurden ein Gemisch (insgesamt 200 µL) aus einem Teil präoxygenierten LENOX (2 mL LENOX, 0.5 L/min 100 % O₂, bei 20 °C für 15 min) und nicht oxygenierten LENOX im Verhältnis 1:1 zu 500 µL Wasser hinzugegeben und

3. Materialien und Methoden

mit Hilfe des PreSens-Systems die vorhandene Sauerstoffmenge über einen Zeitraum bestimmt. Die Messung fand in einer Hypoxiewerkbank bei einer eingestellten Atmosphäre von 1 % O₂, 5 % CO₂ und 94 % N₂ statt. Das vorgelegte Wasser wurde für 16 h unter dieser Atmosphäre vor Versuchsbeginn gelagert, sodass die Menge an gelöstem Sauerstoff ein Minimum angenommen hat. Das Gemisch aus oxygenierten und nicht-oxygenierten LENOX im Verhältnis 1:1 werden im Folgenden als E-ROC (*extended-release oxygen carrier*) bezeichnet.

3.3.6.2 Analyse der HL-1 Zellen

Im zweiten Schritt sollte der Effekt der E-ROC auf Zellen überprüft werden. Dazu wurden Kardiomyozyten der Linie HL-1 ausgewählt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie in Claycomb *et al.* beschrieben.^[132] Die nachfolgenden Versuche wurden mit Unterstützung von Dr. Miriam Cantore und Marina Penzel durchgeführt.

Für die Messungen von sechs verschiedenen Parametern wurden zwei grundlegende Versuchsaufbauten verwendet. Für die Bestimmung von LDH, Troponin und HIF wurden 200.000 Zellen pro Vertiefung in eine 6-Well-Platte ausgesät und für 24 h im Zellkulturmedium gelagert. Anschließend wurde das Medium durch ein Medium ohne Nährstoffe (*starving* Medium) ersetzt und die Zellen verblieben weitere 24 h in dem neuen Medium. Nach der Wartezeit wurde die Platte in einer Hypoxiewerkbank platziert und das Medium wurde gegen hypoxisches Custodiol (1 % O₂) ausgetauscht. Bei einer fest eingestellten Atmosphäre (1 % O₂, 5 % CO₂ und 94 % N₂) ruhten die Zellen für 4 h in dem Custodiol bis anschließend das Custodiol durch entweder präoxygeniertem Custodiol oder präoxygenierten E-ROC ersetzt wurde. Die E-ROC wurden direkt in Custodiol synthetisiert und beide Proben (E-ROC und Custodiol) nach dem zuvor beschriebenen Protokoll oxygeniert. Nach einer Inkubationszeit von 4 h wurden die HIF-Proben mit 50 µL eines Protein-Lyse-Puffer versetzt und die Zellen mit einem Schaber abgelöst. Das Zelllysate wurde durch Zentrifugation (1100 rpm, 3 min, 4 °C) aus dem Medium entfernt und konnte anschließend nach dem Protokoll in Kapitel 3.2.7 analysiert werden. Die Proben für die LDH und Troponin-Bestimmungen wurden nicht lysiert. Stattdessen wurden die Analyseproben direkt aus dem Überstand der Versuche entnommen. Vor der Zelllyse wurden 500 µL für die Troponin und 50 µL für die LDH-Bestimmung aus dem Medium entnommen. Die Troponin-Bestimmung wurde vom klinische Zentrallabor des Universitätsklinikum Essens durchgeführt.

3. Materialien und Methoden

Das zweite Versuchsaufbau wurde zur Bestimmung der Glukoseaufnahme, der ROS-Bildung und der ATP-Produktion verwendet. In einer 24-Well-Platte wurden 50.000 Zellen pro Vertiefung in einen Einsatz ausgesät, sodass Medium und Zellen in Kontakt standen, aber die Zellen durch Entfernen des Einsatzes vollständig aus dem Medium entfernt werden konnten. Auf Grund des Einsatzes war es möglich, die Zellen und die LENOX effektiv voneinander zu trennen, ohne die Sauerstoffversorgung der Zellen zu beeinflussen, da die Nanopartikel die Nachweisreaktionen erheblich störten. Die Zellen wurden äquivalent zum anderen Aufbau für 24 h im *starving* Medium inkubiert und anschließend für weitere 4 h unter Hypoxie gelagert. Die Inkubation mit präoxygeniertem Custodiol und E-ROC erfolgte exakt wie bei den Analysen von LDH, Troponin und HIF über 4 h. Nach der Inkubation der Zellen mit den Probesubstanzen wurden die individuellen Protokolle der jeweiligen Analysesubstanzen aus Kapitel 3.2.8 durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Basisdaten

Bei den LENOX Basisdaten handelt es sich um die physiko-chemische Analyse der LENOX basic, der LENOX OFH und der Kontrollemulsion. Dabei hatten alle Emulsionen den gleichen PFD-Anteil (17 vol.%), die gleiche Albumin-Konzentration (5 %). Zusätzlich hatten die basic und OFH-Variante die gleiche Lecithin-Konzentration (2 %).

Ausgehend von dem Vorprodukt A-AOC wurde eine Mischhülle aus Albumin und Lecithin mit einem Kern aus PFD postuliert (Abbildung 6 A). Als erstes Hauptmerkmal wurde die Partikelgrößenverteilung der drei Emulsionen mittels DLS bestimmt ($n_{\text{basic}} = 6$, $n_{\text{OFH}} = 5$, $n_{\text{Kontr}} = 5$). Neben der kumulativen Partikelgrößenverteilung und der Summenverteilung (Abbildung 6 B+C) wurden sowohl die Perzentile d_{10} , d_{50} und d_{90} als auch die Spanne der Verteilung (Tabelle 4) bestimmt. Es ist vor allem in der Summenverteilung zu sehen, dass sich die Kontrollemulsion von den anderen beiden Emulsionen unterschieden hat. Im 10. Perzentil konnte noch keinen signifikanten Unterschied ($0,9996 \geq p \geq 0,0644$) zwischen allen drei Proben festgestellt werden. Jedoch im 50. und 90. Perzentil unterschieden sich alle Proben signifikant voneinander ($p < 0,0001$). Die Spanne der Größenverteilung war zwischen LENOX basic und LENOX OFH nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,1228$). Im Vergleich zur Kontrollemulsion unterschieden sich die Spannen beider LENOX-Produkte ($p_{\text{basic-Kontr}} = 0,0168$, $p_{\text{OFH-Kontr}} = 0,0005$).

Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Rheologie der Emulsionen. In Abbildung 6 (D+E) ist die Viskosität der drei Produkte in Abhängigkeit der Scherrate aufgetragen ($n_{\text{basic}} = 6$, $n_{\text{OFH}} = 5$, $n_{\text{Kontr}} = 6$). Es ist deutlich zu sehen, dass die Kontrollemulsion sowohl bei 20 °C als auch bei 37 °C ein scherverdünnendes Verhalten im Bereich der geringeren Scherraten (bis ca. 400 s^{-1}) aufwies, wohingegen die Viskositäten der LENOX basic und der LENOX OFH nahezu unabhängig von der Scherrate waren. Der Viskositätswert bei einer Scherrate von 200 s^{-1} zeigte eine größere Ähnlichkeit zwischen LENOX basic und der Kontrollemulsion als im Vergleich zu LENOX OFH. Dabei war die Viskosität bei beiden Temperaturen zwischen LENOX basic und der Kontrollemulsion nicht signifikant unterschiedlich ($p_{20^\circ\text{C}} = 0,2189$, $p_{37^\circ\text{C}} = 0,4458$). LENOX OFH zeigte bei 20 °C einen signifikanten Unterschied zu

4. Ergebnisse

LENOX basic ($p = 0,0058$) und zur Kontrollemulsion ($p < 0,0001$). Bei 37 °C unterschieden sich LENOX OFH und LENOX basic nicht signifikant ($p = 0,5179$), jedoch war die Viskosität der Kontrollemulsion signifikant höher als die Viskosität der OFH-Emulsion ($p = 0,0164$).

Als Maß für die elektrostatische Stabilität einer Emulsion kann das Zeta-Potential bestimmt werden. Beim Vergleich der drei Produkte konnte ein deutlicher Unterschied im Zeta-Potential beobachtet werden. Auf Grund der unterschiedlichen Zusammensetzung und der verschiedenen Syntheseprozesse besaß LENOX OFH mit $-80 \pm 2\text{ mV}$ ($n = 3$) den größten negativen Wert, gefolgt von dem signifikant ($p = 0,0014$) kleineren Potential der basic-Emulsion ($-73 \pm 1\text{ mV}$, $n = 4$) und der Kontrollemulsion ($-56 \pm 2\text{ mV}$, $n = 4$) mit dem signifikant kleinsten Potential ($p_{\text{basic-Kontr}} < 0,0001$, $p_{\text{OFH-Kontr}} < 0,0001$).

Für Produkte mit Absicht zur medizinischen Applikation ist der pH-Wert von großer Bedeutung. LENOX basic lag mit $7,30 \pm 0,01$ leicht unter dem physiologischen pH-Bereich von Blut ($7,35 - 7,45$).^[133] Auch LENOX OFH lag unter dem pH-Bereich von Blut ($7,31 \pm 0,02$). Die Kontrollemulsion war mit $7,51 \pm 0,1$ über dem physiologischen pH-Bereich. Im Vergleich zueinander, unterschieden sich LENOX basic und OFH nicht signifikant ($p = 0,9738$), wohingegen die Kontrollemulsion zu beiden LENOX-Produkten signifikant unterschiedlich war ($p_{\text{basic-Kontr}} = 0,0069$, $p_{\text{OFH-Kontr}} = 0,0086$).

Als letzten Parameter wurde die Funktionalität der AOC in Form der Sauerstofffreisetzung bestimmt. Alle drei Emulsionen unterschieden sich nicht in ihrer Sauerstofffreisetzung ($p_{\text{basic-OFH}} = 0,2345$, $p_{\text{basic-Kontr}} = 0,9598$, $p_{\text{OFH-Kontr}} = 0,2345$) und konnten somit eine vergleichbare Menge Sauerstoff freisetzen (LENOX basic = $71,39 \pm 3,00\text{ mL/L}$, $n_{\text{basic}} = 3$, LENOX OFH = $76,50 \pm 4,14\text{ mL/L}$, $n_{\text{OFH}} = 3$, Kontrollemulsion = $72,06 \pm 3,49\text{ mL/L}$, $n_{\text{Kontr}} = 6$). Die statistischen Unterschiede im Kapitel 4.1 wurden mittels one-way ANOVA + Tukey's multiple comparisons test bestimmt.

4. Ergebnisse

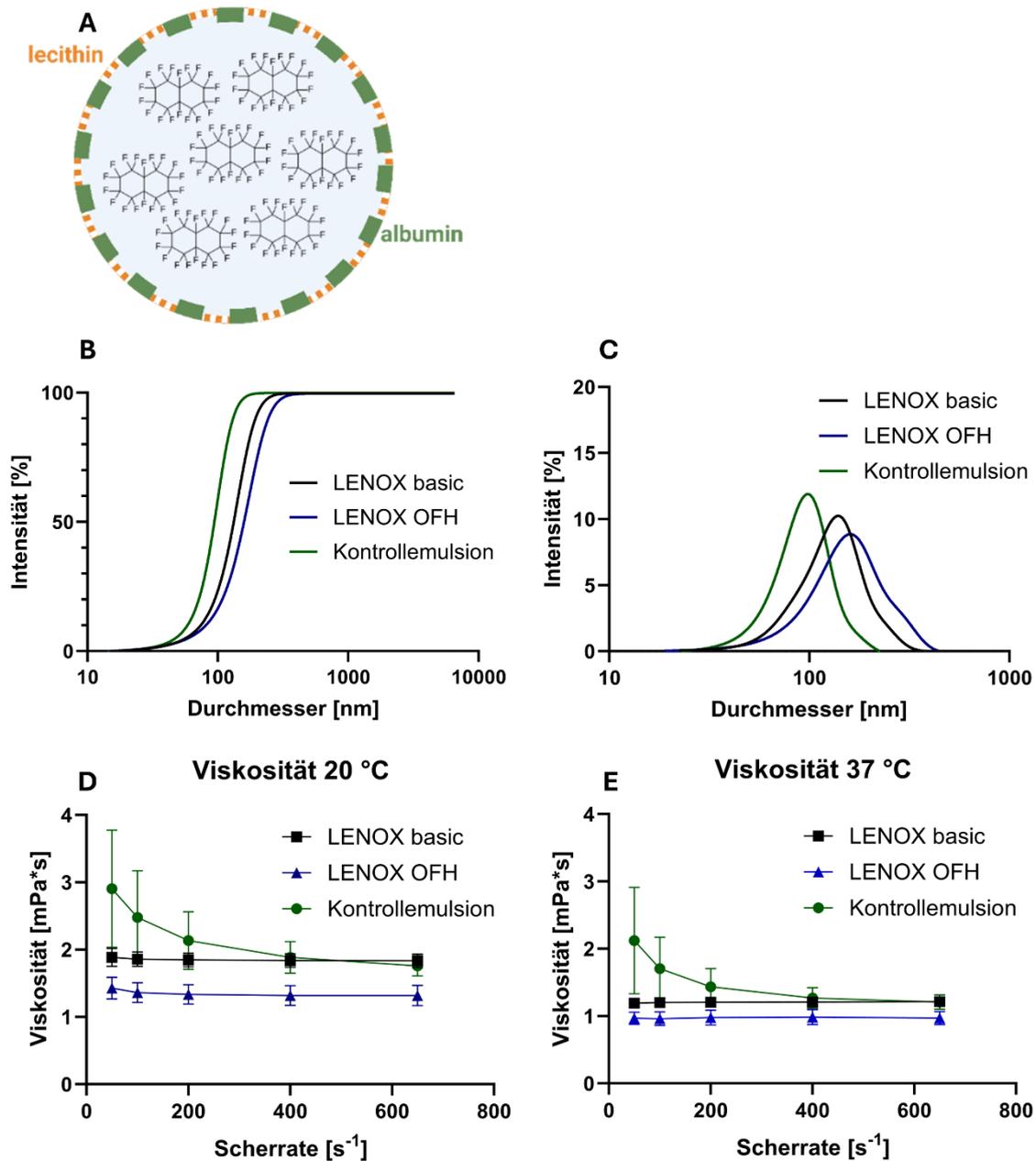


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Partikelgrößenverteilungen und der Rheologie von LENOX basic, LENOX OFH und der Kontroll-emulsion. Neben einer schematischen Darstellung des postulierten LENOX-Emulsionstropfens (A) sind die kumulative Partikelgrößenverteilung (B) und die Summenverteilung (C) gezeigt. Die Kontroll-emulsion wies über die gesamte Verteilung kleinere Partikel auf als die beiden anderen Emulsionen. LENOX basic und LENOX OFH zeigten eine sehr ähnliche Verteilung, wobei die Partikel in dem basic-Produkt kleiner waren als in der Emulsion der OFH-Synthese. Die Viskositätskurven der drei Emulsionen bei 20 °C (D) und 37 °C (E) zeigten ein scherverdünnendes Verhalten der Kontroll-emulsion, wohingegen die beiden LENOX-Emulsionen ein eher newtonsches Verhalten aufwiesen. LENOX basic und Kontroll-emulsion $n = 6$, LENOX OFH $n = 5$.

4. Ergebnisse

Tabelle 4: Physiko-chemische Messwerte von LENOX basic, LENOX OFH und der Kontrollemlusion.

Parameter	LENOX basic	LENOX OFH	Kontrollemlusion
Partikelgrößenverteilung			
d10 [nm]	75 ± 7	75 ± 10	60 ± 4
d50 [nm]	133 ± 9	166 ± 12	95 ± 9
d90 [nm]	195 ± 15	241 ± 12	130 ± 15
Spanne	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,9	0,7 ± 0,1
Viskosität bei 200 s ⁻¹			
Viskosität 20 °C [mPas]	1,85 ± 0,10	1,33 ± 0,14	2,14 ± 0,43
Viskosität 37 °C [mPas]	1,21 ± 0,07	0,98 ± 0,11	1,44 ± 0,27
Zeta-Potential, pH und Sauerstofffreisetzung			
Zeta-Potential [mV]	-73 ± 1	-80 ± 2	-56 ± 2
pH	7,30 ± 0,01	7,31 ± 0,02	7,51 ± 0,1
Sauerstofffreisetzung [mL/L]	71,39 ± 3,00	76,50 ± 4,14	72,06 ± 3,49

4.2 Lagerungsstabilität und -verhalten

Neben den grundlegenden Eigenschaften der AOC ist die Lagerungsmöglichkeit aus praktischer Sicht ein weiterer essenzieller Punkt. In den meisten Fällen wird die Emulsion an einem anderen Tag hergestellt, als die eigentliche Anwendung geplant ist. Zwischen Synthese und Anwendung können somit Tage oder sogar Wochen liegen. In dieser Zeit muss das Produkt gelagert werden und darf die Eigenschaften nur bedingt ändern. Dabei sind das Partikelwachstum, die Rheologie und die Funktionalität die wichtigsten Faktoren zur Überprüfung der Lagerungsstabilität.

LENOX basic und LENOX OFH wurden bei 4 °C statisch und lichtgeschützt über einen Zeitraum von 42 Tagen in 2 mL Reagiergefäßen gelagert und in Abständen von sieben Tagen analysiert. Die Messung der Partikelgröße zeigte einen signifikanten Anstieg in allen drei Perzentilen (Abbildung 7 A-C) innerhalb der ersten sieben Tagen. Die LENOX basic Emulsion änderte ihre Partikelgröße nicht mehr signifikant ab dem siebten Lagerungstag, wohingegen LENOX OFH eine deutliche Änderung der

4. Ergebnisse

Partikelgröße nach 28 Tagen Lagerung zeigte. Der d10 sank ab Tag 28 kontinuierlich bis zum Versuchsende (Änderung des Durchmessers $\Delta d_{28d-42d} = 33 \text{ nm} \pm 27 \%$). Der d50 blieb ab Tag 7 konstant und der d90 stieg von Tag 35 bis Tag 42 an ($\Delta d_{35d-42d} = 106 \text{ nm} \pm 28 \%$). Diese Änderung spiegelte sich in der Spanne der Partikelgrößenverteilung wider (Abbildung 7 D). Während die Spanne der LENOX basic über den gesamte Beobachtungszeitraum konstant blieb, änderte diese sich signifikant bei LENOX OFH ab einer Lagerungszeit von 35 Tagen. Dabei zeigt die Abbildung 7 D eine Änderung der Spanne zwischen Tag 35 und Tag 42 von $1,1 \pm 0,1$ auf $1,5 \pm 0,1$ (Änderung der Spanne $\Delta S = 0,4 \pm 36 \%$).

Die Viskosität bei 20 °C änderte sich nicht während der gesamten Lagerungszeit für LENOX basic ($0,9999 \geq p_{\text{basic}} \geq 0,5013$) und LENOX OFH ($0,9999 \geq p_{\text{OFH}} \geq 0,9615$) und die beiden Emulsionen unterschieden sich im Vergleich zueinander nur nach einer Lagerungszeit von sieben Tagen ($p = 0,0085$) und 21 Tagen ($p = 0,0316$). Die Funktionalität in Form der Sauerstofffreisetzung wurde bei LENOX basic nicht von der Lagerung beeinflusst ($p = 0,9934$), wohingegen die Funktionalität der LENOX OFH zwischen Tag 0 und Tag 42 signifikant abnahm ($p = 0,0001$). Im Vergleich besaßen beide Emulsionen eine vergleichbare Sauerstofffreisetzung zu Beginn des Versuchs (LENOX basic: $71,39 \pm 3,00 \text{ mL/L}$, LENOX OFH: $76,50 \pm 4,14 \text{ mL/L}$, $p = 0,3862$). Jedoch waren sie nach 42 Tagen Lagerung signifikant unterschiedlich (LENOX basic: $72,93 \pm 1,52 \text{ mL/L}$, LENOX OFH: $58,89 \pm 3,35 \text{ mL/L}$, $p = 0,0008$).

4. Ergebnisse

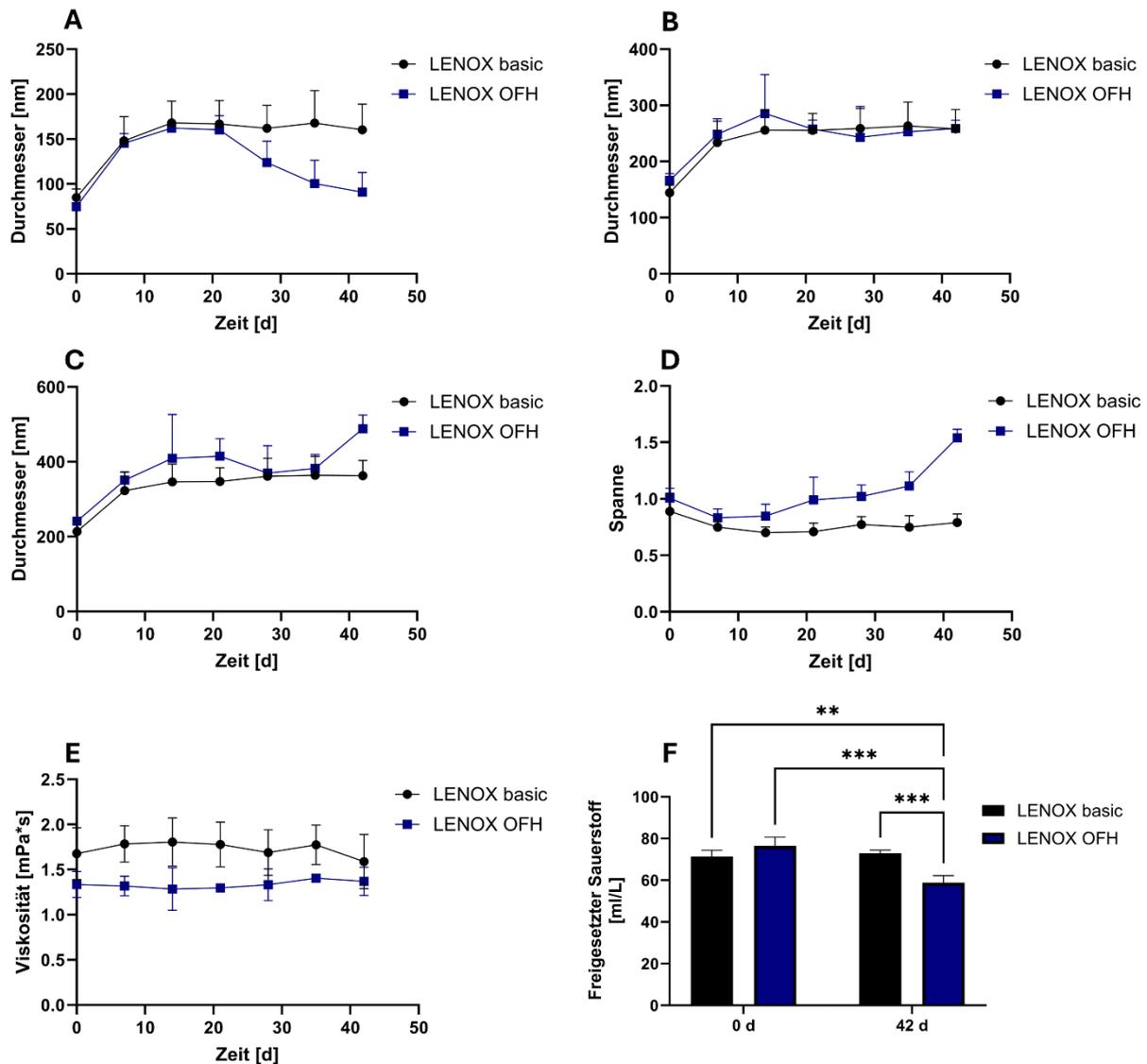


Abbildung 7: Physiko-chemische Analyse der LENOX basic und LENOX OFH Emulsionen während einer 42-tägigen Lagerung. Die Proben wurden dabei statisch bei 4 °C lichtgeschützt in 2 mL Reagiergefäßen gelagert. In Zeitabständen von sieben Tagen wurden jeweils ungeöffnete Reagiergefäße analysiert. Es wurde über einen Zeitraum von 42 Tagen die Partikelgrößenverteilung in Form der Perzentile d10 (A), d50 (B), d90 (C) und die Spanne der Verteilung (D) bestimmt sowie die Viskosität bei 20 °C (E) und die Menge an freigesetztem Sauerstoff (F) gemessen (n = 3). LENOX basic und LENOX OFH zeigten in allen Parametern zu Anfang vergleichbare Werte. LENOX OFH zeigte nach vierzehn Tagen Lagerung eine stärkere Veränderung in den Partikelgrößenverteilungen sowie eine signifikante Abnahme der Sauerstofffreisetzung nach 42 Tagen Lagerung. Statistische Unterschiede wurden mittels 2way ANOVA + Šídák's multiple comparison test bzw. Tukey's multiple comparison test bestimmt.

4.3 Verhalten in klinisch relevanten kristalloiden und kolloidalen Lösungen

Die Kompatibilität von künstlichen Sauerstoffträgern mit kristalloiden und kolloidalen Lösungen ist für die medizinische Applikation essenziell. Die LENOX-Vorgänger besaßen nur eine limitierte Kompatibilität mit diesen Lösungen und konnten nur in einer Auswahl relevanter Injektions- und Perfusionsmedien verwendet werden. Um die Anwendbarkeit der LENOX in verschiedenen klinisch relevanten kristalloiden und

4. Ergebnisse

kolloidalen Lösungen zu untersuchen, wurden Emulsionen nach dem LENOX basic Protokoll in den jeweiligen Lösungen synthetisiert und hinsichtlich der Partikelgrößenverteilung, Viskosität und Sauerstofffreisetzung analysiert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Physiko-chemische Eigenschaften der LENOX basic Emulsion in verschiedenen klinisch relevanten kristalloiden und kolloidalen Lösungen. Alle Werte wurden mit LENOX in Wasser und mit LENOX in STEEN Solution durch einen one-way ANOVA + Dunnett's multiple comparison test verglichen (Sauerstofffreisetzung: n = 3, alle anderen: n = 6). Die Signifikanzen im Vergleich zu LENOX (Wasser) wurden mit Sternen () und im Vergleich zu LENOX (STEEN Solution) mit Pluszeichen (+) gekennzeichnet.*

Partikelgrößenverteilung				
Medium	d10 [nm]	d50 [nm]	d90 [nm]	Span (S)
LENOX (Wasser)	75 ± 7 (++++)	133 ± 9 (++++)	195 ± 15 (++++)	0.9 ± 0.1 (++++)
LENOX (HES 6 %)	88 ± 4 (**)(++++)	175 ± 1 (****)(++++)	271 ± 5 (****)(++++)	1.0 ± 0.1 (*)(++++)
LENOX (NaCl 0,9 %)	71 ± 4 (ns) (++++)	152 ± 3 (****)(++++)	239 ± 14 (****)(++++)	1.1 ± 0.1 (**)(++++)
LENOX (Ringer-Lösung)	73 ± 3 (ns)(++++)	156 ± 2 (****)(++++)	246 ± 8 (****)(++++)	1.1 ± 0.1 (**)(++++)
LENOX (STEEN Solution)	45 ± 1 (****)	204 ± 6 (****)	525 ± 28 (****)	2.4 ± 0.1 (****)
LENOX (Sterofundin ISO)	89 ± 5 (****)(++++)	164 ± 3 (****)(++++)	243 ± 11 (****)(++++)	0.9 ± 0.1 (ns)(++++)
LENOX (Custodiol)	68 ± 8 (ns)(++++)	138 ± 9 (ns)(++++)	205 ± 16 (ns)(++++)	1.0 ± 0.1 (ns)(++++)
LENOX (DMEM)	60 ± 3 (****)(++)	167 ± 5 (****)(++++)	277 ± 9 (****)(++++)	1.3 ± 0.1 (****)(++++)
Viskosität und Sauerstofffreisetzung				
Medium	Viskosität 20 °C [mPa*s]	Viskosität 37 °C [mPa*s]	Sauerstoff- freisetzung bei 37 °C [mL/L]	
LENOX (Wasser)	1,85 ± 0,10 (++++)	1,20 ± 0,07 (++++)	71,39 ± 3,0 (ns ⁺)	
LENOX (HES 6 %)	3,19 ± 0,03 (****)(++++)	2,04 ± 0,02 (****)(++++)	73,79 ± 2,51 (ns)(ns ⁺)	
LENOX (NaCl 0,9 %)	1,84 ± 0,06 (ns)(++++)	1,23 ± 0,07 (ns)(++++)	74,31 ± 1,12 (ns)(ns ⁺)	
LENOX (Ringer-Lösung)	1,76 ± 0,03 (ns)(++++)	1,13 ± 0,02 (ns)(++++)	77,60 ± 6,18 (ns)(ns ⁺)	
LENOX (STEEN Solution)	4,45 ± 0,18 (****)	3,05 ± 0,14 (****)	76,84 ± 5,40 (ns)	

4. Ergebnisse

LENOX (Sterofundin ISO)	1,71 ± 0,06 (ns) (++++)	1,12 ± 0,04 (ns) (++++)	68,65 ± 2,24 (ns) (ns ⁺)
LENOX (Custodiol)	2,08 ± 0,25 (ns) (++++)	1,75 ± 0,33 (ns) (++++)	64,46 ± 3,51 (ns) (++)
LENOX (DMEM)	2,50 ± 0,42 (****) (++++)	1,87 ± 0,33 (****) (++++)	75,26 ± 4,77 (ns) (ns ⁺)
Wasser	0,99 ± 0,04 (****) (++++)	0,63 ± 0,03 (****) (++++)	37,13 ± 0,87 (****) (++++)
Custodiol	1,14 ± 0,06 (****) (++++)	0,78 ± 0,01 (***) (++++)	32,46 ± 2,24 (****) (++++)
DMEM	1,16 ± 0,01 (****) (++++)	0,76 ± 0,01 (***) (++++)	33,81 ± 1,62 (****) (++++)

Alle verwendeten Salzlösungen hatten einen Einfluss auf die Partikelgrößenverteilung und auf die Spanne der Größenverteilung der LENOX. Die Verwendung von STEEN Solution führte zu den größten Unterschieden. Besonders der d90-Wert war mit 525 ± 28 nm im Vergleich zu allen anderen Emulsionen meist doppelt so hoch. Auch lag die Spanne für LENOX (STEEN Solution) mit $2,4 \pm 0,1$ deutlich höher als die Spannen aller anderen Proben.

Zusätzlich war die Viskosität für LENOX (STEEN Solution) sowohl bei 20 °C als auch bei 37 °C höher, im Vergleich zu LENOX (Wasser). Außerdem zeigte LENOX (HES 6 %) eine deutlich erhöhte Viskosität gegenüber LENOX in Wasser. Die drei gemessenen Reinslösungen (ohne Sauerstoffträger) Wasser, Custodiol und DMEM hatten gegenüber den LENOX-haltigen Äquivalenten eine niedrigere Viskosität, was den direkten Einfluss der Emulsionstropfen auf die Viskosität zeigte. Die Funktion der LENOX als Sauerstofftransporter wurde nicht vom verwendeten Medium beeinflusst. Lediglich der Vergleich zwischen LENOX (STEEN Solution) und LENOX (Custodiol) zeigte einen signifikanten Unterschied in der Sauerstofffreisetzung ($p = 0,002$). Im Vergleich zu den reinen Medien, war die Sauerstofffreisetzung der LENOX-haltigen Lösungen deutlich höher, was ihre Funktion als Sauerstofftransporter bestätigte.

4.4 Simulierte normotherme Maschinenperfusion

Eine der häufigsten Anwendungen für künstliche Blutprodukte in Form von Sauerstoffträgern ist die isolierte Organperfusion. Für PFCOC gibt es in der Literatur schon viele Beispiele für Anwendungen in der Maschinenperfusion.^[79, 134] Somit ist neben der Kompatibilität der neuen Sauerstoffträger mit den verschiedenen

4. Ergebnisse

Perfusionsmedien auch die Anwendbarkeit in einer Maschinenperfusionsanlage eine wichtige Eigenschaft. Um das Verhalten der LENOX basic in einer möglichen Perfusion zu bestimmen, wurden LENOX basic-Emulsionen in Wasser, Custodiol und STEEN Solution hergestellt, mit dem jeweiligen Medium auf 4 vol.% verdünnt und in einer simulierten, normothermen Perfusion ohne Organ über einen Zeitraum von 4 h regelmäßig analysiert (n = 3).

Bei der Analyse der Partikelgrößenverteilung (Abbildung 8 A-C) zeigte sich ein ähnliches Verhalten zwischen LENOX (Wasser) und LENOX (Custodiol). Zu Beginn des Versuchs waren die Partikelgrößen der beiden Emulsionen nicht unterschiedlich ($0,8301 \geq p \geq 0,2909$), wobei die Emulsionstropfen in Wasser während der Überwachungszeit signifikant größer wurden. Während der Perfusion stieg die Partikelgröße von $d_{50} = 165 \pm 17$ nm ($t = 0$) nach 180 min auf $d_{50} = 196 \pm 5$ nm ($p = 0,0367$) an (Abbildung 8 A). Die Größen der Emulsionstropfen in Custodiol änderten sich über den gesamten Zeitraum nicht signifikant (Abbildung 8 B). LENOX (STEEN Solution) unterscheidet sich in der Partikelgrößenverteilung erheblich von den anderen beiden Emulsionen (Abbildung 8 C). Das 50. Perzentil von LENOX (STEEN Solution) lag mit 362 ± 53 nm signifikant höher als LENOX (Wasser) und LENOX (Custodiol) ($p_{\text{STEEN-Wasser}} = 0,0006$, $p_{\text{STEEN-Custodiol}} = 0,0004$). Der d_{90} -Wert war mit 922 ± 220 nm signifikant über den Werten der anderen beiden Emulsionen ($d_{90\text{Wasser}} = 244 \pm 20$ nm, $p_{\text{STEEN-Wasser}} = 0,0012$, $d_{90\text{Custodiol}} = 211 \pm 19$ nm, $p_{\text{STEEN-Custodiol}} = 0,0009$) und zeigte somit ein anderes Verhalten der LENOX in STEEN Solution als in Wasser oder Custodiol. Die Spanne der Partikelgrößenverteilungen waren für LENOX (Wasser) und LENOX (Custodiol) vergleichbar ($0,9999 \geq p \geq 0,1020$), mit Ausnahme der Messung zum Zeitpunkt $t = 0$ min ($p = 0,0142$). Die Spanne von LENOX (STEEN Solution) hingegen war über den gesamten Zeitraum signifikant unterschiedlich zu den beiden anderen Emulsionen. Zu Beginn des Versuchs lag die Spanne für LENOX (STEEN Solution) beispielsweise bei $2,3 \pm 0,2$ und für LENOX (Wasser) und LENOX (Custodiol) bei $1,0 \pm 0,1$ respektive $0,8 \pm 0,1$ ($p < 0,0001$). Bei der Sauerstoffkapazität war der Unterschied der drei Produkte im Vergleich zur Partikelgrößenverteilung geringer (Abbildung 8 E). Hier waren LENOX (Wasser) und LENOX (STEEN Solution) nicht signifikant unterschiedlich ($0,9967 \geq p \geq 0,7964$), wohingegen LENOX (Custodiol) im Vergleich zu LENOX in STEEN Solution ab der Messung zum Zeitpunkt $t = 90$ min signifikant geringer war ($0,0444 \geq p \geq 0,0144$). Nach einer Versuchsdauer von 240 min war die

4. Ergebnisse

Sauerstoffkapazität aller drei Emulsionen nicht signifikant unterschiedlich ($0,9989 \geq p \geq 0,1983$).

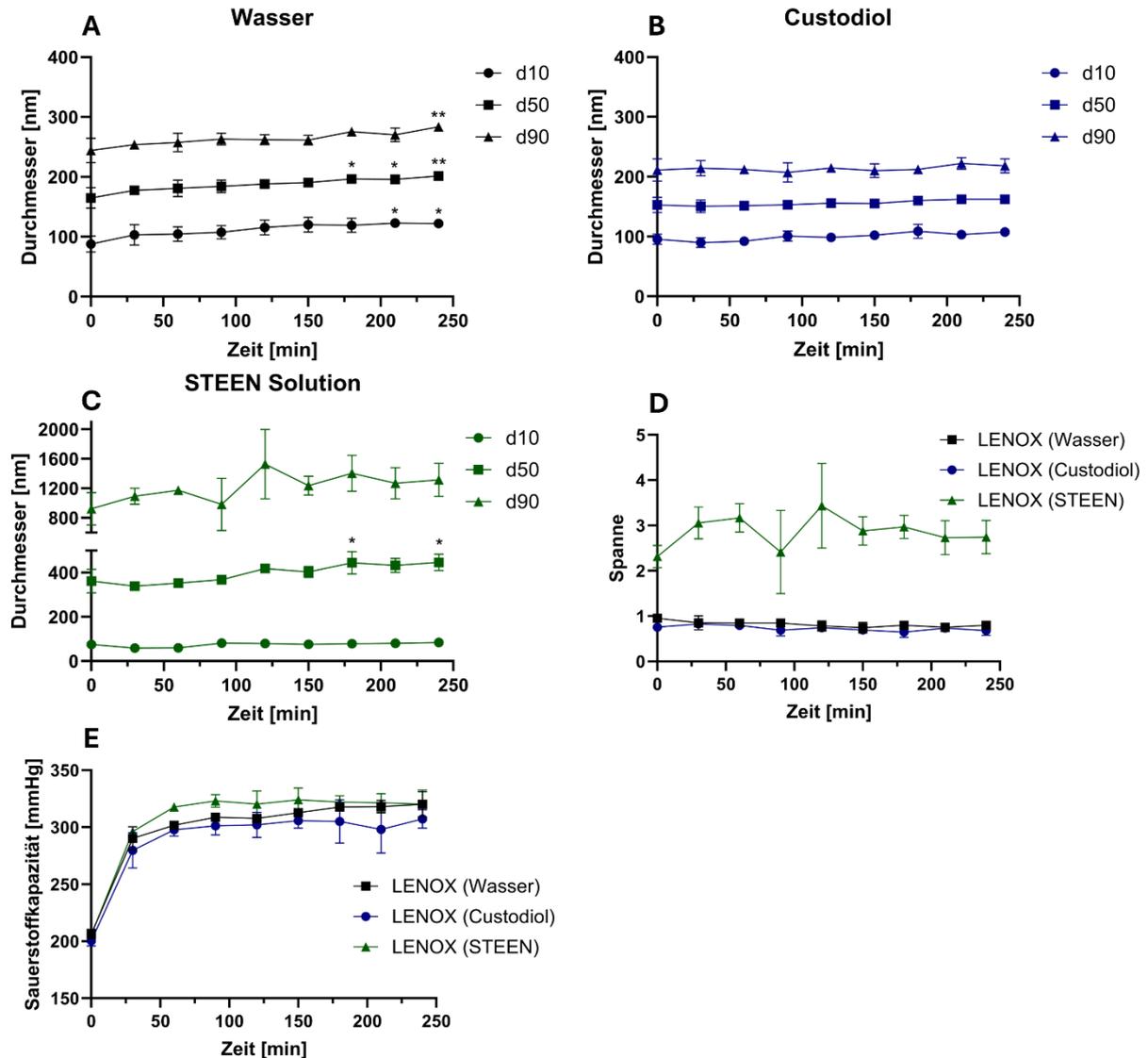


Abbildung 8: Verschiedene physiko-chemische Daten von LENOX (Wasser), LENOX (Custodiol) und LENOX (STEEN Solution) während einer simulierten normothermen Perfusion ohne Organ. Die Partikelgrößenverteilungen, dargestellt durch die Perzentile d10, d50 und d90, sind für LENOX in Wasser (A), in Custodiol (B) und in STEEN Solution (C) gezeigt. Die Spanne aller drei Emulsionen in Abhängigkeit der Perfusionszeit ist in (D) gezeigt. Zum Nachweis der Funktionalität wurde die Sauerstoffkapazität der Probe in Abhängigkeit der Perfusionszeit mit Hilfe einer BGA bestimmt. LENOX in Wasser und in Custodiol verhielten sich vergleichbar und es war lediglich in der LENOX-Probe in Wasser ein Anstieg der Partikelgröße nach 180 min festzustellen. LENOX (STEEN Solution) zeigte grundsätzlich größere Partikel, wobei sich nur der d50-Wert nach 180 min und 240 min signifikant änderte ($p < 0,0229$). Die Sauerstoffkapazität war bei allen drei Proben vergleichbar und es gab zwischen den einzelnen Medien keinen Unterschied. Alle Messungen wurden mit Hilfe eines one-way ANOVA + Tukey's multiple comparison test statistisch analysiert ($n = 3$).

4.5 Auswirkung auf eine biologische Umgebung

Um die Kompatibilität der LENOX mit einer biologischen Umgebung zu zeigen, wurden drei verschiedene Zellkulturversuche durchgeführt. Die kolorimetrischen Tests auf LDH

4. Ergebnisse

und MTT zeigten keinen signifikanten Unterschied ($p_{LDH} = 0,5911$, $p_{MTT} = 0,6245$) zwischen den LENOX basic und der Kontrollprobe (Zellkulturmedium, DMEM). Die Bestimmung des Apoptose-Markers Caspase 3 mittels Western Blot zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,3984$) zwischen Zellkulturmedium und der LENOX-Emulsion (Abbildung 9).

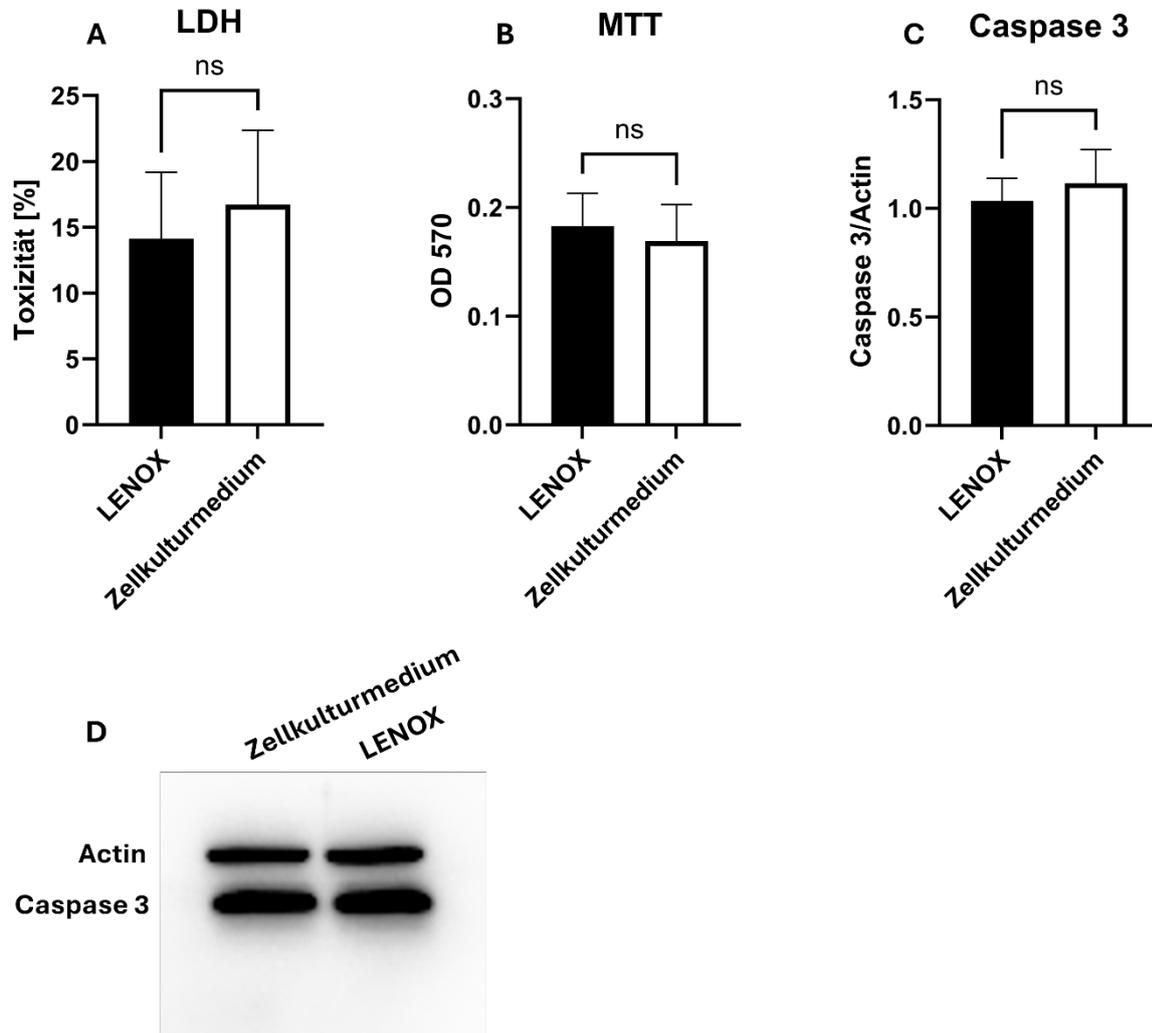


Abbildung 9: Bestimmung der Kompatibilität von LENOX basic mit Hep 3b-Zellen. Zur Bestimmung der Auswirkung der LENOX-Emulsionstropfen auf die Zellen wurde ein LDH-Test (A), und ein MTT-Test (B) durchgeführt. Zusätzlich wurde der Apoptose-Marker Caspase 3 (C) mit Hilfe der Western Blot-Methode (D) bestimmt. In keinem der drei Methoden war ein Unterschied zwischen LENOX basic und Zellkulturmedium als Negativkontrolle zu sehen. Alle gezeigten Daten entsprechen $n = 6$ und wurden mit einem unpaired t-test statistisch untersucht.

4.6 Sauerstoffträger mit einer verlängerten Sauerstofffreisetzung

Für die Anwendung als Organpräservationslösung musste die Sauerstofffreisetzung der LENOX-Emulsion modifiziert werden, sodass die Sauerstofffreisetzung über einen längeren Zeitraum erfolgte. Zu diesem Zweck wurde ein Vergleich der

4. Ergebnisse

Sauerstofffreisetzung zwischen den LENOX basic und den E-ROC, einem 1:1 Gemisch aus oxygenierten und nicht-oxygenierten LENOX basic, durchgeführt. Abbildung 10 zeigt die reine Sauerstofffreisetzung der beiden Produkte, wobei die Menge an vorhandenem Sauerstoff prozentual von der aufgenommenen Sauerstoffmenge angegeben wird (Abbildung 10 A). Außerdem wird in Abbildung 10 B die Rate der Sauerstofffreisetzung (mathematische Ableitung der Sauerstofffreisetzungsglyphen) in [% O₂/min] gezeigt. LENOX basic zeigte eine zu Beginn hohe Sauerstofffreisetzung (7,7 % O₂/min) die innerhalb von 10 min auf 3,3 % O₂/min absank, was einer Änderung von 57 % entsprach. In diesen 10 min wurden 50 % des gesamten beladenen Sauerstoffs abgegeben. Der festgelegte Endpunkt von 20 % Restsauerstoff wurde nach 27 min erreicht, wo die Sauerstofffreisetzungsrage bei 0,8 % O₂/min lag. Die E-ROC besaßen am Start des Experiments eine Sauerstofffreisetzungsrage von 2,9 % O₂/min, welche in den ersten 10 min um 28 % abnahm und einen Wert von 2,1 % O₂/min erreichte. In diesem Zeitfenster wurden 25 % des beladenen Sauerstoffs freigesetzt. Die festgelegte Endkonzentration von 20 % Sauerstoff, erreichten die E-ROC nach über 66 min und besaßen zu diesem Zeitpunkt eine Freisetzungsrage von 0,3 % O₂/min. Zur gleichen Zeit hatten die LENOX basic eine theoretische Sauerstofffreisetzungsrage von 0,03 % O₂/min.

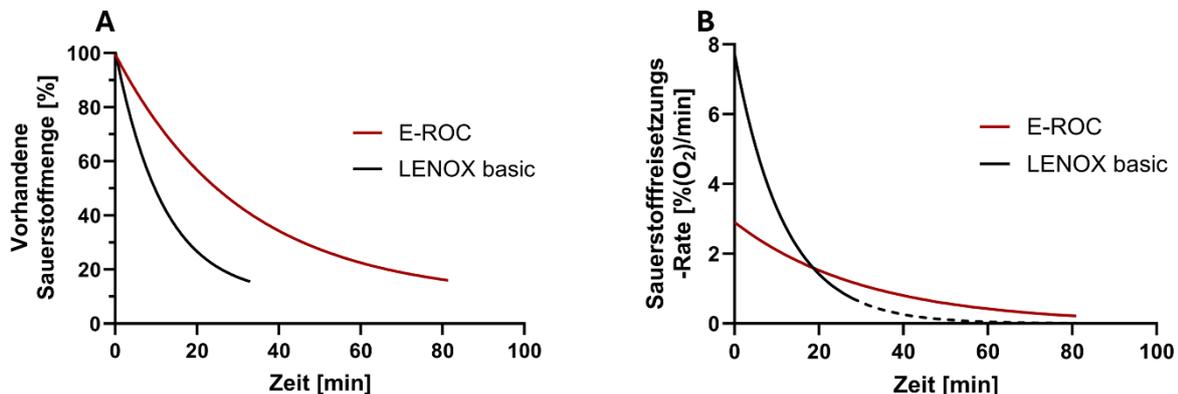


Abbildung 10: Modifizierte Sauerstofffreisetzung der LENOX durch Änderung der Zusammensetzung des Perfusionsmediums. Zur Bestimmung der verlängerten Sauerstofffreisetzung wurde der vorhandene Sauerstoff präoxygenierter LENOX basic und präoxygeniertem E-ROC mittels PreSens über einen Zeitraum von 80 min gemessen. Dabei wurden die beladenen Sauerstoffträger in hypoxisches Wasser gegeben und den Sauerstoffgehalt der gesamten Lösung gemessen (A). Um die Freisetzungsrage zu erhalten, wurden die Graphen aus A mit einem mathematischen Modell angepasst und anschließend mathematisch differenziert (B). Es ist zu sehen, dass eine deutlich längere und konstantere Sauerstofffreisetzung durch die E-ROC, im Vergleich zu LENOX basic, realisiert wurde ($n = 4$).

Neben der reinen physiko-chemischen Analyse der Sauerstofffreisetzung von E-ROC, musste auch die Wirkung der optimierten AOC auf Zellen und deren Metabolismus

4. Ergebnisse

untersucht werden. Dazu wurden Kardiomyozyten zunächst in einem Nährstoff-freiem Medium kultiviert und anschließend für 4 h unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) gelagert. Lediglich bei dem LDH-Test unter Normoxie wurden die Zellen nicht unter Hypoxie gelagert, sondern direkt nach dem Mediumwechsel mit den Analyseproben inkubiert. E-ROC wurden in Custodiol synthetisiert und für 20 min mit 100 % O₂ bei Raumtemperatur präoxygeniert. Die präoxygenierten Proben wurden zu den hypoxischen Zellen gegeben und 4 h inkubiert. Anschließend wurde der Zellüberstand oder das Zelllysate biochemisch hinsichtlich der Zellschädigung mit Hilfe verschiedener Parameter untersucht. Als Kontrollprobe wurde reines Custodiol verwendet, das nach dem gleichen Protokoll oxygeniert wurde oder nicht präoxygenierte LENOX (LENOX (ohne Oxy)).

Als erster essenzieller Parameter zur Messung der Oxygenierung von Zellen und Gewebe wurde die Expression von HIF-1 α bestimmt. Dazu wurden hypoxische Zellen für 4 h mit E-ROC, Custodiol oder nicht oxygenierten LENOX inkubiert. In Zeitabständen von 1 h wurden Proben entnommen und mittels Western Blot Analyse untersucht. Alle drei Proben zeigten zu Beginn des Versuchs die gleiche HIF-Bildung unter Normoxie (NOX) und nach 4 h Hypoxie (HOX) (Abbildung 10). Durch die Zugabe der Versuchslösungen verringerte sich die Menge an gebildetem HIF-1 α in den E-ROC und Custodiol-Proben signifikant ($p_{E-ROC} < 0,0001$, $p_{Custodiol} = 0,035$). Die Zugabe von LENOX (ohne Oxy) führte zu keiner signifikanten Reduktion der HIF-Bildung ($p = 0,9448$). Die Menge an gebildetem HIF-1 α änderte sich innerhalb der Proben über den gesamten Zeitraum nicht mehr. Die HIF-Expression war in den E-ROC-Proben signifikant geringer als bei den anderen beiden Proben ($p_{E-ROC-Custo} < 0,0001$, $0,0029 \geq p_{E-ROC-LENOX} \geq 0,0004$), wobei sich die Custodiol- und LENOX (ohne Oxy)-Proben nicht unterschieden ($p > 0,05$).

4. Ergebnisse

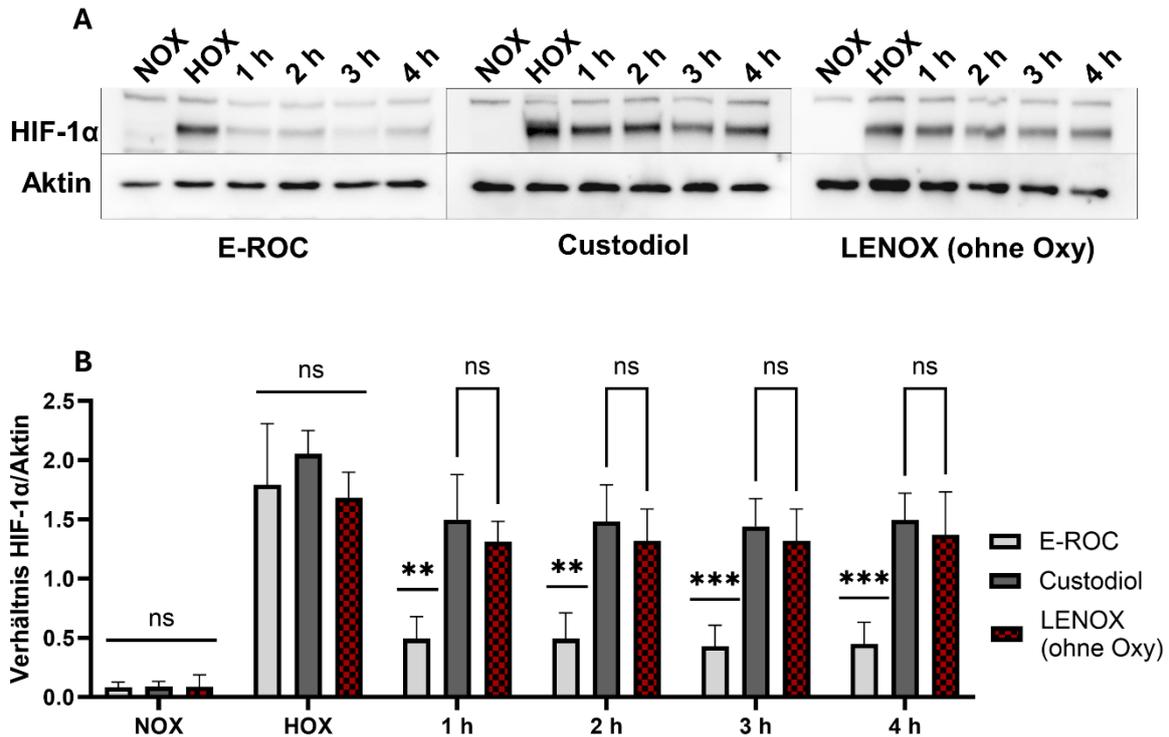


Abbildung 11: HIF-1 α -Expression nach Inkubation mit E-ROC, Custodiol oder unbelasteten LENOX (ohne Oxy) über einen Zeitraum von 4 h. Die HIF-1 α -Expression wurde mittels Western Blot-Analyse (A) bestimmt und die Banden anschließend densitometrisch ausgewertet (B). Alle Proben zeigten unter physiologischen Sauerstoffbedingungen eine minimale HIF-Bildung, welche im Vergleich der Proben nicht unterschiedlich war ($p > 0,05$). Die Lagerung der Zellen unter Hypoxie führte zu einem drastischen Anstieg der HIF-Bildung, welche sich ebenfalls zwischen den verschiedenen Proben nicht unterschieden ($p \geq 0,9994$). Nach der Inkubation mit den Probelösungen konnte die HIF-1 α -Expression in den E-ROC- und Custodiol-Proben signifikant verringert werden ($p < 0,0001$, $p = 0,035$) und die Expression in den nicht belasteten LENOX Proben änderte sich nicht signifikant ($p = 0,9448$). Über den Versuchszeitraum von 4 h war die HIF-Bildung in den E-ROC Proben immer signifikant geringer zu den Custodiol ($p < 0,0001$) als auch zu den LENOX (ohne Oxy)-Proben ($0,0029 \geq p \geq 0,0004$). Die Custodiol-Proben waren zu den LENOX (nicht Oxy)-Proben über die gesamte Versuchszeit nicht signifikant unterschiedlich ($0,9998 \geq p \geq 0,1088$). Statistische Unterschiede wurden mittels 2way ANOVA + Tukey's multiple comparison test bestimmt, $n = 6$, LENOX (ohne Oxy) $n = 3$.

Abbildung 12 A+B zeigt die Ergebnisse des LDH-Tests zur Bestimmung der Zellviabilität unter normoxischen (NOX, Abbildung 12 A) und hypoxischen (HOX) Bedingungen (Abbildung 12 B). Bei den Proben unter normoxischen Bedingungen änderte sich die Zellviabilität über den Beobachtungszeitraum, weder bei den E-ROC Proben noch bei den Custodiol-Proben, nicht. Es konnte in diesem Experiment keine negative Wirkung der E-ROC auf die Zellen beobachtet werden. Bei den Proben unter Hypoxie konnte in den mit E-ROC inkubierten Zellen kein Anstieg der LDH-Konzentration im Zellkulturmedium gemessen werden. Die mit präoxygeniertem Custodiol versetzten Zellen zeigten ab einer Inkubationszeit von 3 h einen signifikanten Anstieg der extrazellulären LDH-Konzentration im Vergleich zu der Probe nach 1 h Inkubation ($p_{1h-3h} = 0,0321$, $p_{1h-4h} = 0,0286$). Die E-ROC Proben zeigten keine Änderung der Toxizität über den Zeitraum von 4 h. Im Vergleich zu einer unter Hypoxie

4. Ergebnisse

verbliebenden Probe (HOX 4+4 h) zeigten alle mit E-ROC oder Custodiol inkubierten Zellproben eine signifikant geringere Zelltoxizität.

Als spezifischer Zellschädigungsmarker für Kardiomyozyten wurde extrazelluläres Troponin bestimmt (Abbildung 12 C). Im Vergleich zur HOX-Probe zeigten alle Proben eine signifikant geringere Troponinfreisetzung, was für eine höhere Zellviabilität sprach. Über den gesamten Zeitraum änderte sich die Troponinkonzentration im Überstand weder bei den E-ROC Proben noch bei den Custodiol-Proben signifikant und auch im Vergleich zwischen den beiden Proben gab es keinen Unterschied.

Die Caspase 3-Bildung als Apoptose-Marker zeigte keine negative Auswirkung der E-ROC oder Custodiol auf die Zellen (Abbildung 12 D). Keine der untersuchten Proben zeigte ein signifikant unterschiedliches Caspase 3/Aktin-Verhältnis im Vergleich zur HOX-Probe ($0,9999 > p \geq 0,3817$). Die ATP-Konzentration, als Marker für die metabolische Aktivität der Zellen, zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen den E-ROC Proben und den Custodiol-Proben (Abbildung 12 E). Im Vergleich zu den unbehandelten HOX-Proben (HOX 4+4h) besaßen die mit E-ROC und Custodiol inkubierten Proben, eine signifikant höhere ($p < 0,0001$) ATP-Konzentration. Im Glukose-Test wurde die Glukoseaufnahme als Marker für die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt. In Abbildung 12 F ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Zellprobe nach 4 h Inkubation mit E-ROC und nach 4 h Inkubation mit Custodiol zu sehen. Dabei war die Glukoseaufnahme, der mit E-ROC inkubierten Proben signifikant geringer als die Glukoseaufnahme der Custodiol-Proben ($p = 0,0282$). Wie schon beim ATP-Test zeigte sich zur HOX-Kontrollprobe ein signifikanter Unterschied ($0,0067 \geq p$) zu allen inkubierten Proben.

Die Bildung von ROS (Abbildung 12 G) wurde durch die Inkubation mit präoxygenierten E-ROC und Custodiol innerhalb 1 h signifikant reduziert ($p < 0,0001$) und stieg anschließend wieder an, sodass am Zeitpunkt $t = 4$ h ein signifikanter Unterschied bestimmt werden konnte ($p_{E-ROC} = 0,0425$, $p_{Custodiol} < 0,0001$). Beim Vergleich der Lösungen reduzierte das Custodiol die ROS-Bildung um 76 % und E-ROC um 61 %. Die Custodiol-Proben zeigten einen stärkeren Anstieg der ROS-Produktion gegenüber der E-ROC Proben bis zum Zeitpunkt $t = 4$ h. Dort überstieg die Menge an gebildetem ROS der Custodiol-Proben, die ROS-Menge in den E-ROC Proben. Zu jedem Zeitpunkt in dem Versuch war die Menge an gebildeten ROS signifikant geringer als die der Positivkontrolle, in der eine Glukoseoxydase

4. Ergebnisse

(GOX) Wasserstoffperoxid produzierte. Auch lagen die Messwerte der ROS-Bestimmung beider Proben nach 4 h Inkubation noch mindestens 23 % unter dem Wert vor der Inkubation.

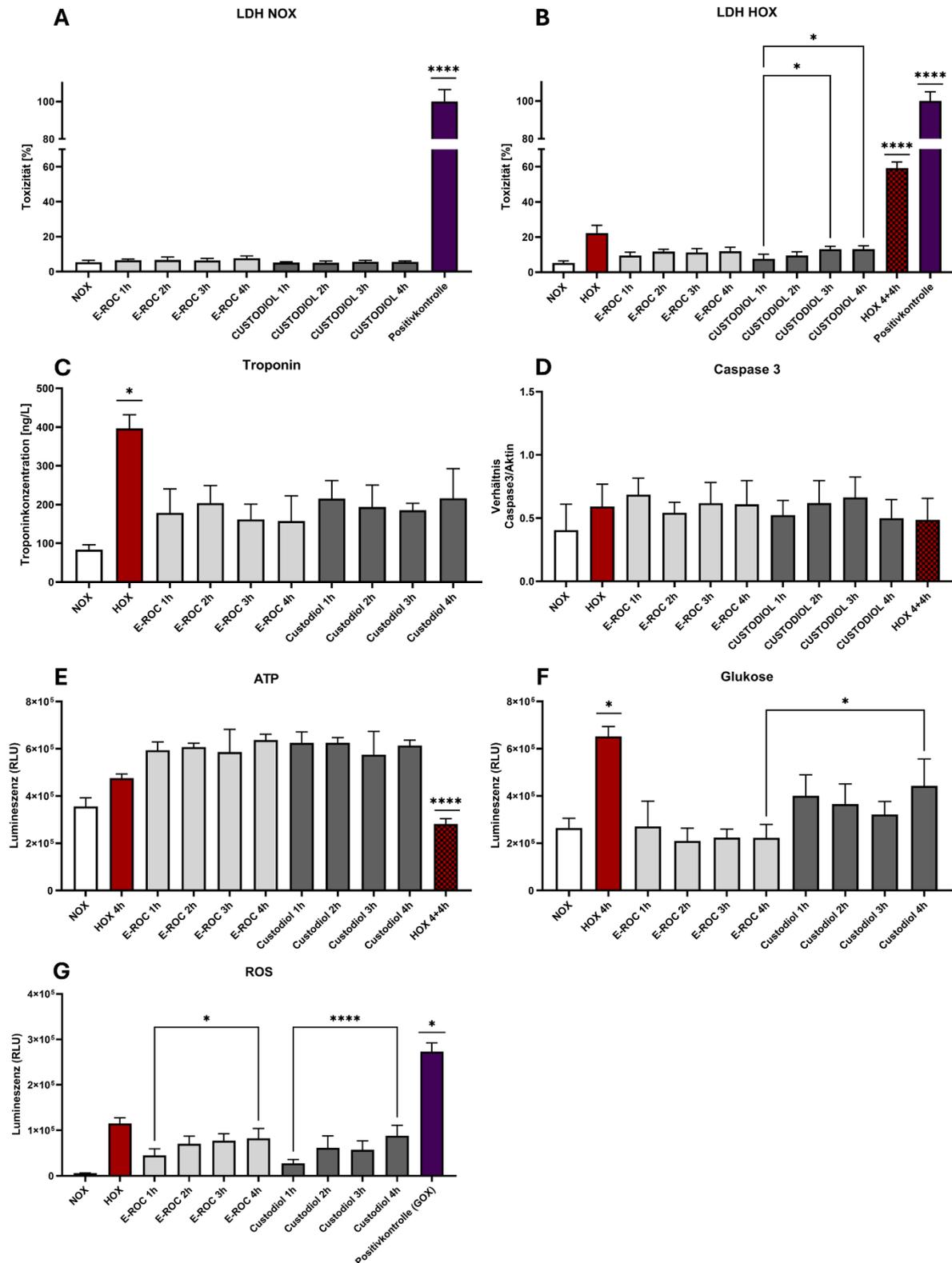


Abbildung 12: Biochemische Analyse der E-ROC hinsichtlich ihrer Wirkung auf Kardiomyozyten (HL-1). (A) und (B) zeigen die Ergebnisse der LDH-Tests bei Normoxie (NOX) und Hypoxie (HOX). Einen signifikanten Unterschied

4. Ergebnisse

fand sich neben der Positivkontrolle nur zwischen der Custodiol-Probe nach einer Inkubationszeit von 3 h und 4 h unter Hypoxie. Die Troponinfreisetzung war unabhängig von der Wahl des präoxygenierten Zusatzes (E-ROC oder Custodiol). Jedoch zeigte die signifikant höhere HOX-Probe den positiven Einfluss der Zugabe von Sauerstoff durch Custodiol und E-ROC (C). Der Caspase 3-Test (D) zeigte keinen Unterschied zwischen der Wahl von E-ROC oder Custodiol, sowie keinen Unterschied zwischen den Kontrollproben (HOX und HOX 4+4h). Der ATP-Test (E) zeigte nur in der HOX 4+4h-Probe eine signifikante Änderung im Vergleich zu allen anderen Proben. Im Glukoseaufnahme-Test (F) zeigte die Custodiol 4 h-Probe eine höhere Glukoseaufnahme als die komplementäre E-ROC 4 h-Probe. Die Bildung von ROS (G) stieg sowohl bei den E-ROC Proben als auch bei den Custodiol-Proben über die Beobachtungszeit an, wobei nur die Probe nach 4 h signifikant höher war im Vergleich zur Probe nach 1 h. Alle Daten wurden mittels one-way ANOVA + Tukey's bzw. + Šidák's multiple comparison test analysiert, n = 4.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die schon vorhandenen A-AOC dahingehend modifiziert, dass neben einem angepassten Syntheseprotokoll, die Verwendung eines zweiten Emulgators zu einem stabileren Produkt führen sollte. Die daraus entstandenen Lecithin-modifizierten nanoskalierten Sauerstoffträger (LENOX) zeigten im Allgemeinen andere physiko-chemische Eigenschaften als das Äquivalent ohne Lecithin (Kontrollemulsion). Albumin als Emulgator ist eine häufige Wahl für medizinisch angewendete Emulsionen und wurde schon erfolgreich als Emulgator für PFCOC verwendet.^[80, 81] Lecithin findet als Emulgator vor allem in der Lebensmittelindustrie Anwendung. Dabei werden beispielsweise Mayonnaise oder Salatdressing durch Lecithin stabilisiert und somit für den Endverbraucher genießbar gemacht.^[135] Lecithin findet in der Medizin auch schon länger Anwendung und ist von der FDA (*Food and Drug Administration*) für die parenterale Gabe bei Menschen zugelassen.^[136] In Verbindung mit PFC konnten auch Lecithin-stabilisierte PFCOC, wie Fluosol-DA, Perftoran, Oxygent oder Oxycyte hergestellt werden.^[137, 138] Die Besonderheit der LENOX besteht in der Kombination der Emulgatoren Albumin und Lecithin. Bei der Kombination von verschiedenen Emulgatoren können die positiven Effekte der einzelnen Emulgatoren kombiniert werden und wirken somit synergistisch. Im Zusammenhang mit PFC wurden schon Emulgatorkombinationen mit Lecithin versucht, wobei hauptsächlich Diblock-Amphiphile oder Pluronic F-68 als zweiter Emulgator verwendet wurde.^[136, 139] Die Kombination von Albumin und Lecithin wurde schon im Bereich der Tumorforschung als Medikamententransporter verwendet, jedoch noch nicht im Bereich der künstlichen Sauerstoffträger.^[140]

Bei dem Versuch, LENOX basic mit HSA herzustellen, sind deutliche Unterschiede vor allem bei der Partikelgröße und der Emulsionsstabilität aufgekommen. Zur Synthese der LENOX wurde als HSA-Quelle eine klinische Fertiglösung verwendet, welche zur intravenösen Applikation von reinem Albumin verwendet wird.^[81] Dieses Produkt enthält N-Acetyl-DL-Tryptophan und Oktansäure als Stabilisatoren für das Albumin.^[126] Diese Additive schützen die Albuminmoleküle vor thermischen Schäden und oxidativem Stress während der industriellen Herstellung.^[141] Die Oktansäure schützt das Albumin primär während der thermischen Pasteurisierung und das N-Acetyl-DL-Tryptophan sorgt für eine verminderte Oxidation des Produkts.^[142] Bei der Anlagerung von Proteinen an Grenzflächen findet eine Konformationsänderung statt, damit das

5. Diskussion

Emulgatormolekül optimal ausgerichtet ist. Es richtet sich dabei der hydrophile Teil des Moleküls zur wässrigen Phase und der hydrophobe Teil zur Öl-Phase aus. Diese Strukturänderung wird Oberflächendenaturierung genannt, solange die Denaturierung durch die Adsorption an eine Grenzfläche ausgelöst wird. Die Güte der Ausrichtung ist stark von der Beweglichkeit und Flexibilität des Emulgatormoleküls abhängig. Je flexibler und beweglicher das Molekül ist, desto schneller und effektiver erfolgt die Adsorption und somit die Stabilisierung der Emulsion. Durch die Zugabe der Stabilisatoren N-Acetyl-DL-Tryptophan und Oktansäure wird das Vermögen zur Oberflächendenaturierung des Albumins reduziert und somit die Ausrichtung an der Grenzfläche verlangsamt. Dies resultiert in einer geringeren Stabilisierungswirkung des Albumins als Emulgator. Zusätzlich sorgt die optimierte Ausrichtung durch die Oberflächendenaturierung für eine verbesserte Zugänglichkeit an die funktionellen Gruppen des Albumins. An diesen können weitere Modifikationen vorgenommen werden, indem beispielsweise anti-oxidativ wirkende Moleküle wie Resveratrol gebunden werden.^[143-146]

Aus diesem Anlass wurde das LENOX OFH-Protokoll entwickelt. Das Ziel dieser Optimierung war es, das klinische Albumin-Fertigprodukt direkt verwendet zu können, ohne es vorher aufwendig von den Stabilisatoren befreit zu müssen. Bei der LENOX OFH-Synthese wurde das Lecithin erst zu einem späteren Zeitpunkt während der Synthese zugegeben. Die Idee hinter dieser Entscheidung begründete sich auf den verschiedenen Anlagerungsgeschwindigkeiten der beiden Emulgatormolekülen. Lecithin lagert sich auf Grund der Molekülgröße schneller an der Grenzfläche an als das größere Albuminmolekül.^[147] Liegen beide Moleküle gleichzeitig vor, findet eine kompetitive Adsorption der Moleküle statt.^[41] Dies hat zur Folge, dass sich das Lecithin an der Grenzfläche anreichert und sich weniger Albumin anlagern kann. Unveröffentlichte Daten zeigten eine höchst instabile Emulsion bei der Verwendung der LENOX basic-Syntheseparameter, wenn Lecithin als einziger Emulgator verwendet wurde. Eine höhere Konzentration an Lecithin an der Grenzfläche hat somit eine weniger stabilisierende Wirkung als eine höhere Konzentration von Albumin. Beginnt die Synthese der LENOX OFH nur mit HSA, so hat das HSA mehr Zeit sich an der Grenzfläche anzulagern und das später zugegebene Lecithin lagert sich an der Grenzfläche und am Albumin an und stabilisiert die Emulsion zusätzlich.

5. Diskussion

5.1 Basis- und Lagerungsdaten

Für eine Einschätzung des neuen Produktes LENOX, war eine Bestimmung der physiko-chemischen und biologischen Grundeigenschaften essenziell. Dabei wurde die Emulsion nach dem LENOX basic und LENOX OFH Syntheseprotokoll hergestellt und gegen eine Kontrollemulsion verglichen, die nach dem LENOX basic Protokoll ohne Lecithin hergestellt wurde. Die Größe der LENOX basic Emulsionstropfen ($d_{50} = 100 - 200 \text{ nm}$) entsprach der Größenordnung vergleichbarer Systeme, wie in Albuminnanopartikel eingekapselte Teniposide^[140] oder dem selektiven Histondeacylase-Inhibitor MPT0B291, welche beide ebenfalls mittels HPH hergestellt wurden.^[148] Die unterschiedlichen Partikelgrößen von LENOX basic und LENOX OFH lassen sich auf das vorhandene bzw. abwesende Lecithin zu Beginn der Synthese zurückführen. Maßgeblich für die finale Partikelgröße bei HPH als Herstellungsmethode ist die Anlagerung von Emulgatormolekülen an der ungeschützten Grenzfläche, die nach dem Zerkleinerungsprozess entstanden ist. Je schneller die Anlagerung der Emulgatoren geschieht, desto geringer ist die Rekoaleszenz der Emulsionstropfen.^[94] Die Arbeit von Cho *et al.* zeigte den Effekt von Lecithin auf die Adsorption von BSA.^[149] Lagen Lecithin und BSA gleichzeitig in situ vor, so begünstigte dies die Adsorption von Albumin an die Grenzfläche durch Bildung von Lecithin-Albumin-Komplexen. Ist die Konzentration in einem optimalen Bereich, können die Lecithinmoleküle die BSA-Moleküle neu anordnen und bilden somit eine dichtere Packung an der Grenzfläche, was den Emulsionstropfen besser schützte.^[149] Einen positiven Einfluss von Lecithin auf die Adsorption von HSA wurde von Cho *et al.* nicht untersucht und konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Den besseren Schutz vor Reifungsprozessen durch BSA ließ sich auch in der Stabilität während der Langzeitlagerung zeigen. Nach einem Wachstum innerhalb der ersten 7 Tage der Lagerung, änderte sich die Größe der LENOX basic Partikel nicht mehr, wohingegen die Partikel der LENOX OFH reiften und die Spanne der Verteilung deutlich breiter wurde (Abbildung 7 D). Diese Änderung am Anfang der Lagerungszeit wird *annealing* genannt und ist für Lecithin-stabilisierte PFC-Emulsionen typisch. Dabei liegt in diesem Fall die molekulare Diffusion als dominierender Prozess vor, was an dem Verlauf der Graphen (Abbildung 7 A-C) abgelesen werden kann.^[150] Die Wahl der Lecithinkonzentration zur Synthese von LENOX führte zusätzlich zur Erhöhung der Stabilität. Krafft *et al.* zeigte eine optimale Emulsionsstabilität bei einem PFD/Lecithin-

5. Diskussion

Verhältnis von 4 - 6 %. LENOX lag mit einem Verhältnis von 5,2 % genau in dieser Spanne.^[151] Die Arbeit von Kuznetsova gibt eine größere Spannweite der optimalen Lecithinkonzentration von 4 - 10 % an und unterstützt die Aussage der stabilisierenden Wirkung durch die Wahl der Lecithinkonzentration.^[152]

Die Verwendung von Lecithin hatte auch einen messbaren Einfluss auf die Rheologie der Emulsion. Sowohl LENOX basic als auch LENOX OFH zeigten eine Viskosität, die von der angelegten Scherrate unabhängig war, wohingegen die Kontrollemulsionen ein stark scherverdünnendes Fließverhalten zeigte. Grund dafür können vorhandene Aggregate sein. Liegen aggregierte Partikel in der Flüssigkeit vor, erhöhen sie die Viskosität. Wird der Energieeintrag durch eine Änderung der Scherrate erhöht, brechen die Aggregate auf, was zu einer Verringerung der Viskosität führt.^[153] Auf Grund der Verläufe der Viskositätskurven (Abbildung 7 E+F) lässt sich eine Aggregationsbildung bei der Kontrollemulsion vermuten, während die beiden LENOX-Produkte keine bzw. nur eine geringere Menge Aggregate aufwiesen. LENOX OFH hatte über den gesamten Scherrate-Bereich von $50 - 800 \text{ s}^{-1}$ eine geringere Scherrate als LENOX basic. Der Grund dafür könnten die unterschiedlichen Tropfenkonzentrationen der Emulsionen sein. Da die Edukt-Zusammensetzung beider Produkte gleich war, jedoch die Tropfengröße der LENOX OFH im Durchschnitt größer waren, müssen bei der LENOX basic-Emulsion mehr Tropfen entstanden sein. Dies muss zu einer höheren Tropfenkonzentration geführt haben. Wie in Kapitel 2.1.5.2 bereits beschrieben, weisen Emulsionen mit geringerer Tropfenkonzentration eine geringere Viskosität auf, wie die Arbeiten von Pal^[58] und Derkach^[56] bestätigten.

Einer der Hauptparameter zur Einschätzung der (Lagerungs-) Stabilität einer Emulsion ist das Zeta-Potential. Die Oberflächenladungen der LENOX basic und LENOX OFH waren höher als das Potenzial der Kontrollemulsion. Dies lag an den zusätzlichen geladenen Molekülen an der Grenzfläche, welche durch die Verwendung von Lecithin als weiterer Emulgator hinzukamen. Albumin liegt in wässriger Lösung bei physiologischem pH-Wert als Anion vor und trägt unter diesen Bedingungen siebzehn negative Ladungen pro Molekül.^[154] Das verwendete Lecithin aus Sojabohnen besteht zu verschiedenen Anteilen (Phospholipide haben einen Anteil von $\geq 97 \%$ am Gesamtgewicht) aus Phosphatidylcholin (PC, 55,3 %), Phosphatidylethanolamin (PE, 26,3 %) und Phosphatidylinositol (PI, 18,4 %).^[155] PC und PE besitzen bei physiologischem pH eine Nettoladung von 0, wohingegen PI eine Nettoladung von -1

5. Diskussion

besitzt.^[156] Somit wirken beide Emulgatoren synergistisch hinsichtlich des Zeta-Potentials und erhöhen den Betrag des Potentials im Gegensatz zu Lecithin-freien Formulierungen. Aus diesem Grund war der Betrag des Zeta-Potentials von LENOX basic und LENOX OFH größer als der Betrag der Kontrollemulsion. Der Unterschied im Zeta-Potential zwischen LENOX basic und LENOX OFH entsteht durch die unterschiedliche Konzentration von Albuminmolekülen an der Grenzfläche. Wie schon zuvor beschrieben, hatte das Albumin während der LENOX OFH-Synthese mehr Zeit, sich an die Grenzfläche anzulagern. Dies führte zu einer höheren Konzentration an Albuminmolekülen an der Grenzfläche, was sich in einem stärkeren Zeta-Potential zeigte. Das größere Zeta-Potential der LENOX Produkte gegenüber der Kontrollemulsion zeigt sich in einer verbesserten Langzeitstabilität. LENOX basic zeigte nach dem anfänglichen *annealing* keine weitere Partikelreifung. Die größere Oberflächenladung erhöhte die repulsiven Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Partikeln, was zu einer erschwerten Annäherung der Partikel führte. Dadurch fand eine Aggregationsbildung seltener statt und zusätzlich war die Koaleszenz gehemmt.^[23] Das Ergebnis der Zeta-Potential-Bestimmung von LENOX basic passt zu den Analysen von Magdassi *et al.* LENOX basic zeigte bei 2 % Lecithin ein Zeta-Potential von -73 mV was im Vergleich zu der Emulsion von Magdassi (-100 mV bei 3 % Lecithin) in einem vergleichbaren Bereich liegt.^[157]

Die gemessenen Mengen an freigesetztem Sauerstoff sind bei allen Emulsionen vergleichbar, da sie hauptsächlich von der Menge an vorhandenem PFC abhängen. Dies ist an der signifikant höheren Sauerstofffreisetzung der verschiedenen LENOX-Emulsionen im Vergleich zu PFC-freien Kontrolllösungen wie Wasser, Custodiol oder DMEM (Tabelle 5) sichtbar. Der Vergleich zwischen der Kontrollemulsion und den LENOX-Emulsionen zeigte keinen Unterschied. Somit war die Freisetzung von Sauerstoff nicht durch den Zusatz eines weiteren Emulgators gehemmt, sondern konnte ungehindert ablaufen. Die absolute freigesetzte Menge an Sauerstoff von 70 - 80 mL/L O₂ (bei 713 mmHg) lässt sich zwischen zwei wichtigen PFCOC einordnen, nämlich Perftoran (57 mL/L bei 713 mmHg) und Oxygent (149 mL/L bei 713 mmHg).^[79] Bei der Langzeitlagerung von 42 Tagen zeigte LENOX basic, passend zu der hohen Stabilität in der Partikelgrößenverteilung, keinen Verlust in der Funktionalität, gemessen an der Sauerstofffreisetzung. LENOX OFH hatten einen Funktionsverlust von 23 %, was ebenfalls zu den Stabilitätsmessungen kongruent war. Da LENOX OFH nach 42 Tagen Lagerung noch fast doppelt so viel Sauerstoff

5. Diskussion

freisetzen konnten wie reines Wasser und das Volumen der Probe konstant geblieben war, musste der Funktionsverlust auf Grund von fehlendem PFD zustande gekommen sein. PFD verdunstet bereits bei Raumtemperatur so rapide, dass sich das Gesamtgewicht der AOC-Probe innerhalb weniger Minuten signifikant verringern kann. Jägers *et al.* konnte bei den Vorgängern (A-AOC) diese Beobachtung machen und zeigten zusätzlich, dass mit Albumin emulgiertes PFD deutlich langsamer verdunstet als wenn es frei in Wasser vorliegt.^[158] Unveröffentlichte Daten von LENOX zeigten direkt nach Synthese kein freies PFD in der wässrigen Phase, was durch NMR-Messungen belegt werden konnte (Anhang 8.1.1). Somit muss sich freies PFD über die Lagerungszeit, auf Grund der abnehmenden Emulsionsstabilität, gebildet haben und durch die fehlende Schutzhülle der Emulgatoren evaporiert sein. Dies führte zu der signifikanten Abnahme der Sauerstofffreisetzung von LENOX OFH.

Die Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen, hinsichtlich einer negativen Wirkung der neuen AOC auf kultivierte Zellen, zeigten wie erwartet keine zellschädigende Wirkung im Vergleich zu reinem Zellkulturmedium. Damit zeigt LENOX die gleiche Biokompatibilität wie andere PFC-Emulsionen und ermöglicht somit grundsätzlich den Einsatz als intravenös applizierte exogene Nanopartikel.^[137, 159]

5.2 Kompatibilität mit klinisch relevanten kristalloiden und kolloidalen Lösungen

Die A-AOC als Vorgänger der LENOX zeigten eine sehr limitierte Stabilität gegenüber ionenhaltigen Medien, wie Perfusionsmedien, Injektionslösungen oder Zellkulturmedien. Deshalb entstand die Idee zur Entwicklung einer neuen AOC-Formulierung mit verbesserter Kompatibilität und Stabilität in kristalloiden und kolloidalen Lösungen, welche von Relevanz für klinische Applikationen sind. Aus diesem Grund wurde neben üblichen Volumenersatzlösungen wie Natriumchlorid (NaCl 0,9 %), Ringerlösung, Hydroxyethylstärke (HES 6 %) oder Sterofundin ISO auch das Transplantationsmedium STEEN Solution, die kardioplege Lösung Custodiol und das Zellkulturmedium DMEM als klinisch und forschungs relevante Lösungen ausgewählt.

Bei der Bestimmung der Partikelgröße in den verschiedenen Medien ist ein Einfluss der verschiedenen Salze zu erkennen. Wie zu erwarten war, hatten die in den Medien vorhandenen Ionen einen Einfluss auf die Emulsionsstabilität. Die LENOX-Emulsion

5. Diskussion

stabilisiert sich unter anderem auf Grund der gleich geladenen Oberflächen, sodass sich die einzelnen Tropfen elektrostatisch abstoßen. Somit wird die Annäherung der einzelnen Tropfen erschwert und die Agglomeration sowie die Reifung der Partikel reduziert. Jedes der verwendeten Medien hatte eine andere Zusammensetzung von Ionen (Anhang 8.1.2), was zu unterschiedlich starken Einflüssen auf die Oberflächenladung der Partikel (Zeta-Potential) führte. Die LENOX-Partikel waren auf Grund der Albumin- und Lecithin-Moleküle negativ geladen, was im Zeta-Potential erkennbar ist. Positiv geladene Ionen lagern sich durch Coulombkräfte an den Emulgatoren an und reduzieren dadurch die effektive Nettoladung der Partikel. Das Potential an der Grenzfläche fällt, die repulsiven Wechselwirkungen sinken und die Wahrscheinlichkeit von Agglomeration und Koaleszenz nimmt zu.^[25, 138] Eine Einwirkung von Ionen auf die Partikelgröße war zu erwarten und ist für eine Anwendung unbedenklich, solange die Partikel auf Grund ihrer Größe keinen Infarkt verursachen. Die elektrostatischen Abstoßungskräfte sind proportional zum Potential an der Grenzfläche. LENOX mit dem größeren Zeta-Potential, im Vergleich zu den A-AOC bzw. Kontrollemulsion, waren resistenter gegenüber der destabilisierenden Wirkung der Kationen, da ein größerer Ioneneintrag zur Destabilisierung der LENOX notwendig war als bei der Kontrollemulsion.^[160, 161] Besonders mehrfach-geladene Ionen wie Magnesium (Mg^{2+}) oder Calcium (Ca^{2+}) haben einen besonders starken Effekt auf die Stabilität der Emulsion, da sie bei gleicher Konzentration doppelt so viele Ladungen neutralisieren können wie einfach-geladenen Ionen.^[138]

Bei der Verwendung von STEEN Solution fallen die deutlich größeren Partikel gegenüber allen anderen Lösungen auf. Hierbei handelte es sich nicht zwingend um einen Effekt der Salze, sondern der Verwendung von humanem Albumin. Bis auf LENOX (STEEN Solution) wurden alle LENOX-Varianten mit BSA hergestellt. Wie zuvor diskutiert, sorgten die Stabilisatoren N-Acetyl-DL-Tryptophan und Oktansäure für eine verminderte Effektivität des Emulgierprozesses und damit zu größeren Partikeln. Der große Vorteil der neu entwickelten LENOX (ausgenommen LENOX in STEEN Solution) war, dass die d_{90} -Werte, trotz des Einflusses von den Salzen, auf eine Partikelgröße < 300 nm reduziert werden konnten und die Spanne der Partikelgrößenverteilung im Durchschnitt bei 1,0 lag.

Die Viskosität der LENOX in Wasser, NaCl, Ringerlösung und Sterofundin ISO waren in der gleichen Größenordnung. LENOX (STEEN Solution) zeigte die höchste

5. Diskussion

Viskosität. Durch den nicht optimalen Syntheseprozess haben sich Agglomerate gebildet, die zu einem Anstieg der Viskosität geführt haben.^[153] LENOX (HES 6 %) weisen die nächsthöhere Viskosität auf. Dieser Viskositätsanstieg ist nicht zwangsweise auf das Vorhandensein von Agglomeraten zurückzuführen. HES 6 % enthält Stärke, was, im Vergleich zu reinem Wasser, zu einer zweifach höheren Viskosität des reinen Mediums führt.^[162] Somit ist die Viskosität des Edukts schon deutlich höher als die Viskosität der LENOX (Wasser)-Probe. Dieser Grund kann zusätzlich zu den signifikant größeren Partikelgrößen geführt haben. Auf Grund der höheren Viskosität des Mediums ist die Diffusionsgeschwindigkeit der Emulgatoren verlangsamt, was zu einer schlechteren Emulgation führte. Dies hat wiederum zur Folge, dass die bei der HPH zerkleinerten Tropfen schneller rekoalisieren und die Partikelgröße der finalen Emulsion erhöht ist. Zusätzlich hat die Viskosität einen Einfluss auf die Fließeigenschaft des Fluids innerhalb des Microfluidizers und somit auch auf die Tropfenbildung. Nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz ist die Rohrströmung antiproportional zur Viskosität. Somit erreicht das Fluid mit höherer Viskosität eine geringere Geschwindigkeit. Aus diesem Grund ist die Scherung durch die Dehnströmung geringer und die Tropfenzerkleinerung weniger effektiv.^[163, 164]

Die Sauerstofffreisetzung ist unabhängig von dem verwendeten Synthesemedium. Bis auf LENOX (Custodiol) im Vergleich zu LENOX (STEEN Solution), zeigten alle LENOX Varianten keine Minderung der Funktionalität. Custodiol enthält als einziges Medium Histidin und Mannitol, die jedoch in keinem bekannten Zusammenhang mit einer destabilisierenden Wirkung auf Emulsionen stehen, da sie bei physiologischem pH-Wert neutral geladen sind. Auch ist die Gesamtionenladung von Kationen in Custodiol deutlich geringer als in allen anderen Medien (Anhang 8.1.2). Es konnte nicht geklärt werden, warum LENOX (Custodiol) eine geringere Sauerstofffreisetzung als LENOX (STEEN Solution) besaß. Im Vergleich zu LENOX (Wasser) war die Funktionalität auch nicht unterschiedlich. LENOX kann somit ohne Funktionsverlust in den unterschiedlichsten klinisch relevanten kolloidalen und kristalloiden Lösungen verwendet werden, wobei die Verwendung der LENOX OFH bei Nutzung von HSA ratsam ist.

5.3 Verhalten in einer simulierten normothermen Maschinenperfusion

Die Anwendungen von AOC im medizinischen Kontext sind breit verteilt und finden in der Organkonservierung, Organtransplantations- und Organperusionsmedizin als

5. Diskussion

auch in der bildgebenden Medizin und in der Anästhesie Anwendung. Rother *et al.* nutzte neben PFCOC auch HBOC als Sauerstoffdonatoren für eine normotherme *ex vivo* Perfusion von Schweinenieren zur Bestimmung der verbesserten Gewebeoxygenierung durch die AOC.^[134] PFCOC auf Basis des PFC Perfluorocetyl bromid wurde zur Perfusion von isolierten Rattenlungen verwendet. Ziel der Untersuchung war die Analyse der Effekte von PFCOC auf eine 4 h subnormothermen Perfusion der Lungen, welche mit einer signifikanten Verbesserung des Organs abgeschlossen werden konnte.^[165] A-AOC wurden schon als therapeutische Maßnahme bei der Dekompressionskrankheit im Tiermodell angewendet und konnten dort die Symptome reduzieren und die Überlebensrate steigern.^[166]

Als eine der Hauptanwendungsgebiete von AOC gilt die Maschinenperfusion von meist isolierten Organen. Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit eine simulierte normotherme Maschinenperfusion als Anwendungstest ausgewählt, wobei kein biologisches Material, wie Zellen oder Organe verwendet wurden, sondern die reinen mechanischen, thermischen und temporalen Effekte untersucht werden sollten. Als Perfusionsmedien wurden die LENOX basic in reinem Wasser, in der kardioplegen Lösung Custodiol und die für Lungentransplantation verwendete STEEN Solution hergestellt. Die Partikelgrößenverteilung von LENOX (Custodiol) zeigte über die gesamte Versuchsdauer von 4 h keinen Effekt der Perfusionseinflüsse. Die Partikel von LENOX (Wasser) hingegen wuchsen nach 3 h signifikant gegenüber der Probe zum Zeitpunkt $t = 0$ min. Einen großen Effekt auf das Wachstum der Nanopartikel hatte die Perfusionstemperatur. Erwärmt sich die Emulsion, bewegen sich die Nanopartikel darin mit mehr Energie und legen in kürzerer Zeit größere Strecken zurück. Zeitgleich reduziert die Temperatur die Viskosität des Mediums, was die Bewegung weiter verstärkt. Zusätzlich reduziert die Temperatursteigerung die Grenzflächenviskosität, was einen Filmriss an der Grenzfläche begünstigt.^[167] Dadurch kommt es zu einer erhöhten Kollision der Partikel, was wiederum eine Zunahme der Agglomerationsrate und der Koaleszenz zur Folge hat.^[168] Aus diesen Gründen wachsen Emulsionstropfen bei höheren Temperaturen schneller. Durch die verbesserte Zusammensetzung der Emulgatoren in LENOX waren die stabilisierenden Eigenschaften ausreichend hoch, um eine drastische Zunahme der Partikelgröße zu verhindern. LENOX (Custodiol) und LENOX (Wasser) wiesen nur Partikel < 300 nm auf, was unter der selbst festgelegten Grenze von $1 \mu\text{m}$ lag. Kapillaren im menschlichen Körper können einen Durchmesser

5. Diskussion

von 4 μm haben, welche Nanopartikel mit einer Größe von 1 μm problemlos passieren können sollten.^[169] Die Tropfen der LENOX (STEEN Solution) zeigten als einzige der drei Proben Partikel $> 1 \mu\text{m}$ auf. Da die großen Partikel von Beginn an vorlagen, lag es nicht an den Perfusionsparametern, sondern an dem Produkt selbst. Die Diskussion zu diesem Punkt ist in Kapitel 5.2 zu finden. Auch LENOX (STEEN Solution) zeigte nur geringe Partikelgrößenänderungen während der Perfusion, was ebenfalls auf eine stabile Emulsion deutet. Trotz der Problematik bei der Synthese und der breiteren Partikelgrößenverteilung, ist die LENOX (STEEN Solution)-Emulsion ausreichend stabil für eine Anwendung in der Maschinenperfusion. Mit einer maximalen Partikelgröße von $< 2 \mu\text{m}$ könnten Kapillargefäße noch perfundiert werden, jedoch mit einem deutlich größeren Risiko zur Bildung von Embolien. Für eine sicherere Anwendung müssen LENOX in STEEN Solution durch die LENOX OFH-Synthese hergestellt werden, um kleinere und stabilere Partikel zu erzeugen.

Der Sauerstoffgehalt der Emulsion nahm nach einer Perfusionszeit von ca. 90 min ein Maximum von 280 – 320 mmHg an. Die Menge an aufgenommenem Sauerstoff blieb ab diesem Punkt konstant, was auf Grund eines nicht vorhandenen Verbrauchers (Gewebe oder Organ) zu erwarten war. Alle drei Produkte zeigten das gleiche Verhalten bei der Entwicklung der Sauerstoffkapazität, was, mit Ausnahme von LENOX (Custodiol) bei $t = 90 \text{ min}$, auf eine vergleichbare Funktionalität hindeutet. Somit konnte gezeigt werden, dass die LENOX über den gesamten Versuchszeitraum von 4 h die Stabilität und Funktionalität aufrechterhalten konnten und grundsätzlich für eine Anwendung in der Maschinenperfusion geeignet sind.

5.4 Sauerstoffträger mit einer verlängerten Sauerstofffreisetzung

Die hohe Gaslöslichkeit von PFCs und ihre simple Aufnahme- bzw. Freisetzungskinetik macht sie zu hervorragenden Kernsubstanzen für künstliche Sauerstoffträger. PFD besitzt bei 25 °C eine Sauerstofflöslichkeit von 403 mL/L (bei 1 atm), wohingegen Blut eine Sauerstofflöslichkeit von 200 mL/L und Wasser von 6,3 mL/L besitzt.^[112, 170, 171] Diese deutlich höhere Sauerstofflöslichkeit liegt ihrem Aufbau zugrunde. PFCs lösen Sauerstoff und andere respiratorische Gase physikalisch durch lockere, nicht gerichtete van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen sich und den Gasen. Dabei weisen beide sehr niedrige Kohäsionsenergiedichten auf, die sich in sehr ähnlichen Hildebrandt-Koeffizienten zeigen. Diese Unterschiede in der Wechselwirkung spiegeln sich in den Profilen der Sauerstoffaufnahmekurven wider, die in Abhängigkeit von

5. Diskussion

Sauerstoffpartialdruck verlaufen. Die Sauerstoffaufnahme kurve verläuft für Blut (Hämoglobin) sigmoidal und für PFCs linear.^[63] Das Verhältnis von Aufnahme und Freisetzung von Sauerstoff erfolgt bei PFCs entlang des Sauerstoffpartialdruckgradienten, der zwischen dem Druck innerhalb des PFCs und dem Druck außerhalb, also der Umgebungsluft oder der Trägerlösung, herrscht. Dabei folgt die Kinetik dem Henry-Gesetz, das einen linearen Zusammenhang zwischen Partialdruck und Gaskonzentration beschreibt.^[112, 172] Das macht die Anwendung von PFCOC in einer Perfusion einfach, da die Sauerstoffträger mit einem höheren Partialdruck (im Vergleich zur normalen Raumluft) beladen werden können und den beladenen Sauerstoff im Sauerstoff-armen Gewebe wieder freisetzen können. Diese Technik wurde schon unter anderem von Rother *et al.* zur Perfusion von Schweinenieren oder von Arni *et al.* bei einer Maschinenperfusion von Lungen verwendet.^[134, 165]

Die Schwierigkeit in dieser Arbeit war die Reduktion der Sauerstofffreisetzungsrates (Sauerstoffmenge pro Zeit), um somit die Freisetzungszeit zu verlängern. Die Aufnahme der Sauerstofffreisetzungskurve (Abbildung 10) von LENOX basic, gab einen Einblick auf die Freisetzungskinetik von dem in LENOX verwendeten PFD. Die anfängliche Freisetzung der LENOX erfolgte mit einer hohen Freisetzungsrates auf Grund des hohen Partialdruckunterschiedes zwischen der hypoxischen Lösung und den beladenen Sauerstoffträgern. Zu Beginn des Versuches betrug der Sauerstoffpartialdruck für das hypoxische Wasser 10 hPa und der Partialdruck in den Sauerstoffträgern 450 hPa, was einer Differenz von 440 hPa entsprach. Dieser große Gradient führte zu einer rapiden Freisetzung des Sauerstoffs aus den LENOX, was sich in einer hohen Freisetzungsrates widerspiegelte. Die Änderung des Partialdrucks innerhalb der ersten 10 min entsprach einer Druckabnahme von 225 hPa bzw. 169 mmHg. Im Vergleich zu metabolisch aktivem Gewebe, indem der Sauerstoffpartialdruck bei ca. 20 mmHg liegt, betrug die Abnahme das 8-Fache des benötigten Sauerstoffpartialdrucks.^[173] Die Freisetzung war für die ersten 15 min linear und folgte somit dem Henry-Gesetz.^[174] Die zeitgleiche Verwendung von beladenen und unbeladenen LENOX sollte dafür sorgen, dass ein Teil des freigesetzten Sauerstoffs von den unbeladenen LENOX aufgenommen wird und somit zu einem späteren Zeitpunkt wieder freigesetzt werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung der E-ROC zu einer verlängerten Sauerstofffreisetzung mit sichtbar veränderter Freisetzungskinetik führte. Es gibt keinen Anlass, um eine grundlegende

5. Diskussion

Änderung der Austauschkinetik der jeweils beladenen und unbeladenen LENOX zu postulieren. Die sichtbare Reduktion der Sauerstofffreisetzungsrates, die eine Abflachung der Sauerstofffreisetzungskurve zur Folge hatte, schien das Resultat einer kombinierten Austauschkinetik zwischen den beiden LENOX-Varianten, dem Trägermedium und der Umgebungsluft zu sein. Zwischen dem vorgelegten Wasser zu Beginn des Versuches und der Umgebungsluft in der Hypoxiewerkbank hatte sich ein Gleichgewicht eingestellt, sodass in der Werkbank ein Sauerstoffpartialdruck von ebenfalls 10 hPa angenommen werden konnte. Da die Sauerstoffkonzentration in der Werkbank automatisch geregelt wurde und das Verhältnis von der Menge an freigesetztem Sauerstoff zum Gesamtvolumen der Hypoxiewerkbank sehr groß war, kann der Partialdruck in der Werkbank als konstant angenommen werden.

Die unbeladenen LENOX wurden bis zum Versuch an der Raumluft gelagert und hatten somit den Sauerstoffpartialdruck der Umgebungsluft von 211 hPa angenommen. Somit lag zwischen den beladenen (450 hPa) und den unbeladenen LENOX eine Differenz von 239 hPa. Der Partialdruckgradient zwischen den beiden LENOX-Varianten war deutlich geringer als der zwischen den beladenen und dem hypoxischen Trägermedium. Mit 239 hPa betrug die Differenz mehr als 50 % der Maximalbeladung in diesem Versuch, was für eine Affinität zur Aufnahme des Sauerstoffs in die unbeladenen LENOX spricht. Auf Grund der Tatsache, dass die unbeladenen Sauerstoffträger mit ihrem Sauerstoffpartialdruck genau in der Mitte zwischen den beladenen LENOX und dem hypoxischen Trägermedium lagen, führte dies zu einer partiellen Aufnahme des freigesetzten Sauerstoffs in die unbeladenen LENOX und eine große Menge Sauerstoff verblieb auf Grund des größeren Gradienten in dem Trägermedium (Wasser). Die Umgebungsluft war in diesem Versuch, mit einem Partialdruck von 10 hPa, der einzige Sauerstoffverbraucher, welcher den Sauerstoff aus dem Wasser entzog. Dem Henry-Gesetz folgend reduzierte sich somit die Menge an Sauerstoff im Messgefäß (Vertiefung in der Well-Platte) kontinuierlich, da der Partialdruck in der Hypoxiewerkbank nach der Freisetzung des Sauerstoffs durch die AOC geringer war als in der Probenlösung.^[175] Da die eingebrachte Sauerstoffmenge durch die beladenen LENOX und der Verbrauch durch die hypoxische Atmosphäre in der Werkbank für alle Proben identisch war, kann die verlängerte Sauerstofffreisetzung nur auf die Verwendung der E-ROC zurückgeführt werden. Ein weiterer Vorteil der E-ROC gegenüber der reinen LENOX ist die Kontinuität der Sauerstofffreisetzung. Die Sauerstofffreisetzungsrates der LENOX basic zeigt einen deutlich hyperbolischen

5. Diskussion

Verlauf, was eine heterogene Freisetzung zur Folge hat. E-ROC hingegen zeigen einen fast linearen Verlauf in der Freisetzungsrates, was für eine gleichmäßige Freisetzung spricht. Eine gleichmäßige Freisetzung ist für die Schaffung einer optimalen, physiologischen Umgebung für das Organ in einer späteren Anwendung von größter Wichtigkeit, da stoßweise Oxygenierung von Zellen zu Hyperoxygenierung führen kann, was zur Schädigung des Organs führt. Das Problem der Hyperoxygenierung beschäftigt beispielsweise die Kardiologie als Teil der Reperfusionsschäden nach einem chirurgischen Eingriff am kardioplegierten Herzen. Wird das Herz wieder zum Schlagen gebracht, werden die Koronararterien durchblutet und das Myokard mit Sauerstoff versorgt. Der große Unterschied im Sauerstoffpartialdruck, zwischen dem arteriellen Blut und den hypoxischen Kardiomyozyten, führt zu ROS-Bildung und Zellschädigungen.^[176]

Die reduzierte Sauerstofffreisetzungsrates in den E-ROC führte zu einer Reduktion der Sauerstoffmenge in Lösung, welcher für den aeroben Stoffwechsel der Zellen benötigt wurde. Somit musste gezeigt werden, dass die reduzierte Menge an Sauerstoff für eine Oxygenierung der Zellen ausreichte. Aus diesem Grund wurde der Hypoxiemarker HIF-1 α in Abhängigkeit der Oxygenierungszeit bestimmt. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die freigesetzte Menge an Sauerstoff aus den E-ROC zur Destabilisierung des HIF genügt und somit eine ausreichende Oxygenierung stattgefunden hat. Im Vergleich konnten präoxygeniertes Custodiol und unbeladene LENOX eine signifikant geringere Menge an HIF destabilisieren, wobei die LENOX (ohne Oxy) die Menge an zuvor gebildetem HIF nicht signifikant reduzieren konnte. Die Menge an zuvor gebildetem HIF-1 α , induziert durch die vierstündige Hypoxie, wurde von E-ROC stärker destabilisiert als durch das reine Custodiol. Da ein Minimum an HIF-Expression physiologische Sauerstoffbedingungen zeigt, ist das Ziel der Sauerstoffträger die maximale Destabilisierung von HIF-1 α .^[177] Neben dem Mangel an Sauerstoff, kann die HIF-Expression auch durch andere Faktoren beeinflusst werden. De Laplanche *et al.* beschrieb die Einwirkung von Glukosemangel auf die HIF-Bildung.^[178] Da bei der Bestimmung von HIF in diesem Versuch keine Glukose zugesetzt wurde und die Zellen für über 24 h einer Mangelversorgung an Nährstoffen ausgesetzt waren, scheint eine HIF-Bildung auf Grund fehlender Nährstoffe ebenfalls für wahrscheinlich. Die gewählte Zelllinie HL-1 zeigt allgemein eine geringe HIF-Bildung, die allein auf Hypoxie basiert. In der Arbeit von Wang *et al.* wurden HL-1 Zellen für 4 h einer Hypoxie ausgesetzt und die gebildete Menge an HIF-1 α -Protein war

5. Diskussion

verhältnismäßig gering.^[179] Erst nach einer Hypoxiezeit von 8 h zeigte sich ein deutliches Signal im Western Blot, was dazu führte, dass für diesen Versuch eine radikalere Behandlung der Zellen vor Versuchsbeginn notwendig war. Kuznetsov *et al.* zeigte die Hypoxieresistenz der HL-1 Zellen durch Bestimmung der Zellviabilität nach 24-stündiger Hypoxie, welche mehr als 90 % betrug.^[180] Dies ist der Grund für die Inkubation der Zellen für 24 h in *starving* Medium und anschließender vierstündiger Hypoxie.

Bei den spezifischen und unspezifischen Markern für metabolische Aktivität und Zellviabilität konnten ebenfalls Unterschiede zwischen den verwendeten Probelösungen gezeigt werden. Es wird davon ausgegangen, dass geladene Nanopartikel, wie LENOX (Zeta-Potential $\neq 0$) ein größeres Potential zur Zelltoxizität haben als vergleichbare Partikel mit neutraler Oberfläche (Zeta-Potential ≈ 0).^[159, 181] LDH als unspezifischer Marker für die Zellviabilität zeigte unter normalen Sauerstoffbedingungen keinen Unterschied zwischen den Proben. Da die Freisetzung des Enzyms bei der Verwendung von E-ROC vergleichbar mit den Freisetzungen in der Normoxie-Probe (NOX) und den Custodiol-Proben war, konnte kein Vorteil durch die Verwendung der E-ROC gezeigt werden. Für diese Untersuchung ist die wichtigere Beobachtung jedoch, dass durch die Verwendung der E-ROC keine Steigerung der LDH-Freisetzung und damit keine Zunahme der Toxizität festgestellt werden konnte.^[182] Waren die Zellen vor der Inkubation mit den Probelösungen schon hypoxisch, so konnte durch Zugabe von präoxygenierten E-ROC und Custodiol die Hypoxie-induzierte LDH-Freisetzung reduziert werden. Über die Versuchszeit von 4 h stieg in den Custodiol-Proben die Menge an freigesetztem LDH wieder an, sodass die Menge an LDH nach 4 h signifikant höher war als noch 1 h nach Zugabe der Probelösungen. In diesem Fall sorgte die Sauerstoffzugabe durch das Custodiol für eine kurzzeitige Reduktion der HIF-Expression. Die anhaltende hypoxische Atmosphäre sorgte für einen Wiederanstieg des HIF-Signals, da eine dauerhafte Freisetzung nicht gewährleistet war.^[183] Die Menge an freigesetztem LDH blieb bei den E-ROC-Proben konstant, was für eine dauerhafte Versorgung der Zellen mit Sauerstoff spricht. Die Versorgung von hypoxischen HL-1 Zellen konnte schon in der Arbeit von Karaman gezeigt werden, in der die Reoxygenierung der Zellen mit einer anderen Weiterentwicklung der A-AOC realisiert wurde.^[146] Dabei wurde das HIF-1 α über einen Zeitraum von 30 min erfolgreich destabilisiert. Dieses Ergebnis ist mit den Beobachtungen dieser Arbeit konform. Wird die Annahme getroffen, dass die von

5. Diskussion

Karaman verwendeten PFCOC eine vergleichbare Sauerstofffreisetzungskinetik wie die LENOX basic besaßen (da beide PFD als Kernsubstanz verwendeten), so ist die Versorgungszeit von 30 min übereinstimmend zu der Sauerstofffreisetzungszeit von 27 min der LENOX basic. E-ROC mit der verlängerten Sauerstofffreisetzung wirken gegen den Wiederanstieg der LDH-Konzentration auf Grund der hypoxischen Atmosphäre und konnten so die LDH-Freisetzung konstant geringhalten.

Troponin ist als spezifischer Zellschädigungsmarker für Kardiomyozyten ein zusätzlicher Parameter für die Bestimmung der potenziellen protektiven Wirkung der E-ROC durch kontinuierliche Sauerstofffreisetzung bei hypoxischen Zellen. Wie schon in Kapitel 2.4.3 beschrieben führen Hypoxie-induzierte Zellschädigungen zur Verringerung der Membranintegrität, was einen Anstieg der extrazellulären Troponinkonzentration zur Folge hat.^[184] Sowohl die Gabe von Custodiol als auch von E-ROC reduzierte die Troponinfreisetzung signifikant und sorgte zusätzlich zu keinem erneuten Anstieg der extrazellulären Troponinkonzentration. Somit zeigten beide Proben eine Verbesserung der Zellmembranintegrität und des Zellzustandes. Ein Grund für die protektive Wirkung beider Proben kann das verwendete Custodiol sein. Das Zellmedium wurde vor der Lagerung unter Hypoxie durch Custodiol ersetzt. Custodiol wurde als protektive kardioplege Lösung entwickelt, um das Herz während einer Ischämie zu schützen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass reines Custodiol die Freisetzung von Troponin reduzieren kann.^[185] Die Einsatzzeit für Custodiol von 3 h wurde jedoch in diesem Versuch überschritten, was sich in einer hohen Konzentration von freiem Troponin widerspiegelte. Somit ist ein positiver Einfluss ab dem Zeitpunkt der Zugabe der Probelösungen nicht mehr anzunehmen.^[185] Die verwendeten Probelösungen enthielten jedoch frisches Custodiol, dessen protektive Wirkung ab dem Zeitpunkt der Zugabe wirken konnte. Somit kann die reine Anwesenheit von Custodiol die positive Wirkungsweise der E-ROC überdecken. Zusätzlich konnte Streng *et al.* eine Abnahme der Troponinfreisetzung auf Grund von bevorstehendem Zelltod zeigen.^[184] Nach der Inkubationszeit von 4 h waren die Zellen schon insgesamt 8 h unter Hypoxie. In der Arbeit von Streng zeigten HL-1 Zellen zu diesem Zeitpunkt schon eine verminderte Troponinfreisetzung.^[184] Dies kann die Wirkung der E-ROC überlagern, wodurch kein Effekt sichtbar ist.

Apoptose ist ein programmierter Zelltod, der für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts und der Gesundheit von Organismen essenziell ist. Dieser Prozess

5. Diskussion

eliminiert gezielt beschädigte, überflüssige oder potenziell gefährliche Zellen, ohne dabei eine Entzündungsreaktion auszulösen. Die Apoptose wird durch spezifische Signale und molekulare Mechanismen ausgelöst, die zur Aktivierung von Enzymen namens Caspasen führen. Diese Enzyme spalten zelluläre Proteine und führen zur kontrollierten Demontage der Zellstrukturen. Caspase-3 ist dabei ein zentrales Enzym in der Apoptose und gilt als eine der wichtigsten Effektor-Caspasen. Sie wird als inaktives Proenzym (Pro-Caspase 3) synthetisiert und durch andere Caspasen, insbesondere Caspase 8 oder Caspase 9, in ihre aktive Form gespalten. Nach der Aktivierung zerschneidet Caspase 3 spezifische zelluläre Proteine und leitet die strukturelle Demontage der Zelle ein, was letztlich zum geordneten Zelltod führt.^[186] E-ROC und Custodiol zeigen keinen Einfluss auf die Caspase 3-Bildung und lösen somit keine Apoptose aus. Hypoxie kann durch die Anwesenheit von HIF-1 Apoptose initiieren. Dafür induziert HIF-1 hohe Konzentrationen von proapoptotischen Proteinen wie z.B. BNIP3 (*BCL2 interacting protein 3*) oder stabilisiert den Transkriptionsfaktor p53.^[187] Anhand der Kontrollproben HOX und der HOX 4+4h Proben lässt sich feststellen, dass die Caspase 3-Bildung nicht durch Hypoxie beeinflusst wurde, da alle Messwerte nicht signifikant unterschiedlich waren. Diese Beobachtung ist kongruent zu den Analysen von Ambrose *et al.*, die eine signifikante Zunahme der Caspase 3-Proteinkonzentration erst nach 48 h Hypoxie zeigen konnten.^[188] Hier ist jedoch zu erwähnen, dass die Verwendung von E-ROC keine Apoptose auslöste und somit zusätzlich zu den LDH-Analysen ein weiterer Beweis für die nicht toxische Wirkung der E-ROC ist.

Als zentraler Energieträger im menschlichen Organismus gilt ATP, welches zu 90 % in den Mitochondrien der Zellen gebildet wird. Durch Hydrolyse der Phosphatgruppen und Bildung von Adenosindiphosphat (ADP) wird unter physiologischen Bedingungen -50 kJ/Mol Energie frei. Pro Tag bildet ein erwachsener Mensch bis zu 100 kg ATP, wobei die Menge an gleichzeitig vorliegendem ATP 50 g beträgt. Zur Produktion des ATPs wird ADP und ein Phosphat in die Reaktionskammern der mitochondrialen Innenmembran eingeschleust und dort oxidativ phosphoryliert.^[189] Somit ist die Änderung der ATP-Konzentration ein direkter Marker für die metabolische Aktivität der Zellen, da ohne Aktivität das vorhandene ATP verbraucht wird und kein neues produziert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die achtstündigen Hypoxieproben (HOX 4+4h) einen Verlust der metabolischen Aktivität aufweisen, da die Menge an vorhandenem ATP signifikant niedriger war als bei allen anderen Proben.

5. Diskussion

Die aerobe ATP-Bildung ist 10-mal ergiebiger als die anaerobe Bildung von ATP.^[190] Aus diesem Grund nimmt die Menge an produzierten ATP mit sinkender Sauerstoffkonzentration ab. Unter hypoxischen Bedingungen ist die Cytochrom C-Oxidase-Aktivität (COX) nicht gehemmt, was eine grundlegende ATP-Bildung gewährleisten soll.^[191] Zellulär ist die ATP-Nachfrage unter Hypoxie mit der Bildung von ROS verbunden. Um eine Überproduktion von ROS zu verhindern und gleichzeitig den Sauerstoffverbrauch zu senken, wird die Nachfrage nach ATP reduziert, was zu einem Verlust der vollständigen Zellfunktion und nach einer längeren Hypoxiezeit zum Zelltod führt.^[192] Wird der Stoffwechsel durch Zugabe von präoxygenierten Lösungen (Custodiol und E-ROC) nach vierstündiger Hypoxie von anaerob zu aerob gewechselt, so wird die ATP-Produktion kompensatorisch gesteigert. Die sehr geringe sichtbare Steigerung der ATP-Bildung im Vergleich zwischen Hypoxie und Reoxygenierung konnte auch Takeo und Sakanashi zeigen, welche den mitochondrialen Stoffwechsel von Hasenherzen während einer hypoxischen und reoxygenierten Perfusion untersuchten.^[193] Anders als erwartet, ist die ATP-Konzentration unter Normoxie geringer als in den Hypoxieproben und den Reoxygenierungsproben. Dieser Zusammenhang konnte bis jetzt nicht geklärt werden.

Gekoppelt an die ATP-Produktion ist die Glukoseaufnahme ein zentraler Parameter für die metabolische Aktivität und kann ein wichtiger Faktor für die Unterscheidung zwischen anaeroben und aeroben Stoffwechsel sein. Wie zuvor beschrieben reagieren Zellen auf Hypoxie durch Bildung des aktiven Transkriptionsfaktors HIF. Dieser aktive Transkriptionsfaktor reguliert viele Gene, unter anderem das Gen für die Expression des Glukosetransporters 1 (GLUT1).^[194] Dieser sorgt für die Insulin-unabhängige Glukoseaufnahme in Zellen, was zu einer höheren intrazellulären Konzentration von Glukose führt.^[195] Somit kompensiert die Zelle den Sauerstoffmangel durch Erhöhung der intrazellulären Glukoseaufnahme, wobei sich die extrazelluläre Glukosekonzentration gleichzeitig reduzieren muss. Dieser Effekt konnte schon in kultivierten HL-1 Zellen unter Hypoxie gezeigt werden.^[188] Der gleiche Effekt ist in diesem Versuch ebenfalls zu sehen, da die vierstündige Hypoxie-Probe (HOX) den signifikant höchsten Wert aufwies und alle reoxygenierten Proben eine geringere Glukoseaufnahme zeigten. Während der Reoxygenierung mit E-ROC und Custodiol änderte sich innerhalb der Gruppen die Menge an aufgenommener Glukose nicht, wobei nach 4 h die Menge an aufgenommener Glukose in den Custodiol-Proben signifikant höher war als in den E-ROC-Proben. Komplementär zu den LDH-Daten

5. Diskussion

zeigt sich hier die bessere Sauerstofflangzeitversorgung der E-ROC, da die Zellen der Custodiol-Proben eine höhere Glukoseaufnahme nach 4 h der Reoxygenierung benötigen als die E-ROC-Proben.

Ein weiterer Parameter zur Einschätzung der metabolischen Zellaktivität war die Analyse der ROS-Produktion. Ein moderates Maß an ROS ist für verschiedene zelluläre Reaktionen, die für die normale Funktion der Zellen erforderlich sind, von entscheidender Bedeutung. Jedoch ist die Überproduktion ein pathologischer Vorgang und führt zur Schädigung von biologischen Molekülen, wie Proteinen, Phospholipiden, DNA und RNA. Ein Grund für die Überproduktion der ROS liegt im Zellstress, ausgelöst durch beispielsweise Hypoxie-Reoxygenierungs-Schäden.^[196] Der Anstieg an gebildetem ROS durch reine Hypoxie und die noch höhere ROS-Produktion nach Reoxygenierung der hypoxischen Zellen, konnte schon bei der Reoxygenierung von menschlichen Leberzellen gezeigt werden.^[197] Der Anstieg der ROS-Produktion nach Reoxygenierung konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Reoxygenierung der Zellen durch Custodiol und E-ROC führte zu einer Reduktion der ROS-Konzentration. Die Reduktion von Reoxygenierungsschäden bei der Verwendung von PFCOC und bei präoxygenierten Medien, beispielsweise induziert durch erhöhter ROS-Produktion, steht im Einklang mit der Literatur und konnte dort bereits nachgewiesen werden.^[146] Es zeigte sich in beiden Proben ein erneuter Anstieg der ROS-Produktion bis zu einem signifikanten Unterschied nach 4 h, wobei die Zunahme in den Custodiol-Proben größer war. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme einer besseren Sauerstoffversorgung der Zellen über einen längeren Zeitraum, da die größere Zunahme der ROS-Produktion in den Custodiol-Proben für eine schnellere Rückkehr der hypoxischen Bedingungen spricht.^[197]

Die durchgeführten Analysen zeigen viele Indizien für eine verbesserte Langzeitsauerstoffversorgung von Kardiomyozyten nach induzierter Hypoxie. Vor allem die Beobachtungen der LDH-, Glukoseaufnahme- und ROS-Analysen zeigten einen Unterschied in der Verwendung der reinen kardioplegen Lösungen und der E-ROC. Diese Analysen bilden die Grundlage für eine umfangreiche Untersuchung der Wirkungsweise der E-ROC in Tierexperimenten, in denen realistischere Bedingungen vorliegen und die Anzahl an Zellen höher ist, was zu einer Verstärkung der Effekte führen kann.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Modifikation und Optimierung der schon etablierten A-AOC hinsichtlich ihrer Stabilität bei Lagerung und Anwendung. Vor allem sollte die Kompatibilität mit einem breiteren Spektrum von klinisch relevanten kristalloiden und kolloidalen Lösungen ermöglicht werden. Zusätzlich sollte ein Mechanismus zur Verlängerung der Sauerstofffreisetzung entwickelt werden, um eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung während einer Kardioplegie zu realisieren.

In dieser Arbeit wurden die A-AOC mit Lecithin als zusätzlicher Emulgator modifiziert. Das Resultat waren die Lecithin-modifizierten nanoskalierten Sauerstoffträger (LENOX), bei denen eine Mischhülle aus den beiden Emulgatoren Albumin und Lecithin postuliert wurde. Die Verwendung von humanem Albumin aus klinischen Fertiglösungen führte zu instabilen Emulsionen, sodass der verbesserte Syntheseprozess mit dem Namen LENOX optimiert für Humanalbumin (LENOX OFH) entwickelt wurde. Beide LENOX-Produkte zeigten größere Partikeldurchmesser im Vergleich zu der Lecithin-freien Vergleichsemulsion. Die maximalen Partikeldurchmesser waren jedoch deutlich kleiner als 500 nm. Des Weiteren konnte das Zeta-Potential signifikant verstärkt werden, ohne dabei die Sauerstofffreisetzung zu reduzieren. Zusätzlich konnte das Fließverhalten von einem scherverdünnenden zu einem fast vollständig newtonschen Verhalten verbessert werden. Die LENOX basic ließen sich bis zu 42 Tage flüssig bei 4 °C lagern und zeigten weder einen Funktionsverlust noch eine signifikante Änderung der Partikelgröße nach dem anfänglichen *annealing* in den ersten sieben Tagen. Die LENOX OFH verhielten sich über einen Zeitraum von 21 Tagen äquivalent zu den LENOX basic und zeigten danach ein instabileres Verhalten, was sich ebenfalls in einer Abnahme der Funktionalität zeigte.

Die Modifikation mit Lecithin führte zu einer erheblichen Verbesserung der Stabilität in verschiedenen kristalloiden und kolloidalen Lösungen, was eine bessere Anwendbarkeit der LENOX *in vitro* und *in vivo* ermöglicht. Die LENOX basic konnten in einer schematischen normothermen Maschinenperfusion ohne Organ ihre Stabilität und Funktionalität über einen Zeitraum von 4 h in Wasser, Custodiol und STEEN Solution aufrechterhalten. Somit können sie wie ihre Vorgänger in einer Maschinenperfusion eingesetzt werden.

6. Zusammenfassung

Durch eine weitere Modifikation wurde die Dauer der rein physikalischen Sauerstofffreisetzung mehr als verdoppelt. Die neu entwickelten *extended-release oxygen carrier* (E-ROC) bestanden dabei aus einer Mischung von präoxygenierten und nicht-präoxygenierten LENOX basic in Custodiol. Zellkulturversuche mit Kardiomyozyten wiesen eine reduzierte HIF-1 α -Expression, eine verminderte LDH-Freisetzung, eine reduzierte Glukoseaufnahme und auch eine verringerte ROS-Bildung auf, was eine gute Sauerstoffversorgung durch die Verwendung der E-ROC im Vergleich zu der aktuell klinisch verwendeten Custodiol-Lösung ohne AOC zeigte.

Zukünftig sollen die verschiedenen Neuentwicklungen in Tiermodellen angewendet werden. Unter anderem sollen LENOX basic und LENOX OFH in einer allgemeinen Verträglichkeitsstudie im Kleintier getestet werden. Darauf aufbauend kann LENOX in der Maschinenperfusion von isolierten Organen verwendet werden. Aktuell werden schon Experimente mit LENOX im Langendorff-Herz durchgeführt. Für die E-ROC sind Tierversuche im Kleintiermodell geplant, wobei untersucht werden soll, ob sich das verlängerte Sauerstofffreisetzungsprofil aus der Zellkultur auf das isolierte Organ übertragen werden kann.

7. Literatur

- [1] B. Zeppenfeld, Statista, *Ranking der schnellsten Sprinter über 100 Meter von 1900 bis 2024*. **2024**.
<https://de.statista.com/statistik/daten/studie/1312180/umfrage/schnellste-sprinter-100-meter/>, [abgerufen am 28.06.2024].
- [2] Eurosport, *Olympia 2021: Gewichtheber Lasha Talachadse schreibt Geschichte - Mit Dreifachem Weltrekord zu Gold*. **2021**.
https://www.eurosport.de/gewichtheben/olympia-gewichtheben/2021/olympia-2021-gewichtheber-lasha-talachadse-schreibt-geschichte-mit-dreifachem-weltrekord-zu-gold_vid1521456/video.shtml, [abgerufen am 28.06.2024].
- [3] S. Würz, Eurosport, *Kein Tag wie jeder andere: Kubaner Javier Sotomayor springt Hochsprung-Weltrekord _ Marke von 1989 steht weiterhin*. **2024**.
https://www.eurosport.de/alle-sportarten/special/2024/kein-tag-wie-jeder-andere-javier-sotomayor-springt-hochsprung-weltrekord_sto10045929/story.shtml, [abgerufen am 28.06.2024].
- [4] H. Ehmke, Kapitel: *Atmung*, aus *Duale Reihe Physiologie*. 4. Auflage, Behrends, et al., Editoren. **2021**, Georg Thieme Verlag KG. S. 233-272.
- [5] A. Kurtz, Kapitel: *Störungen der Sauerstoffversorgung: Hypoxie*, aus *Physiologie*. 9. Auflage, Pape, Kurtz, and Silbernagl, Editoren. **2019**, Georg Thieme Verlag KG. S. 361-365.
- [6] S. Höchel, Südkurier, *Rekord im Apnoetauchen: Welche Menschen können am längsten die Luft anhalten?* **2023**.
<https://www.suedkurier.de/ueberregional/panorama/rekorde/rekord-im-apnoetauchen-welche-menschen-koennen-am-laengsten-die-luft-anhalten;art1373672,11718319>, [abgerufen am 28.06.2024].
- [7] K.B. Ferenz, A.U. Steinbicker, *Artificial Oxygen Carriers—Past, Present, and Future—a Review of the Most Innovative and Clinically Relevant Concepts*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2019**. 369(2): S. 300-310.
- [8] J.S. Jahr, N.R. Guinn, D.R. Lowery, L. Shore-Lesserson, A. Shander, *Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics: A Review*. *Anesthesia & Analgesia* **2021**. 132(1): S. 119-129.
- [9] J. Varney, A. Rivera, V. Dong, P. Tieu, S. Zia, N.T. Huy, *Mini-review on the properties and possible applications of therapeutic oxygen carrier Hemarina-M101*. *Transfusion and Apheresis Science* **2021**. 60(1): S. 1-4.

7. Literatur

- [10] A. Wrobeln, J. Laudien, C. Groß-Heitfeld, J. Linders, C. Mayer, B. Wilde, T. Knoll, D. Naglav, M. Kirsch, K.B. Ferenz, *Albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers: A physico-chemical characterization and first in vivo evaluation of biocompatibility*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **2017**. 115: S. 52-64.
- [11] S.M. Lipatow, Kapitel: *Definition und Bedeutung der Lehre von den Kolloiden*, aus *Physikalische Chemie der Kolloide*. 1. Auflage. **1954**, De Gruyter: Berlin, Boston. S. 1-2.
- [12] G.J. Lauth, J. Kowalczyk, Kapitel: *Einführung*, aus *Einführung in die Physik und Chemie der Grenzflächen und Kolloide*. 1. Auflage. **2016**, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. S. 3-11.
- [13] S.M. Lipatow, Kapitel: *Die Grundnomenklatur. Zwei Perioden in der Entwicklung der Lehre von den Kolloiden* aus *Physikalische Chemie der Kolloide*. 1. Auflage. **1953**, De Gruyter: Berlin, Boston. S. 3-5.
- [14] A.V. Hirner, H. Rehage, M. Sulkowski, Kapitel: *Kolloidale Systeme in der Umwelt*, aus *Umweltgeochemie: Herkunft, Mobilität und Analyse von Schadstoffen in der Pedosphäre*. 1. Auflage. **2000**, Steinkopff: Heidelberg. S. 461-545.
- [15] T.F. Tadros, Kapitel: *General introduction*, aus *Formulation Science and Technology*. 1. Auflage. **2018**, De Gruyter: Berlin/Boston. S. 1-58.
- [16] T.F. Tadros, Kapitel: *Emulsionen - Herstellung, Stabilität, Anwendung in der Industrie*, aus *Emulsionen*. 1. Auflage. **2023**, De Gruyter: Berlin. S. 1-9.
- [17] L. Figura, Kapitel: *Grenzflächen*, aus *Lebensmittelphysik: Physikalische Kenngrößen - Messung und Anwendung*. 2. Auflage. **2021**, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. S. 241-278.
- [18] G.J. Lauth, J. Kowalczyk, Kapitel: *Grenzflächenerscheinungen an flüssigen Phasengrenzen*, aus *Einführung in die Physik und Chemie der Grenzflächen und Kolloide*. 1. Auflage. **2016**, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. S. 53-89.
- [19] G. Meichsner, T. Mezger, J. Schröder, Kapitel: *Grenzflächen*, aus *Lackeigenschaften messen und steuern*. 2. Auflage. **2016**, Vincentz Network: Hannover, Germany. S. 89-122.
- [20] K. Stierstadt, W.T. Hering, T. Dorfmueller, Kapitel: *Grenzflächen von Flüssigkeiten*, aus *Band 1 Mechanik, Relativität, Wärme*. 11. Auflage. **2020**, De Gruyter: Berlin, Boston. S. 444-476.

7. Literatur

- [21] T.F. Tadros, Kapitel: *General Principles of Colloid Stability and the Role of Surface Forces*, aus *Colloid Stability*. 1. Auflage. **2010**. S. 1-22.
- [22] T.F. Tadros, Kapitel: *Theory of colloid stability*, aus *Basic Principles of Interface Science and Colloid Stability*. 1. Auflage. **2018**, De Gruyter: Berlin, Boston. S. 97-116.
- [23] L.L. Schramm, Kapitel: *Colloid Stability*, aus *Emulsions, Foams, and Suspensions*. 1. Auflage. **2005**, Wiley-VCH Verlag. S. 117-154.
- [24] J. Lyklema, Kapitel: *Electric Double Layers*, aus *Fundamentals of Interface and Colloid Science*. 2. Auflage, Lyklema, Editor. **1995**, Academic Press. S. 3.1-3.232.
- [25] T.F. Tadros, Kapitel: *Interaction forces between emulsion droplets*, aus *Emulsions*. 1. Auflage. **2016**, De Gruyter: Berlin, Boston. S. 15-28.
- [26] G.J. Lauth, J. Kowalczyk, Kapitel: *Stabilität von Suspensionen*, aus *Einführung in die Physik und Chemie der Grenzflächen und Kolloide*. 1. Auflage. **2016**, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. S. 285-330.
- [27] A.H. Nour, *Emulsion types, stability mechanisms and rheology: A review*. International Journal of Innovative Research and Scientific Studies (IJIRSS) **2018**. 1(1): S. 14-21.
- [28] M. Schuberth, *Kolloidstabilität auf Grund elektrostatischer Wechselwirkungen*. **2017**.
<https://daten.didaktikchemie.uni-bayreuth.de/umat/kolloidestabilitaet/archiv/kolloidstabiliaet.htm>, [abgerufen am 06.02.2024].
- [29] G. Fleer, M.C. Stuart, F. Leermakers, Kapitel: *Effect of Polymers on the Interaction between Colloidal Particles*, aus *Fundamentals of Interface and Colloid Science*. 5. Auflage, Lyklema, Editor. **2005**, Academic Press. S. 1.1-1.94.
- [30] S.M. Lipatow, Kapitel: *Sedimentation*, aus *Physikalische Chemie der Kolloide*. 1. Auflage. **1953**, De Gruyter: Berlin, Boston. S. 3-5.
- [31] R. Pal, *Modeling of Sedimentation and Creaming in Suspensions and Pickering Emulsions*. Fluids **2019**. 4(4): S. 186.
- [32] T.F. Tadros, Kapitel: *Creaming/sedimentation of emulsions and its prevention*, aus *Emulsions*. 1. Auflage. **2016**, De Gruyter: Berlin, Boston. S. 95-112.

7. Literatur

- [33] T.F. Tadros, Kapitel: *Sedimentation of suspensions, creaming of emulsions and their prevention*, aus *Volume 1 Basic Theory of Interfacial Phenomena and Colloid Stability*. 1. Auflage. **2018**, De Gruyter: Berlin, Boston. S. 325-352.
- [34] E. Dickinson, *Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**. 81(1): S. 130-140.
- [35] T.F. Tadros, Kapitel: *Flocculation of dispersions*, aus *Volume 1 Basic Theory of Interfacial Phenomena and Colloid Stability*. 1. Auflage. **2018**, De Gruyter: Berlin, Boston. S. 253-272.
- [36] T.F. Tadros, Kapitel: *Emulsion coalescence and its prevention*, aus *Volume 1 Basic Theory of Interfacial Phenomena and Colloid Stability*. 1. Auflage. **2018**, De Gruyter: Berlin, Boston. S. 293-312.
- [37] D. Langevin, *Coalescence in foams and emulsions: Similarities and differences*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2019**. 44: S. 23-31.
- [38] J. Eggers, J.R. Lister, H.A. Stone, *Coalescence of liquid drops*. *Journal of Fluid Mechanics* **1999**. 401: S. 293-310.
- [39] C.K. Law, J. Qian, *Regimes of coalescence and separation in droplet collision*. *Journal of Fluid Mechanics* **1997**. 331: S. 59-80.
- [40] N. Ashgriz, J.Y. Poo, *Coalescence and separation in binary collisions of liquid drops*. *Journal of Fluid Mechanics* **1990**. 221: S. 183-204.
- [41] D.J. McClements, S.M. Jafari, *Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review*. *Advances in Colloid and Interface Science* **2018**. 251: S. 55-79.
- [42] T.F. Tadros, Kapitel: *Ostwald ripening in dispersions and its prevention*, aus *Volume 1 Basic Theory of Interfacial Phenomena and Colloid Stability*. 1. Auflage. **2018**, De Gruyter: Berlin, Boston. S. 273-292.
- [43] P. Taylor, *Ostwald ripening in emulsions*. *Advances in Colloid and Interface Science* **1998**. 75(2): S. 107-163.
- [44] M.Y. Koroleva, E.V. Yurtov, *Ostwald ripening in macro-and nanoemulsions*. *Russian Chemical Reviews* **2021**. 90(3): S. 293.
- [45] I.V. Alexandrova, D.V. Alexandrov, E.V. Makoveeva, *Ostwald ripening in the presence of simultaneous occurrence of various mass transfer mechanisms: an*

7. Literatur

- extension of the Lifshitz–Slyozov theory*. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences **2021**. 379(2205): S. 1-13.
- [46] Y. Dong, D. Zhang, D. Li, H. Jia, W. Qin, *Control of Ostwald ripening*. Science China Materials **2023**. 66(3): S. 1249-1255.
- [47] M. Gmelch, S. Reineke, Kapitel: *Im Wasser wird's bunt: Licht, Brechung und Farben*, aus *Durchblick in Optik: Mit Phänomenen, Formeln und Fragen zum Verständnis*. 1. Auflage. **2019**, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. S. 1-40.
- [48] S.M. Lipatow, Kapitel: *Optische Eigenschaften Kolloidaler Systeme*, aus *Physikalische Chemie der Kolloide*. 1. Auflage. **1953**, De Gruyter: Berlin, Boston. S. 13-23.
- [49] W.J. Moore, Kapitel: *Kolloidchemie, Makromolekeln*, aus *Physikalische Chemie*. 4. Auflage. **2011**, De Gruyter: Berlin, New York. S. 1136-1187.
- [50] A.G. Alkholidi, Kapitel: *Free Space Optical Communications - Theory and Practices*, aus *Contemporary Issues in Wireless Communications*. 7. Auflage, Khatib, Editor. **2014**, IntechOpen. S. 159-212.
- [51] G. Lagaly, O. Schulz, R. Zimehl, Kapitel: *Teilchengröße*, aus *Dispersionen und Emulsionen: Eine Einführung in die Kolloidik feinverteilter Stoffe einschließlich der Tonminerale*. 1. Auflage. **1997**, Steinkopff: Heidelberg. S. 279-318.
- [52] M. Haruta, *When Gold Is Not Noble: Catalysis by Nanoparticles*. The Chemical Record **2003**. 3(2): S. 75-87.
- [53] T.F. Tadros, Kapitel: *Adsorption von Tensiden an der Öl/Wasser-Grenzfläche*, aus *Emulsionen*. 1. Auflage. **2023**, De Gruyter: Berlin, Boston. S. 30-48.
- [54] C. Chung, D.J. McClements, Kapitel: *Characterization of Physicochemical Properties of Nanoemulsions: Appearance, Stability, and Rheology*, aus *Nanoemulsions*. 1. Auflage, Jafari and McClements, Editoren. **2018**, Academic Press. S. 547-576.
- [55] A. Eucken, Kapitel: *Viskosität*, aus *Handbuch der Arbeitsmethoden in der anorganischen Chemie*. 3. Auflage, Arthur, Editor. **1913**, De Gruyter: Berlin, Boston. S. 546-564.
- [56] S.R. Derkach, *Rheology of emulsions*. Advances in Colloid and Interface Science **2009**. 151(1): S. 1-23.

7. Literatur

- [57] Z. Zhang, D.J. McClements, Kapitel: *Overview of Nanoemulsion Properties: Stability, Rheology, and Appearance*, aus *Nanoemulsions*. 1. Auflage, Jafari and McClements, Editoren. **2018**, Academic Press. S. 21-49.
- [58] R. Pal, *Effect of droplet size on the rheology of emulsions*. *AIChE Journal* **1996**. 42(11): S. 3181-3190.
- [59] L.C. Clark, F. Gollan, *Survival of Mammals Breathing Organic Liquids Equilibrated with Oxygen at Atmospheric Pressure*. *Science* **1966**. 152(3730): S. 1755-1756.
- [60] E. Riedel, C. Janiak, *Anorganische Chemie*. 10. Auflage. **2011**, Berlin, New York: De Gruyter.
- [61] J.G. Riess, *Understanding the Fundamentals of Perfluorocarbons and Perfluorocarbon Emulsions Relevant to In Vivo Oxygen Delivery*. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* **2005**. 33(1): S. 47-63.
- [62] J. Behrends, J. Bischofberger, R. Deutzmann, H. Ehmke, S. Frings, S. Grissmer, M. Hoth, A. Kurtz, J. Leipziger, F. Müller, C. Pedain, J. Rettig, C. Wagner, E. Wischmeyer, Kapitel: *Blut*, aus *Duale Reihe Physiologie*. 3. Auflage. **2017**, Thieme: Stuttgart. S. 173-198.
- [63] J.G. Riess, *Perfluorocarbon-based Oxygen Delivery*. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* **2006**. 34(6): S. 567-580.
- [64] B.P. Fuhrman, P.R. Paczan, M. Defrancis, *Perfluorocarbon-associated gas exchange*. *Critical Care Medicine* **1991**. 19(5): S. 712-722.
- [65] T.C. Fabian, *Perfluorocarbons*. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* **2011**. 70(5): S. S42-S44.
- [66] M.A. Miller, E.M. Sletten, *Perfluorocarbons in Chemical Biology*. *ChemBioChem* **2020**. 21(24): S. 3451-3462.
- [67] J.A. Gladysz, C. Emnet, Kapitel: *Fluorous Solvents and Related Media*, aus *Handbook of Fluorous Chemistry*. 1. Auflage, John A. Gladysz, Dennis P. Curran, and Horváth, Editoren. **2004**, Wiley-VCH: Weinheim. S. 11-23.
- [68] J.G. Weers, *A physicochemical evaluation of perfluorochemicals for oxygen transport applications*. *Journal of Fluorine Chemistry* **1993**. 64(1): S. 73-93.

7. Literatur

- [69] W. Clayton, Kapitel: *Emulsionen und Emulgatoren*, aus *Die Theorie der Emulsionen und der Emulgierung*. 1. Auflage. **1924**, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. S. 1-11.
- [70] L. Figura, Kapitel: *Wasseraktivität und Sorptionsisothermen*, aus *Lebensmittelphysik: Physikalische Kenngrößen - Messung und Anwendung*. 2. Auflage. **2021**, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. S. 1-54.
- [71] B. Bergenstahl, Kapitel: *Physicochemical Aspects of an Emulsifier Functionality*, aus *Food Emulsifiers and Their Applications: Second Edition*. 2. Auflage. **2008**, Springer Verlag. S. 173-194.
- [72] A.L.R. Costa, A. Gomes, C.C.P.d. Andrade, R.L. Cunha, *Emulsifier functionality and process engineering: Progress and challenges*. *Food Hydrocolloids* **2017**. 68: S. 69-80.
- [73] T.F. Tadros, Kapitel: *Auswahl der Emulgatoren*, aus *Emulsionen*. 1. Auflage. **2023**, De Gruyter: Berlin, Boston. S. 76-99.
- [74] S. Cox, A. Sandall, L. Smith, M. Rossi, K. Whelan, *Food additive emulsifiers: a review of their role in foods, legislation and classifications, presence in food supply, dietary exposure, and safety assessment*. *Nutrition Reviews* **2020**. 79(6): S. 726-741.
- [75] E. Dickinson, Kapitel: *Protein-Stabilized Emulsions*, aus *Water in Foods*. 1. Auflage, Fito, Mulet, and McKenna, Editoren. **1994**, Pergamon: Amsterdam. S. 59-74.
- [76] M. Postel, P. Chang, J.-P. Rolland, M.-P. Krafft, J.G. Riess, *Fluorocarbon/lecithin emulsions: identification of EYP-coated fluorocarbon droplets and fluorocarbon-empty vesicles by freeze-fracture electron microscopy*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1991**. 1086(1): S. 95-98.
- [77] J. Rassow, Kapitel: *Die Proteine des Blutserums*, aus *Duale Reihe Biochemie*. 5. Auflage, Rassow, Netzker, and Hauser, Editoren. **2022**, Georg Thieme Verlag KG. S. 792.
- [78] M. Hoth, E. Wischmeyer, Kapitel: *Blutplasma*, aus *Duale Reihe Physiologie*. 4. Auflage, Behrends, et al., Editoren. **2021**, Georg Thieme Verlag KG. S. 186-189.
- [79] A. Wrobeln, K.D. Schlüter, J. Linders, M. Zähres, C. Mayer, M. Kirsch, K.B. Ferenz, *Functionality of albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers in the Langendorff-heart*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2017**. 45(4): S. 723-730.

7. Literatur

- [80] A. Wrobeln, J. Jägers, T. Quinting, T. Schreiber, M. Kirsch, J. Fandrey, K.B. Ferenz, *Albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers can avoid hypoxic tissue damage in massive hemodilution*. Scientific Reports **2020**. 10(1): S. 11950.
- [81] BfArM. *Zulassung Humanalbumin als Alburnorm 5%*. **2009**, <https://portal.dimdi.de/amguifree/am/docoutput/jpadocdisplay.xhtml>, [abgerufen am 02.03.2024]
- [82] M. Nejatian, S. Abbasi, Kapitel: *Application of bio-based emulsifiers in the formulation of food-grade nanoemulsions*, aus *Bio-Based Nanoemulsions for Agri-Food Applications*. 1. Auflage, Abd-El Salam and Murugan, Editoren. **2022**, Elsevier. S. 311-327.
- [83] M. Winterer, H. Hahn, *Chemical vapor synthesis of nanocrystalline powders*. Nanoceramics by Chemical Vapor Synthesis **2003**. 94: S. 1084-1090.
- [84] A.R. Ingole, S.R. Thakare, N. Khati, A.V. Wankhade, D. Burghate, *Green synthesis of selenium nanoparticles under ambient condition*. Chalcogenide Lett **2010**. 7(7): S. 485-489.
- [85] N. Abid, A.M. Khan, S. Shujait, K. Chaudhary, M. Ikram, M. Imran, J. Haider, M. Khan, Q. Khan, M. Maqbool, *Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review*. Advances in Colloid and Interface Science **2022**. 300: S. 1-18.
- [86] S. Kumari, S. Raturi, S. Kulshrestha, K. Chauhan, S. Dhingra, K. Andrés, K. Thu, R. Khargotra, T. Singh, *A comprehensive review on various techniques used for synthesizing nanoparticles*. Journal of Materials Research and Technology **2023**. 27: S. 1739-1763.
- [87] R. Chokkareddy, N. Thondavada, B. Kabane, G.G. Redhi, Kapitel: *Current advances in biosynthesis of silver nanoparticles and their applications*, aus *Green metal nanoparticles: synthesis, characterization and their applications*. 1. Auflage, Martin Scrivener and Carmical, Editoren. **2018**, Scrivener Publishing: Massachusetts. S. 165-198.
- [88] H.-J. Kim, K.-J. Kim, D.-S. Kwak, *A case study on modeling and optimizing photolithography stage of semiconductor fabrication process*. Quality and Reliability Engineering International **2010**. 26(7): S. 765-774.
- [89] N. Xia, T.P. Hunt, B.T. Mayers, E. Alsberg, G.M. Whitesides, R.M. Westervelt, D.E. Ingber, *Combined microfluidic-micromagnetic separation of living cells in continuous flow*. Biomedical Microdevices **2006**. 8(4): S. 299-308.

7. Literatur

- [90] S. Schultz, G. Wagner, J. Ulrich, *Hochdruckhomogenisation als ein Verfahren zur Emulsionsherstellung*. Chemie Ingenieur Technik **2002**. 74(7): S. 901-909.
- [91] P. Paquin, *Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides*. International Dairy Journal **1999**. 9(3): S. 329-335.
- [92] Microfluidics, *Funktionsprinzip*. <https://www.microfluidics-mpt.com/de-de/microfluidics-technology/how-it-works?hsCtaTracking=44a46c40-56a9-48ac-8418-f113faa2f5a5%7Cce1f05eb-6fc2-4908-bddf-3ecb8da524bd>, [abgerufen am 25.04.2024].
- [93] P. Kiefer, A. Treiber, *Prall und Stoß als Zerkleinerungsmechanismen bei der Hochdruck-Homogenisation von O/W-Emulsionen*. Chemie Ingenieur Technik **1975**. 47(13): S. 573-573.
- [94] M. Stang, H. Schubert, *Zerkleinern und Stabilisieren von Tropfen beim Emulgieren*. Chemie Ingenieur Technik **1998**. 70(9): S. 1069-1070.
- [95] M. Heindl, Dissertation mit dem Thema: *Einfluss von Dehnströmung auf die Morphologieausbildung von Polymerblends*. Technische Fakultät, Universität Erlangen-Nürnberg, **2005**.
- [96] L. Rayleigh, XVI. *On the instability of a cylinder of viscous liquid under capillary force*. The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science **1892**. 34(207): S. 145-154.
- [97] S. Tomotika, G.I. Taylor, *On the instability of a cylindrical thread of a viscous liquid surrounded by another viscous fluid*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A - Mathematical and Physical Sciences **1935**. 150(870): S. 322-337.
- [98] H.P. Grace, *Dispersion phenomena in high viscosity immiscible fluid systems and application of static mixers as dispersion devices in such systems*. Chemical Engineering Communications **1982**. 14(3-6): S. 225-277.
- [99] Y. Renardy, *The effects of confinement and inertia on the production of droplets*. Rheologica Acta **2007**. 46(4): S. 521-529.
- [100] R. Borsali, Kapitel: *Basic Scattering Theory - Interference*, aus *Soft matter characterization : with 38 tables*. 1. Auflage, Redouane Borsali and Pecora, Editoren. **2008**, Springer: New York. S. 3-7.

7. Literatur

- [101] P.A. Hassan, S. Rana, G. Verma, *Making Sense of Brownian Motion: Colloid Characterization by Dynamic Light Scattering*. Langmuir **2015**. 31(1): S. 3-12.
- [102] R. Borsali, Kapitel: *Macromolecular and Colloidal Dispersions*, aus *Soft matter characterization : with 38 tables*. 1. Auflage, Redouane Borsali and Pecora, Editoren. **2008**, Springer: New York. S. 35-37.
- [103] K. Clark, N. Wardrobe-Wong, J. Elliott, P. Gill, N. Tait, P. Snashall, *Cigarette smoke inhalation and lung damage in smoking volunteers*. European Respiratory Journal **1998**. 12(2): S. 395-399.
- [104] M.A. Zoroddu, S. Medici, A. Ledda, V.M. Nurchi, J.I. Lachowicz, M. Peana, *Toxicity of nanoparticles*. Curr. Med. Chem **2014**. 21(33): S. 3837-3853.
- [105] A.B. Sengul, E. Asmatulu, *Toxicity of metal and metal oxide nanoparticles: a review*. Environmental Chemistry Letters **2020**. 18(5): S. 1659-1683.
- [106] J. Khalili Fard, S. Jafari, M.A. Eghbal, *A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles*. Adv Pharm Bull **2015**. 5(4): S. 447-54.
- [107] M.M. Nachlas, S.I. Margulies, J.D. Goldberg, A.M. Seligman, *The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt*. Analytical Biochemistry **1960**. 1(4): S. 317-326.
- [108] T. Riss, A. Niles, R. Moravec, N. Karassina, J. Vidugiriene, *Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells*. 1. Auflage. **2004**: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD).
- [109] J.C. Stockert, A. Blázquez-Castro, M. Cañete, R.W. Horobin, Á. Villanueva, *MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets*. Acta Histochemica **2012**. 114(8): S. 785-796.
- [110] J. van Meerloo, G.J.L. Kaspers, J. Cloos, Kapitel: *Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay*, aus *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. 2. Auflage, Cree, Editor. **2011**, Humana Press: Totowa, NJ. S. 237-245.
- [111] S.P.M. Crouch, R. Kozlowski, K.J. Slater, J. Fletcher, *The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity*. Journal of Immunological Methods **1993**. 160(1): S. 81-88.
- [112] J. Jägers, A. Wrobeln, K.B. Ferenz, *Perfluorocarbon-based oxygen carriers: from physics to physiology*. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology **2021**. 473(2): S. 139-150.

7. Literatur

- [113] Z. Wang, X. Gong, J. Li, H. Wang, X. Xu, Y. Li, X. Sha, Z. Zhang, *Oxygen-Delivering Polyfluorocarbon Nanovehicles Improve Tumor Oxygenation and Potentiate Photodynamic-Mediated Antitumor Immunity*. ACS Nano **2021**. 15(3): S. 5405-5419.
- [114] C. Wittmann, P. Chockley, S.K. Singh, L. Pase, G.J. Lieschke, C. Grabher, *Hydrogen Peroxide in Inflammation: Messenger, Guide, and Assassin*. Advances in Hematology **2012**. 2012: S. 1-6.
- [115] M. Horie, Y. Tabei, *Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity*. Free Radical Research **2021**. 55(4): S. 331-342.
- [116] Promega, *ROS-Glo™ H₂O₂ Assay*. **2024**. https://www.promega.de/products/cell-health-assays/oxidative-stress-assays/ros_glo-h2o2-assay/?catNum=G8820, [abgerufen am 02.06.2024].
- [117] P.J. Ratcliffe, *HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia?* The Journal of clinical investigation **2007**. 117(4): S. 862-865.
- [118] Statistisches Bundesamt, *Todesursachenstatistik 2022*. **2022**. <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?sequenz=tabelleErgebnis&selectionname=23211-0002#abreadcrumb>, [abgerufen am 23.05.2024].
- [119] A. Faller, M. Schünke, G. Schünke, Kapitel: *Herz und Gefäßsystem*, aus *Der Körper des Menschen : Einführung in Bau und Funktion*. 17. Auflage. **2016**, Georg Thieme Verlag: Stuttgart ; New York. S. 356-405.
- [120] T. Doenst, H. Thiele, J. Haasenritter, T. Wahlers, S. Massberg, A. Haverich, *The Treatment of Coronary Artery Disease*. Dtsch Arztebl Int **2022**. 119(42): S. 716-723.
- [121] J. Bradić, M. Andjić, J. Novaković, N. Jeremić, V. Jakovljević, *Cardioplegia in Open Heart Surgery: Age Matters*. J Clin Med **2023**. 12(4): S. 1-17.
- [122] A. Francica, F. Tonelli, C. Rossetti, I. Tropea, G.B. Luciani, G. Faggian, G.P. Dobson, F. Onorati, *Cardioplegia between Evolution and Revolution: From Depolarized to Polarized Cardiac Arrest in Adult Cardiac Surgery*. J Clin Med **2021**. 10(19): S. 1-13.
- [123] D.J. Chambers, H.B. Fallouh, *Cardioplegia and cardiac surgery: Pharmacological arrest and cardioprotection during global ischemia and reperfusion*. Pharmacology & Therapeutics **2010**. 127(1): S. 41-52.

7. Literatur

- [124] M. Hoth, J. Rettig, Kapitel: *Grundlagen der Neurophysiologie*, aus *Duale Reihe Physiologie*. 4. Auflage, Behrends, et al., Editoren. **2021**, Georg Thieme Verlag KG. S. 33-64.
- [125] R.M. Bell, M.M. Mocanu, D.M. Yellon, *Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2011**. 50(6): S. 940-950.
- [126] Octapharma, *Albunorm 5 %: Gebrauchsinformation für Anwender*. **2023**
- [127] *Darstellung der Ergebnisse von Partikelgrößenanalysen - Teil 1: Grafische Darstellung (ISO 9276-1:1998)*. **2004**, Deutsches Institut für Normung. S. 13
- [128] *Darstellung der Ergebnisse von Partikelgrößenanalysen – Teil 2: Berechnung von mittleren Partikelgrößen/-durchmessern und Momenten aus Partikelgrößenverteilungen (ISO 9276-2:2014)*. **2018**, Deutsches Institut für Normung. S. 34
- [129] M.A. Panteleev, N. Korin, K.D. Reesink, D.L. Bark, J.M.E.M. Cosemans, E.E. Gardiner, P.H. Mangin, *Wall shear rates in human and mouse arteries: Standardization of hemodynamics for in vitro blood flow assays: Communication from the ISTH SSC subcommittee on biorheology*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2021**. 19(2): S. 588-595.
- [130] Promega, *CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay: Instructions for Use of Product*. Technisches Merkblatt **2016**: S. 1-20.
- [131] Y. Yuzefovych, E. Valdivia, S. Rong, F. Hack, T. Rother, J. Schmitz, J.H. Bräsen, D. Wedekind, C. Moers, N. Wenzel, F. Gueler, R. Blasczyk, C. Figueiredo, *Genetic Engineering of the Kidney to Permanently Silence MHC Transcripts During ex vivo Organ Perfusion*. *Frontiers in Immunology* **2020**. 11: S. 1-12.
- [132] W.C. Claycomb, N.A. Lanson, B.S. Stallworth, D.B. Egeland, J.B. Delcarpio, A. Bahinski, N.J. Izzo, *HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**. 95(6): S. 2979-2984.
- [133] J.M. Hughes, V.H. Vilchiz, C. Lee, *An Easy Approach to Understanding Acid-Base Balance in a Blood Buffer System*. *The American Biology Teacher* **2021**. 83(8): S. 526-531.
- [134] T. Rother, C. Horgby, K. Schmalkuche, J.M. Burgmann, F. Nocke, J. Jägers, J. Schmitz, J.H. Bräsen, M. Cantore, F. Zal, K.B. Ferenz, R. Blasczyk, C. Figueiredo, *Oxygen carriers affect kidney immunogenicity during ex-vivo machine perfusion*. *Frontiers in Transplantation* **2023**. 2: S. 1-13.

7. Literatur

- [135] D.J. McClements, Kapitel: *Food Emulsions in Practice*, aus *Food Emulsions*. 3. Auflage. **2015**, CRC Press. S. 547-575.
- [136] D.J. Burgess, J.K. Yoon, *Influence of interfacial properties on perfluorocarbon/aqueous emulsion stability*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1995**. 4(5): S. 297-308.
- [137] N. Mohanto, Y.-J. Park, J.-P. Jee, *Current perspectives of artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: a review of old to cutting-edge technologies using in vitro and in vivo assessments*. *Journal of Pharmaceutical Investigation* **2023**. 53(1): S. 153-190.
- [138] J.G. Riess, M. Postel, *Stability and Stabilization of Fluorocarbon Emulsions Destined for Injection*. *Biomaterials, Artificial Cells and Immobilization Biotechnology* **1992**. 20(2-4): S. 819-830.
- [139] M.P. Krafft, J.G. Riess, *Therapeutic oxygen delivery by perfluorocarbon-based colloids*. *Advances in Colloid and Interface Science* **2021**. 294: S. 1-41.
- [140] X. He, N. Xiang, J. Zhang, J. Zhou, Y. Fu, T. Gong, Z. Zhang, *Encapsulation of teniposide into albumin nanoparticles with greatly lowered toxicity and enhanced antitumor activity*. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**. 487(1): S. 250-259.
- [141] M. Anraku, Y. Tsurusaki, H. Watanabe, T. Maruyama, U. Kragh-Hansen, M. Otagiri, *Stabilizing mechanisms in commercial albumin preparations: octanoate and N-acetyl-L-tryptophanate protect human serum albumin against heat and oxidative stress*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2004**. 1702(1): S. 9-17.
- [142] K. Yamasaki, M. Anraku, Kapitel: *Stability of Albumin and Stabilization of Albumin Preparations*, aus *Albumin in Medicine: Pathological and Clinical Applications*. 1. Auflage, Otagiri and Chuang, Editoren. **2016**, Springer Singapore: Singapore. S. 25-49.
- [143] D.J. McClements, *Protein-stabilized emulsions*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2004**. 9(5): S. 305-313.
- [144] A. Raymundo, J. Franco, C. Gallegos, J. Empis, I. Sousa, *Effect of thermal denaturation of lupin protein on its emulsifying properties*. *Food / Nahrung* **1998**. 42(03-04): S. 220-224.

7. Literatur

- [145] S. Poon, A.E. Clarke, C.J. Schultz, *Effect of Denaturants on the Emulsifying Activity of Proteins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **2001**. 49(1): S. 281-286.
- [146] O. Karaman, Dissertation mit dem Thema: *Untersuchungen der strukturellen und funktionellen Interaktionen zwischen trans-Resveratrol und der Albuminhülle eines künstlichen Sauerstoffträgers auf Perfluordecalinbasis*. Institut für Physiologische Chemie, Universität Duisburg-Essen, **2023**.
- [147] C. Qian, D.J. McClements, *Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size*. Food Hydrocolloids **2011**. 25(5): S. 1000-1008.
- [148] A.D. Putri, P.-S. Chen, Y.-L. Su, J.-P. Lin, J.-P. Liou, C.-M. Hsieh, *Optimization and Development of Selective Histone Deacetylase Inhibitor (MPT0B291)-Loaded Albumin Nanoparticles for Anticancer Therapy*. Pharmaceutics **2021**. 13(10): S. 1728.
- [149] D. Cho, G. Narsimhan, E.I. Franses, *Interactions of Spread Lecithin Monolayers with Bovine Serum Albumin in Aqueous Solution*. Langmuir **1997**. 13(17): S. 4710-4715.
- [150] M. Postel, J.G. Riess, J.G. Weers, *Fluorocarbon Emulsions the Stability Issue*. Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology **1994**. 22(4): S. 991-1005.
- [151] M.P. Krafft, J.P. Rolland, J.G. Riess, *Detrimental effect of excess lecithin on the stability of fluorocarbon/lecithin emulsions*. The Journal of Physical Chemistry **1991**. 95(14): S. 5673-5676.
- [152] I.N. Kuznetsova, *Perfluorocarbon Emulsions: Stability in vitro and in vivo (A Review)*. Pharmaceutical Chemistry Journal **2003**. 37(8): S. 415-420.
- [153] P. Borthakur, P.K. Boruah, B. Sharma, M.R. Das, Kapitel: *Nanoemulsion: preparation and its application in food industry*, aus *Emulsions*. 3. Auflage, Grumezescu, Editor. **2016**, Academic Press. S. 153-191.
- [154] N. Fogh-Andersen, P.J. Bjerrum, O. Siggaard-Andersen, *Ionic binding, net charge, and Donnan effect of human serum albumin as a function of pH*. Clinical Chemistry **1993**. 39(1): S. 48-52.
- [155] T. Wang, E.G. Hammond, W.R. Fehr, *Phospholipid fatty acid composition and stereospecific distribution of soybeans with a wide range of fatty acid composition*. Journal of the American Oil Chemists' Society **1997**. 74(12): S. 1587-1594.

7. Literatur

- [156] N. Gutiérrez-Méndez, D.R. Chavez-Garay, M.Y. Leal-Ramos, *Lecithins: A comprehensive review of their properties and their use in formulating microemulsions*. *Journal of Food Biochemistry* **2022**. 46(7): S. 1-22.
- [157] S. Magdassi, A. Siman-Tov, *Formation and stabilization of perfluorocarbon emulsions*. *International Journal of Pharmaceutics* **1990**. 59(1): S. 69-72.
- [158] J. Jägers, Dissertation mit dem Thema: *Charakterisierung und ex vivo Untersuchung eines künstlichen Sauerstoffträgers für den Einsatz zur Konservierung von Nieren*. Institut für Physiologie, Universität Duisburg-Essen, **2021**.
- [159] D.T. Savage, J.Z. Hilt, T.D. Dziubla, Kapitel: *In Vitro Methods for Assessing Nanoparticle Toxicity*, aus *Nanotoxicity: Methods and Protocols*. 1. Auflage, Zhang, Editor. **2019**, Springer New York: New York, NY. S. 1-29.
- [160] S. Salgın, U. Salgın, S. Bahadır, *Zeta Potentials and Isoelectric Points of Biomolecules: The Effects of Ion Types and Ionic Strengths*. *International Journal of Electrochemical Science* **2012**. 7(12): S. 12404-12414.
- [161] E.J.W. Verwey, *Theory of the stability of lyophobic colloids*. *The Journal of Physical Chemistry* **1947**. 51(3): S. 631-636.
- [162] A.M. Walker, Y. Xiao, C.R. Johnston, D.E. Rival, *The viscous characterization of hydroxyethyl starch (HES) plasma volume expanders in a non-Newtonian blood analog*. *Biorheology* **2013**. 50: S. 177-190.
- [163] M.D. Lechner, Kapitel: *Viskosität*, aus *Einführung in die Kinetik: Chemische Reaktionskinetik und Transporteigenschaften*. 1. Auflage. **2018**, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. S. 117-125.
- [164] M. Stang, H. Schuchmann, H. Schubert, *Emulsification in High-Pressure Homogenizers*. *Engineering in Life Sciences* **2001**. 1(4): S. 151-157.
- [165] S. Arni, C. Necati, T. Maeyashiki, I. Opitz, I. Inci, *Perfluorocarbon-Based Oxygen Carriers and Subnormothermic Lung Machine Perfusion Decrease Production of Pro-Inflammatory Mediators*. *Cells* **2021**. 10(9): S. 2249.
- [166] D. Mayer, F. Guerrero, C. Goanvec, L. Hetzel, J. Linders, M. Ljubkovic, A. Kreczy, C. Mayer, M. Kirsch, K.B. Ferenz, *Prevention of Decompression Sickness by Novel Artificial Oxygen Carriers*. *Medicine and science in sports and exercise* **2020**. 52(10): S. 2127-2135.

7. Literatur

- [167] S. Kokal, J. Al-Juraid. *Quantification of Various Factors Affecting Emulsion Stability: Watercut, Temperature, Shear, Asphaltene Content, Demulsifier Dosage and Mixing Different Crudes*. in *SPE Annual Technical Conference and Exhibition*. 1999.
- [168] R. Bessenrodt, *Brownsche Bewegung: Hundert Jahre Theorie der wichtigsten Brücke zwischen Mikro- und Makrophysik*. *Physikalische Blätter* **1977**. 33(1): S. 7-16.
- [169] S. Grissmer, Kapitel: *Die terminale Strombahn*, aus *Duale Reihe Physiologie*. 3. Auflage, Behrends, et al., Editoren. **2016**, Georg Thieme Verlag KG. S. 145-146.
- [170] E.P. Wesseler, R. Iltis, L.C. Clark, *The solubility of oxygen in highly fluorinated liquids*. *Journal of Fluorine Chemistry* **1977**. 9(2): S. 137-146.
- [171] N. Kakaei, R. Amirian, M. Azadi, G. Mohammadi, Z. Izadi, *Perfluorocarbons: A perspective of theranostic applications and challenges*. *Front Bioeng Biotechnol* **2023**. 11: S. 1-16.
- [172] J.G. Riess, *Overview of Progress in the Fluorocarbon Approach to in vivo Oxygen Delivery*. *Biomaterials, Artificial Cells and Immobilization Biotechnology* **1992**. 20(2-4): S. 183-202.
- [173] H. Ehmke, Kapitel: *Sauerstofftransport im Blut*, aus *Duale Reihe Physiologie*. 3. Auflage, Behrends, et al., Editoren. **2016**, Georg Thieme Verlag KG. S. 254-255.
- [174] N.S. Faithfull, *Oxygen Delivery from Fluorocarbon Emulsions-Aspects of Convective and Diffusive Transport*. *Biomaterials, Artificial Cells and Immobilization Biotechnology* **1992**. 20(2-4): S. 797-804.
- [175] R. Sander, *Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent*. *Atmos. Chem. Phys.* **2015**. 15(8): S. 4399-4981.
- [176] J.-C. Orban, C. Garrel, D. Déroche, F. Cattet, P. Ferrari, F. Berthier, C. Ichai, *Assessment of oxidative stress after out-of-hospital cardiac arrest*. *The American Journal of Emergency Medicine* **2016**. 34(8): S. 1561-1566.
- [177] J. Jägers, M. Kirsch, M. Cantore, O. Karaman, K.B. Ferenz, *Artificial oxygen carriers in organ preservation: Dose dependency in a rat model of ex-vivo normothermic kidney perfusion*. *Artificial Organs* **2022**. 46(9): S. 1783-1793.

7. Literatur

- [178] E. de Laplanche, A. Boudria, E. Dacheux, A. Vincent, N. Gadot, F. Assade, K. Le Corf, X. Leroy, F. Mège Lechevallier, B. Eymin, N. Dalla Venezia, H. Simonnet, *Low glucose microenvironment of normal kidney cells stabilizes a subset of messengers involved in angiogenesis*. *Physiological Reports* **2015**. 3(1): S. 1-11.
- [179] J. Wang, Y. Wang, Z. Duan, W. Hu, *Hypoxia-induced alterations of transcriptome and chromatin accessibility in HL-1 cells*. *IUBMB Life* **2020**. 72(8): S. 1737-1746.
- [180] A.V. Kuznetsov, S. Javadov, S. Sickinger, S. Frotschnig, M. Grimm, *H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2015**. 1853(2): S. 276-284.
- [181] S. Sharifi, S. Behzadi, S. Laurent, M. Laird Forrest, P. Stroeve, M. Mahmoudi, *Toxicity of nanomaterials*. *Chemical Society Reviews* **2012**. 41(6): S. 2323-2343.
- [182] V. Patravale, P. Dandekar, R. Jain, *Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles*. *Nanoparticulate drug delivery* **2012**. 4: S. 123-155.
- [183] E. Sarri, D. Garcia-Dorado, A. Abellan, J. Soler-Soler, *Effects of hypoxia, glucose deprivation and acidosis on phosphatidylcholine synthesis in HL-1 cardiomyocytes. CTP:phosphocholine cytidyltransferase activity correlates with sarcolemmal disruption*. *Biochemical Journal* **2006**. 394(1): S. 325-334.
- [184] A.S. Streng, L.H.J. Jacobs, R.W. Schwenk, E.P.M. Cardinaels, S.J.R. Meex, J.F.C. Glatz, W.K.W.H. Wodzig, M.P. van Dieijen-Visser, *Cardiac troponin in ischemic cardiomyocytes: Intracellular decrease before onset of cell death*. *Experimental and Molecular Pathology* **2014**. 96(3): S. 339-345.
- [185] W.A. Saber, M. El-Ghannam, Y.S. Mubarak, H.H. Mahdy, R.M.R. Khorshid, *Custodiol-HTK Solution Vs. Conventional Cardioplegia for Myocardial Protection During Coronary Artery Bypass Grafting Following Recent ST-Elevation Myocardial Infarction*. *Bali Journal of Anesthesiology* **2022**. 6(2): S. 97-102.
- [186] I. Ullah, A.T. Khalil, M. Ali, J. Iqbal, W. Ali, S. Alarifi, Z.K. Shinwari, *Green-Synthesized Silver Nanoparticles Induced Apoptotic Cell Death in MCF-7 Breast Cancer Cells by Generating Reactive Oxygen Species and Activating Caspase 3 and 9 Enzyme Activities*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2020**. 2020(1): S. 1-14.

7. Literatur

- [187] A.E. Greijer, E. van der Wall, *The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis*. Journal of Clinical Pathology **2004**. 57(10): S. 1009-1014.
- [188] L.J.A. Ambrose, A.H. Abd-Jamil, R.S.M. Gomes, E.E. Carter, C.A. Carr, K. Clarke, L.C. Heather, *Investigating Mitochondrial Metabolism in Contracting HL-1 Cardiomyocytes Following Hypoxia and Pharmacological HIF Activation Identifies HIF-Dependent and Independent Mechanisms of Regulation*. Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics **2014**. 19(6): S. 574-585.
- [189] J. Rassow, K. Hauser, Kapitel: *Energiestoffwechsel*, aus *Duale Reihe Biochemie*. 4. Auflage, Rassow, et al., Editoren. **2016**, Georg Thieme Verlag KG. S. 19-96.
- [190] T. Abel, Kapitel: *Kraftwerk Zelle*, aus *Aktuelle Ernährungsmedizin*. 41. Auflage. **2016**, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart, New York. S. 2-5.
- [191] N.S. Chandel, G.R.S. Budinger, P.T. Schumacker, *Molecular Oxygen Modulates Cytochrome c Oxidase Function*. Journal of Biological Chemistry **1996**. 271(31): S. 18672-18677.
- [192] W.W. Wheaton, N.S. Chandel, *Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism*. American Journal of Physiology-Cell Physiology **2011**. 300(3): S. C385-C393.
- [193] S. Takeo, M. Sakanashi, *Possible mechanisms for reoxygenation-induced recovery of myocardial high-energy phosphates after hypoxia*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology **1983**. 15(9): S. 577-594.
- [194] G.L. Semenza, *Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology*. Trends in molecular medicine **2001**. 7(8): S. 345-350.
- [195] S. Pragallapati, R. Manyam, *Glucose transporter 1 in health and disease*. J Oral Maxillofac Pathol **2019**. 23(3): S. 443-449.
- [196] A.V. Kuznetsov, I. Kehrer, A.V. Kozlov, M. Haller, H. Redl, M. Hermann, M. Grimm, J. Troppmair, *Mitochondrial ROS production under cellular stress: comparison of different detection methods*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **2011**. 400(8): S. 2383-2390.
- [197] R.H. Bhogal, S.M. Curbishley, C.J. Weston, D.H. Adams, S.C. Afford, *Reactive oxygen species mediate human hepatocyte injury during hypoxia/reoxygenation*. Liver Transplantation **2010**. 16(11): S. 1303-1313.

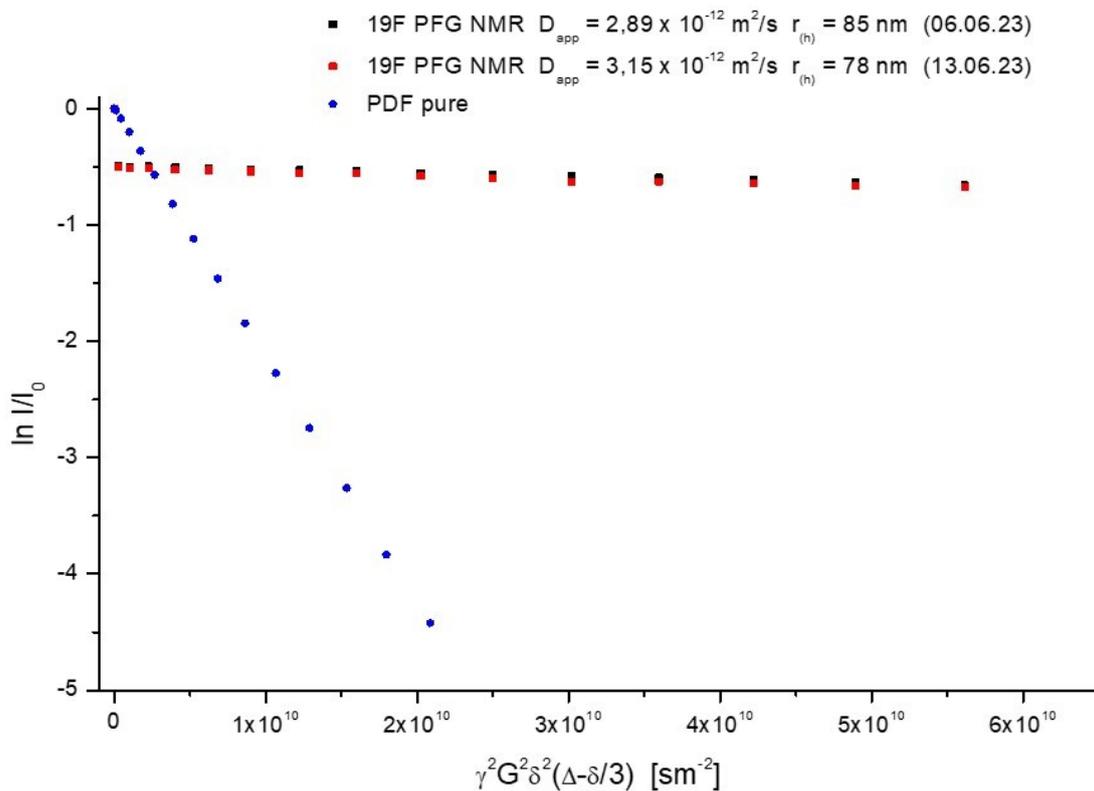
7. Literatur

- [198] F. Kabi, *Product Information Volulyte 6%*. <https://www.fresenius-kabi.com/in/products/volulyte-6>, [abgerufen am 03.04.2024].
- [199] M.G. Kees, H. Schlotterbeck, R. Passemard, T. Pottecher, P. Diemunsch, *Le soluté de Ringer : un standard « isotonique » discutable*. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* **2005**. 24(6): S. 653-655.
- [200] L. Stig Steen, Evaluation and preservation solution, Patent, **2007**.USA.
- [201] C.R. Bradley, D.D. Bragg, E.F. Cox, A.M. El-Sharkawy, C.E. Buchanan, A.H. Chowdhury, I.A. Macdonald, S.T. Francis, D.N. Lobo, *A randomized, controlled, double-blind crossover study on the effects of isoeffective and isovolumetric intravenous crystalloid and gelatin on blood volume, and renal and cardiac hemodynamics*. *Clinical Nutrition* **2020**. 39(7): S. 2070-2079.
- [202] C.J. Preusse, *Custodiol Cardioplegia: A Single-Dose Hyperpolarizing Solution*. *J Extra Corpor Technol* **2016**. 48(2): S. P15-20.

8. Anhang

8.1 Ergänzungen zur Arbeit

8.1.1 Messung der LENOX basic und von freiem PFD mittels gepulster Feldgradient-NMR



Die Abbildung zeigt den Stejskal-Tanner-Plot der LENOX basic (schwarz und rot) und von reinem PFD (blau), gemessen mittels gepulster Feldgradient-NMR (PFG-NMR). Das Besondere an der PFG-NMR ist das inhomogene Magnetfeld, welches einen Gradienten während der Messung aufweist. Durch diese Technik lässt sich auf die Selbstdiffusion der Analyseproben schließen. Somit können beispielsweise frei vorliegende Fluide von emulgierten Fluiden unterschieden werden, die mit einem Emulgator stabilisiert wurden. Die beiden LENOX Proben sind LENOX basic nach 24 h Lagerung (rot) und nach 7 Tagen Lagerung (schwarz). In dem Plot ist deutlich zu sehen, dass die LENOX Proben ein anderes Verhalten aufweisen als das freie PFD. Somit lässt sich sagen, dass die LENOX basic kein freies PFD aufweisen und das vorliegende PFD vollständig emulgiert ist. Die Daten wurden von Dr. Jürgen Linders im Arbeitskreis von Prof. Christian Mayer am Institut für Physikalische Chemie, Universität Duisburg-Essen aufgenommen.

8. Anhang

8.1.2 Zusammensetzung und Eigenschaften der verwendeten klinisch relevanten kristalloiden und kolloidalen Lösungen zur Herstellung der LENOX Emulsionen ^[198-202]

	HES 6%	NaCl 0.9%	Ringer Lösung	Steen Solution	Sterofundin ISO	Custo- diol
geladen @ pH7.4						
[mM]						
Na ⁺	137.0	154.0	147.0	102.2	145.0	15.0
K ⁺	4.0	-	4.0	4.6	4.0	10
Ca ²⁺	-	-	2.2	1.5	2.5	0.015
Mg ²⁺	1.5	-	-	1.2	1.0	4.0
Tryptophan ⁺	-	-	-	-	-	2.0
Acetat ⁻	34.0	-	-	-	24.0	-
Malat ⁻	-	-	-	-	5.0	-
Cl ⁻	110.0	154.0	156.0	96.0	127.0	34.03
Hydrogen-2oxo- glutarat ⁻	-	-	-	-	-	1.0
HCO ₃ ⁻	-	-	-	15.0	-	-
H ₂ PO ₄ ⁻	-	-	-	1.2	-	-
Albumin ⁻	-	-	-	1.05	-	-
Gesamt ⁺ Ladung	144	154	155.4	112.2	156	35.03
Ionen ¹⁺	141	154	151	106.8	149	27
Ionen ²⁺	1.5	-	2.2	2.7	3.5	4.015
Gesamt ⁻ Ladung	144	154	156	113.25	156	35.03
neutral @ pH 7.4						
[mM]						
Histidin	-	-	-	-	-	198.0
Mannitol	-	-	-	-	-	30.0
Poly(O-2- hydroxyethylstärke)	~0.46	-	-	-	-	-
Dextran 40	-	-	-	0.125	-	-
D(+)-glukose				11.0		

8. Anhang

pH _{Hersteller}	5.7- 6.5	4.5- 7.0	5.0-7.0	7.4	5.1-5.9	7.0-7.2
pH _{gemessen}	5.98	6.02	5.35	8.02	5.35	7.25
Osmolarität _{Hersteller}	287	308	309	-	309	300
Osmolarität _{berechnet}	289	308	311	237	312	310

8. Anhang

8.2 Publikationsliste, Konferenzteilnahmen und Sonstiges

8.2.1 Patent

Lecithin-modifizierte nanoskalierte Sauerstoffträger (LENOX), eingereicht beim Europäischen Patentamt am 31. August 2022 (EP 22193221.3) und einer PCT-Nachmeldung mit der Antragsnummer WO 2024/046999 A1 (pending) am 29. August 2023.

8.2.2 Publikationen

- J. Jaegers, S. Haferkamp, O. Arnolds, D. Moog, A. Wrobeln, F. Nocke, M. Cantore, S. Pütz, A. Hartwig, R. Franzkoch, O.E. Psathaki, H. Jastrow, C. Schauerte, R. Stoll, M. Kirsch, K.B. Ferez, *Deciphering the Emulsification Process to Create an Albumin-Perfluorocarbon-(o/w) Nanoemulsion with High Shelf Life and Bioresistivity*. Langmuir **2022**. 38(34): p. 10351-10361.
 - DOI: 10.1021/acs.langmuir.1c03388
- T. Rother, C. Horgby, K. Schmalkuche, J.M. Burgmann, F. Nocke, J. Jägers, J. Schmitz, J.H. Bräsen, M. Cantore, F. Zal, K.B. Ferez, R. Blasczyk, C. Figueiredo, *Oxygen carriers affect kidney immunogenicity during ex-vivo machine perfusion*. Frontiers in Transplantation **2023**. 2.
 - DOI: 10.3389/frtra.2023.1183908
- Fabian Nocke, Miriam Cantore, Marina Penzel, Andrea U. Steinbicker, Katja B. Ferez, *Artificial oxygen carrier optimized for ex situ organ perfusion*, 56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e. V. (DGTI), 20.–22. September 2023, Berlin, ABSTRACTS: DGTI 2023 Abstracts. Transfus Med Hemother 5 September **2023**; 50 (Suppl. 1): 1–96. DOI: 10.1159/000533306
- Anna-Lena Semmler, Jan-Philipp Köhler, Lara Regolien, Franziska Bayer, Nikolay Polyansky, Elise Gradhand, Andreas von Knethen, Kai Zacharowski, Fabian Nocke, Katja B. Ferez, Joachim Schwäble, Halvard Bonig, Eva Herrmann, Isabelle Hornung, Andrea U. Steinbicker, *Selective red blood cell depletion by apheresis in sheep causes severe*

8. Anhang

normovolemic anemia, Current Research in Translational Medicine, aktuell unter Revision.

- Fabian Nocke, Martin A. Schroer, Marina Penzel, Miriam Cantore, Andrea U. Steinbicker, Katja B. Ferenz, *LENOX: Artificial oxygen carriers on perfluorocarbon-base with mixed shell composition and improved stability*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, eingereicht.

8.2.3 Konferenzteilnahmen

- Fabian Nocke, Marina Penzel, Martin A. Schroer, Katja B. Ferenz, *Synthesis and characterization of perfluorocarbon-based albumin nanoparticles for practical application*, Europhysiology, Copenhagen, **2022**.
- Fabian Nocke, Miriam Cantore, Marina Penzel, Andrea U. Steinbicker, Katja B. Ferenz, *Lecithin-modified nanoscaled oxygen carrier*, 3rd CENIDE conference, Bergisch Gladbach, **2023**.
- Jan-Eric Sydow, Fabian Nocke, Katja B. Ferenz, *Effect of artificial oxygen carriers on erythrocytes*, Bergisch Gladbach, **2023**.
- Jacqueline Hausherr, Ozan Karaman, Fabian Nocke, Katja B. Ferenz, *Utilization of a perfluorodecalin nanoemulsion in an in vitro ischemia-reperfusion-injury model in HL-1 cardiomyocytes*, Bergisch Gladbach, **2023**.
- Fabian Nocke, Miriam Cantore, Marina Penzel, Andrea U. Steinbicker, Katja B. Ferenz, *A new stable emulsion with a mixed shell composition for oxygen delivery*, 10th NRW Nano Conference, Dortmund, **2023**.
- Jacqueline Hausherr, Ozan Karaman, Fabian Nocke, Katja B. Ferenz, *Using a perfluoro decalin nanoemulsion in a cardiomyocyte in vitro model of ischemia-reperfusion injury*, 10th NRW Nano Conference, Dortmund, **2023**.
- Marina Penzel, Fabian Nocke, Katja B. Ferenz, *Optimization of the stability of an albumin-based perfluorocarbon emulsion by changing the synthesis parameters*, 10th NRW Nano Conference, Dortmund, **2023**.
- Fabian Nocke, Miriam Cantore, Marina Penzel, Andrea U. Steinbicker, Katja B. Ferenz,

8. Anhang

Artificial oxygen carrier optimized for ex situ organ perfusion, 56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e.V., Berlin, **2023**.

- Jacqueline Hausherr, Miriam Cantore, Fabian Nocke, Oman Abou-Issa, Nicolaus Pizanis, Markus Kamler, Katja B. Ferenz, *Implementation of perfluorocarbon-based artificial oxygen carrier during a normothermic porcine heart perfusion*, 56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e.V., Berlin, **2023**.
- Jan-Eric Sydow, Adrian Haag, Fabian Nocke, Michael Giese, Katja B. Ferenz, *Investigation of perfluorodecalin nanoemulsion as an artificial oxygen carrier in whole blood and 3D-printed blood vessels*, 56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e.V., Berlin, **2023**.
- Martin Schroer, Jan-Eric Sydow, Fabian Nocke, Ozan Karaman, Katja Ferenz, *Understanding Structure and Stability for The Development of Novel Artificial Oxygen Carriers*, MRS Spring Meeting, **2024**.

8.2.4 Preise und Sonstiges

- Best Poster Award, 10th NRW Nano Conference, Dortmund, **2023**
- Reviewer für das Journal Acta Mechanica, Springer Verlag, **2024**.

8. Anhang

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

8. Anhang

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich Frau Prof. Dr. Katja Ferez bedanken, die mich seit meiner Bachelorarbeit begleitet und mich während meiner Dissertation stets lösungsorientiert unterstützt hat. Sie gab mir die Möglichkeit, an nationalen und internationalen Projekten zu arbeiten und damit mein Netzwerk zu erweitern. Frau Prof. Ferez konnte auch in den schwierigen Zeiten meiner Dissertation immer die für mich richtigen Hilfestellungen geben. Es war zu jeder Zeit möglich, ein Gespräch auf Augenhöhe zu führen und ich konnte meine Ideen immer mit einbringen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Kirsch bedanken, der neben der Funktion als Zweitgutachter mich jederzeit mit fachlichem Rat unterstützt hat. Vor allem der Ideenaustausch bei der Entwicklung neuer Methoden war sehr hilfreich.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Miriam Cantore. Mit ihrer Hilfe konnte ich meine Arbeit, besonders im Bereich der Zellkultur, auf ein höheres Niveau bringen. Ihre besondere Expertise, ihre freundliche Art und ihre unermüdliche Unterstützung im Labor führten zu dem Gelingen vieler Projekte und gaben mir die Möglichkeit, mich in biologischen Fragestellungen und Versuchen weiterzuentwickeln.

Besonders möchte ich Marina Penzel danken. Ihre Unterstützung in allen meiner Projekte und Ideen führten zu großartigen Möglichkeiten. Ohne ihre Hilfe wäre die Anzahl an Versuchen, Synthesen und Lehrveranstaltungen nicht möglich gewesen. Außerdem sorgte sie mit ihrer Art immer für eine gute Stimmung im Labor. Es hat mich sehr gefreut, mit ihr zusammenarbeiten zu dürfen.

Auch möchte ich mich bei Dr. Martin Schroer bedanken, durch dessen Hilfe ich meine eigene Erfindung noch besser verstehen konnte. Seine Erfahrung in der Nanopartikelanalyse und seine freundliche Art, Sachzusammenhänge zu erklären, gaben mir einen anderen Blickwinkel und halfen mir, Fehler zu vermeiden und die Qualität meiner Arbeit zu steigern. Durch ihn bekam ich die Möglichkeit, Messungen am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg durchzuführen, was eine einmalige Erfahrung war.

Mein Dank geht auch an Dr. Jürgen Linders, durch dessen Unterstützung in der NMR-Analyse viele Fragestellungen beantwortet werden konnten. Außerdem war er immer für fachliche oder private Diskussionsrunden verfügbar, was ein sehr angenehmes Umfeld schaffte.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Bastian Schmack, Dr. Jasmin Hanke und Jörg Optenhöfel. Durch das Einbringen ihres klinischen Fachwissens konnten die E-ROC stets mit realistischem Blick auf die klinische Anwendung entwickelt werden. Zusätzlich beflügelten mich die gemeinsamen Meetings und motivierten mich weiterzumachen. Durch sie hatte ich auch die Möglichkeit einer realen Herzoperation beizuwohnen, was ein beeindruckendes Erlebnis für mich war.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Dhanusha Schwan und Jana Westhues bedanken, die für Spaß in den praktischen Lehrveranstaltungen sorgten und immer ein offenes Ohr hatten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Christian Elm, Jacqueline Arnold-Thomas, Eva Hillen, Birgit Podleska, Natalie Homann, Dr. Katharina Effenberger-Neidnicht, Susanne Eitner und Falk Kähler aus der AG Kirsch, die mich nicht nur in ihren Räumlichkeiten aufgenommen haben, sondern mir stets den Rücken gestärkt, sowie organisatorisch und fachlich unterstützt haben.

Natürlich möchte ich mich auch bei meinen Gruppenkollegen Jan-Eric Sydow, Jacqueline Hausherr, Hanah Khachani und Janne Lüscher bedanken. Mit ihnen wurde jeder Konferenzbesuch etwas Besonderes und ich konnte mich in unserem Arbeitskreis sehr wohl fühlen.

Außerdem möchte ich meinen Eltern Andrea und Stephan, sowie meiner Schwester Victoria danken, ohne die ich nicht so weit gekommen wäre. Sie haben mich mit Allem, was sie hatten, unterstützt und haben sich besonders in den stressigen und schwierigen Phasen immer Zeit genommen.

Zum Schluss möchte ich noch meiner Freundin Tamara meinen besonderen Dank aussprechen. Ohne so eine einfühlsame, motivierende und verständnisvolle Person an meiner Seite, wäre die Zeit eine deutlich schwerere gewesen. Ihr Verständnis für die unzähligen Nachtschichten und spontanen Versuche am Wochenende war stets gegeben und führte nie zu Meinungsverschiedenheiten. Vielen Dank dafür.