

# **Biologische Verträglichkeit künstlicher Sauerstoffträger auf Perfluorcarbon-Basis**

## **Dissertation**

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

Vorgelegt von

**Julia Laudien**

geboren in Essen

Institut für Physiologische Chemie  
der  
Universität Duisburg-Essen

**2014**

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2011 bis Juni 2014 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. H. de Groot am Institut für Physiologische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 12.12.2014

Gutachter:	Prof. Dr. Dr. H. de Groot
	Prof. Dr. C. Mayer
Vorsitzender:	Prof. Dr. E. Spohr

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>3</b>
2.1	Blut .....	3
2.2	Perfluorcarbone .....	6
2.3	Künstliche Blutersatzstoffe und künstliche Sauerstoffträger .....	9
<b>3</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
4.1	Material .....	14
4.1.1	Pharmaka und Chemikalien .....	14
4.1.2	Materialien und Geräte .....	15
4.1.3	Software .....	17
4.1.4	Versuchstiere .....	17
4.1.5	Verwendete Kapseltypen .....	18
4.2	Methoden .....	22
4.2.1	Mikrobiologische Testreihen .....	22
4.2.2	Allgemeiner Operationsablauf .....	24
4.2.3	Intravitalmikroskopie der Leber zur Bestimmung der prozentualen Anzahl perfundierter GefäÙe und des mittleren GefäÙdurchmessers nach intravenöser Applikation von PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln .....	27
4.2.4	Bestimmung der toxikologischen Effekte der Albumin-Kapseln nach intravenöser Infusion .....	34
4.2.5	Bestimmung der Anaphylatoxine C3a und C5a zu Beginn und am Ende der Infusionsphase von PACA- und Albumin-Kapseln .....	36
4.2.6	Bestimmung der <i>intravasalen</i> Halbwertszeit von PACA- und Albumin-Kapseln .....	37
4.2.7	Anfertigung und Untersuchung von kryohistologischen Schnittpräparaten zur Beurteilung der <i>in vivo</i> -Verteilung von PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln .....	39
4.2.8	Histologische Untersuchungen von Leber, Darm, Lunge, Niere, Herz und Milz nach intravenöser Applikation von PACA- und Albumin-Kapseln .....	42

4.2.9	Bestimmung des Einflusses der Kapselsuspensionen auf die dynamische Viskosität von Blut.....	44
4.2.10	Messung der Sauerstoffkapazität der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln .....	45
4.2.11	Statistik .....	48
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
5.1	<i>In vitro</i> -Charakterisierung der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln .....	50
5.1.1	Keimfreiheit und mikrobielle Stabilität der verwendeten Kapselsuspensionen .....	50
5.1.2	Einfluss der PACA- und Albumin-Kapseln auf die dynamische Viskosität von Blut .....	52
5.1.3	Sauerstoffgehalt der 8 Vol.-%igen PLGA-, PACA- und Albumin-Kapselsuspensionen im Vergleich zu den Trägerlösungen Albumin (5%) und NaCl (0,9%) .....	54
5.1.4	Sauerstoffgehalt der Albumin-Kapselsuspension in Abhängigkeit vom Volumenanteil der Albumin-Kapseln .....	55
5.2	<i>In vivo</i> -Charakterisierung der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln .....	57
5.2.1	Einfluss der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln auf systemische Parameter und die Mikrozirkulation.....	57
5.2.2	Einfluss der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln auf den Säure-Base-Haushalt und metabolische Parameter .....	62
5.2.3	Einfluss der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln auf spezifische Schädigungsmarker .....	67
5.2.4	Einfluss der PACA- und Albumin-Kapseln auf die Integrität von Organstrukturen .....	72
5.2.5	<i>In vivo</i> -Verteilung der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln .....	76
5.2.6	<i>Intravasale</i> Halbwertszeit der PACA- und Albumin-Kapseln.....	82
5.2.7	Einfluss der Infusion von PACA- und Albumin-Kapseln auf die Plasmakonzentration der Anaphylatoxine C3a und C5a .....	83
5.2.8	Bestimmung der CK-Isoenzyme nach Infusion der Albumin-Kapseln ..	83
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>85</b>
6.1	Keimfreiheit und mikrobielle Stabilität der Kapselsuspensionen .....	85
6.2	<i>In vivo</i> -Verteilung, <i>intravasale</i> Halbwertszeit, und Organschädigungen .....	86
6.3	<i>Transiente</i> systemische Hypotension .....	90
6.4	Funktionsstörungen der hepatischen Mikrozirkulation .....	93
6.5	Einflüsse auf den Säure-Base-Haushalt und den Laktatspiegel .....	95

6.6	Sauerstoffkapazitäten der Kapselsuspensionen .....	97
6.7	Einordnung der therapeutischen Relevanz der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln als künstliche Sauerstoffträger .....	100
<b>7</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>105</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>110</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>117</b>
10.1	Abkürzungsverzeichnis .....	117
10.2	Publikationsliste und wissenschaftliche Vorträge.....	120
10.2.1	Eigene Publikationen .....	120
10.2.2	Wissenschaftliche Vorträge.....	121
10.2.3	Posterpräsentationen.....	122
10.3	Curriculum Vitae .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
10.4	Erklärung.....	126
10.5	Danksagung.....	127

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Quantitative Zusammensetzung des Blutes .....	3
<b>Abb. 2:</b> Das Tetramer Hämoglobin <sup>9</sup> .....	5
<b>Abb. 3:</b> Struktur der Häm-Gruppen (modifiziert nach Nelson/Cox <sup>7</sup> ).....	5
<b>Abb. 4:</b> Schematische Darstellung der Sauerstoffbindungskurven von Blut und Perfluorcarbon-haltigen Präparaten (modifiziert nach Habler <sup>1</sup> ).....	7
<b>Abb. 5:</b> Strukturformel des Perfluordecals. ....	8
<b>Abb. 6:</b> Aufbau einer PLGA-Mikrokapsel. ....	19
<b>Abb. 7:</b> Aufbau einer PLGA-Mikrosphäre.....	19
<b>Abb. 8:</b> Aufbau einer PACA Nanokapsel.....	20
<b>Abb. 9:</b> Aufbau einer Albumin-Nanokapsel. ....	20
<b>Abb. 10:</b> Mechanismus der Fluoreszenz.....	29
<b>Abb. 11:</b> Absorptions- und Fluoreszenzspektrum.....	30
<b>Abb. 12:</b> Freipräparation und Auslagerung der Leber. ....	31
<b>Abb. 13:</b> Abdecken des Operationsbereichs. ....	32
<b>Abb. 14:</b> OP-Schema für intravitalmikroskopische Untersuchungen nach intravenöser Infusion von PLGA- und PACA-Kapseln. ....	33
<b>Abb. 15:</b> OP-Schema für intravitalmikroskopische Untersuchungen nach intravenöser Infusion von Albumin-Kapseln. ....	34
<b>Abb. 16:</b> OP-Schema zur Bestimmung der toxikologischen Effekte der Albumin-Kapseln nach intravenöser Infusion. ....	36
<b>Abb. 17:</b> OP-Schema für die Bestimmung der <i>intravasalen</i> Halbwertszeit von PACA- und Albumin-Kapseln. ....	39
<b>Abb. 18:</b> OP-Schema für die Beurteilung der <i>in vivo</i> -Verteilung von PACA-, PLGA- und Albumin-Kapseln.. ....	41
<b>Abb. 19:</b> Keimfreiheit und mikrobielle Stabilität der Kapselsuspensionen. ....	51
<b>Abb. 20:</b> Einfluss von 0,9%iger NaCl-Lsg. und PACA-Kapseln auf die dynamische Viskosität von Blut. ....	52
<b>Abb. 21:</b> Einfluss von 5%iger Albumin-Lsg. und Albumin-Kapseln auf die dynamische Viskosität von Blut. ....	53
<b>Abb. 22:</b> Sauerstoffgehalt der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapselsuspensionen (8 Vol.-%) im Vergleich zu 0,9%iger NaCl-Lsg. und 5%iger Albumin-Lsg.....	54
<b>Abb. 23:</b> Erhöhter Sauerstoffgehalt der Albumin-Kapselsuspension bei gesteigertem Volumenanteil der Kapseln. ....	56

<b>Abb. 24:</b> Einfluss der PLGA- und PACA-Kapseln auf den MAP (A), die prozentuale Anzahl perfundierter Gefäße in der Leber (B) und den hepatischen Gefäßdurchmesser (C). .....	59
<b>Abb. 25:</b> Einfluss von PLGA-Sphären auf den MAP (A), die prozentuale Anzahl perfundierter Gefäße in der Leber (B) und den hepatischen Gefäßdurchmesser (C). .....	60
<b>Abb. 26:</b> Einfluss der Albumin-Kapseln auf den MAP (A), die prozentuale Anzahl perfundierter Gefäße in der Leber (B) und den hepatischen Gefäßdurchmesser (C). .....	61
<b>Abb. 27:</b> Einfluss der PLGA- und PACA-Kapseln auf den pH-Wert (A), den Base Excess (B), den pCO <sub>2</sub> (C) und die Laktatkonzentration (D). .....	64
<b>Abb. 28:</b> Einfluss der Albumin-Kapseln auf den pH-Wert (A), den Base Excess (B), den pCO <sub>2</sub> (C) und die Laktatkonzentration (D). .....	66
<b>Abb. 29:</b> Einfluss der PLGA- und PACA-Kapseln auf die Plasmakonzentrationen spezifischer Schädigungsmarker .....	69
<b>Abb. 30:</b> Einfluss der Albumin-Kapseln auf die Plasmakonzentrationen spezifischer Schädigungsmarker .....	71
<b>Abb. 31:</b> Strukturelle Veränderungen von Milz, Niere und Dünndarm nach intravenöser Applikation von PACA-Kapseln. ....	73
<b>Abb. 32:</b> Einfluss der Albumin-Kapseln auf die Organstruktur der Milz. ....	75
<b>Abb. 33:</b> <i>In vivo</i> -Verteilung der PLGA-Kapseln.....	77
<b>Abb. 34:</b> <i>In vivo</i> -Verteilung der PACA-Kapseln. ....	79
<b>Abb. 35:</b> <i>In vivo</i> -Verteilung der Albumin-Kapseln. ....	81
<b>Abb. 36:</b> <i>Intravasale</i> Halbwertszeiten der PACA- und Albumin-Kapseln (8 Vol.-%) .	82
<b>Abb. 37:</b> Gelelektrophorese zur Auftrennung der CK-Isoenzyme. ....	84
<b>Abb. 38:</b> Sauerstoffkapazitäten der unterschiedlichen Kapselsuspensionen bei klinisch relevanten Sauerstoffpartialdrücken. ....	98
<b>Abb. 39:</b> Sauerstoffkapazität der 64 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension im Vergleich zu Blut mit einem Hb-Gehalt von 5 g/dl. ....	102

## **Formelverzeichnis**

<b>Formel 1:</b> Berechnung des Sauerstoff-Korrekturfaktors $F(O_2)$ für die Bestimmung der maximalen Sauerstoffkapazität .....	46
<b>Formel 2:</b> Berechnung des Sauerstoffanteils der Trägerlösung an der Gesamt-Sauerstoffkapazität der Kapselsuspension.....	48
<b>Formel 3:</b> Berechnung des Sauerstoffanteils der Kapseln an der Gesamt-Sauerstoffkapazität der Kapselsuspension.....	48

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Durchmesser der verschiedenen Kapseltypen sowie Volumenanteile, Konzentrationen und Trägerlösungen der jeweiligen Suspensionen. ....	21
<b>Tab. 2:</b> Anzahl der Tiere für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen. ....	28
<b>Tab. 3:</b> Anzahl der Tiere zur Bestimmung der toxikologischen Effekte der Albumin-Kapseln. ....	35
<b>Tab. 4:</b> Anzahl der Tiere zur Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit von PACA- und Albumin-Kapseln. ....	38
<b>Tab. 5:</b> Variation der Fluorochrome in Abhängigkeit vom Kapseltyp. ....	40
<b>Tab. 6:</b> Anzahl der Tiere zur Beurteilung der <i>in vivo</i> -Verteilung. ....	40
<b>Tab. 7:</b> Sauerstoffanteil der unterschiedlichen Kapseltypen und der Trägerlösungen an den Gesamt-Sauerstoffkapazitäten der 8 Vol.-%igen Kapselsuspensionen unter Berücksichtigung der Volumenverteilung. ....	55
<b>Tab. 8:</b> Sauerstoffanteil der Albumin-Kapseln und der Albumin-Trägerlösung an den Sauerstoffkapazitäten der unterschiedlich konzentrierten Albumin-Kapselsuspensionen unter Berücksichtigung der Volumenverteilung. ....	56
<b>Tab. 9:</b> Vergleich der Sauerstoffkapazitäten von Perftoran und Albumin-Kapselsuspensionen mit Volumenanteilen von 32 Vol.-% und 64 Vol.-% bei einem $pO_2$ von 500 mmHg. ....	101
<b>Tab. 10:</b> Sauerstofffreisetzung von Erythrozyten, Erythrozytenkonzentraten und der 64 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension bei einer Beatmung mit reinem Sauerstoff. ....	104

# 1 Einleitung

Die Zahl der allein in Deutschland benötigten Blutkonserven beläuft sich jährlich auf etwa vier Millionen<sup>1</sup>. Bei einem sinkenden Spenderaufkommen, aber einem steigenden Bedarf an Spenderblut, ist in Zukunft mit einem zunehmenden Mangel an Blutkonserven zu rechnen<sup>2</sup>. Darüber hinaus zeigen sich vor allem bei der Behandlung von Trauma- und Polytraumapatienten, die aufgrund eines hohen Blutverlustes dringend eine Bluttransfusion benötigen, einige gravierende Probleme. Ein großer Blutverlust bedeutet nicht nur einen massiven Volumenmangel, der schnellstmöglich zur Kreislaufstabilisierung durch die Gabe einer geeigneten Volumenersatzlösung ausgeglichen werden muss, sondern vielmehr auch eine akute und lebensgefährliche Anämie. Da die Erythrozyten für den Sauerstofftransport und den Abtransport von Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) im Körper verantwortlich sind, kommt es bei anämischen Patienten schnell zu einer Sauerstoffunterversorgung des Gewebes und der Organe. Eine Bluttransfusion ist für diese Patienten daher lebensrettend. Zum jetzigen Zeitpunkt ist diese lebensrettende Bluttransfusion nur im Krankenhaus und nicht direkt am Unfallort möglich, so dass für die betroffenen Patienten während des Transportes zum Krankenhaus wertvolle, lebenswichtige Zeit verstreicht, bis eine angemessene Behandlung erfolgen kann. Darüber hinaus sind Blutkonserven auch in Katastrophen- und Krisengebieten aufgrund ihrer begrenzten Haltbarkeit<sup>3</sup> Mangelware und religiöse Gruppen wie z. B. die Zeugen Jehovas lehnen Fremdbluttransfusionen ganz ab<sup>4</sup>. Aus all diesen Gründen ist die Entwicklung künstlicher Sauerstoffträger in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die biologische Verträglichkeit neuartiger künstlicher Sauerstoffträger auf Perfluorcarbon-Basis nach intravenöser Applikation im Rattenmodell untersucht. Neben der Bestimmung der

akuten Toxizität und der *in vivo*-Verteilung wurden intravitalmikroskopische Untersuchungen der hepatischen Mikrozirkulation durchgeführt, um die Einflüsse der eingesetzten Kapselsysteme auf die mikrovaskuläre Perfusion beurteilen zu können. Darüber hinaus wurde die Sauerstofftransportkapazität der verwendeten künstlichen Sauerstoffträger bestimmt und deren Keimfreiheit überprüft.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Blut

Blut besteht aus einem flüssigen und einem zellulären Anteil, wobei der flüssige Anteil, das Blutplasma, zu ca. 90% aus Wasser besteht. Die restlichen 10% entfallen auf Proteine, Elektrolyte und kleinmolekulare organische Substanzen. Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten bilden die zellulären Anteile des Blutes (Abb. 1)<sup>5</sup>.

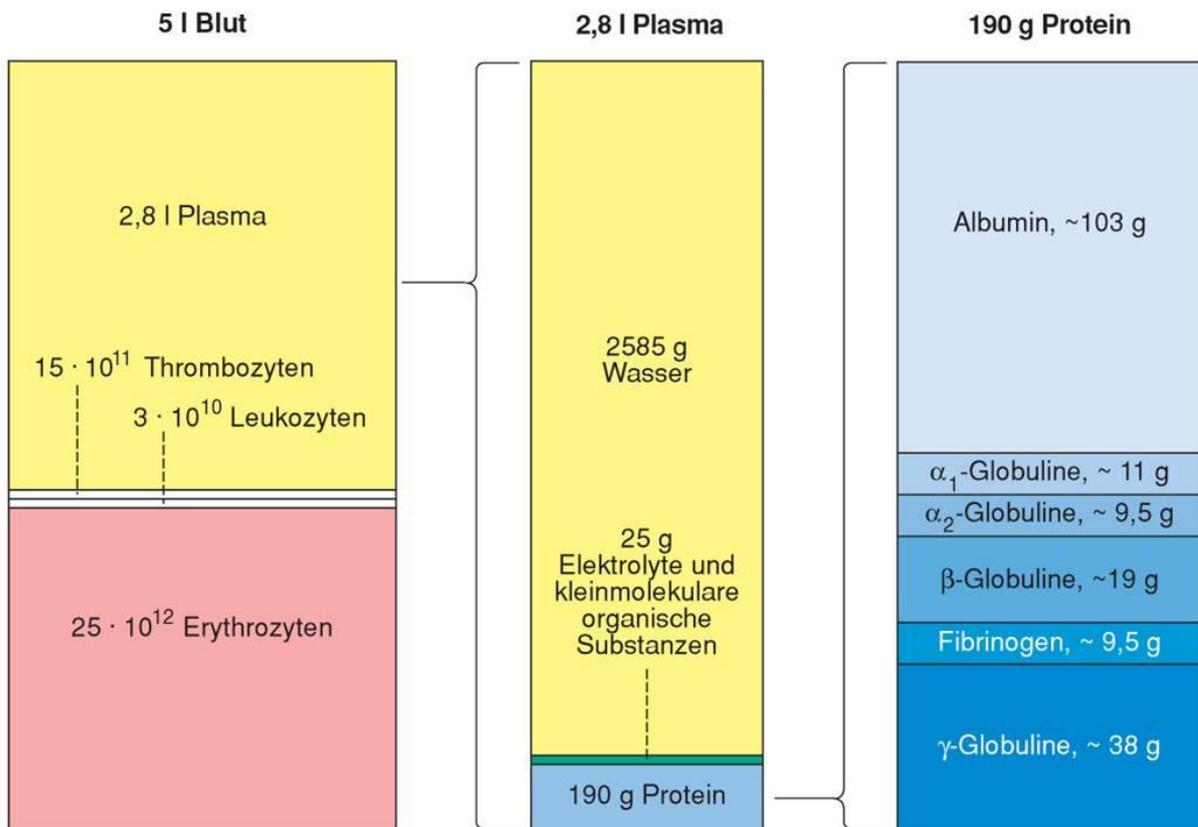
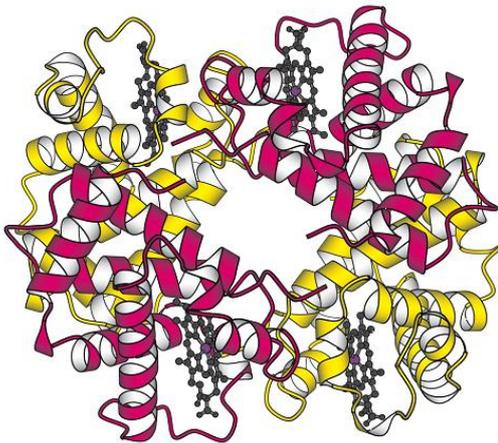


Abb. 1: Quantitative Zusammensetzung des Blutes (links), des darin enthaltenen Plasmas (Mitte) sowie der Plasmaproteine (rechts)<sup>5</sup>.

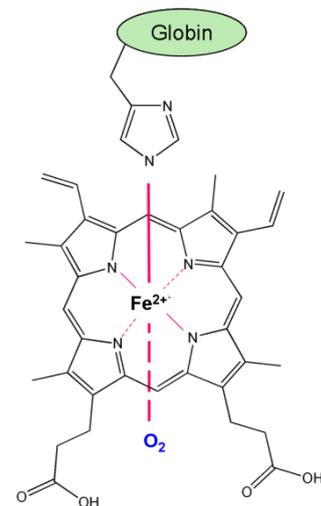
Über das weit verzweigte Gefäßsystem kann das Blut mit jedem Organ und jedem Körpergewebe interagieren. Es dient im Organismus als Transportmedium und erfüllt eine Vielzahl von Aufgaben, wie zum Beispiel den Transport von Nährstoffen, die

Regulation des Wärmehaushaltes, die Aufrechterhaltung des pH-Wertes, den Abtransport von Metaboliten oder den Transport von Botenstoffen, die der interzellulären Kommunikation dienen. Die wichtigste Aufgabe des Blutes ist jedoch die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff ( $O_2$ ) und der Abtransport von Kohlendioxid ( $CO_2$ ). Aufgrund der geringen physikalischen Löslichkeiten von  $O_2$  und  $CO_2$  im Blut, stehen die physikalisch im Blut transportierten Mengen dieser Gase quantitativ weit hinter den chemisch gebundenen Mengen zurück<sup>6</sup>. Sauerstoff wird daher zum größten Teil an Hämoglobin gebunden transportiert. Das in den Erythrozyten lokalisierte Hämoglobin ist ein oligomeres Protein, das als Tetramer vorliegt und ein Molekulargewicht von 64500 Da aufweist<sup>7</sup>. Die vier globulären Polypeptidketten umgeben jeweils eine prosthetische Hämgruppe (Abb. 2)<sup>5</sup>, die wiederum aus einer organischen Ringstruktur, dem Protoporphyrin IX, und einem zweiwertigen Eisen-Atom als Zentralatom aufgebaut ist (Abb. 3)<sup>7</sup>. Aufgrund seiner Elektronenkonfiguration kann das zentrale Eisen-Atom insgesamt sechs koordinative Bindungen eingehen. Vier Koordinationsstellen werden von Stickstoffatomen des Porphyrinsystems besetzt und über eine weitere Koordinationsstelle ist das Eisen-Atom mit einem Histidin-Rest der jeweiligen globulären Polypeptidkette verbunden. Die sechste Koordinationsstelle ist die Bindungsstelle für molekularen Sauerstoff (Abb. 3). Folglich kann ein Molekül Hämoglobin insgesamt vier  $O_2$ -Moleküle transportieren. Die Bindung von  $O_2$  an Hämoglobin erfolgt kooperativ, so dass mit zunehmender  $O_2$ -Sättigung die  $O_2$ -Affinität des Hämoglobins steigt, und die  $O_2$ -Bindungskurve sigmoidal verläuft<sup>8</sup>. Die  $O_2$ -Sättigung des Hämoglobins ist abhängig von der vorherrschenden 2,3-Bisphosphoglyceratkonzentration und lokalen Einflüssen wie Temperatur, pH-Wert,  $CO_2$ - und  $O_2$ -Partialdruck ( $pCO_2$  bzw.  $pO_2$ ). So erfährt das Hämoglobin in  $O_2$ -verbrauchenden Geweben eine Konformationsänderung, die zu einer Abnahme der  $O_2$ -Affinität führt (Bohr-Effekt)<sup>3, 7</sup>. Dies erleichtert die Abgabe von  $O_2$  ans Gewebe und  $CO_2$  kann an primäre

Aminogruppen der Globinketten gebunden und abtransportiert werden. Die in der Lunge vorherrschenden Bedingungen (niedrigere Temperatur, höherer pH-Wert, höherer  $pO_2$ , niedrigerer  $pCO_2$  und geringere 2,3-Bisphosphoglyceratkonzentration) bedingen eine erneute Konformationsänderung, so dass die  $O_2$ -affine Form des Hämoglobins entsteht (Haldane-Effekt)<sup>3, 7</sup>. Aus der Atemluft stammender  $O_2$  kann nun an das Hämoglobin binden, während  $CO_2$  abgegeben und exhaliiert wird<sup>3</sup>. Das auf diese Weise transportierte  $CO_2$  macht ca. 20% des bei der Zellatmung anfallenden  $CO_2$  aus<sup>3, 7</sup>. Der verbleibende Anteil wird mit Hilfe der Carboanhydrase in den Erythrozyten in Bikarbonat umgewandelt und physikalisch gelöst im Blut transportiert<sup>3, 7</sup>.



**Abb. 2: Das Tetramer Hämoglobin<sup>9</sup>.** Das in den Erythrozyten lokalisierte Hämoglobin ist aus insgesamt vier globulären Polypeptidketten aufgebaut, die jeweils eine Häm-Gruppe umgeben<sup>9</sup>.

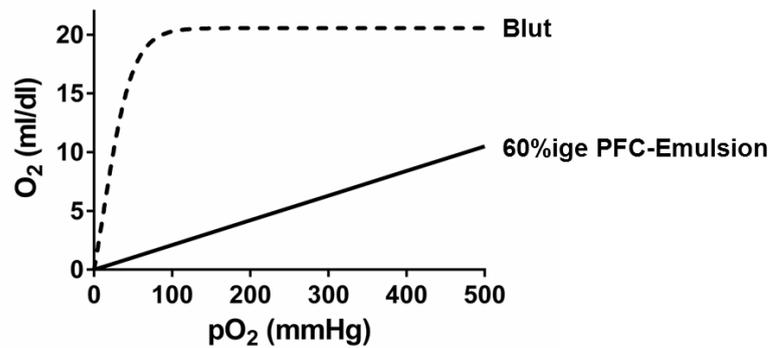


**Abb. 3: Struktur der Häm-Gruppen (modifiziert nach Nelson/Cox<sup>7</sup>).** Vier Koordinationsstellen des zentralen Eisen-Atoms werden von Stickstoffatomen des Porphyrinsystems besetzt. Über eine weitere ist das Eisen-Atom mit einem Histidin-Rest der jeweiligen globulären Polypeptidkette verbunden. Die sechste Koordinationsstelle ist die Bindungsstelle für molekularen Sauerstoff ( $O_2$ )

## 2.2 Perfluorcarbone

Perfluorcarbone (PFCs) sind vollständig fluorierte, rein synthetische Kohlenstoffverbindungen. Bedingt durch die große Anzahl an Fluor-Atomen weisen PFCs sehr starke intramolekulare Bindungen (Kohlenstoff-Fluor-Bindungsenergie beträgt ca.  $485 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) und gleichzeitig sehr schwache intermolekulare Wechselwirkungen (van-der-Waals-Kräfte) auf<sup>10</sup>. Neben der starken Kohlenstoff-Fluor-Bindung bewirken die elektronenziehenden Effekte der Fluor-Atome, die zu einer hohen Elektronendichte führen, eine zusätzliche Stabilisierung des Kohlenstoffgrundgerüsts durch elektronische Abschirmung. Das gesamte Molekül gewinnt so an Stabilität. Darüber hinaus sind PFCs aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften sowohl hydro- als auch lipophob, was in Verbindung mit der hohen Stabilität der Moleküle dazu beiträgt, dass PFCs chemisch und vor allem metabolisch inert sind. Daher gehen sie selbst mit hoch reaktiven Verbindungen keine Reaktion ein und können im Organismus keine schädlichen Metabolite bilden<sup>10</sup>. Sie werden im Organismus vor allem vom retikuloendothelialen System (RES) der Leber, der Milz und der Lunge durch Phagozytose aufgenommen. Auf Grund der fehlenden Metabolisierung werden sie nach und nach in kleinen Mengen wieder in die Blutbahn abgegeben<sup>11</sup>. Der hohe Dampfdruck der PFCs ermöglicht es, dass diese geringen Mengen in der Lunge exhalieren können<sup>11-14</sup>. Bedingt durch die schwachen intermolekularen Wechselwirkungen besitzen PFCs eine hohe Löslichkeit für respiratorische Gase wie  $\text{O}_2$  oder  $\text{CO}_2$ . Im Gegensatz zum Hämoglobin, in dem  $\text{O}_2$  chemisch an das zentrale Eisen-Atom gebunden wird, wird er im Falle der PFCs rein physikalisch in Hohlräumen zwischen den einzelnen Molekülen gelöst<sup>10, 15</sup>. Die Löslichkeit ist, dem Henry-Gesetz entsprechend, proportional zum jeweiligen Gas-Partialdruck und ist daher unabhängig von anderen Faktoren wie pH-Wert, Temperatur oder der Präsenz toxischer Rauchgase wie Kohlenmonoxid,

Cyanwasserstoff oder Schwefelwasserstoff<sup>1, 10, 11, 16, 17</sup>. Im Gegensatz zum Hämoglobin, dessen Sauerstoffbindungskurve sigmoidal verläuft, verlaufen die Sauerstoffbindungskurven von PFC-haltigen Präparaten linear (Abb. 4)<sup>1, 11, 18-20</sup>.

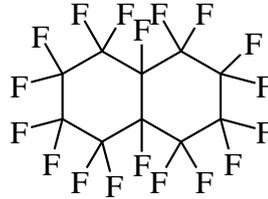


**Abb. 4: Schematische Darstellung der Sauerstoffbindungskurven von Blut und Perfluorcarbon-haltigen Präparaten (modifiziert nach Habler<sup>1</sup>).** Die O<sub>2</sub>-Bindungskurve von Blut (Hb-Gehalt ≈ 15 g/dl) zeigt aufgrund der kooperativen O<sub>2</sub>-Bindung einen sigmoidalen Verlauf. In PFC-haltigen Präparaten (hier: 60%ige Oxygent® Emulsion) wird O<sub>2</sub> rein physikalisch gelöst, weshalb die Löslichkeit proportional zum pO<sub>2</sub> ist und die O<sub>2</sub>-Bindungskurve einen linearen Verlauf zeigt.<sup>1</sup>

Ein adäquater Sauerstoffgehalt der PFCs kann folglich nur bei einem ausreichend hohen pO<sub>2</sub> erzielt werden, was eine Beatmung der Patienten mit 50-100%igem Sauerstoff erforderlich macht<sup>11</sup>.

Die hohe Sauerstofflöslichkeit (40-60 ml O<sub>2</sub> auf 100 ml PFC)<sup>21</sup>, die fehlende Metabolisierung und die Tatsache, dass sie synthetisch und somit keimfrei und unbegrenzt hergestellt werden können, machen PFCs zu einer attraktiven Stoffklasse für den Einsatz in der Medizin und der medizinische Forschung. Während PFCs in der Klinik bereits Anwendung in der Augenheilkunde bei *vitreoretinalen* Operationen<sup>22, 23</sup>, bei der Therapie von Neugeborenen in Form der Flüssigkeitsbeatmung<sup>24, 25</sup> oder in sehr geringen Dosen als Kontrastmittel für Ultraschalluntersuchungen („*microbubbles*“)<sup>26-29</sup> finden, können PFCs auch als potenzielle künstlicher Sauerstoffträger eingesetzt werden<sup>13, 15, 19, 30-32</sup>.

Eines der am besten erforschten PFCs in biologischen Systemen ist das flüssige Perfluordecalin (PFD –  $C_{10}F_{18}$ ). Chemisch betrachtet ist PFD ein perfluoriertes, bicyclische Alkan (Abb. 5) mit einer hohen Dichte von  $1,92 \text{ g/cm}^3$ .



**Abb. 5: Strukturformel des Perfluordecalins.**

## 2.3 Künstliche Blutersatzstoffe und künstliche Sauerstoffträger

Die Geschichte der Blutersatzstoffe ist eng mit der der Bluttransfusionen verbunden und kann bis zu den frühen menschlichen Kulturen zurückverfolgt werden<sup>3</sup>. Moderne Forschungsansätze zum künstlichen Blutersatz finden ihren Ursprung zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts<sup>3, 14</sup> mit der Entdeckung der Sauerstofftransportfunktion der Erythrozyten<sup>3</sup> und der Beschreibung des AB0-Systems durch Karl Landsteiner<sup>14, 33, 34</sup>. Diese Entdeckungen ermöglichten die Herstellung und Transfusion von Erythrozytenkonzentraten (EKs), wobei sich erstmals transfusionsassoziierte Risiken wie z. B. immunologisch vermittelte Transfusionsreaktionen oder transfusionsbedingte Infektionen zeigten<sup>35-38</sup>. Darüber hinaus ist aufgrund der demografischen Entwicklung in Zukunft von einem sinkenden Spenderaufkommen und einem gleichzeitig steigenden Bedarf an Spenderblut auszugehen, so dass mit einem zunehmenden Mangel an Blutkonserven zu rechnen sein wird<sup>2, 37, 39</sup>. Nicht zuletzt ist die kurze Haltbarkeit von Blutkonserven ein limitierender Faktor für Bluttransfusionen<sup>3</sup>. So können beispielsweise EKs je nach Herstellungsverfahren bei  $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  für nur 28-49 Tage gelagert werden<sup>37</sup>. Zudem wird diskutiert, ob die Lagerung Einfluss auf die klinische Effizienz oder auf die Nebenwirkungsprofile hat<sup>37, 40</sup>. Aufgrund all dieser Probleme ist die Entwicklung künstlicher Blutersatzstoffe gegenwärtig ein Forschungsgebiet von sehr großem Interesse. Momentane Forschungsansätze zu künstlichem Blutersatz konzentrieren sich hauptsächlich darauf, den Sauerstofftransport im Organismus zu gewährleisten, weshalb bisherige Entwicklungen auf diesem Gebiet als künstliche Sauerstoffträger ( $\text{O}_2$ -Träger) bezeichnet werden. Hierbei unterscheidet man hauptsächlich zwei Gruppen,

hämoglobinbasierte künstliche Sauerstoffträger (HbOCs) und perfluorcarbonbasierte künstliche Sauerstoffträger (PCOCs)<sup>1, 10, 14, 16, 41, 42</sup>.

### **2.3.1 Künstliche Sauerstoffträger auf Perfluorcarbonbasis (PCOCs)**

PCOCs bieten den großen Vorteil, dass sie steril, bzw. keimfrei, hergestellt werden können<sup>3</sup>. Aufgrund dessen können transfusionsassoziierte Risiken, wie zum Beispiel transfusionsbedingte Infektionen oder hämolytische Transfusionsreaktionen, vermieden werden. Im Gegensatz zu Bluttransfusionen können PCOCs blutgruppenunabhängig verabreicht werden und weisen je nach Lagerung eine Haltbarkeit von ein bis zwei Jahren auf<sup>16, 43</sup>. Im Vergleich zu vielen anderen Forschungsansätzen auf dem Gebiet der künstlichen Blutersatzstoffe können PCOCs nicht nur den Sauerstofftransport im Körper gewährleisten, sondern auch das im Gewebe bei Stoffwechselprozessen anfallende CO<sub>2</sub> wieder abtransportieren<sup>44</sup>. Aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften können sie therapeutisch sowohl als künstliche Blutersatzstoffe als auch bei Rauchgasvergiftungen eingesetzt werden. Die Präsenz von Rauchgasen, wie z. B. Kohlenmonoxid (CO), hat keinen Einfluss auf die Sauerstofftransportfähigkeit der PCOCs, so dass diese im Gegensatz zum Hämoglobin in den Erythrozyten im Falle einer Rauchgasvergiftung voll funktionsfähig bleiben und einen adäquaten Sauerstofftransport im Körper gewährleisten können<sup>45</sup>.

Ein genereller Nachteil von reinen Perfluorcarbonen ist, dass sie aufgrund ihres inerten Charakters nicht blutkompatibel sind. Um sie dennoch für intravenöse Anwendungen zugänglich zu machen, wurden sie in bisherigen *in vivo*-

Forschungsansätzen im Bereich künstlicher Sauerstoffträger ausschließlich als Emulsionen eingesetzt. Dabei zeigten sich jedoch spezifische Nebenwirkungsprofile, die mit kurzen Halbwertszeiten, einer Aktivierung des RES, Wechselwirkungen mit dem Emulgator und vor allem mit der Instabilität der Emulsionen durch Ostwaldreifung in Verbindung gebracht werden konnten<sup>19, 46-49</sup>. Produkte wie Fluosol-DA®, Perftoran®, Oxygent® und Oxycyte® wurden und werden noch in klinischen Studien geprüft<sup>1, 14, 16, 41-43, 50</sup>. Bislang wird keines der Präparate großflächig klinisch eingesetzt.

Im Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen und im Institut für Physikalische Chemie der Universität Duisburg-Essen wird in einem neuen, viel versprechenden Forschungsansatz das flüssige PFC Perfluordecalin in eine Polymerhülle eingekapselt, wodurch einige der oben genannten Probleme, wie z. B. die Instabilität der Emulsionen durch Ostwaldreifung vermieden werden können<sup>30, 32</sup>. Durch Oberflächenmodifikationen wie z. B. PEGylierung (Oberflächenmodifikation der Kapselhülle mit Polyethylenglykol (PEG)) kann die Kapselwand weiter funktionalisiert werden, so dass verlängerte Halbwertszeiten der Kapseln im Gefäßsystem erzielt werden können<sup>51, 52</sup>.

Als Kapselwandmaterialien werden die vollsynthetischen Polymere Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) und Poly(*n*-Butyl-Cyanacrylat) (PACA) sowie das natürlich vorkommende Biopolymer Albumin verwendet. Während für PFD-gefüllte PLGA- und PACA-Kapseln bereits eine generelle Verträglichkeit nach intravenöser Applikation beschrieben werden konnte<sup>32, 52</sup>, sind für PFD-gefüllte Albumin-Kapseln bislang noch keine *in vivo*-Daten verfügbar.

### 3 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Im Hinblick auf die Entwicklung künstlicher Blutersatzstoffe stellen PFCs aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften und ihres inerten Charakters eine ideale Substanzklasse für den Einsatz als künstliche Sauerstoffträger dar (siehe Abschnitt 2.2). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten PFD-gefüllten PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln sollen daher über lange Sicht als künstliche Sauerstofftransportsysteme bei der Therapie von generalisierten Gewebeischämien durch große Blutverluste oder Rauchgasvergiftungen Anwendung finden. Um das tatsächliche Potenzial der entwickelten Kapselsysteme als neue Arzneistoffe einschätzen zu können, ist es zwingend notwendig, zum einen die Nebenwirkungsprofile der PFD-gefüllten PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln zu ermitteln und zu analysieren und zum anderen die Sauerstoffkapazitäten dieser Kapseln zu kennen. Während im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. Waack bereits Untersuchungen zum Einfluss und zur Bioverträglichkeit von PFD-gefüllten PLGA-Kapseln im Rattenmodell durchgeführt wurden<sup>53</sup>, konnte für PFD-gefüllte PACA-Kapseln nur eine generelle Eignung für intravenöse Anwendungen beschrieben werden<sup>32</sup>. Zu den PFD-gefüllten Albumin-Kapseln sind bislang keine *in vivo*-Daten verfügbar.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand in der *in vitro*- und *in vivo*-Charakterisierung der PFD-gefüllten PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln, um das therapeutische Potenzial dieser Kapseln für einen Einsatz in der Notfallmedizin abschätzen zu können. Im Rahmen der *in vitro*-Charakterisierung sollten die Keimfreiheit und die mikrobielle Stabilität der Kapselsuspensionen überprüft und die Einflüsse der Kapselsuspensionen auf die dynamische Viskosität von Blut untersucht werden. Darüber hinaus sollte ein *in vitro*-Assay zur Messung der

Sauerstoffkapazitäten der unterschiedlichen Kapselsuspensionen etabliert werden. Die *in vivo*-Charakterisierung sollte es ermöglichen, die biologische Verträglichkeit der entwickelten Kapselsysteme zu beurteilen. Hierzu sollten u. a. die Einflüsse der Kapseln auf die Mikrozirkulation und die Integrität von Organstrukturen sowie auf systemische und metabolische Parameter geklärt werden. Eine Analyse der *in vivo*-Verteilung und der *intravasalen* Halbwertszeiten sollten zusätzliche Informationen im Hinblick auf die Nebenwirkungsprofile der Kapseln liefern. Die Untersuchungen zur biologischen Verträglichkeit der PLGA-Kapseln sollten dabei ergänzend zu den von Frau Dr. Waack durchgeführten Versuchen stattfinden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Pharmaka und Chemikalien

<u>Produkt / Substanz</u>	<u>Hersteller</u>
Forene®, Isofluran	Abbott (Wiesbaden, Deutschland)
Agar Agar	Merck (Darmstadt, Deutschland)
ALAT (GPT) FS (IFCC mod.)	DiaSys Diagnostic Systems (Holzheim, Deutschland)
ASAT (GOT) FS (IFCC mod.)	DiaSys Diagnostic Systems (Holzheim, Deutschland)
CASO-Bouillon	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
CK-NAC FS	DiaSys Diagnostic Systems (Holzheim, Deutschland)
Complete® Proteaseinhibitor	Roche (Mannheim, Deutschland)
Creatinine FS	DiaSys Diagnostic Systems (Holzheim, Deutschland)
Ethanol 99,8%	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
FITC-Dextran ( M = 150000 g/mol )	TdB consultancy (Uppsala, Schweden)
Formalin-Lsg., 10%, neutral gepuffert	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Freeflex®, Ringerlösung	Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland)
Glucose	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
HEPES	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Human Albumin 50g/L	Baxter Deutschland (Unterschleißheim, Deutschland)
Isotone Kochsalzlösung 0,9%ig	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Kaliumcyanid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ketamin (als Hydrochlorid) 10%ig	Ceva Tiergesundheit (Düsseldorf, Deutschland)
LAL Reagent Water	Lonza (Walkersville, USA)
LDH FS IFCC	DiaSys Diagnostic Systems (Holzheim, Deutschland)
Nilrot	Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Perfluordecalin HP	F2 Chemicals (Lancashire, UK)
Shandon Cryomatrix	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Trockenhefe	Aldi Nord (Deutschland)
Vectashield Einbettmedium mit DAPI H-1500	Vector Laboratories (Burlingham, USA)
Xylocain 1%ig (Lidocainhydrochlorid-Monohydrat)	AstraZeneca (Wedel, Deutschland)

## 4.1.2 Materialien und Geräte

<u>Produkt / Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Cardiff Aldasorber (Aktivkohlefilter)	Aldasorber® (Shirley Aldred, England)
Adhäsionsfolie aus Polyethylen (Frischhaltefolie)	FOLIA (Aldi Nord)
Axio Imager. A1 (Mikroskop)	Carl Zeiss Microscopy (Jena, Deutschland)
AxioCam MRc (Kamera)	Carl Zeiss Microscopy (Jena, Deutschland)
Bee Sana®, Vliesstoffkompressen	Karl Beese (Barsbüttel, Deutschland)
Biofuge 13	Heraeus Holding (Hanau, Deutschland)
Biofuge primo R	Heraeus Holding (Hanau, Deutschland)
Biomonitor Sirecust 1281	Siemens Medical Electronics (Danvers, MA, USA)
Blutgasanalysegerät ABL 715	Radiometer (Willich, Deutschland)
Cary 300 BIO UV-Visible Spectrophotometer	Varian (Darmstadt, Deutschland)
Chirurgische Instrumente	Fine Science Tools (Eckermünde, Deutschland)
Chirurgisches Nahtmaterial (Seide, nicht resorbierbar)	Resorba® (Nürnberg, Deutschland)
Deckgläser, Ø28 mm	Gerhard Menzel (Braunschweig, Deutschland)
Dreiwegehahn + Spülsystem (Druckdom)	Smiths Medical (Grasbrunn, Deutschland)
Drigalskispatel	Hedinger (Stuttgart, Deutschland)
Druckmanschette	MediPlac® (Borchen, Deutschland)
Druckwandler MX960	Medex Medical (Rossendale, England)
Einbettförmchen aus Kunststoff (verschiedene Größen)	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik (Emmendingen, Deutschland)
ELISA-Kit Komplementfragment C3a	Novatein Biosciences (Woburn, MA, USA)
ELISA-Kit Komplementfragment C5a	Shanghai BlueGene Biotech (Shanghai, China)
Eppendorf Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Reference® Pack (Pipetten)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Feinwaage 770	Kern & Sohn (Balingen, Deutschland)
Halbmikroküvetten, acryl Ø10 mm	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Hämatokrit-Versiegelungskit	Brand (Wertheim, Deutschland)
Hämatokrit-Zentrifuge Universal 320R	Hettich (Bäch, Schweiz)
Hamilton 705N, 50µl Spritze	Hamilton Company (Nevada, USA)
Hydragel Iso-CK k20	Sebia (Évry, Frankreich)
Infusionsgerät, IntrafixPrimeline	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Isofluran Vet. Med. Vapor	Drägerwerk (Lübeck, Deutschland)
KL 1500 LCD Kaltlichtquelle	Carl Zeiss Microscopy (Jena, Deutschland)
Kleintier OP-Tisch, beheizbar	Medax (Rendsburg, Deutschland)
Kryostat Leica CM1850 UV	Leica (Wetzlar, Deutschland)

Kurzzeitmesser	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Laser Scanning Mikroskop Typ LSM510	Carl Zeiss Microscopy (Jena, Deutschland)
Leica DMLM (Intravitalmikroskop)	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy (Jena, Deutschland)
Matrix Anesthetic Gas Scavenger	Midmark (Ohio, USA)
Medizinische Temperatursonde D-RB3	ASMUTH Medizintechnik (Minden, Deutschland)
Microlance Kanülen 0,6 mm x 30 mm	BD (Franklin Lakes, USA)
Mikro-Hämatokrit-Kapillare,	
Natriumheparinisiert	Brand (Wertheim, Deutschland)
Minisart Syringe Filter 0,20 µm	Sartorius Stedim Biotech (Göttingen, Deutschland)
Narkosegerät Trajan 800	Drägerwerk (Lübeck, Deutschland)
O2C (Oxygen to see)	LEA Medizintechnik (Giessen, Deutschland)
Objektträger, SuperFrost®, blau, geschnitten	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Original-Perfusor®-Spritze 50 ml	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Oxygraph-2K	Oroboros Instruments (Innsbruck, Österreich)
Perfusor® Secura FT	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Perfusor®-Leitung	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Petrischale 100 x 20 mm	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
PICO50 Probennehmer 2 ml (mit 80 IU	
Heparin)	Radiometer (Willich, Deutschland)
PoretexTMPolyethylen-Schläuche 0,58 mm	
ID, 0,96 mm OD	Smiths Medical (Grasbrunn, Deutschland)
Pulsoxymetriesensor, Nellcor™	Covidien (Mansfield, MA, USA)
Reaktionsgefäß 1 ml, 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reinstwassersystem Typ HP 6 UV/UF	TKA (Niederelbert, Deutschland)
Rheometer LS40	proRheo (Althengstett, Deutschland)
Rotationsmikrotom RM2235	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Schwingmühle MM200	Retsch (Haan, Deutschland)
Shandon Cassete/Biopsy, weiß	Thermo Fisher Scientific® (Kalamazoo, MI, USA)
Spritzen 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml	Terumo® Europe N.V. (Leuven, Belgien)
Spritzenpumpe Model 2010	Medfusion (Raleigh, USA)
Trockenschrank U25	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Tube 20 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Tube 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Vierwegehahn	Smiths Medical (Grasbrunn, Deutschland)
Vitalab Selectra E	Vital Scientific (Spankeren, Niederlande)
Wattestäbchen	MaiMed (Neueunkirchen, Deutschland)
Zelos-285M GV (Kamera)	Kappa Optronics (Gleichen, Deutschland)

### 4.1.3 Software

<u>Software</u>	<u>Hersteller</u>
Microsoft Officepaket 2003	Microsoft (Redmond, WA, USA)
Adobe Photoshop	Adobe Systems (München, Deutschland)
AxioVision Rel. 4.6	Carl Zeiss Microscopy (Jena, Deutschland)
GraphPad Prism 6	GraphPad Software (La Jolla, CA, USA)
Kappa CameraControl Zelos	Kappa Optronics (Gleichen, Deutschland)
Kappa ImageBase 2.8.2.11051	Kappa Optronics (Gleichen, Deutschland)

### 4.1.4 Versuchstiere

Alle Tierversuche im Rahmen dieser Arbeit wurden an männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 400-450 g durchgeführt. Die Tiere wurden im Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen (ZTL) gezüchtet. Die Haltung erfolgte nach geltenden Tierschutzgesetzen ebenfalls im ZTL unter standardisierten Bedingungen bei konstanter Temperatur ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) und konstanter Luftfeuchtigkeit ( $55\% \pm 5\%$ ). Die Tiere unterlagen einem zwölfstündigen Hell-Dunkelrhythmus. Futter (Ssniff®-Spezialdiäten, Soest, Deutschland) und Wasser waren jederzeit frei zugänglich. Alle durchgeführten Tierversuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) genehmigt (G1242/11, AZ 84-02.04.2011.A361 und G1383/13, AZ 84-02.04.2013.A391).

### 4.1.5 Verwendete Kapseltypen

Für die Versuche in dieser Arbeit wurden insgesamt drei verschiedenen Kapseltypen eingesetzt, die sich in Kapselwandmaterial, Größe und Gewicht voneinander unterschieden. Zur intravenösen Applikation wurden die Kapseln in Trägerlösung (0,9%ige Kochsalz (NaCl)-Lsg. oder 5%ige Albumin-Lsg.) suspendiert. Um die Ergebnisse der Versuche untereinander vergleichen zu können, wurde der Volumenanteil der Kapseln am Gesamtvolumen der jeweiligen Suspension mit Hilfe einer Hämatokritzentrifuge auf 8 Vol.-%  $\pm$  1 Vol.-% eingestellt. Die Albuminkapseln wurden für weiterführende Versuche zusätzlich auf Volumenanteile von 32 Vol.-%  $\pm$  1 Vol.-% und 64 Vol.-%  $\pm$  1 Vol.-% eingestellt.

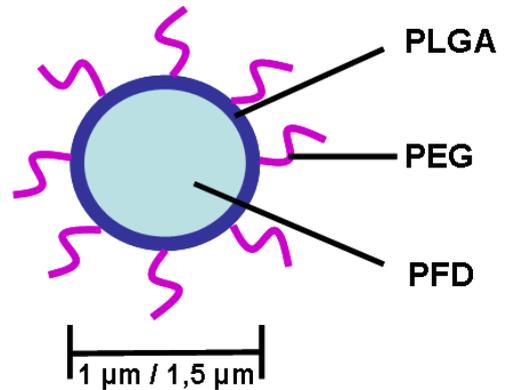
Die Konzentrationen der Kapselsuspensionen wurden in mg/ml bestimmt. Hierzu wurde jeweils 1 ml der entsprechenden Suspension bei 4500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Kapsel pellet bei 37°C getrocknet und konstant gewogen.

#### PLGA-Mikrokapseln

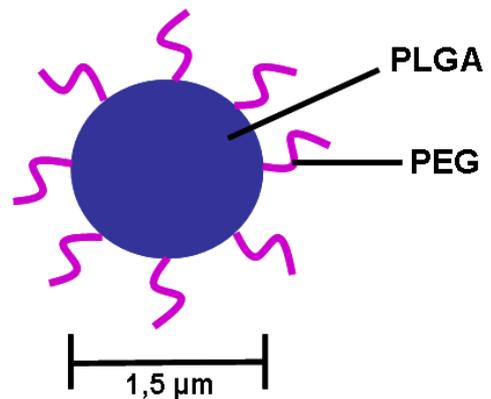
Die verwendeten PLGA-Kapseln wurden als Suspension in 0,9%iger Kochsalzlösung in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Michael Kirsch (Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen) hergestellt und für die Versuche, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, zur Verfügung gestellt<sup>52</sup>. Die Synthese der Kapseln beruhte dabei auf einem Emulsions-Evaporations-Verfahren nach Pisani *et. al.*<sup>52, 54</sup>. Zum Schutz vor Opsonierung war die Oberfläche der PLGA-Kapseln mit PEG funktionalisiert (Abb. 6). Neben PFD-gefüllten PLGA-Mikrokapseln wurden zusätzlich PEGylierte PLGA-Mikrosphären eingesetzt, die frei von PFD waren (Abb. 7). Die Synthese der PFD-freien PLGA-Mikrosphären erfolgte analog zur Synthese der PFD-gefüllten PLGA-Mikrokapseln. Die Durchmesser der PLGA-

Mikrokapseln und PLGA-Mikrosphären sowie die Konzentrationen der Suspensionen sind in Tabelle 1 zusammengefasst (Tab. 1).

**Abb. 6: Aufbau einer PLGA-Mikrokapsel.** Flüssiges Perfluordecalin (PFD) wurde in eine Polymerhülle aus Poly(lactid-co-glycolid) eingekapselt. Zum Schutz vor Opsonisierung wurde die Oberfläche der PLGA-Mikrokapseln mit Polyethylenglykol (PEG) funktionalisiert. Der mittlere Durchmesser der Kapseln betrug entweder 1 oder 1,5  $\mu\text{m}$ .



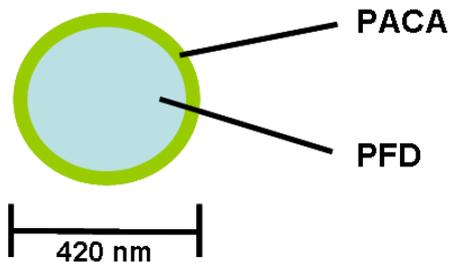
**Abb. 7: Aufbau einer PLGA-Mikrosphäre.** Im Gegensatz zu den PLGA-Mikrokapseln besaßen die PLGA-Mikrosphären keine PFD-Füllung. Sie bestanden aus reinem Poly(lactid-co-glycolid). Die Oberfläche wurde zum Schutz vor Opsonisierung ebenfalls mit Polyethylenglykol (PEG) funktionalisiert. Der mittlere Durchmesser der Sphären betrug 1,5  $\mu\text{m}$ .



### PACA-Nanokapseln

Die PACA-Nanokapseln wurden im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Christian Mayer (Institut für Physikalische Chemie, Universität Duisburg-Essen) synthetisiert und für die Versuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zur Verfügung gestellt<sup>32, 55</sup>. Der Aufbau einer solchen Kapsel ist in Abbildung 8 dargestellt (Abb. 8). Da die PACA-Kapseln als Suspension in wässriger Lösung vorlagen, wurde die Osmolarität der Suspension zur intravenösen Anwendung durch Zugabe von

Natriumchlorid (7,9 mg/ml) an die des Blutes angepasst. Durchmesser und Konzentration der Suspension sind in Tabelle 1 zusammengefasst (Tab. 1).

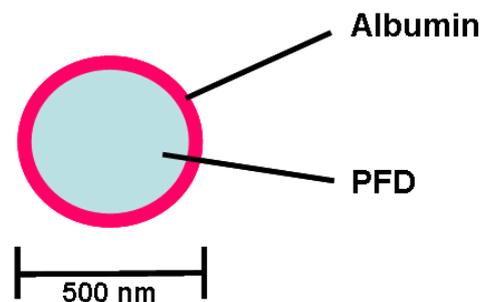


**Abb. 8: Aufbau einer PACA Nanokapsel.** Eine Polymerhülle aus Poly(*n*-Buty-Cyanoacrylat) (PACA) umgibt einen flüssigen Kern aus Perfluordecalin (PFD). Der mittlere Kapseldurchmesser betrug  $420 \text{ nm} \pm 65 \text{ nm}$ .

### Albumin-Nanokapseln

Modifiziert nach der Synthese von Sloviter *et al.*<sup>56</sup> wurden die eingesetzten Albumin-Nanokapseln im Arbeitskreis von Frau Dr. Katja Ferez aus 5%igem humanen Serumalbumin (HSA) und PFD mit Hilfe einer Ultraschallsonde hergestellt und für die Versuche in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Der Aufbau einer Albumin-Kapsel ist in Abbildung 9 dargestellt (Abb. 9). Für intravenöse Anwendung wurden die Kapseln in 5%iger Albumin-Lösung suspendiert. Durchmesser und Konzentration der Suspensionen sind in Tabelle 1 zusammengefasst (Tab. 1).

**Abb. 9: Aufbau einer Albumin-Nanokapsel.** Das Biopolymer Albumin umgibt das flüssige PFC Perfluordecalin (PFD). Der mittlere Durchmesser der Kapseln betrug 500 nm.



Kapseltyp	Durchmesser	Volumenanteil (Vol.-%)	Konzentration (mg/ml)	Trägerlösung
PLGA-Kapseln	≈ 1,5 µm	8 ± 1	125,06 ± 2,21	NaCl-Lsg. 0,9 %
	≈ 1,0 µm	8 ± 1	104,41 ± 9,02	NaCl-Lsg. 0,9 %
PLGA-Sphären	≈ 1,5 µm	8 ± 1	64,51 ± 1,02	NaCl-Lsg. 0,9 %
PACA-Kapseln	≈ 400 nm	8 ± 1	106,59 ± 7,95	NaCl-Lsg. 0,9 %
Albumin-Kapseln	≈ 500 nm	8 ± 1	2,3 ± 0,84	Albumin-Lsg. 5%
		32 ± 1	11,50 ± 0,69	Albumin-Lsg. 5%
		64 ± 1	23,15 ± 1,11	Albumin-Lsg. 5%

**Tab. 1: Durchmesser der verschiedenen Kapseltypen sowie Volumenanteile, Konzentrationen und Trägerlösungen der jeweiligen Suspensionen.**

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Mikrobiologische Testreihen

Um ausschließen zu können, dass eventuelle Effekte nach intravenöser Applikation der Kapselsuspensionen durch eine Kontamination der Suspensionen mit Bakterien und Pilzen hervorgerufen werden, wurden mikrobiologische Testreihen durchgeführt, die es ermöglichten, die Keimfreiheit der verwendeten Suspensionen sicherzustellen.

Nach dem europäischen Arzneibuch (*pharmacopoea europaea, Ph. Eur.*) wird der Einsatz von CASO-Bouillon sowohl zum Nachweis verschiedener Bakterien, wie z. B. Salmonellen, *Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus* oder *Pseudomonas aeruginosae*, als auch zum Nachweis von Pilzen und Hefen empfohlen<sup>57, 58</sup>. CASO-Bouillon besitzt eine hohe Nährstoffdichte und fördert das Wachstum selbst von anspruchsvollen Mikroorganismen.

An den jeweiligen Versuchstagen wurden Rückstellproben der intravenös applizierten Kapselsuspensionen auf CASO-Bouillon-haltigen Agarplatten unter der Sterilbank ausplattiert.

Aufgrund des teilweise aufwendigen und zeitintensiven Herstellungsverfahrens der Kapselsuspensionen und der zum Teil großen Synthesevolumina sollte die Überprüfung der mikrobiellen Stabilität Aufschluss darüber geben, ob eine Keimfreiheit auch bei längerer Lagerung gewährleistet werden kann. Dazu wurde ein Ansatz der jeweiligen Kapselsuspension über einen Zeitraum von vier Wochen im Kühlschrank gelagert, aus dem zweimal wöchentlich Proben ausplattiert und beurteilt wurden.

### **Ansetzen der Agarplatten**

Zum Ansetzen von ca. 12 Agarplatten wurden 250 ml einer CASO-Bouillon-Lösung (30 g CASO-Bouillon auf 1 l *Aqua bidest*) mit 3,75 g Agar versetzt und autoklaviert. Bei ca. 50°C wurde die noch flüssige Agar-Lösung aus dem Autoklaven genommen und umgehend unter der Sterilbank in 20 ml Portionen in sterile Petrischalen gegossen. Die Petrischalen wurden bis zum Erkalten mit geschlossenem Deckel unter der Sterilbank stehen gelassen. Die fertigen Agarplatten wurden mit dem Datum der Herstellung beschriftet und bis zu vier Wochen im Kühlschrank gelagert. Zur Überprüfung der aktuellen Charge Agarplatten wurden sowohl eine Negativ-Kontrolle mit sterilem Wasser als auch eine Positiv-Kontrolle mit Darmkeimen angesetzt.

### **Ausplattieren der Kapselsuspensionen**

Zum Ausplattieren der Kapselsuspensionen wurden an den Versuchstagen 500 µl der jeweiligen Suspension unter der Sterilbank auf die Mitte der Agarplatte pipettiert. Anschließend wurde die Suspension mit einem sterilen Drigalskispatel gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Sobald der Flüssigkeitsfilm in das Agar-Gel eingezogen war, wurde die Petrischale mit Deckel verschlossen und bei 37°C für 72 Stunden in den Wärmeschrank gestellt. Zusätzlich wurde jedes Mal eine Negativ-Kontrolle mit sterilem Wasser angefertigt.

### **Beurteilung der Keimfreiheit**

Nachdem die Agarplatten mit den Proben in den Wärmeschrank gestellt wurden, erfolgte alle 24 Stunden eine Überprüfung der Platten auf Kontamination. War nach drei Tagen noch immer kein Wachstum von Bakterien, Pilzen oder Hefen zu sehen, wurden die entsprechenden Proben nachträglich als keimfrei deklariert, womit die betreffenden Versuche als valide angesehen und für die Gesamtauswertung

herangezogen wurden. Aufgrund dieses Vorgehens konnte sichergestellt werden, dass auftretende Effekte nach Infusion der Kapselsuspensionen nicht auf Kontamination mit Bakterien oder Pilzen zurückzuführen waren.

## **4.2.2 Allgemeiner Operationsablauf**

### **Anästhesie und Analgesie**

Zur Narkoseeinleitung wurden die Ratten in einen Begasungstopf gesetzt, der mit Isofluran geflutet wurde (2% Isofluran in 100% O<sub>2</sub>, Durchfluss: 4 l/Min). Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe bzw. des gewünschten Toleranzstadiums<sup>59</sup> wurden die Ratten in Rückenlage auf einen beheizbaren OP-Tisch gelegt (38°C – 40°C), wo die fortwährende Narkoseführung über eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (1,5-2% in 100% O<sub>2</sub>, Durchfluss: 1 l/Min) erfolgte. Zur Analgesie wurde den Ratten Ketamin (50 mg/kg KGW) subkutan in die linke Flanke injiziert. Des Weiteren erfolgte eine Lokalanästhesie der rechten Leistengegend durch subkutane Applikation von Xylocain (5 mg/kg KGW). Zur Atemwegssicherung wurde die Zunge leicht exponiert und mit einem Holzstäbchen fixiert. Um ein Auskühlen der Tiere zu verhindern, wurden diese entweder mit Aluminium- oder mit Polyadhäsionsfolie zugedeckt.

Während des gesamten Versuchs wurde die Narkosetiefe der Tiere stets mit Hilfe des Zwischenzehenreflexes und des Corneareflexes überwacht und bei Bedarf über die Isofluran-Konzentration (im Bereich zwischen 1,5 und 2%) im Atemgas nachreguliert. Darüber hinaus konnte nach Katheterisierung der Femoralgefäße zusätzlich der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) zur Beurteilung der Narkosetiefe herangezogen werden.

### **Katheterisierung der Femoralgefäße**

Mit Ausbleiben des Zwischenzehen- und Corneareflexes erfolgte rechtsseitig eine inguinale Inzision. Die *arteria* und *vena femoralis* wurden vorsichtig freipräpariert und voneinander separiert. Um die Gefäße katheterisieren zu können, wurden diese mit Hilfe von einer Pinzette aufgebockt und anschließend distal ligiert. An der proximalen Seite wurde ebenfalls eine Ligatur eingebracht, die jedoch zunächst nur angeschlungen wurde. Mit einer Gefäßschere wurde die Gefäßwand leicht angeschnitten, so dass die Katheter vorsichtig in die Gefäße eingelegt werden konnten. Die Katheter wurden anschließend mit den bereits angeschlungenen proximalen Ligaturen und den distalen Ligaturen fixiert. Um möglichst zeitnah mit dem Biomonitoring beginnen zu können und somit eine einwandfreie Narkoseführung zu gewährleisten, wurde zuerst der Arterienkatheter gelegt. Das Biomonitoring wurde umgehend gestartet. Es erfolgte eine erste Blutentnahme (BGA 1; 0,5 ml) zur Blutgasanalyse und zur Bestimmung von Schädigungsparametern. Anschließend erfolgte die Katheterisierung der *vena femoralis*. Über den Venenkatheter wurde kontinuierlich 0,9%ige NaCl-Lsg. infundiert, um narkosebedingte Flüssigkeitsverluste der Tiere auszugleichen. Die Infusionsrate betrug immer 5 ml/kg KGW.

### **Biomonitoring und Basiswerte**

Nach Katheterisierung der Femoralgefäße wurden die Vitalparameter der Tiere kontinuierlich überwacht. Hierzu wurden MAP, Herzfrequenz, Atemfrequenz, Körpertemperatur, Sauerstoffsättigung und die aktuelle Isoflurankonzentration in 10-minütigen Abständen kontrolliert und dokumentiert. Das Biomonitoring gab daher während der gesamten Versuchsdauer Aufschluss über das Befinden und die Narkosetiefe der Tiere. Während der ersten 30 Minuten nach Beginn des Biomonitorings wurden die so genannten Basiswerte erfasst. In diesem Zeitraum

wurden keine Eingriffe am Tier vorgenommen. Er diente ausschließlich der Akklimatisierung der Tiere und der Feineinstellung der Narkosetiefe.

### **Blutgasanalysen und Bestimmung von Schädigungsparametern**

Mittels Blutgasanalysen (BGAs) können unter anderem Aussagen über den Säure-Base-Haushalt, den pH-Wert und die Gasverteilung von Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) im Blut gemacht werden. Zur Messung einer BGA wird arterielles, heparinisiertes Vollblut benötigt. Dazu wurden mit einem 2 ml Probennehmer (PICO50), der 80 IU elektrolyt-kompensiertes Heparin enthielt, 0,5 ml Blut über den Katheter in der *Arteria femoralis* entnommen. Anschließend wurden aus 100 µl des abgenommenen Blutes mittels Blutgasanalysen-Gerät die Parameter pH-Wert (pH), Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck (pO<sub>2</sub> und pCO<sub>2</sub>), arterielle O<sub>2</sub>-Sättigung, Base Excess (BE), Standardbicarbonat, Hämoglobingehalt (Hb) und Hämatokrit (Hkt) bestimmt. Darüber hinaus wurden die Metabolite Glukose und Laktat sowie die Elektrolyte Kalium (K<sup>+</sup>), Calcium (Ca<sup>2+</sup>), Natrium (Na<sup>+</sup>) und Chlorid (Cl<sup>-</sup>) gemessen. Aus dem restlichen Blutvolumen wurde mittels Zentrifugation (4500 x g; 5 Min) Blutplasma gewonnen, aus dem verschiedene Schädigungsparameter bestimmt werden konnten. Als Indikatoren für einen Leberschaden wurden die Leberenzyme Alanin-Aminotransferase (ALAT) und die Aspartat-Aminotransferase (ASAT) gemessen. Als Schädigungsparameter für die Nieren wurde Creatinin bestimmt. Die Creatin-Kinase (CK-NAC) gab Aufschluss über Schädigungen von Herz- und Skelettmuskelzellen. Die Laktatdehydrogenase (LDH) diente als unspezifischer Schädigungsparameter, da sie in fast allen Geweben vorkommt.

## **Euthanasie und Organentnahme**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Überlebensversuche durchgeführt. Alle Tiere wurden am Ende der Versuche durch eine Überdosierung der Narkose (Isoflurankonzentration 5%) und eine anschließende Organentnahme getötet. Mit den entnommenen Organen wurden histopathologische Untersuchungen durchgeführt oder es wurden kryohistologische Schnittpräparate angefertigt, die fluoreszenzmikroskopisch analysiert wurden.

### **4.2.3 Intravitalmikroskopie der Leber zur Bestimmung der prozentualen Anzahl perfundierter Gefäße und des mittleren Gefäßdurchmessers nach intravenöser Applikation von PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln**

Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie (IVM) konnten Aussagen über die hepatische Mikrozirkulation getroffen werden. Bestimmt wurden die prozentuale Anzahl perfundierter Gefäße in der Leber während und nach Kapselinfusion sowie der mittlere hepatische Gefäßdurchmesser während der Infusionsphase. Zusätzlich zu den PFD-gefüllten PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln wurden PFD-freie PLGA-Mikrosphären infundiert, um abzuklären, ob die PFD-Füllung der Kapseln einen Einfluss auf die Mikrozirkulation ausübt. Die Anzahl der Tiere in den einzelnen Versuchsgruppen ist in Tabelle 2 dargestellt (Tab. 2).

Versuchsgruppen	Anzahl der Tiere
NaCl 0,9%	6
Albumin 5%	6
PLGA-Kapseln ( $\varnothing = 1,5 \mu\text{m}$ )	6
PLGA-Kapseln ( $\varnothing = 1 \mu\text{m}$ )	6
PLGA-Sphären ( $\varnothing = 1,5 \mu\text{m}$ )	6
PACA-Kapseln	6
Albumin-Kapseln 8 Vol.-%	6
Albumin-Kapseln 32 Vol.-%	6
	<b><math>\Sigma</math>Tiere = 48</b>

Tab. 2: Anzahl der Tiere für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen.

### Prinzip der Messung

Bei der Intravitalmikroskopie handelt es sich im Generellen um Fluoreszenzmikroskopie, eine spezielle Form der Lichtmikroskopie. Um Fluoreszenzmikroskopie durchführen zu können, benötigt man Fluoreszenzfarbstoffe, so genannte Fluorochrome.

Nach Freipräparation der Leber und intravenöser Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes und Plasmamarkers FITC-Dextran ( $\lambda_{\text{ex}} = 450\text{-}490 \text{ nm}$ ) konnten die oberflächennahen hepatischen Gefäße mit Hilfe eines Intravitalmikroskops dargestellt werden. Die Aufnahme von kurzen Videosequenzen ermöglichte die Bestimmung der prozentualen Anzahl perfundierter Gefäße vor, während und nach intravenöser Infusion der Kapselsuspensionen. Pro Videosequenz wurden insgesamt fünf Gesichtsfelder mit je fünf gut sichtbaren Gefäßen über den Zeitverlauf betrachtet, so dass die prozentuale Anzahl der zu den einzelnen Zeitpunkten perfundierten Gefäße berechnet werden konnte.

Darüber hinaus konnte anhand von Standbildern mit Hilfe einer Vermessungs- und Markierungssoftware der mittlere hepatische Gefäßdurchmesser festgestellt werden. Pro Standbild wurde der Durchmesser von insgesamt fünf verschiedenen Gefäßen ermittelt, wobei der Durchmesser zu Beginn der Infusionsphase als 100% angenommen wurde.

### Prinzip der Fluoreszenz

Gibt ein durch Strahlung elektronisch angeregtes Molekül oder Atom seine überschüssige Energie wieder an die Umgebung ab, bezeichnet man dies als „strahlende Desaktivierung“. Bei der Abgabe der überschüssigen Energie erfolgt zunächst ein strahlungsloser Übergang eines Elektrons in den Schwingungsgrundzustand. Danach fällt das Elektron zurück in ein Orbital mit niedrigerem Energieniveau. Das Molekül kehrt in den elektronischen Grundzustand zurück. Wenn dabei ein Photon freigesetzt wird und die emittierte Strahlung im sichtbaren Spektralbereich liegt (400-750 nm), kann das freigesetzte Licht vom Betrachter wahrgenommen werden und man spricht von Fluoreszenz (Abb. 10)<sup>60-63</sup>.

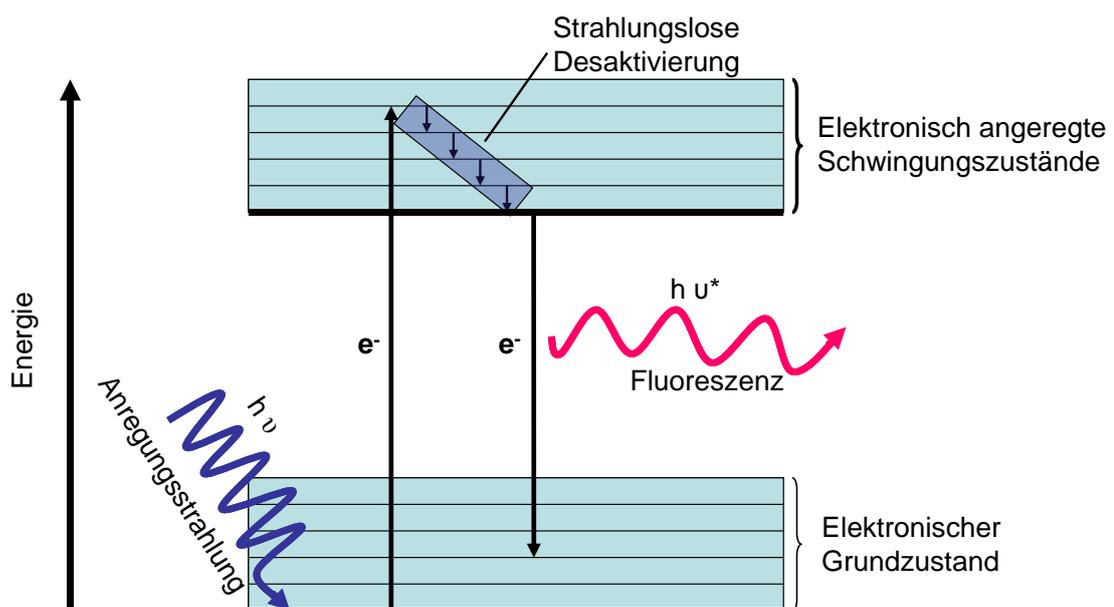
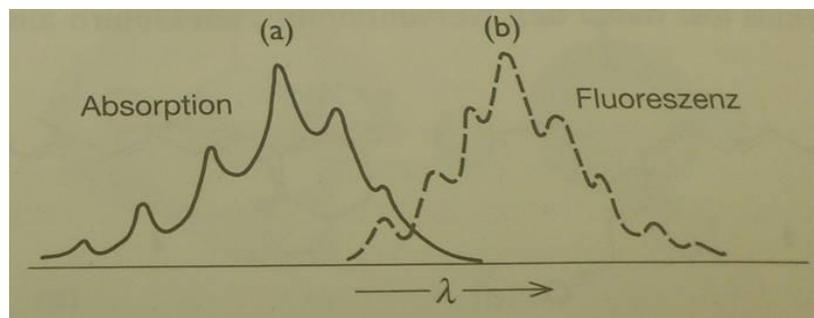


Abb. 10: Mechanismus der Fluoreszenz (Modifiziert nach P. W. Atkins)<sup>61</sup>.

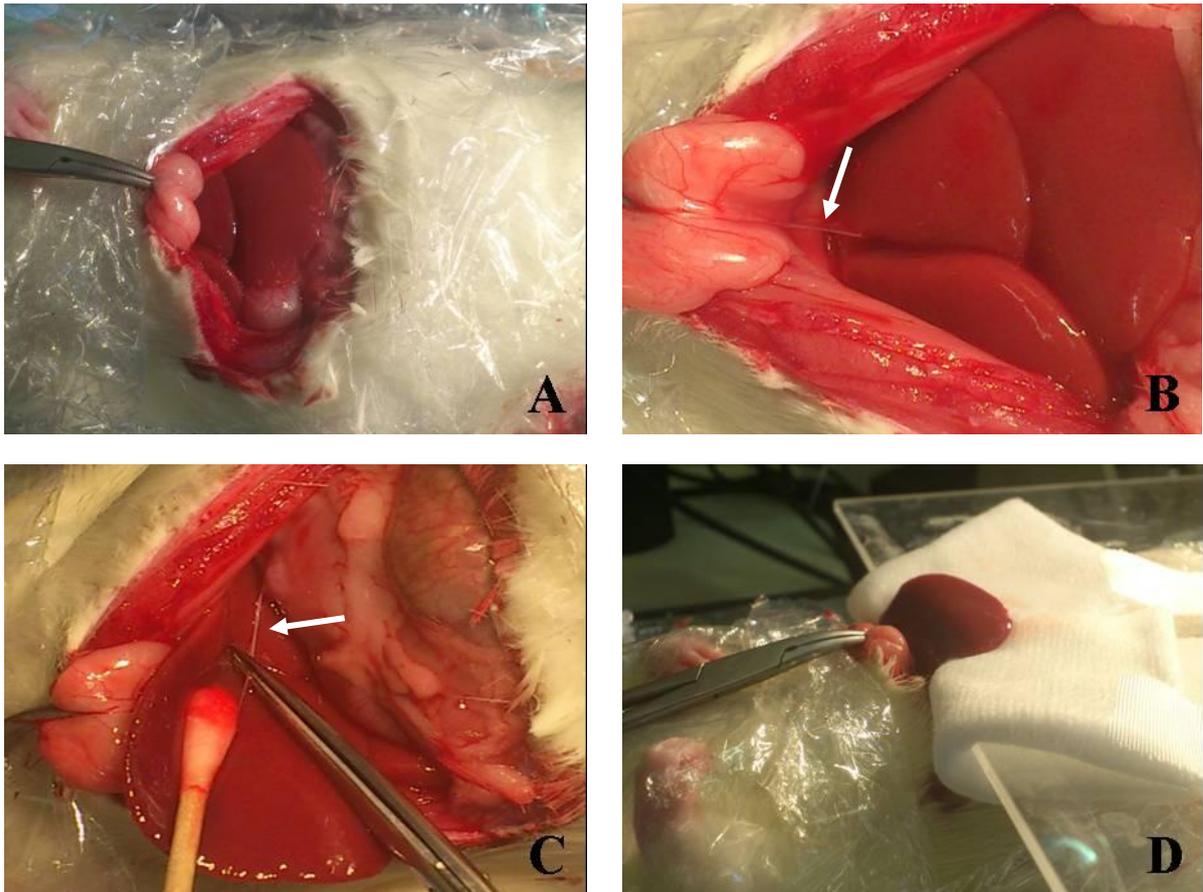
Der Prozess der Fluoreszenz ist in einem Zeitrahmen von ca. 10-100 ns angesiedelt, wobei die Farbe des emittierten Lichts von der Anregungsstrahlung abhängt. Die emittierte Strahlung weist dabei eine größere Wellenlänge auf als die Anregungsstrahlung<sup>60, 61</sup>. Das bedeutet, dass das Fluoreszenzspektrum im Vergleich zum Absorptionsspektrum zu niedrigeren Frequenzen bzw. höheren Wellenlängen hin verschoben ist (Abb. 11). Diese Verschiebung wird als „Stokes' Shift“ bezeichnet<sup>62</sup>.



**Abb. 11: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum.** Das Absorptionsspektrum gibt die Schwingungsstruktur des angeregten Zustandes wieder (a), das Fluoreszenzspektrum die des Grundzustandes (b). Das Fluoreszenzspektrum ähnelt einem Spiegelbild des Absorptionsspektrums (mit  $\lambda$ : Wellenlänge).<sup>60</sup>

### Allgemeiner Versuchsablauf bei der Intravitalmikroskopie

Der allgemeine Operationsablauf ist in Abschnitt 4.2.2 beschrieben. Nach Erhalt der Basiswerte (siehe Abschnitt 4.2.2) erfolgte eine mediane Laparatomie von ca. 8-9 cm und die Leber wurde vorsichtig frei präpariert (Abb. 12). Hierzu wurden zunächst das *ligamentum coronarium* und das *ligamentum hepato gastricum* durchtrennt (Abb. 12 B/C). Anschließend wurde der linke mittlere Leberlappen (*lobus medialis sinister*) mit Hilfe eines feuchten Wattestäbchens unter größter Vorsicht auf einen speziell dafür angefertigten Tisch ausgelagert (Abb. 12 D). Dieser wurde zuvor mit feuchten Vlieskompressen abgepolstert, um Druckstellen an der Leber zu vermeiden.



**Abb. 12: Freipräparation und Auslagerung der Leber.**

Nach medianer Laparatomie (A) wurden die *ligamenta coronarium* (B) und *hepato gastricum* (C) durchtrennt. Der *lobus medialis sinister* wurde mit Hilfe von feuchten Wattestäbchen unter Vermeidung von Druckstellen vorsichtig auf einen für diesen Zweck angefertigten Tisch ausgelagert (D).

Die Auslagerung war zwingend notwendig, um störende Atembewegungen zu minimieren, so dass einwandfreie Aufnahmen der oberflächennahen Kapillaren in der Leber gemacht werden konnten. Die Leber und der gesamte Operationsbereich wurden mit Polyadhäsionsfolie abgedeckt. Der Mikroskopierbereich wurde mit einem Deckgläschen bedeckt (Abb. 13). So konnte zum einen ein Auskühlen der Tiere verhindert und zum anderen die Organe im Bauchraum feucht gehalten werden.



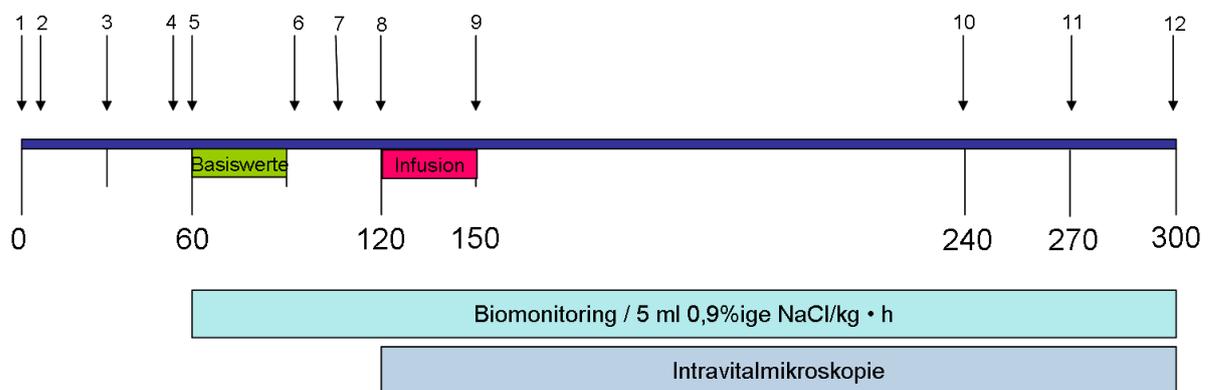
**Abb. 13: Abdecken des Operationsbereichs.**

Das Abdecken des Operationsbereichs mit Polyadhäsionsfolie verhinderte das Auskühlen des Tieres und ein Austrocknen des Gewebes. Durch Abdecken des Mikroskopierbereichs mit einem Deckgläschen wurde eine glatte Oberfläche für die Intravitalmikroskopie geschaffen.

Im Anschluss an die Organauslagerung erfolgte eine Blutentnahme zu Analysezwecken (BGA 2). Zur Kontrastierung der Blutgefäße wurde das Fluorochrom FITC-Dextran ( $\lambda_{\text{ex}}=450-490\text{ nm}$ ) als 5%ige Lösung in NaCl (0,9%) über den Venenkatheter appliziert (1 ml/kg KGW). Danach schloss sich eine 15-minütige Beobachtungsphase an. Diese diente dazu, eventuelle Einflüsse des FITC-Dextrans auf die Vitalparameter der Tiere auszuschließen. Darüber hinaus konnte so eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffes im Gefäßsystem gewährleistet werden. Im Anschluss an diese Beobachtungszeit wurde die Intravitalmikroskopie gestartet. Bis zum Ende des Versuchs wurden alle zehn Minuten für ca. zehn Sekunden Videosequenzen der hepatischen Mikrozirkulation aufgezeichnet. Die Bestrahlungsintervalle wurden bewusst kurz gewählt, so dass das Risiko von Gewebeschädigungen minimal gehalten werden konnte. Simultan zur Intravitalmikroskopie wurde die Infusion der Kapselsuspensionen bzw. der Kontroll-Lsg. gestartet. Die Infusion erfolgte mit Hilfe einer Infusionspumpe über einen Zeitraum von 30 Minuten in die *vena femoralis*. Um die Infusion für alle Kapseltypen zu standardisieren, wurde die Katheterlänge immer gleich lang gewählt (20 cm). Das Infusionsvolumen betrug in allen Versuchen 10 ml/kg KGW. Nach beendeter Infusion wurde der Venenkatheter mit 0,5 ml NaCl (0,9%) gespült.

### Intravitalmikroskopische Untersuchungen zu den PLGA- und PACA-Kapseln sowie zu PFD-freien PLGA-Mikrophären

Bei den Untersuchungen zu den PLGA- und PACA-Kapseln sowie zu den PLGA-Sphären schloss sich an die Infusionsphase eine Nachbeobachtungszeit von 2 ½ Stunden an, so dass die Versuchsdauer insgesamt fünf Stunden betrug (Abb. 14). Da sowohl die PLGA-Sphären als auch die PLGA- und PACA-Kapseln in 0,9%iger NaCl-Lsg. infundiert wurden, wurde für diese Versuchsreihen 0,9%ige NaCl-Lsg. als Kontrolle gewählt.

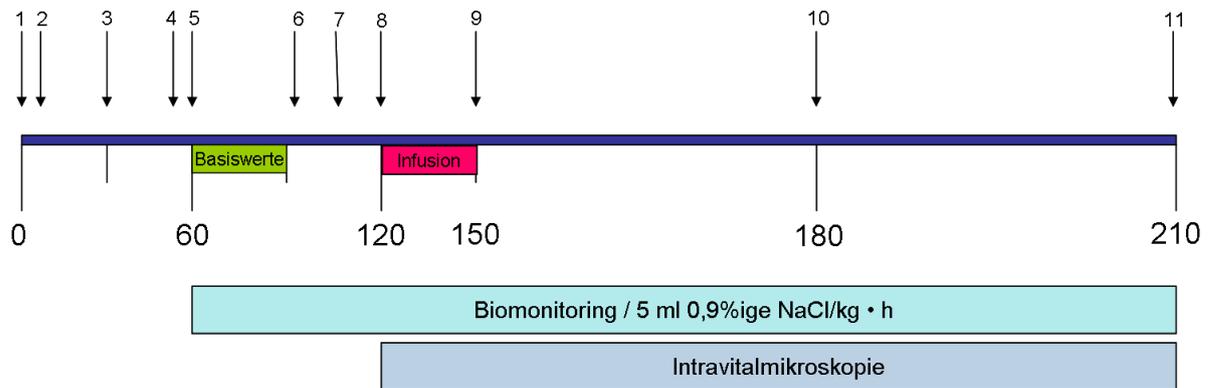


**Abb. 14: OP-Schema für intravitalmikroskopische Untersuchungen nach intravenöser Infusion von PLGA- und PACA-Kapseln.** Mit: **1)** Narkoseeinleitung; **2)** Analgesie; **3)** Katheterisierung der *arteria* und *vena femoralis*; **4)** BGA 1; **5)** Start Biomonitoring; **6)** Organauslagerung; **7)** BGA 2, Applikation FITC-Dextran (1 ml/kg einer 5%igen Lsg. in NaCl 0,9%); **8)** Start Infusion 10 ml/kg KGW, Beginn Intravitalmikroskopie; **9)** Ende Infusion; **10)** BGA 3; **11)** BGA 4 und **12)** BGA 5 und Euthanasie des Tieres.

### Intravitalmikroskopische Untersuchungen zu den Albumin-Kapseln

Für die Untersuchungen zu den Albumin-Kapseln wurde die Nachbeobachtungszeit auf 60 Minuten verkürzt. Die Versuchsdauer betrug insgesamt 3 ½ Stunden, wobei die intravitalmikroskopischen Untersuchungen über einen Zeitraum von 1 ½ Stunden

durchgeführt wurden. Infundiert wurden Albumin-Kapseln in 5%iger Albumin-Lsg., weshalb für die entsprechenden Kontrollen 5%ige Albumin-Lsg. gewählt wurde (Abb. 15).



**Abb. 15: OP-Schema für intravitalmikroskopische Untersuchungen nach intravenöser Infusion von Albumin-Kapseln.** Mit: **1)** Narkoseeinleitung; **2)** Analgesie; **3)** Katheterisierung der *arteria* und *vena femoralis*; **4)** BGA 1; **5)** Start Biomonitoring; **6)** Organauslagerung; **7)** BGA 2, Applikation FITC-Dextran (1 ml/kg einer 5%igen Lsg. in NaCl 0,9%); **8)** Start Infusion 10 ml/kg KGW, Beginn Intravitalmikroskopie; **9)** Ende Infusion; **10)** BGA 3 und **11)** BGA 4 und Euthanasie des Tieres.

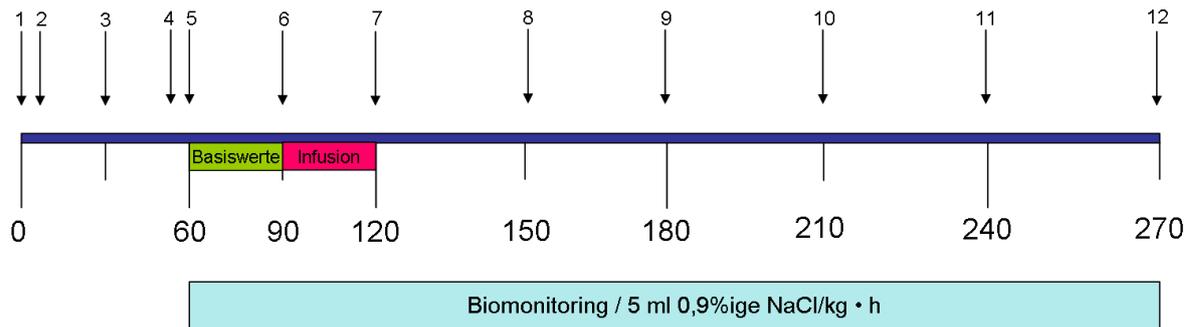
#### 4.2.4 Bestimmung der toxikologischen Effekte der Albumin-Kapseln nach intravenöser Infusion

Nach den intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurde eine eigenständige Serie zur Bestimmung der toxikologischen Effekte der Albumin-Kapseln durchgeführt. Die eingesetzten Albumin-Kapselsuspensionen hatten einen Kapsel-Volumenanteil von 8 Vol.-% und 32 Vol.-%. Als Kontrolle diente 5%ige Albumin-Lsg. Die Anzahl der Tiere in den einzelnen Versuchsgruppen ist in Tabelle 3 dargestellt (Tab. 3). Der allgemeine Operationsablauf entsprach den Ausführungen in Abschnitt 4.2.2.

Im Anschluss an das 30-minütige Basismonitoring wurden die Kapselsuspensionen bzw. die 5%ige Albumin-Lsg. in die *vena femoralis* infundiert. Die Infusion erfolgte mit Hilfe einer Infusionspumpe über einen Zeitraum von 30 Minuten. Zur Standardisierung der Versuche betrug das Infusionsvolumen in allen Versuchen 10 ml/kg KGW. Die Katheterlänge wurde immer gleich lang gewählt (20 cm). Nach beendeter Infusion wurde der Venenkatheter mit 0,5 ml NaCl-Lsg. (0,9%) gespült. Es schloss sich eine Nachbeobachtungszeit von 2 ½ Stunden an. Über den gesamten Versuchsablauf von 4 ½ Stunden wurden, wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, regelmäßig Blutgasanalysen gemessen sowie spezifische Schädigungsparameter bestimmt (Abb. 16). Als Erweiterung zur routinemäßigen Bestimmung der Schädigungsmarker (Abschnitt 4.2.2) wurden die CK-Isoenzyme (CK-MB, CK-MM, CK-BB) mit einem Gelelektrophorese-Kit nach Anleitung des Herstellers bestimmt. Zusätzlich wurden zu definierten Zeitpunkten (siehe Abb. 16) nicht-invasive Messungen der Sauerstoffversorgung des *musculus gastrocnemius* (*m. gastrocnemius*) mit Hilfe eines speziellen Diagnosegerätes (*Oxygen to see*; O2C) vorgenommen, die Rückschlüsse auf die lokale Mikrozirkulation zuließen. Gemessen wurden die Sauerstoffversorgung ( $sO_2$ ), der relative Hämoglobingehalt (rHb), die generelle Durchblutung (*Blood Flow*) und die Blutflussgeschwindigkeit (*Blood Flow Velocity*).

Versuchsgruppen	Anzahl der Tiere
Albumin 5%	6
Albumin-Kapseln 8 Vol.-%	6
Albumin-Kapseln 32 Vol.-%	6
<b>ΣTiere = 18</b>	

Tab. 3: Anzahl der Tiere zur Bestimmung der toxikologischen Effekte der Albumin-Kapseln.



**Abb. 16: OP-Schema zur Bestimmung der toxikologischen Effekte der Albumin-Kapseln nach intravenöser Infusion.** Mit: **1)** Narkoseeinleitung; **2)** Analgesie; **3)** Katheterisierung der *arteria* und *vena femoralis*; **4)** BGA 1; **5)** Start Biomonitoring; **6)** Blutentnahme für BGA 2 und O<sub>2</sub>C-Messung, Start Infusion 10ml/kg/KGW; **7)** Ende Infusion, Blutentnahme für BGA 3 und O<sub>2</sub>C-Messung; **8)** Blutentnahme für BGA 4; **9)** Blutentnahme für BGA 5 und O<sub>2</sub>C-Messung; **10)** Blutentnahme für BGA 6; **11)** Blutentnahme für BGA 7 und O<sub>2</sub>C-Messung; **12)** Blutentnahme für BGA 8 und Euthanasie des Tieres.

#### 4.2.5 Bestimmung der Anaphylatoxine C3a und C5a zu Beginn und am Ende der Infusionsphase von PACA- und Albumin-Kapseln

Aus Plasma-Rückstellproben, die zu Beginn und am Ende der Infusionsphase von PACA- und Albumin-Kapseln in den verschiedenen Versuchsreihen gewonnen wurden, erfolgte die Bestimmung der Konzentrationen der Anaphylatoxine C3a und C5a mittels ELISA nach Anleitung des Herstellers.

#### 4.2.6 Bestimmung der *intravasalen* Halbwertszeit von PACA- und Albumin-Kapseln

Die *intravasale* Halbwertszeit der PACA- und Albumin-Kapseln wurde in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Christian Mayer (Institut für Physikalische Chemie, Universität Duisburg-Essen) bestimmt.

##### Prinzip der Messung

Die Zirkulationdauer der infundierten Kapseln im Gefäßsystem kann durch mehrere Faktoren beeinflusst werden. Auf der einen Seite kann der Abbau der Kapseln direkt einsetzen, so dass das PFD aus dem Kern ins Blut freigesetzt und aufgrund seines hohen Dampfdrucks über die Lungen abgeatmet wird. Auf der anderen Seite können die Kapseln vom RES aufgenommen werden oder in Organen und Geweben aufgrund ihrer Größe oder spezifischen Eigenschaften akkumulieren. Eine Abnahme des Gehalts an PFD bedeutete folglich eine Abnahme der Anzahl an frei zirkulierenden Kapseln im Gefäßsystem. Die Abnahme der PFD-Konzentration im Blut konnte daher als Maß für die *intravasale* Zirkulationszeit angenommen werden. Der Gesamtgehalt an PFD im Blut wurde mittels Fluor-Kernspinresonanzspektroskopie ( $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie) bestimmt, so dass die *intravasale* Halbwertszeit der Kapseln errechnet werden konnte.

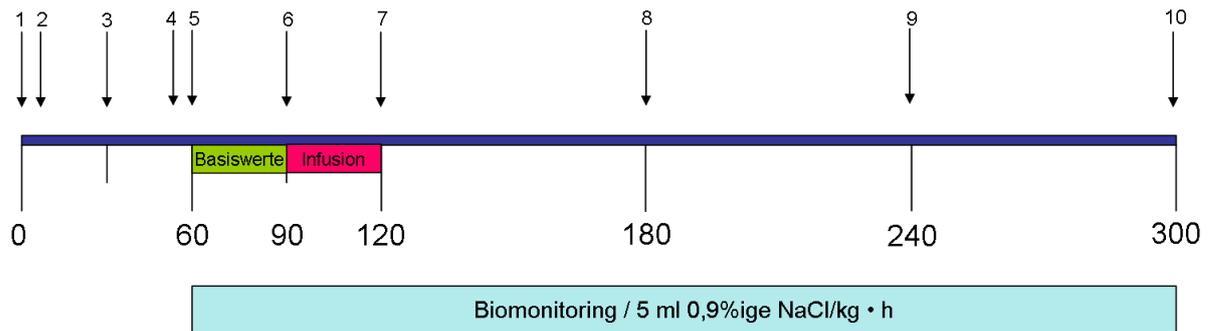
##### Versuchsablauf

Der allgemeine Operationsablauf wurde bereits unter 4.2.2 beschrieben. Die Anzahl der Tiere in den jeweiligen Versuchsgruppen ist in Tabelle 4 dargestellt (Tab. 4). Nach 30-minütigem Basismonitoring erfolgte die Kapselinfusion in die *vena femoralis* mit Hilfe einer Infusionspumpe über einen Zeitraum von 30 Minuten (Abb. 17). Zur Standardisierung des Infusionsvolumens wurde die Länge der Katheter immer gleich

gewählt (20 cm). Es wurden 10 ml Kapselsuspension pro kg Körpergewicht infundiert. Nach beendeter Infusion wurde der Katheter mit 0,5 ml isotoner Kochsalzlösung gespült. Die Blutentnahmen zu Analysezwecken erfolgten unmittelbar zu Beginn und am Ende der Infusionsphase und anschließend alle 60 Minuten über eine Dauer von drei Stunden. Die Versuchsdauer betrug insgesamt fünf Stunden. Die Messung des  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrums und die Berechnung des PFD-Gehaltes in den Blutproben erfolgten im Institut für Physikalische Chemie der Universität Duisburg-Essen im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Christian Mayer. Anschließend konnte die *intravasale* Halbwertszeit der Kapseln aus den gewonnenen Daten errechnet werden.

Versuchsgruppen	Anzahl der Tiere
PACA-Kapseln 8 Vol.-%	6
Albumin-Kapseln 8 Vol.-%	6
	$\Sigma$ Tiere = 12

Tab. 4: Anzahl der Tiere zur Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit von PACA- und Albumin-Kapseln.



**Abb. 17: OP-Schema für die Bestimmung der intravasalen Halbwertszeit von PACA- und Albumin-Kapseln.** Mit: **1)** Narkoseeinleitung; **2)** Analgesie; **3)** Katheterisierung der *arteria* und *vena femoralis*; **4)** BGA 1; **5)** Start Biomonitoring; **6)** Blutentnahme für BGA 2 und NMR, Start Infusion 10ml/kg/KGW; **7)** Ende Infusion, Blutentnahme für BGA 3 und NMR; **8)** Blutentnahme für BGA 4 und NMR; **9)** Blutentnahme für BGA 5 und NMR; **10)** Blutentnahme für BGA 6 und NMR, Euthanasie des Tieres.

#### 4.2.7 Anfertigung und Untersuchung von kryohistologischen Schnittpräparaten zur Beurteilung der *in vivo*-Verteilung von PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln

Um die *in vivo*-Verteilung der verschiedenen Kapseltypen, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, beurteilen zu können, wurden diese fluoreszenzmarkiert. Aufgrund der unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften der verwendeten Kapseltypen (unterschiedliche Wandstärke bzw. unterschiedlicher Wandaufbau) wurde entweder die Kapselwand oder der Kapselkern (= Zielstruktur) mit einem passenden Fluorochrom angefärbt (Tab. 5). Neben dem kommerziell erhältlichen Nilrot wurde BODIPY-Thiol, ein speziell für den PFD-Kern synthetisierter Fluoreszenzfarbstoff, verwendet<sup>64</sup>.

Kapseltyp	Fluorochrom	Anregungswellenlänge ( $\lambda_{ex}$ ) und Emissionswellenlänge ( $\lambda_{em}$ )	Zielstruktur
PLGA-Kapseln	Nilrot	$\lambda_{ex} = 515-530$ nm $\lambda_{em} = 525-605$ nm	PLGA
PACA-Kapseln	BODIPY-Thiol <sup>64</sup>	$\lambda_{ex} = 505$ nm $\lambda_{em} = 515$ nm	Perfluordecalin
Albumin-Kapseln	BODIPY-Thiol <sup>64</sup>	$\lambda_{ex} = 505$ nm $\lambda_{em} = 515$ nm	Perfluordecalin

Tab. 5: Variation der Fluorochrome in Abhängigkeit vom Kapseltyp.

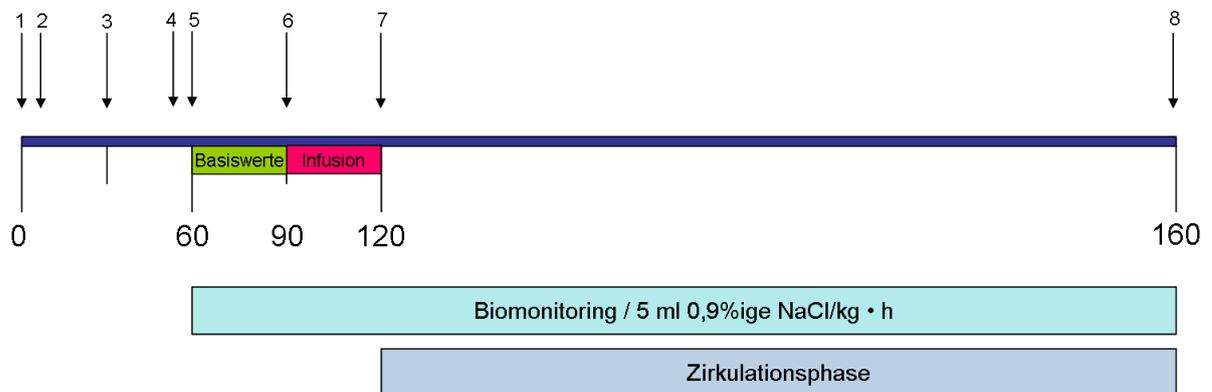
Nach intravenöser Applikation der so markierten Kapselsuspensionen wurden in Kooperation mit dem Institut für Nephrologie des Universitätsklinikums Essen kryohistologische Schnittpräparate von Leber, Lunge, Niere, Darm, Milz, Herz, Gehirn und *m. gastrocnemius* angefertigt. Das Verteilungsmuster der Kapseln in den verschiedenen Organen konnte anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden. Die Anzahl der in den einzelnen Versuchsgruppen verwendeten Tiere ist in Tabelle 6 dargestellt (Tab. 6).

Versuchsgruppen	Anzahl der Tiere
NaCl 0,9%	3
PLGA-Kapseln ( $\varnothing = 1,5 \mu\text{m}$ ) 8 Vol.-%	3
PLGA-Kapseln ( $\varnothing = 1 \mu\text{m}$ ) 8 Vol.-%	3
PACA-Kapseln 8 Vol.-%	3
Albumin-Kapseln 8 Vol.-%	3
Albumin-Kapseln 32 Vol.-%	3
	$\Sigma$ Tiere = 18

Tab. 6: Anzahl der Tiere zur Beurteilung der *in vivo*-Verteilung.

## Operationsablauf und Kryokonservierung der Organe

Der allgemeine Operationsablauf wurde bereits in Abschnitt 4.2.2 beschrieben. Nach Erhalt der Basiswerte wurden die jeweiligen Kapselsuspensionen mit einer Infusionspumpe über die Dauer von 30 Minuten intravenös infundiert. Nach einer Zirkulationsphase von 40 Minuten wurden die Organe in tiefer Isoflurannarkose entnommen und in einem speziellen Kälteschutzmedium kryokonserviert, um Organschädigungen durch Kälte zu vermeiden. Zudem ermöglichte dies eine Lagerung der Organe bei  $-80^{\circ}\text{C}$  (Abb. 18).



**Abb. 18: OP-Schema für die Beurteilung der *in vivo*-Verteilung von PACA-, PLGA- und Albumin-Kapseln.** Mit: 1) Narkoseeinleitung; 2) Analgesie; 3) Katheterisierung der *arteria* und *vena femoralis*; 4) BGA 1; 5) Start Biomonitoring; 6) Start Infusion 10 ml/kg KGW; 7) Ende Infusion; 8) Euthanasie des Tieres durch Organentnahme.

## Anfertigung von kryohistologischen Schnittpräparaten

Mittels Kryostat wurden ca.  $5\ \mu\text{m}$  dicke Schnitte der kryokonservierten Organe angefertigt und auf geeignete Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden die Schnitte eingedeckt. Um die Orientierung in den Schnitten zu erleichtern, wurden die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI,  $\lambda_{\text{ex}} = 358\ \text{nm}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 461\ \text{nm}$ ) gegengefärbt. Des Weiteren diente die Zellkernfärbung als

Fluoreszenzkontrolle der Schnitte. Durch die Verwendung eines DAPI-haltigen Eindeckmediums mit Ausbleichschutz konnten der Eindeckvorgang und die Gegenfärbung der Zellkerne in einem Schritt erfolgen. Darüber hinaus verhinderte der Ausbleichschutz eine vorzeitige und zu schnelle Abnahme der Fluoreszenz.

### **Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der kryohistologischen Schnittpräparate**

Die kryohistologischen Schnittpräparate wurden nach dem Eindecken mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Darstellung der Kapseln erfolgte bei unterschiedlichen Wellenlängen (siehe Tab. 2), die mit DAPI gefärbten Zellkerne wurden bei 358 nm angeregt. Um möglichst scharfe Aufnahmen von Kapseln und Zellkernen zu erhalten, wurden Einzelbilder im Schwarz-Weiß-Modus generiert, die erst nachträglich durch eine Software (AxioVision Rel. 4.6) gefärbt und übereinander gelegt wurden.

#### **4.2.8 Histologische Untersuchungen von Leber, Darm, Lunge, Niere, Herz und Milz nach intravenöser Applikation von PACA- und Albumin-Kapseln**

Um beurteilen zu können, ob die intravenös infundierten Kapselsuspensionen pathologische Veränderungen des Gewebes hervorrufen, wurden histologische Untersuchungen an Leber, Darm, Lunge, Niere, Herz und Milz durchgeführt. Bei den Albumin-Kapseln wurden die Untersuchungen zudem auf den *m. gastrocnemius* erweitert.

Die histologischen Untersuchungen der verschiedenen Organe erfolgten nur nach intravenöser Applikation der PACA- und der Albumin-Kapseln. Eine Beurteilung der Organschädigungen nach Applikation von PLGA-Kapseln erfolgte bereits im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. Waack mit dem Titel „Untersuchungen zum Einfluss und zur Bioverträglichkeit von Perfluordecalingefüllten Poly(laktid-co-glykolid)-Mikrokapseln in einem Modell der Ratte“, die ebenfalls im Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen angefertigt wurde<sup>53</sup>.

### **Organentnahme und Anfertigung von histologischen Schnittpräparaten**

Im Falle der PACA-Kapseln erfolgte die Organentnahme im Anschluss an die intravitalmikroskopischen Untersuchungen (Abschnitt 3.2.2). Zur Beurteilung der Gewebeschädigung nach Applikation der Albumin-Kapseln wurden die Organe am Ende der toxikologischen Untersuchungen (Abschnitt 4.2.4) entnommen. Die Organe der jeweiligen Kontrollgruppen dienten als Negativkontrollen.

Die Organentnahme erfolgte in tiefer Isoflurannarkose. Es wurde eine mediane Laparatomie entlang der *linea alba* durchgeführt. Anschließend wurde der Dünndarm entnommen und in zehn etwa gleichlange Segmente unterteilt. Das Darmsegment IV wurde für die histologischen Untersuchungen weiter aufgearbeitet. Danach wurden die rechte Niere, der rechte mittlere Leberlappen (*lobus medialis dexter*) und die Milz entnommen. Um Lunge und Herz zu entnehmen, erfolgte zunächst eine mediane Halsinzision. Nach Freipräparation der Luftröhre konnte eine Tracheotomie durchgeführt werden, so dass mit Hilfe einer Spritze die Lunge komplett mit Luft gefüllt werden konnte. Im Anschluss daran wurden die Lunge und das Herz im Ganzen entnommen. Im Falle der mit Albumin-Kapseln infundierten Tiere erfolgte zusätzlich eine Entnahme des *m. gastrocnemius* aus dem linken Hinterlauf. Alle entnommenen Organe wurden für 24 Stunden in 10%igem, neutral gepufferten Formalin fixiert. Nach Entwässerung wurden diese im Institut für Pathologie und

Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden mit einem Schlittenmikrotom ca. 2-3  $\mu\text{m}$  dünne Schnittpräparate angefertigt. Da die Schnitte der meisten Gewebe farblos sind und eine Beurteilung so nur schlecht erfolgen kann, wurden die Schnitte nachträglich gefärbt, so dass sie mittels Lichtmikroskopie analysiert werden konnten.

### **Hämatoxylin-Eosin-Färbung der histologischen Schnittpräparate**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) der angefertigten Schnittpräparate ermöglicht eine bessere Orientierung und die Unterscheidung von verschiedenen Gewebestrukturen. Das Hämatoxylin ist ein basischer Farbstoff, der basophile Gewebekomponenten wie zum Beispiel Nukleinsäuren oder Glykane blau färbt. Das Eosin hingegen färbt azidophile Gewebekomponenten wie beispielsweise Kollagen oder Mitochondrien rot, da es sich hierbei um einen sauren Farbstoff handelt. Durch die Kombination von Hämatoxylin und Eosin (HE) erhält man unterschiedliche Farbtöne in den Schnitten. Zellkerne werden blau-violett, Zytoplasma rot-violett und Kollagenfasern rot dargestellt<sup>65</sup>.

Die HE-Färbung der histologischen Schnittpräparate erfolgte im Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen.

### **4.2.9 Bestimmung des Einflusses der Kapselsuspensionen auf die dynamische Viskosität von Blut**

In Kooperation mit dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Mayer vom Institut für Physikalische Chemie der Universität Duisburg-Essen wurde der Einfluss der Kapselsuspensionen auf die dynamische Viskosität von Blut überprüft.

Hierzu wurde die dynamische Viskosität von sechs humanen Blutproben an einem Rheometer gemessen. Anschließend wurden die Blutproben mit den Kapselsuspensionen bzw. den Kontrolllösungen versetzt. Das Verhältnis Kapselsuspension zu Blut wurde entsprechend der Konzentration der Kapselsuspensionen in den *in vivo*-Versuchen gewählt (1:5,4). Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 37°C, wurden die dynamischen Viskositäten der einzelnen Proben erneut bestimmt. Alle Messungen wurden bei Scherraten von 1-100 rad/s und bei 37°C durchgeführt.

#### **4.2.10 Messung der Sauerstoffkapazität der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln**

Um die therapeutisch relevanten Dosen der verschiedenen Kapselsysteme abschätzen zu können, wurden die Sauerstoffgehalte der jeweiligen Kapselsuspensionen mit Hilfe eines Respirometers ermittelt. Untersucht wurde die Sauerstoffkapazität von PLGA-, PACA- und Albumin-Kapselsuspensionen mit einem Kapsel-Volumenanteil von 8 Vol.-% sowie Albumin-Kapselsuspensionen mit Kapsel-Volumenanteilen von 32 Vol.-% und 64 Vol.-%. Als Kontrolle dienten 5%ige Albumin-Lsg. und 0,9%ige NaCl-Lsg.

##### **Prinzip der Messung**

Dem Henry-Gesetz entsprechend ist der Sauerstoffgehalt von Flüssigkeiten und flüssigen Perfluorcarbonen proportional zum Sauerstoffpartialdruck<sup>1, 6</sup>. Kapselsuspensionen, die bei einem hohen  $pO_2$  mit Sauerstoff beladen wurden, geben daher bei entsprechendem Partialdruckgefälle den gespeicherten Sauerstoff

ab. Folglich kann die Sauerstofffreisetzung als Maß für die maximale Sauerstoffkapazität der jeweiligen Suspension angenommen werden.

### **Korrektur der Messabweichungen**

Vor jeder Messreihe wurden die Messabweichungen des Gerätes mit Hilfe eines Sauerstoffstandards ermittelt. Hierzu wurden die Messkammern des Oxygraphen mit 2 ml Wasser befüllt und auf 37°C temperiert. Bei atmosphärischem Luftdruck wurde das Wasser in den Messkammern unter Rühren inkubiert bis sich ein konstanter Sauerstoffgehalt einstellte. Basierend auf diesem Sauerstoffmaximalwert und der theoretischen Sauerstoffkapazität des Wassers unter den gegebenen Bedingungen (= 209 mmol/ml) konnte der Korrekturfaktor ( $F(O_2)$ ) für den Messfehler berechnet werden (Formel 1).

$$F(O_2) \text{ [mmol/ml]} = \frac{\text{max. O}_2\text{-Gehalt}_{\text{Wasser}}(\text{soll})}{\text{max. O}_2\text{-Gehalt}_{\text{Wasser}}(\text{ist})}$$

**Formel 1: Berechnung des Sauerstoff-Korrekturfaktors  $F(O_2)$  für die Bestimmung der maximalen Sauerstoffkapazität.**

### **Vorbereitung der Messkammern**

Die Messkammern des Oxygraphen wurden mit 2 ml Phosphatpuffer (PP-Puffer; 50 mM) befüllt und luftdicht verschlossen. Der im PP-Puffer gelöste Sauerstoff wurde durch Zugabe von 96 µl Hefe (83 mg/ml in PP-Puffer) und 50 µl Glucose (1 M in PP-Puffer) aus den Kammern entfernt. Anschließend wurden 60 µl Kaliumcyanid (KCN; 100 mM in PP-Puffer) in die Messkammern gegeben. KCN ist ein Inhibitor des Komplex IV der Atmungskette und verhindert dort die Elektronenübertragung auf den Sauerstoff. So konnte sichergestellt werden, dass die Energiegewinnung der Hefe im

weiteren Versuchsverlauf nur noch anaerob verläuft und kein Sauerstoff mehr verbraucht wird.

### **Sauerstoffbeladung der Kapselsuspensionen und Kontrollen**

Um eine Sauerstoffbeladung bei reiner Sauerstoffatmosphäre zu gewährleisten, wurde ein mit *Septum* verschlossenes Gefäß zunächst für eine Minute mit reinem Sauerstoff durchgespült. Anschließend wurden 2 ml der zu untersuchenden Kapselsuspension bzw. der Kontrolle mit einer Spritze in das Gefäß eingefüllt. Die Probe wurde für 30 Sekunden bei 37°C in reiner Sauerstoffatmosphäre inkubiert (vorherrschender  $pO_2 \approx 713$  mmHg  $\rightarrow$  ergibt sich aus:  $pO_2$  bei 100%  $O_2$ -Atmosphäre ( $\approx 760$  mmHg) abzgl. des Wasserdampfdrucks ( $\approx 47$  mmHg)).

### **Messung der Sauerstofffreisetzung als Maß für die maximale Sauerstoffkapazität**

50  $\mu$ l der mit Sauerstoff beladenen Kapselsuspensionen bzw. Kontrolllösungen wurden unter Ausschluss von Luft in die Messkammern appliziert. Der Maximalwert der Sauerstofffreisetzung wurde abgelesen. Unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors für den Messfehler wurde die maximale Sauerstoffkapazität der jeweiligen Kapselsuspension oder Kontrolle berechnet. Die Angabe der Sauerstoffkapazität erfolgte in ml/dl.

Da die gemessenen Sauerstoffkapazitäten der Kapselsuspensionen die Summe der Sauerstoffgehalte der unterschiedlichen Kapseln und der jeweiligen Trägerlösungen waren, wurden unter Berücksichtigung der Volumenverteilungen zusätzlich die Sauerstoffanteile, die auf Trägerlösungen und Kapseln zurückzuführen waren, berechnet (Formel 2 und Formel 3).

$$\text{O}_2\text{-Anteil}_{\text{Trägerlsg.}} [\text{ml/dl}] = \text{O}_2\text{-Kapazität}_{\text{Trägerlsg.}} \cdot \frac{x}{100}$$

**Formel 2: Berechnung des Sauerstoffanteils der Trägerlösung an der Gesamt-Sauerstoffkapazität der Kapselsuspension.** Mit: x = prozentualer Volumenanteil der Trägerlösung an der Kapselsuspension).

$$\text{O}_2\text{-Anteil}_{\text{Kapseln}} [\text{ml/dl}] = \text{O}_2\text{-Kapazität}_{\text{Suspension}} \cdot \text{O}_2\text{-Anteil}_{\text{Trägerlsg.}}$$

**Formel 3: Berechnung des Sauerstoffanteils der Kapseln an der Gesamt-Sauerstoffkapazität der Kapselsuspension.**

#### 4.2.11 Statistik

Die im Ergebnisteil dargestellten Daten aus den Tierversuchen und den Viskositätsmessungen sind die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen  $\pm$  SEM (Standardfehler; *Standard Error of the Mean*) bei den *in vivo*-Versuchen und  $\pm$  SD (Standardabweichung; *Standard Deviation*) bei den *in vitro*-Versuchen. Die statistische Signifikanz zwischen den Versuchsgruppen und den Kontrollgruppen wurde mittels *two-way ANOVA* für nicht wiederkehrende Messwerte und anschließender *Dunnett's post-hoc* Analyse geprüft. Als statistisch signifikant galt hierbei eine Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert) von \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die im Ergebnisteil dargestellten Daten aus der Messung der Sauerstoffkapazität sind die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen  $\pm$  SD (Standardabweichung; *Standard Deviation*). Die statistische Signifikanz wurde mittels *one-way ANOVA* für nicht wiederkehrende Messwerte und anschließender *Dunnett's post-hoc* Analyse

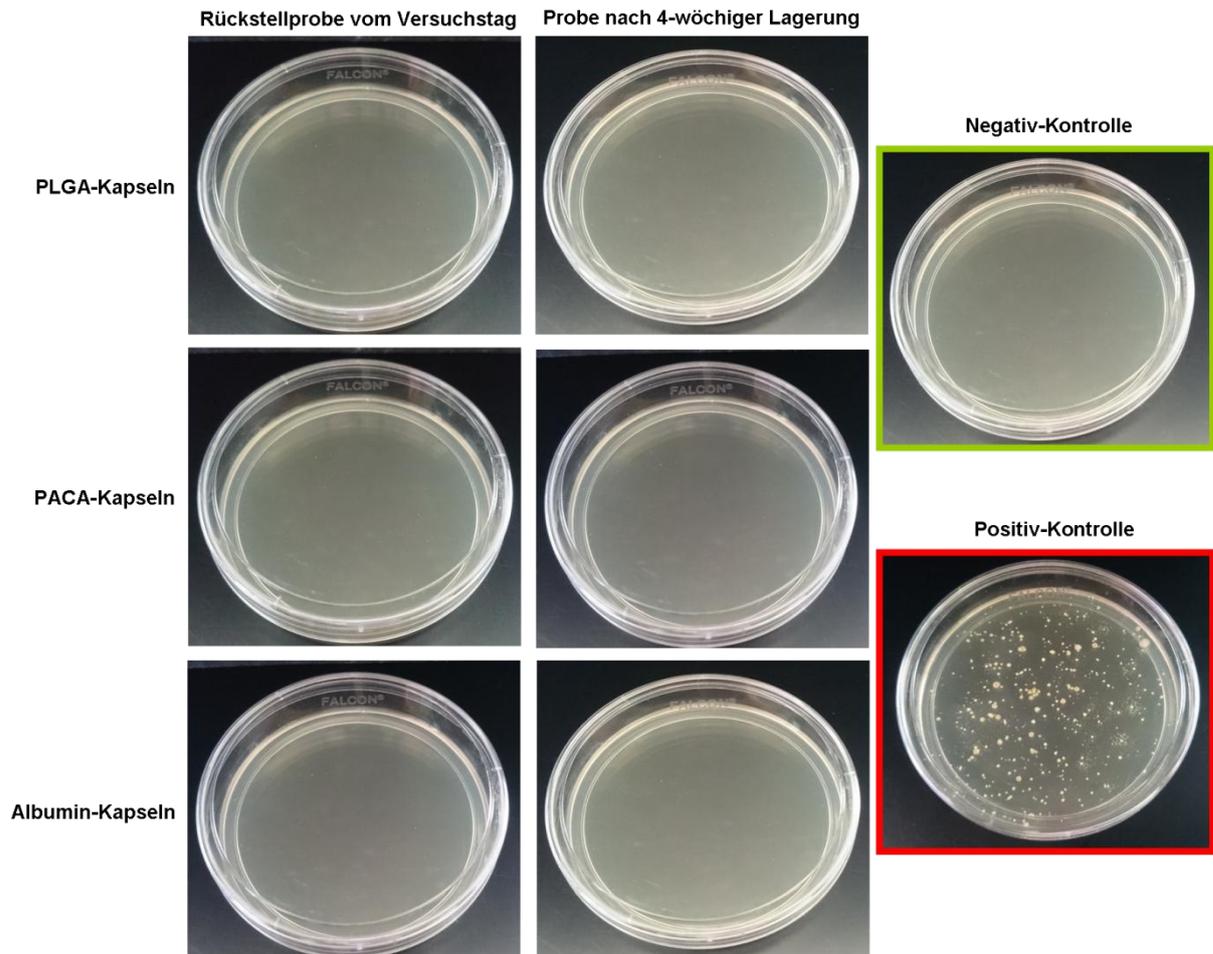
geprüft. Eine Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert) von \*  $p < 0,05$  galt hierbei als statistisch signifikant.

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 *In vitro*-Charakterisierung der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln**

#### **5.1.1 Keimfreiheit und mikrobielle Stabilität der verwendeten Kapselsuspensionen**

Durch den Vergleich mit Positiv- und Negativ-Kontrollen konnte mit Hilfe mikrobiologischer Testreihen ausgeschlossen werden, dass die für die Versuche verwendeten Kapselsuspensionen mit Bakterien oder Pilzen kontaminiert waren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass selbst eine Lagerung von vier Wochen (bei 4°C) keinen Einfluss auf die mikrobielle Stabilität der Kapselsuspensionen hat. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bei 37°C zeigten die Negativ-Kontrollen genau wie die Rückstellproben von den Versuchstagen und die gelagerten Proben keinerlei Anzeichen von Bakterien- oder Pilzwachstum, während in den Positiv-Kontrollen ein eindeutiges Wachstum von Bakterienkolonien zu verzeichnen war (Abb. 19).



**Abb. 19: Keimfreiheit und mikrobielle Stabilität der Kapselsuspensionen.** Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank zeigten die CASO-Bouillon-haltigen Agarplatten mit den verschiedenen Kapselsuspensionen und die Negativ-Kontrollen (grün) keinerlei Anzeichen von Bakterien- und/oder Pilzwachstum. Dabei spielte es keine Rolle, ob es sich um eine Rückstellprobe vom Versuchstag handelte oder um eine Probe, die für vier Wochen im Kühlschrank gelagert wurde. Auf den Platten mit den Positiv-Kontrollen (rot) konnte hingegen immer ein Wachstum von Bakterienkolonien beobachtet werden.

### 5.1.2 Einfluss der PACA- und Albumin-Kapseln auf die dynamische Viskosität von Blut

Bei der Auswertung der dynamischen Viskosität zeigte sich, dass 0,9%ige NaCl-Lsg. die Viskosität von Blut vor allem bei niedrigen Scherraten signifikant herabsetzt (Abb. 20). Im Gegensatz dazu zeigten sich nach Inkubation der Blutproben mit der PACA-Kapselsuspension keine Änderungen in der dynamischen Viskosität (Abb. 20).

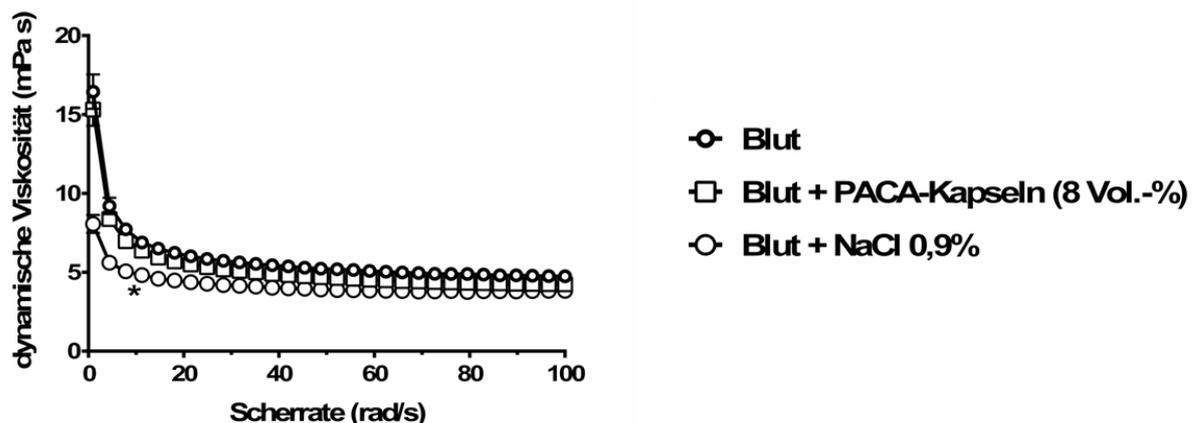
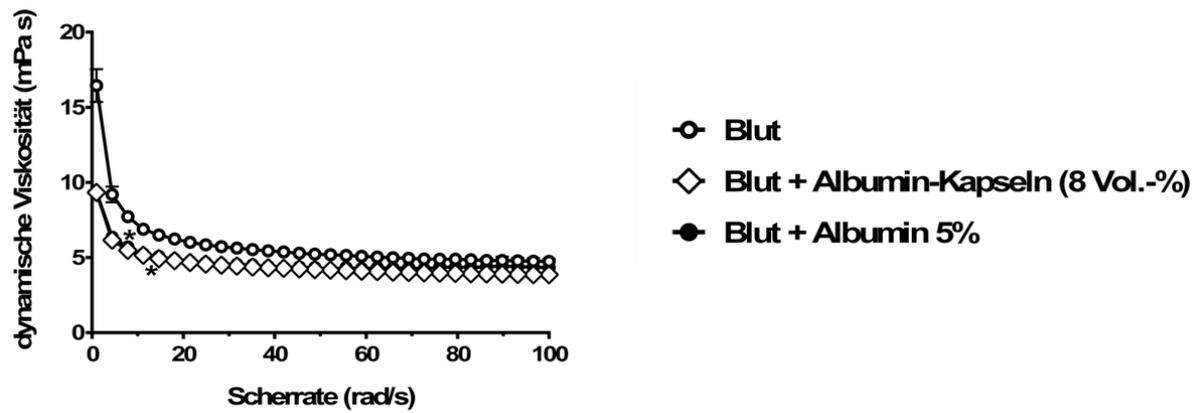


Abb. 20: Einfluss von 0,9%iger NaCl-Lsg. und PACA-Kapseln auf die dynamische Viskosität von Blut. Die Messungen der dynamischen Viskosität erfolgten bei 37°C und Scherraten von 1-100 rad/s. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus n=6. \*  $p < 0,05$  verglichen mit Blut.

Eine Verdünnung der Blutproben mit 5%iger Albumin-Lsg. führte ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der dynamischen Viskosität bei niedrigen Scherraten (Abb. 21). Nach Inkubation der Blutproben mit der 8 Vol.-%iger Albumin-Kapselsuspension wurden die gleichen Werte für die dynamische Viskosität erhalten wie nach Inkubation mit 5%-iger Albumin-Lsg. (Abb. 21). Auch hier konnte eine signifikant niedrigere Viskosität bei niedrigen Scherraten festgestellt werden.



**Abb. 21: Einfluss von 5%iger Albumin-Lsg. und Albumin-Kapseln auf die dynamische Viskosität von Blut.** Die Messungen der dynamischen Viskosität erfolgten bei 37°C und Scherraten von 1-100 rad/s. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus n=6. \*  $p < 0,05$  verglichen mit Blut. Die 5%ige Albumin-Lsg. und die Albumin-Kapseln beeinflussten die dynamische Viskosität von Blut in gleichem Maße, weshalb sich die Datenpunkte in der Abbildung überlagern und nur der Datensatz der Albumin-Kapseln zu sehen ist.

### 5.1.3 Sauerstoffgehalt der 8 Vol.-%igen PLGA-, PACA- und Albumin-Kapselsuspensionen im Vergleich zu den Trägerlösungen Albumin (5%) und NaCl (0,9%)

Die 5%ige Albumin-Lsg. und die 0,9%ige NaCl-Lsg. konnten beide 2,5 ml O<sub>2</sub>/dl ± 0,25 ml O<sub>2</sub>/dl aufnehmen (Abb. 22). Im Vergleich dazu lagen die Sauerstoffgehalte der 8 Vol.-%igen PLGA-Kapselsuspension (4,2 ml O<sub>2</sub>/dl ± 0,4 ml O<sub>2</sub>/dl) und der 8 Vol.-%igen PACA-Kapselsuspension (5,7 ml O<sub>2</sub>/dl ± 0,2 ml O<sub>2</sub>/dl) signifikant höher (Abb. 22). Bei der 8 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension (3,3 ml O<sub>2</sub>/dl ± 0,4 ml O<sub>2</sub>/dl) konnte im Vergleich zur Trägerlösung nur eine marginale und nicht signifikante Erhöhung des Sauerstoffgehalts festgestellt werden (Abb. 22).

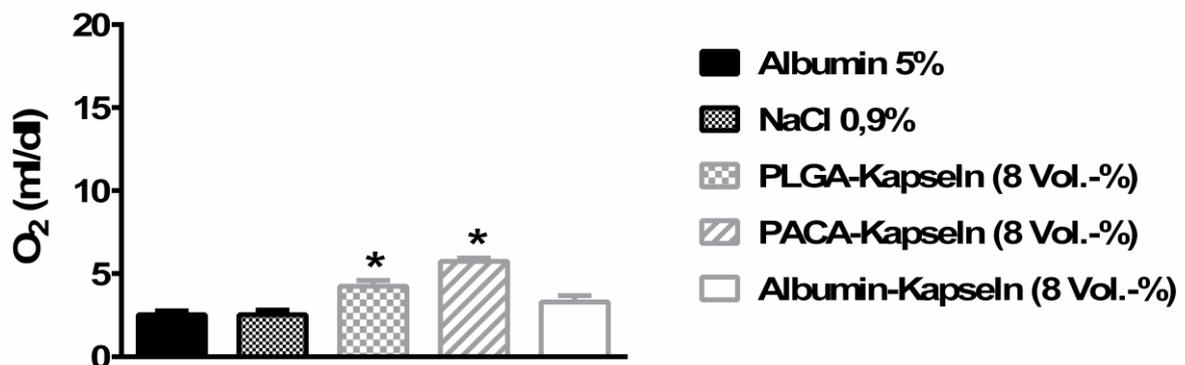


Abb. 22: Sauerstoffgehalt der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapselsuspensionen (8 Vol.-%) im Vergleich zu 0,9%iger NaCl-Lsg. und 5%iger Albumin-Lsg. Die reinen Trägerlösungen und die Kapselsuspensionen wurden für 30 Sekunden bei 37°C und einem pO<sub>2</sub> von 713 mmHg mit Sauerstoff beladen. Anschließend wurde der Sauerstoffgehalt am Respirometer gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD aus n=12. \*  $p < 0,05$  verglichen mit den Trägerlösungen.

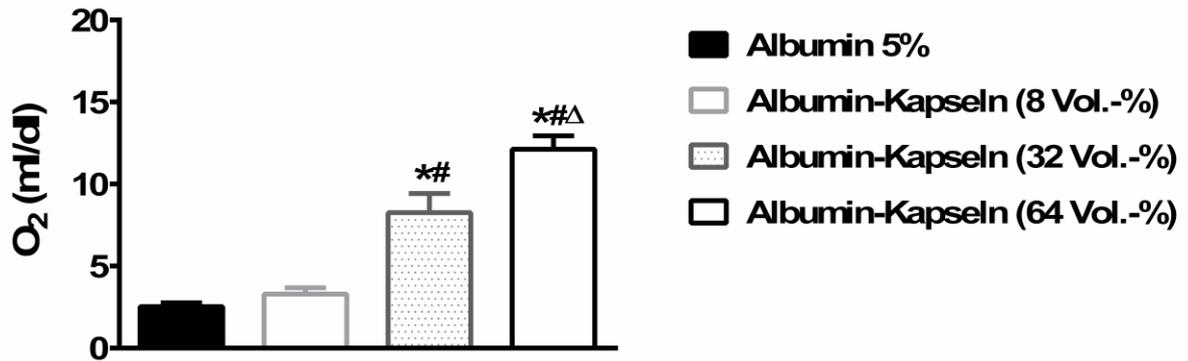
Die Ergebnisse der Berechnungen der jeweiligen Sauerstoffanteile der Kapseln und der Trägerlösungen an der Sauerstoffkapazität der unterschiedlichen Kapselsuspensionen sind in Tabelle 7 dargestellt (Tab. 7).

	<b>O<sub>2</sub>-Kapazität der Suspension (ml/dl)</b>	<b>O<sub>2</sub>-Anteil der Kapseln (ml/dl)</b>	<b>O<sub>2</sub>-Anteil der Trägerlösung (ml/dl)</b>
PACA-Kapselsuspension (8 Vol.-%)	5,7	3,4	2,3
PLGA-Kapselsuspension (8 Vol.-%)	4,2	1,9	2,3
Albumin-Kapselsuspension (8 Vol.-%)	3,3	1	2,3

**Tab. 7: Sauerstoffanteil der unterschiedlichen Kapseltypen und der Trägerlösungen an den Gesamt-Sauerstoffkapazitäten der 8 Vol.-%igen Kapselsuspensionen unter Berücksichtigung der Volumenverteilung.**

#### **5.1.4 Sauerstoffgehalt der Albumin-Kapselsuspension in Abhängigkeit vom Volumenanteil der Albumin-Kapseln**

Bei erhöhten Volumenanteilen der Albumin-Kapseln am Gesamtvolumen der Kapselsuspensionen zeigten sich deutlich gesteigerte Sauerstoffgehalte (Abb. 23). Während sich zwischen der Albumin-Trägerlösung und der Albumin-Kapselsuspension mit 8 Vol.-% keine signifikanten Unterschiede im Sauerstoffgehalt feststellen ließen (siehe Abschnitt 5.1.3; Abb. 22), konnte für die 32 Vol.-%ige Albumin-Kapselsuspension ein signifikant gesteigerter Sauerstoffgehalt von  $8,3 \text{ ml O}_2/\text{dl} \pm 1,2 \text{ ml O}_2/\text{dl}$  gemessen werden (Abb. 23). Im Vergleich dazu lag der Sauerstoffgehalt bei der Albumin-Kapselsuspension mit 64 Vol.-% nochmals deutlich höher ( $12,1 \text{ ml O}_2/\text{dl} \pm 0,8 \text{ ml O}_2/\text{dl}$ ). Dieser erhöhte Gehalt an Sauerstoff war sowohl in Bezug auf die Trägerlösung und die 8 Vol.-%ige Albumin-Kapselsuspension als auch in Bezug auf die Albumin-Kapselsuspension mit 32 Vol.-% signifikant (Abb. 23).



**Abb. 23: Erhöhter Sauerstoffgehalt der Albumin-Kapselsuspension bei gesteigertem Volumenanteil der Kapseln.** Die Kapselsuspensionen (8 Vol.-%, 32 Vol.-%, 64 Vol.-%) und die 5%ige Albumin-Trägerlösung wurden für 30 Sekunden bei 37°C und einem pO<sub>2</sub> von 713 mmHg mit Sauerstoff beladen. Anschließend wurde der Sauerstoffgehalt am Respirometer gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD aus n=12. \*  $p < 0,05$  verglichen mit der 5%igen Albumin-Trägerlösung, #  $p < 0,05$  verglichen mit der 8 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension, Δ  $p < 0,05$  verglichen mit der 32 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension.

Die Ergebnisse der Berechnungen der jeweiligen Sauerstoffanteile der Kapseln und der Trägerlösung an der Sauerstoffkapazität der Kapselsuspensionen sind in Tabelle 8 dargestellt (Tab. 8).

	O <sub>2</sub> -Kapazität der Suspension (ml/dl)	O <sub>2</sub> -Anteil der Kapseln (ml/dl)	O <sub>2</sub> -Anteil der Trägerlösung (ml/dl)
Albumin-Kapselsuspension (8 Vol.-%)	3,3	1	2,3
Albumin-Kapselsuspension (32 Vol.-%)	8,3	6,6	1,7
Albumin-Kapselsuspension (64 Vol.-%)	12,1	11,2	0,9

**Tab. 8: Sauerstoffanteil der Albumin-Kapseln und der Albumin-Trägerlösung an den Sauerstoffkapazitäten der unterschiedlich konzentrierten Albumin-Kapselsuspensionen unter Berücksichtigung der Volumenverteilung.**

## **5.2 *In vivo*-Charakterisierung der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln**

Da sich nach Infusion der PLGA-Kapseln mit einem Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 1,5  $\mu\text{m}$  keine Unterschiede bei der *in vivo*-Charakterisierung zeigten, sind im Folgenden nur die Daten aus den Versuchen mit den 1  $\mu\text{m}$  PLGA-Kapseln dargestellt.

### **5.2.1 Einfluss der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln auf systemische Parameter und die Mikrozirkulation**

Aufgrund des kontinuierlichen Biomonitorings in allen Versuchsreihen konnten Aussagen über die Effekte der applizierten Kapselsuspensionen auf systemische Parameter wie zum Beispiel MAP, Körpertemperatur, Herz- und Atemfrequenz getroffen werden. Darüber hinaus konnten mittels intravitalmikroskopischer Untersuchungen die Einflüsse auf die Mikrozirkulation analysiert werden. Um mikrozirkulatorische Effekte der PFD-Füllung zu überprüfen, wurden neben den PFD-gefüllten PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln zusätzlich PFD-freie PLGA-Sphären in 0,9%iger NaCl-Lsg. infundiert.

Bei den Untersuchungen zu den Albumin-Kapseln wurden neben den intravitalmikroskopischen Untersuchungen auch Messungen der Sauerstoffversorgung des *m. gastrocnemius* vorgenommen, die es ermöglichten, die lokale Mikrozirkulation im Skelettmuskel zu beurteilen.

## **Einfluss der PLGA- und PACA-Kapseln auf die Mikrozirkulation und systemische Parameter**

Im Vergleich zur Kontroll-Gruppe zeigten sich nach Applikation der PLGA- und PACA-Kapseln signifikante Veränderungen in der Mikrozirkulation sowie ein deutlicher und temporärer Abfall des MAP (Abb. 24). In der NaCl-Gruppe blieb der MAP über den gesamten Versuchszeitraum konstant im physiologischen Bereich von 80-120 mmHg (Abb. 24 A). Im Gegensatz dazu konnte 20 Minuten nach Infusionsbeginn der PLGA- und PACA-Kapseln ein signifikanter Abfall des MAP auf 60 mmHg beobachtet werden. Während der MAP in der PACA-Gruppe bereits kurz nach Infusionsende wieder auf ein physiologisches Niveau gestiegen war, erholte sich der MAP in der PLGA-Gruppe nur langsam und erreichte erst ca. 60 Minuten nach Infusionsende (Zeitpunkt 90 Min) ein physiologisches Level (Abb. 24 A). Körpertemperatur, Herz- und Atemfrequenz blieben in allen Gruppen unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Im Hinblick auf die Mikrozirkulation blieb die prozentuale Anzahl der perfundierten Gefäße in der Leber in der NaCl-Gruppe während des Infusionszeitraums und der anschließenden Beobachtungsphase konstant bei 100% (Abb. 24 B). Der sinusoidale hepatische Gefäßdurchmesser zeigte in der NaCl-Gruppe während der Infusionsphase ebenfalls keine Veränderungen (Abb. 24 C). Im Gegensatz dazu nahm die prozentuale Anzahl der perfundierten Gefäße in der PLGA- und PACA-Gruppe 10 Minuten nach Infusionsbeginn um ca. 60% ab, so dass nur noch knapp 40% der Gefäße in der Leber perfundiert waren. Kurz nach diesem signifikanten Abfall nahm die Anzahl der perfundierten Gefäße in beiden Gruppen wieder zu, stagnierte ab dem Ende der Infusion (Zeitpunkt 30 Min) jedoch bei rund 80% (Abb. 24 B). Bei der Betrachtung der sinusoidalen Gefäßdurchmesser konnte 10 Minuten nach Infusionsbeginn der PLGA- und PACA-Kapseln eine signifikante Vasodilatation von 20% festgestellt werden. Direkt im Anschluss war eine

Vasokonstriktion zu verzeichnen, so dass der Gefäßdurchmesser noch während der Infusionsphase wieder das Basisniveau von 100% erreichte (Abb. 24 C).

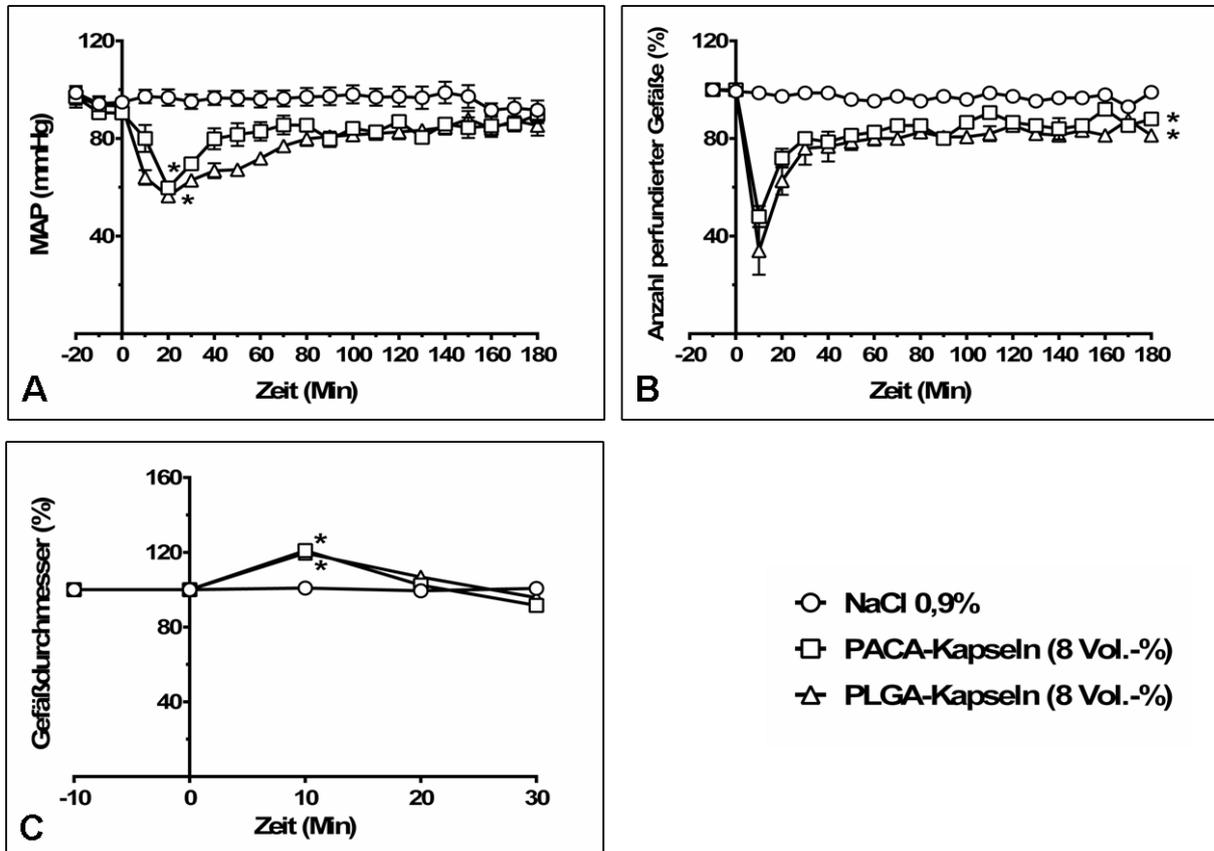
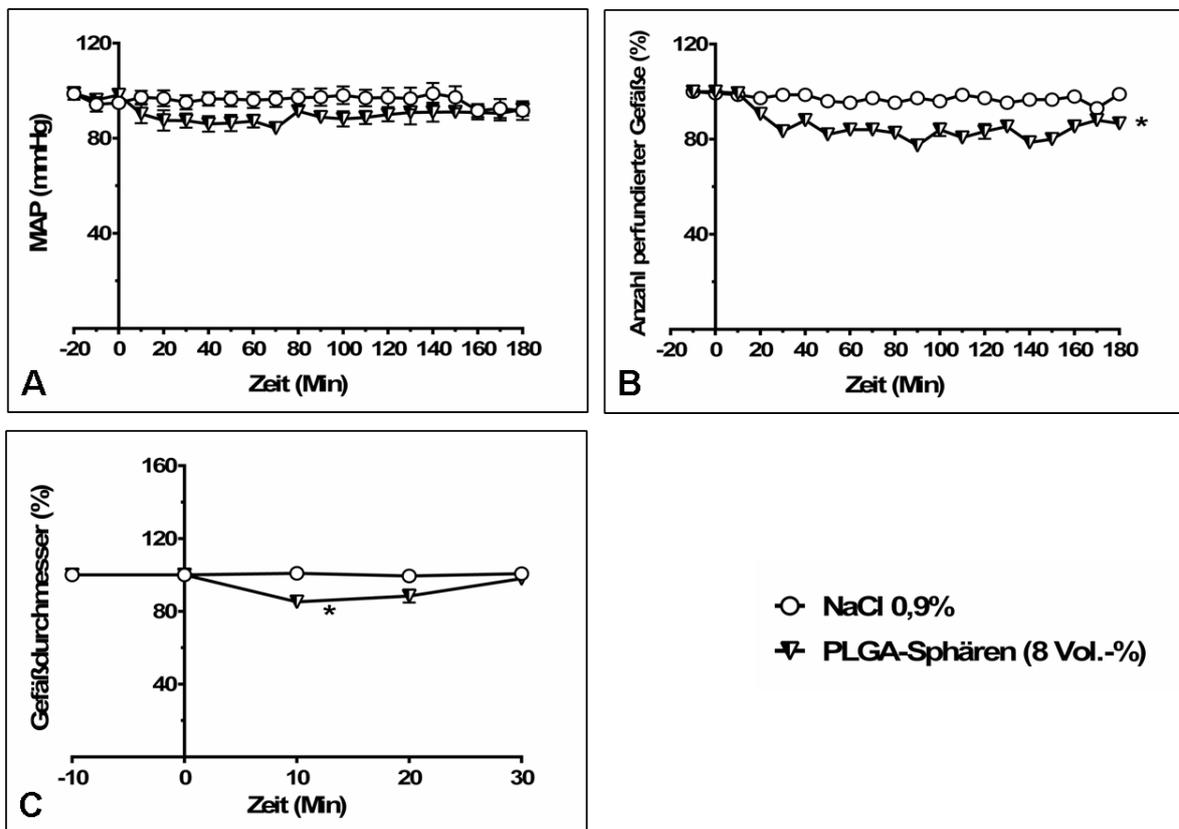


Abb. 24: Einfluss der PLGA- und PACA-Kapseln auf den MAP (A), die prozentuale Anzahl perfundierter Gefäße in der Leber (B) und den hepatischen Gefäßdurchmesser (C). NaCl-Lsg. (0,9%), PLGA- und PACA-Kapseln wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten intravenös infundiert. Die Infusionsvolumina betragen 10 ml/kg KGW x 30 Minuten. Infusionsbeginn war zum Zeitpunkt Null (0 Min.). Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n=6. \*  $p < 0,05$  verglichen mit der NaCl-Gruppe.

### Einfluss der PLGA-Sphären auf die Mikrozirkulation und systemische Parameter

Im Vergleich zu den PLGA- und PACA-Kapseln zeigte sich nach Infusionsbeginn von PLGA-Sphären kein Abfall des MAP. Der Blutdruck blieb während der gesamten Versuchsdauer im physiologischen Bereich (Abb. 25 A). Auch auf die Körpertemperatur, die Herz- und die Atemfrequenz zeigte die Infusion von PLGA-Sphären keinen Einfluss (Daten nicht gezeigt). Die prozentuale Anzahl der

perfundierten Gefäße in der Leber verringerte sich nach Infusionsbeginn stetig und pendelte sich am Ende der Infusionsphase bei rund 80% ein (Abb. 25 B). Bei der Betrachtung des mittleren hepatischen Gefäßdurchmessers zeigte sich, dass die Gefäße 10 Minuten nach Infusionsbeginn der PLGA-Sphären signifikant konstringierten und im Anschluss daran wieder dilatierten. Am Ende der Infusionsphase betrug der mittlere sinusoidale Gefäßdurchmesser in der Leber wieder 100% (Abb. 25 C).



**Abb. 25:** Einfluss von PLGA-Sphären auf den MAP (A), die prozentuale Anzahl perfundierter Gefäße in der Leber (B) und den hepatischen Gefäßdurchmesser (C). NaCl-Lsg. (0,9%) und PLGA-Sphären wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten intravenös infundiert. Die Infusionsvolumina betragen 10 ml/kg KGW x 30 Minuten. Infusionsbeginn war zum Zeitpunkt Null (0 Min.). Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n=6. \*  $p < 0,05$  verglichen mit der NaCl-Gruppe.

## Einfluss der Albumin-Kapseln auf die Mikrozirkulation und systemische Parameter

Im Gegensatz zu den PLGA-Sphären und den PLGA- und PACA-Kapseln hatten die Albumin-Kapseln weder einen Einfluss auf die systemischen Parameter noch auf die hepatische Mikrozirkulation (Abb. 26). Unabhängig von der applizierten Konzentration der Albumin-Kapseln blieben der MAP (Abb. 26 A), die Körpertemperatur, die Herz- und die Atemfrequenz (Daten nicht gezeigt) über die gesamte Versuchsdauer im physiologischen Bereich. Auch die prozentuale Anzahl der perfundierten Gefäße und der sinusoidale Gefäßdurchmesser in der Leber zeigten keine Abweichungen von der Kontroll-Gruppe (Abb. 26 B/C).

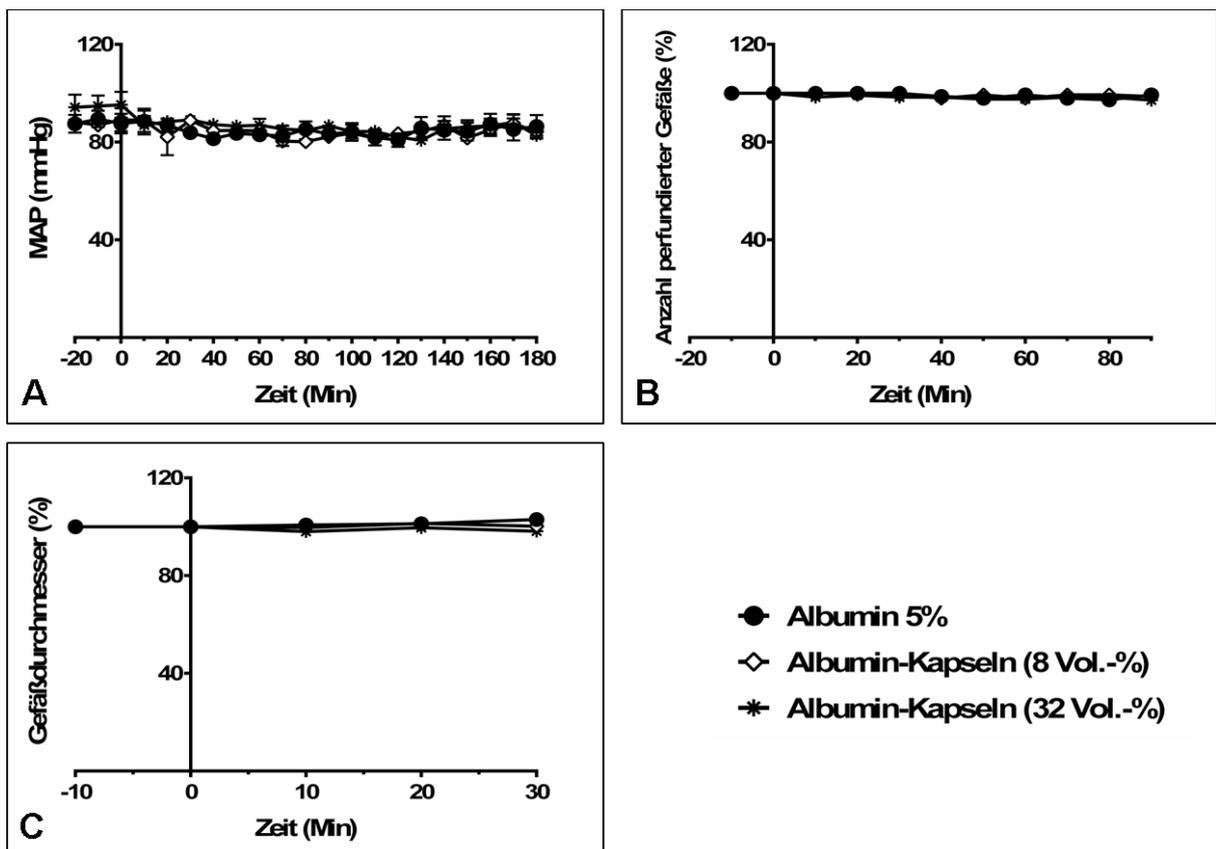


Abb. 26: Einfluss der Albumin-Kapseln auf den MAP (A), die prozentuale Anzahl perfundierter Gefäße in der Leber (B) und den hepatischen Gefäßdurchmesser (C). Albumin-Lsg. (5%) und Albumin-Kapseln (8 Vol.-% und 32 Vol.-%) wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten intravenös infundiert. Die Infusionsvolumina betragen 10 ml/kg KGW x 30 Minuten. Infusionsbeginn war zum

Zeitpunkt Null (0 Min.). Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=6$ . \*  $p < 0,05$  verglichen mit der Albumin-Kontrollgruppe.

Bei den Messungen der Sauerstoffversorgung des *m. gastrocnemius* zeigten sich in keiner Versuchsgruppe Effekte, die auf eine lokale Störung der Mikrozirkulation im Skelettmuskel verweisen würden. Sauerstoffversorgung ( $sO_2$ ), relativer Hämoglobingehalt (rHb), die generelle Durchblutung (Blood Flow) und die Blutflussgeschwindigkeit (Blood Flow Velocity) blieben über den gesamten Versuch in allen Gruppen unverändert (Daten nicht gezeigt).

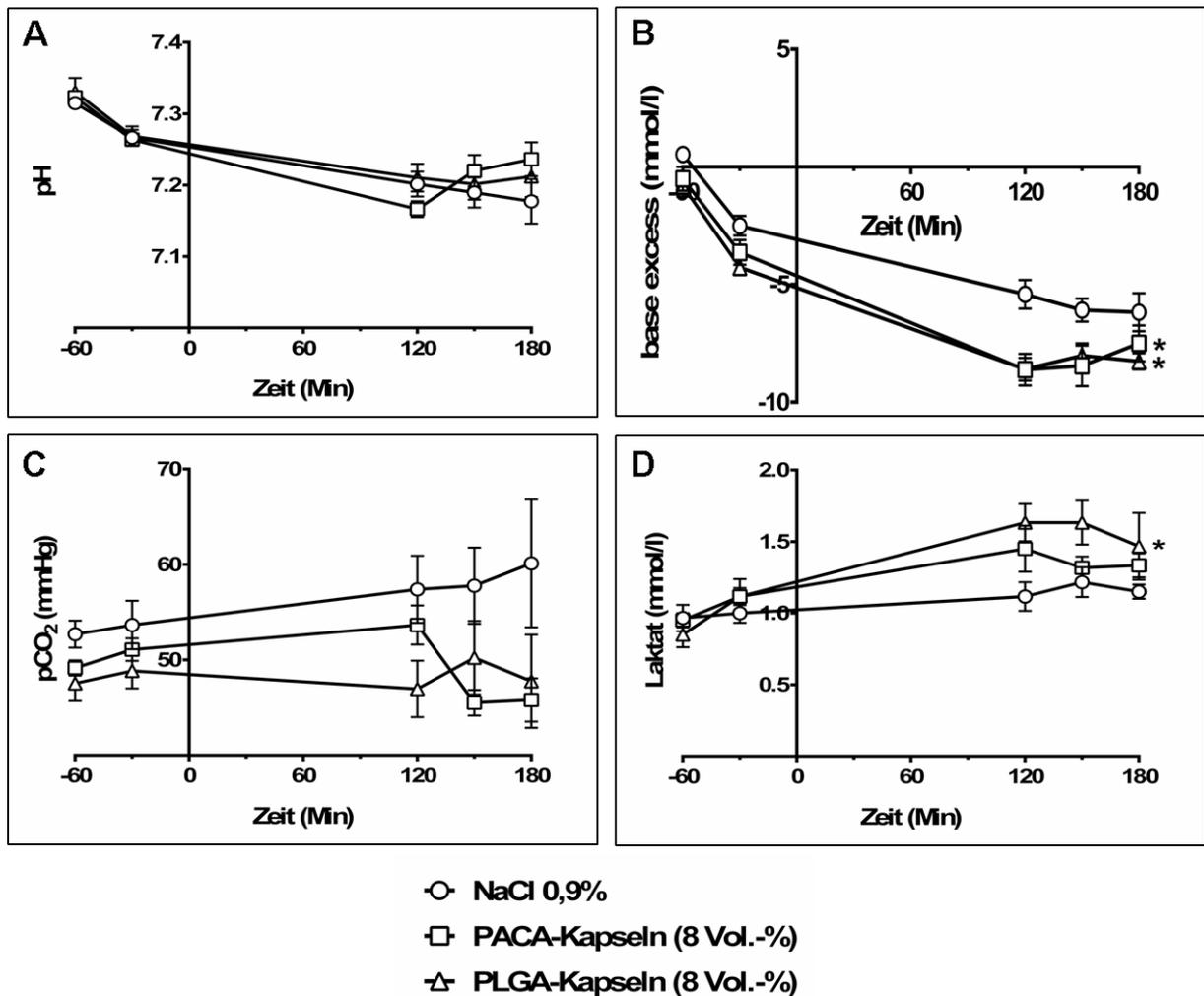
### **5.2.2 Einfluss der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln auf den Säure-Base-Haushalt und metabolische Parameter**

Im Vergleich zu den Kontrollgruppen manifestierten sich nach intravenöser Infusion der eingesetzten Kapselsuspensionen zum Teil signifikante Veränderungen der metabolischen Parameter und des Säure-Base-Status (Abb. 27/28).

#### **Effekte der PLGA- und PACA-Kapseln auf den Säure-Base-Status und die Laktatkonzentration im Blut**

In der NaCl, PLGA- und PACA-Gruppe war der initiale pH-Wert (7,33) leicht azidotisch (Abb. 27 A). Während der ersten 180 Minuten (von -60 Min bis 120 Min) des Versuchs verringerte sich der pH-Wert sukzessive auf ca. 7,2. Während in der letzten Stunde des Versuchs ein leichter pH-Anstieg in der PLGA- und PACA-Gruppe zu verzeichnen war, blieb der pH-Wert in der NaCl-Gruppe bei rund 7,2 (Abb. 27 A). Der Base Excess (BE) verringerte sich in den ersten 30 Minuten in allen drei

Gruppen, lag während dieser Zeit jedoch nie außerhalb des physiologischen Bereichs von +3 mmol/l bis -3 mmol/l (Abb. 27 B). 120 Minuten nach Infusionsbeginn fiel der BE in allen drei Versuchsgruppen unter das physiologische Niveau, war in der PLGA- und PACA-Gruppe (-8 mmol/l) jedoch signifikant tiefer als in der NaCl-Gruppe (-5 mmol/l). In Bezug auf den pCO<sub>2</sub>, zeigte sich nach Infusion von 0,9%iger NaCl-Lsg. eine leichte, aber stetige Zunahme über die gesamte Versuchszeit (Abb. 27 C). Während nach Infusion von PLGA-Kapseln keine nennenswerten Effekte auf den pCO<sub>2</sub> zu beobachten waren, stieg der pCO<sub>2</sub> in der PACA-Gruppe erst leicht an, um 120 Minuten nach Infusionsbeginn wieder abzufallen (Abb. 27 C). Der Laktatspiegel blieb in den NaCl-Kontrolltieren über den gesamten Versuchszeitraum mehr oder weniger konstant bei 1,0 mmol/l (Abb. 27 D). Nach Infusion der PACA-Kapseln zeigte sich eine kurzzeitige und leichte Erhöhung des Laktatspiegels auf 1,2 mmol/l, die sich schnell wieder regenerierte (Abb. 27 D). Im Vergleich dazu war die Laktatkonzentration 120 Minuten nach PLGA-Infusion signifikant auf 1,6 mmol/l erhöht, sank am Ende des Versuches (180 Min) aber auch wieder leicht ab (Abb. 27 D).



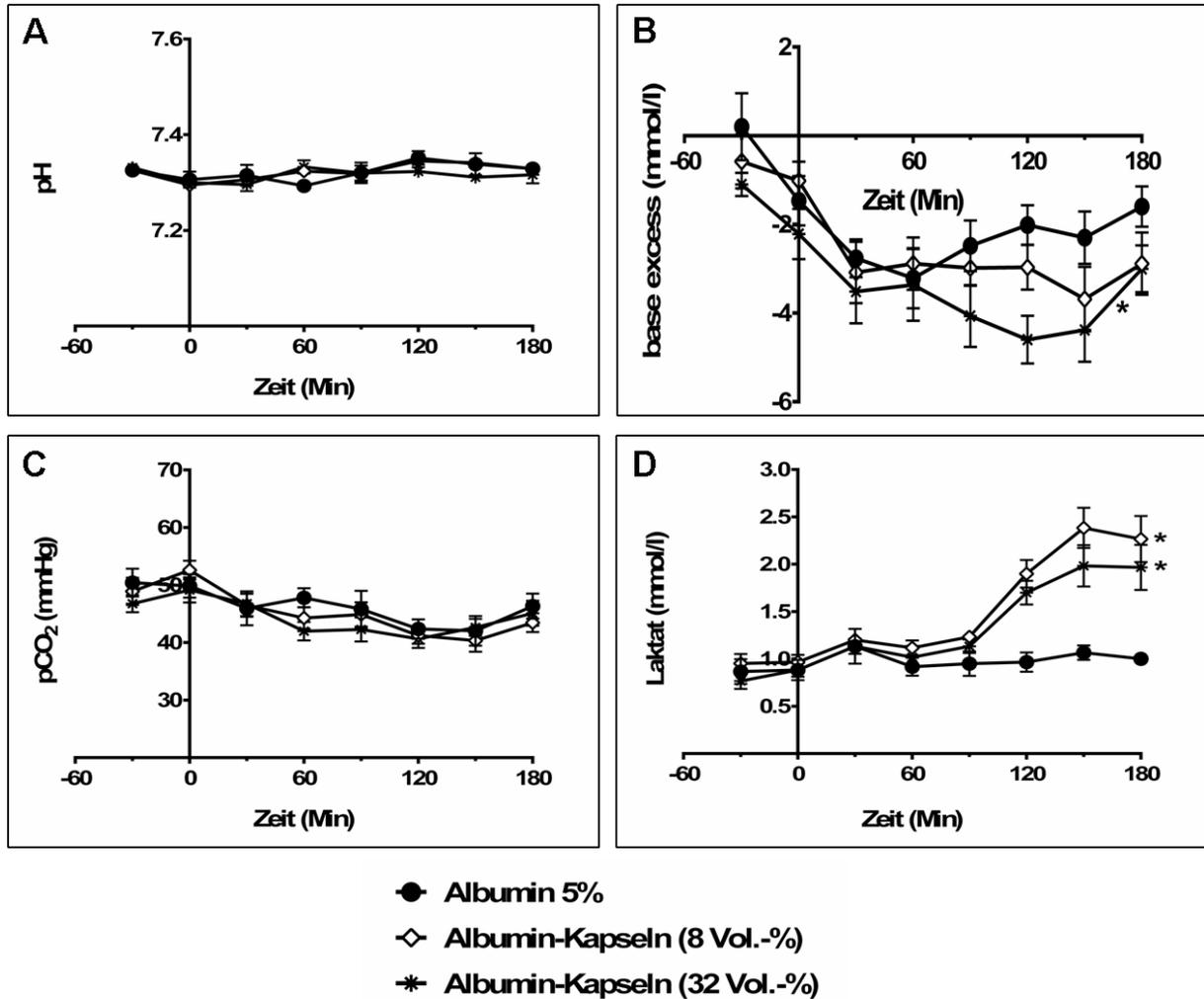
**Abb. 27:** Einfluss der PLGA- und PACA-Kapseln auf den pH-Wert (A), den Base Excess (B), den pCO<sub>2</sub> (C) und die Laktatkonzentration (D). NaCl-Lsg. (0,9%), PLGA- und PACA-Kapseln wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten intravenös infundiert. Die Infusionsvolumina betragen 10 ml/kg KGW x 30 Minuten. Infusionsbeginn war zum Zeitpunkt Null (0 Min.). Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n=6. \*  $p < 0,05$  verglichen mit der NaCl-Gruppe.

### **Einfluss der Albumin-Kapseln auf den Säure-Base-Haushalt und den Laktatspiegel im Blut**

Wie bei den NaCl, PLGA- und PACA-Tieren (Abb. 27 A) war der initiale pH-Wert (7,33) bei den Albumin-Kontrolltieren und den Albumin-Kapseltieren ebenfalls leicht azidotisch (Abb. 28 A). Sowohl in der Kontroll-Gruppe als auch in den Gruppen, die entweder 8 Vol.-%ige oder 32 Vol.-%ige Albumin-Kapseln infundiert bekamen, änderte sich der pH-Wert über den Versuchszeitraum nicht (Abb. 28 A).

Der BE nahm während der ersten 30 Minuten innerhalb des physiologischen Bereichs (+3 mmol/l bis -3 mmol/l) in allen drei Gruppen ab (Abb. 28 B). In der Albumin-Kontrollgruppe sank der BE bis 60 Minuten nach Infusionsbeginn stetig weiter ab und lag zu diesem Zeitpunkt nur minimal außerhalb des physiologischen Bereichs bei 3,2 mmol/l (Abb. 28 B). Im weiteren Verlauf des Versuchs stieg der BE kontinuierlich wieder an und lag zu jedem Zeitpunkt deutlich im physiologischen Bereich. Nach Infusion der 8 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension war der BE bis auf -3 mmol/l abgesunken und schwankte bis zum Versuchsende innerhalb der unteren Grenze des physiologischen Niveaus. Lediglich 150 Minuten nach Infusionsbeginn lag der BE kurzzeitig unterhalb dieser Grenze bei -3,7 mmol/l (Abb. 28 B). Im Gegensatz dazu unterschied sich der BE nach Infusion der 32 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension signifikant von der Kontrollgruppe. Bereits am Ende der Infusionsphase (Zeitpunkt 30 Min) lag der BE mit -3,5 mmol/l unterhalb des physiologischen Bereichs. Anschließend verringerte er sich kontinuierlich weiter bis zu einem Minimum von -4,6 mmol/l 120 Minuten nach Infusionsbeginn. Bis zum Versuchsende regenerierte sich der BE wieder auf ein physiologisches Niveau von -3 mmol/l (Abb. 28 B). Bei der Evaluierung des  $p\text{CO}_2$  zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Kontroll- und den Kapseltieren (Abb. 28 C). In allen drei Gruppen verringerte sich der  $p\text{CO}_2$  geringfügig über die Zeit hinweg. Bei der Betrachtung des Laktatspiegels zeigten sich wiederum signifikante Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den Kapseltieren (Abb. 28 D). Bis 90 Minuten nach Infusionsbeginn konnten noch übereinstimmende Laktatkonzentrationen in allen drei Gruppen gemessen werden. Anschließend kam es zu einem signifikanten Anstieg des Laktats in den beiden Kapselgruppen. 150 Minuten nach Infusionsbeginn erreichte die Laktatkonzentration nach Infusion der 8 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension ein Maximum von  $2,4 \text{ mmol/l} \pm 0,2 \text{ mmol/l}$ . Das Maximum nach Infusion der 32 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension lag zu diesem Zeitpunkt bei

2 mmol/l  $\pm$  0,2 mmol/l (Abb. 28 D). Der Unterschied zwischen den beiden Kapselgruppen war dabei nicht signifikant.



**Abb. 28:** Einfluss der Albumin-Kapseln auf den pH-Wert (A), den Base Excess (B), den pCO<sub>2</sub> (C) und die Laktatkonzentration (D). Albumin-Lsg. (5%) und Albumin-Kapseln (8 Vol.-% und 32 Vol.-%) wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten intravenös infundiert. Die Infusionsvolumina betragen 10 ml/kg KGW x 30 Minuten. Infusionsbeginn war zum Zeitpunkt Null (0 Min.). Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n=6. \*  $p < 0,05$  verglichen mit der Albumin-Kontrollgruppe.

### **5.2.3 Einfluss der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln auf spezifische Schädigungsmarker**

Zur Beurteilung von Organschädigungen nach intravenöser Infusion der verschiedenen Kapselsuspensionen wurden sowohl die Plasmakreatininkonzentrationen als auch die Plasmaenzymaktivitäten von Kreatinkinase (CK), Laktatdehydrogenase (LDH), Alanin-Aminotransferase (ALAT) und Aspartat-Aminotransferase (ASAT) bestimmt. Weder bei den NaCl-Kontrollen für die PLGA- und PACA-Kapseln noch bei den Albumin-Kontrollen für die Albumin-Kapseln zeigten sich Einflüsse auf die gemessenen Schädigungsmarker (Abb. 29 und Abb. 30).

#### **Einfluss der PLGA- und PACA-Kapseln auf die Plasmaaktivitäten und Plasmakonzentrationen der spezifischen Schädigungsmarker**

Beim Vergleich der NaCl-Kontrollgruppe mit der PLGA- und PACA-Gruppe zeigten sich zum Teil signifikante Unterschiede in den Konzentrationsspiegeln der gemessenen Schädigungsmarker (Abb. 29). Nach PLGA-Kapselinfusion (Infusionsbeginn bei 0 Min) konnte ein kontinuierlicher und signifikanter Anstieg der Transaminasen-Aktivität im Plasma gemessen werden (Abb. 29 A/B). Am Versuchsende (180 Min) war die ALAT-Aktivität von  $45 \pm 4$  U/l auf  $293 \pm 197$  U/l (6-fach) gestiegen (Abb. 29 A) und die ASAT-Aktivität von  $53 \pm 3$  U/l auf  $418 \pm 239$  U/l (8-fach) erhöht (Abb. 29 B). Im Vergleich dazu konnte nach Infusion der PACA-Kapseln lediglich ein leichter und nicht signifikanter Anstieg der ASAT-Aktivität im Plasma gemessen werden (Abb. 29 B). Die ALAT-Aktivität blieb hingegen unverändert (Abb. 29 A).

Die CK-Aktivität erreichte 180 Minuten nach Infusion der PLGA-Kapseln das 10,7-fache des Ausgangswertes und stieg von anfänglich  $100 \pm 28$  U/l auf  $1073 \pm 306$  U/l signifikant an (Abb. 29 C). Im Gegensatz dazu erreichte die CK-Aktivität in der

PACA-Gruppe 120 Minuten nach Infusionsbeginn ein Maximum von  $800 \pm 67$  U/l und sank danach bis zum Versuchsende (180 Min) wieder leicht ab (Abb. 29 C). Die LDH-Aktivität im Plasma wurde ebenfalls sowohl durch die PLGA-Kapseln als auch durch die PACA-Kapseln erhöht (Abb. 29 D). Während sie nach PLGA-Kapselinfusion um das 18-fache (von  $68 \pm 12$  U/l auf  $1245 \pm 617$  U/l) zunahm, erhöhte sie sich nach Infusion der PACA-Kapseln um das 6-fache (von  $61 \pm 9$  U/l auf  $351 \pm 40$  U/l). Darüber hinaus konnte nach PACA-Kapselinfusion ein signifikanter Anstieg in der Plasmakreatininkonzentration gemessen werden (Abb. 29 E), die 120 Minuten nach Infusionsbeginn fast verdoppelt war und danach wieder leicht absank. Bei den mit PLGA-Kapseln infundierten Tieren stieg die Kreatininkonzentration nur marginal und nicht signifikant. Die intravenöse Infusion von NaCl bewirkte zu keinem Zeitpunkt eine Änderung des Plasmaspiegels der gemessenen Schädigungsmarker (Abb. 29 A-E).

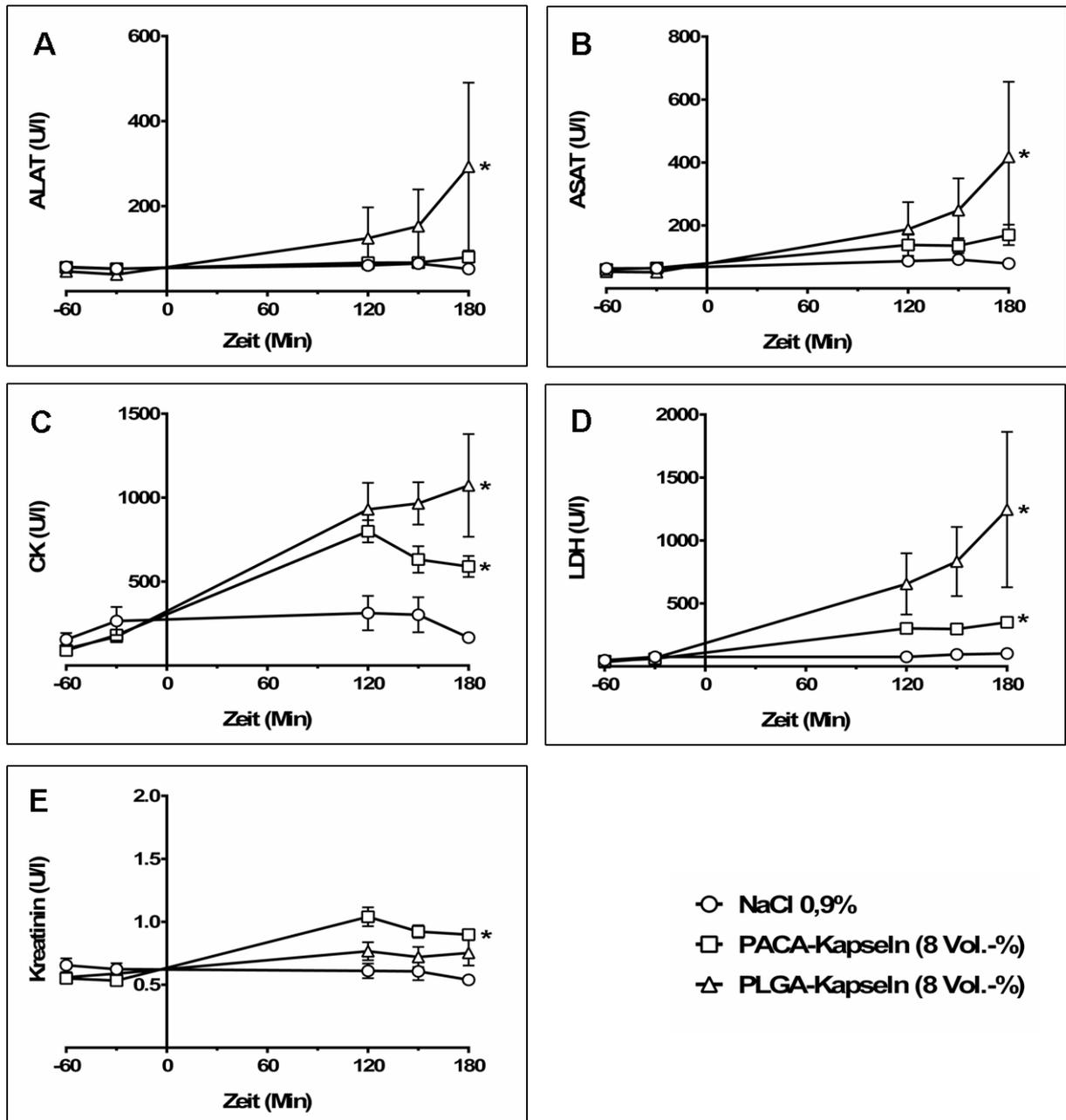


Abb. 29: Einfluss der PLGA- und PACA-Kapseln auf die Plasmakonzentrationen spezifischer Schädigungsmarker: Alanin-Aminotransferase (ALAT) (A), Aspartat-Aminotransferase (ASAT) (B), Kreatinkinase (CK) (C), Laktat-Dehydrogenase (LDH) (D) und Kreatinin (E). NaCl-Lsg. (0,9%), PLGA- und PACA-Kapseln wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten intravenös infundiert. Die Infusionsvolumina betragen 10 ml/kg KGW x 30 Minuten. Infusionsbeginn war zum Zeitpunkt Null (0 Min). Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n=6. \*  $p < 0,05$  verglichen mit der NaCl-Gruppe.

## **Einfluss der Albumin-Kapseln auf die Plasmaaktivitäten und Plasmakonzentrationen der spezifischen Schädigungsparameter**

Beim Vergleich der Plasmaaktivitäten und Plasmakonzentrationen der Schädigungsmarker nach Infusion der Albumin-Kapseln (8 Vol.-% und 32 Vol.-%) konnten im Vergleich zur Albumin-Kontrollgruppe erhöhte Aktivitäten von ALAT, ASAT, CK und LDH gemessen werden (Abb. 30 A-D). Die Plasmakreatininkonzentration blieb durch die Albumin-Kapseln unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Die ALAT-Aktivität war über die Versuchsdauer in allen drei Gruppen weitestgehend unverändert (Abb 30 A). Nach Infusion der Albumin-Kapseln mit 32 Vol.-% war am Versuchsende (180 Min) jedoch eine leichte, aber signifikante Zunahme der ALAT-Aktivität zu verzeichnen (Abb. 30 A). Im Gegensatz dazu wurde die ASAT-Aktivität im Plasma sowohl durch die Albumin-Kapseln mit einer Konzentration von 8 Vol.-% als auch durch die Albumin-Kapseln mit einer Konzentration von 32 Vol.-% signifikant beeinflusst. In beiden Fällen konnte 60 Minuten nach Kapselinfusion (Infusionsbeginn bei 0 Min) eine kontinuierliche Aktivitätszunahme gemessen werden. Während die ASAT-Aktivität nach Infusion von 8 Vol.-% Kapseln von anfänglich  $49 \pm 1$  U/l auf  $108 \pm 22$  U/l anstieg, erhöhte sie sich nach Infusion der 32 Vol.-% Kapseln von  $59 \pm 11$  U/L auf  $183 \pm 21$  U/l (Abb. 30 B).

Ein Anstieg der CK-Aktivität konnte nur nach Infusion der 32 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension beobachtet werden. Nach Kapselinfusion (Infusionsbeginn bei 0 Min; CK-Aktivität bei  $376 \pm 78$  U/l) erhöhte sich die CK-Aktivität bis sie sich 90 Minuten nach Infusionsbeginn bei  $639 \pm 113$  U/l einpendelte (Abb. 30 C). Bezüglich der LDH-Aktivität im Plasma konnte bei beiden Kapselkonzentrationen eine signifikante Aktivitätszunahme gemessen werden. Nach Infusion der 8 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension stieg die LDH-Aktivität kontinuierlich von ursprünglich  $76 \pm 25$  U/l (0 Min) auf  $274 \pm 106$  U/l (180 Min) an (Abb. 30 D). Die

Infusion der 32 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension führte zu einer Aktivitätssteigerung von anfänglich  $57 \pm 31$  U/l (0 Min) auf final  $451 \pm 62$  U/l (180 Min) (Abb. 30 D).

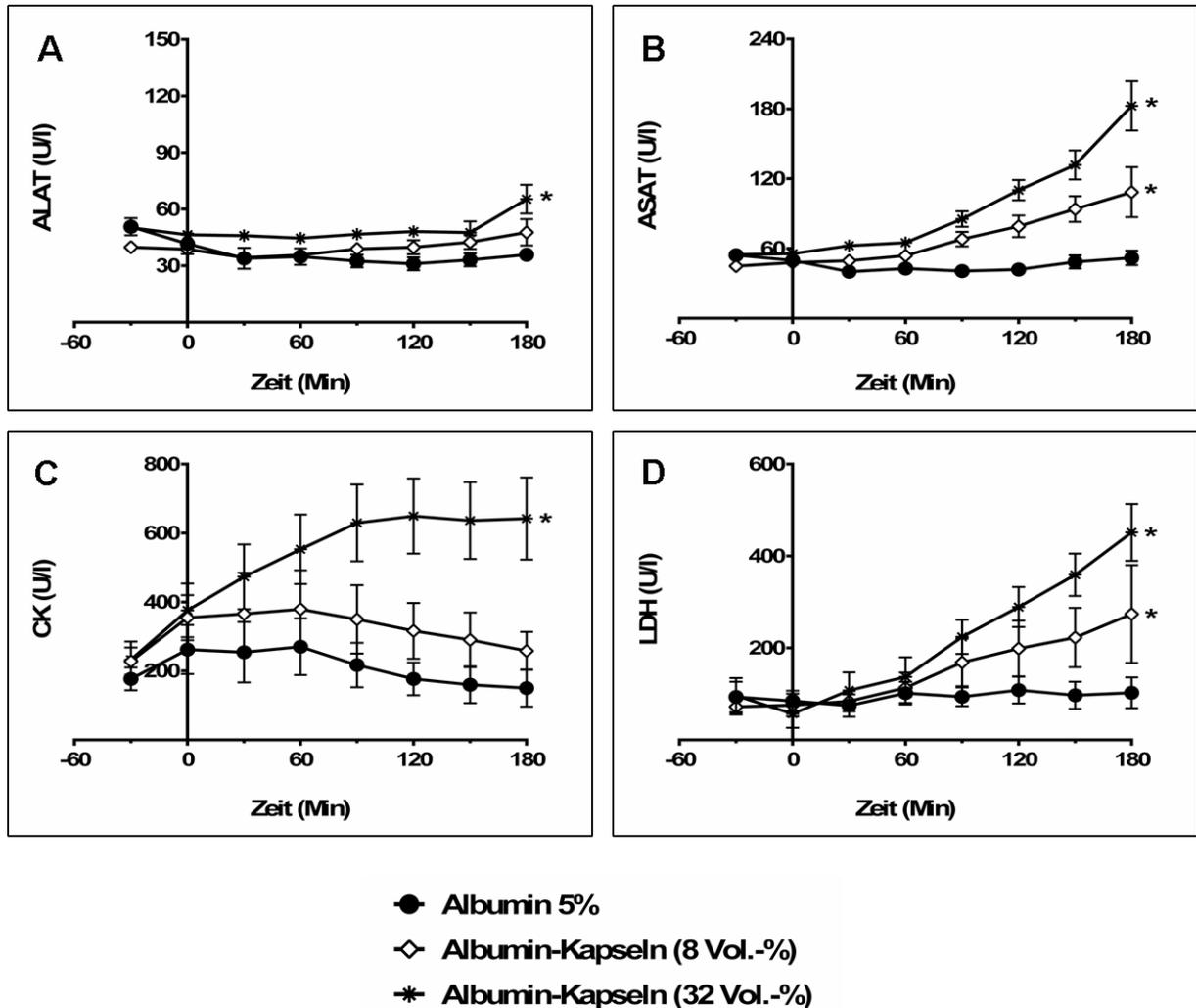


Abb. 30: Einfluss der Albumin-Kapseln auf die Plasmakonzentrationen spezifischer Schädigungsmarker: Alanin-Aminotransferase (ALAT) (A), Aspartat-Aminotransferase (ASAT) (B), Kreatinkinase (CK) (C), Laktat-Dehydrogenase (LDH) (D) und Kreatinin (E) Albumin-Lsg. (5%) und Albumin-Kapseln (8 Vol.-% und 32 Vol.-%) wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten intravenös infundiert. Die Infusionsvolumina betragen 10 ml/kg KGW x 30 Minuten. Infusionsbeginn war zum Zeitpunkt Null (0 Min). Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=6$ . \*  $p < 0,05$  verglichen mit der Albumin-Kontrollgruppe.

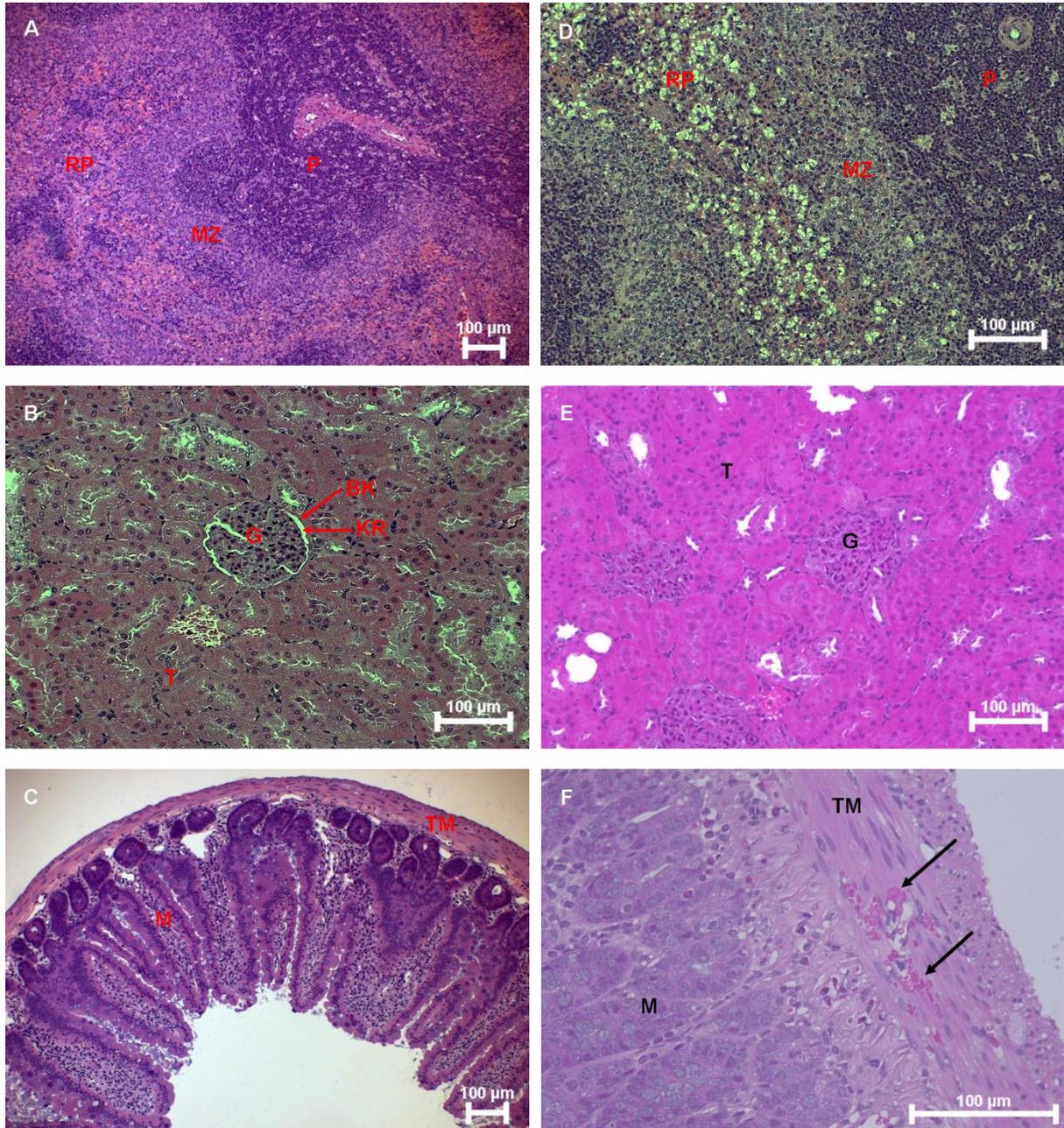
## 5.2.4 Einfluss der PACA- und Albumin-Kapseln auf die Integrität von Organstrukturen

Nach intravenöser Infusion von PACA- und Albumin-Kapseln kam es zu spezifischen Veränderungen von Organstrukturen. Untersucht wurden Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbte Schnittpräparate von Milz, Leber, Niere, Dünndarm, Herz, Lunge und *m. gastrocnemius* (siehe Abschnitt 4.2.7).

### Strukturelle Veränderungen von Milz, Niere und Dünndarm nach intravenöser Applikation von PACA-Kapseln

Im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe kam es nach Infusion von PACA-Kapseln zu deutlichen pathologischen Veränderungen in Milz, Niere und Dünndarm (Abb. 31). Während sich die rote und die weiße Pulpa (bestehend aus Periarterieller Lymphscheide und Marginalzone) in der Milz von NaCl-Tieren als sehr gleichmäßig und ohne pathologischen Befund präsentierten (Abb. 31 A), zeigten sich in den Milzschnitten von PACA-Tieren stark zerstörte Gewebestrukturen der roten Pulpa (Abb 31 D). Diese war von zahlreichen Vakuolen durchzogen (Abb. 31 D). Die Nieren von PACA-Tieren wiesen im Vergleich zu NaCl-Tieren ebenfalls große strukturelle Unterschiede auf. Vor allem die Malphigi-Körperchen, bestehend aus einer Bowman-Kapsel und dem dazugehörigen *glomerulus*, waren sehr stark verändert. Die *glomeruli* waren zum Teil deformiert und geschwollen, so dass der Kapselraum in der Bowman-Kapsel nicht mehr zu erkennen war (Abb. 31 E). Zudem erschienen die *tubuli* in *cortex* und *medulla* geschwollen (Bilder nicht gezeigt). Das Erscheinungsbild der Nierenschnitte der mit NaCl infundierten Tiere war pathologisch unauffällig (Abb. 31 B). In der *tunica muscularis* des Dünndarms manifestierten sich nach Infusion der PACA-Kapseln zahlreiche Petechien (Abb. 31 F). Die mikroskopischen

Untersuchungen von Schnittpräparaten von Leber, Herz und Lunge blieben ohne Befund (Bilder nicht gezeigt).

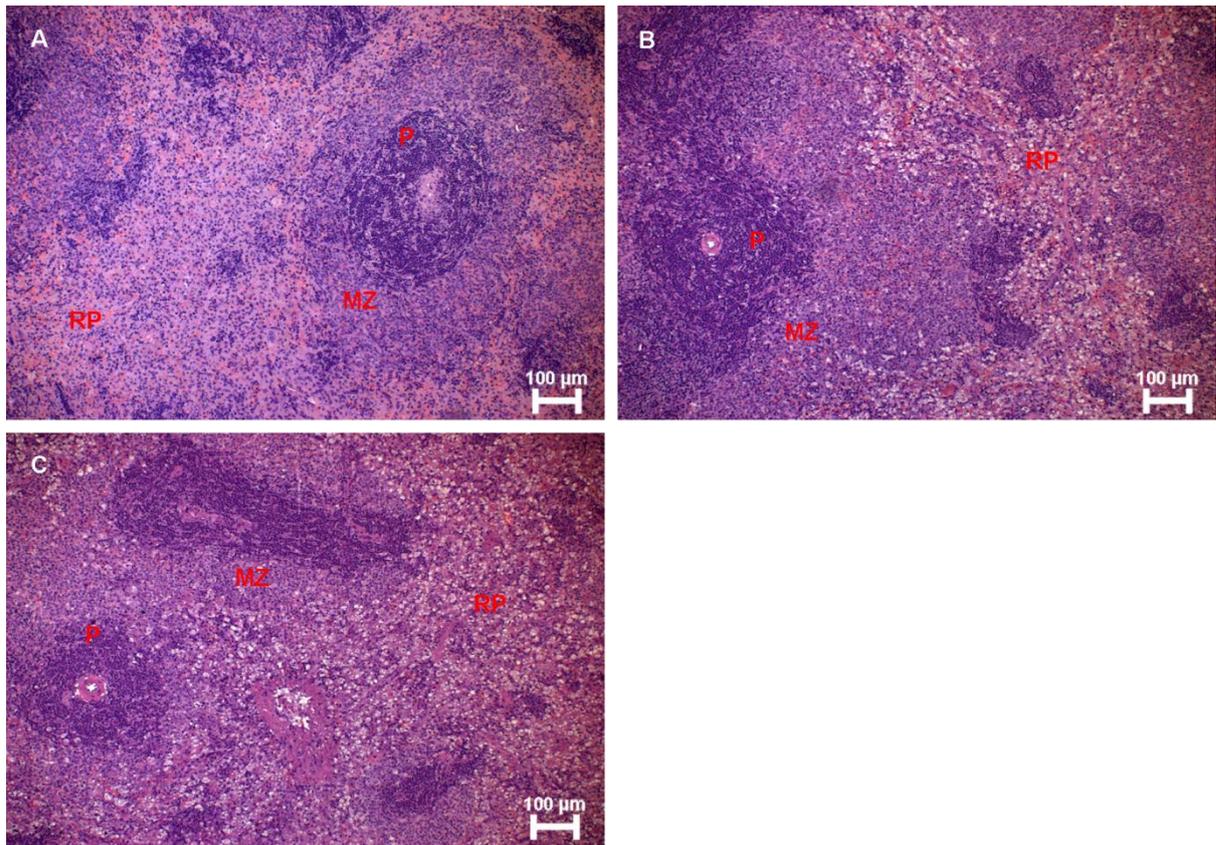


**Abb. 31: Strukturelle Veränderungen von Milz, Niere und Dünndarm nach intravenöser Applikation von PACA-Kapseln.** Nach Infusion von 0,9%iger NaCl-Lsg. zeigten sich bei der mikroskopischen Beurteilung von HE-gefärbten Schnittpräparaten keine pathologischen Veränderungen in Milz (A), Niere (B) und Dünndarm (C). Im Vergleich dazu führte eine intravenöse Applikation von PACA-Kapseln zu deutlichen strukturellen Veränderungen und Schädigungen in Milz (D) und Niere (E). In der *Tunica musculuslaris* des Dünndarms manifestierten sich nach intravenöser Infusion der PACA-Kapseln zudem zahlreiche Petechien (F, schwarze Pfeile). Mit: RP = rote Pulpa,

MZ = Marginalzone, P = periarterielle Lymphscheide, G = *glomeruli*, BK = Bowman-Kapsel, KR = Kapselraum, T = *tubuli*, M = *mucosa* und TM = *tunica muscularis*.

### **Albumin-Kapseln bewirken strukturelle Veränderungen in der Milz**

In histologischen Schnittpräparaten von mit Albumin-Kapseln infundierten Tieren konnten hingegen eindeutige pathologische Gewebeveränderungen in der Milz gefunden werden. Die eingesetzten Albumin-Kapselsuspensionen mit einem Gesamtvolumenanteil von 8 Vol.-% und 32 Vol.-% verursachten gleichermaßen schwerwiegende Schädigungen der roten Pulpa (Abb. 32 B und Abb. 32 C). Das Gewebe erschien völlig aufgelöst und war von unzähligen Vakuolen durchzogen (Abb. 32 B/C). Bei Albumin-Kontrolltieren waren keine strukturellen Veränderungen in der Milz ersichtlich. Sowohl die rote als auch die weiße Pulpa waren pathologisch unauffällig (Abb. 32 A). Die pathologische Beurteilung von Leber, Niere, Dünndarm, Herz, Lunge und *m. gastrocnemius* blieb ohne Befund (Bilder nicht gezeigt).

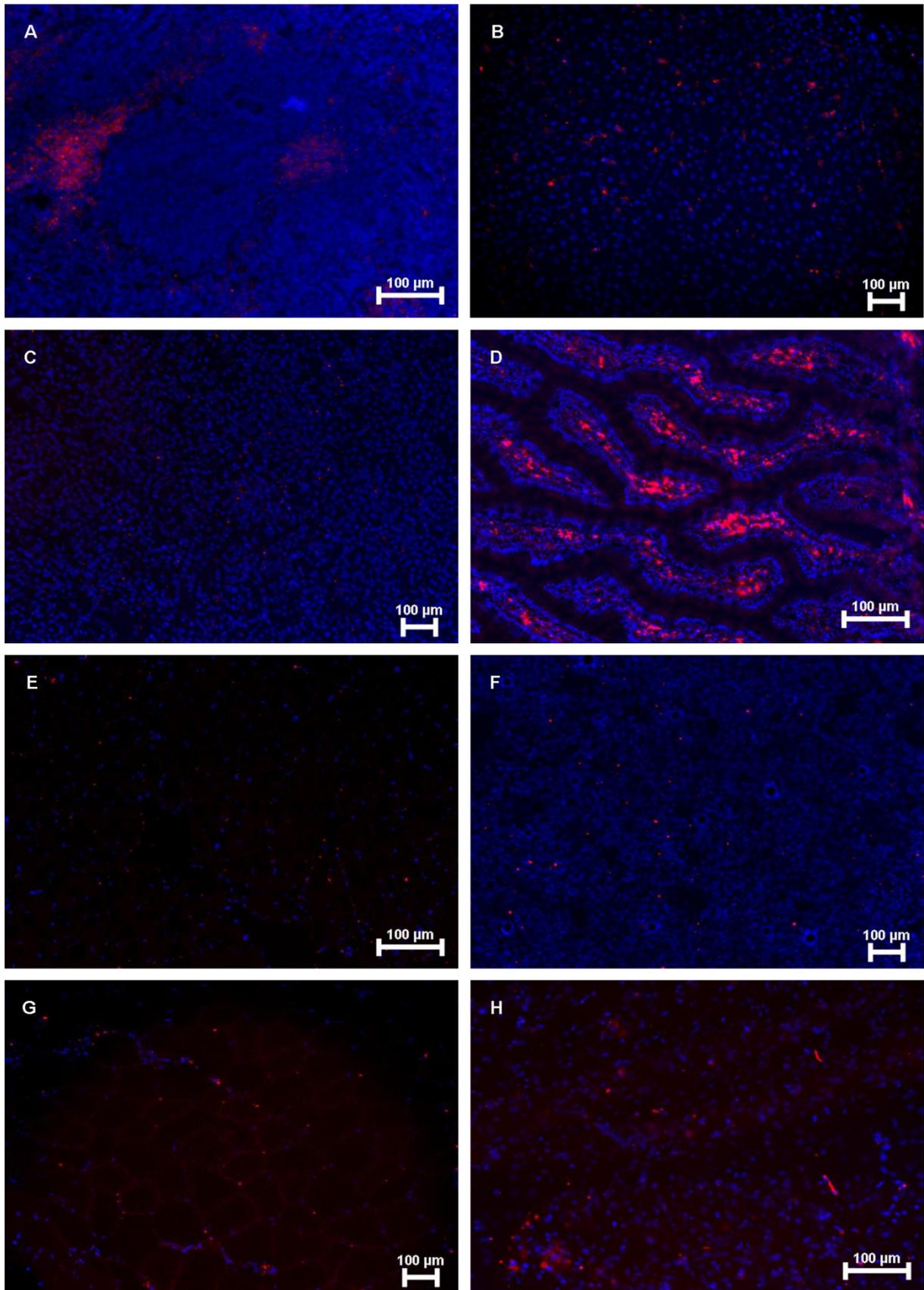


**Abb. 32: Einfluss der Albumin-Kapseln auf die Organstruktur der Milz.** Im Vergleich zu Tieren, denen 5%ige Albumin-Lösung infundiert wurde (A), zeigten sich in Schnittpräparaten der Milz von Tieren, die 8 Vol.-%ige (B) und 32 Vol.-%ige (C) Albumin-Kapselsuspension intravenös verabreicht bekommen hatten, starke strukturelle Veränderungen der roten Pulpa. Mit: RP = rote Pulpa, MZ = Marginalzone und P = periarterielle Lymphe.

### **5.2.5 *In vivo*-Verteilung der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln**

Nach intravenöser Infusion von fluoreszenzmarkierten PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln wurde die *in vivo*-Verteilung der Kapseln durch Beurteilung kryohistologischer Schnittpräparate bestimmt. Untersucht wurden dabei Schnittpräparate von Milz, Leber, Niere, Dünndarm, Herz, Lunge, *m. gastrocnemius* und Gehirn. Es konnte gezeigt werden, dass jeder Kapseltyp ein eigenes, ganz spezifisches Verteilungsmuster im Organismus aufweist (Abb. 33-35).

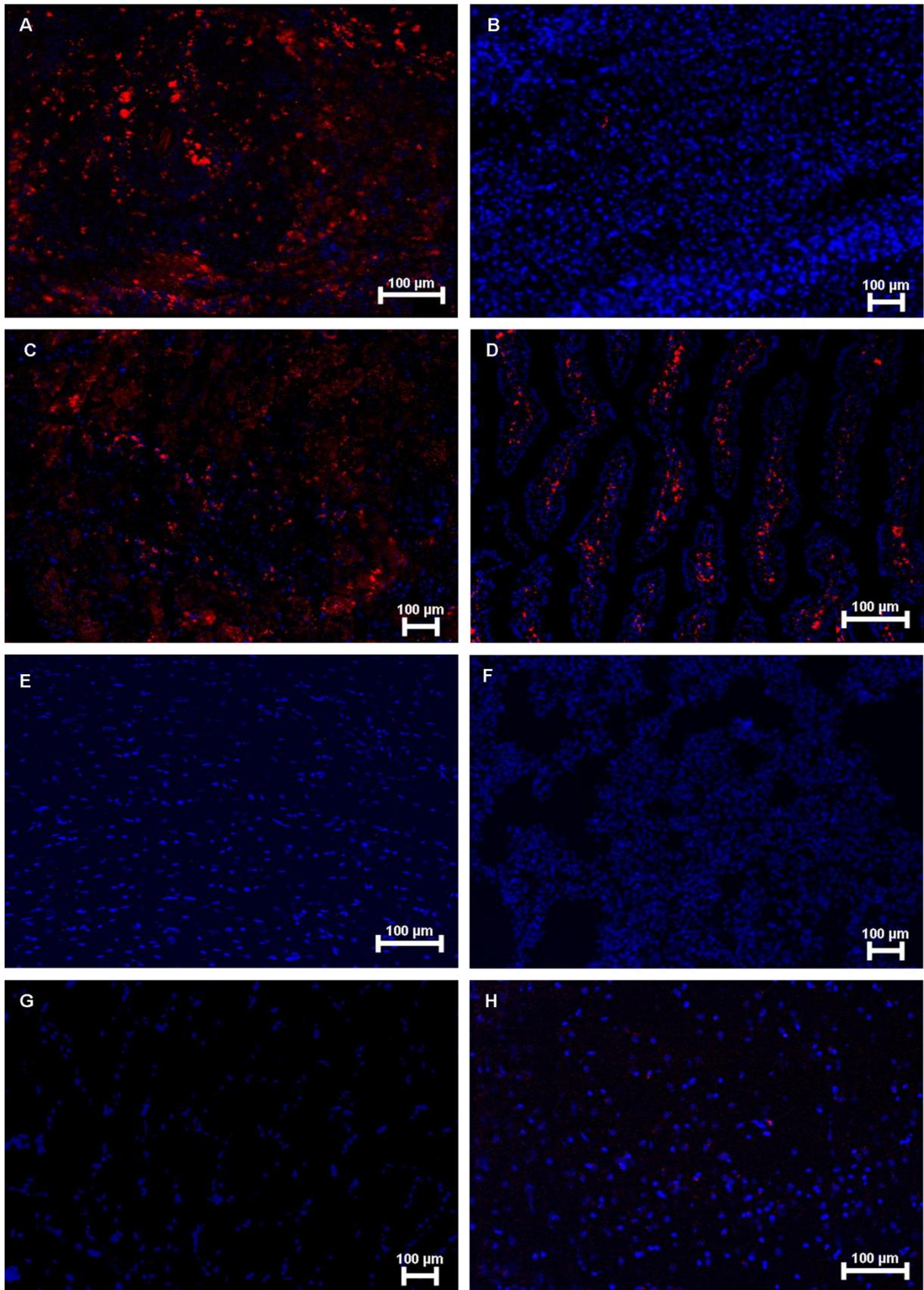
Im Falle der PLGA-Kapseln konnten Ablagerungen in allen untersuchten Organen gefunden werden (Abb. 33). Die größten Kapselansammlungen waren dabei in Milz, Leber, Dünndarm und Gehirn lokalisiert (Abb. 33 A/B/D/H).



**Abb. 33: *In vivo*-Verteilung der PLGA-Kapseln.** Nach intravenöser Applikation von Nilrot-markierten PLGA-Kapseln (rot) konnten in allen untersuchten Organen (Milz (A), Leber (B), Niere (C), Dünndarm (D), Herz (E), Lunge (F), *m. gastrocnemius* (G) und Gehir (H)) Kapselablagerungen gefunden

werden. In Milz (A), Leber (B), Dünndarm (D) und Gehirn (H) zeigten sich quantitativ die meisten Kapselansammlungen. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) gefärbt (blau).

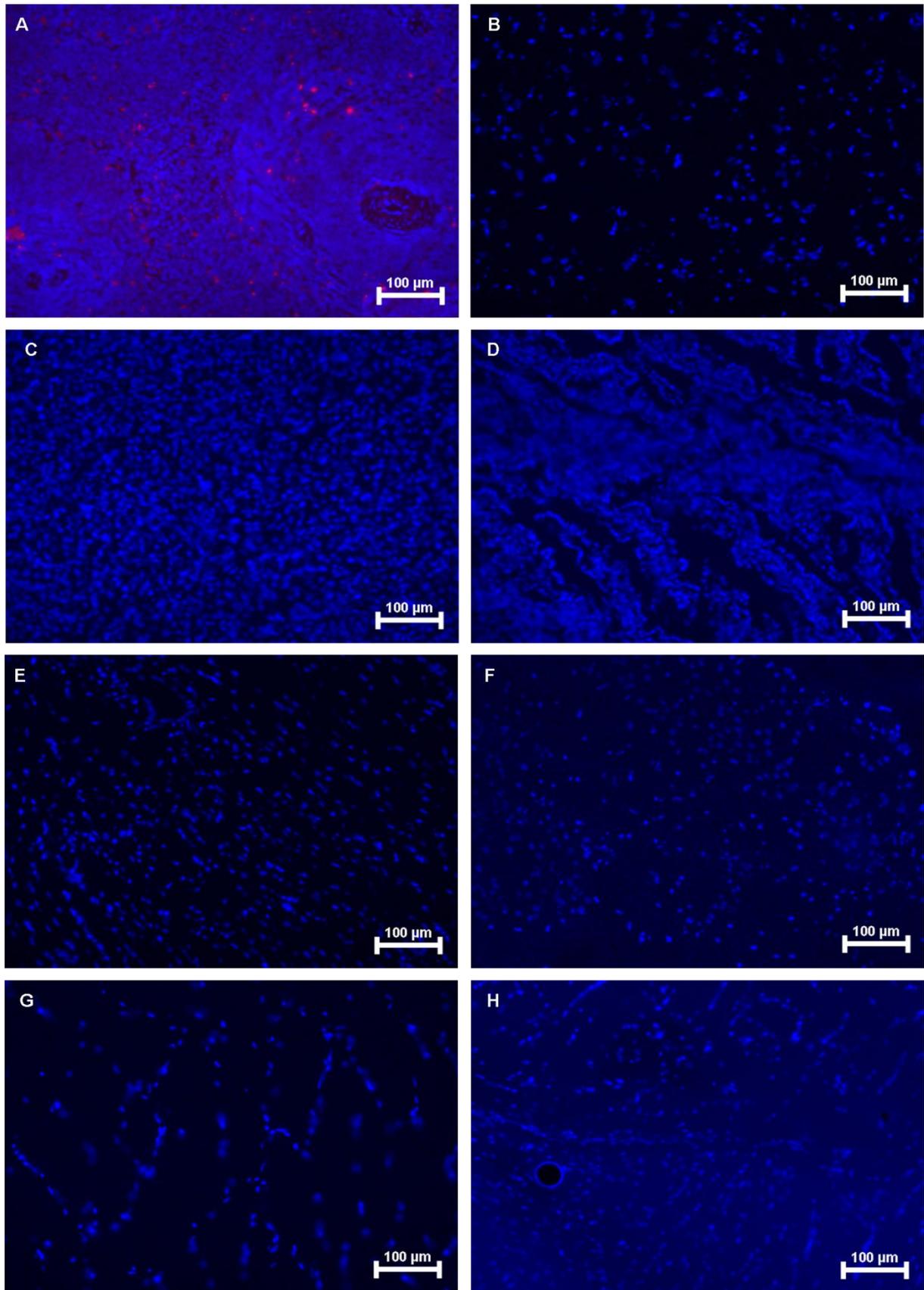
Nach intravenöser Applikation der PACA-Kapseln kam es zu massiven Kapselakkumulationen in Milz, Niere und Dünndarm (Abb. 34 A/C/D). Leber, Herz, Lunge, *m. gastrocnemius* und Gehirn blieben hingegen frei von Kapselablagerungen (Abb. 34 B/E-H).



**Abb. 34:** *In vivo*-Verteilung der PACA-Kapseln. Mit BODIPY-Thiol markierte PACA-Kapseln (rot) akkumulierten nach intravenöser Infusion spezifisch in Milz (A), Niere (C) und Dünndarm (D). Die kryohistologischen Schnittpräparate von Leber (B), Herz (E), Lunge (F), *m. gastrocnemius* (G) und

Gehirn (H) wiesen keine Kapselakkumulationen auf. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) gefärbt (blau).

Als Folge einer intravenösen Infusion der Albumin-Kapseln kam es zu zahlreichen Kapselablagerungen in der Milz (Abb. 35 A). Alle anderen untersuchten Organe zeigten keinerlei Anzeichen von Kapselakkumulationen (Abb. 35 B-H).

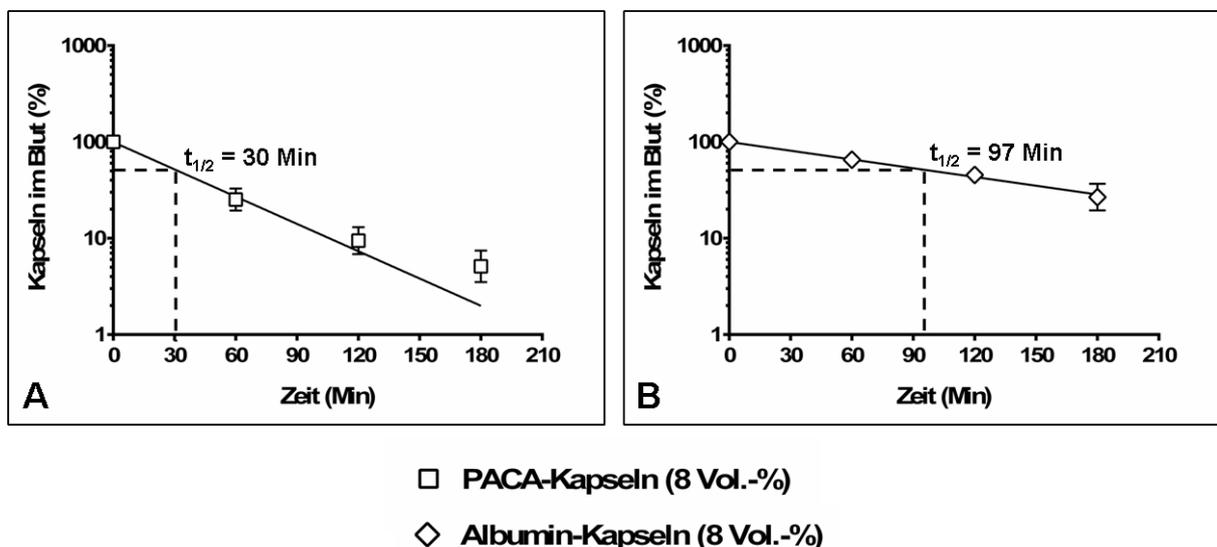


**Abb. 35: *In vivo*-Verteilung der Albumin-Kapseln.** Nach intravenöser Applikation von BODIPY-Thiol-markierten Albumin-Kapseln (rot) konnte eine spezifische Akkumulation der Kapseln in der Milz (A) festgestellt werden. Leber, Niere, Dünndarm, Herz, Lunge, *m. gastrocnemius* und Gehirn (B-H)

waren frei von Kapselansammlungen. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) gefärbt (blau).

## 5.2.6 Intravasale Halbwertszeit der PACA- und Albumin-Kapseln

Ausgehend vom PFD-Gehalt im Blut, der mittels  $^{19}\text{F}$ -NMR bestimmt wurde, konnten die *intravasalen* Halbwertszeiten (HWZ) der PACA- und Albumin-Kapseln (8 Vol.-%) berechnet werden. Die Albumin-Kapseln wiesen dabei im Vergleich zu den PACA-Kapseln eine deutlich längere HWZ auf (Abb. 36).



**Abb. 36: Intravasale Halbwertszeiten der PACA- und Albumin-Kapseln (8 Vol.-%)** Die Kapseln wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten intravenös infundiert. Die Infusionsvolumina betragen 10 ml/kg KGW x 30 Minuten. Im Anschluss an den Infusionszeitraum (Infusionsende bei 0 Min) wurde, basierend auf dem Gesamtgehalt an PFD in den Blutproben der verschiedenen Zeitpunkte, der prozentuale Gehalt an Kapseln im Blut über einen Zeitraum von 180 Minuten berechnet. Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$  und die dazugehörigen exponentiellen Ausgleichsgeraden.

Während 30 Minuten nach Infusionsende bereits nur noch die Hälfte der ursprünglichen Kapselkonzentration der PACA-Kapseln gemessen werden konnte (Abb. 36 A mit  $t_{1/2} = 30$  Min), betrug die Konzentration der Albumin-Kapseln zu diesem Zeitpunkt noch ca. 82%. Erst nach ca. 97 Minuten waren 50% der Albumin-Kapseln aus dem Intravasalraum entfernt (Abb. 36 B mit  $t_{1/2} = 97$  Min), womit die *intravasale* HWZ der Albumin-Kapseln mehr als 3-mal so lang war wie die der PACA-Kapseln.

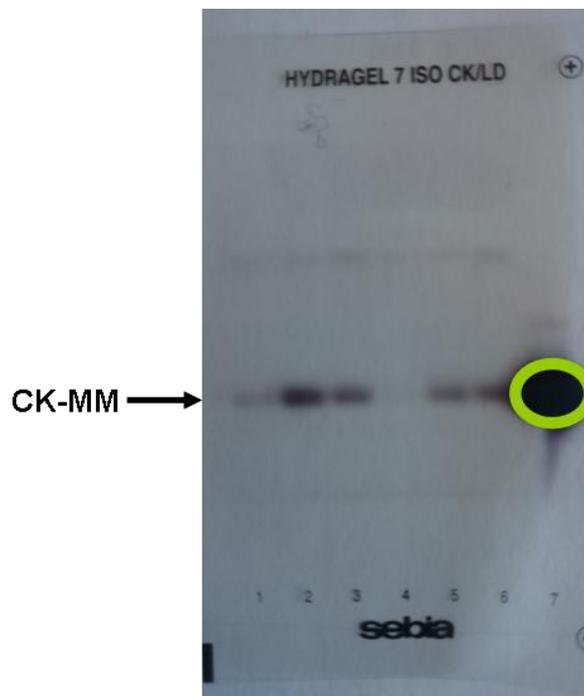
### **5.2.7 Einfluss der Infusion von PACA- und Albumin-Kapseln auf die Plasma-Konzentration der Anaphylatoxine C3a und C5a**

Die Messung der Komplementfragmente C3a und C5a zeigte, dass die Infusion von PACA- und Albumin-Kapseln keine Aktivierung des Komplementsystems zur Folge hatte. Weder zu Beginn der Infusionsphase noch nach beendeter Infusion konnte eine erhöhte Konzentration des Anaphylatoxins C5a gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Die Konzentration des Anaphylatoxins C3a lag bei beiden Zeitpunkten unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA-Kits von 25 µg/ml (Daten nicht gezeigt).

### **5.2.8 Bestimmung der CK-Isoenzyme nach Infusion der Albumin-Kapseln**

Im Rahmen der toxikologischen Untersuchungen zu den Albumin-Kapseln, wurden die CK-Isoformen mittels Gelelektrophorese bestimmt (Abschnitt 4.2.4). Während die

unverdünnte Negativ-Kontrolle (Plasma vor Infusionsbeginn) eine schwache CK-MM-Bande aufwies, zeigten sich in der diluierten Negativ-Kontrolle (Plasma vor Infusionsbeginn 1:1 verdünnt) keine Banden für CK-Isoenzyme (Abb. 37; Spur 1 und Spur 4). Für den CK-MM-Standard (CK-MM *rabbit*) konnte eine deutlich ausgeprägte CK-MM-Bande detektiert werden (Abb. 37; Spur 7). Sowohl 30 als auch 60 Minuten nach dem Infusionsende der 32 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension manifestierten sich deutliche CK-MM-Banden (Abb. 37). Andere Isoformen wurden nicht detektiert.



**Abb. 37: Gelelektrophorese zur Auftrennung der CK-Isoenzyme.** Belegung der Spuren: **1)** Plasma vor Infusionsbeginn (konzentriert), **2)** Plasma 30 Minuten nach Infusionsende (konzentriert), **3)** Plasma 60 Minuten nach Infusionsende (konzentriert), **4)** Plasma vor Infusionsbeginn (1:2 verdünnt), **5)** Plasma 30 Minuten nach Infusionsende (1:2 verdünnt), **6)** Plasma 60 Minuten nach Infusionsende (1:2 verdünnt), **7)** Ck-MM-Standard (vom Kaninchen; CK-MM rabbit, grün). Die Laufzeit betrug 14 Minuten bei 100 Volt.

## 6 Diskussion

### 6.1 Keimfreiheit und mikrobielle Stabilität der Kapselsuspensionen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten mikrobiologischen Testreihen basierten auf den Empfehlungen des europäischen Arzneibuchs (*pharmacopoea europaea*, *Ph. Eur.*) für eine Prüfung auf Sterilität<sup>57</sup>. So konnte sichergestellt werden, dass die im Tier eingesetzten Kapselsuspensionen frei von Bakterien und Pilzen waren (Abb. 19). Alle Effekte, die nach intravenöser Applikation der Kapselsuspensionen beobachtet wurden, können daher als reine Kapsel-Effekte angesehen werden und sind nicht auf eine Kontamination der Suspensionen mit Mikroorganismen zurückzuführen. Zudem ist eine sterile Lagerung der Kapselsuspensionen auch ohne den Zusatz von Konservierungsstoffen möglich, was eine Grundvoraussetzung für den klinischen Einsatz der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln als künstliche Sauerstoffträger darstellt (Abb. 19). Darüber hinaus ist dies ein wichtiges Kriterium für die Herstellung der Kapselsuspensionen als Bulk-Ware, so dass zum einen eine ausreichende Verfügbarkeit der künstlichen Sauerstoffträger garantiert wäre und zum anderen Kosten und Zeit des Herstellungsverfahrens gesenkt werden könnten.

## 6.2 *In vivo*-Verteilung, *intravasale* Halbwertszeit, und Organschädigungen

Für die in dieser Arbeit verwendeten PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln konnten kapseltypspezifische Verteilungsmuster im Organismus festgestellt werden (Abb. 33, Abb. 34 und Abb. 35), so dass anzunehmen ist, dass vor allem die verwendeten Kapselwandmaterialien einen maßgeblichen Einfluss auf die *in vivo*-Verteilung hatten. Es ist zu vermuten, dass die als Kapselwandmaterialien verwendeten künstlichen Polymere PLGA und PACA vom Immunsystem als körperfremd erkannt und durch Proteine opsoniert werden, was die Aufnahme der Kapseln durch das RES begünstigt<sup>66</sup>. Bei dem verwendeten Albumin hingegen handelt es sich um ein physiologisches Biopolymer, das in der Literatur bereits als potenzielles Protein zum „Coating“ von biomedizinisch einsetzbaren Nanopartikeln diskutiert wird<sup>67</sup>. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass die Albumin-Kapseln vom Immunsystem weitestgehend unentdeckt bleiben. Gestützt wird diese These durch die *intravasalen* Halbwertszeiten der verschiedenen Kapseltypen. Im Vergleich zu den PLGA- und PACA-Kapseln wiesen die Albumin-Kapseln mit 97 Minuten die längste *intravasale* HWZ auf (Abb. 36 B). Die relativ kurze *intravasale* HWZ der PACA-Kapseln lag mit 30 Minuten im Bereich der Halbwertszeiten von anderen, nicht oberflächenmodifizierten PACA-Nanokapseln (Abb. 36 A)<sup>68-70</sup>. Für die in dieser Arbeit verwendeten PLGA-Kapseln konnte in früheren Untersuchungen eine im Vergleich zu den PACA-Kapseln verlängerte HWZ von 55 Minuten nachgewiesen werden<sup>52</sup>, die zum Teil durch die PEGylierung der Kapseln bedingt gewesen sein könnte, da bekannt ist, dass PEGylierung die *intravasalen* Halbwertszeiten verlängern kann<sup>70, 71</sup>. Es ist zu erwähnen, dass die zirkulatorischen Halbwertszeiten für intravenös applizierte Partikel bei der Ratte viel kürzer sind als beim Menschen. Dies liegt daran, dass das RES der Ratte bezüglich der Aufnahme und Entfernung von körperfremden

Partikeln deutlich höhere Kapazitäten aufweist<sup>72</sup>. Für eine Anwendung beim Menschen wären daher bedeutend längere Halbwertszeiten der Kapseln im Intravasalraum zu erwarten.

In Übereinstimmung mit den spezifischen *in vivo*-Verteilungsmustern der unterschiedlichen Kapseltypen konnten pathologische Veränderungen der Organstrukturen und ein Anstieg spezifischer Schädigungsparameter im Plasma nachgewiesen werden. Die Akkumulation der PACA-Kapseln in Milz, Niere und Dünndarm hatte schwerwiegende Veränderungen der Gewebestrukturen in diesen Organen zur Folge (Abb. 34 A/C/D und Abb. 31 D-E). Es manifestierten sich deutliche Gewebeveränderungen der roten Pulpa in der Milz sowie deformierte, zum Teil geschwollene *glomeruli* in der Niere und Einblutungen in der *tunica muscularis* des Dünndarms (Abb. 31 D-F). Während die Zunahme der LDH-Aktivität eine generelle Organschädigung anzeigte, implizierte der Anstieg der Plasmakreatininkonzentration nach Infusion der PACA-Kapseln eine Nierenfunktionsstörung (Abb. 29 D und Abb. 29 E). Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Nierenschädigung könnte der Metabolisierungsprozess des PACA-Polymers sein<sup>55</sup>. Unter physiologischen Bedingungen wird der Abbau der PACA-Kapseln hauptsächlich als eine enzymatische Hydrolyse der Esterfunktionen der Seitenketten des Polymers beschrieben<sup>73</sup>. Die dabei entstehenden Abbauprodukte sind Cyanacrylsäure und der korrespondierende Alkylalkohol *n*-Butanol, der nierenschädigend wirken kann<sup>74</sup>. Die Ausscheidung der Cyanacrylsäure erfolgt durch renale Filtration<sup>73</sup>, während der Alkylalkohol einem enzymatischen Abbau durch die Alkoholdehydrogenase und die Aldehyddehydrogenase unterliegt. Trotz der beobachteten Organschädigungen blieb die Barrierefunktion der Nieren intakt, da im Urin keine PACA-Kapseln nachgewiesen werden konnten (Abb. 31 E)<sup>55</sup>. Im Gegensatz zu anderen PACA-Nanokapseln<sup>69, 75</sup>, aber im Einklang mit Wilson *et al.*<sup>76</sup>, konnten fast keine Ablagerungen der PACA-Kapseln in der Leber festgestellt werden

(Abb. 34 B). So zeigten sich auch bei den Plasmaspiegeln der Transaminasen der Leber keine signifikanten Aktivitätssteigerungen nach Applikation der PACA-Kapseln (Abb. 29 A/B).

Der dosisabhängige, proportionale Anstieg von LDH und CK nach Applikation der Albumin-Kapseln deutet auf einen Herzmuskel-, Skelettmuskel oder Gehirnschaden hin (Abb. 29 C/D). Durch die Bestimmung der CK-Isoenzyme konnte sowohl eine Myokardschädigung als auch eine Schädigung des zentralen Nervensystems als unwahrscheinlich angenommen werden (Abb. 37). Zudem zeigten sich bei den Messungen der Sauerstoffversorgung des *m. gastrocnemius* keine Anzeichen für eine lokal gestörte Mikrozirkulation bzw. eine Gewebeschädigung des Skelettmuskels (Abschnitt 5.2.1; Daten nicht gezeigt). Daher musste eine andere Quelle als das zentrale Nervensystem, der Herz- oder Skelettmuskel für den beobachteten CK-Anstieg in Betracht gezogen werden.

Stressfasern (*stress fibers*) sind strukturelle Komponenten des Aktinfilamentsystems und sind u. a. in Endothelzellen wie z. B. in verzweigten Kapillaren, Arterien und Herzkammern lokalisiert<sup>77-81</sup>. Drenckhahn *et al.* konnten zeigen, dass Stressfasern bei Säugern auch im Sinusendothel der Milz vorkommen<sup>81</sup>. Blutzellen und Blutplasma gelangen durch terminale, offene Blutgefäße in den Extravasalraum der Milz, von wo aus sie permanent durch interendotheliale Lücken in das Sinuslumen gepresst werden<sup>81</sup>. Der Filtrationsprozess kann dabei aktiv durch Adhensionsverbindungen, die so genannte *adherens junctions*, vorangetrieben werden, wobei starke Scherkräfte am Endothel auftreten können<sup>82, 83</sup>. Es wird vermutet, dass die Stressfasern den Filtrationsprozess in der Milz unterstützen, indem sie die Seitenränder der interendothelialen Lücken vor Zellablösung schützen<sup>81</sup>. Darüber hinaus konnten Eckert *et al.* nachweisen, dass Kreatinkinase vom Typ CK-MM u. a. in Stressfasern lokalisiert ist<sup>84</sup>. Berücksichtigt man all diese Fakten, so ist zu vermuten, dass eine starke Zellschädigung der Milz zu erhöhten

CK-Werten im Plasma führen kann. Übereinstimmend mit dieser These konnten nach Infusion aller drei Kapseltypen sowohl erhöhte CK-Werte im Plasma gemessen (Abb. 29 C und Abb. 30 C) als auch starke Schädigungen der roten Pulpa der Milz beschrieben werden (Abb. 31 D (PACA-Kapseln); Abb. 32 B/C (Albumin-Kapseln; Ferez *et al.* und Waack (PLGA-Kapseln)<sup>31, 53</sup>). Dabei ist anzunehmen, dass diese beobachteten Gewebeschädigungen auf einen Filtrationsprozess der Kapseln in der Milz zurückzuführen sind, da Kapselakkumulationen aller Kapseltypen in der Milz nachgewiesen werden konnten (Abb. 33 A, Abb. 34 A und Abb. 35 A). Es ist bereits bekannt, dass Partikel mit einem Durchmesser von unter 200 nm in der Milz nicht filtriert werden<sup>85, 86</sup>, was bedeutet, dass alle Partikel mit einem Durchmesser von über 200 nm, also auch alle in dieser Arbeit eingesetzten Kapseltypen, der Filtration in der Milz unterliegen.

Während die ALAT im Allgemeinen im Zytosol von Hepatozyten lokalisiert ist, befindet sich die ASAT in den Mitochondrien jeder Zelle. Folglich kann bei einer Aktivitätszunahme der ASAT ein Leberschaden ausgeschlossen werden, wenn die Aktivität der ALAT unverändert bleibt. Im Falle der Albumin-Kapseln ist es daher wahrscheinlich, dass die ASAT-Aktivität im Plasma ebenfalls aufgrund der Kapselakkumulationen und der Zellschädigungen in der Milz zunahm (Abb. 30 B, Abb 35 A und Abb. 32 B/C).

### 6.3 *Transiente systemische Hypotension*

Schon lange ist bekannt, dass die Infusion von PFC-basierten künstlichen Sauerstoffträgern in Form von PFC-Emulsionen zu einer transienten Hypotension führen kann<sup>48, 49</sup>. In neuester Zeit konnte dieser vorübergehende Blutdruckabfall auch für kapselbasierte, PFD-haltige Sauerstoffträger beschrieben werden<sup>31, 32, 53, 55</sup>. Die nach intravenöser Applikation der PLGA- und PACA-Kapseln beobachtete *transiente* Hypotension könnte durch die PFD-Füllung ausgelöst worden sein, da sich nach Applikation von PLGA-Sphären (keine PFD-Füllung) kein Abfall des MAP zeigte (Abb 24 A und Abb. 25 A). Auch die Daten von Ferez *et al.* und Waack belegen, dass PLGA-Sphären keinen Einfluss auf den Blutdruck haben<sup>31, 53</sup>.

Ein in der Literatur beschriebener Auslöser einer systemischen Vasodilatation bzw. einer Hypotension ist die klassische oder alternative Aktivierung des Komplementsystems<sup>87</sup>. Wird das Komplementsystem beispielsweise durch körperfremde Partikel aktiviert<sup>87</sup>, werden vasoaktive Substanzen wie z. B. Anaphylatoxine freigesetzt, die die Permeabilität kleiner Blutgefäße steigern. Im Einklang mit dieser Hypothese konnten Ferez *et al.* und Waack eine Abnahme des Komplementfaktors C3 und eine Konzentrationserhöhung des Anaphylatoxins C4a 90, 170 und 250 Minuten nach intravenöser Infusion von PFD-gefüllten PLGA-Kapseln messen<sup>31, 53</sup>. Im Falle der PACA-Kapseln konnte jedoch kein Anstieg der Anaphylatoxine C3a und C5a festgestellt werden (Abschnitt 5.2.7; Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zu Ferez *et al.* und Waack<sup>31, 53</sup> wurden die Konzentrationen der Anaphylatoxine direkt am Ende der Infusionsphase und nicht im späteren Verlauf des Versuchs gemessen. Eine mit Komplementaktivierung assoziierte Pseudoallergie (CARPA), die zum Beispiel durch Nanopartikel, Polymere oder Emulgatoren ausgelöst werden kann<sup>88, 89</sup>, ist sehr unwahrscheinlich, da Ratten im Allgemeinen nicht sehr anfällig für CARPA sind<sup>90</sup>.

Eine andere Ursache für die *transiente* Hypotension könnten Stickstoffmonoxid (NO)-vermittelte Signalwege sein. Die hydrophobe PFD-Phase bietet ideale Bedingungen für eine Anreicherung von O<sub>2</sub> und NO, so dass über intermediäres Distickstofftrioxid (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) vermehrt S-Nitrosothiole gebildet werden könnten, die als biologische Metabolite und NO-Donatoren gelten<sup>31, 55, 91-93</sup>. Zudem kann die Bildung von S-Nitrosothiolen auch durch erhöhte Scherkräfte am Endothel getriggert werden<sup>94</sup>. Vàsquez *et al.* postulierten, dass Perfluorcarbone, die in salzhaltiger Trägerlösung infundiert werden, in Gegenwart von Erythrozyten vermehrt Aggregate bilden und so zu einer Erhöhung der Viskosität des Blutes führen<sup>95</sup>. Eine Erhöhung der Blutviskosität löst erhöhten Scherstress am Endothel aus, was wiederum die Freisetzung von vasoaktiven Substanzen wie z. B. Gefäßendothel-relaxierenden Faktoren (endothelial relaxing factors; EDRF) triggert<sup>95-98</sup>. Der Einfluss der in 0,9%iger NaCl-Lsg. infundierten PACA-Kapseln auf die Blutviskosität bestärkt diese Annahme (Abb. 20).

Im Allgemeinen ist davon auszugehen, dass sich die dynamische Viskosität des Blutes bei steigender Verdünnung vermindert. So wurde in Übereinstimmung mit Riess die Blutviskosität nach Verdünnung mit 0,9%iger NaCl-Lsg., 5%iger Albumin-Lsg. und Albumin-Kapseln in 5%iger Albumin-Lsg. herabgesetzt (Abb. 20 und Abb. 21)<sup>15</sup>. Auch eine Verdünnung von Blut mit Oxygent<sup>TM</sup>, einer 60 Vol.-%igen, salzfreien PFC-Emulsion, führt zu einem Absinken der Blutviskosität<sup>15</sup>. Im Gegensatz dazu konnte nach einer Blutverdünnung mit in 0,9%iger NaCl-Lsg. suspendierten PACA-Kapseln keine Änderung der dynamischen Viskosität des Blutes festgestellt werden (Abb. 20). Folglich muss davon ausgegangen werden, dass PFD-gefüllte PACA-Kapseln in Verbindung mit 0,9%iger NaCl-Lsg. einen steigernden Effekt auf die Viskosität des Blutes ausübten, so dass der zu erwartende Verdünnungseffekt ausblieb (Abb. 20)<sup>95</sup>. Demnach sollte ein besonderes Augenmerk auf die Wahl der Trägerlösung gelegt werden. Es könnte ratsam sein, Lösungen mit einem möglichst

geringen Salzanteil wie zum Beispiel die zusammen mit den Albumin-Kapseln eingesetzte 5%ige Albumin-Lsg. als Trägerlösung zu wählen. Albumin dient als körpereigenes Serum-Protein u. a. der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks im Körper, der maßgebend für die gleichmäßige Verteilung der Flüssigkeiten im Organismus ist<sup>99</sup>. Daher wird Albumin in der Klinik u. a. zur Therapie der Hypovolämie bzw. des hämorrhagischen Schocks in Form von Volumenersatzlösungen wie z. B. Albiomin® eingesetzt<sup>99-102</sup>. Falls es sich bei der *transienten* Hypotension nach Infusion der PLGA- und PACA-Kapseln um einen typischen PFC-Klasseneffekt handeln sollte, wäre es denkbar, dass z. B. eine 5%ige Albumin-Lsg. dem PFD-induzierten Blutdruckabfall entgegenwirken könnte (Abb. 24 A). Übereinstimmend mit dieser These hatte eine Infusion der in 5%iger Albumin-Lsg. suspendierten PFD-gefüllten Albumin-Kapseln keinen Einfluss auf den MAP (Abb. 26 A). So ist davon auszugehen, dass eine 5%ige Albumin-Lsg. als Trägerlösung für PFC-basierte Kapseln prinzipiell besser geeignet ist. Albumin wird derzeit zwar nicht als Standardvolumenersatzlösung empfohlen<sup>103, 104</sup>, ein Einsatz könnte aber bei bestimmten therapeutischen Indikationen durchaus sinnvoll sein und sollte im Einzelnen geklärt werden<sup>104</sup>.

## 6.4 Funktionsstörungen der hepatischen Mikrozirkulation

Die hepatische Mikrozirkulation wird von mehreren Faktoren wie z. B. dem sinusoidalen Gefäßdurchmesser oder dem MAP beeinflusst. Vor allem die Freisetzung von NO kann eine systemische Hypotension der Kapillaren und eine periphere Vasodilatation induzieren<sup>55</sup>. So ist bekannt, dass NO und andere EDRFs wie z. B. Endothelin in Folge von erhöhtem Scherstress am Endothel den hepatischen Blutfluss regulieren<sup>105, 106</sup>. Während sinusoidale Endothelzellen und Hepatozyten in Abhängigkeit von den Scherraten am Endothel NO produzieren und sezernieren können, reagieren Ito- und glatte Muskelzellen in Gegenwart von vasoaktiven Substanzen sehr schnell mit einer Relaxation<sup>105</sup>. Die Zunahme des hepatischen Gefäßdurchmessers nach Infusion der PLGA- und PACA-Kapseln könnte also eine Folge von erhöhtem Scherstress am Endothel sein (Abb. 24 C). Im Allgemeinen resultiert eine Vasodilatation in einer Hypotension und einer Abnahme des Perfusionsdrucks<sup>107</sup>. Eine Abnahme des Perfusionsdrucks könnte wiederum zu einer unregelmäßigen hepatischen Perfusion<sup>55</sup> und somit zu einer Abnahme der prozentualen Anzahl der perfundierten Gefäße in der Leber führen (Abb. 24 B). Die Erholung des MAP und des Gefäßdurchmessers sowie der prozentualen Anzahl der perfundierten Gefäße in der Leber könnte durch kompensatorische Mechanismen bedingt gewesen sein (Abb. 24). Es ist bekannt, dass eine kompensatorische Vasokonstriktion den Blutdruck auf Kosten der Mikrozirkulation aufrechterhält<sup>108</sup>. Gestützt wird diese These durch die Tatsache, dass die prozentuale Anzahl der perfundierten Gefäße in der Leber auf nur ca. 80% des Ausgangsniveaus stieg (Abb. 24 B).

Auch das relativ hohe Gewicht der Kapseln, welches durch die hohe Dichte des PFD-Kerns ( $1,92 \text{ g/cm}^3$ ) bedingt ist, könnte ein Grund für erhöhte Scherkräfte am

Endothel sein<sup>55</sup>. So könnten die Kapseln über die Oberfläche des Endothels „rollen“ und über hydromechanische Kräfte zu erhöhtem Scherstress führen, der wiederum die Freisetzung von EDRFS induziert<sup>55</sup>. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte nach intravenöser Infusion von PLGA-Sphären (keine PFD-Füllung) weder ein Abfall des MAP noch eine plötzliche Abnahme der prozentualen Anzahl der perfundierten Gefäße in der Leber festgestellt werden (Abb. 25 A/B). Nach Applikation der PLGA-Sphären trat eine leichte periphere Vasokonstriktion auf, was mit Ergebnissen von Rosas-Hernández *et al.* übereinstimmt, die zeigen konnten, dass niedrige Konzentrationen von Nanopartikeln zu einer arteriellen Vasokonstriktion führen können (Abb. 25 C)<sup>109</sup>. Trotz allem konnten die beobachtete *transiente* Hypotension und die kurzzeitige Vasodilatation sowie die Abnahme der prozentualen Anzahl der perfundierten Gefäße in der Leber nach Infusion von PLGA- und PACA-Kapseln nicht ausschließlich auf den PFD-Kern zurückgeführt werden, da sich nach Applikation der Albumin-Kapseln keine Einflüsse auf den mittleren arteriellen Blutdruck und die Mikrozirkulation manifestierten (Abb. 24 und Abb. 26).

## 6.5 Einflüsse auf den Säure-Base-Haushalt und den Laktatspiegel

Die in Abschnitt 5.2.2 dargestellten Einflüsse der Albumin-Kapseln auf den Säure-Base-Status und metabolische Parameter wurden im Rahmen der Untersuchungen zur Bestimmung der toxikologischen Effekte (Abschnitt 4.2.4) erhoben. Im Falle der PLGA- und PACA-Kapseln wurden die gewonnenen Daten aus den Versuchsreihen der intravitalmikroskopischen Untersuchungen (Abschnitt 4.2.3) dargestellt, da für diese beiden Kapseltypen keine eigenständigen Serien zur Beurteilung der toxikologischen Effekte durchgeführt wurden.

Sowohl nach Infusion von 0,9%iger NaCl-Lsg. als auch nach Applikation der PLGA- und PACA-Kapseln sank der pH-Wert leicht ab und es manifestierte sich eine leichte metabolische Azidose, die wahrscheinlich auf den relativ großen chirurgischen Eingriff der Organauslagerung zurückzuführen ist (Abb. 27 A). Entgegen der Untersuchungen von Sedova *et al.* konnte ein Absinken des pH-Wertes aufgrund der PFD-Füllung ausgeschlossen werden<sup>110</sup>, da nach Infusion der PFD-gefüllten Albumin-Kapseln keine Änderungen des pH-Wertes zu verzeichnen waren (Abb. 28 A). Die in der PACA-Gruppe beobachtete Azidose war im Vergleich zur NaCl- und PLGA-Gruppe allerdings etwas stärker ausgeprägt, was verschiedene Ursachen haben könnte (Abb. 27 A). Eine Ursache könnten die bei der Metabolisierung des PACA-Polymers gebildeten Abbauprodukte Cyanacrylsäure und Butanol sein<sup>73, 111</sup>, wobei die Bildung der Säure einen direkten Einfluss auf den pH-Wert ausüben sollte (Abb. 27 A). Darüber hinaus ist auch das entstehende Butanol eine potenzielle Quelle für Säureäquivalente, da allgemein bekannt ist, dass es aufgrund der Laktatbildung im Rahmen des Alkoholabbaus zu einer Laktatazidose kommen kann (Abb. 27 D). Zudem wurde in der Literatur bereits diskutiert, dass die

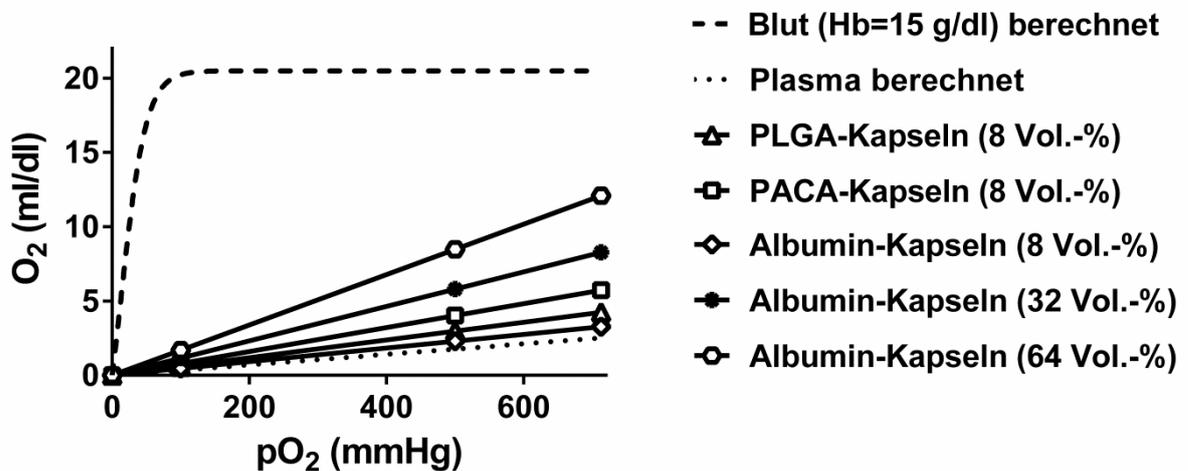
beim PACA-Abbau entstehenden Mengen an Butanol durchaus physiologisch relevant sein können<sup>55</sup>.

Grund für den Überschuss an Laktat nach Infusion der PLGA-Kapseln könnte ebenfalls der beginnende Abbau des Polymers sein (Abb. 27 D). Unter oxidativen Bedingungen entstehen Milch- und Glykolsäure<sup>112</sup>, die anschließend über den Citratzyklus zu Wasser (H<sub>2</sub>O) und CO<sub>2</sub> abgebaut werden<sup>31, 113</sup>. Alternativ kann die Glykolsäure auch renal ausgeschieden werden<sup>31, 114</sup>. Die Abbaurate des PLGA-Polymers beträgt *in vivo* jedoch 50-60 Tage<sup>115</sup>, weshalb ein Laktatanstieg aufgrund eines beginnenden Polymerabbaus auszuschließen ist. Denkbar wäre auch, dass die *transiente* Hypotension und die Störungen der hepatischen Mikrozirkulation nach Infusion der PLGA- und PACA-Kapseln zu einem generellen Sauerstoffmangel im Gewebe geführt haben, was wiederum die anaerobe Glykolyse getriggert und zu einer erhöhten Bildung von Laktat im Muskelgewebe geführt hat (Abb. 24 A, Abb. 24 B/C und Abb. 27 D)<sup>55, 116</sup>. Da allerdings auch nach Infusion der Albumin-Kapseln eine deutliche Erhöhung des Laktatspiegels zu verzeichnen war, ist zu vermuten, dass die Akkumulation der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln in der Milz die Ursache des vermehrt anaeroben Stoffwechsels waren (Abb. 28 D, Abb. 33 A, Abb. 34 A und Abb. 35 A). Aufgrund der Kapselablagerungen könnte es zu infarktähnlichen Durchblutungsstörungen mit einer daraus resultierende Gewebeischämie und einer anaeroben Stoffwechsellage gekommen sein (Abb. 27 D und Abb. 28 D)<sup>116</sup>.

## 6.6 Sauerstoffkapazitäten der Kapselsuspensionen

Perfluorcarbone sind u. a. aufgrund ihrer hohen Sauerstofflöslichkeit (40-60 ml/dl)<sup>18</sup> eine attraktive Stoffklasse für die Entwicklung künstlicher Sauerstoffträger<sup>13, 15, 19, 30-32</sup>. Dem Henry-Gesetz entsprechend ist die Sauerstofflöslichkeit von Perfluorcarbonen proportional zum vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck und unabhängig von anderen Faktoren<sup>1, 10, 15</sup>, weshalb die Sauerstoffbindungskurven von PFC-haltigen Präparaten linear verlaufen<sup>1, 11</sup>. Bei einem ausreichend hohen  $pO_2$  sollten die in dieser Arbeit eingesetzten PFD-haltigen PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln eine höhere Sauerstoffkapazität aufweisen als z. B. reines Blutplasma. Übereinstimmend mit dieser Annahme haben die Messungen der Sauerstoffkapazitäten der 8 Vol.-%igen Kapselsuspensionen gezeigt, dass die PLGA- und PACA-Kapseln bei einem  $pO_2$  von 713 mmHg signifikant mehr Sauerstoff speichern können als die NaCl-Trägerlösung (Abb. 22 / Tab. 7). Bei den Albumin-Kapseln und der Albumin-Trägerlsg. war der Effekt hingegen nicht so ausgeprägt (Abb. 22 / Tab. 7). Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Assay zur Bestimmung der Sauerstoffkapazitäten lieferte Messwerte für die NaCl- und die Albumin-Trägerlösung, die übertragen auf den arteriellen  $pO_2$  unter physiologischen Bedingungen (100 mmHg) im Bereich der theoretischen Sauerstoffkapazität von Plasma (0,3 ml/dl bei 100 mmHg) liegen (Abb. 22)<sup>117</sup>. Bei einer Beatmung mit reinem Sauerstoff steigt der arterielle  $pO_2$  auf bis zu 500 mmHg an<sup>118</sup>. Prognostiziert man nun die Sauerstoffkapazitäten der verwendeten Kapselsuspensionen bei einem  $pO_2$  von 100 mmHg und 500 mmHg, wird die Abhängigkeit der Sauerstofflöslichkeit der Perfluorcarbone vom vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck deutlich (Abb. 38). Während sich die  $O_2$ -Gehalte des Blutplasmas und der Kapselsuspensionen bei einem  $pO_2$  von 100 mmHg kaum unterscheiden, kommt es bei einer Beatmung mit

reinem Sauerstoff zu einer beträchtlichen Steigerung der O<sub>2</sub>-Kapazitäten der Kapselsuspensionen (Abb. 38).



**Abb. 38: Sauerstoffkapazitäten der unterschiedlichen Kapselsuspensionen bei klinisch relevanten Sauerstoffpartialdrücken.** Ausgehend von den Sauerstoffmessungen bei einem pO<sub>2</sub> von 713 mmHg wurden die Sauerstoffkapazitäten bei 100 mmHg (arterieller pO<sub>2</sub> unter physiologischen Bedingungen) und 500 mmHg (arterieller pO<sub>2</sub> bei reiner Sauerstoffbeatmung) prognostiziert. Um die therapeutische Relevanz einordnen zu können, sind zum Vergleich die Sauerstoffkapazitäten von Blut (Hb-Gehalt ≈ 15 g/dl) und Plasma dargestellt.

Beim Vergleich der Sauerstoffkapazitäten der 8 Vol.-%igen Kapselsuspensionen konnte festgestellt werden, dass die PACA-Kapselsuspension verhältnismäßig den höchsten O<sub>2</sub>-Gehalt aufwies (Abb. 22 und Abb. 38). Bei gleich bleibendem Volumenanteil nimmt die Kapselanzahl mit abnehmendem Kapseldurchmesser zu. Das bedeutet, dass die PACA-Kapselsuspension mehr Kapseln enthält als die PLGA- oder Albumin-Kapselsuspensionen. Darüber hinaus konnten Bauer *et al.* für PFD-gefüllte Kapseln zeigen, dass die Wanddicke mit abnehmendem Kapseldurchmesser geringer wird<sup>30</sup>, so dass in Bezug auf den Kapseldurchmesser der prozentuale Anteil des PFD-Kerns immer größer wird.

Bei der Betrachtung der Sauerstoffgehalte der Albumin-Kapselsuspensionen mit verschiedenen Volumenanteilen (8, 32 und 64 Vol.-%) wurde deutlich, dass die Sauerstoffkapazität mit steigendem Volumenanteil zunahm (Abb. 23 / Abb. 38 / Tab. 8). Während sich die Sauerstoffkapazitäten der 32 und 64 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspensionen proportional verhielten, belief sich die O<sub>2</sub>-Kapazität der 8 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension nur auf etwa  $\frac{1}{6}$  der Kapazität der 32 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension (Tab. 8). Die gleiche Diskrepanz zeigte sich auch bei der Bestimmung der Konzentrationen der Albumin-Kapselsuspensionen (Tab. 1). Die Konzentration der Albumin-Kapseln in der 64 Vol.-%igen Suspension war ungefähr doppelt so hoch wie in der 32 Vol.-%igen Suspension. Die Konzentration der Albumin-Kapseln in der 8 Vol.-%igen Suspension betrug hingegen ebenfalls nur etwa  $\frac{1}{6}$  der Kapselkonzentration der 32 Vol.-%igen Suspension (Tab. 1). Es ist zu vermuten, dass es bei der Einstellung des Volumenanteils mittels Hämatokritzentrifuge (siehe Abschnitt 4.1.5) bei den Kapselsuspensionen mit niedrigen Konzentrationen zu Messungenauigkeiten kommen kann, weshalb dieses Verfahren für die Einstellung kleiner Volumenanteile wahrscheinlich wenig geeignet ist.

## 6.7 Einordnung der therapeutischen Relevanz der PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln als künstliche Sauerstoffträger

Bei der Erstversorgung von Trauma- und Polytraumapatienten mit starken Blutverlusten liegen die Prioritäten zunächst auf der Blutungsstillung, dem Ausgleich des verlorenen Volumens durch Volumenersatzlösungen und der Sicherung der Ventilation. All diese Maßnahmen dienen der Stabilisierung des Blutdrucks zur Aufrechterhaltung der Perfusion lebenswichtiger Organe und der Gewebeoxygenierung<sup>19</sup>. Da eine Transfusion von Erythrozytenkonzentraten (EK) normalerweise erst in der Klinik erfolgt, würde die Verfügbarkeit eines künstlichen Sauerstoffträgers bei der Erstbehandlung von Trauma- und Polytraumapatienten einen enormen Zugewinn für die Gewebeoxygenierung und somit für den *Outcome* der Patienten bedeuten.

Bezüglich ihrer Sauerstoffkapazität hätten die PLGA- und PACA-Kapseln durchaus das Potenzial als künstliche Sauerstoffträger zu fungieren. Nichts desto trotz muss die klinische Relevanz dieser Kapseln aufgrund der Schwere der Nebenwirkungen zum jetzigen Stand der Entwicklung angezweifelt werden. Die *transiente* Hypotension, die Störungen der Mikrozirkulation und die Organschädigungen, die nach intravenöser Applikation der PLGA- und PACA-Kapseln auftraten, widersprechen einem Einsatz in der Notfallmedizin (Abb. 24/33/34)<sup>31, 53</sup>.

Anders sieht es dagegen bei den in dieser Arbeit untersuchten Albumin-Kapseln aus. Diese zeigten nach intravenöser Infusion keine Einflüsse auf den MAP oder die Mikrozirkulation (Abb. 26). Bei einer Nutzen-Risiko-Abwägung sollte der positive Effekt (verbesserte Überlebenschancen) deutlich den beobachteten Nebenwirkungen in Form von Gewebeschädigungen der roten Pulpa (Abb. 32) überwiegen, so dass eine Infusion der Albumin-Kapselsuspensionen durchaus vertretbar und klinisch

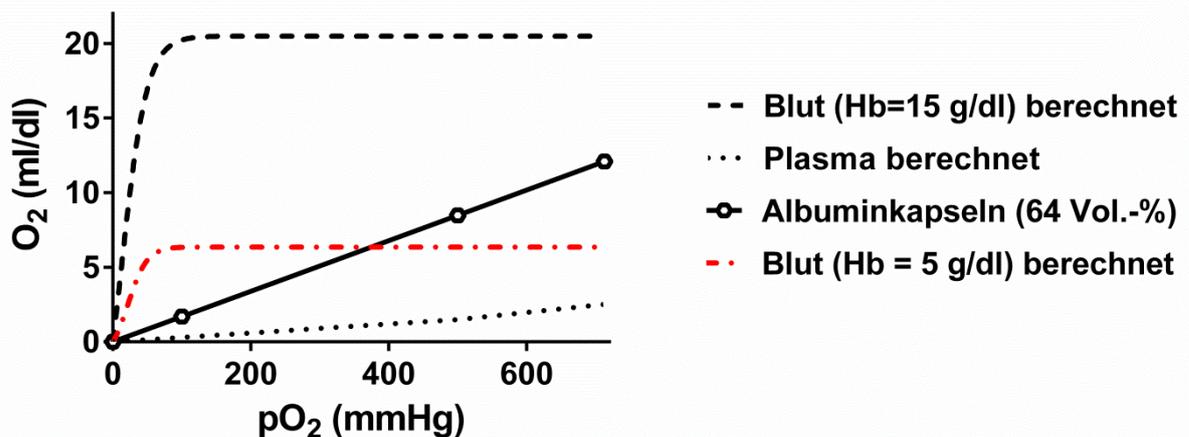
relevant wäre. Vergleicht man die Sauerstoffkapazitäten der verwendeten Albumin-Kapselsuspensionen mit denen von Blut und Plasma, wird deutlich, dass nur die 32 und die 64 Vol.-%ige Suspension therapeutische Relevanz besitzen (Abb. 38). Während herkömmliche Volumenersatzlösungen wie beispielsweise 0,9%ige Kochsalzlösung ungefähr die gleiche Sauerstoffkapazität aufweisen wie Blutplasma (siehe Abschnitt 6.6), betragen die Sauerstoffkapazitäten für Albumin-Kapselsuspensionen mit 32 Vol.-% und 64 Vol.-% bei einem  $pO_2$  von 713 mmHg das 3- bzw. das 5-fache (Abb. 23). Bei einer Beatmung mit reinem Sauerstoff ( $pO_2 = 500$  mmHg) liegen die Sauerstoffkapazitäten der 32 und 64 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspensionen zwar immer noch weit unter der des Blutes, befinden sich aber in therapeutisch relevanten Konzentrationsbereichen (Abb. 38). So können die Albumin-Kapselsuspensionen zum Beispiel im Vergleich zum Perftoran®, einer 20%igen PFC-Emulsion, die in Russland, Kasachstan, Kirgistan, Mexiko und der Ukraine als künstlicher Sauerstoffträger zugelassenen ist, deutlich mehr Sauerstoff aufnehmen (Tab. 9). Folglich würden die entwickelten Kapselsuspensionen bei gleichem Infusionsvolumen eine bessere Sauerstoffversorgung des Organismus gewährleisten.

	<b>Perftoran (Emulsion 20%)</b>	<b>Albumin-Kapseln (32 Vol.-%)</b>	<b>Albumin-Kapseln (64 Vol.-%)</b>
<b>Sauerstoffkapazität</b>	$\approx 4 \text{ ml O}_2 / \text{dl}^{10}$	5,8 ml O <sub>2</sub> / dl	8,5 ml O <sub>2</sub> / dl

**Tab. 9: Vergleich der Sauerstoffkapazitäten von Perftoran und Albumin-Kapselsuspensionen mit Volumenanteilen von 32 Vol.-% und 64 Vol.-% bei einem  $pO_2$  von 500 mmHg.**

Da die Indikationen zur Bluttransfusion u. a. von Faktoren wie Vorerkrankungen, Krankheitsursache, Schwere der Anämie oder dem Allgemeinzustand des Patienten abhängt<sup>120</sup>, wird der Trigger für die Transfusion von EKs auch heute noch kontrovers

diskutiert<sup>121</sup>. Vermeer *et al.* geben z. B. einen Hämatokrit von rund 20% als Transfusionstrigger an<sup>122</sup>, was einem Hb-Gehalt von ca. 7 g/dl entspricht. In den Querschnitts-Leitlinien der Bundesärztekammer (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten wird für Patienten mit normaler Herz-Kreislauf-Funktion sogar ein kritischer Hb-Gehalt von 5 g/dl (Hkt  $\approx$  15%) akzeptiert<sup>123</sup>. Dieser Hb-Gehalt wird auch von Weiskopf *et al.* als kritischer Hb angegeben<sup>124</sup> und entspricht einer maximalen Sauerstoffkapazität von 6,7 ml/dl. Es zeigt sich, dass die 64 Vol.-%ige Albumin-Kapselsuspension mit rund 8,5 ml/dl bei reiner Sauerstoffbeatmung eine etwas höhere Sauerstoffkapazität aufweist (Abb. 39), was einem Hb-Gehalt von 6,3 g/dl entsprechen würde und was oberhalb des von der BÄK angegebenen Transfusionstriggers für Patienten mit normaler Herz-Kreislauf-Funktion liegt<sup>123</sup>.



**Abb. 39: Sauerstoffkapazität der 64 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension im Vergleich zu Blut mit einem Hb-Gehalt von 5 g/dl.** Ausgehend von den Sauerstoffmessungen bei einem pO<sub>2</sub> von 713 mmHg wurden die Sauerstoffkapazitäten der 64 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension bei 100 mmHg (pO<sub>2</sub> im Blut unter physiologischen Bedingungen) und 500 mmHg (pO<sub>2</sub> der Inspirationsluft bei reiner Sauerstoffatmung) prognostiziert. Um die therapeutische Relevanz einordnen zu können, sind zum Vergleich die theoretischen Sauerstoffkapazitäten von Blut mit einem Hb-Gehalt von 15 g/dl (schwarz) und 5 g/dl (rot) dargestellt. Zusätzlich ist die zu erwartende Sauerstoffkapazität von reinem Plasma gezeigt.

In Bezug auf die Sauerstoffkapazität könnte also rein hypothetisch ein Austausch des kompletten Blutvolumens gegen die 64 Vol.-%ige Albumin-Kapselsuspension vom Organismus toleriert werden. Zudem könnte durch eine Volumensubstitution mit der 64 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension die Gewebeoxygenierung eines Trauma- oder Polytraumapatienten bis zum Erhalt einer adäquaten Bluttransfusion gewährleistet werden.

Da Blut neben dem Sauerstofftransport noch viele andere lebenswichtige Aufgaben im Organismus erfüllt, können und sollen die Albumin-Kapseln die Bluttransfusion zum jetzigen Zeitpunkt nicht ersetzen, sondern lediglich als Notfallssubstrat dienen. Anzustreben wäre daher eine kombinierte Therapie, bei der die Albumin-Kapseln im Rahmen der präklinischen Erstversorgung von Trauma- und Polytraumapatienten als künstliche Sauerstoffträger eingesetzt werden. So könnte die Gewebeoxygenierung aufrecht erhalten werden bis in der Klinik die Transfusion von EKs erfolgen kann, um den Hb-Gehalt langsam wieder anzuheben. Das Ziel dabei könnte ein Hb-Gehalt von ca. 9 - 10 g/dl sein, wobei ein EK den Hb-Gehalt um etwa 1 g/dl steigern kann<sup>125</sup>.

Aufgrund der physikalischen Eigenschaften der Perfluorcarbone sollten die Sauerstoffkapazitäten von PFC-basierten künstlichen Sauerstoffträgern jedoch nicht isoliert, sondern vielmehr im Zusammenhang mit der Sauerstofffreisetzung im Organismus betrachtet werden. So zeigt sich das tatsächliche therapeutische Potenzial der 64 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension erst, wenn man die O<sub>2</sub>-Aufnahme und -Abgabe der Kapselsuspension mit Blut und Erythrozytenkonzentraten vergleicht. Bei einem Gesamtvolumen von ca. 280 ml<sup>126</sup> enthält ein EK morphologisch und funktionell intakte Erythrozyten<sup>123</sup> aus rund 500 ml Vollblut<sup>127</sup>. Während Blut bei reiner Sauerstoffbeatmung einen Sauerstoffgehalt von rund 20 ml/dl aufweist, beläuft sich der O<sub>2</sub>-Gehalt eines EKs auf 100,5 ml bzw. ≈ 36 ml/dl. Der O<sub>2</sub>-Gehalt der 64 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension beträgt unter diesen Bedingungen 8,5 ml/dl, was ca. der Hälfte des O<sub>2</sub>-Gehalts im Blut und rund ¼

des O<sub>2</sub>-Gehalts eines EKs entspricht. Unter physiologischen Bedingungen (arterieller pO<sub>2</sub> ≈ 100 mmHg und venöser pO<sub>2</sub> ≈ 40 mmHg) geben Erythrozyten ca. 20-25% des gebundenen Sauerstoffs an die Peripherie ab (entspricht einer O<sub>2</sub>-Abgabe von ca. 4 ml/dl), während Plasma und PFCs aufgrund ihrer linearen „Dissoziationskurve“ ungefähr 60% des gelösten Sauerstoffs freisetzen würden<sup>118</sup>. Bei einer Beatmung mit reinem Sauerstoff erhöht sich das Partialdruckgefälle im Gefäßsystem. Die Sauerstoffkapazität und die Sauerstofffreisetzung der Erythrozyten würde unter diesen Bedingungen nur marginal gesteigert werden (auf max. 25%)<sup>118</sup>. Die Sauerstoffabgabe der PFCs würde sich hingegen von 60% auf ca. 92% erhöhen<sup>118</sup>. Für die 64 Vol.-%ige Albumin-Kapselsuspension bedeutet dies eine Sauerstofffreisetzung von ≈ 8 ml/dl, was zum einen das Doppelte des von den Erythrozyten im Blut freigesetzten Sauerstoffs ist und zum anderen sogar die bereitgestellte Sauerstoffmenge eines EKs unter reiner Sauerstoffbeatmung übertrifft (Tab. 10).

<b>O<sub>2</sub>-Abgabe der Erythrozyten im Blut (Hb-Gehalt ≈ 15 g/dl)</b>	≈ 4 ml/dl
<b>O<sub>2</sub>-Abgabe eines EKs</b>	≈ 7 ml/dl
<b>O<sub>2</sub>-Abgabe der 64 vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension</b>	≈ 8 ml/dl

**Tab. 10: Sauerstofffreisetzung von Erythrozyten, Erythrozytenkonzentraten und der 64 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension bei einer Beatmung mit reinem Sauerstoff.**

## 7 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Versuche durchgeführt, die eine *in vitro*- und *in vivo*-Charakterisierung der PFD-gefüllten PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln ermöglichten, um das therapeutische Potenzial für einen Einsatz in der Notfallmedizin abschätzen zu können. So wurden neben der biologischen Verträglichkeit der unterschiedlichen Kapselsysteme die Einflüsse der Kapselsuspensionen auf die dynamische Viskosität von Blut untersucht, deren Keimfreiheit und mikrobielle Stabilität überprüft sowie deren Sauerstoffkapazitäten ermittelt.

Die Albumin-Kapseln wiesen im Allgemeinen eine sehr gute biologische Verträglichkeit auf. In der Milz zeigte sich jedoch ein durch Kapselakkumulation bedingter Integritätsverlust der roten Pulpa (Abschnitt 6.2). Es ist anzunehmen, dass die Albumin-Kapseln aufgrund ihres Kapseldurchmessers von rund 500 nm dem Filtrationsprozess in der Milz unterlagen<sup>85, 86</sup>. Ein kleinerer Kapseldurchmesser könnte in Zukunft dazu beitragen, diesen Filtrationsprozess zu vermindern, bzw. zu umgehen. Zusätzlich könnte so die *intravasale* HWZ der Albumin-Kapseln verlängert werden. Eine Verringerung des Kapseldurchmessers könnte sich zudem positiv auf die Sauerstoffkapazität auswirken, da die Wanddicke PFD-gefüllter Kapseln mit abnehmendem Kapseldurchmesser geringer wird<sup>30</sup>, so dass eine kleinere Kapsel prozentual mehr PFD enthalten würde. Auch wenn die Sauerstoffkapazität der 64 Vol.-%igen Albumin-Kapselsuspension bereits in einem klinisch relevanten Bereich lag, sollte man versuchen, die Sauerstoffkapazität der Kapseln weiter zu erhöhen. So könnten insgesamt weniger Kapseln eingesetzt werden. Anstelle des PFDs könnte beispielsweise ein anderes Perfluorcarbon mit höherer Sauerstofflöslichkeit als Kernmaterial eingesetzt werden. Die Sauerstofflöslichkeit der

Perfluorcarbone steigt mit abnehmendem Molekulargewicht, wobei lineare PFCs generell bessere Sauerstofflöslichkeiten aufweisen als zyklische oder polyzyklische PFCs<sup>10</sup>. Perfluorooctylbromid (PFOB; Perflubron), ein lineares PFC mit terminaler Bromidgruppe, könnte daher ein geeigneter Kandidat für den Kapselkern sein. Ob und in welchem Maße PFOB die Sauerstoffkapazität der Albumin-Kapseln verbessern würde, sollte in weiterführenden Untersuchungen überprüft werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Albumin-Kapselsuspensionen mit Volumenanteilen von 8 Vol.-% und 32 Vol.-% im Tiermodell eingesetzt. Da sich insbesondere für die 64 Vol.-%ige Albumin-Kapselsuspension Sauerstoffkapazitäten mit klinischer Relevanz zeigten, die beobachteten Nebenwirkungen jedoch abhängig vom Volumenanteil der Suspension waren, sollten in jedem Fall *in vivo* Studien mit dieser Kapselsuspension folgen. Unter Berücksichtigung der Fluidität könnte der Volumenanteil der Kapseln eventuell noch weiter erhöht werden, um die Kapselsuspension mit der höchstmöglichen Sauerstoffkapazität zu identifizieren.

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Albumin-Kapseln prinzipiell klinische Relevanz besitzen, sollte dies z. B. in Tiermodellen des akuten hämorrhagischen Schocks oder der normovolämischen Dilution bestätigt werden.

Da die Albumin-Kapseln in 5%iger Albumin-Lsg. infundiert wurden, der Einsatz von Albumin bzw. Kolloiden zur Volumensubstitution in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert wird<sup>104, 119, 128</sup>, ist es fraglich, ob die Albumin-Trägerlösung die beste Alternative darstellt. Andererseits postulierten Hampton *et al.*, dass der präklinische Einsatz von kristalloiden Volumensubstitutionslösungen die Überlebensrate senkt<sup>129</sup> und Vázquez *et al.* zeigten, dass Perfluorcarbone, die in salzhaltiger Trägerlösung infundiert werden, in Gegenwart von Erythrozyten vermehrt Aggregate bilden<sup>95</sup>. So können die *transiente* Hypotension, die Störungen der Mikrozirkulation, und die Kapselanreicherungen in diversen Organen nach Applikation der PLGA- und PACA-Kapseln möglicherweise auf die Verwendung 0,9%iger NaCl-Lsg. zurückgeführt

werden. Um die Albumin-Kapseln als künstliche Sauerstoffträger in einer geeigneten Trägerlösung suspendieren zu können, sollten daher simultan zur Optimierung der Kapseln eigenständige Studien zu den Trägerlösungen durchgeführt werden.

## 8 Zusammenfassung

Bis heute ist die Entwicklung künstlicher Blutersatzstoffe ein Forschungsgebiet von größtem Interesse, da aufgrund der demografischen Entwicklung und der abnehmenden Spendebereitschaft der Bevölkerung in Zukunft mit einem zunehmenden Mangel an Blutkonserven zu rechnen ist. Die Verfügbarkeit künstlicher Sauerstoffträger wäre sowohl für die routinemäßige Versorgung von Patienten als auch für die präklinische Notfallversorgung von Schwerstverletzten von größter Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine *in vitro*- und *in vivo*-Charakterisierung neuartiger künstlicher Sauerstoffträger auf Perfluorcarbon-Basis in Form von PFD-gefüllten PLGA-, PACA- und Albumin-Kapseln. Während die PLGA- und PACA-Kapseln in 0,9%iger Kochsalzlösung suspendiert wurden, diente bei den Albumin-Kapseln eine 5%ige Albumin-Lsg. als Trägerlösung. Im Rahmen der *in vitro*-Charakterisierung wurde die Keimfreiheit und die mikrobielle Stabilität der Kapselsuspensionen überprüft sowie deren Einflüsse auf die dynamische Viskosität von Blut untersucht. Zudem wurde ein *in vitro*-Assay zur Messung der Sauerstoffkapazitäten der Kapselsuspensionen etabliert. Im Rahmen der *in vivo*-Charakterisierung wurde die biologische Verträglichkeit der neuartigen künstlichen Sauerstoffträger im Rattenmodell untersucht. Neben der Evaluation toxikologischer Effekte wurden die Einflüsse der Kapselsysteme auf die Mikrozirkulation und die Integrität von Organstrukturen analysiert. Darüber hinaus wurden die *intravasalen* Halbwertszeiten und die *in vivo*-Verteilung der neuartigen künstlichen Sauerstoffträger bestimmt.

Eine Lagerung der Kapselsuspensionen war ohne Zusatz von Konservierungsstoffen möglich, was eine Grundvoraussetzung für klinische Anwendungen ist. Bei den

Messungen der dynamischen Viskositäten von Blut zeigte sich, dass PFD-gefüllte PACA-Kapseln in Verbindung mit 0,9%iger Kochsalzlösung einen steigernden Effekt auf die Blutviskosität ausübten. Im Allgemeinen sollte daher für PFD-haltige künstliche Sauerstoffträger eine Trägerlösung mit einem möglichst geringen Salzanteil wie z. B. 5%ige Albumin-Lsg. gewählt werden. Bezüglich der Sauerstoffkapazitäten hätten prinzipiell alle untersuchten Kapseltypen, bei einer ausreichend hohen Kapselkonzentration, das Potenzial als künstliche Sauerstoffträger zu fungieren. Eine 64 Vol.-%ige Albumin-Kapselsuspension weist zum jetzigen Entwicklungsstand sogar höhere Sauerstoffkapazitäten auf als ein bereits zugelassenes Präparat auf Perflourcarbon-Basis. Darüber hinaus übertrifft die 64 Vol.-%ige Albumin-Kapselsuspension ein Erythrozytenkonzentrat hinsichtlich der bereitgestellten Sauerstoffmenge im Organismus.

Schwerwiegende Nebenwirkungen wie eine *transiente* Hypotension, Störungen der Mikrozirkulation und Organschädigungen nach intravenöser Infusion der PLGA- und PACA-Kapseln widersprechen jedoch einem Einsatz in der Notfallmedizin, so dass die therapeutische Relevanz dieser Kapseltypen zum jetzigen Stand der Entwicklung fraglich ist.

Nach intravenöser Infusion der Albumin-Kapseln manifestierten sich filtrationsbedingte Kapselakkumulationen in der Milz. Alles in allem überzeugte diese in 5%iger Albumin-Lsg. suspendierten Kapseln aber durch eine sehr gute biologische Verträglichkeit und eine im Vergleich zu anderen nicht oberflächenmodifizierten Nanokapseln lange *intravasale* Halbwertszeit. Ein Einsatz der PFD-gefüllten Albumin-Kapseln als künstliche Sauerstoffträger im Rahmen der präklinischen Notfallversorgung kann aufgrund der Untersuchungen in dieser Arbeit insgesamt als therapeutisch relevant eingestuft werden.

## 9 Literatur

1. Habler, O., Pape, A., Meier, J. & Zwissler, B. [Artificial oxygen carriers as an alternative to red blood cell transfusion]. *Anaesthesist* 54, 741-54 (2005).
2. Henkel-Honke, T.; & Oleck, M.;. Artificial oxygen carriers: a current review. *AANA Journal* 75, 205-11 (2007).
3. Kim, H. W. & Greenburg, A. G. Artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: a selected review and current status. *Artif Organs* 28, 813-28 (2004).
4. Gohel, M. S., Bulbulia, R. A., Slim, F. J., Poskitt, K. R. & Whyman, M. R. How to approach major surgery where patients refuse blood transfusion (including Jehova's Witnesses). *Ann R Coll Surg Engl.* 87, 3-14 (2005).
5. Deetjen, P., Speckmann, E. J. & Hescheler, J. *Physiologie* (Elsevier Urban & Fischer, München, Jena, 2004).
6. Klinke, R., Pape, H.C. & Silbernagel, S. *Physiologie* (Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2005).
7. Nelson & Cox. *Lehninger Biochemie* (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2009).
8. Mozzarelli, A., Ronda, L., Faggiano, S., Bettati, S. & Bruno, S. Haemoglobin-based oxygen carriers: research and reality towards an alternative to blood transfusions. *Blood Transfus* 8 Suppl 3, s59-68 (2010).
9. Berg, T. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. *Stryer Biochemie* (Elsevier - Spektrum Akademischer Verlag, München, 2007).
10. Riess, J.G. Oxygen carriers ("blood substitutes")--raison d'etre, chemistry, and some physiology. *Chem Rev* 101, 2797-920 (2001).
11. Dinkelmann, S.; & Northoff, H.;. Artificial Oxygen Carriers – a Critical Analysis. *Infus Ther Transfus Med* 29, 167-74 (2002).
12. Leland, C. Clark Jr. & Gollan, Frank. Survival of Mammals Breathing Organic Liquids Equilibrated with Oxygen at Atmospheric Pressure. *Science* 152, 1755-1756 (1966).
13. Lowe, K. C. Engineering blood: synthetic substitutes from fluorinated compounds. *J. Tissue Eng.* 9, 389-99 (2003).
14. Winslow, R. M. Current status of oxygen carriers ('blood substitutes'): 2006. *Vox Sang* 91, 102-10 (2006).
15. Riess, J. G. Perfluorocarbon-based oxygen delivery. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 34, 567-80 (2006).
16. Schöler, M., Frietsch, T., Jambor, C. & Knels, R. Gibt es eine Zukunft für künstliche Blutersatzstoffe? (Artificial blood - coming soon or never reaching clinical maturity?). *Dtsch Med Wochenschr* 135, 575-81 (2010).
17. Sloviter, H. A., Petkovic, M., Ogoshi, S. & Yamada, H. Dispersed fluorochemicals as substitutes for erythrocytes in intact animals. *J Appl Physiol* 27, 666-8 (1969).
18. Riess, J.G. & Le Blanc, M. Solubility and Transport Phenomena in Perfluorochemicals relevant to blood substitution and other biomedical applications *Pure & Appl.Chem.* 54, 2383—2406 (1982).
19. Spahn, D. R. Blood substitutes. Artificial oxygen carriers: perfluorocarbon emulsions. *Crit Care* 3, R93-7 (1999).
20. Squires, J. E. Artificial blood. *Science* 295, 1002-5 (2002).
21. King, A. T., Mulligan, B. J. & Lowe, K.C. Perfluorochemicals and cell culture. *Bio/Technology* 7, 1037-1042 (1989).

22. Mertens, S., Bednarz, J., Richard, G. & Engelmann, K. Effect of perfluorodecalin on human retinal pigment epithelium and human corneal endothelium in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238, 181-5 (2000).
23. Yu, Q., Liu, K., Su, L., Xia, X. & Xu, X. Perfluorocarbon Liquid: Its Application in Vitreoretinal Surgery and Related Ocular Inflammation. *Biomed Res Int*, 250323 (2014).
24. Curtis, S. E., Fuhrman, B. P., Howland, D. F., DeFrancis, M. & Motoyama, E. K. Cardiac output during liquid (perfluorocarbon) breathing in newborn piglets. *Crit Care Med* 19, 225-30 (1991).
25. Fuhrman, B. P., Paczan, P. R. & DeFrancis, M. Perfluorocarbon-associated gas exchange. *Crit Care Med* 19, 712-22 (1991).
26. Bertolotto M, Catalano O. Contrast-enhanced ultrasound: past, present and future. *Ultrasound Clinics* 4, 339-367 (2009).
27. Diaz-Lopez, R., Tsapis, N. & Fattal, E. Liquid perfluorocarbons as contrast agents for ultrasonography and (19)F-MRI. *Pharm Res* 27, 1-16 (2010).
28. Kripfgans, O. D., Fowlkes, J. B., Miller, D. L., Eldevik, O. P. & Carson, P. L. Acoustic droplet vaporization for therapeutic and diagnostic applications. *Ultrasound Med Biol* 26, 1177-89 (2000).
29. Liao, A. H. et al. Paramagnetic perfluorocarbon-filled albumin-(Gd-DTPA) microbubbles for the induction of focused-ultrasound-induced blood-brain barrier opening and concurrent MR and ultrasound imaging. *Phys Med Biol* 57, 2787-802 (2012).
30. Bauer, J. et al. Perfluorocarbon-filled poly(lactide-co-glycolide) nano- and microcapsules as artificial oxygen carriers for blood substitutes: a physico-chemical assessment. *J. Microencapsul.* 27, 122-32 (2010).
31. Ferenz, K.B. et al. Safety of poly (ethylene glycol)-coated perfluorodecalin-filled poly(lactide-co-glycolide) microcapsules following intravenous administration of high amounts in rats. *Results Pharma Sci.* 4, 8-18 (2014).
32. Stephan, C.; et al. Artificial Oxygen Carriers Based on Perfluorodecalin-Filled Poly(n-butyl-cyanoacrylate) Nanocapsules. *J. Microencapsul.* 31, 284-292 (2014).
33. Gröger, H. Karl Landsteiner and medical science in Vienna around 1900. The significance of laboratory medicine for clinical medicine. *Vox Sang* 78 Suppl 2, 3-6 (2000).
34. Landsteiner, Karl. Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkung des Blutserums und der Lymphe. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten* ; printed in *Cir Res* 1969; 25:500. 27, 357-62 (1900).
35. Hourfar, M. K. et al. Experience of German Red Cross blood donor services with nucleic acid testing: results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus. *Transfusion* 48, 1558-66 (2008).
36. Barker, L. F. & Gerety, R. J. The clinical problem of hepatitis transmission. *Prog Clin Biol Res* 11, 163-82 (1976).
37. Gombotz, H., Zacharowski, K. & Spahn, D. R. *Patient Blood Management* (Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2013).
38. Kobayashi, K., Tsuchida, E. & Horinouchi, H. *Artificial Oxygen Carrier* (Springer-Verlag, Tokyo, 2005).
39. Paxian, M. [Synthetic oxygen carriers as an alternative to foreign blood transfusion]. *Anaesthesist* 50 Suppl 1, S43-9 (2001).
40. Roback, J. D. Vascular effects of the red blood cell storage lesion. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 475-9 (2011).

41. Kocian, R. & Spahn, D. R. Haemoglobin, oxygen carriers and perioperative organ perfusion. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 22, 63-80 (2008).
42. Lowe, K. Blood substitutes: From chemistry to clinic. *J. Mater. Chem.* 16, 4189-4196 (2006).
43. Castro, C. I. & Briceno, J. C. Perfluorocarbon-based oxygen carriers: review of products and trials. *Artif. Organs* 34, 622-34 (2010).
44. Spiess, B. D. Perfluorocarbon emulsions as a promising technology: a review of tissue and vascular gas dynamics. *J Appl Physiol* 106, 1444-52 (2009).
45. Yokoyama, K. Effect of perfluorochemical (PFC) emulsion on acute carbon monoxide poisoning in rats. *Jpn J Surg* 8, 342-52 (1978).
46. Flaim, S. F. Pharmacokinetics and side effects of perfluorocarbon-based blood substitutes. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 22, 1043-54 (1994).
47. Flaim, S. F., Hazard, D. R., Hogan, J. & Peters, R. M. Characterization and mechanism of side-effects of Oxygent HT (highly concentrated fluorocarbon emulsion) in swine. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 22, 1511-5 (1994).
48. Tremper, K. K., Friedman, A. E., Levine, E. M., Lapin, R. & Camarillo, D. The preoperative treatment of severely anemic patients with a perfluorochemical oxygen-transport fluid, Fluosol-DA. *N Engl J Med* 307, 277-83 (1982).
49. Waxman, K., Cheung, C. K. & Mason, G. R. Hypotensive reaction after infusion of a perfluorochemical emulsion. *Crit Care Med* 12, 609-10 (1984).
50. Vorob'ev, S.L. First- and second-generation perfluorocarbon emulsions. *Pharm. Chem. J.* 43, 209-218 (2009).
51. Veronese, F. M. & Pasut, G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today* 10, 1451-8 (2005).
52. Ferez, K. B., Waack, I. N., Mayer, C., de Groot, H. & Kirsch, M. Long-circulating poly(ethylene glycol)-coated poly(lactid-co-glycolid) microcapsules as potential carriers for intravenously administered drugs. *J Microencapsul.* (2013).
53. Waack, Indra Naemi. in *Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen (Universität Duisburg-Essen, Essen, 2013).*
54. Pisani, E. et al. Polymeric nano/microcapsules of liquid perfluorocarbons for ultrasonic imaging: physical characterization. *Langmuir* 22, 4397-402 (2006).
55. Laudien, J. et al. Perfluorodecalin-filled Poly(n-butyl-cyanoacrylate) nanocapsules as potential artificial oxygen carriers: Preclinical safety and biocompatibility. *J. Nanosci Nanotechnol* 15, 1-12 (2014).
56. Sloviter, H.A. & Kamimoto, T. Erythrocyte Substitute for Perfusion of Brain. *Nature* 216, 458-460 (1967).
57. Europe, Council of. *European Pharmacopoeia (European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, 2011).*
58. Carl Roth, GmbH + Co. KG. CASO-Buillon. *Produkt-Datenblatt* (2012).
59. Guedel, A. E. Inhalation Anesthesia: A Fundamental Guide. *Anesth. Analg.* 16, 119-120 (1937).
60. Atkins, P. W. *Kurzlehrbuch Physikalische Chemie (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin; Oxford, 1993).*
61. Atkins, P.W. *Physikalische Chemie - Memofix - Kurz und bündig von A-Z (VCH Weinheim, 1996).*
62. Mulisch, M.; & Welsch, U. *Romeis Mikroskopische Technik (Spektrum Akademischer Verlag, 2010).*
63. Tipler, Paul A. *Physik (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin, 2000).*

64. Laudien, J. et al. Perfluorodecalin-soluble fluorescent dyes for the monitoring of circulating nanocapsules with intravital fluorescence microscopy. *J. Microencapsul.* 25, 1-8 (2014).
65. Junqueira, L. C. U. & Carneiro, J. *Histologie* (ed. M. Gratzl) (Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005).
66. Owens, D.E. & Peppas, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 307, 93-102 (2006).
67. Neuberger T., B. Schöpf, H. Hofmann, M. Hofmann, B. von Rechenberg. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J. Magn. Magn. Mater.* 293, 483–496 (2005).
68. Alhareth, K. et al. Conformation of surface-decorating dextran chains affects the pharmacokinetics and biodistribution of doxorubicin-loaded nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 81, 453-7 (2012).
69. Ambruosi, A., Yamamoto, H. & Kreuter, J. Body distribution of polysorbate-80 and doxorubicin-loaded [14C]poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after i.v. administration in rats. *J Drug Target* 13, 535-42 (2005).
70. Peracchia, M. T. et al. Visualization of in vitro protein-rejecting properties of PEGylated stealth polycyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* 20, 1269-75 (1999).
71. Peracchia, M. T. et al. Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J Control Release* 60, 121-8 (1999).
72. Chang, T.M., Powanda, D. & Yu, W.P. . Analysis of polyethylene-glycol-poly lactide nano-dimension artificial red blood cells in maintaining systemic hemoglobin levels and prevention of methemoglobin formation. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 31, 231-247 (2003).
73. Nicolas, J. & Couvreur, P. Synthesis of poly(alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 1, 111-27 (2009).
74. Dauderer, M. *Handbuch der Umweltgifte* (ecomed MEDIZIN; Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm GmbH, Landsberg am Lech, 2006).
75. Calvo, P. et al. Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery. *Pharm Res* 18, 1157-66 (2001).
76. Wilson, B. et al. Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain Res* 1200, 159-68 (2008).
77. Drenckhahn, D. Cell motility and cytoplasmic filaments in vascular endothelium. *Prog. Appl. Microcirc.* 1, 55-70 (1983).
78. Weigelt, H. Die spezialisierte Endothelzelle - erregbare Zelle und mechanischer Effektor der Mikrozirkulation. *Funkt. Biol. Med.* 1 (1982).
79. White, G. E., Gimbrone, M.A. & Fujiwara, K. J. Factors influencing the expression of stress fibers in vascular endothelial cells in situ. *J. Cell Biol.* 97, 416-425 (1983).
80. Wong, A. J., Pollard, T.D. & Herman, I. Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo. *Science* 219, 867-869 (1983).
81. Drenckhan, D. & Wagner, J. Stress Fibers in the Splenic Sinus Endothelium In Situ: Molecular Structure, Relationship to the Extracellular Matrix, and Contractility. *J. Cell Biol.* 102, 1738-1747 (1986).
82. Dejana, E., Orsenigo, F. & Lampugnani, M. G. The role of adherens junctions an VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell Sci.* 121, 2115-2122 (2008).

83. Uehara, K. Distribution of adherens junction mediated by VE-cadherin complex in rat spleen sinus endothelial cells. *Cell Tissue Res* 323, 417-424 (2006).
84. Eckert, B. S., Koons, S.J., Schantz, A. W. & Zobel, C.R. Association of Creatine Phosphokinase with the Cytoskeleton of Cultured Mammalian Cells. *J. Cell Biol.* 86, 1-5 (1980).
85. Gref, R. et al. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 16, 215-233 (1995).
86. Shan, X. et al. In vitro macrophage uptake and in vivo biodistribution of long-circulation nanoparticles with poly(ethylene-glycol)-modified PLA (BAB type) triblock copolymer. *Colloids Surf B Biointerfaces* 72, 303-311 (2009).
87. Andersson, J., Ekdahl, K. N., Larsson, R., Nilsson, U. R. & Nilsson, B. C3 adsorbed to a polymer surface can form an initiating alternative pathway convertase. *J Immunol* 168, 5786-91 (2002).
88. Szebeni, J. et al. A porcine model of complement-mediated infusion reactions to drug carrier nanosystems and other medicines. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 64, 1706-16 (2012).
89. Weiszhar, Z. et al. Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20. *Eur. J. Pharm. Sci.* 45, 492-498 (2012).
90. Szebeni, J. et al. Animal models of complement-mediated hypersensitivity reactions to liposomes and other lipid-based nanoparticles. *J. of Lipos. Res.* 17, 107-117 (2007).
91. Ortiz, D., Cabrales, P. & Briceno, J. C. Transport of nitric oxide by perfluorocarbon emulsion. *Biotechnol. Progr.* 29, 1565-1572 (2013).
92. Rafikova, O., Sokolova, E., Rafikov, R. & Nudler, E. Control of plasma nitric oxide bioactivity by perfluorocarbons: Physiological mechanisms and clinical implications. *Circulation* 110, 3573-3580 (2004).
93. Cabrales, P., Vasquez, B. Y. S., Negrete, A. C. & Intaglietta, M. . Perfluorocarbons as gastransporters for O<sub>2</sub>, NO, CO and volatile anesthetics. *Transfus. Altern. Transfus. Med.* 9, 294-303 (2007).
94. Huang, B., Chen, S. C. & Wang, D. L. Shear flow increases S-nitrosylation of proteins in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 83, 536-46 (2009).
95. Vasquez, D. M., Ortiz, D., Alvarez, O. A., Briceno, J. C. & Cabrales, P. Hemorheological implications of perfluorocarbon based oxygen carrier interaction with colloid plasma expanders and blood. *Biotechnol Prog* 29, 796-807 (2013).
96. Intaglietta, M. Microcirculatory basis for the design of artificial blood. *Microcirculation* 6, 247-58 (1999).
97. Johnson, B. D., Mather, K. J. & Wallace, J. P. Mechanotransduction of shear in the endothelium: basic studies and clinical implications. *Vasc. Med.* 16, 365-77 (2013).
98. Koller, A., Sun, D. & Kaley, G. Role of shear stress and endothelial prostaglandins in flow- and viscosity-induced dilation of arterioles in vitro. *Circ Res* 72, 1276-84 (1993).
99. Patil, Gayathri V. Biopolymer Albumin for Diagnosis and in Drug Delivery. *Drug Develop. Res.* 58, 219-247 (2003).
100. Caironi, P. & Gattinoni, L. The clinical use of albumin: the point of view of a specialist in intensive care. *Blood Transfusion* 7, 259-67 (2009).
101. Dubniks, M., Persson, J. & Grande, P. O. Plasma volume expansion of 5% albumin, 4% gelatin, 6% HES 130/0.4, and normal saline under increased microvascular permeability in the rat. *Intensive Care Med* 33, 293-9 (2007).

102. Quinlan, G. J., Martin, G. S. & Evans, T. W. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology* 41, 1211-9 (2005).
103. Amanullah, S. & Venkataraman, R. The routine use of albumin for fluid resuscitation of critically ill patients is not warranted. *Crit Care* 8, E2 (2004).
104. Alderson, P. et al. Human albumin solution for resuscitation and volume expansion in critically ill patients (Review). *The Cochrane Library* (2004).
105. Bauer, C., Walcher, F., Kalweit, U., Larsen, R. & Marzi, I. Role of nitric oxide in the regulation of the hepatic microcirculation in vivo. *J Hepatol* 27, 1089-95 (1997).
106. Li, X., Benjamin, I. S. & Alexander, B. The role of nitric oxide in systemic and hepatic haemodynamics in the rat in vivo. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 368, 142-9 (2003).
107. Whitesides, T. E., Haney, T. C., Morimoto, K. & Harada, H. Tissue pressure measurements as a determinant for the need of fasciotomy. *Clin Orthop Relat Res*, 43-51 (1975).
108. Arikan, A. A.; & Citak, A. *Pediatric Shock. SIGNA VITAE* 3, 13-23 (2008).
109. Rosoa-Hernández, H. et al. Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. *Toxicology Letters* 191, 305-313 (2009).
110. Sedova, L. A., Kochetygov, N. I., Berkos, M. V. & Pjatowskaja, N. N. Side reaction caused by the perfluorocarbon emulsions in intravenous infusion to experimental animals. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 26, 149-57 (1998).
111. Vauthier, C., Dubernet, C., Fattal, E., Pinto-Alphandary, H. & Couvreur, P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 519-48 (2003).
112. Makadia, H. K. & Siegel, S. J. . Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery Carrier. *Polymers* 3, 1377-1397 (2011).
113. Panyam, J. & Labhasetwar, V. . Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 55, 329-347 (2003).
114. Jain, R. A. . The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21, 2475-2490 (2000).
115. Pisal, D. S., Kosloski, M. P. & Balu-Iyer, S. V. Delivery of therapeutic proteins. *J. Pharm. Sci.* 99, 2557-2575 (2010).
116. Robergs, R. A., Ghasvand, F. & Parker, D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, R502-16 (2004).
117. Schmidt, R. F., Lang, F. & Thews, G. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie* (Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005).
118. Faithfull, N. S. The concept of hemoglobin equivalency of perfluorochemical emulsion. *Adv. Exp. Med. Biol.* 530, 271-285 (2003).
119. Stainsby, D., MacLennan, S. & Hamilton, P. J. Management of massive blood loss: a template guideline. *Brit. J. Anaesth.* 85, 487-91 (2000).
120. Stehling, L. & Simon, T.L. The red blood cell transfusion trigger. *Physiology and clinical studies. Arch. Pathol. Lab. Med.* 118, 429-434 (1994).
121. Klein, H. G, Spahn, D. R. & Carson, J. L. Red blood cell transfusion in clinical practice. *The Lancet* 370, 415-426 (2007).
122. Vermeer, H., Teerenstra, S., de Sévaux, R. G. L., Swieten, H. A. & Weerwind, P.W. The effect of hemodilution during normothermic cardiac surgery on renal physiology and function: a review. *Perfusion* 23, 329-338 (2008).
123. Bundesärztekammer. *Querschnitts-Leitlinien (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten.* 4. Auflage (2008).

124. Weiskopf, R. B. et al. Human Cardiovascular and Metabolic Response to Acute, Severe Isovolemic Anemia. *JAMA* 279, 217-222 (1998).
125. Edwards, J. et al. Patient blood transfusion management: discharge hemoglobin level as a surrogate marker for red blood cell utilization appropriateness. *Transfusion* 52, 2445-2451 (2012).
126. Gebrauchs-/Fachinformation. Erythrozytenkonzentrat nach Aphaese Klinikum der Stadt Ludwigshafen am Rhein (2005).
127. Salma, A. Klinisches Gutachten "Erythrozytenkonzentrate" (Blutbank der Charité Berlin).
128. Schierhout, G & Roberts, I. Fluid resuscitation with colloid or crystalloid solutions in critically ill patients: a systemic review of randomised trials. *BMJ* 316, 961-316 (1998).
129. Hampton, D. A. et al. Prehospital intravenous fluid is associated with increased survival in traum patients. *J. Trauma Acute Care* 75, S9-15 (2013).

## 10 Anhang

### 10.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
<sup>19</sup> F-NMR	<sup>19</sup> Fluor-Magnetresonanzspektroskopie
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BÄK	Bundesärztekammer
BE	Basenüberschuss ( <i>base excess</i> )
BGA	Blutgasanalyse
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ion
CARPA	mit einer Komplementaktivierung assoziierte Pseudoallergie
CASO-Bouillon	Casein-Sojapepton-Bouillon
CK	Kreatinkinase
Cl <sup>-</sup>	Chlorid-Ion
cm	Zentimeter
CO	Kohlenmonoxid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
dl	Deziliter
EDRF	vasodilatierende Substanzen (endothelial derived relaxing factors)
EK	Erythrozytenkonzentrat
F(O <sub>2</sub> )	Korrekturfaktor für die Messung der Sauerstoffkapazität
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
g	Gramm
H <sub>2</sub> O	Wasser
Hb	Hämoglobin
HbOCs	Künstliche Sauerstoffträger auf Hämoglobin-Basis

HE	Hämatoxylin-Eosin
Hkt	Hämatokrit
HSA	Humanes Serumalbumin
HWZ	Halbwertszeit
IVM	Intravitalmikroskopie
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
KCN	Kaliumcyanid
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
kJ	Kilojoule
l	Liter
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LDH	Laktatdehydrogenase
Lsg.	Lösung
Min	Minute
ml	Milliliter
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Distickstofftrioxid
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid / Kochsalz
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
ns	Nanosekunde
O <sub>2</sub>	Sauerstoff (molekular)
PACA	Poly( <i>n</i> -Butyl-Cyanacrylat)
pCO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PCOCs	Künstliche Sauerstoffträger auf Perfluorcarbon-Basis
PEG	Polyethylenglykol
PFC	Perfluorcarbon
PFD	Perfluordecalin
PFOB	Perfluorocetyl bromid
pH	pH-Wert
<i>Ph. Eur.</i>	<i>pharmacopoea europaea</i>
PLGA	Poly(laktid-co-glykolid)

---

pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PP-Puffer	Phosphat-Puffer
RES	Retikuloendotheliales System
rHb	relativer Hämoglobin-Gehalt
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
sO <sub>2</sub>	Sauerstoffsättigung
Vol.-%	Volumen-Prozent

## 10.2 Publikationsliste und wissenschaftliche Vorträge

### 10.2.1 Eigene Publikationen

- **Laudien J.**, Naglav D., Groß-Heitfeld C., Ferez K. B., de Groot H., Mayer C., Schulz S., Schnepf A. and Kirsch M.; Perfluorodecalin-soluble fluorescent dyes for the monitoring of circulating nanocapsules with intravital fluorescence microscopy. *J. Microencapsul.* 25,1-8 (2014).
- **Laudien J.**, Groß-Heitfeld C., Mayer C., de Groot H., Kirsch M. and Ferez K.B.; Perfluorodecalin-filled Poly(*n*-butyl-cyanoacrylate) nanocapsules as potential artificial oxygen carriers: Preclinical safety and biocompatibility. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15, 1-12 (2014).
- Ferez K. B., Waack I. N., **Laudien J.**, Mayer C., Broecker-Preuss M., de Groot H. and Kirsch M.; Safety of Poly (ethylene glycol)-coated Perfluorodecalin-filled Poly (lactid-co-glycolid) microcapsules following intravenous administration of high amounts in rats. *Results in Pharma Science* 4, 8-18 (2014).
- **Laudien J.**, Wrobeln A., Groß-Heitfeld C., Mayer C., de Groot H., Kirsch M. and Ferez K. B.; Albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers (in preparation).

## 10.2.2 Wissenschaftliche Vorträge

- **Laudien J.**, Naglav D., Kirsch M., Ferez K. B. und de Groot H.  
„Modified fluorinated porphyrin systems for the monitoring of perfluorodecalin-filled poly(lactide-co-glycolide) microcapsules by fluorescence intravital microscopy“.  
Vortrag BIOME-Seminar (Graduiertenschule) am 22.05.2012 in Essen.
  
- **Laudien J.**, Waack I. N., Ferez K. B., Kirsch M. und de Groot H.  
„Labelling and pharmacokinetic studies of PEG-PLGA microcapsules as artificial oxygen carriers“.  
Vortrag, 1. nephrologischer Workshop (Klinik für Nephrologie des Universitätsklinikums Essen) am 02.06.2012.
  
- **Laudien J.**, Ferez K. B., Kirsch M. und de Groot H.  
„Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von pegylierten Poly(laktid-co-glykolid) Mikrokapseln“.  
Vortrag, 18. Workshop „Zell- und Gewebeschädigung: Mechanismen, Protektion und Therapie“, 29.11.-01.12.2012 in Xanten.
  
- **Laudien J.**, Ferez K. B., Kirsch M. und de Groot H.  
„*In vivo* Charakterisierung von Poly(*n*-Butyl-Cyanoacrylat) Nanokapseln als potenzielle künstliche Sauerstoffträger“  
Vortrag, 19. Workshop „Zell- und Gewebeschädigung: Mechanismen, Protektion und Therapie“, 28.11.-30.11.2013 in Xanten.

### 10.2.3 Posterpräsentationen

- **Laudien J.**, Ferez K. B., Kirsch M. und de Groot H.  
„Fluoreszenzmikroskopische Analyse der *in vivo* Verteilung von pegylierten Poly(laktid-co-glycolid) Mikrokapseln nach intravenöser Applikation in die Ratte“.  
Postervortrag, Forschungstag der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Essen am 23.11.2012.
  
- **Laudien J.**, Ferez K. B., Mayer C. und de Groot H.  
„*In vivo* Charakterisierung von Poly(*n*-Butyl-Cyanoacrylat) Nanokapseln als potenzielle künstliche Sauerstoffträger“  
Postervortrag, Forschungstag der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Essen am 22.11.2013.

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

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

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

## 10.4 Erklärung

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

**„Biologische Verträglichkeit künstlicher Sauerstoffträger auf Perfluorcarbon-Basis“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im Oktober 2014

---

Julia Laudien

## 10.5 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2011 bis Juni 2014 im Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

Mein Dank gebührt an erster Stelle

**Herrn Prof. Dr. Dr. de Groot**

für die Bereitstellung der wissenschaftlichen Arbeitsstelle und die Überlassung des interessanten Themas. Die fortwährende Geduld, die stete Diskussionsbereitschaft sowie die wertvollen Anregungen und Denkanstöße haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke

**Herrn Prof. Dr. Mayer**

für die Übernahme des Korreferats und die stete Kooperationsbereitschaft.

Ein besonderer Dank gebührt

**Frau Dr. K. Ferez**

für ihr aufopferungsvolles Engagement, die stete Diskussionsbereitschaft und die stets offenen Worte, das Vertrauen und die Unterstützung während der wissenschaftlichen Begleitung dieser Arbeit.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Kirsch**, **Herrn D. Naglav**, **Herrn C. Groß-Heitfeld** und **Frau T. Hinkeldein** für die stete Kooperationsbereitschaft und die tolle Zusammenarbeit.

Danken möchte ich zudem **Frau Anna Wroblen, Frau Johanna Teloh, Frau Maren Oude-Lansink, Frau Lisa Kremer, Frau Kristina Piwellek, Herrn Johannes Jägers, Frau Dr. Ricarda Rohrig, Frau Dr. Rabea Verhaegh, Frau Dr. Katharina Effenberger-Neidnicht, Frau Dr. Indra Waack, Herrn Dr. Thomas Rönn und Herrn Dr. Tim Hamburger**, ohne die meine Promotionszeit deutlich langweiliger gewesen wäre.

Zudem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie für das stets offene Ohr und die kollegiale Zusammenarbeit.

Ein ganz besonderer Dank gebührt

**meinen Eltern und meiner Schwester**

für das stete Vertrauen, den Rückhalt und die immer vorbehaltlose Unterstützung, die mir den Weg zur Promotion erst ermöglicht hat.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei

**Herrn Thorsten Dresen,**

der immer ein aufmunterndes Wort und ein offenes Ohr hatte. Danke für das stete Vertrauen und die Unterstützung.