

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

“Untersuchungen zur Biokompatibilität / Toxizität von Hämoglobin-basierten
Mikropartikeln (HbMP-700) als Sauerstoffträger”

“Investigations of biocompatibility / toxicity of hemoglobin-based
microparticles (HbMP-700) as oxygen carrier”

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Ijad Kao
aus Berlin-Zehlendorf

Datum der Promotion: 25.11.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Abstrakt	1
1.1 Deutsche Version	1
1.2 Englische Version.....	2
2 Einleitung	3
3 Zielstellung	6
4 Methodik	6
4.1 Herstellung der HbMP	6
4.2 Morphologie	7
4.2.1 <i>Atomkraftmikroskopie der Partikel zur Ermittlung der Größe und Verformbarkeit</i>	7
4.2.2 <i>Probenvorbereitung zur Untersuchung der Oberflächenmodifikationen</i>	7
4.2.3 <i>TEM-Messung zur Morphologischen Darstellung von nicht modifizierten und modifizierten HbMP</i>	8
4.3 CLSM-Untersuchung, Messung des hydrodynamischen Durchmessers und Zeta Potential Messung zur Ermittlung der Stabilität der HbMP Suspension	9
4.3.1 <i>CLSM-Untersuchung</i>	9
4.3.2 <i>Zetapotential</i>	9
4.4 Rheologie	9
4.5 Sauerstoffaffinität	10
4.5.1 <i>Ermittlung der Hämoglobinkonzentration</i>	10
4.5.2 <i>Ermittlung der oxygenierten HbMP</i>	10
4.5.3 <i>Sauerstoffaffinitätsmessung mithilfe des HEMOX Analysegerätes</i>	11

4.6	Immunogenität und Zirkulationszeit	11
4.6.1	<i>Bindung von Anti-Hb Antikörper an oberflächenmodifizierte HbMP ...</i>	11
4.6.2	<i>Bindung von IgG an oberflächenmodifizierte HbMP.....</i>	12
4.6.3	<i>Bindung von Haptoglobin an oberflächenmodifizierte HbMP.....</i>	12
4.7	Toxizitätsbestimmung.....	12
4.7.1	<i>Reaktive-Sauerstoffspezies</i>	12
4.7.2	<i>Gentoxizitätstests</i>	14
4.7.2.1	<i>Ames Test</i>	14
4.7.2.2	<i>Säugetier In-vivo Mikronukleus Test</i>	15
4.7.2.3	<i>Säugetierzellen Genmutationstest</i>	16
5	Ergebnisse	17
5.1	Morphologie	17
5.1.1	<i>Atomkraftmikroskopie der Partikel zur Ermittlung der Größe und Verformbarkeit.....</i>	17
5.1.2	<i>TEM-Messung zur Morphologischen Darstellung von nicht modifizierten und modifizierten HbMP</i>	17
5.2	CLSM-Untersuchung, Messung des hydrodynamischen Durchmessers und Zeta Potential Messung zur Ermittlung der Stabilität der HbMP Suspension	18
5.2.1	<i>CLSM-Untersuchung</i>	18
5.2.2	<i>Zetapotential.....</i>	19
5.3	Rheologie	19
5.4	Sauerstoffaffinität	19
5.4.1	<i>Ermittlung der Hämoglobinkonzentration.....</i>	19
5.4.2	<i>Ermittlung der oxygenierten HbMP</i>	20
5.4.3	<i>Sauerstoffaffinitätsmessung mithilfe des HEMOX Analysegerätes</i>	20

5.5	Immunogenität und Zirkulationszeit	20
5.5.1	<i>Bindung von Anti-Hb Antikörper an oberflächenmodifizierte HbMP ...</i>	20
5.5.2	<i>Bindung von IgG an oberflächenmodifizierte HbMP.....</i>	22
5.5.3	<i>Bindung von Haptoglobin an oberflächenmodifizierte HbMP.....</i>	22
5.6	Toxizitätsbestimmung.....	23
5.6.1	<i>Reaktive-Sauerstoffspezies</i>	23
5.6.2	<i>Gentoxizitätstests</i>	25
5.6.2.1	<i>Ames Test</i>	25
5.6.2.2	<i>Säugetier In-vivo Mikronukleus Test</i>	26
5.6.2.3	<i>Säugetierzellen Genmutationstest</i>	27
6	Diskussion	28
7	Referenzen	34
8	Eidesstattliche Versicherung – Selbständigkeitserklärung.....	42
9	Anteilerklärung	43
10	Auszug aus der Journal Summary List	44
11	Druckexemplare der Publikationen	50
12	Lebenslauf.....	79
13	Komplette Publikationsliste	80
14	Danksagung	81

Abkürzungsverzeichnis

AFM	Atomic Force Microscopy / Rasterkraftmikroskop
AHD	Alkalische-Hematin-D
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Deutsche Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
CLSM	Konfokale Laser-Rastermikroskopie
CPA	Cyclophosphamid
DGU	Deutsches Trauma Register
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Erythrozytenkonzentrat
EMS	Ethylmethansulfonat
FDA	Food and Drug Administration
GA	Glutaraldehyd
H₂DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetat
HA	Hyaluronsäure
Hb	Hämoglobin
HbMP-700	Hämoglobin basierte Mikropartikel (700nm)
HBOC	Hemoglobin Based Oxygen Carrier / Hemoglobin basierte Sauerstoffträger
Hct	Hämatokrit
HP	Haptoglobin
HSA	Humanes Serum Albumin
KCl	Kaliumchlorid
MEA	Mikroelektrodenarray
metHb	Methämoglobin
ML	Mauslymphom
MMS	Methylmethansulfonat
MnCl₂	Mangan(II)-chlorid

MTD	Maximal tolerierbare Dosis
Na₂CO₃	Natriumcarbonat
NaBH₄	Natriumborhydrid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NC	Negative control / Negativkontrolle
NO	Stickstoffmonoxid / Stickoxid
O₂	Oxygen / Sauerstoff
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development / Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
Oxy-Hb	Oxyhämoglobin
p50	Sauerstoff-Partialdruck, bei 50 %-iger Sauerstoffsättigung
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCE	Polychromatische Erythrozyten
Plu	Pluronic
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROS	Reactive Oxygen Species / Reaktive Sauerstoffspezies
Si₃N₄	Siliziumnitrid
TBHP	tert-Butylhydroperoxid
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFT	Trifluorthymidin
TK	Thymidine Kinase
WHO	World Health Organization / Weltgesundheitsorganisation Fachgesellschaften e.V.

1.1. Abstrakt

Moderne Arzneiformen als parenterale Zubereitung zur Gewährleistung der Sauerstoffversorgung können erhebliche Vorteile gegenüber den gegenwärtig eingesetzten Erythrozytenkonzentraten (EK) bieten. Hämoglobin-basierte Mikro-partikel (HbMP) können in effizienten Mengen hergestellt werden, bergen nicht die Gefahr der Kontamination und können deutlich länger als EK gelagert werden. Bei HbMP zur parenteralen Applikation handelt es sich um eine Neuentwicklung, weshalb noch nicht genügend Biokompatibilitäts- bzw. Toxizitätsuntersuchungen vorliegen. Präklinische In-vitro Untersuchungen wurden durchgeführt um Sicherheitsaspekte der HbMP-700 zu untersuchen. Morphologie und Verformbarkeit der Partikel wurden mittels Atomkraftmikroskopie (AFM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bestimmt. Die Suspensionsstabilität wurde mittels Konfokaler Laserscanning-mikroskopie und dynamischer Lichtstreuung ermittelt. HbMP weisen eine gute Verformbarkeit und homogene Größenverteilung auf. Die Analyse der HbMP mittels Rheometer zeigte ein rheologisch ähnliches Fließverhalten wie humanes Blut sowie keine Aggregation im Ruhezustand. Die Sauerstoffaffinität wurde mittels Sauerstoffmeter und einem HEMOX Analysegeräts untersucht. Die HbMP besitzen eine hohe Sauerstoffaffinität, so dass der Sauerstoff nur im hypoxischen Gewebe abgegeben wird. Um die Erkennung der HbMP durch das Immunsystem zu minimieren, wurden die Partikel zusätzlich mit Albumin abgedeckt, was mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen wurde. Die Quantifizierung der Reaktiven-Sauerstoffspezies (ROS) zeigte keine Toxizität der HbMP. Ebenso konnte keine Gentoxizität im Ames Test, im Säugetierzellen-Genmutationstest und im In-vivo Mikronukleus Test nachgewiesen werden. Die neuartige Hämoglobin-basierten Sauerstoffträger, HbMP-700, sind vielversprechend bei der Erfüllung der anspruchsvollen Voraussetzungen für die Entwicklung eines universellen Blutersatzes und zeigten in den In-vitro Untersuchungen keine Biotoxizitäten. Die Ergebnisse in den präklinischen Untersuchungen bestätigen die Biokompatibilität. Es ist daher von großem medizinischem Interesse, präklinische In-vivo Experimente durchzuführen, um weitere Daten zu erfassen.

1.2. Abstract

Modern drug forms such as micro- / nanoparticles as a parenteral application to ensure the oxygen supply, may offer a substantial advantage over the currently used erythrocyte concentrates (EC). Hemoglobin-based microparticles (HbMP) can be produced in effective quantities, do not possess the uncertainty of contamination and are able to be stored distinctly longer than EC. HbMP for parenteral administration is a new development for which reason there are not sufficient biocompatibility or toxicity studies available. Preclinical In-vitro safety investigations were performed to determine the safety aspects of HbMP-700. The morphology and deformability of the particles were investigated with the use of Atomic Force Microscopy (AFM) and Transmission Electron Microscopy (TEM). The suspension stability was determined with Confocal Laser-Scanning-Microscopy (CLSM) and the dynamic light scattering. HbMP show a good deformability and homogeneous size distribution. The analysis of the HbMP with the use of a Rheometer demonstrated a rheologically similar flow behavior to human blood with no aggregation of the suspension in a state of rest. The oxygen affinity was investigated with an oxygen meter and HEMOX analyzer. The HbMP have a high affinity for oxygen so that the oxygen is only released in the hypoxic tissue. In order to minimize the detection of HbMP by the immune system, the particles were also covered with albumin, which was demonstrated by flow cytometry. The quantification of the reactive oxygen species (ROS) showed no toxicity of the HbMP. Likewise, no genotoxicity could be detected in the Ames test, in the mammalian cell gene mutation test or in the in-vivo micronucleus test. The novel hemoglobin-based oxygen carriers, HbMP-700, are promising in meeting the demanding requirements for the development of a universal blood substitute and showed no biotoxicity in the In-vitro investigations. The results in the preclinical studies confirm the biocompatibility. It is therefore of great medical interest to carry out preclinical In-vivo experiments in order to obtain further Data.

2 Einleitung

Blut ist eine Körperflüssigkeit, die mithilfe der Organe des Herz-Kreislaufsystems, im gesamten Organismus permanent zirkuliert. Hierbei befindet sich der Großteil (ca. 80%) der Flüssigkeit verteilt in den Venen, der rechten Herzhälfte und im Lungen-Kreislauf. Blut setzt sich zusammen aus einem zellulären Anteil (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) und einem nicht-zellulären Anteil (Plasma). Die Funktionen des Blutes sind u.a. der Transport von Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid und Stoffwechselprodukten, die Signaltransduktion, die Homöostase und die Mobilisierung des Immunsystems (1).

Die Erythrozyten sind durch besondere Eigenschaften an ihre Funktion als Sauerstofftransporteure optimalen angepasst. Als kernlose, bikonkave Strukturen mit einem Randwall erreichen sie eine bestmögliche Verformbarkeit für die optimale Sauerstoffversorgung des gesamten Organismus (2). Ihr 1 µm flaches Zentrum und der 2 µm dicke Rand führen zu einer vergrößerten Oberfläche für einen effizienteren Sauerstoff Austausch. Der Durchmesser eines Erythrozyten beträgt durchschnittlich 7,7 µm (3). Die außerordentliche Flexibilität verdanken die Erythrozyten ihrer aus einer Glykokalyx bestehenden Plasmamembran. In dieser sind unter anderem Glykoproteine eingelagert, die als Blutgruppenantigene fungieren können und damit beispielsweise für das ABO-System verantwortlich sind.

Dadurch, dass humane Erythrozyten keine Zellkerne oder Organellen besitzen, können Sie sich weder vermehren noch aerob Energie herstellen. Erythrozyten leben durchschnittlich 120 Tage. Die Energiegewinnung ist ausschließlich anaerob durch die Glykolyse möglich. Die Erythrozyten enthalten als Hauptbestandteil Hämoglobin. Dieses hat die primäre Funktion, durch die in den 4 Proteinketten enthaltenen Eisenatome, Sauerstoff zu binden und damit dessen Transport durch das Herz-Kreislaufsystem zu ermöglichen (3,4). Erythrozyten, abgepackt in Beuteln in Form von Konzentraten (EK), spielen in der Trauma-/Notfallmedizin eine essenzielle Rolle.

Die deutsche Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) aktualisiert permanent die S3-Leitlinie für die Polytrauma-/Schwererletzten-Behandlung, um die notfallmedizinischen Maßnahmen zu optimieren. Zu den lebensrettenden Erstmaßnahmen zählt u.a. die Vermeidung von Blutverlusten bzw. das Entgegenwirken eines Abfalls der Hämoglobinkonzentration, um die daraus resultierenden hypoxischen Reaktionen zu verhindern. Als Arzneimittel

definiert, werden daher EK von Blutspenden permanent benötigt, um lebensnotwendige Transfusionen durchzuführen (5). Nach einem notfallmedizinischen Trauma stirbt die Hälfte der Patienten nach Einlieferung in eine Klinik innerhalb von zwei Tagen aufgrund von unkontrollierten Blutungen (6).

Das Deutsche Trauma Register DGU® erstellt jährlich ein Bericht über die Daten der Schwerverletztenversorgung in deutschen Kliniken. Dies soll zur besseren Analyse und Optimierung der Qualität in der Traumabehandlung beitragen. Hier werden u.a. die Zeitabstände zwischen der Aufnahme des Patienten im Schockraum und der Transfusion von Erythrozytenkonzentraten untersucht (7). Derzeit werden weltweit jährlich rund 100 Millionen Blutkonserven von Spendern für lebensrettende Transfusionen benötigt. Allein in Deutschland wurden 2018 mehr als 3 Millionen Einheiten (Beutel) Erythrozytenkonzentrate transfundiert (8). In entwickelten Ländern ist die Nachfrage nach Blutspendern trotz Bevölkerungswachstum und Alterung, aufgrund der jüngsten Entwicklungen in der Medizin, wie minimalinvasiven Operationstechniken, tendenziell rückläufig (9). Jedoch steigt weltweit der Bedarf an Plasma, Thrombozyten oder Erythrozytenkonzentraten, mit zeitgleicher Abnahme der Spenderzahl, was chronisch zu kritischen Versorgungsengpässen in den Blutbanken führt (10).

Ein weiteres wichtiges Thema ist die Sicherheit, da die Transfusion von Blutprodukten immer noch Risiken wie hämolytische Reaktionen, Immunmodulation, Fehltransfusionen infolge von Nichtübereinstimmung, logistische Einschränkungen, Übertragung von Infektionen bergen (10-12). Dies ist besonders in Entwicklungsländern von großer Bedeutung. Die bisher von der World Health Organization (WHO) gesammelt Daten zeigen, dass nur 104 von den 173 berichterstattenden Ländern gesetzlich geregelte Qualitäts- und Sicherheitsstandards für die Transfusion von Blutprodukten aufweisen. Dreizehn dieser Länder sind nicht in der Lage, alle Spenden auf ein oder mehrere Infektionskrankheiten wie HIV, Hepatitis B, Hepatitis C und Syphilis zu testen. Die Prävalenz transfusions-übertragbarer Infektionskrankheiten bei Spenden in „high-income“ Ländern ist bedeutend niedriger als in „low- and middle-income“ Ländern (13). Zusätzlich ergab die Analyse großer Patientengruppen ein höheres Sterberisiko, wenn Blut transfundiert wurde das länger als 2 Wochen gelagert wurde (14-17). Eine elegante Lösung des oben erwähnten Problems könnte die Bereitstellung eines geeigneten künstlichen Sauerstoffträger sein, der für eine lange Zeit lagerfähig, sofort verfügbar und blutgruppenunabhängig transfundierbar wäre.

Die Entwicklung in diesem Bereich konzentriert sich auf vollsynthetische Träger wie Hybridverbindungen auf Hämbasis und Perfluorkohlenwasserstoffe einerseits und Sauerstoffträger auf Hämoglobinbasis (HBOCs) andererseits (18,19). Der Hauptvorteil von HBOCs gegenüber synthetischen Trägern besteht in der Natur von Hb als physiologisches Sauerstofftransporterprotein. Stromafreies Hb kann aufgrund seiner Nephrotoxizität nicht direkt verwendet werden (20). Chemische Modifikationen wie intra- und intermolekulare Vernetzung und Konjugation mit Makromolekülen (21-23) oder Einkapselung in Liposomen (24-26), Polymerkapseln (27-29), Polymermizellen (30) usw. wurden vorgeschlagen, um diese Probleme zu überwinden. Bisher jedoch mit nur mäßigem Erfolg. Die meisten dieser Produkte führten In-vivo zu Nebenwirkungen. Hauptsächlich aufgrund einer durch Vasokonstriktion verursachten Hypertonie (22,31-36). Nur wenige von ihnen erreichten klinische Studien in der Spätphase, scheiterten jedoch bei der Zulassung durch die FDA aufgrund von Gesundheitsschäden und Todesfällen (35-37). Zugelassene Produkte existieren in Südafrika, Russland, China und Mexico (18,19). Die genauen Mechanismen, die den vasokonstriktiven Effekten zugrunde liegen, sind bisher nicht vollständig geklärt.

Es gibt zwei grundlegende Hypothesen:

- (i) Sauerstoffübersorgung bei HBOCs mit geringer Sauerstoffaffinität
- (ii) Stickstoffmonoxid (NO) -Fänger (31,32,35).

Die Fähigkeit von azellulärem Hb, die Ausbreitung von oxidativem Stress zu provozieren und zu beschleunigen, ist wahrscheinlich auch ein Faktor (34). Die neue Generation der HBOCs weisen eine hohe Sauerstoffaffinität auf, wodurch ein vorzeitiges Überangebot an Sauerstoff und eine Vasokonstriktion (38), verursacht durch einen automatischen Regulationsmechanismus (39), verhindert werden. Die Größenanpassung der HBOCs auf über 100 nm kann eine Extravasation durch die Endothellücken und damit ein NO-Abfangen verhindern. Denn niedrige NO-Werte führen zu einer Limitation der Hemmung physiologischer vasokonstriktorischer Proteine wie z.B. Angiotensin II, Endothelin-1. (40,41). Wichtig dabei ist es trotzdem die Größe kleiner als 1 µm zu halten, um eine Blockierung der Mikrozirkulation und Probleme einer verstärkten Phagozytose zu vermeiden (42,43). Dabei können Oberflächenmodifikationen die Partikel vor Erkennung und Eliminierung durch das angeborene Immunsystem das Partikel schützen. Als vielversprechende HBOCs der nächsten Generation haben wir kürzlich das neuartige Hämoglobin-basierte

Mikropartikel (HbMP-700), mit einer Partikelgröße unter 1 µm eingeführt, das In-vitro keine Vasokonstriktion kleiner Blutgefäße verursacht (44-46).

Die zu untersuchenden Hämoglobin-basierten Mikropartikel HbMP-700 bestehen aus durch Glutaraldehyd vernetzten Hb-Molekülen. Die Herstellung von HbMP-700 beinhaltet die drei Teilschritte Copräzipitation der Hb-Moleküle mittels Na₂CO₃- und MnCl₂-Lösungen, was zur Bildung von MnCO₃-Partikeln führt, die das Hb enthalten, Vernetzung des Hb in den Partikeln durch Glutaraldehyd (GA) und Auflösung des anorganischen MnCO₃-Templats mittels EDTA (42). Nach der Skalierung des Herstellungsprozesses wird HbMP-700 derzeit präklinisch untersucht. In dieser Studie werden erste Ergebnisse in Bezug auf Sicherheit, einschließlich mechanischer Eigenschaften, Einfluss von Oberflächenmodifikationen, der Sauerstoffbindungskapazität, Produktion Reaktiver-Sauerstoffspezies (ROS) und genetische Toxizität präsentiert. Die biologische Beurteilung der Biokompatibilität bzw. Toxizität basiert auf der Norm ISO 10993. Alle Tests wurden in Übereinstimmung mit den Anforderungen der Zulassungsbehörde in Deutschland, dem Paul-Ehrlich-Institut, durchgeführt.

3 Zielstellung

Das Ziel der Arbeit ist es die Hämoglobin-basierten Mikropartikeln (HbMP-700) hinsichtlich ihrer Biokompatibilität bzw. Toxizität unter Berücksichtigung der in der Norm ISO 10993 festgelegten Tests zu untersuchen. Das betrifft insbesondere die physikalische, chemische und morphologische Charakterisierung sowie die Vasoaktivität und die Toxikologie. Die Untersuchung beinhaltet die Ermittlung der Größe und Verformbarkeit der Partikel, das Fließverhalten und die Suspensionsstabilität, die Abschirmung gegenüber der Detektion durch das Immunsystem, die Funktion des Sauerstofftransports bzw. die Sauerstoffaffinität, ROS-Produktion, In-vitro Zytotoxizität und Gentoxizität.

4 Methodik

4.1 Herstellung der HbMP

Für die Herstellung der HbMP wird die Copräzipitationstechnik angewendet. Dazu werden erst 5mg/ml Hämoglobin in 0,125 M MnCl₂ gegeben. In der ersten Präzipitation werden 0,125 M Na₂CO₂ unter starkem Rühren in die Lösung eingearbeitet und für 30

Sekunden weitergerührt. Die entstandenen Hb-MnCO₃ Partikel werden zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen (Zentrifugieren mit 3000g, 3min) und anschließend in isotonomischer Kochsalzlösung resuspendiert. Dem Ansatz wird dann 0,02% GA Lösung hinzugefügt und für 1 h bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend werden die Partikel gewaschen und in destilliertem Wasser resuspendiert (61).

4.2 Morphologie

4.2.1 *Atomkraftmikroskopie der Partikel zur Ermittlung der Größe und Verformbarkeit*

Zur Ermittlung des HbMP-700-Oberflächenprofils wurde die Atomkraftmikroskop (AFM) verwendet. Die Bildaufnahmen erfolgten unter der Verwendung eines Nanoscope III Multimode AFM (Digital Instrument Inc., Santa Barbara, Kalifornien, USA) im Tapping-Modus. Nach der Aufnahme wurden die Bilder mit der Nanoscope-Software verarbeitet. Die HbMP-Proben wurden 1:10.000 mit entionisiertem Wasser verdünnt auf ein frisch gespaltenes Mica-Substrat getropft. Es erfolgte eine Vorbehandlung des Mica-Substrats mit 1 mM Polyethylenimin (Mw 25 kDa) für 20 min, um eine ausreichende Haftung der Partikel während der Messungen, durch eine positiv geladene Oberfläche, zu erhalten. Nach dem Anhaften der Partikel wurde das Substrat mit entionisiertem Wasser gespült und unter einem sanften Stickstoffstrom getrocknet. Die Partikel wurden zuerst im trockenen Zustand gescannt. Anschließend wurde ein Tropfen entionisiertes Wasser zugegeben und im nassen Zustand gescannt. Für die Messung in Luft, wurden mikrolithographierte Spitzen auf Siliciumnitrid (Si₃N₄) Cantilevern mit einer Federkonstante von 42 N/m und Resonanzfrequenz von 300 kHz (Olympus Corporation, Tokio, Japan), verwendet. Die Scans in Wasser wurden mit Cantilevern durchgeführt, die eine Federkonstante von 3 N/m und eine Resonanzfrequenz von 75 kHz (Budgetsensoren, innovative Lösungen Bulgaria Ltd., Sofia, Bulgarien) aufwiesen. Die Höhe von jedem Partikel im trockenen und feuchten Zustand wurden mithilfe der Nanoscope-Software bestimmt. Es wurde die Höhendifferenz zwischen der Unterlage und dem höchsten Punkt des Partikeloberflächenprofils gemessen (60).

4.2.2 *Probenvorbereitung zur Untersuchung der Oberflächenmodifikationen*

HSA-d-HbMP und HSA-t-HbMP

Zur zweifachen Präzipitation werden die bereits hergestellten Hb-MnCO₃ Partikel in 0,04M MnCl₂ und 0,4% HSA suspendiert, um das HSA an die Oberfläche der Partikel

zu binden. Nach 5min werden 0,04M Na₂CO₃ addiert und die Partikel mit destilliertem Wasser gewaschen und in isotonischer Kochsalzlösung resuspendiert. Anschließend wird dem Ansatz 0,02% GA Lösung bei Raumtemperatur und unter langsames Rühren hinzugefügt. Dabei werden die Partikel quervernetzt. Mit 0,25M EDTA Lösung wird dann das MnCO₃ aufgelöst. Der Ansatz wird mit 0,2mg/ml NaBH₄ in 0,1M NaOH Lösung für 30 min inkubiert. Die HSA-d-HbMP werden dann dreimal mit isotonischer Kochsalzlösung und 0,2% HSA gewaschen. Zuletzt werden die Partikel in Ringer-Acetatlösung resuspendiert und bei 4°C gelagert. Die dreifache Präzipitation bzw. die Herstellung der HSA-t-HbMP beinhaltet einen zusätzlichen Copräzipitationsschritt nach der zweiten Quervernetzung. Anschließend wird mit GA quervernetzt und wie beim vorherigen Schritt aufgelöst (61).

HA-d-HbMP und HA-t-HbMP

HA-d-HbMP werden genauso hergestellt wie zuvor bei der Herstellung der HSA-d-HbMP beschrieben. Hier wird jedoch 0,04% HA zusätzlich zu 0,4%HSA verwendet. Die dreifache Präzipitation wird nach der zweiten Quervernetzung durchgeführt. Anschließend wird mit GA quervernetzt und wie beim vorherigen Schritt aufgelöst (61).

Plu-d-HbMP und Plu-t-HbMP

Plu-d-HbMP werden genauso hergestellt wie zuvor bei der Herstellung der HSA-d-HbMP beschrieben. Hier wird jedoch 0,04% Pluronic zusätzlich zu 0,4%HSA verwendet. Die dreifache Präzipitation wird nach der zweiten Quervernetzung durchgeführt. Anschließend wird mit GA quervernetzt und wie beim vorherigen Schritt aufgelöst (61).

4.2.3 TEM-Messung zur Morphologischen Darstellung von nicht modifizierten und modifizierten HbMP

TEM-Messung wurde mithilfe von Zeiss EM 906 Omega Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit einer Beschleunigungsspannung von 80kV durchgeführt. Das Wasser der Suspension wird schrittweise mit Ethanol ausgetauscht. Die Waschschrte sind 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 99% Ethanol. Nach der letzten Zentrifugation (1800g, 6min) wird die Probe mit LR-White Resin über Nacht bei Raumtemperatur, zu einem Verhältnis von 1 : 1 (Ethanol : LR-White Resin), inkubiert. Danach wird die Probe mit frischem LR-WR ausgetauscht und in Gelatine kapseln

überführt. Eine Polymerisation des Resins wird durch UV-Licht Exposition für 48h bei Raumtemperatur erreicht. Anschließend werden dünne Sektionen präpariert (60-70nm auf Mesh-Grids). Die Sektionen werden für 15min mit 1% Phosphorwolframsäure und 15min mit 4% wässrigem Uranylacetat gefärbt (61).

4.3 CLSM-Untersuchung, Messung des hydrodynamischen Durchmessers und Zeta Potential Messung zur Ermittlung der Stabilität der HbMP Suspension

4.3.1 *CLSM-Untersuchung*

Es werden von allen Oberflächenmodifikationen CLSM Fotos gemacht, mithilfe von LSM 510 Meta (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) Mikroskop mit einem 100x Öl-Immersionsobjektiv. Zur Anregung werden Strahlen mit der Wellenlänge von 488nm verwendet. Außerdem kommt ein Long-Pass-Emissionsfilter mit 505nm zum Einsatz (61).

4.3.2 *Zetapotential*

Um das Zetapotential der Partikel zu bestimmen wird der Zetasizer Nano ZS Instrument (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire , UK) genutzt. Jede Probe wird im Verhältnis 1:200 mithilfe der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) verdünnt (61).

4.4 Rheologie

Fließeigenschaften von humanem Blut werden mithilfe der Scheinviskosität charakterisiert, da dessen Viskosität von der bei der Messung angewandten Scherbelastung abhängt (nicht-Newtonsches Verhalten). Die Scheinviskosität der HbMP-700 Suspensionen wird unter Verwendung eines Rheometer Physics MCR 301 (Anton Paar, Ostfildern-Scharnhausen, Deutschland) mit einem Platten-Platten-System untersucht. HbMP-700 werden in einer Volumenkonzentration von 40% in Blutplasma resuspendiert, dann wird ein Teil der Suspension mit dem gleichen Volumenanteil Vollblut (40% Hämatokrit) gemischt. Die Scheinviskosität wird im Schergeschwindigkeitsbereich zwischen 0,1 und 1000/s einer 40%igen HbMP-700-Suspensionen in Plasma, HbMP-700-Blut-Gemischen und Vollblut (Hct=40%), aufgezeichnet (60).

4.5 Sauerstoffaffinität

4.5.1 *Ermittlung der Hämoglobinkonzentration*

Die Hämoglobinkonzentration wurde mithilfe der modifizierten Alkaline Hematin-D Methode (AHD Method) ermittelt (47,48). Hier wird mit steigender Konzentration Pronase der 2% (v/v) Partikelsuspension, bis zu einer Konzentration von 0,5mg/ml Pronase, addiert und für 30min bei 45°C inkubiert. Anschließend wird AHD Reagenz (25mg/ml Triton X-100 in 0,1M NaOH) im Verhältnis 1:1 hinzugefügt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Proben wurden dann bei einem Absorptionsspektrum bei 574nm Wellenlänge mittels UV-Vis Spektroskopie (Hitachi U2800, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) gemessen (61).

4.5.2 *Ermittlung der oxygenierten HbMP*

Zur Ermittlung der oxygenierten HbMP wurde die Ferricyanid Methode angewendet (49,50). Das Ferricyanid bewirkt eine Umwandlung von Oxyhämoglobin in Met-Hämoglobin (Met-Hb) und damit eine Freisetzung von Sauerstoff (bestimmt durch die Änderung des pO_2) in dem umgebenden Medium, entsprechend der in den Partikeln an Hämoglobin gebundenen Sauerstoffmenge. Die Sauerstoffbindungskapazität der Partikel wird aus dem Gehalt an Oxy-Hb bestimmt. 2% (v/v) Partikelsuspension wird in einem Glassvial mit Magnetrührer und einem Sauerstoff Sensor (oxygen microsensor NTH-PSt7, Presens-Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland) mit mobilen Sauerstoffmeter und Datenlogger (Microx4, Presens-Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland) gegeben. Damit wird die gelöste Sauerstoffkonzentration gemessen. Nach drei Sekunden wird 10% Kaliumferrocyanid hinzugegeben und die Änderung der Konzentration von gelöstem Sauerstoff gemessen, bis ein stabiler Wert erreicht ist. Die Differenz zwischen dem finalen pO_2 Wert und dem pO_2 zu Beginn korrespondiert mit dem gebundenen Sauerstoff im Hämoglobin der Partikel. Die Änderung in pO_2 wird mithilfe der folgenden Formel in die Konzentration des freigesetzten Sauerstoffs (cO_2) umgewandelt (61):

$$cO_2 = aO_2 \times pO_2$$

cO_2 = Sauerstoffkonzentration
 aO_2 = Löslichkeitskoeffizient von O_2 in Blut
 pO_2 = Sauerstoffpartialdruck

Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff in Blut = 0,0031ml O_2 /mmHg O_2 /dl Blut.

Die Konzentration von Oxy-Hb wird wie folgt berechnet:

$$c(\text{Oxy-Hb}) = \frac{m_{\text{O}_2}}{\rho(\text{O}_2) \times \text{Hb}_s}$$

$\rho(\text{O}_2) = 1,43 \text{ g/l}$ (Sauerstoffdichte)
 $\text{Hb}_s = 1,34 \text{ ml O}_2/\text{g Hb}$ (gesättigter Hb Gehalt)

4.5.3 Sauerstoffaffinitätsmessung mithilfe des HEMOX Analysegerätes

Die Sauerstoffdissoziationskurven von Rinder-Hb und HbMP-700 werden mithilfe eines HEMOX Analysegerät (TCS Scientific, New Hope, PA, USA), ausgestattet mit einem Spektralphotometer mit zwei Wellenlängen bei 37°C, erstellt. Die Sauerstoffsättigung der Partikel wird bei einem Sauerstoffpartialdruck von 150 mmHg (20 kPa) bis 2 mmHg (0,27 kPa) aufgezeichnet. Der p50 wird gemäß der Adair-Gleichung als der Sauerstoffpartialdruck definiert, der beim Erreichen einer Sauerstoffsättigung von 50% gemessen wird (60).

4.6 Immunogenität und Zirkulationszeit

Die Bindung von Antikörpern an partikelgebundenem Hämoglobin erlaubt es die erfolgreiche Modifizierung der Partikel zu beweisen. Dieser Versuch wird mithilfe der Durchflusszytometrie (FACS Canto II, Becton und Dickinson, Franklin lakes, NJ, USA) durchgeführt. Alle sechs verschiedenen Oberflächenmodifikationen werden für den Test verglichen. HbMP ohne Oberflächenmodifikation gilt als Kontrollgruppe. Die Färbung der Partikel mithilfe von sekundären Antikörpern beschreibt die nicht-spezifische Bindung. Die Färbung mit primären und sekundären Antikörpern zeigt die totale Bindung. Die spezifische Bindung wird dann als Differenz zwischen totale und nicht-spezifische Bindung berechnet (61).

4.6.1 Bindung von Anti-Hb Antikörper an oberflächenmodifizierte HbMP

Proben mit 1 ml 0,2% (v/v) Partikelsuspension werden für 2h mit primären Kaninchen anti-Rinderhämoglobin Antikörpern zu einer Konzentration von 2,5 µg/ml inkubiert. Die Partikelsuspension wird dann mit sekundären APC-konjugierten Ziegen anti-Kaninchen IgG Antikörpern zu einer Konzentration von 1 µg/ml bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischen jedem Inkubationsschritt wird die Partikelsuspension 2-3 mal mit PBS-Lösung gewaschen. Die Partikelsuspension wird dann nochmals in Dunkelheit für 2h inkubiert, gewaschen und in 300 µl PBS Lösung für die Durchflusszytometrie-Untersuchung resuspendiert (61).

4.6.2 *Bindung von IgG an oberflächenmodifizierte HbMP*

Die Bindung von IgG an die Partikeloberfläche führt zur Opsonisierung und Erkennung der Partikel durch die immunkompetenten Zellen im Blut und Gewebe. Daher sollte eine hochwertige Oberflächenmodifikation die Partikel vor IgG-Adsorption schützen.

Die Bindung von IgG an die Partikel wird genauso durchgeführt wie bei den anti-Hb Antikörpern. 1ml der Partikelsuspension wird primäre Biotin-konjugierte humane IgG Isotyp-Kontrolle zu einer Konzentration von 2.5µg/ml hinzugefügt und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird mit PBS-Lösung gewaschen. Danach wird die Suspension für 2h mit APC-Steptavidin zu einer Konzentration von 1µg/ml in der Dunkelheit inkubiert und mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert (61).

4.6.3 *Bindung von Haptoglobin an oberflächenmodifizierte HbMP*

HP ist ein Glykoprotein, das hauptsächlich von Leberzellen synthetisiert und sezerniert wird und mit einer hohen Hb Affinität eine wichtige Rolle im Kreislauf spielt (51). Es ist für die schnelle Beseitigung von azellulärem Hb aus dem Blutkreislauf verantwortlich und bildet mit den β-Ketten von Hb einen Komplex, der dann von den Kupferzellen erkannt wird. Vermutlich kann es auch an die Hb-Moleküle auf der Oberfläche der HbMP binden, das vermieden werden sollte, um lange Zirkulationszeiten zu erreichen. Die Erreichbarkeit von Hämoglobin für Haptoglobin wird genauso untersucht wie zuvor beschrieben. Gepooltes humanes Plasma wird zu einer Konzentration von 2.5µg/ml HP zu 1ml Partikelsuspension hinzugefügt. Anschließend wird APC-konjugierte Kaninchen polyklonale Antikörper (sekundäre Antikörper) zu einer Konzentration von 1µg/ml zu humanes Haptoglobin (HP Antikörper) hinzugefügt und mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert (61).

4.7 Toxizitätsbestimmungen

4.7.1 *Reaktive-Sauerstoffspezies*

Die Bestimmung von entstehenden Reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species ROS) wurde mithilfe von Cor.4U-Zellen (geliefert als frische Zellen, die in Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen ausgesät wurden) der Firma Axiogenesis (Köln, Deutschland) durchgeführt. Nach Erhalt wurde das Medium jeder Einheit komplett durch frisches Medium ersetzt, damit die Zellen sich regenerieren können. Am Folgetag wurden die Zellen entsprechend ihrer Zugehörigkeit, wie in Tabelle 1 gezeigt, inkubiert und in einem Inkubator (37°C und 5% CO₂) für 72h platziert. TBHP Ringer-

Acetat und HbMP-700 wurden durch Pipettieren von 20 µL der Stammlösung in das 200 µL Medium jeder Vertiefung zugegeben (60).

Gruppe	Näpfchenzahl	Anwendung (72h Experiment)	H ₂ DCFDA Anwendung	Dient als
1	10	Pure Cor.4U Zellen	-	Kontrollgruppe
2	10	Pure Cor.4U Zellen	+	Farbstoff Kontrollgruppe
3	10	10% Ringer Acetat	+	Vehikel Kontrollgruppe
4	10	500µM TBHP	+	Positiv-Kontrollgruppe
5	10	10% HbMP-700	+	Testgruppe

Tabelle 1: Testgruppen für den Reactive Oxygen Species (ROS) Produktionstest. Inkubation (37°C und 5% CO₂) für 72h (60).

Der ROS-empfindliche Farbstoff H₂DCFDA (50 µM) wurde so aufgetragen, dass das vorhandene Medium durch frisches Medium mit H₂DCFDA ersetzt wurde und damit die Zellmembran durchdringen konnte. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln, wurde das jeweilige Medium in jeder Vertiefung vollständig durch frisches Medium ersetzt, gefolgt von zwei Waschvorgängen mit frischem Medium. Die Fluoreszenzintensität wurde durch ein Live - Zellen - Bildgebungssystem unter Verwendung von Pherastar Multiplate Reader (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) gemessen. Um in der Lage zu sein, die resultierenden ROS-basierten Fluoreszenzintensitäten auf die Anzahl der lebenden Zellen in jeder Vertiefung zu beziehen, musste anschließend eine Lumineszenz Zelllebensfähigkeits-Assay durchgeführt werden. Die Intensität des Lumineszenz-signals, erfasst durch das Mikroplatten-Lesegerät war proportional zur Menge an ATP, das direkt proportional zur Anzahl der Zellen in den Vertiefungen war. Durch die Berechnung des Verhältnisses der ROS-basierten Fluoreszenz und ATP-basierten Lumineszenz ergab sich ein zellunabhängiger ROS-Spiegel (60).

4.7.2 *Gentoxizitätstests*

Zur Untersuchung des Gentoxizitätspotentials der HbMP-700 eignen sich die von der Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) anerkannten Tests.

- (1) Test Guideline No. 471 - Bacterial Reverse Mutation Test
- (2) Test Guideline No. 474 - Mammalian In-vivo Micronucleus Test
- (3) Test Guideline No. 476 – In-vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests

4.7.2.1 Ames Test

Die Mutagenität ist ein wichtiger Faktor zur Ermittlung der Toxizität. Dazu wird der Bacterial reverse mutation assay / Bakterien Rückmutationstest (Ames Test) verwendet. Im Ames Test werden aminosäurehaltige Stämme zum Nachweis von Punktmutationen genutzt, die das Ersetzen, Hinzufügen oder Löschen von ein oder mehreren DNA-Basenpaaren aufzeigen (52-54). Die HbMP-700 Suspension (20% v/v in Ringer-Acetat) wurde 20 min bei 10.000 X g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde durch 0,22µm Polyvinylidenfluorid (PVDF) -Filter filtriert. Der Überstand wurde auf sein Potenzial Genmutationen zu induzieren, gemäß des Platten-Inkorporationstests (Versuch I) und Vorinkubationstests (Versuch II) mit Salmonella typhimurium (S. typhimurium) Stämme TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 und Escherichia coli (E. coli) Teststamm WP2 uvrA, untersucht. Mikrosomale Leberfraktion mix S9 von männlichen Wistar-Ratten (Lot: 280613A, Protein Konzentration 33,6 mg / ml) wurde von BSL BIOSERVICE GmbH, Planegg, Deutschland bereitgestellt. Jeder Assay wurde mit und ohne Stoffwechselaktivierung durchgeführt. Die folgenden Mengen des Überstandes wurden in den Experimenten angewendet: 0,0316, 0,100, 0,316, 1,00, 2,5 und 5,0 µl pro Platte. Alle Konzentrationen und die Kontrollen wurden in zwei unabhängigen Experimenten in dreifacher Ausfertigung getestet. Für den Platten Inkorporationstest wurden die folgenden Materialien in einem Reagenzglas gemischt und über die Oberfläche einer minimal Agarplatte gegossen:

- 100 µl Testlösung bei jeder Dosisstufe, Lösungsmittel oder Negativkontrolle oder Referenzmutagenlösung (Positivkontrolle);
- 500 µl S9-Mix (zum Testen mit metabolischer Aktivierung) oder S9-Mischungssubstitutionspuffer (0,015 M KCl in 0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,4, zum Testen ohne metabolische Aktivierung);
- 100 µl Bakteriensuspension (ca. 10⁹ Zellen pro ml);
- 2000 µl Overlay Agar.

Der Mutationsfaktor wurde durch Teilen des Mittelwertes der Revertanzahl durch den Mittelwert der Lösungsmittelkontrolle berechnet (die exakten und nicht die gerundete Werte werden zur Berechnung verwendet). Eine Probe gilt als mutagen, wenn eine klare und dosisbezogene Erhöhung der Revertanzahl zu verzeichnen ist und/oder eine biologisch relevante positive Antwort, für mindestens eine der Dosisgruppen in mindestens einem Teststamm mit oder ohne Stoffwechselaktivierung, erkennbar wird. Ein biologisch relevanter Anstieg wird als positiv beurteilt, wenn in den Teststämmen TA 98, TA 100 und E.coli die Anzahl der Umkehrungen mindestens doppelt so hoch und/oder in Teststämmen TA 1535 und TA 1537 die Anzahl der Umkehrungen mindestens um das Dreifache höher ist, im Vergleich zur Umkehrrate der Lösungsmittelkontrolle (55,60).

4.7.2.2 Säugetier In-vivo Mikronukleus Test

Der Säugetier In-vivo Mikronukleus Test des HbMP-700 wurde in einem zertifizierten Unternehmen (BSL BIOSERVICE) durchgeführt. Die Einrichtung und die angewendeten Verfahren von BSL erfüllen die Anforderungen der Richtlinie 2010/63 / EU und der nationalen Gesetzgebung, definiert im Tierschutzgesetz (in der Fassung vom 22. September 2010) zum Schutz von Tieren für experimentelle und anderen wissenschaftlich verwendete Verfahren (57). Nach dem neunten Nachtrag gemäß den OECD-Richtlinien für die Prüfung von Chemikalien, Abschnitt 4, Nr. 474 „Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test“, umgesetzt am 21. Juli 1997 (58), wird in dieser Studie die Verwendung von Mäusen empfohlen. In dieser Studie wurde nur der Überstand des HbMP-700 Suspension getestet. Die Identität des Tests-Mediums (HbMP-700) wurde bei der Anlieferung in der Testeinrichtung geprüft. Der Überstand von HbMP-700 wurde wie folgt hergestellt: HbMP-700 wurde bei 10.000 X g für 20 min zentrifugiert, um die Partikel zu sedimentieren. Der Überstand von HbMP-700 wurde durch ein 0,22 µm PVDF-Filter filtriert und unverdünnt aufgetragen. Die Tiere (Mus Musculus, Stamm NMRI, jung, gesund, erwachsen, Charles River, 97633 Sulzfeld, Deutschland) stammen aus einem kontrollierten, Vollbarriere-gepflegten Zuchtsystem. Nach Artikel 9.2, Nr. 7 des Tierschutzgesetzes (59) wurden die Tiere zu Versuchszwecken gezüchtet und unterzogen sich einer angemessenen Akklimatisationszeit nach der Ankunft. Fünf Tiere jedes Geschlechts waren zufällig auf drei Testgruppen verteilt. Jedes Tier einer Testgruppe erhielt i.v. 10 mL/kg Körper Gewicht (KG) unverdünnten Überstand, in der negative Kontrollgruppe erhielten sie

i.v. 10 mL/kg Körpergewicht physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und in der Positivkontrollgruppe wurde 40 mg/kg KG Cyclophosphamid (CPA) gelöst in 10 mL/kg Körpergewicht physiologische Kochsalzlösung infundiert. Vor der Behandlung waren die Lösungen auf Raumtemperatur äquilibriert. Peripheres Blut der behandelten Tiere wurde 44h und 68h nach der einmaligen Gabe entnommen. Die relative PCE (rel. PCE = Anteil von polychromatische [unreife] Erythrozyten unter den gesamten Erythrozyten) wurde für jedes Tier bestimmt. Mindestens 10.000 unreife Erythrozyten pro Tier wurden ermittelt als Inzidenz mikronukleierter unreifer Erythrozyten (60).

4.7.2.3 Säugetierzellen Genmutationstest

(Thymidinkinase Locus / TK1 / 2) im Mauslymphom (ML) L5178Y Zellen

Um auf Genmutationen der Säugetierzellen zu testen, wurden Maus-Lymphom-L5178Y-Zellen von BSL BIOSERVICE bezogen. Dem Zellkulturmedium war RPMI mit 5% Pferdeserum, 100 U/100 µg/mL Penicillin/Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES und 2,5 µg/mL Amphotericin B ergänzt. Selektives Medium war ergänzt mit 20% Pferdeserum und 5 µg/mL TFT. Das Behandlungsmedium wurde als Negativkontrolle verwendet. Ethylmethansulfonat (EMS; 300 µg/mL) und Methylmethansulfonat (MMS; 10 µg/mL) wurden als Positivkontrolle in Assays ohne Stoffwechselaktivierung verwendet. Benzo[a]pyren (B[a]P; 2,5 µg/mL) diente als positive Kontrolle in den Tests mit Stoffwechselaktivierung. HbMP-700 Überstand (ohne und mit metabolischer Aktivierung) wurde bei 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400 und 500 µg/mL getestet. HbMP-700 wurde mit 10.000 X g für 20min zentrifugiert, um den Überstand zu erhalten. Der Überstand wurde durch einen 0,22 µm PVDF-Filter gefiltert. Die Experimente wurden auch mit einem exogenen metabolischen Aktivierungssystem durchgeführt (S9-Mix, siehe Ames Test oben), um In-vivo Bedingungen nachzuahmen. Abschließend betrug die Proteinkonzentration 0,75 µg/mL in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 mit 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 5 mM Glucose-6-phosphat und 5 mM NADP. Der Maus-Lymphom-Assay wurde gemäß den zuvor beschriebenen Empfehlungen durchgeführt und analysiert (56,60).

5 Ergebnisse

5.1 Morphologie

5.1.1 Atomkraftmikroskopie zur Darstellung des schwammartigen Verhaltens

Um die **Verformbarkeit** von HbMP-700 zu demonstrieren, wurden mehrere Partikel im trockenen und nassen Zustand mittels AFM gescannt (Abb. 1).

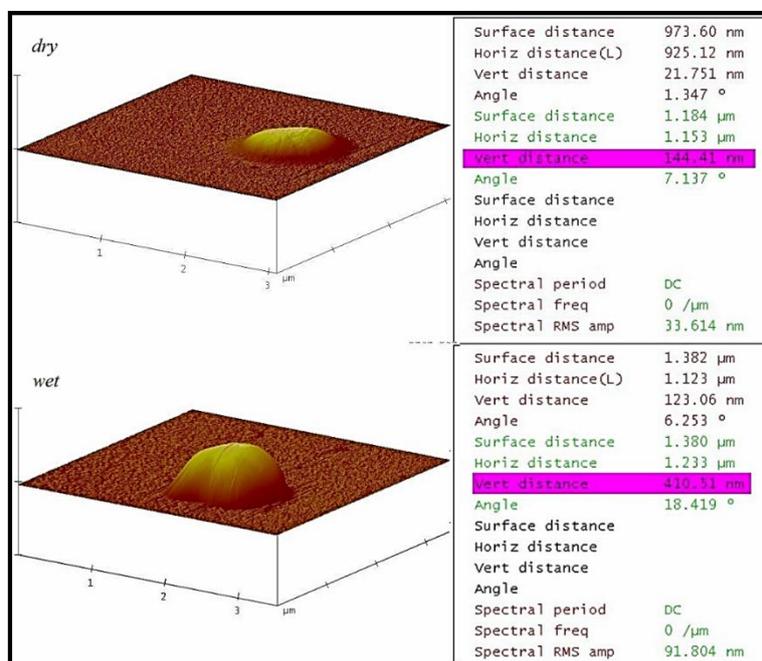


Abb. 1: AFM Bilder von HbMP-700 im trocknen und feuchten Zustand. Die Dicke der Partikel wird als vertikale Länge zwischen der Glimmer-Unterlage und dem obersten Punkt des Partikels definiert (60).

Die Partikel sind im feuchten Zustand erkennbar gequollen. Hier wurde die mittlere Dicke aus Scans von 10 Partikeln im trockenen Zustand mit 144 nm und im feuchten Zustand mit 410 nm bestimmt. Die fast dreifache Zunahme der Dicke lässt auf eine schwammartige Struktur der Partikel mit einem hohen Wassergehalt schließen (60).

5.1.2 TEM-Messung zur Morphologischen Darstellung von nicht modifizierten und modifizierten HbMP

Die untersuchten Partikel, HbMP, HSA-d-HbMP und HSA-t-HbMP besitzen eine erdnussartige Form. Im Vergleich zu den modifizierten Partikeln, weisen die unmodifizierten eine poröse Struktur auf. Die modifizierten Partikeln sind deutlich dichter und mit einer klar abgrenzbaren schwarzen Umrandung identifizierbar, was auf eine erfolgreiche Oberflächenmodifikation hindeutet (61) (Abb.2).

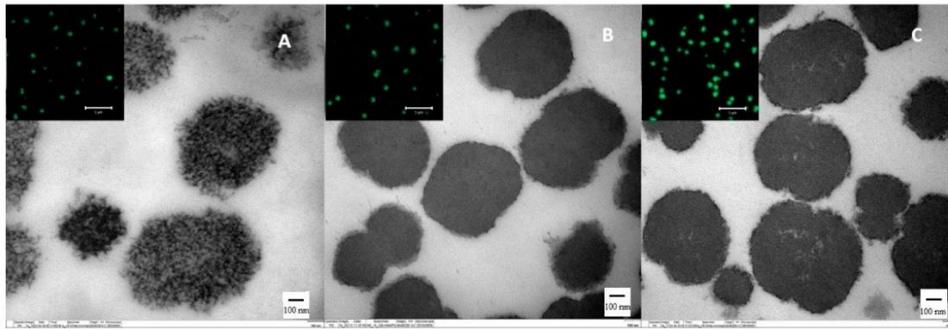


Abb. 2: Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Bilder (Maßstabeleiste 100nm). Konfokale Laserscanmikroskopische (CLSM) Bilder (integrierte Bilder) (Maßstabeleiste: 5µm) von unmodifiziertem HbMP (A), zweifach präzipitierte HbMP (HSA-d-HbMP) (B) und dreifach präzipitierte HbMP (HSA-t-HbMP) (C) (61).

5.2 CLSM-Untersuchung, Messung des hydrodynamischen Durchmessers und Zeta Potential Messung zur Darstellung der Stabilität der HbMP Suspension

5.2.1 CLSM-Untersuchung

Durch die Autofluoreszenz, verursacht durch die Protein Quervernetzung mit GA, war es möglich auch eine CLSM Messung der Partikel durchzuführen. In der Abbildung 2 ist erkennbar, dass es sich bei der Partikelsuspension um eine stabile Suspension handelt, die keine Aggregation verursacht. Der hydrodynamische Durchmesser der HbMP wurde mittels dynamischen Lichtstreuung ermittelt und er unterscheidet sich bei modifizierten HbMP nicht signifikant von dem der unmodifizierten HbMP. Dieser lag bei allen 7 Proben zwischen 0,7-1µm (61) (Abb.3A).

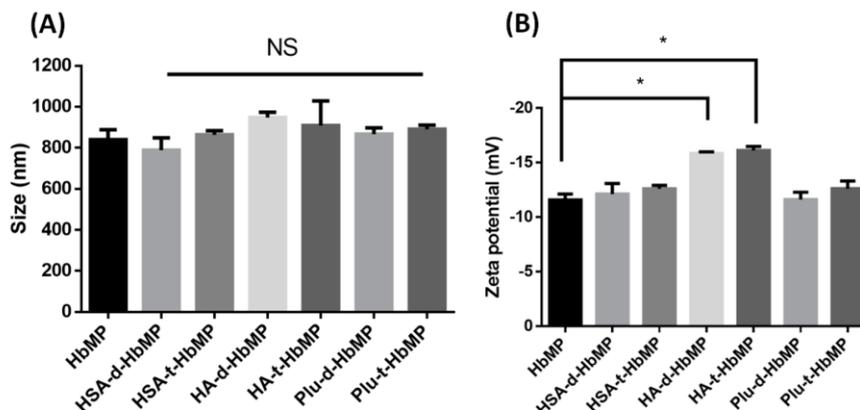


Abb. 3: Hydrodynamischer Durchmesser (A) und Zetapotential (B) der oberflächen-modifizierten HbMP. Die Daten sind abgebildet als arithmetische Mittel \pm SD (n=3). „NS“ deutet auf nicht signifikant hin. Die Asterisks deuten auf einen signifikanten Unterschied hin, bei dem Vergleich mit unmodifizierten HbMP (* $p < 0,05$) (61).

5.2.2 Zetapotential

Die Durchschnittswerte des Zetapotentials von allen oberflächenmodifizierten HbMP suspendiert in PBS waren negativ (HSA-d-HbMP, HSA-t-HbMP, Plu-d-HbMP, und Plu-t-HbMP lagen zwischen -11 bis -13 mV). Es konnte kein signifikanter Unterschied im Zetapotential zwischen HSA oder Plu verglichen mit unmodifizierten HbMP beobachtet werden ($p < 0.05$). Bei HA-d-HbMP bzw. HA-t-HbMP waren die Zetapotentiale um ca. 36-38% stärker negativ verglichen zu unmodifizierten HbMP (Abb 3B) (61).

5.3 Rheologie

Die Fließeigenschaften von menschlichem Blut sowie HbMP-700 Suspension wurden durch die Messung der Scheinviskosität bei einer Schergeschwindigkeit zwischen 0,1 und 100/s charakterisiert. Blut zeigt das typische thixotrope Verhalten. HbMP-700 zeigt ein rheologisches Fließverhalten ähnlich wie humanes Blut (Tab. 2) (60).

	Vollblut 40%	HbMP-700 40%
Schergeschwindigkeit [1/s]	Scheinviskosität [mPa·s]	Scheinviskosität [mPa·s]
1.1	53.0 ± 12.1	38.4 ± 0.7
12.7	15.1 ± 2.8	11.4 ± 0.5
143.8	6.1 ± 0.4	7.3 ± 0.0
1000.0	5.0 ± 0.1	6.2 ± 0.1

Tabelle 2: Die Scheinviskosität von Vollblut sowie HbMP-700 in Abhängigkeit der Schergeschwindigkeit. Volumenkonzentration 40 %, $T = 20 \pm 0.5^\circ\text{C}$, HbMP-700 resuspendiert in Plasma (Scheinviskosität $1.37 \pm 0.02 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) (60).

5.4 Sauerstoffaffinität

5.4.1 Ermittlung der Hämoglobinkonzentration

Es ist kein signifikanter Unterschied in der Hämoglobinkonzentration der oberflächenmodifizierten HbMP im Vergleich zu den unmodifizierten HbMP zu beobachten (35–40 mg/ml, bei 20% Hämatokrit (Hct) Anteil, $p\text{-Wert} < 0,05$) (Abb. 4A) (61).

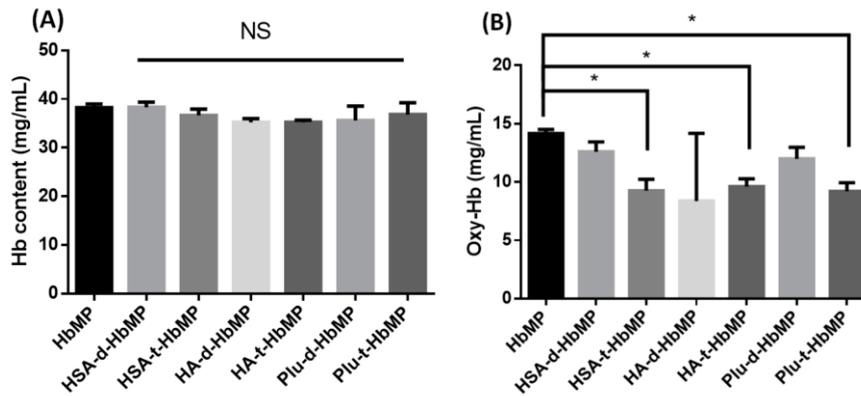


Abb. 4: Die Hämoglobinkonzentration (A) und die Konzentration des oxygenierten Hämoglobin (B) auf der Oberfläche der HbMP wurde berechnet für eine Suspension mit 20% Hct Anteil. Die Daten sind abgebildet als arithmetische Mittel \pm SD (n=3). „NS“ deutet auf nicht signifikant hin. Die Asterisks deuten auf einen signifikanten Unterschied hin, bei dem Vergleich mit unmodifizierten HbMP (* $p < 0,05$) (61).

5.4.2 Ermittlung der oxygenierten HbMP

Die Untersuchung der Oxy-Hb Konzentration aller Proben hat einen Konzentrationsbereich zwischen 9 und 12mg/ml ergeben (Abb 4B). Die zweifach präzipitierten HbMP (HSA-d-HbMP, HA-d-HbMP und Plu-d-HbMP) erreichten einen leicht aber nicht signifikant reduzierten Oxy-Hb Anteil im Vergleich zu den unmodifizierten HbMP. Die Oxy-Hb Konzentration der dreifach präzipitierten HbMP sind jedoch im Vergleich zu den unmodifizierten HbMP signifikant reduziert (HSA-t-HbMP(33%), HA-t-HbMP(32%) und Plu-t-HbMP(35%)) (61).

5.4.3 Sauerstoffaffinitätsmessung mithilfe des HEMOX Analysegerätes

Die Charakterisierung der Funktionalität der HbMP-700 wurde mittels der Sauerstoff-Dissoziationskurve sowie des p50 Wert ermittelt. Die Kooperativität, charakterisiert durch den Hill-Faktor, von Hb für Sauerstoff war für HbMP-700 (1,50) niedriger als für freies Hb (1,92) aufgrund der Vernetzung von Hb. Dennoch war die Kooperativität noch vorhanden. Die Sauerstoffaffinität von HbMP-700 im Vergleich zu Rinder-Hb, quantifiziert durch den p50-Wert, lag mit 10,17 mmHg für HbMP-700 bei etwa der Hälfte des freien Rindes Hb mit 23,33 mmHg (60).

5.5 Immunogenität und Zirkulationszeit

5.5.1 Bindung von Anti-Hb Antikörper an oberflächenmodifizierte HbMP

Die Ergebnisse zeigen einen geringen Anteil an unspezifischen Bindungen (5-10%), während die Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben nicht signifikant

sind (Abb.5). Der Anteil an spezifischen anti-Hb Antikörper Bindungen bei den unmodifizierten HbMP ist mit ca.80% und bei HSA-d-HbMP mit ca.70% relativ hoch. Dabei gibt es keinen signifikanten Unterschied.

Bei der zweifachen Präzipitation (HA-d-HbMP und Plu-d-HbMP) ist die spezifische Bindung im Vergleich zu unmodifizierten HbMP um 36% bzw. 33% signifikant reduziert. Die dreifach präzipitierten HbMP (HSA-t-HbMP, HA-t-HbMP und Plu-t-HbMP) zeigen eine verringerte spezifische anti-Hb Antikörper Bindung im Vergleich zu unmodifizierten HbMP um 54%, 56% bzw. 67%.

Die Werte der Fluoreszenzintensität aller modifizierten HbMP liegen niedriger als die der unmodifizierten HbMP. Die Abbildungen 5C-E zeigen die Fluoreszenz Verteilungen der HbMP, HSA-d-HbMP und HSA-t-HbMP Proben (61).

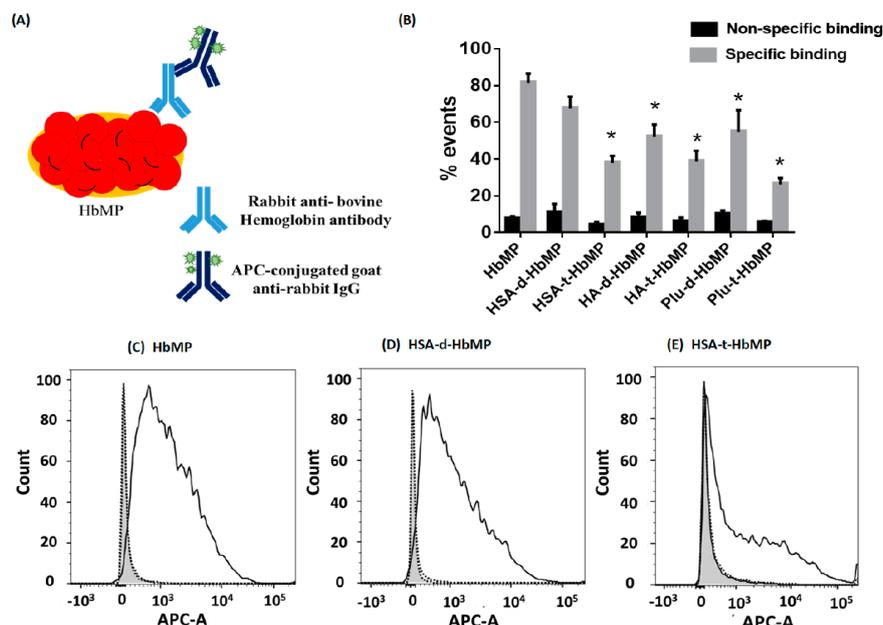


Abb. 5: Immunofluoreszenz Assay mit Kanninchen anti-Rinder-Hb Antikörper.

(A) Schematische Darstellung der indirekten Immunofluoreszenz Färbung durch anti-Hb Antikörper. (B) Die % positiven Ereignisse der nicht-spezifischen und spezifischen anti-Hb Antikörper Bindung an den jeweiligen oberflächenmodifizierten HbMP. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel \pm SD und die Asterisks geben die Signifikanz des Unterschiedes bei dem Vergleich zu unmodifizierten HbMP (* $p < 0.05$). Die Histogramme zeigen Beispiele der durchflusszytometrischen Analyse der anti-Hb Antikörper Bindung an HbMP (C), HSA-d-HbMP (D) und HSA-t-HbMP (E). Die grauen Bereiche repräsentieren die Histogramme der Partikel die keine Antikörper ausgesetzt waren. Die gestrichelten Linien sind Histogramme der Partikel mit nur sekundärer Antikörper Färbung als nicht-spezifische Bindungen. Die durchgezogenen Linien sind Histogramme der Partikel mit primärer und sekundärer Antikörper Färbung als totale Bindung (61).

5.5.2 Bindung von IgG an oberflächenmodifizierte HbMP

Modifizierte HbMP zeigen eine signifikante Verringerung der spezifischen Bindung um ca. 80-95% im Vergleich zu den unmodifizierten HbMP.

Die Werte der Fluoreszenzintensität aller modifizierten HbMP liegen niedriger als die der unmodifizierten HbMP. Die Abbildungen 6C-E zeigen die Fluoreszenz Verteilungen der HbMP, HSA-d-HbMP und HSA-t-HbMP Proben (61).

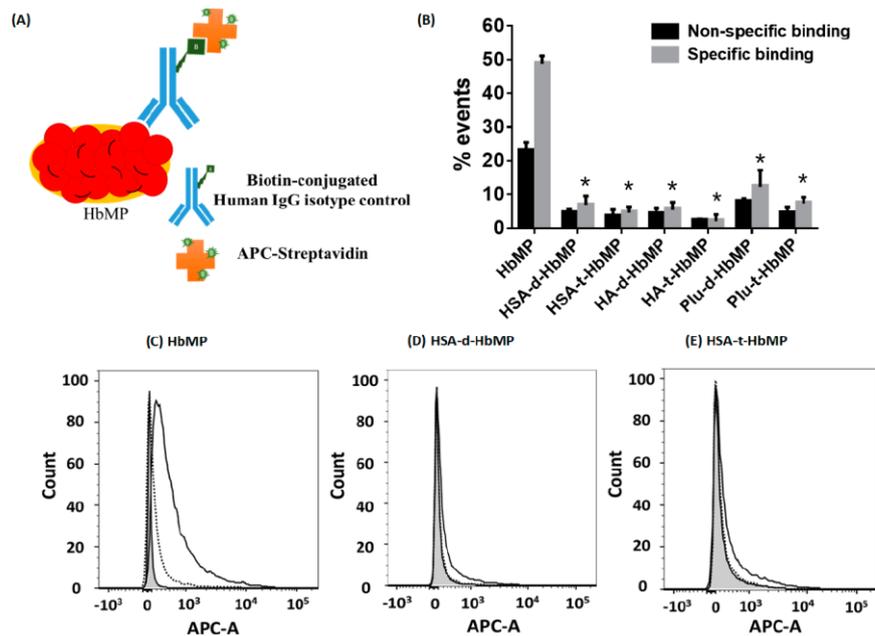


Abb. 6: Immunofluoreszenz Assay der IgG (biotinyliert) Bindung an oberflächenmodifizierten HbMP. (A) Schematische Darstellung der Immunofluoreszenz Färbung durch APC-Streptavidin. (B) Die % positiven Ereignisse der nicht-spezifischen und spezifischen APC-Streptavidin Bindung an den jeweiligen oberflächenmodifizierten HbMP. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel \pm SD und die Asterisks geben die Signifikanz des Unterschiedes bei dem Vergleich zu unmodifizierten HbMP (* $p < 0.05$). Die Histogramme zeigen Beispiele der durchflusszytometrischen Analyse der APC-Streptavidin Bindung an HbMP (C), HSA-d-HbMP (D) und HSA-t-HbMP (E). Die grauen Bereiche repräsentieren die Histogramme der Partikel die keine Antikörper ausgesetzt waren. Die gestrichelten Linien sind Histogramme der Partikel mit nur APC-Streptavidin Färbung als nicht-spezifische Bindungen. Die durchgezogenen Linien sind Histogramme der Partikel mit biotinylierter IgG und APC-Streptavidin Färbung als totale Bindung (61).

5.5.3 Bindung von Haptoglobin an oberflächenmodifizierte HbMP

Modifizierte HbMP zeigen eine signifikante Verringerung der spezifischen Bindung um ca. 80-95% im Vergleich zu unmodifizierter HbMP. Die Werte der Fluoreszenzintensität aller modifizierten HbMP liegen niedriger als die der unmodifizierten HbMP. Die

Abbildungen 7C-E zeigen die Fluoreszenz Verteilungen der HbMP, HSA-d-HbMP und HSA-t-HbMP Proben (61).

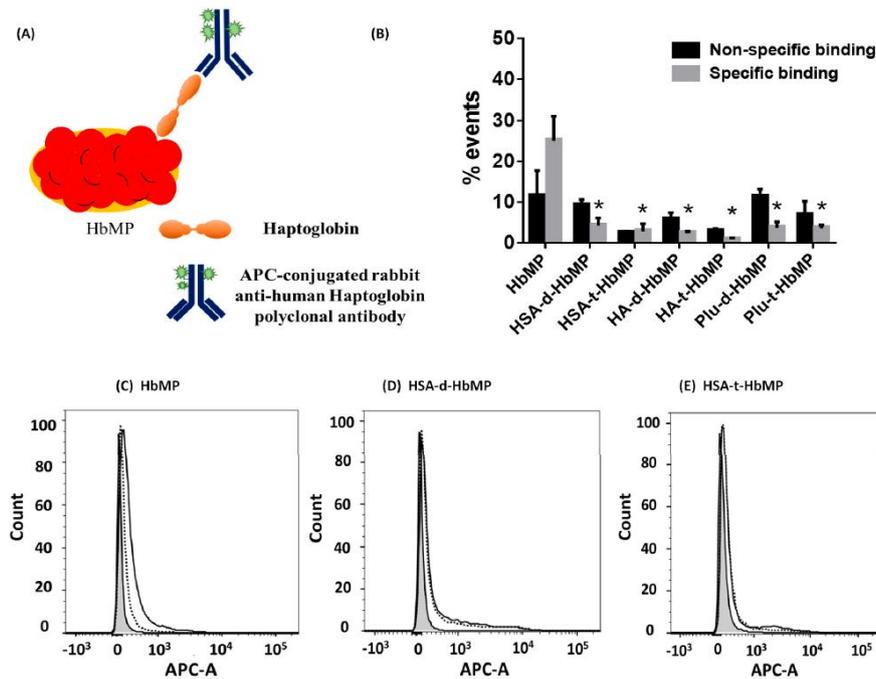


Abb. 7.: Immunofluoreszenz assay der Haptoglobin (HP) Bindung an oberflächenmodifizierte HbMP. (A) Schematische Darstellung der Immunofluoreszenz Färbung. (B) Die % positiven Ereignisse der nicht-spezifischen und spezifischen anti-HP Antikörper Bindung an den jeweiligen oberflächenmodifizierten HbMP. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel \pm SD und die Asterisks geben die Signifikanz des Unterschiedes bei dem Vergleich zu unmodifizierten HbMP (* $p < 0.05$). Die Histogramme zeigen Beispiele der flowzytometrischen Analyse der anti-HP Antikörper Bindung an HbMP (C), HSA-d-HbMP (D) und HSA-t-HbMP (E). Die grauen Bereiche repräsentieren die Histogramme der Partikel denen keine Antikörper ausgesetzt waren. Die gestrichelten Linien sind Histogramme der Partikel mit nur anti-HP Antikörper Färbung als nicht-spezifische Bindungen. Die durchgehenden Linien sind Histogramme der Partikel mit HP und anti-HP Antikörper Färbung als totale Bindung (61).

5.6 Toxizitätsbestimmungen

5.6.1 Reaktive-Sauerstoffspezies

In einem Vortest wurden Cor.4U-Kardiomyozyten auf MEA-Chips (Microelectrode Array) kultiviert und 72 h mit 10% HbMP-700 inkubiert, um ROS-unabhängige Effekte oder Schäden der Cor.4U-Kardiomyozyten durch HbMP-700 auszuschließen und ihre Lebensfähigkeit zu überprüfen. Die MEA-Technologie ermöglicht die nichtinvasive extrazelluläre Aufzeichnung von Aktionspotentialen von ausgesäten Zellen. Um die Lebensfähigkeit der Zellen zu überprüfen, wurden optische Inspektionen und

Aufzeichnungen der Feldaktionspotentiale nach Inkubationszeiten von 24, 48 und 72 h durchgeführt. Nach dieser Inkubationszeit waren die Zellen für die, für den Zelltyp typische, Form normal. Alle Zellen waren spontan aktiv und es wurden koordinierte Kontraktionen des gesamten Syncytiums beobachtet, die sich nicht von denen un behandelter Cor.4U-Kardiomyozyten unterschieden. Im ROS-Assay repräsentierte das in der Blindkontrollgruppe beobachtete Fluoreszenzniveau den zellulären Fluoreszenzhintergrund und die Fluoreszenzintensität der Farbstoffkontrollgruppe repräsentierte das Basis-ROS-Niveau. Die ROS-basierten Fluoreszenzintensitätswerte jeder Gruppe wurden durch die entsprechenden ATP-basierten Lumineszenzintensitätswerte, die mittels des Lumineszenzzellebensfähigkeitstests erhalten wurden, normalisiert (Abb. 8) (60).

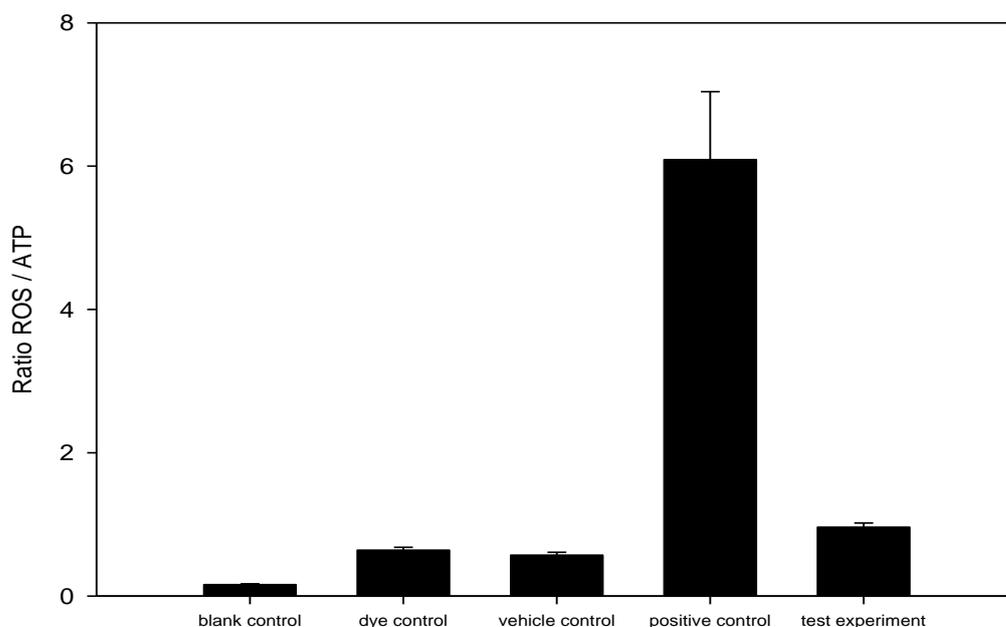


Abb. 8: ROS Produktion dargestellt als ROS-basierter Fluoreszenzintensität normalisiert mit ATP-basierter Lumineszenzintensität (60).

Die Verhältnswerte der ROS-basierten Fluoreszenz und der ATP-basierten Lumineszenz der Farbstoffkontrollgruppe, die das Hintergrundniveau darstellt, unterschieden sich nicht von den Werten der Vehikelkontrollgruppe. Die hohen Verhältnswerte der positiven Kontrollgruppe zeigten eine ausgeprägte ROS-Produktion an. Eine geringe Anzahl von (in den Vertiefungen verbleibenden) Zellen exprimierte eine sehr hohe Fluoreszenz auf ROS-Basis. Die Verhältnswerte der Testversuchsgruppe waren leicht erhöht im Vergleich zu denen der Farbstoffkontrollgruppe, jedoch viel niedriger als diejenigen der TBHP-Werte (60).

5.6.2 *Gentoxizitätstests*

5.6.2.1 *Ames Test*

Es konnte kein Sediment des Testgegenstands in irgendeinem Teststamm in Experiment I und II (mit und ohne metabolische Aktivierung) beobachtet werden. In keinem der fünf Teststämme, die bis zur höchsten Dosisgruppe (die mit und ohne metabolische Aktivierung in Experiment I und II bewertet wurde) verwendet wurden, wurden toxische Wirkungen des Testgegenstands festgestellt (Abb. 9a, b) (60).

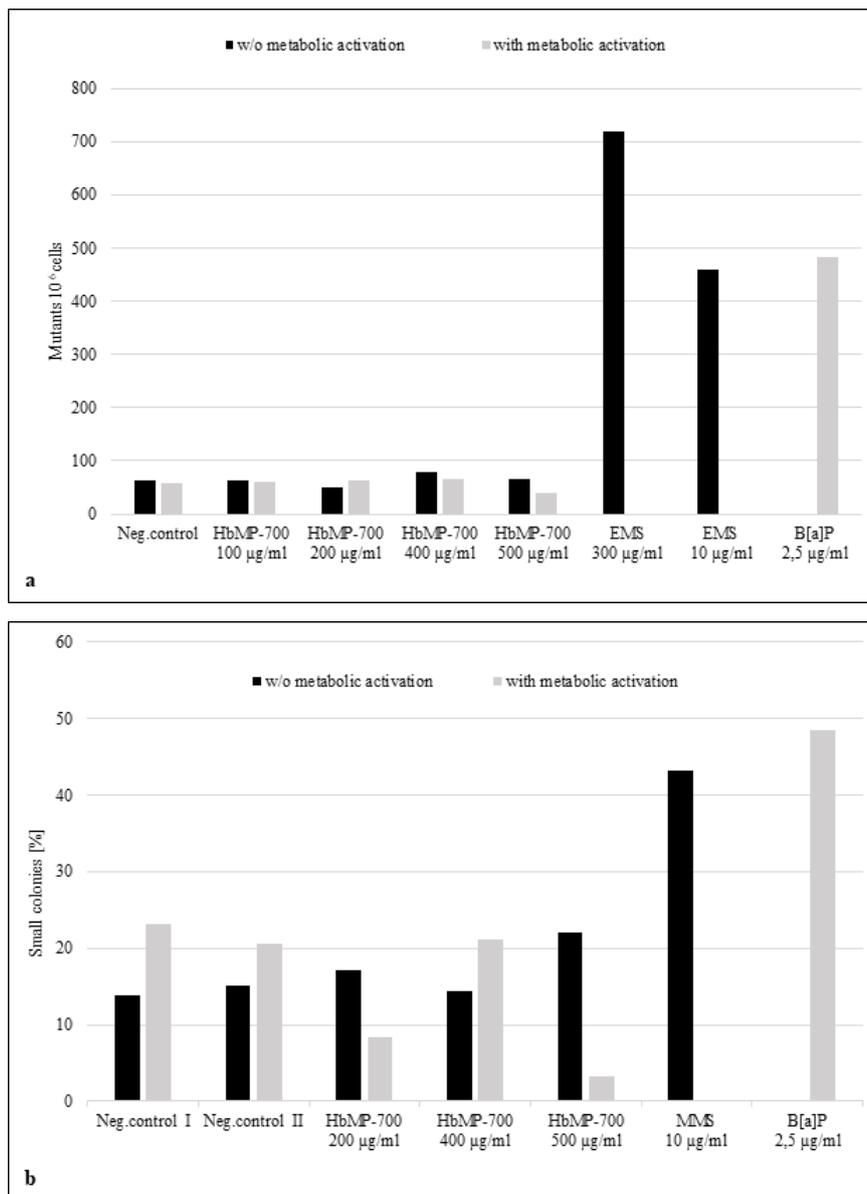


Abb. 9: a) Mutantenfrequenz von HbMP-700-Überstand im Vergleich zur Negativ- und Positivkontrolle (60). b) Prozent kleiner Kolonien. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Mann-Whitney Tests berechnet (60).

Nach der Behandlung mit HbMP-700 (Überstand) wurde bei keiner Konzentration ein biologisch relevanter Anstieg der Anzahl der revertanten Kolonien bei einem der fünf Teststämme beobachtet, weder in Gegenwart noch in Abwesenheit einer metabolischen Aktivierung in Experiment I und II. Die Referenzmutagene induzierten einen deutlichen Anstieg der revertanten Kolonien, was auf die Gültigkeit der Experimente hinweist. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass während der beschriebenen Mutagenitätstests und unter den angegebenen experimentellen Bedingungen, HbMP-700 (Überstand) keine Genmutationen durch Basenpaaränderungen oder Frameshifts im Genom der verwendeten Teststämme verursachte. Daher ist HbMP-700 (Überstand) in diesem bakteriellen Umkehrmutationstest nicht mutagen (60).

5.6.2.2 Säugetier In-vivo Mikronukleus Test

Dieser In-vivo Test wird zum Nachweis von Schäden verwendet, die durch Testsubstanzen an den Chromosomen oder am mitotischen Apparat von Erythroblasten verursacht werden. Der Test ist besonders relevant für die Beurteilung des mutagenen Risikos unter Berücksichtigung von Faktoren des In-vivo Metabolismus, der Pharmakokinetik und der DNA-Reparaturprozesse. Es identifiziert Substanzen, die zytogenetische Schäden verursachen, die zur Bildung von Mikrokernen führen, die ein Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen enthalten. Wenn sich ein Knochenmark-Erythroblast zu einem polychromatischen Erythrozyten (PCE) entwickelt, wird der Hauptkern extrudiert. Jeder gebildete Mikronukleus kann ansonsten im entkernten Zytoplasma zurückbleiben. Das Knochenmark von Nagetieren wird in diesem Test routinemäßig verwendet. Die Messung von mikronukleierten, unreifen, polychromatischen Erythrozyten im peripheren Blut ist gleichermaßen akzeptabel, da die Milz von Mäusen nicht in der Lage ist, mikronukleierte Erythrozyten zu entfernen. 10 mL/kg KG des Überstands von HbMP-700 wurden im Experiment als maximal tolerierbare Dosis (1 MTD) getestet. Während der Behandlung wurde keine Toxizität beobachtet. Innerhalb von 4 h nach der Anwendung wurden keine klinischen Anzeichen einer Toxizität beobachtet (60). Die für die 44-h-Negativkontrolle angegebenen Mittelwerte betragen 1,75% (männliche Mäuse) und 1,52% (weibliche Mäuse). Die für die 68-h-Negativkontrolle nachgewiesenen Mittelwerte betragen 2,44% (männliche Mäuse) und 2,47% (weibliche Mäuse). Die Tiere, die 1 MTD (44 h Behandlung) erhielten, zeigten

Mittelwerte von 1,90% (männliche Mäuse) und 1,80% (weibliche Mäuse). Mindestens 10.000 unreife Erythrozyten pro Tier wurden hinsichtlich der Inzidenz von mikrokernhaltigen unreifen Erythrozyten bewertet. Die ausgewerteten Negativkontrollen (44 und 68 h) lagen im Bereich der historischen Kontrolldaten der Negativkontrolle (0,10–0,34%). Die Mittelwerte der für die Negativkontrolle (44 h) beobachteten Mikrokernwerte betragen 0,20% (männliche Mäuse) und 0,27% (weibliche Mäuse).

Die Mittelwerte der Negativkontrolle (68 h) betragen 0,13% (männliche Mäuse) und 0,21% (weibliche Mäuse). Intraperitoneal verabreichtes CPA (40 mg / kg bm) wurde als positive Kontrolle verwendet, die einen statistisch signifikanten Anstieg der Mikronukleusfrequenz induzierte (der mittlere Prozentsatz der Zellen mit Mikrokernen betrug 2,06% für männliche und 1,29% für weibliche Mäuse). Der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test wurde durchgeführt, um die Ergebnisse zu verifizieren. In den Dosisgruppen des bewerteten Testobjekts wurden keine statistisch signifikanten Anstiege ($P < 0,05$) von Zellen mit Mikrokernen festgestellt, mit Ausnahme des für die männliche Gruppe beobachteten Wertes (68 h). Diese Gruppe war im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle signifikant erhöht. Der Wert lag jedoch im Bereich der historischen Negativkontrolldaten. Aufgrund dieser Daten wurde dieser Anstieg als nicht biologisch relevant angesehen (60).

5.6.2.3 Säugetierzellen Genmutationstest

(Thymidinkinase Locus / TK1 / 2) im Mauslymphom (ML) L5178Y Zellen

Der Thymidinkinase (TK) -Test wurde verwendet, um das mutagene und klastogene Potential des HbMP-700-Überstands unter Verwendung der Maus-Lymphomzelllinie L5178Y zu bestimmen. Das Assay erkennt Mutationen am TK-Locus (TK1 / 2 bis TK2 / 2) aufgrund verschiedener genetischer Veränderungen wie Basenpaaränderungen, Frame-Shift-Mutationen und kleiner und großer nichtletaler Deletionen des relevanten Chromosoms (62-65). TK-exprimierende Zellen enthalten das Pyrimidinanalogon Trifluorthymidin (TFT), was aufgrund einer Hemmung des Zellstoffwechsels zum Zelltod führt. Im Gegensatz dazu wachsen Zellen, denen TK-Mutanten fehlen, in Gegenwart des selektiven Mittels TFT. Diese Zellen synthetisieren Nucleotide de novo für den Zellstoffwechsel. Die Mutagenität des HbMP-700-Überstands wird durch die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien in selektivem Medium bestimmt. Das Aussäen einer definierten Anzahl von Zellen in selektives Medium zum Nachweis von Mutanten

und in nicht selektives Medium zur Bestimmung der Klonierungseffizienz ermöglicht die Bestimmung der Mutantenfrequenz. Die Kolonie-Dimensionierung ermöglicht den Nachweis klastogener Effekte wie Deletion, Addition oder Umlagerung von Chromosomenabschnitten. Das Auftreten kleiner Kolonien ist ein Hinweis auf klastogene Eigenschaften. Kleine Kolonien bilden sich aufgrund des langsamen Wachstums und/oder der morphologischen Veränderung der Zellen. Die Mutantenfrequenz wird bestimmt nach Zellzahlen in selektivem Medium im Vergleich zu Zellzahlen in nicht selektivem Medium.

Zusammenfassend zeigt der Überstand von HbMP-700 keine mutagene Wirkung auf den TK-Locus in der Maus-Lymphomzelllinie L5178Y. Der IMF ist unabhängig von der HbMP-700-Überstandskonzentration und mit dem IMF der Negativkontrollen vergleichbar. Abb. 9a, b zeigen vergleichbare Mutantenfrequenzen der Negativkontrolle und unterschiedliche HbMP-700-Überstandskonzentrationen. Positive Kontrollen zeigen einen signifikanten Anstieg der Mutantenfrequenz. Für die statistische Analyse wurde der Mann-Whitney-Test zur Berechnung der statistischen Signifikanz bei 5% ($P < 0,05$) verwendet (60).

6 Diskussion

Der in der Transfusionsmedizin gegenwärtige Einsatz von menschlichem Blut in Form von z.B. Erythrozytenkonzentraten weist Einschränkungen wie eine begrenzte Haltbarkeit von Blutprodukten, Risiko durch Übertragung von Krankheiten, Immunmodulation, Risiko hämolytischer Transfusionsreaktionen und lagerlogistische Einschränkungen auf (66,67). Die Verwendung von unmodifiziertem, stromafreiem Hämoglobin als Blutersatz ist aufgrund von schwerwiegenden Problematiken wie z.B. der kurzen Zirkulationszeit In-vivo, der hohen Nephrotoxizität und der Eigenschaft, eine hohe Affinität zu Stickoxid (NO) zu besitzen und die damit verbundene Vasokonstriktion und Bluthochdruck zu verursachen, ungeeignet (68,69).

HBOCs der früheren Generation wie intramolekular vernetztes Diaspirin-Hb (DCLHb) und schwach polymerisiertes Hämoglobin (wie z.B. Hemopure, PolyHeme) weisen eine verlängerte intravasale Retentionszeit auf. Dies verursacht eine erhebliche Hypertonie durch NO-Spülung und/oder ein Sauerstoffüberangebot in den präkapillären Arteriolen, was Vasokonstriktionen zur Folge hat (66,67,70-72).

Viele Wissenschaftler haben in den letzten 30 Jahren intensiv an der Modifikation von Hämoglobin, basierend auf intra- und intermolekularer Vernetzung oder Einkapselung, gearbeitet, um eine geeignete neue HBOC Generation herzustellen (44).

Bäumler et al. 2014 ist es gelungen, eine neue Generation Hämoglobin basierte Mikropartikel (HbMP-700) mit einer Partikelgröße von etwa 700 nm (liegt zwischen 100 und 1000 nm) und einer nahezu gleichmäßigen Morphologie, mit hoher Sauerstoffaffinität und geringer Immunogenität unter Verwendung einer neuartigen, hochwirksamen und einfachen Copräzipitations-Technik zu entwickeln (73).

HbMP-700 erwiesen sich in den Biokompatibilitäts-/Toxizitätstests als sehr vielversprechend. Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen dem menschlichen Vollblut ähnliche Charakteristiken, die für die Biokompatibilität relevant sind.

Um die Verformbarkeit von HbMP-700 zu bestätigen wurden HbMP-700 Partikel mittels AFM im trockenen und nassen Zustand, im 3D-Modus, gescannt (Abb.1). Es ist deutlich zu erkennen, dass das HbMP-700-Partikel im nassen Zustand geschwollen ist. Die mittlere Dicke von 10 Partikeln ergab im trockenen Zustand 144 nm und im nassen Zustand 410 nm. Die Ergebnisse bestätigen damit die Verformbarkeit von HbMP-700-Partikeln, die fast eine dreifache Zunahme der Dicke zeigten. Dies gilt als Beweis für eine schwammartige Struktur der HbMP-700-Partikel und impliziert eine hohe Verformbarkeit, was sicherlich die Scherverdünnung bei hohen Schergeschwindigkeiten ermöglicht (74).

Aufgrund ihrer Größe können die HbMP-700-Partikel nicht in den Zwischenraum zwischen den Endothelzellen und den vaskulären glatten Muskelzellen extravasieren. Daher können die HbMP nur eine begrenzte abfangende Wirkung auf das Vasodilatationsmittel Stickoxid haben. Zusätzlich werden die HbMP aufgrund ihrer hohen Sauerstoffaffinität den Sauerstoff in den präkapillären Arteriolen nicht vorzeitig freisetzen. Wir können also erwarten, dass HbMP-700 keine Vasokonstriktion verursachen (42, 43).

Die erfolgreiche Oberflächenmodifikation der Partikel konnte mithilfe des TEM dargestellt werden. Trotz der mehrfachen Präzipitation blieben die erhaltenen Partikel im gleichen Größenbereich wie die unmodifizierten HbMP. Dies kann durch die eher poröse Struktur der ursprünglich unmodifizierten HbMP erklärt werden, die durch die mehrfache Präzipitation und Quervernetzung eine dichtere Morphologie mit klar abgrenzbarer Umrandung bewirkt. Dabei bleibt die typische erdnussähnliche Form jedoch erhalten. (Abb.2) (61).

Die gleichmäßige Größenverteilung spielt bei der Stabilität der Suspension eine wichtige Rolle. Bei der ermittelten Größenverteilung besteht ein niedriger Polydispersitätsindex von $PDI < 0,3$ (Abb. 3A). Dies beschreibt eine geringe Größenverteilung und deutet auf die Abwesenheit von Aggregationen hin. Die Zetapotentialmessung hat ergeben, dass nur bei HA-d-HbMP bzw. HA-t-HbMP die Werte viel stärker negativ (um ca. 36-38%) waren verglichen mit unmodifizierten HbMP. Dies deutet auf die Bindung des stark negativ geladenen polysaccharids HA an der Oberfläche hin (61).

Das Fließverhalten von menschlichem Vollblut und von HbMP-700 Suspension wurden bei Messungen der Scheinviskosität in dem Schergeschwindigkeitsbereich zwischen 0,1 und 1000/s charakterisiert. Das Vollblut zeigt das typische thixotrope Verhalten. Die Scherverdünnung bei hohen Schergeschwindigkeiten korreliert mit der Verformbarkeit von Erythrozyten und ihre Ausrichtung im Scherfeld. Bei niedrigen Schergeschwindigkeiten nimmt die Scheinviskosität durch die Aggregation von Erythrozyten zu (75,7676). HbMP-700 Suspension zeigt ein rheologisches Fließverhalten ähnlich wie Vollblut. Die gemessene Scheinviskosität der HbMP-700-Suspension nimmt mit zunehmender Schergeschwindigkeit ab. Bei einer Schergeschwindigkeit von 1000/s lag die Scheinviskosität um 1–1,4 mPas höher als die Scheinviskosität des Vollbluts. Die Scherverdünnung bei hohen Schergeschwindigkeiten in der HbMP-700-Suspension in Blutplasma kann durch die Partikelorientierung im Scherfeld und durch die Verformbarkeit erklärt werden, da HbMP-700 nicht kugelförmig sind, sondern eine erdnussartige Form besitzen (61). Der Anstieg der Scheinviskosität der HbMP-700-Suspension bei niedrigen Schergeschwindigkeiten kann jedoch nicht durch die Bildung von Aggregaten erklärt werden, da keine Aggregation in ruhenden Suspensionen beobachtet wurde. Es ist daher möglich anzunehmen, dass die erhöhte Scheinviskosität der HbMP-Suspension bei niedrigen Schergeschwindigkeiten auf Reibung, die durch die Kollision einer vergleichsweise hohen Anzahl von Partikeln in der HbMP- Suspension zustande kommt, zurückzuführen ist. Denn in einer Suspension zeigen Partikel eine ungerichtete, thermische Molekularbewegung (Brownsche Bewegung), durch welche sie in die angrenzenden Schichten übergehen und dort mit anderen Partikeln kollidieren können. Wenn diese sogenannte Relativbewegung geringer ist, dringen die Partikel tiefer in die angrenzenden Schichten ein, wobei es zu erhöhter Wechselwirkung bzw. Kollisionen kommt, was wiederum eine erhöhte Scheinviskosität

zur Folge hat. Außerdem führt diese Impulsbewegung zu einer stärkeren Querbewegung, wobei das Eindringen in die angrenzenden Schichten weiter verstärkt wird. Bei erhöhter Relativgeschwindigkeit der Partikel dringen diese nicht mehr so tief in die angrenzenden Schichten ein. Es kommt hier nur noch zu flachen Kollisionen mit geringerem Impulsaustausch was wiederum eine geringere Scheinviskosität zur Folge hat. Flüssigkeiten, die das Nicht-Newtonsche Fließverhalten aufweisen, verflüssigen sich mit steigender Schergeschwindigkeit (77).

Da der Sauerstofftransport die wesentliche Funktion der HbMP darstellt, ist die Ermittlung der Hämoglobinkonzentration auch bei den modifizierten HbMP essenziell. Die Oberflächenmodifikation der Partikel verursachte keine signifikante Reduktion der Hämoglobinkonzentration (61). Der Gehalt an funktionellem Hb (Oxy-Hb) der oberflächenmodifizierten HbMP war aufgrund einer erhöhten Anzahl von Präzipitation und zusätzlichen GA-Vernetzungsschritten leicht verringert, was zu einer partiellen Oxidation von Hb bzw. das enthaltene Fe^{2+} zu MetHb bzw. das enthaltene Fe^{3+} führte (44,78). Dieses Hindernis könnte vermieden werden, indem während der Herstellung Antioxidantien eingesetzt werden oder die Herstellung unter der Abwesenheit von Sauerstoff durchgeführt wird (61). Die Sauerstoffaffinität der HbMP-700-Partikel und der p_{50} Wert wurden mittels der Sauerstoff-Dissoziationskurve ermittelt. Die Affinität für HbMP-700 Partikel (1,50) war aufgrund der Vernetzung niedriger als die für freies Rinder-Hb (1,92). Die Sauerstoffaffinität von HbMP-700 Partikel im Vergleich zu Rinder-Hb wurde mithilfe von p_{50} -Wert quantifiziert. Bei HbMP-700 ($p_{50}=10,17$ mmHg) beträgt der Wert ungefähr ein Drittel der von freiem Rinder-Hb ($p_{50}=23,33$ mmHg) (79) was die höhere Affinität für Sauerstoff belegt. Eine hohe Sauerstoffaffinität (niedriger Sauerstoffhalbsättigungsdruck p_{50}) ist eine der wichtigsten Eigenschaften der neuen Generation der oben erwähnten HBOCs. Die Eigenschaft ist essenziell, um eine Vasokonstriktion durch Sauerstoffübersversorgung in den präkapillären Arteriolen zu vermeiden. Winslow schlägt einen p_{50} von 5-10mmHg für die neuen zellfreien HBOCs vor (39, 61).

Bei der Untersuchung der Immunogenität wurden verschiedene Immunfluoreszenz-Assays verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass unsere Oberflächenmodifikationstechnik effizient war, um die spezifische Bindung von Anti-Hb-Antikörpern, IgG und HP zu reduzieren. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch Oberflächenmodifikationen und zusätzliche Präzipitationen, insbesondere durch die Dreifachpräzipitation, das Hämoglobin mehr abgeschirmt wird und die Erkennung

durch das Immunsystems reduziert ist. Diese Resultate können nützlich sein, um eine längere Halbwertszeit von HbMP im Kreislauf vorherzusagen (61).

Die spontane Oxidation von Fe^{2+} im Hämoglobin findet in Erythrozyten statt und wird durch das metHb-Reduktase-System kontrolliert. Wenn sich aber das Hämoglobin frei außerhalb der Erythrozyten bewegt, kann es zu unkontrollierten Fe^{3+} und ROS Bildung kommen und damit die Funktion Sauerstoff zu transportieren verlieren (80). Die Bildung von ROS kann dann zu Gewebsschädigungen wie Artherosklerose, Vaskulitis oder Reperfusionsschäden führen (81,82). Daher ist die Untersuchung auf ROS Produktion durch die HbMP-700, toxikologisch relevant. Die Tests haben ergeben, dass sich die ROS-Produktionswerte weit unterhalb der Positivkontrollgruppe befinden. Die Werte waren jedoch im Verhältnis zur Farbstoffkontrollgruppe etwas erhöht. Dieser Befund liefert jedoch nicht automatisch Beweise für eine ROS-Induktion. Der Verhältniswert basierte nämlich eher auf eine Reduktion der ATP-basierten Lumineszenz als auf eine Erhöhung der ROS-basierten Fluoreszenz. Die Reduktion der ATP-basierten Lumineszenz von HbMP-700 ist auf Wechselwirkung von HbMP-700 mit der Lumineszenz zurückzuführen, wobei die Anzahl der lebensfähigen Zellen verringert ist, weil im Vorversuch den inkubierten Cor.4U-Kardiomyozyten mit 10% HbMP-700 für 72 Stunden keine ROS-abhängige Effekte oder toxische Wirkungen oder andere Schäden nachgewiesen werden konnte. Die Kombination des ROS-Assays mit der Lumineszenz des Zelllebensfähigkeitstests stellte sich als gutes Werkzeug zur Bestimmung des ROS-Niveaus in Cor.4U Kardiomyozyten heraus (60). Das Mutagenitätspotential an Bakterien wurde mit dem Ames Test („OECD Test Guideline No. 471, Bacterial Reverse Mutation Test“) untersucht. Mithilfe dieses Verfahrens sollen Punktmutationen wie Substitution, Addition oder Deletion von DNA-Basenpaaren erkannt werden (83). In den bei den Experimenten I und II (mit und ohne metabolische Aktivierung) verwendeten Teststämmen konnten keine toxischen Wirkungen des Testgegenstandes, die bis zur höchsten Dosisgruppe verwendet wurden, festgestellt werden (Abb. 9a, b). Es konnten keine biologisch relevanten Erhöhungen der Revertanten-Kolonienzahl in den Experimenten I und II bei den fünf Teststämmen, unter allen Konzentrationen, nach Behandlung mit HbMP-700-Überstand, ob mit oder ohne metabolische Aktivierung, beobachtet werden. Hingegen induzierten die Referenzmutagene eine deutliche Zunahme von relevanten Kolonien, die die Testvalidität spiegelt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass während dem Mutagenitätstests und unter den experimentell beschriebenen Bedingungen, der Überstand HbMP-700 keine Genmutationen durch Basenpaar-Änderungen oder Frameshifts im Genom der verwendeten Teststämme verursachte. Daher ist der HbMP-700-Überstand, bei diesem bakteriellen Umkehrmutations-Assay, nicht mutagen.

Das Mutagenitätspotential an Säugetierzellen konnte mithilfe des In-vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test auch bekannt als „OECD Test Guideline No. 476“ untersucht werden. HbMP-700 weist keine mutagene Wirkung im TK-Locus der Maus-Lymphom Zelllinie L5178Y auf. Der Ausschluss von Kolonienbildung im selektiven Medium weist fehlende klastogene Effekte wie Deletion, Addition oder Umlagerung von Chromosomenabschnitten nach. Der Säugetier In-vivo Mikronukleus Test auch bekannt als “OECD Test Guideline No. 474” wurde angewendet, um das Potential für Chromosomenschäden (klastogen) oder Schäden am mitotischen Apparat (aneugen) an Erythroblasten, das durch HbMP-700 verursacht wird, zu untersuchen. Dieses Verfahren identifiziert gentoxische Veränderungen, die zur Bildung von Mikrokernen im Zytoplasma der polychromatischen Erythrozyten, aufgrund von Mutagenen, führen. Diese enthalten Chromosomenfragmenten bzw. ganze Chromosomen (83). Bei diesem Mutagenitätstest in Säugetierzellen wurde keine Toxizität während der Behandlung und auch keine klinischen Anzeichen von Toxizität innerhalb von 4h nach der Anwendung beobachtet. Es wurde keine statistisch signifikante Erhöhung ($P < 0,05$) der Mikronuklei-Zellen der bewerteten Dosisgruppen nachgewiesen mit einer Ausnahme bei der männlichen Gruppe (68 h). Der beobachtete Wert in dieser Gruppe war signifikant erhöht im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle. Der Wert lag jedoch im Bereich von historische Negativkontrolldaten. Basierend auf diesen Daten wurde dieser Anstieg als biologisch nicht relevant angesehen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass während der Studie und unter den erwähnten experimentellen Bedingungen, der Überstand von HbMP-700 keine induzierten strukturellen und/oder numerische Chromosomen Schäden in den unreifen Erythrozyten der Maus verursacht. Daher wird HbMP-700 als nicht mutagen angesehen in Bezug auf Klastogenität und/oder Aneugenizität im Mammalien Erythrozyten Mikronukleus Test.

In dieser Dissertation wird über eine neue Art der Hämoglobin-basierten Sauerstoffträger HbMP-700 berichtet, welche vielversprechend bei der Erfüllung der anspruchsvollen Anforderungen als neuartiger universeller Blutersatz an Bedeutung gewinnt. Die Ergebnisse haben eindeutig gezeigt, dass HbMP-700 eine hohe Affinität zu Sauerstoff besitzt ($p_{50} = 10,17$ mmHg), was wiederum als sehr wichtiger Faktor gilt, um eine vorzeitige Freisetzung von Sauerstoff in den präkapillären Arteriolen zu verhindern bzw. um die Vasokonstriktion durch Sauerstoffübersversorgung in die präkapillären Arteriolen zu vermeiden. Die Verformbarkeit von HbMP-700 wurde mit einem AFM-Mikroskop im nassen und trockenen Zustand nachgewiesen. Oberflächenmodifikationen können die Zirkulationszeit bzw. HWZ der Partikel verlängern, indem sie die Partikel vor der Erkennung und Elimination durch das Immunsystem schützen. HbMP-700 gilt als nicht mutagen im Ames Test und In-vitro Säugetierzellen Genmutationstest. In den In-vivo Studien zeigten die Ergebnisse des Mikronukleustests bei Mäusen, dass der Überstand von HbMP-700 nicht mutagen ist, da es keine chromosomale Schädigung der unreifen Erythrozyten der Maus verursacht. HbMP-700 konnten In-vitro ein biokompatibles Profil nachgewiesen werden. Weitere präklinische Untersuchungen der Sicherheit, wie z.B. In-vivo Studien in geeigneten Tiermodellen bezüglich der Pharmakokinetik und Reproduktionstoxizität sind notwendig, um bessere Einschätzungen zur Biokompatibilität zu erhalten zu und damit die präklinische Testung vollständig abschließen zu können.

7 Referenzen

1. Silbernagl S, Despopoulos A, eds. Taschenatlas Physiologie. 8th ed. Georg Thieme Verlag; 2012. doi:10.1055/b-002-50992
2. Torsten Haferlach, Heinz Diem, Harald Klaus Thöml, Vera Ulrike Bacher, Marianne Engels, Hrsg. Taschenatlas Hämatologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2012. doi:10.1055/b-004-134404
3. Gerhard Aumüller, Gabriela Aust, Arne Conrad, Jürgen Engele, Joachim Kirsch, Giovanni Maio, Artur Mayerhofer, Siegfried Mense, Dieter Reißig, Jürgen Salvetter, Wolfgang Schmidt, Frank Schmitz, Erik Schulte, Katharina Spaniel-Borowski, Gunther Wennemuth, Werner Wolff, Laurenz J. Wurzinger, Duale Reihe Anatomie, Hrsg. 5., korrigierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2020. doi:10.1055/b-007-170976
4. Horn F, Biochemie des Menschen, Hrsg. 8., überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, Germany: Thieme; 2020. doi:10.1055/b000000082

5. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) S3-Leitlinie Stand: 25.08.2017.
6. Hans Bäuml. Künstliche Sauerstofftransporter können mehr als Sauerstoff liefern - Artificial Oxygen Carriers Can Do More Than Just Deliver Oxygen. *Transfusionsmedizin - Immunhämatologie, Hämotherapie, Immungenetik, Zelltherapie* 2020; 10(04): 199 – 207. doi: 10.1055/a-1119-1796
7. TraumaRegister DGU®. Aktueller Jahresbericht 2020. http://www.traumaregister-dgu.de/fileadmin/user_upload/traumaregister-dgu.de/docs/Downloads/TR-DGU_Jahresbericht_2020.pdf (letzte Abfrage Jan23, 2021)
8. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Verbrauch von Blutprodukten durch Transfusionen. [https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg_isgbe5.prc_menu_olap?p_uid=gast&p_aid=86598950&p_sprache=D&p_help=3&p_indnr=687&p_indsp=&p_ityp=H&p_fid=.](https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg_isgbe5.prc_menu_olap?p_uid=gast&p_aid=86598950&p_sprache=D&p_help=3&p_indnr=687&p_indsp=&p_ityp=H&p_fid=) (letzte Abfrage Mai24, 2020)
9. Wald ML. Blood Industry Shrinks as Transfusions Decline. *The New York Times* 2014 Aug 22; <https://www.nytimes.com/2014/08/23/business/blood-industry-hurt-by-surplus.html>
10. World Health Organization. Ten Facts on Blood Transfusion. http://www.who.int/features/factfiles/blood_transfusion/en/ (letzte Abfrage Jun09, 2014)
11. Klein HG. How safe is blood, really? *Biologicals* 2010; 38:100–4. doi:10.1016/j.biologicals.2009.10.008.
12. Ironside J. Review. Variant Creutzfeldt-Jakob disease: an update. *Folia Neuropathologica*. 2012;50(1):50-56.
13. World Health Organization. Blood safety and availability. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/blood-safety-and-availability> (letzte Abfrage Mai24, 2020)
14. Wang D, Sun J, Solomon SB, Klein HG, Natanson C. Transfusion of older stored blood and risk of death: a meta-analysis: OUTCOMES USING OLD VS. NEW STORED BLOOD. *Transfusion* 2012; 52:1184–95. doi:10.1111/j.1537-2995.2011.03466.x.
15. Shishehbor MH, Madhwal S, Rajagopal V, Hsu A, Kelly P, Gurm HS, Kapadia SR, Lauer MS, Topol EJ. Impact of Blood Transfusion on Short- and Long-Term Mortality in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *JACC: Cardiovascular Interventions* 2009; 2:46–53. doi:10.1016/j.jcin.2008.09.011
16. Bäuml H, Radtke H, Haas T, Latza R, Kiesewetter H. Influence of 30 Gy Gamma Irradiation on the Quality of Red Blood Cell Concentrates in Several Storage Media. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 1999; 26:212–21. doi:10.1159/000053491
17. Lee JS, Gladwin MT. Bad Blood: The risks of red cell storage. *Nature Medicine* 2010;16:381–2. doi:10.1038/nm0410-381.

18. Katja B. Ferenz and Andrea U. Steinbicker. Artificial Oxygen Carriers—Past, Present, and Future—a Review of the Most Innovative and Clinically Relevant Concepts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* May 2019, 369 (2) 300-310; doi.org/10.1124/jpet.118.254664
19. Khan F, Singh K, Friedman MT. Artificial Blood: The History and Current Perspectives of Blood Substitutes. *Discoveries (Craiova, Romania)*. 2020 Mar;8(1):e104. doi: 10.15190/d.2020.1.
20. Li T, Jing X, Huang Y. Polymer/Hemoglobin Assemblies: Biodegradable Oxygen Carriers for Artificial Red Blood Cells. *Macromolecular Bioscience* 2011;11:865–75. doi:10.1002/mabi.201000469.
21. Chang TMS. Blood substitutes based on nanobiotechnology. *Trends in Biotechnology* 2006;24:372–7. doi:10.1016/j.tibtech.2006.06.005
22. Jahr JS, Sadighi A, Doherty L, Li A, Won Kim H. Hemoglobin-Based Oxygen Carriers: History, Limits, Brief Summary of the State of the Art, Including Clinical Trials. In: Mozzarelli A, Bettati S, editors. *Chemistry and Biochemistry of Oxygen Therapeutics*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2011, p. 301–16
23. Chen J-Y, Scerbo M, Kramer G. A review of blood substitutes: examining the history, clinical trial results, and ethics of hemoglobin-based oxygen carriers. *Clinics* 2009;64. doi:10.1590/S1807-59322009000800016
24. Deshpande SV, Beissinger RL. Liposome-Encapsulated Hemoglobin using Film Hydration Processing to form Artificial Red Blood Cells. *Biomaterials, Artificial Cells and Immobilization Biotechnology* 1993; 21:135–51. doi:10.3109/10731199309117352
25. Arifin DR, Palmer AF. Determination of Size Distribution and Encapsulation Efficiency of Liposome-Encapsulated Hemoglobin Blood Substitutes Using Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation Coupled with Multi-Angle Static Light Scattering. *Biotechnology Progress* 2003; 19:1798–811. doi:10.1021/bp034120x
26. Sakai H, Sato A, Masuda K, Takeoka S, Tsuchida E. Encapsulation of Concentrated Hemoglobin Solution in Phospholipid Vesicles Retards the Reaction with NO, but Not CO, by Intracellular Diffusion Barrier. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283:1508–17. doi:10.1074/jbc.M707660200
27. Lvov Y, Cui T, Hua F, Patel A, Antipov A, Cordeiro AL, Michelle E. Prevot, Gleb B. Sukhorukov, Ronald S. Besser. Layer-by-layer nanoassembly of polyion and enzymes for production of micropatterns and nanoshells. In: Varadan VK, Kish LB, editors., 2003, p. 132. doi:10.1117/12.483562
28. Bäuml H, Kelemen C, Mitlöhner R, Georgieva R, Krabi A, Schäling S, Gerhard Artmann, Holger Kieseewetter. *Micromechanical Properties of Newly Developed*

- Polyelectrolyte Microcapsules (PEMC). In: Kobayashi K, Tsuchida E, Horinouchi H, editors. *Artificial Oxygen Carrier*, vol. 12, Tokyo: Springer-Verlag; 2005, p. 205–16
29. Yi Jia, Yue Cui, Jinbo Fei, Mingchun Du, Luru Dai, Junbai Li, Yang Yang. Construction and Evaluation of Hemoglobin-Based Capsules as Blood Substitutes. *Advanced Functional Materials* 2012; 22:1446–53. doi:10.1002/adfm.201102737
 30. Shasha Wang, Fang Yuan, Kui Chen, Gaojian Chen, Kehua Tu, Hongjun Wang, Li-Qun Wang. Synthesis of Hemoglobin Conjugated Polymeric Micelle: A ZnPc Carrier with Oxygen Self-Compensating Ability for Photodynamic Therapy. *Biomacromolecules* 2015; 16:2693–700. doi:10.1021/acs.biomac.5b00571
 31. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:9265–9
 32. Cabrales P, Sun G, Zhou Y, Harris DR, Tsai AG, Intaglietta M, Palmer AF. Effects of the molecular mass of tense-state polymerized bovine hemoglobin on blood pressure and vasoconstriction. *Journal of Applied Physiology* 2009; 107:1548–58. doi:10.1152/jappphysiol.00622.2009
 33. Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279:H908-915
 34. Rentsendorj O, Zhang X, Williams M, Buehler P, D'Agnillo F. Transcriptional Suppression of Renal Antioxidant Enzyme Systems in Guinea Pigs Exposed to Polymerized Cell-Free Hemoglobin. *Toxics* 2016; 4:6. doi:10.3390/toxics4010006
 35. Alayash AI. Blood substitutes: why haven't we been more successful? *Trends in Biotechnology* 2014; 32:177–85. doi:10.1016/j.tibtech.2014.02.006
 36. Buehler PW, D'Agnillo F, Schaer DJ. Hemoglobin-based oxygen carriers: from mechanisms of toxicity and clearance to rational drug design. *Trends in Molecular Medicine* 2010; 16:447–57. doi:10.1016/j.molmed.2010.07.006
 37. Silverman TA, Weiskopf RB. Hemoglobin-based Oxygen Carriers: Current Status and Future Directions. *Anesthesiology* 2009; 111:946–63. doi:10.1097/ALN.0b013e3181ba3c2c
 38. Bob Smit, Yvo M. Smulders, Etto C. Eringa, Heleen M. Oudemans - van Straaten, Armand R. J. Girbes, Kimberley E. Wever, Carlijn R. Hooijmans & Angelique M. E. Spoelstra - de Man. Effects of hyperoxia on vascular tone in animal models: systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 22, 189 (2018). doi.org/10.1186/s13054-018-2123-9

39. Winslow RM. Current status of blood substitute research: towards a new paradigm. *J Intern Med* 2003; 253:508–17
40. Pedro Cabrales and Joel M. Friedman. HBOC Vasoactivity: Interplay Between Nitric Oxide Scavenging and Capacity to Generate Bioactive Nitric Oxide Species. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Jun 10; 18(17): 2284–2297. doi: 10.1089/ars.2012.5099
41. Taverne, Y. J., de Wijs-Meijler, D., Te Lintel Hekkert, M., Moon-Massat, P. F., Dubé, G. P., Duncker, D. J., & Merkus, D. (2017). Normalization of hemoglobin-based oxygen carrier-201 induced vasoconstriction: targeting nitric oxide and endothelin. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 122(5), 1227–1237. doi.org/10.1152/jappphysiol.00677.2016
42. Champion JA, Walker A, Mitragotri S. Role of Particle Size in Phagocytosis of Polymeric Microspheres. *Pharmaceutical Research* 2008; 25:1815–21. doi:10.1007/s11095-008-9562-y
43. Rudt S, Müller RH. In vitro phagocytosis assay of nano- and microparticles by chemiluminescence. III. Uptake of differently sized surface-modified particles, and its correlation to particle properties and in vivo distribution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 1993; 1:31–9. doi:10.1016/0928-0987(93)90015-3
44. Xiong Y, Steffen A, Andreas K, Müller S, Sternberg N, Georgieva R, Bäuml H. Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Microparticles: Synthesis, Properties, and In Vitro and In Vivo Investigations. *Biomacromolecules* 2012; 13:3292–300. doi:10.1021/bm301085x
45. Xiong Y, Liu ZZ, Georgieva R, Smuda K, Steffen A, Sendeski M, Voigt A, Patzak A, Bäuml H. Nonvasoconstrictive Hemoglobin Particles as Oxygen Carriers. *ACS Nano* 2013; 7:7454–61. doi:10.1021/nn402073n
46. Bäuml H, Xiong Y, Liu ZZ, Patzak A, Georgieva R. Novel Hemoglobin Particles- Promising New-Generation Hemoglobin-Based Oxygen Carriers: Promising New-Generation HBOCs. *Artificial Organs* 2014; 38:708–14. doi:10.1111/aor.12331
47. Kloypan C, Prapan A, Suwannasom N, Chaiwaree S, Kaewprayoon W, Steen A, Xiong Y, Baisaeng N, Georgieva R, Bäuml H. Improved oxygen storage capacity of haemoglobin submicron particles by one-pot formulation. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2018,46,S964–S972. doi: 10.1080/21691401.2018.1521819
48. Anchinmane V.T, Sankhe S.V. Evaluation of hemoglobin estimation with non-cyanide alkaline haematin D-575 method. *Int. J. Res. Med. Sci.* 2016, 44, 4297–4299. doi: http://dx.doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20163157
49. Haldane, J. The ferricyanide method of determining the oxygen capacity of blood. *J Physiol.* 1900, 25, 295–302. doi: 10.1113/jphysiol.1900.sp000797

50. Baidukova, O.; Wang, Q.; Chaiwaree, S.; Freyer, D.; Prapan, A.; Georgieva, R.; Zhao, L.; Baumler, H. Antioxidative protection of haemoglobin microparticles (HbMPs) by polydopamine. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2018, 46, S693–S701. doi: 10.1080/21691401.2018.1505748.
51. Jia, Y.; Wood, F.; Buehler, P.W.; Alayash, A.I. Haptoglobin preferentially binds but not subunits cross-linked hemoglobin tetramers with minimal effects on ligand and redox reactions. *PLoS ONE* 2013, 8, e59841. doi: 10.1371/journal.pone.0059841
52. Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70:2281–5. doi: 10.1073/pnas.70.8.2281.
53. Claxton LD, Allen J, Auletta A, Mortelmans K, Nestmann E, Zeiger E. Guide for the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. *Mutat Res* 1987; 189:83–91. doi: 10.1016/0165-1218(87)90014-0.
54. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113:173–215. doi: 10.1016/0165-1161(83)90010-9.
55. Kier LD, Brusick DJ, Auletta AE, Von Halle ES, Brown MM, Simmon VF, Dunkel V, McCann J, Mortelmans K, Prival M, Rao TK, Ray V. The *Salmonella typhimurium*/mammalian microsomal assay. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1986; 168:69–240. doi: 10.1016/0165-1110(86)90002-3.
56. Clements J. The mouse lymphoma assay. *Mutat Res* 2000; 455:97–110. doi: 10.1016/s0027-5107(00)00066-x.
57. Directive 2010/63/EU of the European parliament of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.
58. Ninth Addendum to OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4, No. 474 “Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test“, adopted July 21, 1997
59. German Animal Welfare Act, Art. 9.2, No. 7 (Deutsches Tierschutzgesetz, 24. Juli 1972 (BGBl. I S. 1277), Inkrafttreten der letzten Änderung: 13. Juli 2009, (Art. 1 ÄndG vom 4. Juli 2013)
60. Kao I, Xiong Y, Steffen A, Smuda K, Zhao L, Georgieva R, Pruß A, Bäuml H. Preclinical In Vitro Safety Investigations of Submicron Sized Hemoglobin Based Oxygen Carrier HbMP-700. *Artificial Organs.* 2018;42(5):549-559. doi:10.1111/aor.13071.
61. Prapan, A.; Suwannasom, N.; Kloypan, C.; Chaiwaree, S.; Steffen, A.; Xiong, Y.; Kao, I.; Pruß, A.; Georgieva, R.; Bäuml, H. Surface Modification of Hemoglobin-Based

- Oxygen Carriers Reduces Recognition by Haptoglobin, Immunoglobulin, and Hemoglobin Antibodies. *Coatings* 2019, 9, 454. doi.org/10.3390/coatings9070454
62. Aaron CS, Bolcsfoldi G, Glatt HR, Moore M, Nishi Y, Stankowski L, Theiss J, Thompson E. Mammalian cell gene mutation assays working group report. *Mutat Res* 1994; 312:235–9
 63. Mitchell A., Auletta A., Clive D, Kirby P., Moore M., Myhr B. The L5178Y/tk+/- mouse lymphoma specific gene and chromosomal mutation assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 1997; 394:177–303. doi:10.1016/S1383-5718(97)00115-0
 64. Myhr BC, Caspary WJ. Chemical mutagenesis at the thymidine kinase locus in L5178Y mouse lymphoma cells: results for 31 coded compounds in the National Toxicology Program. *Environ Mol Mutagen* 1991; 18:51–83. doi: 10.1002/em.2850180109.
 65. Nestmann ER, Brillinger RL, Gilman JP, Rudd CJ, Swierenga SH. Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories: II. Mutation in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutat Res* 1991; 246:255–84. doi: 10.1016/0027-5107(91)90048-s.
 66. Chen, J.-Y.; Scerbo, M.; Kramer. A review of blood substitutes: examining the history, clinical trial results, and ethics of hemoglobin-based oxygen carriers. *G. Clinics (São Paulo)* 2009, 64, 803– 813. doi: 10.1590/s1807-59322009000800016
 67. Jahr, J. S.; Sadighi, A.; Doherty, L.; Li, A.; Kim, H. W. In *Chemistry and Biochemistry of Oxygen Therapeutics: From Transfusion to Artificial Blood*; Mozzarelli, A.; Bettati, S., Eds.; John Wiley and Sons, Ltd.: New York, 2011; pp 301– 316.
 68. Squires, J. E. Artificial blood. *Science* 2002, 295, 1002– 1005. doi: 10.1126/science.1068443.
 69. Reid, T. J. Hb-based oxygen carriers: are we there yet? *Transfusion* 2003, 43, 280– 287. doi: 10.1046/j.1537-2995.2003.00314.x.
 70. Saxena, R.; Wijnhoud, A. D.; Carton, H.; Hacke, W.; Kaste, M.; Przybelski, R. J.; Stern, K. N.; Koudstaal, P. J. Controlled safety study of a hemoglobin-based oxygen carrier. *Stroke* 1999, 30, 993– 996
 71. Sprung, J.; Kindscher, J. D.; Wahr, J. A.; Levy, J. H.; Monk, T. G.; Moritz, M. W.; O'Hara, P. J. The use of bovine hemoglobin glutamer-250 (Hemopure) in surgical patients: results of a multicenter, randomized, single-blinded trial. *Anesth. Analg.* 2002, 94, 799– 808
 72. Moore, E. E.; Moore, F. A.; Fabian, T. C.; Bernard, A. C.; Fulda, G. J.; Hoyt, D. B.; Duane, T. M.; Weireter, L. J.; Gomez, G. A.; Cipolle, M. D.; Rodman, G. H.; Malangoni, M. A.; Hides, G. A.; Omert, L. A.; Gould, S. A. Human polymerized hemoglobin for the

- treatment of hemorrhagic shock when blood is unavailable: the USA multicenter trial. *J. Am. Coll. Surg.* 2009, 208, 1– 13 doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2008.09.023
73. Hans Bäumlér, Yu Xiong, Zhi Zhao Liu, Andreas Patzak, and Radostina Georgieva. Novel Hemoglobin Particles—Promising New-Generation Hemoglobin-Based Oxygen Carriers. *Artificial Organs* 2014, (38):708-714 doi:10.1111/aor.12331
 74. Ding, Y., Xu, GK. & Wang, GF. On the determination of elastic moduli of cells by AFM based indentation. *Sci Rep* 7, 45575 (2017). doi.org/10.1038/srep45575
 75. Chien S, Usami S, Dellenback RJ, Gregersen MI, Nanninga LB, Guest MM. Blood Viscosity: Influence of Erythrocyte Aggregation. *Science* 1967; 157:829–31. doi:10.1126/science.157.3790.829
 76. Lerche D, Bäumlér H. Moderate heat treatment of only red blood cells (RBC) slows down the rate of RBC-RBC aggregation in plasma. *Biorheology* 1984; 21:393–403
 77. G. Böhme, „Strömungsmechanik nicht-newtonscher Fluide“, Vincentz, Hannover, 1998, ISBN 3-519-02354-7
 78. Wu, M.; Feng, K.; Li, Q.; Ma, H.; Zhu, H.; Xie, Y.; Yan, G.; Chen, C.; Yan, K. Glutaraldehyde-polymerized hemoglobin and tempol (PolyHb-Tempol) has superoxide dismutase activity that can attenuate oxidative stress on endothelial cells induced by superoxide anion. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2018, 46, 47–55.
 79. Remy B, Deby-Dupont G, Lamy M. Red blood cell substitutes: Fluorocarbon emulsions and haemoglobin solutions. *Br Med Bull* 1999; 55: 277–298. doi: 10.1258/0007142991902259.
 80. Alayash AI. Oxygen therapeutics: can we tame haemoglobin? *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3:152–159. doi: 10.1038/nrd1307.
 81. Motterlini R, Foresti R, Vandegriff K, Intaglietta M, Winslow RM. Oxidative-stress response in vascular endothelial cells exposed to acellular haemoglobin solutions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1995;269:H648–H655.
 82. J Balla, H S Jacob, G Balla, K Nath, J W Eaton, G M Vercellotti. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:9285–9289. doi: 10.1073/pnas.90.20.9285.
 83. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals_72d77764-en

8 Eidesstattliche Versicherung

Selbständigkeitserklärung

„Ich, Ijad Kao, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: “Untersuchungen zur Biokompatibilität / Toxizität von Hämoglobin-basierten Mikropartikeln (HbMP-700) als Sauerstoffträger”, „Investigations of biocompatibility / toxicity of hemoglobin-based microparticles (HbMP-700) as oxygen carrier“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte. Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst. “

.....

Datum

.....

Unterschrift

9 Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Ijad Kao hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

[Kao I, Xiong Y, Steffen A, Smuda K, Zhao L, Georgieva R, Pruß A, Bäuml H.], [Preclinical In Vitro Safety Investigations of Submicron Sized Hemoglobin Based Oxygen Carrier HbMP-700: IN VITRO SAFETY INVESTIGATION OF HbMP-700.], [Artificial Organs], [2018]; Q2 (Medicine)

Beitrag im Einzelnen: *Experimente: Rheologische Untersuchung der HbMP-700 (Kap. 4.4 und 5.3); Aus meinen Messungen und Auswertungen ist die Tabelle 2 in der Publikation entstanden. Rasterkraftmikroskopie der HbMP-700 (Kap. 4.2.1 und 5.1.1); Aus meiner Auswertung sind die Abbildungen 1, 3, 4 in der Publikation entstanden. Probenvorbereitung für Toxizitätstests (Kap. 4.7). Datenanalyse und Interpretation zusammen mit den Co-Autoren. Erstellung des Publikationsmanuskripts.*

Publikation 2:

[Prapan A, Suwannasom N, Kloypan C, Chaiwaree S, Steffen A, Xiong Y, Kao I, Pruß A, Georgieva R, Bäuml H.], [Surface Modification of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers Reduces Recognition by Haptoglobin, Immunoglobulin, and Hemoglobin Antibodies.], [Coatings], [2019] Q2

Beitrag im Einzelnen: *Selbständige Literaturrecherche, Datenanalyse, Anteil an Entwurf des Publikationsmanuskripts.*

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

10 Auszug aus der Journal Summary List

InCites Journal Citation Reports

Clarivate

Journal Data Filtered By: Selected JCR Year: 2015 Selected Editions: SCIE,SSCI Selected Categories: 'ENGINEERING, BIOMEDICAL' Selected Category Scheme: WoS

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Annual Review of Biomedical Engineering	3,823	10.256	0.006450
2	BIOMATERIALS	95,025	8.387	0.148530
3	Acta Biomaterialia	20,966	6.008	0.053810
4	Advanced Healthcare Materials	3,173	5.760	0.011330
5	Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	2,862	4.710	0.007260
6	Biofabrication	1,216	4.702	0.003810
7	MEDICAL IMAGE ANALYSIS	4,764	4.565	0.010690
8	EUROPEAN CELLS & MATERIALS	2,798	4.560	0.006760
9	IEEE TRANSACTIONS ON MEDICAL IMAGING	13,784	3.756	0.024430
10	Journal of Neural Engineering	3,789	3.493	0.013450
11	CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH	11,968	3.464	0.016950
12	Biomedical Materials	2,230	3.361	0.004180
13	JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A	15,442	3.263	0.023580
14	Biomechanics and Modeling in Mechanobiology	1,975	3.032	0.006520
15	Organogenesis	742	2.910	0.002440
16	ANNALS OF BIOMEDICAL ENGINEERING	8,405	2.887	0.017640
17	JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART B-APPLIED BIOMATERIALS	7,100	2.881	0.010770
18	Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	4,277	2.876	0.014690

19	PHYSICS IN MEDICINE AND BIOLOGY	21,090	2.811	0.039780
20	Regenerative Medicine	1,496	2.602	0.003870
21	IEEE TRANSACTIONS ON NEURAL SYSTEMS AND REHABILITATION ENGINEERING	3,077	2.583	0.007620
22	IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING	14,781	2.468	0.024470
23	LASERS IN MEDICAL SCIENCE	3,607	2.461	0.007020
24	JOURNAL OF BIOMECHANICS	24,856	2.431	0.032710
25	Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation	2,280	2.419	0.006790
26	ASAIO JOURNAL	2,376	2.291	0.005130
27	JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE-MATERIALS IN MEDICINE	9,663	2.272	0.012060
28	BIOMEDICAL MICRODEVICES	2,722	2.227	0.005270
29	ARTIFICIAL INTELLIGENCE IN MEDICINE	1,503	2.142	0.002640
30	ULTRASONIC IMAGING	967	2.111	0.000750
31	Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology	290	2.024	0.000540
32	IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems	1,307	2.018	0.006200
33	ARTIFICIAL ORGANS	3,221	1.993	0.004620
34	JOURNAL OF BIOMATERIALS APPLICATIONS	1,432	1.988	0.002760
35	COMPUTER METHODS AND PROGRAMS IN BIOMEDICINE	3,898	1.862	0.007960
36	COMPUTER METHODS IN BIOMECHANICS AND BIOMEDICAL ENGINEERING	1,774	1.850	0.005270
37	International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering	776	1.849	0.004490

38	International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery	1,030	1.827	0.003160
39	MEDICAL & BIOLOGICAL ENGINEERING & COMPUTING	4,283	1.797	0.005430
40	Expert Review of Medical Devices	1,270	1.762	0.002810
41	JOURNAL OF BIOMECHANICAL ENGINEERING-TRANSACTIONS OF THE ASME	6,454	1.747	0.007410
42	JOURNAL OF BIOMATERIALS SCIENCE-POLYMER EDITION	3,618	1.733	0.003690
43	Biomedical Engineering-Biomedizinische Technik	775	1.650	0.001720
44	CLINICAL BIOMECHANICS	7,061	1.636	0.009880
45	MEDICAL ENGINEERING & PHYSICS	4,617	1.619	0.008460
46	PHYSIOLOGICAL MEASUREMENT	3,560	1.576	0.005600
47	Biomedical Signal Processing and Control	961	1.521	0.002410
47	COMPUTERS IN BIOLOGY AND MEDICINE	2,755	1.521	0.005150
49	PACE-PACING AND CLINICAL ELECTROPHYSIOLOGY	4,855	1.440	0.008570
50	JOURNAL OF ARTIFICIAL ORGANS	637	1.438	0.001140
51	COMPUTERIZED MEDICAL IMAGING AND GRAPHICS	1,583	1.385	0.002570
52	Biomedical Engineering Online	1,671	1.382	0.004360
53	CELL AND TISSUE BANKING	754	1.248	0.001390
54	Sports Biomechanics	451	1.209	0.000900
55	Journal of Medical and Biological Engineering	561	1.018	0.001100
56	JOURNAL OF APPLIED BIOMECHANICS	1,357	1.010	0.002460

57	INTERNATIONAL JOURNAL OF ARTIFICIAL ORGANS	1,864	1.005	0.002920
58	PROCEEDINGS OF THE INSTITUTION OF MECHANICAL ENGINEERS PART H- JOURNAL OF ENGINEERING IN MEDICINE	1,857	0.996	0.003180
59	BIO-MEDICAL MATERIALS AND ENGINEERING	1,250	0.988	0.001700
60	BIORHEOLOGY	1,511	0.981	0.000760
61	Molecular & Cellular Biomechanics	156	0.962	0.000240
62	Tissue Engineering and Regenerative Medicine	349	0.941	0.000700
63	Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials	127	0.934	0.000460
64	Biocybernetics and Biomedical Engineering	107	0.808	0.000260
65	Journal of Mechanics in Medicine and Biology	495	0.797	0.001090
66	Acta of Bioengineering and Biomechanics	340	0.767	0.000710
67	Applied Bionics and Biomechanics	185	0.703	0.000240
68	TECHNOLOGY AND HEALTH CARE	563	0.678	0.000890
69	AUSTRALASIAN PHYSICAL & ENGINEERING SCIENCES IN MEDICINE	359	0.676	0.000780
70	IRBM	210	0.628	0.000640
71	IEEE Pulse	160	0.558	0.000770
72	Bioinspired Biomimetic and Nanobiomaterials	77	0.523	0.000360
73	Journal of Medical Devices- Transactions of the ASME	321	0.450	0.001030
74	Journal of Hard Tissue Biology	117	0.424	0.000150
75	Journal of Vibroengineering	388	0.384	0.001020
76	ISOKINETICS AND EXERCISE SCIENCE	344	0.357	0.000590

Copyright © 2021 Clarivate

By exporting the selected data, you agree to the data usage policy set forth in the Terms of Use

**Journal Data Filtered By: Selected JCR Year: 2018 Selected Editions: SCIE,SSCI
Selected Categories: 'MATERIALS SCIENCE, COATINGS & FILMS' Selected
Category Scheme: WoS**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	APPLIED SURFACE SCIENCE	92,186	5.155	0.108900
2	PROGRESS IN ORGANIC COATINGS	10,828	3.420	0.009010
3	SURFACE & COATINGS TECHNOLOGY	41,783	3.192	0.033490
4	JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY	71,747	3.120	0.054380
5	CORROSION REVIEWS	480	2.528	0.000700
6	Surface Innovations	312	2.333	0.000580
7	Coatings	1,400	2.330	0.002030
8	DIAMOND AND RELATED MATERIALS	8,081	2.290	0.005640
9	SURFACE ENGINEERING	2,258	2.229	0.002400
10	JOURNAL OF THERMAL SPRAY TECHNOLOGY	4,337	2.129	0.003460
11	THIN SOLID FILMS	39,892	1.888	0.022040
12	Colloid and Interface Science Communications	265	1.870	0.000510
13	JOURNAL OF VACUUM SCIENCE & TECHNOLOGY A	9,302	1.833	0.005680
14	JOURNAL OF PLASTIC FILM & SHEETING	392	1.714	0.000250
15	Journal of Coatings Technology and Research	1,604	1.584	0.001990
16	International Journal of Surface Science and Engineering	239	0.918	0.000220
17	TRANSACTIONS OF THE INSTITUTE OF METAL FINISHING	634	0.806	0.000490

18	Pigment & Resin Technology	537	0.724	0.000310
19	CoatingsTech	51	0.040	0.000020
20	SURFACE COATINGS INTERNATIONAL	170	0.000	0.000000

Copyright © 2021 Clarivate

By exporting the selected data, you agree to the data usage policy set forth in the Terms of Use

11 Druckexemplare der Publikationen

**Preclinical In Vitro Safety Investigations of Submicron Sized Hemoglobin
Based Oxygen Carrier HbMP-700**

Artificial Organs, First published: 06 March 2018

<https://doi.org/10.1111/aor.13071>

**Surface Modification of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers Reduces
Recognition by Haptoglobin, Immunoglobulin, and Hemoglobin Antibodies**

Coatings, First published: 21 July 2019

<https://doi.org/10.3390/coatings9070454>

12 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Originalarbeiten

1. **Kao I**, Xiong Y, Steffen A, Smuda K, Zhao L, Georgieva R, Pruß A, Bäuml H. Preclinical In Vitro Safety Investigations of Submicron Sized Hemoglobin Based Oxygen Carrier HbMP-700: IN VITRO SAFETY INVESTIGATION OF HbMP-700. *Artificial Organs*. 2018;42(5):549-559. doi:[10.1111/aor.13071](https://doi.org/10.1111/aor.13071).
2. Prapan A, Suwannasom N, Kloypan C, Chaiwaree S, Steffen A, Xiong Y, **Kao I**, Pruß A, Georgieva R, Bäuml H. Surface Modification of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers Reduces Recognition by Haptoglobin, Immunoglobulin, and Hemoglobin Antibodies. *Coatings*. 2019;9(7):454. doi:[10.3390/coatings9070454](https://doi.org/10.3390/coatings9070454).
3. Suwannasom N, **Kao I**, Pruß A, Georgieva R, Bäuml H. Riboflavin: The Health Benefits of a Forgotten Natural Vitamin. *IJMS*. 2020;21(3):950. doi:[10.3390/ijms21030950](https://doi.org/10.3390/ijms21030950).

14 Danksagung

Mein besonders großer Dank gilt dem Leiter der Forschungsabteilung der Transfusionsmedizin Prof. Dr. rer. nat. Hans Bäuml, der mir ein ausgesprochen aufregendes und faszinierendes Promotionsthema zur Verfügung stellte, mit seiner Motivation meine wissenschaftliche Karriere einleitete und mich in meiner Arbeit wissenschaftlich sehr unterstützte und für Rat immer geduldig zur Seite stand. Seine Meinungen zu diversen Fragestellungen empfand ich stetig als große Stütze. Für die Möglichkeit zur Teilnahme an wissenschaftlichen Veranstaltungen bin ich ihm sehr dankbar.

Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Radostina Georgieva für die wissenschaftliche und organisatorische Unterstützung in den Publikationen bedanken. Ihr Rat in den Besprechungen gab mir Hilfestellungen und Impulse für die weitere Vorgehensweise.

Danken möchte ich außerdem das Team der Arbeitsgruppe Prof. Bäuml, für die Kooperation an den Publikationen. Die Zusammenarbeit bereitete mir viel Freude und erlaubte es mir mich wissenschaftlich weiterzuentwickeln.

Weiterhin möchte ich mich bei Institutsdirektor Prof. Dr. med. Axel Pruß für die Ermöglichung der Promotion am Institut für Transfusionsmedizin der Charité bedanken.

Außerdem möchte ich mich für die technische Unterstützung bei Frau Anneliese Heilig vom MPI Colloids and surfaces in Potsdam-Golm, Dr. Dietmar Hess (NMITT GmbH,

Reutlingen), Dr. Kristina Trenz, Frau Gudrun Schreib und Dr. Anton Wessels (BSL BIOSERVICE GmbH, Planegg) bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung des Projektes möchte ich mich bei der Europäischen Union (EFRE-ProFIT 10139827 und IRSES-612673 DINaMIT) bedanken.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Freund Aljoscha Metz bedanken für die Durchsicht meiner Dissertation.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Frau Ban und meinen Eltern Amal Kao und Dr. med. vet. Moujahed Kao, die mich motiviert und moralisch von Anfang an unterstützt haben meine Arbeit zu vollenden.