

**Herstellung von Mikropartikeln zum
Sauerstofftransport auf Hämoglobinbasis**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Yu Xiong

aus Sichuan (V. R. China)

2012

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2008 bis Februar 2012 in der Forschungsabteilung des Institutes für Transfusionsmedizin und am Berlin-Brandenburg Center of Regenerative Therapies (BCRT) der Charité– Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Herrn PD Dr. Hans Bäumler durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer H. Müller

2. Gutachter: PD Dr. Hans Bäumler

Disputation am 12. 09. 2012

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	HINTERGRUND	1
1.2	PERFLUORCARBON (PFC)-EMULSIONEN	4
1.3	HÄMOGLOBIN-BASIERTE SAUERSTOFFTRÄGER (HBOCs)	7
1.3.1	<i>Hämoglobin-Physiologie</i>	7
1.3.2	<i>Stromafreies Hämoglobin (SFH)</i>	10
1.3.3	<i>Modifiziertes azelluläres Hämoglobin</i>	11
1.3.4	<i>Verkapseltes Hämoglobin</i>	14
1.3.5	<i>Gentechnische Modifikation</i>	15
1.3.6	<i>HBOC induzierte Vasokonstriktion</i>	15
1.4	AUFGABENSTELLUNG	17
2	MATERIALIEN UND METHODEN	18
2.1	MATERIALIEN	18
2.1.1	<i>Rinder-Hämoglobin</i>	18
2.1.2	<i>Chemikalien und direkt bezogene Lösungen</i>	19
2.1.3	<i>Weitere Lösungen und Puffer</i>	21
2.1.4	<i>Geräte</i>	22
2.1.5	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	23
2.2	HERSTELLUNG DER HÄMOGLOBIN-MIKROPARTIKEL (Hb-MP)	24
2.2.1	<i>Coprecipitation</i>	24
2.2.2	<i>Vernetzung des Hb</i>	25
2.2.3	<i>Auflösung von CaCO₃</i>	25
2.2.4	<i>Vernetzung unter sauerstoffarmen Bedingungen</i>	25
2.2.5	<i>Quenchen des Vernetzers und Reduktion der Imin-Bindung</i>	26
2.2.6	<i>Postreduktion der Hb-MP mit Ascorbinsäure</i>	26
2.2.7	<i>Herstellung der Mischpartikel</i>	26
2.2.7.1	<i>Hb-Hyaluronan-Mischpartikel (Hb-HA-MP)</i>	26
2.2.7.2	<i>Hb-Humanalbumin-Mischpartikel (Hb-HSA-MP)</i>	27
2.2.8	<i>Modifikationen der Hb-MP</i>	28
2.2.8.1	<i>PEGylierung der Hb-MP</i>	28
2.2.8.2	<i>Modifikation der Hb-MP mit Dextran (Hb-Dx-MP)</i>	28

Inhaltsverzeichnis

2.2.8.3	Zusatzmodifikation der Hb-Dx-MP	30
2.3	METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DES HB UND DER HB-MP	32
2.3.1	<i>Konzentrationsbestimmungen</i>	32
2.3.1.1	Spektralphotometrie	32
2.3.1.2	Bestimmung des Hämoglobingehalts	32
2.3.1.3	Bestimmung des Methämoglobin (MetHb)-Gehalts.....	33
2.3.1.4	Effizienz der Hb-Einkapselung der Mikropartikel.....	35
2.3.1.5	Bestimmung des Hb-Gehalts in Hb-MP-Suspensionen.....	36
2.3.1.6	Partikelkonzentration	36
2.3.2	<i>Charakterisierung der morphologischen Eigenschaften der Partikel</i>	36
2.3.2.1	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM).....	36
2.3.2.2	Rasterelektronenmikroskopie (SEM).....	37
2.3.2.3	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	38
2.3.2.4	Partikelgröße	38
2.3.3	<i>Charakterisierung der physiko-chemischen Eigenschaften der Partikel</i>	39
2.3.3.1	Partikelaggregation	39
2.3.3.2	Zetapotential	39
2.3.4	<i>Charakterisierung der immunologischen Eigenschaften der Partikel</i>	43
2.3.4.1	Durchflusszytometrie	43
2.3.4.2	Phagozytoseaktivität	44
2.3.4.3	Inkubation in plättchenreichem Plasma (PRP).....	45
2.3.5	<i>Charakterisierung des Gasaustausches</i>	45
2.3.5.1	Sauerstofftransportfunktion	45
2.3.5.2	Sauerstoffbindungskurve (ODC)	46
3	ERGEBNISSE	48
3.1	EFFIZIENZ DER HB-EINKAPSELUNG	48
3.2	HB-MP OHNE MODIFIKATION MIT ANDEREN POLYMEREN	51
3.2.1	<i>Hb-Beladung in MP nach der Herstellung</i>	52
3.2.2	<i>MetHb-Gehalt der Hb-MP</i>	53
3.2.3	<i>Partikelgröße und Morphologie</i>	54
3.2.4	<i>Partikelaggregation</i>	58
3.2.5	<i>Zetapotential</i>	59
3.2.6	<i>Phagozytose der Hb-MP</i>	60

Inhaltsverzeichnis

3.2.7	<i>Inkubation in plättchenreichem Plasma (PRP)</i>	61
3.2.8	<i>Sauerstofftransportfunktion der Hb-MP</i>	62
3.2.9	<i>Sauerstoffbindungskurve (ODC)</i>	64
3.3	PEGYLIERUNG DER PARTIKEL	65
3.3.1	<i>Größe und Morphologie der PEGylierten Hb-MP</i>	65
3.3.2	<i>Partikelaggregation</i>	66
3.3.3	<i>Zetapotential</i>	67
3.3.4	<i>Phagozytose der PEGylierten Hb-MP</i>	68
3.3.5	<i>Inkubation in plättchenreichem Plasma (PRP)</i>	68
3.3.6	<i>Sauerstofftransportfunktion der PEGylierten Hb-MP</i>	69
3.3.7	<i>Sauerstoffbindungskurve (ODC)</i>	70
3.4	HB-HYALURONAN-MISCHPARTIKEL (HB-HA-MP)	71
3.4.1	<i>Größe und Morphologie der Hb-HA-MP</i>	72
3.4.2	<i>Partikelaggregation</i>	74
3.4.3	<i>Zetapotential</i>	75
3.4.4	<i>Phagozytose der Hb-HA-MP</i>	76
3.4.5	<i>Inkubation in plättchenreichem Plasma (PRP)</i>	77
3.4.6	<i>Sauerstofftransportfunktion der Hb-HA-MP</i>	78
3.4.7	<i>Sauerstoffbindungskurve (ODC)</i>	79
3.5	HB-HUMANALBUMIN-MISCHPARTIKEL (HB-HSA-MP)	80
3.5.1	<i>Größe und Morphologie der Hb-HSA-MP</i>	81
3.5.2	<i>Partikelaggregation</i>	82
3.5.3	<i>Zetapotential</i>	83
3.5.4	<i>Phagozytose der Hb-HSA-MP</i>	83
3.5.5	<i>Inkubation in plättchenreichem Plasma (PRP)</i>	84
3.5.6	<i>Sauerstofftransportfunktion der Hb-HSA-MP</i>	85
3.5.7	<i>Sauerstoffbindungskurve (ODC)</i>	87
3.6	MODIFIKATION MIT DX/DX-HSA/DX-MPEG	87
3.6.1	<i>Größe und Morphologie der Hb-Dx-(HSA/mPEG)-MP</i>	88
3.6.2	<i>Partikelaggregation</i>	90
3.6.3	<i>Zetapotential</i>	91
3.6.4	<i>Phagozytose der Hb-Dx-(HSA/mPEG)-MP</i>	91
3.6.5	<i>Inkubation in plättchenreichem Plasma (PRP)</i>	92
3.6.6	<i>Sauerstofftransportfunktion der Hb-Dx-(HSA/mPEG)-MP</i>	93

Inhaltsverzeichnis

3.6.7	<i>Sauerstoffbindungskurve (ODC)</i>	95
4	DISKUSSION	96
4.1.1	<i>Methode zur Hb-MP-Herstellung</i>	97
4.1.2	<i>Methämoglobinbildung</i>	102
4.1.3	<i>Morphologische Eigenschaften der Partikel</i>	104
4.1.4	<i>Physiko-chemische Eigenschaften der Partikel</i>	106
4.1.4.1	Zetapotential	106
4.1.4.2	Stabilität der Partikel in Salzlösungen	107
4.1.4.3	Stabilität der Partikel in PRP	109
4.1.5	<i>Immunologische Eigenschaften der Partikel</i>	109
4.1.5.1	Phagozytose der Partikel.....	109
4.1.5.2	Partikelaggregation / Thrombozytenaktivierung.....	111
4.1.6	<i>Sauerstoffbindung und Sauerstoffabgabe</i>	112
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	115
5.1	ZUSAMMENFASSUNG	115
5.2	AUSBLICK	116
5.3	SUMMARY	117
5.4	PERSPECTIVES.....	118
	ABKÜRZUNGEN	119
	LITERATURVERZEICHNIS	122
	PUBLIKATIONEN	133
	DANKSAGUNG	134
	LEBENS LAUF	135

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

„Blut ist ein ganz besonderer Saft“ [1]. Blut ist als flüssiges Gewebe Teil des Herz-Kreislauf-Systems [2]. Es besteht aus den zellulären Bestandteilen Erythrozyten (*red blood cell*, RBCs), Leukozyten und Thrombozyten und dem zellfreien Plasma. Blut hat eine Vielzahl lebenswichtiger Funktionen im Körper. Es gewährleistet die Homöostase, ist beteiligt am Immunsystem und dient als ausgezeichnetes Transportsystem für den An- und Abtransport für alle am Stoffwechsel beteiligten Substrate [2].

Herausragend bei der Transportfunktion ist der lebensnotwendige Sauerstofftransport durch die Erythrozyten. 30 % des Zellinhaltes der Erythrozyten bestehen aus Hämoglobin, das für Austausch und Transport der Atemgase verantwortlich ist [2]. Bei akutem Blutverlust (z. B. durch Operation, Trauma) oder chronischer Anämie (z. B. durch Niereninsuffizienz, Tumoranämie) können die Körperorgane nicht mehr genügend mit Sauerstoff versorgt werden. Um die anämische Hypoxie zu vermeiden und das Leben zu retten, ist in solchen Fällen die Transfusion von Erythrozyten notwendig.

Die Bluttransfusion wurde erst nach der Entdeckung des AB0-Systems der Blutgruppen durch Karl Landsteiner möglich [3]. Nachdem geeignete Antikoagulanzen und Aufbewahrungsmethoden für Blut gefunden worden waren, konnten Blutkonserven angelegt werden. Die Bluttransfusion ist seitdem ein wichtiger Bestandteil medizinischer Behandlungen [4–6].

Blut ist ein wertvolles Gut. Im Jahr 2008 wurden mehr als 90 Millionen Blutspenden weltweit durchgeführt. Fast die Hälfte davon erfolgte in den Industriestaaten (etwa 15 % der Weltbevölkerung) und nur 4,3 % der globalen Blutspenden erfolgten in der afrikanischen Region (12 % der Weltbevölkerung) [7]. In Deutschland betrug im Jahr 2009 die Gesamtzahl der Blutspenden 4,86 Millionen [8], in diesem Jahr wurden 4,7 Millionen Transfusionseinheiten Erythrozytenkonzentrate (EK) hergestellt [8]. Pro 1.000 Einwohner wurden durchschnittlich 36,4 Blutspenden in den entwickelten Industriestaaten, 11,6 Blutspenden in Schwellenländern und nur 2,8 Blutspenden in Entwicklungsländern

Einleitung

geleistet [7]. Im Vergleich dazu sind die Menschen in Deutschland momentan mit 60 Blutspenden pro 1.000 Einwohner gut selbstversorgt [8]. Das wird sich jedoch ändern. Aufgrund der demografischen Entwicklung in Deutschland wird die Einbuße in der Blutversorgung bei gleichzeitigem Ansteigen des Bedarfs erwartet [8].

Jede Bluttransfusion ist mit einem gewissen Risiko verbunden. Am häufigsten treten allergische Transfusionsreaktionen mit mildem Verlauf auf [5]. Akute hämolytische Transfusionsreaktionen aufgrund von Fehltransfusionen trotz vorgeschriebener Blutgruppen-Kompatibilitätäsprüfung sind eine häufige Ursache für Transfusionszwischenfälle (1 : 20.000 bis 1 : 40.000 der Fälle), die sehr oft tödlich verlaufen [9]. Andere Komplikationen entstehen dadurch, dass irreguläre Antikörper im Empfänger aufgrund einer vorangegangenen Transfusion oder bei Schwangerschaft gebildet wurden. Diese Alloantikörper sind zum Zeitpunkt der Transfusion nicht nachweisbar, treten aber bei der erneuten Exposition nach der Boosterung wieder auf und lösen eine verzögerte hämolytische Transfusionsreaktion aus (Häufigkeit von maximal 1 : 1.000) [9–11]. Im Vergleich zu diesen transfusionsbedingten Reaktionen ist das Risiko für eine transfusionsassoziierte Virusinfektionen Dank der aufwendigen Labortests wesentlich geringer (s. **Tabelle 1-1**). Zwischen 2005 und 2009 wurden nur acht transfusionsbedingte Infektionen von HBV, HCV und HIV bei Anwendung von ca. 22 Millionen Einheiten EK in Deutschland registriert [12].

Tabelle 1-1: Häufigkeiten transfusionsassoziiierter Virusinfektionen [11,13].

Virus	Risiko je transfundierte Einheit
Hepatitis-B-Virus (HBV)	1 : 10 ⁵ - 1 : 10 ⁶
Hepatitis-C-Virus (HCV)	< 1 : 10 ⁶
Humane Immundefizienz-Virus (HIV)	1 : 10 ⁶ - 1 : 10 ⁷

Das Risiko der Virusübertragung durch Transfusion kann in manchen Ländern höher als in Deutschland sein. Im Jahr 2008 wurden die Blutspenden in 39 Ländern noch nicht routinemäßig auf HBV, HCV, HIV und Syphilis getestet und 47 % der Blutspenden in Entwicklungsländern wurden in Laboratorien ohne Qualitätssicherung getestet [7].

Weitere Transfusionsreaktionen wie z. B. transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz und transfusionsbedingte bakterielle Infektionen können ebenfalls nicht völlig ausgeschlossen werden [9–12].

Weitere Probleme entstehen durch begrenzte Ressourcen an geeigneten Spendern sowie durch die Kosten für die Herstellung, Lagerung und den Vertrieb der Blutkonserven. So beträgt die Haltbarkeit der EKs bei nicht unterbrochener Kühlkette in Abhängigkeit vom Lagerungsmedium zwischen 35 und 49 Tagen [14,15]. Die Kosten für ein EK werden sehr unterschiedlich kalkuliert. Blutspendedienste in Deutschland verkaufen eine EK-Einheit an Kliniken für ca. 75 – 85 € [16–19], innerhalb von Europa und den USA variieren diese Preise zwischen 75 – 230 € [18–22]. Wenn alle Kosten wie Beschaffung, Überwachung, Logistik, Regress für Transfusionszwischenfälle einschließlich Versicherung und Rechtsstreitigkeiten, Logistik und Aufrechterhaltung des Hämovigilanz-Systems berücksichtigt würden, dann belief sich der Preis für eine EK-Einheit auf 350 - 500 € [20,23,24].

Zusätzlich können EKs nur bei systemischem Sauerstoffmangel, aber nicht gezielt als Sauerstofftherapeutikum nach lokalem Bedarf (z. B. bei Minderdurchblutung eines Gewebes) eingesetzt werden.

Aus den oben genannten sowohl ethischen als auch kommerziellen Gründen gibt es einen dringenden Bedarf, einen geeigneten Blutersatz (*blood substitutes, artificial blood*) zu finden, wobei es gegenwärtig in erster Linie um die Entwicklung von künstlichen Sauerstoffträgern (*artificial oxygen carriers*) geht. Der Begriff “Blutersatz” ist jedoch zu global und sollte deshalb vermieden werden. Nach Squires [4] sollte ein idealer Sauerstoffträger

- Sauerstoff effektiv transportieren und abgeben,
- universal kompatibel, d. h. Blutgruppen unabhängig, sein,
- eine lange Haltbarkeit haben,
- lange genug im Kreislauf verbleiben und dabei seine Funktion permanent erfüllen,
- keine unerwünschten Wirkungen auslösen,
- frei von Krankheitserregern,
- kostengünstig und jederzeit verfügbar sein.

In der Phase der Erprobung und Entwicklung befinden sich derzeit zwei Arten von künstlichen Sauerstoffträgern: Perfluorcarbon-basierte Sauerstoffträger (Perfluorcarbon-Emulsionen) und Hämoglobin-basierte Sauerstoffträger (*hemoglobin-based oxygen carriers*, HBOCs).

1.2 Perfluorcarbon (PFC)-Emulsionen

Perfluorcarbone (PFCs) sind (fast) vollständig mit Fluor substituierte synthetische Kohlenstoffverbindungen; zum Teil tragen sie auch einzelne Brom- oder Chlorsubstituenten [25,26]. Sie sind chemisch inert und hydrophob. Biologisch verhalten sich PFCs im Wesentlichen inert. PFCs besitzen eine hohe Gastransportkapazität. Aufgrund der mangelhaften Wasserlöslichkeit müssen PFCs vor einer intravenösen Anwendung in Emulsion gebracht werden [4,5,26–28].

Im Jahr 1966 hatten Clark und Golan in einem spektakulären Experiment gezeigt, dass eine in einer mit Sauerstoff gesättigten PFC-Lösung getauchte Maus atmen und überleben konnte [29]. Dies war der Beginn intensiver Forschungen zum Einsatz von PFCs als Sauerstoffträger.

PFCs können große Mengen an Gasen wie O_2 und CO_2 physikalisch lösen [5,27,28], während Hämoglobin Sauerstoff koordinativ bindet (s. **Abb. 1-1**) [5,26,27,30].

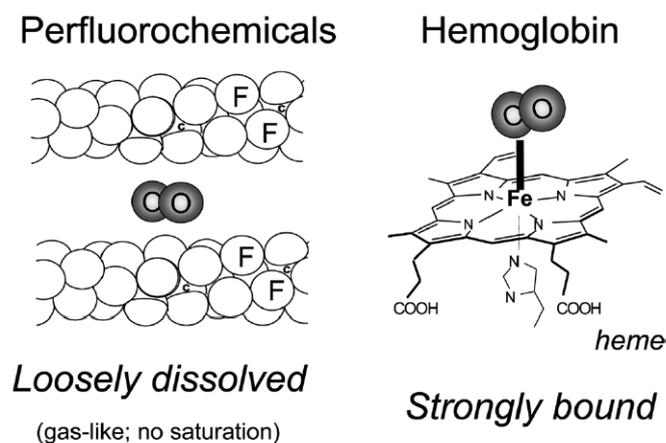


Abb. 1-1: Sauerstofftransport durch PFCs und Hämoglobin. In PFCs ist der Sauerstoff physikalisch gelöst, bei Hämoglobin ist der Sauerstoff an das Eisenatom des Häms koordinativ gebunden [30].

Deshalb sieht die Sauerstoffbindungskurve von PFCs anders aus als die des Hämoglobins. Die Menge an physikalisch gelöstem Sauerstoff in PFC-Emulsionen ist direkt proportional zum Sauerstoffpartialdruck (pO_2) und unterliegt keiner Sättigungskinetik. Bei einem gegebenen pO_2 bindet Hämoglobin mehr Sauerstoff als in PFCs gelöst werden kann (s. **Abb. 1-2**) [4,5]. Die Sauerstoffmenge in PFC-Emulsionen ist unter normalem Luftsauerstoffpartialdruck im Vergleich zum Hämoglobin unzureichend. Daher müssen die PFC-Emulsionen klinisch mit hohen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen (also mit hohem pO_2) eingesetzt werden, d. h. die Patienten müssen dazu beatmet werden [5,26,27].

Ein Vorteil von PFCs gegenüber Hämoglobin besteht darin, dass PFCs verschiedene Gase unabhängig voneinander lösen und transportieren. Die Anwesenheit von Kohlenmonoxid stört den Sauerstofftransport durch PFCs nicht [26,27]. Außerdem können PFC-Emulsionen im großen Maßstab hergestellt und aufgereinigt werden [5,28].

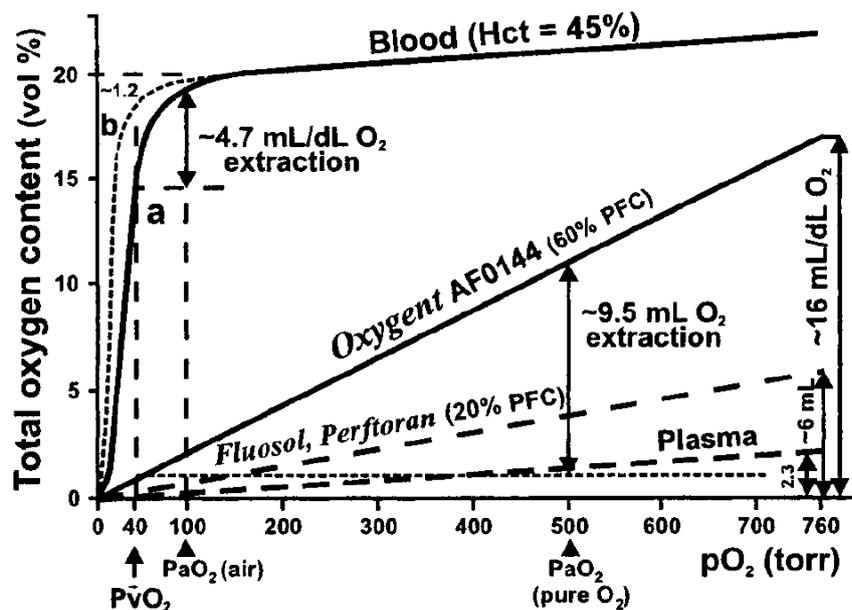


Abb. 1-2: Sauerstoffbindungskurven verschiedener PFCs, a) Vollblut und b) zellfreiem Hämoglobin [5]. PvO_2 : venöser Sauerstoffpartialdruck.

Nach der intravenösen Applikation von PFC-Emulsionen werden PFCs nicht metabolisiert. Die Emulsionströpfchen werden zuerst von im Blut zirkulierenden Monozyten und in den Geweben lokalisierten Makrophagen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) phagozytiert, was auch für die begrenzte intravasale Halbwertszeit der PFC-Emulsionen verantwortlich ist [5,26]. PFCs werden vorübergehend im MPS der Leber und Milz

gespeichert und nicht verstoffwechselt. Wenn die phagozytierten PFC-Moleküle wieder durch die Zellmembranen der MPS-Organen ins Blut diffundieren, werden sie von zirkulierenden Lipidträgern aufgenommen und zur Lunge transportiert. Dort werden die PFCs durch Abatmung ausgeschieden [5,26,30].

Nebenwirkungen der PFC-Emulsionen sind z. B. Fieber, grippeähnliche Symptomatik, Thrombozytopenie, allergische Hautrötung. Diese sind jedoch mild und vorübergehend [26].

Die PFC-Emulsionen der ersten Generation (Fluosol®, Perftoran®) enthalten weniger als 20 % Gewicht/Volumen (w/v) PFC; die Sauerstofftransportkapazität ist begrenzt. Fluosol® (Green Cross Corp., Japan) wurde 1989 für die Risiko-Koronarangioplastie in den USA zugelassen [26]. In klinischen Studien hatte Fluosol® keinen Nutzen als Ersatz bei Blutverlust gezeigt [28]. Der in Fluosol® enthaltene Emulgator Poloxamer-188 (*Pluronic F68*) verursachte viele unerwünschte Wirkungen wie Komplementaktivierung, Hemmung der Leukozyten, temporäre Thrombozytopenie und Anaphylaxie [5,28]. Die Emulsion ist instabil und muss für den Transport und die Lagerung tiefgefroren werden. Diese Eigenschaften waren wesentliche Ursachen für den kommerziellen Misserfolg von Fluosol®. 1994 wurde die Produktion von Fluosol® eingestellt [5,26]. Perftoran® (Russian Academy of Sciences / Perftoran Company) wurde für den klinischen Einsatz als temporärer intravaskulärer Sauerstoffträger für hämorrhagischen Schock und Perfusion von menschlichen Organen 1996 in Russland sowie in Kasachstan, der Ukraine, Kirgisien und Mexiko zugelassen [5,28]. Perftoran® muss ebenfalls tiefgefroren gelagert werden [28].

Die PFC-Emulsionen der zweiten Generation besitzen einen deutlich höheren PFC-Gehalt (mindestens 60 %, w/v), werden unter Verwendung nicht synthetischer Phospholipide hergestellt und müssen für die Lagerung nicht eingefroren werden.

Oxygent® (Alliance Pharmaceutical Corporation, USA) enthält 58 % (w/v) Perfluorooctylbromid und 2 % (w/v) Perfluorodecylbromid als Wirkstoffe und 3,6 % (w/v) Phospholipide aus Eilecithin als Emulgator [28,31]. Die Tröpfchengröße der Emulsion liegt bei 160 nm. Oxygent® ist bei 5 – 10 °C ein bis zwei Jahre stabil [28,30]. In klinischen Studien wurden positive [28] als auch negative Effekte [32,33] erzielt. Der

Hersteller von Oxygent®, Alliance Pharmaceutical Corporation, musste die weitere Entwicklung wegen mangelnder Finanzierung einstellen. Inzwischen wurde die klinische Entwicklung von Oxygent® durch Double-Crane Pharmaceutical China wieder aufgenommen [30,33,34].

Oxyfluor® (HemaGen/PFC, USA) ist eine andere PFC-Emulsion der zweiten Generation. Es enthält 78 % (w/v) Perfluordichloroctan als Wirkstoff und ebenfalls Phospholipide aus Eilecithin als Emulgator. Die Tröpfchengröße der Emulsion liegt zwischen 100 und 350 nm. Die Emulsion hat eine Haltbarkeit von einem Jahr bei Raumtemperatur (RT) [28]. Die Emulsion enthält einen kleinen Anteil von Distelöl. Ursprünglich wurde Distelöl (Triglyceride) zugegeben, um die Stabilität der Emulsion zu erhöhen. Die stabilisierende Wirkung der zugegebenen Triglyceride wurde jedoch experimentell nicht eindeutig nachgewiesen [5,34]. Die Entwicklung von Oxyfluor® wurde nach Erreichen der klinischen Phase-II-Studien wegen Rückzug der Finanzierung von dem Partner Baxter International gestoppt [35].

Derzeit sind nur wenige PFC-Emulsionen in der Entwicklung. Oxycyte® (Oxygen Biotherapeutics, Inc., vormals Synthetic Blood Int., USA) befindet sich in klinischen Phase-IIb-Studien für die Behandlung traumatischer Hirnverletzungen. In Kolumbien und Frankreich sind neue PFC-Emulsionen in der präklinischen Erprobung [27,28].

1.3 Hämoglobin-basierte Sauerstoffträger (HBOCs)

1.3.1 Hämoglobin-Physiologie

Hämoglobin ist ein globuläres Protein in den RBCs mit einem Molekulargewicht von 64,5 Kilodalton (kDa). Es ist für den Transport von Sauerstoff im menschlichen Körper verantwortlich und am Transport von anderen Gasen wie CO₂ und NO beteiligt [2,36].

Die Struktur des Hämoglobins wurde von Perutz et al. im Jahr 1959 mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt [37]. Hämoglobin besteht aus vier Untereinheiten (s. **Abb. 1-3**): je zwei α -Untereinheiten mit 141 Aminosäuren und zwei β -Untereinheiten mit 146 Aminosäuren [38]. Die α - und β -Untereinheiten bilden durch van der Waals- und

Einleitung

Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen dichte $\alpha\beta$ -Dimere; zwei $\alpha\beta$ -Dimere binden locker zu tetramerem Hämoglobin [5]. Jede Untereinheit ist mit einer prosthetischen Gruppe, dem Häm, verbunden. Das Häm ist ein Eisen(II)-Komplex des Protoporphyrins IX und über das proximale Histidin an den Globinteil koordinativ gebunden. Es ist in der Lage, ein Molekül Sauerstoff zu binden. Die Bindung des Sauerstoffs erfolgt an das Eisenion des Häms (s. **Abb. 1-3**) [38]. Ein Hämoglobin-Molekül kann also vier Sauerstoffmoleküle binden.

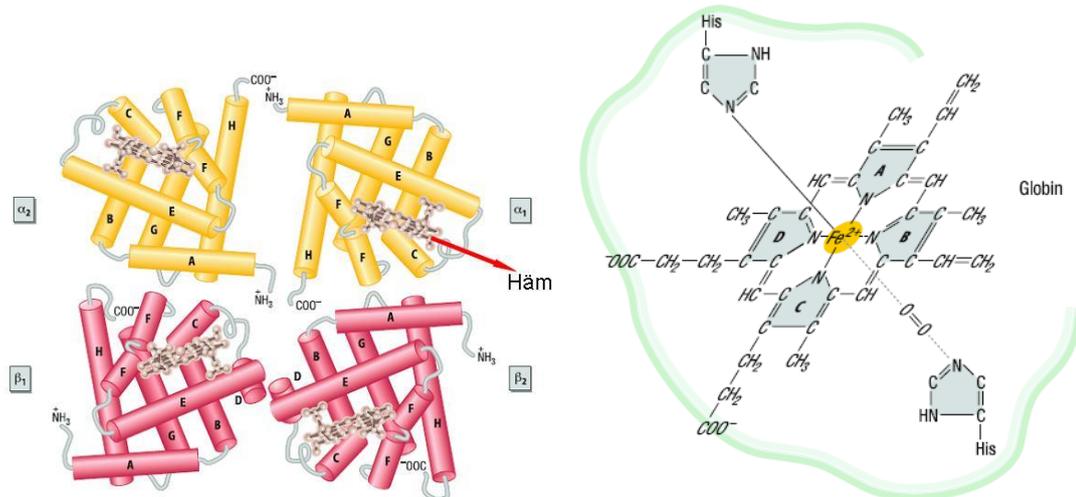


Abb. 1-3: Die Struktur des Hämoglobintetramers (links) und des Häms (rechts) [38].

Hämoglobin kommt in zwei verschiedenen Konformationen vor. Oxygeniertes Hämoglobin liegt in der R (relaxed)-Konformation vor und desoxygeniertes Hämoglobin liegt in der T (tensed)-Konformation vor. In dem desoxygenierten Zustand befindet sich das Eisenion des Häms außerhalb der Ringebene des Porphyringerüsts und das Porphyrinsystem ist durchgebogen. Lagert sich nun ein Sauerstoffmolekül an das Eisenion an, ändert sich die Elektronenkonfiguration des Moleküls und führt zu einer Bewegung des Eisenions in die Ebene des Porphyrinrings. Der Sauerstoff ist zwischen dem zentralen Eisenion und dem distalen Histidin gebunden [38]. Nach dem Übergang von der T-Konformation zur R-Konformation wird das $\alpha_1\beta_1$ -Dimer relativ zum $\alpha_2\beta_2$ -Dimer um etwa 15° verdreht [38].

Die Bindung von Sauerstoff an ein Hämoglobin-Tetramer ist ein kooperativer Prozess. Die Bindung eines Sauerstoffmoleküls an eine Hämoglobinuntereinheit führt zu Konformationsänderung in der Tertiär- und Quartärstruktur des Hämoglobins, d. h. von der T-Konformation zur R-Konformation. Letztere hat eine 70 Mal höhere Sauerstoffaffinität

im Vergleich zur T-Konformation. Die Sauerstoffaffinität ist gering bei niedrigerem pO_2 , steigt aber mit jeder Anlagerung eines weiteren Sauerstoffmoleküls. Als Folge ist die Sauerstoffbindungskurve des Hämoglobins sigmoidal (s. **Abb. 1-4**) [38].

Als Sauerstoffaffinität des Hämoglobins wird das Verhältnis zwischen Sauerstoffpartialdruck und der Beladung des Hämoglobinmoleküls mit Sauerstoff (Sauerstoffsättigung) bezeichnet. Die Sauerstoffaffinität von Hämoglobin kann durch Messen der Sauerstoffbindungskurve bestimmt werden. Ein quantitatives Maß ist der $p50$, der pO_2 bei Halbsättigung des Hämoglobins. Der $p50$ des in menschlichen Erythrozyten befindlichen Hämoglobins eines gesunden Erwachsenen beträgt 26,6 mmHg (35,4 hPa) bei pH 7,4 und 37 °C [36]. Erhöhter $p50$ deutet auf eine verminderte Affinität zu Sauerstoff, während niedriger $p50$ erhöhte Sauerstoffaffinität zeigt.

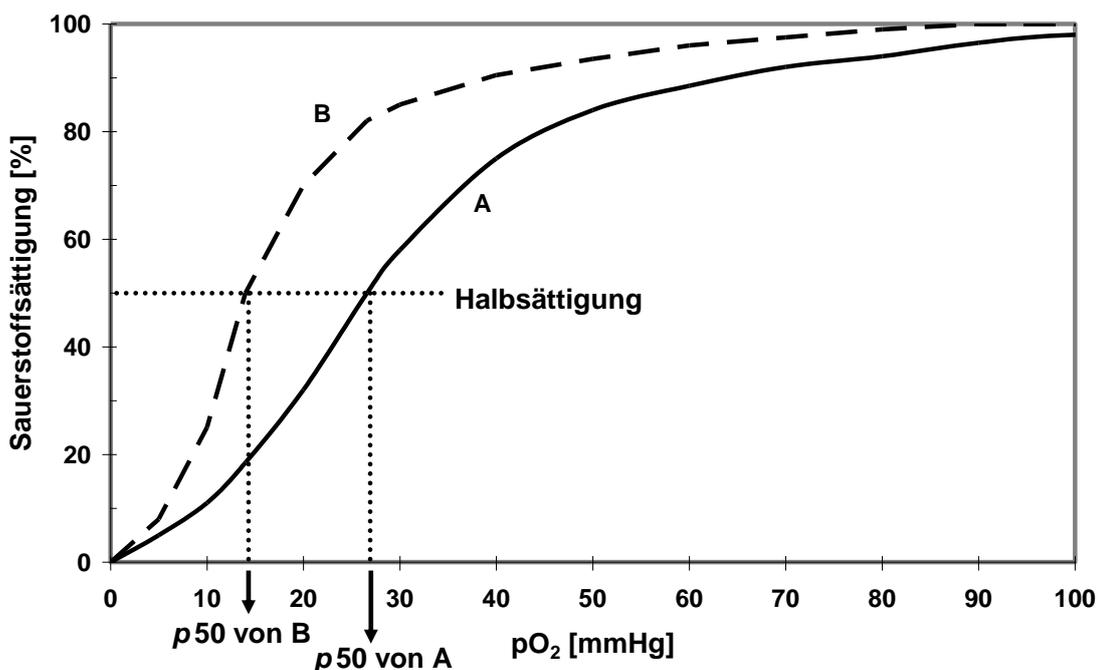


Abb. 1-4: Sauerstoffbindungskurven von Human-Hämoglobin in RBCs A) mit $p50$ von 26,6 mmHg und zellfreiem Human-Hämoglobin B) mit $p50$ von 14 mmHg, modifiziert nach [5].

Die Sauerstoffbindungskurve wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Ein Anstieg von H^+ -Konzentration (pH-Wert erniedrigt), CO_2 -Druck, Temperatur und Konzentration von 2,3-Bisphosphoglycerat (2,3-BPG) bewirkt eine Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve (erhöhter $p50$, erniedrigte Sauerstoffaffinität). Eine Verminderung dieser Faktoren bewirkt eine Linksverschiebung (erniedrigter $p50$, erhöhter

Sauerstoffaffinität). Eine Erhöhung der H^+ -Konzentration stabilisiert den T-Zustand des Hämoglobins und führt zur Freisetzung von Sauerstoff. Die Aufnahme von Sauerstoff bei erniedrigter H^+ -Konzentration ist mit der Abgabe von Protonen verbunden. Dieser Effekt wurde von Bohr entdeckt [39] und wird als Bohr-Effekt bezeichnet. 2,3-BPG und andere anionische Substanzen, vor allem ATP, anorganisches Phosphat und Chloridionen stabilisieren ebenfalls die T-Konformation und erhöhen somit den $p50$ des Hämoglobins. Der $p50$ des humanen Hämoglobins in RBCs wird durch intrazellulär zur Verfügung stehendes 2,3-BPG stark beeinflusst; zellfreies humanes Hämoglobin (d. h. Abwesenheit von 2,3-BPG) hat einen $p50$ von nur ca. 14 mmHg (18,6 hPa) (s. **Abb. 1-4**) [4,5,38,40–42].

In Gegenwart von Sauerstoff neigt Hämoglobin zur spontanen Autooxidation, wobei das zweiwertige zum dreiwertigen Eisen oxidiert wird. Das entstehende Methämoglobin ist nicht mehr in der Lage, Sauerstoff zu transportieren. Aufgrund des intraerythrozytären Reduktionssystem wird eine Methämoglobinkonzentration von 1 - 2 % nicht überschritten [5,36,43].

1.3.2 Stromafreies Hämoglobin (SFH)

Aufgrund der nachgewiesenen Fähigkeit des Hämoglobins zum Sauerstofftransport scheint stromafreies Hämoglobin (SFH) die logische Wahl für einen Erythrozytenersatz zu sein, da es frei von Blutgruppen ist. Von Starck stellte bereits im Jahr 1898 die erste zellfreie Hämoglobinlösung her [44]. 1916 berichteten Sellards und Minot über eine stabilere Hämoglobinlösung [45]. Amberson et al. publizierten zum ersten Mal Ergebnisse nach Infusionen einer Hämoglobinlösung beim Menschen. Sie beobachteten eine Erhöhung des Blutdruckes, Bradykardie und Oligurie bis hin zum Nierenversagen [46]. Als Ursache wurde eine Beeinträchtigung der Organfunktion durch die Verunreinigung der Hämoglobinlösungen mit Stromafragmenten angesehen [47]. Erst eine von Rabiner entwickelte neue Filtrationsmethode ermöglichte die Herstellung von SFH [48] und gab Anlass zur Hoffnung auf eine bessere Verträglichkeit des Hämoglobins.

Die mit SFH gewonnenen Ergebnisse waren jedoch enttäuschend. Hämoglobin dissoziiert außerhalb des RBCs schnell in zwei $\alpha\beta$ -Dimere, welche leicht durch die Nierenglomeruli herausgefiltert werden. Die nephrotoxische Häm-Gruppe verursacht eine Nierenblockierung, was zu akutem Nierenversagen führen kann [4,5,49–51]. Die

Neurotoxizität wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet [52–54]. Freie Hämoglobine induzieren außerdem eine Vasokonstriktion und Hypertonie [5,50,55–60].

Wegen zahlreicher schwerwiegender Nebenwirkungen von SFH *in vivo*, wurden damit die Versuche als potenzieller Blutersatz aufgegeben.

1.3.3 Modifiziertes azelluläres Hämoglobin

Zellfreies Human-Hämoglobin hat wegen des Verlustes von 2,3-BPG einen niedrigeren $p50$ (s. **Abb. 1-4**). Ein höherer bzw. ein mit den RBCs vergleichbarer $p50$ des Hämoglobins wurde jedoch in der früheren Entwicklung angestrebt, um die Sauerstoffabgabe an das Gewebe zu erleichtern. Einfaches Hinzufügen von 2,3-BPG zu einer SFH-Lösung war wegen seiner schnellen Elimination unwirksam [61]. Eine Verschiebung der Sauerstoffbindungskurve nach rechts und ein damit verbundener erhöhter $p50$ konnte erreicht werden, indem Hämoglobin mit Pyridoxalphosphat pyridoxaliert wurde (Pyridoxalation) [62,63]. Die Aldehydgruppe des Pyridoxalphosphats reagiert mit der Aminogruppe in der 2,3-BPG-Bindungstasche und der allosterische Modulator Pyridoxalphosphat wird an die 2,3-BPG-Bindungstasche gekoppelt [5].

Um die Dissoziation des freien Hämoglobintetramers in $\alpha\beta$ -Dimere zu vermeiden, die zu einer hohen Toxizität und kurzen Halbwertszeit des Hämoglobins führen würde, muss das Hämoglobin chemisch stabilisiert werden.

Hämoglobin kann mit spezifischem Vernetzungsmittel intramolekular zu einem stabilen Tetramer vernetzt werden [4,5,64–66]. Ein bekanntes Beispiel dafür ist das mit Bis-3,5-dibromosalicylfumarat (DBBF oder Diaspirin) vernetzte humane Hämoglobin DCLHb (*Diaspirin Cross-Linked Human Hemoglobin*, HemAssist™, Baxter, USA). DBBF vernetzt spezifisch die zwei Lysin-99-Reste der beiden α -Untereinheiten des desoxygenierten Hämoglobins in Gegenwart von Natriumtripolyphosphat und stabilisiert somit das Hämoglobintetramer [67,68]. HemAssist™ hat einen hohen $p50$ von 32 mmHg (42,6 hPa) und eine Halbwertszeit *in vivo* von 6 - 12 h [69,70]. Es zeigte jedoch viele Nebenwirkungen wie Vasokonstriktion, Gehirn- und Lungenödeme, Myokardischämie und erhöhte Mortalität in klinischen Studien [69,71,72]. Die Entwicklung von HemAssist™

wurde wegen zahlreicher schwerwiegender unerwünschter Ereignisse im Jahr 1998 von Baxter eingestellt [5].

Hämoglobin kann auch mit Vernetzern polymerisiert werden. Intermolekulare Vernetzung führt zur Erhöhung der Molekülgröße mit gleichzeitiger Reduktion des onkotischen Drucks. Die Dissoziation des Hämoglobins wird verhindert und die Plasmahalbwertszeit wird erhöht [5]. Die Polymerisierung wird üblicherweise in freier Hämoglobinlösung durchgeführt. Die Produkte sind meistens heterogen in Bezug auf das Molekulargewicht und müssen fraktioniert werden, was zu einer verringerten Ausbeute führt und zusätzliche Kosten verursacht [5]. Die Methämoglobinbildung während der Polymerisation ist oft beträchtlich [5]. Häufig werden bi- oder multifunktionelle Vernetzer eingesetzt und die intra- und intermolekulare Vernetzungen finden meistens gleichzeitig statt [5,15,73,74]. Gängige Vernetzer sind z. B. Glutaraldehyd und oxidierte Raffinose (o-Raffinose) [5,73]. Es wurden verschiedene vernetzte Hämoglobine entwickelt, z. B. das mit o-Raffinose polymerisierte Human-Hämoglobin Hemolink™ (Hemosol Inc., Canada), das mit Glutaraldehyd vernetzte Rinder-Hämoglobin Hemopure® oder HBOC-201 (OPK Biotech ehemals BioPure Corporation, USA) und das mit Glutaraldehyd vernetzte pyridoxalierte Human-Hämoglobin PolyHeme® (Northfield Laboratories, USA).

Hemolink™ und Hemopure® enthalten beide eine Mischung aus vernetztem Hämoglobintetramer und Hämoglobinoligomer. Hemolink™ hat einen $p50$ von 34 mmHg (45,2 hPa). Hemopure® ist durchschnittlich 250 kDa groß mit einem $p50$ von 38 mmHg (50,5 hPa) und hat eine Halbwertszeit von 19 h. PolyHeme® hat ein Molekulargewicht von 150 kDa, einen $p50$ von 28 - 30 mmHg (37,2 -39,9 hPa), eine Halbwertszeit von 24 h und weniger als 1 % vernetztes Tetramer [5,75–78]. Diese Produkte konnten in klinischen Studien die Fremdbluttransfusion reduzieren, hatten aber auch viele schwerwiegende Nebenwirkungen, wie Vasokonstriktion, Hypertonie, erhöhte Mortalität ausgelöst [27,69,75,79,80]. Hemolink™ wurde inzwischen vom Markt genommen [27]. Die weitere Entwicklung von PolyHeme® wurde nach der Ablehnung des Zulassungsantrages durch die Food and Drug Administration (FDA, USA) im Mai 2009 ebenfalls eingestellt [27]. Hemopure® ist seit 2001 in Südafrika zur Behandlung von Erwachsenen mit akutem Blutverlust zugelassen, allerdings droht zur Zeit ein Widerruf der Zulassung [81]. Derzeit wird Hemopure® in zusätzlichen Studien erprobt. Indes hat die FDA bereits eine Studie vorzeitig beendet [27].

Eine andere Möglichkeit der Stabilisierung des freien Hämoglobins ist die Copolymerisation des Hämoglobins mit Superoxiddismutase (SOD) und Katalase (CAT), welche antioxidative Eigenschaften zeigen und eine reduzierte Methämoglobinbildung bewirken. Dadurch könnte sowohl das Gewebe als auch das Hämoglobinpolymer gegen die reaktiven Sauerstoffspezies während der Infusion geschützt werden [82–85].

Eine andere Strategie zur Polymerisierung des Hämoglobins ist die „Zero-Link Polymerisation“, bei der die Hämoglobinmoleküle durch direkte intermolekulare Pseudopeptidbindungen ohne Anwendung von polymerisierenden Vernetzern aneinander gekoppelt werden. Die Carboxygruppen der Hämoglobinmoleküle werden mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid aktiviert und anschließend mit Lysinresten von anderen Hämoglobinmolekülen zu stabilen Amidbindungen verbunden [86,87]. Das nach diesem Prinzip aus Rinder-Hämoglobin hergestellte Produkt OxyVita™ (ZL-HBv, OXYVITA Inc., USA) ist ca. 36 nm groß mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 17 Megadalton. Es hat eine sehr hohe Sauerstoffaffinität mit einem $p50$ von 6 mmHg (8 hPa), OxyVita™ ist derzeit in präklinischen Studien [88,89].

Hämoglobin kann ebenfalls an ein biokompatibles Polymer wie Polysaccharide oder Polyethylenglykol (PEG) konjugiert werden. Damit werden die Molekülgröße und die Halbwertszeit in Plasma erhöht [5,73]. Hemospan® (MP4) von Sangart Inc. ist ein Produkt aus mit Maleinimid-Polyethylenglykol konjugiertem Human-Hämoglobin. Jedes Hämoglobintetramer ist mit sechs PEG-Ketten modifiziert. Hemospan® hat mit einem $p50$ von 4 - 6 mmHg (5,3 - 8 hPa) eine sehr hohe Sauerstoffaffinität [90]. Sangart hat zwei Phase-III Studien mit Indikation der orthopädischen Chirurgien (Hüftendoprothetik) bereits vollendet. Derzeit befindet sich Hemospan® mit Indikation Trauma in einer Phase-IIb Studie [91].

Über eine Kombination von Polymerisation und Konjugation wurde ebenfalls berichtet. Hämoglobin-Hyperpolymer (HP₃Hb, SanguiBioTech GmbH) ist mit Glutaraldehyd vernetztes und mit PEG modifiziertes Schweine-Hämoglobin. HP₃Hb hat ein mittleres Molekulargewicht von 800 kDa, einen $p50$ von 16 mmHg (21,3 hPa) und eine Halbwertszeit von bis zu 30 h in Ratten [92].

1.3.4 Verkapseltes Hämoglobin

Die Mikroinkapselung von Hämoglobinlösungen ist eine Alternative, um die Dissoziation und rasche Elimination des Hämoglobintetramers zu verhindern [5]. Um die Methämoglobinbildung zu reduzieren, können Enzyme und Reduktionsmittel ebenfalls mit eingekapselt werden. Chang gelang es als erster, Hämoglobin in Mikrokapseln mit semipermeabler Membran erfolgreich einzukapseln [93]. Seitdem werden Hämoglobin-Verkapselungen in Nano/Mikrokapseln intensiv untersucht.

Bei den Nano-/Mikrokapseln spielen Liposomen eine Rolle. Liposomenverkapseltes Hämoglobin (*liposome-encapsulated hemoglobin*, LEH) hat zwar potentielle Vorteile im Vergleich zu anderen Systemen, besitzt jedoch nur eine kurze Halbwertszeit von einigen Stunden. Andere Nachteile wie Komplementaktivierung, Thrombozytopenie, Belastung des MPS-Systems, Ineffizienz und hohe Kosten der Produktion und kurze Haltbarkeit ließen LEH älterer Generation in präklinischen und klinischen Entwicklungen nicht weiter fortschreiten [94].

Die jüngste Entwicklung der LEH sind Hämoglobin-Vesikel (HbV), bei denen die Partikelgröße, Anzahl der Lipidschichten und Oberflächenmodifikation optimiert wurden [95]. HbV haben eine hohe Verkapselungseffizienz für Hämoglobin, eine durchschnittliche Vesikelgröße von 250 nm, eine erhöhte Halbwertszeit von 32 h in Ratten, können die Thrombozytenaktivierung durch Verwendung synthetischer Lipide reduzieren und verfügen durch PEG-Modifikation über eine verlängerte Haltbarkeit bei RT von bis zu zwei Jahren [96,97]. Die Herstellung ist jedoch weiterhin aufwendig und nicht kosteneffektiv. HbV befinden sich zur Zeit in präklinischen Studien [27].

Hämoglobin lässt sich ebenfalls in Polyelektrolytmikrokapseln (PEMCs) verkapseln. Der Arbeitsgruppe Bäuml er gelang es, monodisperse PEMCs mit der layer-by-layer Technologie unter Verwendung biologischer Zellen z. B. RBCs herzustellen und mit Hämoglobin zu beladen [98–100]. Derartige PEMCs sind für kleine Ionen und sowohl für geladene als auch nicht geladene Makromoleküle permeabel und extrem stabil gegen chemische und physikalische Einflüsse [100–102]. Die Wandstärke und Deformierbarkeit der PEMC sind einstellbar. Die Oberfläche der PEMCs ist beliebig modifizierbar [100]. Die Phagozytose der mit Hämoglobin beladenen PEMC durch Monozyten und

Granulozyten konnte in Zellkultur auf unter 1 % reduziert werden. Die Sauerstoffbindungskurve von mit Hämoglobin gefüllten PEMCs-RBCs-Gemischen ist im Vergleich zum Vollblut nur geringfügig nach links verschoben [100].

Neuartige künstliche nanodimensionale Sauerstofftransporter wurde von Chang et al. entwickelt, wobei anstelle der Lipide bei Liposomen bioabbaubare Polylactide (PLA) als Membranmaterial eingesetzt wurden [103,104]. Diese Nanokapseln sind ca. 40 - 120 nm groß und haben einen $p50$ von 26 mmHg, also dem $p50$ von Erythrozyten ähnlich. Ferner können die in den RBCs vorhandenen Enzyme wie Carbonanhydrase, SOD, CAT und das Methämoglobin-Reduktasesystem mit eingekapselt werden, wobei die Aktivitäten der Enzyme in den Nanokapseln erhalten blieben. Mit PEG modifizierte Nanokapseln haben eine Halbwertszeit von ca. 24 h in Ratten. Die Entwicklung dieser neuartigen Nanokapseln befindet sich noch in einem frühen Stadium [105,106].

1.3.5 Gentechnische Modifikation

Gentechnisch modifiziertes Hämoglobin wurde mittlerweile erfolgreich in *E. coli* exprimiert. Optro™ oder rHb1.1 (Baxter Corp.) ist der erste rekombinate humane HBOC, bei dem die beiden α -Untereinheiten des Hämoglobins durch eine Glycin-Brücke fusioniert sind und damit die Dissoziation des Tetramers zu Dimeren verhindert wird. Dieses Produkt verursacht jedoch eine starke Vasokonstriktion, weshalb die Entwicklung vorerst eingestellt wurde [70,107,108].

1.3.6 HBOC induzierte Vasokonstriktion

Bisher erhielten noch keine HBOCs in Europa oder USA die Zulassung als Arzneimittel. Viele HBOCs (besonders die ältere Generation) wiesen ein ungünstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis (Beziehung zwischen Wirksamkeit und Schädlichkeit) in den klinischen Studien auf. Diese HBOCs konnten zwar die erwünschte Wirksamkeit zeigen (z. B. Reduktion der Fremdbluttransfusion), hatten aber gleichzeitig eine überwiegende Schädlichkeit (schwerwiegende Nebenwirkungen). Diese Produkte sind stark vasoaktiv und verursachen einen Blutdruckanstieg, eine Erhöhung des pulmonalarteriellen und peripheren

Widerstandes, eine Reduktion der Herzfrequenz, des Herzzeitvolumens und der Gewebedurchblutung [5].

Mehrere Hypothesen über den Mechanismen der Vasokonstriktion werden zurzeit diskutiert, wobei die s. g. „NO-Scavenging“ und „Autoregulationshypothesen“ favorisiert werden.

Es ist bekannt, dass Hämoglobin das Stickstoffmonoxid (NO), den endothelial gebildeten Vasodilatator (*endothelium derived relaxing factor*), binden kann, wobei zellfreies Hämoglobin NO deutlich stärker als intrazelluläres Hämoglobin bindet [5,108]. Freies, intramolekular vernetztes und auch schwach polymerisiertes niedermolekulares Hämoglobin könnte aufgrund seiner Größe das Gefäßlumen verlassen (Extravasation), in den interstitiellen Raum zwischen den Endothelzellen und den glatten Gefäßmuskelzellen gelangen und dort das NO binden. Dieses NO-Scavenging führt zu Vasokonstriktion [89,109–111]. Eine Erhöhung der HBOC-Größe sollte somit das NO-Scavenging und die Vasokonstriktion reduzieren. Sakai et al. and Cabrales et al. haben gezeigt, dass das Ausmaß der Vasokonstriktion und Hypertonie mit zunehmender Größe des HBOC abnimmt [112,113].

Eine andere wichtige Hypothese ist die „Autoregulationstheorie“: Eine Überversorgung der präkapillaren Arteriolen mit Sauerstoff durch HBOCs kann reflektorisch eine Vasokonstriktion und eine Reduktion der funktionsfähigen Kapillardichte im Gewebe erzeugen [90,114,115]. Der $p50$ des menschlichen erythrozytären Hämoglobins beträgt 26,6 mmHg (35,4 hPa) [36]. Ein höherer oder mit den RBCs vergleichbarer $p50$ der HBOCs ($p50 >$ oder $=$ 26,6 mmHg) wurde hinsichtlich der erleichterten Abgabe von Sauerstoff an das Gewebe angestrebt. Die Diffusion von Sauerstoff erfolgt bei RBCs aufgrund der RBC-Membran in den Präkapillargefäßen langsamer als bei zellfreiem Hämoglobin oder HBOC [116,117]. HBOCs mit einem hohen $p50$ setzen den Sauerstoff frühzeitig in den präkapillaren Arteriolen frei. Die Arteriole wird mit Sauerstoff überversorgt, was eine arteriolen Vasokonstriktion auslösen kann [115,118]. Demzufolge wäre eine Erhöhung der Sauerstoffaffinität und somit ein niedrigerer $p50$ von $<$ 26,6 mmHg für das zellfreie HBOC in Hinsicht auf eine Reduktion der Vasokonstriktion sehr sinnvoll.

Die Polymerisation des Hämoglobins zu einem höheren Molekulargewicht bei gleichzeitig niedrigerem $p50$ wäre ein Lösungsansatz zur Verhinderung der Vasokonstriktion und würde einen geeigneten „Blutersatz“ ergeben [75,115].

1.4 Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Hämoglobin-Mikropartikel als potentielle HBOCs herzustellen. Die Partikel sollen nach einem kürzlich von Bämler und Georgieva [119] entwickelten Verfahren hergestellt werden.

In Abhängigkeit von den bei der Herstellung der HBOCs gewählten Ausgangsbedingungen sollen die morphologischen, physiko-chemischen und immunologischen Eigenschaften sowie die Sauerstoffaffinität der Hämoglobin-Mikropartikel charakterisiert werden. Desweiteren soll der Gasaustausch und insbesondere die Methämoglobinkonzentration in den Partikeln bestimmt werden. Da Methämoglobin keinen Sauerstoff ins Gewebe transportieren kann, muss der Anteil an Methämoglobin so gering wie möglich sein und sollte kleiner als 10 % des Gesamt-Hämoglobin-Gehalts sein [120].

Die morphologischen Eigenschaften der Partikel sollen mit geeigneten mikroskopischen Methoden charakterisiert werden. Die Partikel sollen dabei kleiner als 5 μm sein und eine möglicherweise auftretende Partikelaggregation soll minimiert werden.

Mittels Phagozytostests und Untersuchung der Aggregation in plättchenreichem Plasma sollen wichtige immunologische Eigenschaften der Hämoglobin-Mikropartikel erfasst werden.

Es soll außerdem an Hand ausgewählter Polymere untersucht werden, welche von ihnen geeignet sind, die Oberflächeneigenschaften der Partikel hinsichtlich Immunreaktion und Aggregationsverhalten zu optimieren.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Rinder-Hämoglobin

Für alle Untersuchungen wurde ausschließlich Rinder-Hämoglobin (Hb) verwendet, welches aus Rinder-Erythrozyten durch hypotonische Hämolyse gewonnen wurde [121]. Frisches Rinderblut (Schlachtbetrieb GmbH Perleberg) mit 2 mg/mL Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) pH 7,4 als Antikoagulant wurde bei 2.500 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand (Plasma und Buffy-Coat) wurde verworfen. Das Sediment (Erythrozyten) wurde drei Mal mit 4 °C kalter PBS pH 7,4 durch Resuspension und Abzentrifugation gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Erythrozyten mit Ampuwa® hämolysiert, wobei das Volumenverhältnis zwischen Erythrozyten und Ampuwa® 1 : 5 – 1 : 10 betrug. Hämolysiert wurde bei 4 °C für mindestens 1 h. Nach der Hämolyse wurde das Hämolysat bei 10.000 g und 4 °C für 1 h abzentrifugiert. Der Überstand wurde mittels 0,22 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert und bis zur Anwendung bei -80 °C aufbewahrt. Vor der Anwendung wurde die Hämoglobinlösung aufgetaut und mittels 0,1 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert. Das filtrierte Hb wurde als Stocklösung für die Herstellung der Partikel benutzt.

Die Reinheit der Hb-Lösung wurde mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) bestimmt und ist in **Abb. 2-1** dargestellt. Für die Herstellung der Partikel wurde eine Hb-Stocklösung mit einem Methämoglobin-Gehalt von weniger als 4 % verwendet.

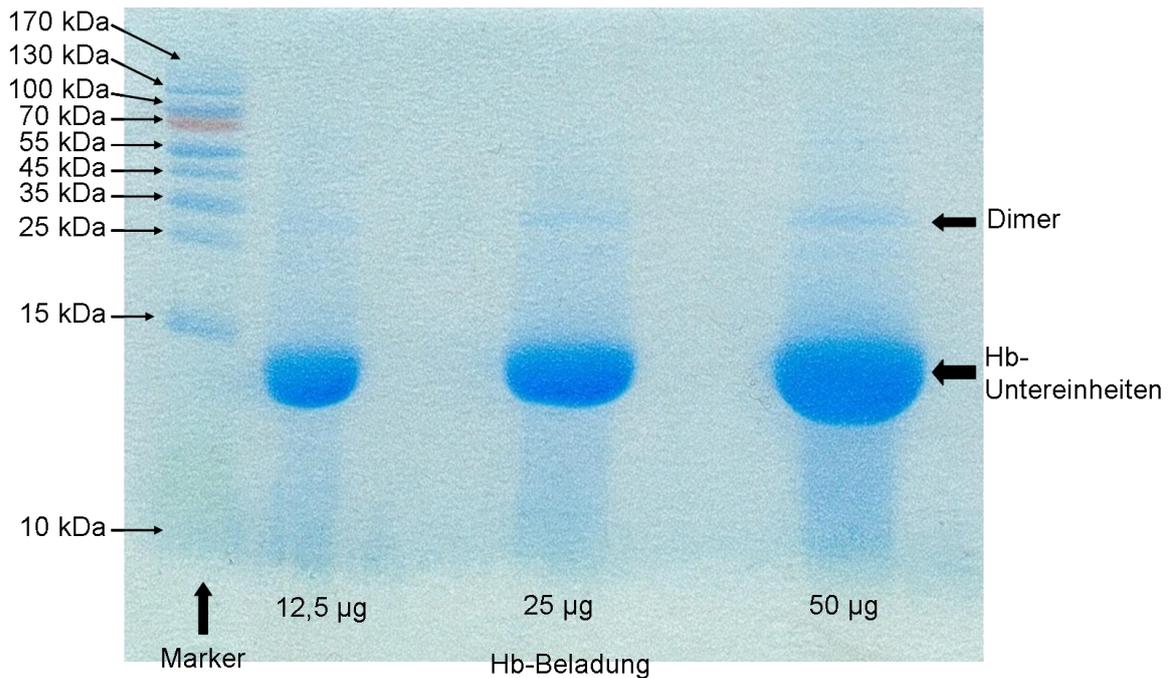


Abb. 2-1: Die SDS-PAGE präsentiert die hohe Reinheit der Hb-Stocklösung. Es war nur ein dickes Band deutlich zu sehen. SDS denaturiert Hb in seine einzelnen Untereinheiten und resultiert in einem dicken Band bei ca. 15 kDa. Das schwache Band bei ca. 35 kDa stellt die noch nicht komplett denaturierten $\alpha\beta$ -Dimere dar. Ein noch schwächeres Band unter dem Dimerband ist möglicherweise auf das Vorhandensein von Carboanhydrasen (29 kDa) zurückzuführen

2.1.2 Chemikalien und direkt bezogene Lösungen

Die direkt bezogenen Chemikalien und Lösungen sind in **Tabelle 2-1** gelistet.

Tabelle 2-1: Hersteller von Chemikalien und direkt bezogenen Lösungen.

Chemikalie / Lösung	Bezugsquelle
0,9 % Natriumchlorid (NaCl)-Lösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid (EDC)	Sigma Aldrich Germany
Ampuwa®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Borax-Decahydrat	Sigma Aldrich Germany
Calciumchlorid (CaCl ₂) Dihydrat	Sigma Aldrich Germany
Casy® ton	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
Dextran (Dx)	Sigma Aldrich Germany

Materialien und Methoden

Chemikalie / Lösung	Bezugsquelle
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Sigma Aldrich Germany
Divinylsulfon (DVS)	Sigma Aldrich Germany
Ethylendiamintetraessigs äure (EDTA)	Sigma Aldrich Germany
Glutaraldehyd (GA) 25 %, Grad 1	Sigma Aldrich Germany
Humanalbumin (HSA) Infusionsl ösung 20 %	Baxter Deutschland GmbH
Kaliumcyanid (KCN)	Sigma Aldrich Germany
Kaliumhexacyanoferrat (III) ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)	Sigma Aldrich Germany
Methoxypolyethylenglykol 5.000, aktiviert mit Cyanurchlorid (cc-mPEG 5.000)	Sigma Aldrich Germany
Methoxypolyethylenglykolamin 5.000	Sigma Aldrich Germany
Natriumascorbat	Sigma Aldrich Germany
Natriumborhydrid (NaBH_4)	Sigma Aldrich Germany
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Sigma Aldrich Germany
Natriumchlorid (NaCl)	Merck Chemicals Germany
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)- Monohydrat	Merck Chemicals Germany
Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)	Sigma Aldrich Germany
Natriumhyaluronat (Na-Hyaluronan, HA)	Sigma Aldrich Germany
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma Aldrich Germany
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid (NHS)	Sigma Aldrich Germany
Phagotest®-Kit	Glycotope-Biotechnology GmbH
Pulver zur Herstellung der Phosphatgepufferten Salzl ösung (Phosphate buffered saline, PBS) pH 7,4	Sigma Aldrich Germany
Rinder-Albumin, Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiert	Sigma Aldrich Germany
Salzs äure (HCl) 37 %	Merck Chemicals Germany
Succinylchlorid (SCl) 95 %	Sigma Aldrich Germany

2.1.3 Weitere Lösungen und Puffer

In **Tabelle 2-2** sind die im Labor hergestellten Lösungen aufgelistet. Wenn nicht anders beschrieben, wurde Ampuwa® als Lösungsmittel eingesetzt.

Tabelle 2-2: Zusammensetzung der eingesetzten Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	Bemerkung
0,3 M Phosphatpuffer 1 M NaCl, pH 7,4	0,243 M Na ₂ HPO ₄ 0,057 M NaH ₂ PO ₄ 1 M NaCl	für die Bestimmung der Sauerstoffbindungskurve
2 % HSA- 0,9 % NaCl-Lösung	2 % HSA 0,9 % NaCl	20 % HSA Infusionslösung wurde mit 0,9 % NaCl 1 : 10 verdünnt
67 mM Phosphatpuffer pH 6,8	32,83 mM Na ₂ HPO ₄ 34,17 mM NaH ₂ PO ₄	für Hb-Bestimmung
Borat Puffer pH 9,0	0,1 M Borax	pH Wert mit 1 M HCl auf 9,0 eingestellt
EDTA-Lösung	0,2 M EDTA	pH Wert mit NaOH Plätzchen auf 7,4 eingestellt
Ferricyanid-Lösung	50 mg/mL K ₃ Fe(CN) ₆ 5 mg/mL Na ₂ CO ₃	für Hb-Bestimmung
KCN-Lösung	5 mg/mL KCN	für Hb-Bestimmung
NaBH ₄ -Lösung	10 mg/mL NaBH ₄	immer frisch vor der Anwendung in PBS pH 7,4 gelöst
PBS pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄	ein Päckchen PBS pH 7,4 Pulver wurde mit Ampuwa® zu 1 Liter gelöst
Transformationslösung	0,2 g/L K ₃ Fe(CN) ₆ 0,05 g/L KCN 1 g/L NaHCO ₃	für Hb-Bestimmung

2.1.4 Geräte

In **Tabelle 2-3** sind die für die Untersuchungen eingesetzten Geräte aufgelistet.

Tabelle 2-3: benutzte Geräte.

Gerät	Hersteller
Blutgasanalysator ABL 725	Radiometer GmbH
CASY® 1 Cell Counter	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
Durchflußzytometer FACS-Canto	Becton & Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Heraeus® Biofuge® Primo R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Heraeus® Brutschrank	Thermo Fisher Scientific
Heraeus® Labofuge® 400 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Hettich Mikro 22R Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Hettich Rotina 35 Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Hitachi U2800 Spektralphotometer	Hitachi High-Technologies Corporation
Laser Scanning Mikroskop 510 Meta	Carl Zeiss MicroImaging GmbH
Nanoscope III Multimode AFM	Digital Instrument Inc., Santa Barbara, CA
Oxymeter GMH 3630	Greisinger electronic GmbH
pH Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG
Pipetten	Eppendorf AG
PowerWave 340 Mikroplatten-Spektralphotometer	BioTek Instruments GmbH
Präzisionswaage Explorer	Ohaus Europe GmbH
Rollen-Mischgerät: Assistent RM 5, Nr. 348	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG
Rotator: Intelli-Mixer	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG
Rührer	Bibby Sterilin Ltd, UK
Transsonic T 420 Ultraschallbad	Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG

Materialien und Methoden

Gerät	Hersteller
Ultraschall-Stab Bandelin Sonopuls GM 70	Bandelin electronic GmbH
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries
Wasserbad Lauda MS	Lauda Dr. R. Wobser GMBH & CO. KG
Zetasizer nano ZS	Malvern Instruments Ltd.

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

In **Tabelle 2-4** sind die Verbrauchsmaterialien gelistet.

Tabelle 2-4: Liste der Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
BD Vacutainer® Citratröhrchen	Becton Dickinson GmbH
BD Vacutainer® Plasmaröhrchen	Becton Dickinson GmbH
Casy® cups	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
Pipettenspitzen	Eppendorf AG
Reaktionsgefäße (Eppi)	Sarstedt AG & Co
Spritzenvorsatzfilter Durapore® 0,22 µm	Millipore GmbH
Spritzenvorsatzfilter Polyethersulfon 0,1 µm	Sartorius AG
Zentrifugenröhren	Sarstedt AG & Co

2.2 Herstellung der Hämoglobin-Mikropartikel (Hb-MP)

Die Hb-MP wurden in drei Schritten (s. **Abb. 2-2**) hergestellt: Copräzipitation, Vernetzung und Auflösung [119,122].

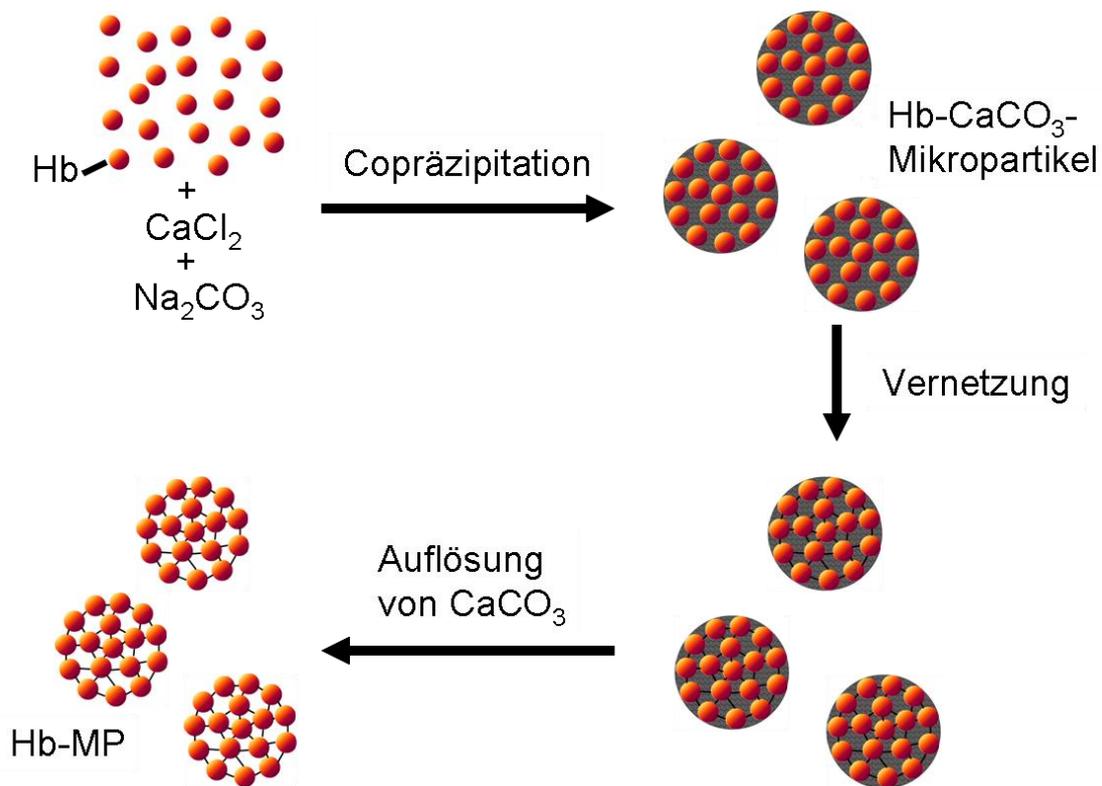


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Hb-Mikropartikel-Herstellung.

2.2.1 Copräzipitation

Soweit nicht anders beschrieben, wurden 5 mL Hb-Lösung mit 5 mL Calciumchlorid (CaCl_2)-Lösung vermischt und für 5 min leicht gerührt. Anschließend wurden unter schnellem Rühren 10 mL Natriumcarbonat (Na_2CO_3)-Lösung in gleicher Molarität wie Ca^{2+} in die Hb- CaCl_2 -Mischung gegeben und dann bei 300 g für 1 min zentrifugiert. Das Pellet (Hb- CaCO_3 -Mikropartikel, Hb- CaCO_3 -MP) wurde drei Mal mit 20 mL Ampuwa® durch Resuspension-Abzentrifugation gewaschen (300 g, 1 min) und abschließend in 5 mL Ampuwa® resuspendiert.

2.2.2 Vernetzung des Hb

Zu 5 mL der Hb-CaCO₃-MP-Suspension wurden 15 mL einer Glutaraldehyd (GA)-Lösung gegeben (GA-Endkonzentrationen: 1,0 %, 0,1 %, 0,01 % und 0,005 %) und über 1 h bei RT auf einem Rollenmischer inkubiert. Danach wurden die Partikel wieder durch Zentrifugation gesammelt und drei Mal mit 20 mL Ampuwa® durch Resuspension-Abzentrifugation gewaschen (300 g, 1 min). Das Pellet wurde in 5 mL Ampuwa® resuspendiert.

Die Vernetzung des Hb erfolgt über die beiden funktionellen Gruppen des GA, die mit den nukleophilen Gruppen des Hb z. B. Aminogruppen (s. **Abb. 2-3**) reagieren können.

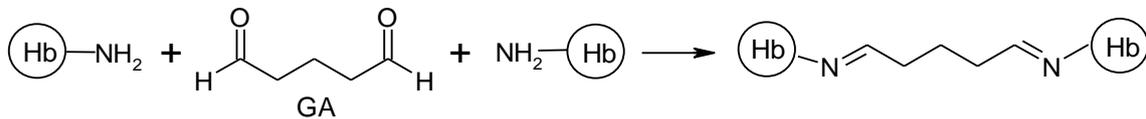


Abb. 2-3: Reaktionsgleichungen der Aminogruppen von Hb mit GA

2.2.3 Auflösung von CaCO₃

Die 5 mL Partikelsuspension wurde mit 20 mL 0,2 M EDTA pH 7,4 vermischt und für 1 h bei RT inkubiert. Die Ca²⁺-Ionen werden dabei durch EDTA komplexiert, so dass die CaCO₃-Kristallstruktur verloren geht und Calcium und CO₂ in Lösung gehen und die Hb-MP aus der Lösung abzentrifugiert werden können (1.500 g, 2 min). Das Pellet wurde durch Resuspension-Abzentrifugation drei Mal mit 20 mL Ampuwa® gewaschen (2.000 g - 2.500 g, 2 min). Nach dem Waschen wurden die Partikel in 5 mL Ampuwa® dispergiert und bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.4 Vernetzung unter sauerstoffarmen Bedingungen

Vor der Vernetzung wurde die Partikelsuspension mit Argongas solange begast, bis der Sauerstoffpartialdruck (*p*O₂) weniger als 1 mmHg (1,3 hPa) betrug. Danach wurde die Vernetzer-Lösung hinzugegeben und die Partikelsuspension bei RT inkubiert, wobei der *p*O₂ während Vernetzung immer auf weniger als 1,3 hPa gehalten wurde (ggf. durch neue Begasung).

2.2.5 Quenchen des Vernetzers und Reduktion der Imin-Bindung

Um die restlichen freien Vernetzer und freie funktionelle Gruppen des Vernetzers zu quenchen, wurde das Pellet vor der Auflösung in einer Mischung aus 1 mL 1 % Glycin in Phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate buffered saline, PBS) pH 7,4 und 19 mL Ampuwa® resuspendiert und für 30 min inkubiert. Da die durch die GA-Vernetzung entstandenen Imin-Bindungen nicht stabil sind (GA kann hydrolysieren) und GA freigesetzt werden kann, ist eine Reduktion der Imin-Bindungen zu stabilen sekundären Aminen mit Natriumborhydrid (NaBH_4) sinnvoll [5] (Reaktion s. **Abb. 2-4**). Nach der Inkubation der Partikel mit EDTA wurden 200 μL einer frisch hergestellten 10 mg/mL NaBH_4 -Lösung zu der Partikelsuspension gegeben und für weitere 30 min bei RT inkubiert.

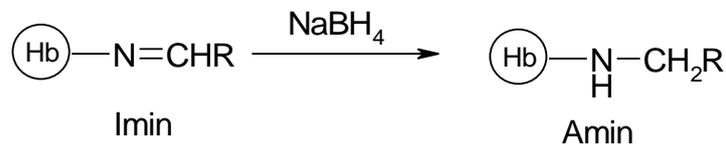


Abb. 2-4: Reduktion der Imin-Bindung mit NaBH_4 zur stabilen Amin-Bindung.

2.2.6 Postreduktion der Hb-MP mit Ascorbinsäure

Die Partikelsuspension wurde mit Argongas begast, um den $p\text{O}_2$ in der Suspension auf weniger als 1,3 hPa (1 mmHg) zu reduzieren. Anschließend wurde desoxygenierte 2 %ige Natriumascorbat-Lösung zugegeben und die Suspension für 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Partikel drei Mal mit Ampuwa® gewaschen, in Ampuwa® dispergiert und bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.7 Herstellung der Mischpartikel

2.2.7.1 Hb-Hyaluronan-Mischpartikel (Hb-HA-MP)

Statt reinem Hb wurde eine Mischung aus Hb und Natrium-Hyaluronan (HA) mit einem Verhältnis von 10 : 1 und 20 : 1 (Gewicht/Gewicht, w/w) bei der Copräzipitation eingesetzt.

Als Vernetzer wurde Divinylsulfon (DVS) zusätzlich zu GA eingesetzt, um HA zu immobilisieren, da DVS mit den Hydroxygruppen von Hb und HA reagieren kann (s. **Abb. 2-5**). Die Vernetzung wurde in 0,9 % Natriumchlorid (NaCl) mit 0,01 % GA und 5 mM DVS unter sauerstoffarmen Bedingungen für 1 h bei RT durchgeführt. Die Partikel wurden nach der Vernetzung mit Glycin gequenchet und nach der Auflösung mit NaBH₄ reduziert (s. Kapitel 2.2.5) Am Ende wurden die Partikel drei Mal mit 20 mL Ampuwa® gewaschen (6.000 g – 10.000 g, 5 min - 10 min), in 5 mL Ampuwa® dispergiert und bei 4 °C aufbewahrt.

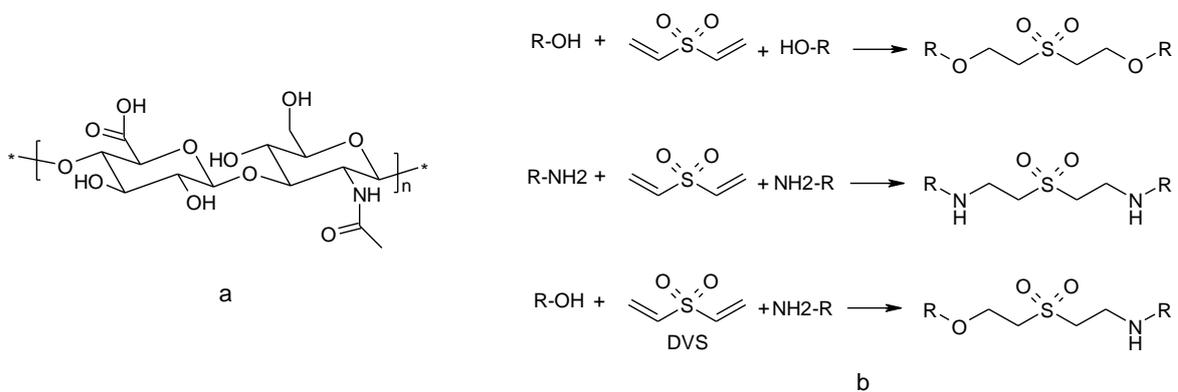


Abb. 2-5: HA und die Reaktionen von DVS mit HA und Hb. a) Struktur von Hyaluronsäure. b) Die Reaktionen von DVS mit Hb oder HA. DVS reagiert entweder mit zwei Hydroxygruppen (b oben), oder mit zwei Aminogruppen (b Mitte), oder mit einer Hydroxygruppe und einer Aminogruppe (b unten) des Hb oder der HA.

2.2.7.2 Hb-Humanalbumin-Mischpartikel (Hb-HSA-MP)

Statt reinem Hb wurde eine Proteinmischung aus Hb und Humanalbumin (HSA) mit einem Verhältnis von 5 : 1 und 10 : 1 (w/w) bei der Copräzipitation eingesetzt. Die Vernetzung wurde mit 0,01 % GA für 1 h unter sauerstoffarmen Bedingungen bei RT durchgeführt. Die Partikel wurden nach der Vernetzung mit Glycin gequenchet und nach der Auflösung mit NaBH₄ reduziert (s. Kapitel 2.2.5). Am Ende wurden die Partikel drei Mal mit 20 mL Ampuwa® gewaschen (2.000 g – 2.500 g, 2 min), in 5 mL Ampuwa® dispergiert und bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.8 Modifikationen der Hb-MP

2.2.8.1 PEGylierung der Hb-MP

Zu 5 mL in Ampuwa® resuspendierte Hb-MP wurden 15 mL 0,1 M Borat-Puffer pH 9,0 gegeben und für drei Mal 1 min mittels Ultraschall-Stab behandelt. 100 mg mit Cyanurchlorid aktiviertes Methoxypolyethylenglykol 5.000 (cc-mPEG 5.000, s. **Abb. 2-6**) wurde frisch in 1 mL 0,1 M Borat Puffer pH 9,0 gelöst, der Partikel-Suspension zugefügt und bei RT für 1 h inkubiert. Dabei wird ein Chloratom von cc-mPEG 5.000 durch eine nukleophile Gruppe wie eine Aminogruppe auf der Hb-MP-Oberfläche substituiert und das mPEG-Molekül an Hb-MP kovalent gebunden. Die Partikel wurden nach der Inkubation abzentrifugiert (1.500 g, 2 min) und drei Mal mit 20 mL Ampuwa® gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Partikel in 5 mL Ampuwa® dispergiert und bei 4 °C aufbewahrt.

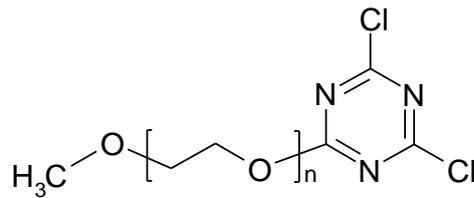


Abb. 2-6: Strukturformel von cc-mPEG 5.000.

2.2.8.2 Modifikation der Hb-MP mit Dextran (Hb-Dx-MP)

Statt reinem Hb wurde eine Mischung aus Hb und Dextran (Dx) 40 kDa (s. **Abb. 2-7 A**) mit einem Verhältnis von 5 : 1 (w/w) bei der Copräzipitation eingesetzt. Die Vernetzung erfolgte zunächst durch Inkubation mit 0,005 % GA unter sauerstoffarmen Bedingungen für 30 min bei RT. Nach dem Waschen wurden die Partikel in 0,2 M NaCl und 1 % Dx resuspendiert und bei RT für 30 min inkubiert. Die Partikel wurden dann drei Mal mit 20 mL Ampuwa® gewaschen (300 g, 1 min) und in 20 mL Ampuwa® dispergiert.

Unter sauerstoffarmen Bedingungen wurden die Partikel weiter mit Succinylchlorid (SCI, s. **Abb. 2-7 B**) vernetzt: Der Suspension wurden drei Mal 10 µL SCI im zeitlichen Abstand von 10 min zugegeben und der pH-Wert der Suspension mit Hilfe von 1 M Na₂CO₃ zwischen 9,0 und 9,5 eingestellt.

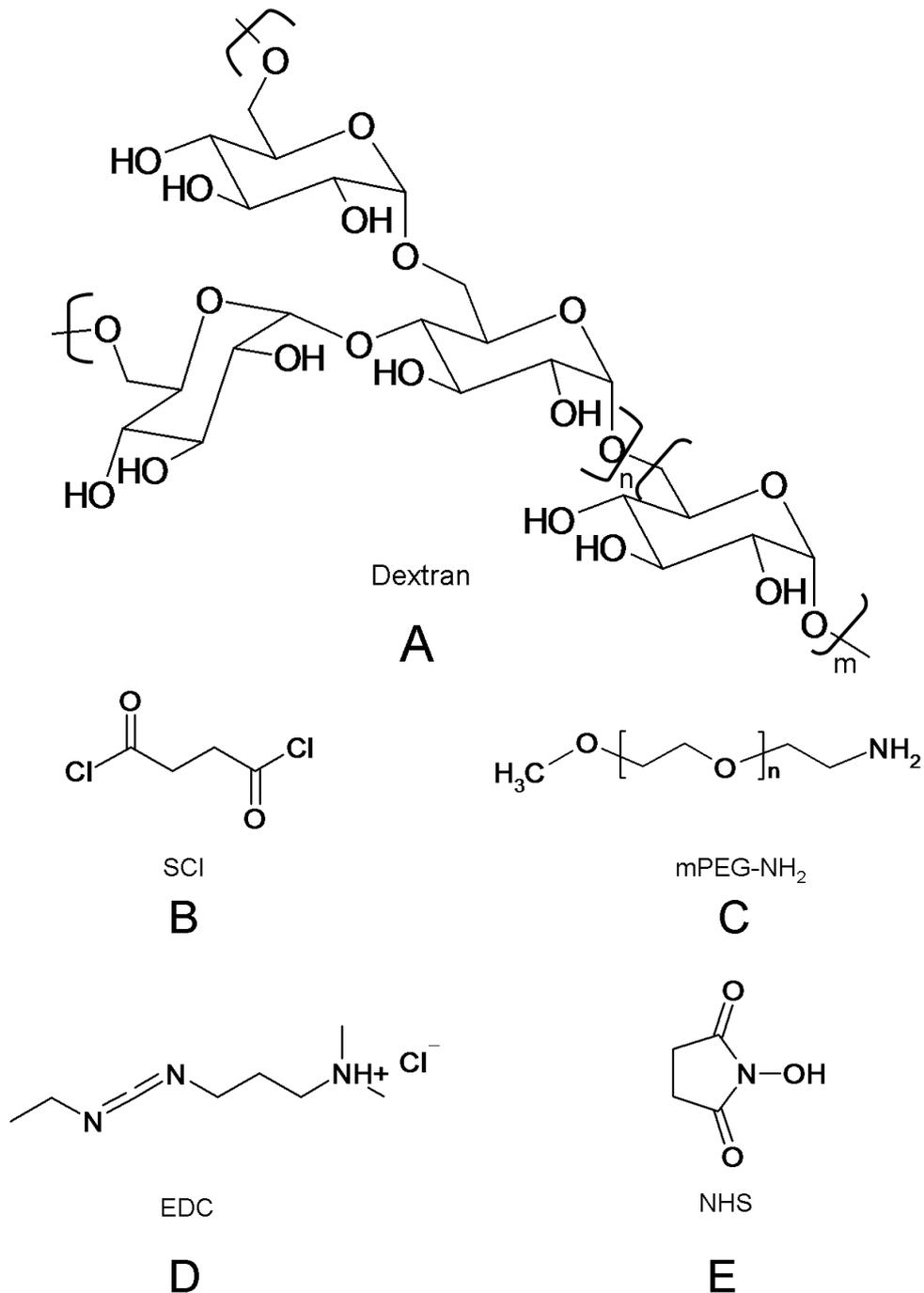


Abb. 2-7: Bei der Modifikation mit Dextran eingesetzte Chemikalien. A) Dextran 40 kDa. B) Succinylchlorid. C) mPEG-NH₂ 5 kDa. D) EDC. E) NHS.

Danach wurden die Partikel mit Glycin gequenchet und mit NaBH₄-Lösung bei der Auflösung behandelt (s. Kapitel 2.2.5). Die Hb-Dx-MP wurden drei Mal mit Ampuwa® gewaschen (3.000 g - 6.000 g, 5 min), in 5 mL Ampuwa® dispergiert und bei 4 °C aufbewahrt.

SCI reagiert sowohl mit Amino- oder Hydroxygruppen zu entsprechenden stabilen Amid- oder Esterverbindungen als auch mit H₂O und hydrolysiert dabei zu Carbonsäure (s. **Abb. 2-8**).

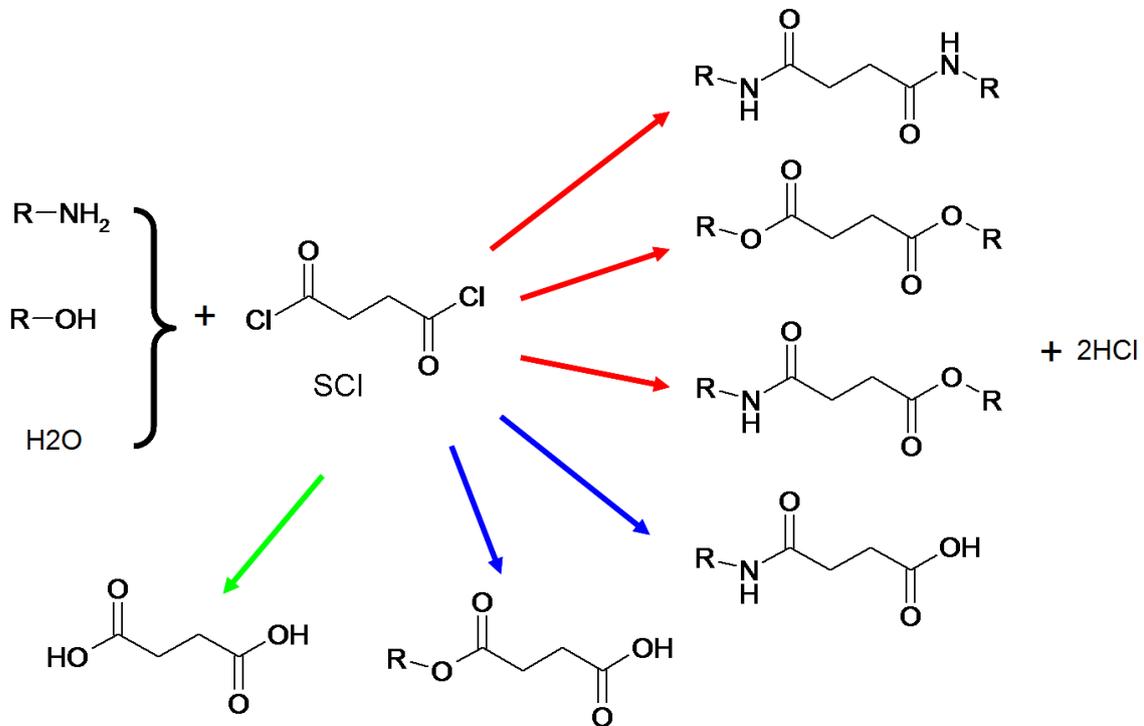


Abb. 2-8: Reaktionen von SCI mit Hb, Dx und H₂O. Rote Pfeile: stabile Amid- oder Esterverbindung nach der Reaktion von SCI mit Amino- oder Hydroxygruppen von Hb und Dx; Hb oder Dx sind damit quervernetzt. Blaue Pfeile: ein Säurechlorid des SCI reagiert mit Amino- oder Hydroxygruppe von Hb und Dx; das andere Säurechlorid des SCIs hydrolysiert, so dass eine neue Carboxygruppe entsteht. Grüner Pfeil: SCI ist vollständig hydrolysiert.

2.2.8.3 Zusatzmodifikation der Hb-Dx-MP

Die Partikel wurden zusätzlich mit HSA oder Methoxypolyethylenglykolamin 5.000 (mPEG-NH₂, s. **Abb. 2-7 C**) weiter modifiziert. Die Modifikation erfolgte unter sauerstoffarmen Bedingungen ($pO_2 < 1,3$ hPa). 5 mL Partikelsuspension wurden mit 15 mL 0,9 % NaCl vermischt. 20 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid (EDC, s. **Abb. 2-7 D**) und 30 mg *N*-Hydroxysuccinimid (NHS, s. **Abb. 2-7 E**) wurden in 0,5 mL 0,9 % NaCl gelöst und der Partikelsuspension zugegeben. Nach 15 minütiger Inkubation und Zugabe von 20 mL PBS pH 7,4 wurden entweder 0,5 mL 20 % HSA-Infusionslösung oder 1 mL 5 % mPEG-NH₂ in PBS hinzugegeben und für 2 h

bei RT inkubiert (Reaktionen s. **Abb. 2-9**). Nach der Inkubation wurden die Partikel bei 2.000 g für 2 min abzentrifugiert und das Pellet durch Resuspension-Abzentrifugation drei Mal mit 20 mL Ampuwa® gewaschen (2.000 g - 3.000 g, 2 min). Nach dem Waschen wurden die Partikel in 5 mL Ampuwa® dispergiert und bei 4 °C aufbewahrt.

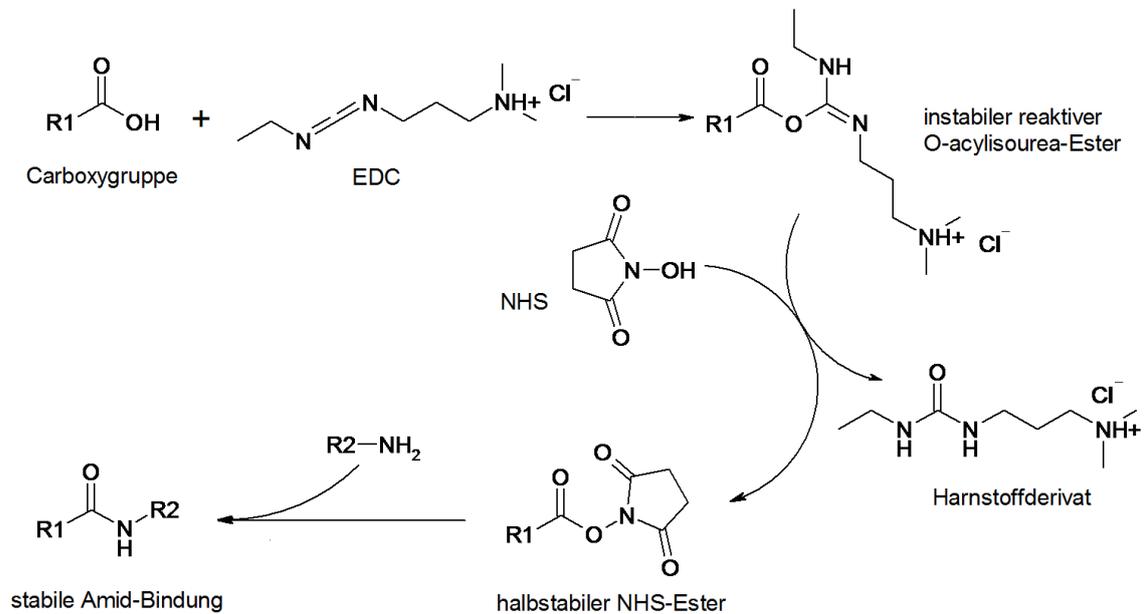


Abb. 2-9. Partikelmodifikation mit Hilfe von EDC / NHS. Die Carboxygruppen der Partikeloberfläche wurden zuerst mit EDC aktiviert. Die aktiven Intermediate wurden mit NHS als NHS-Ester stabilisiert. Diese NHS-Ester können mit Aminogruppen der Polymere (hier HSA oder mPEG-NH₂) zu stabilen Amid-Bindungen reagieren.

2.3 Methoden zur Charakterisierung des Hb und der Hb-MP

2.3.1 Konzentrationsbestimmungen

2.3.1.1 Spektralphotometrie

Das Hb weist sehr charakteristische Absorptionsbanden im VIS Bereich (400 - 700 nm) auf. Daher ist es möglich, den Gehalt des Hb photometrisch zu bestimmen.

Die photometrische Messung basiert auf dem Lambert-Beerschen-Gesetz: die Absorption ist proportional zu der Hb-Konzentration und der Schichtdicke der Küvette:

$$A_{(\lambda)} = \varepsilon_{(\lambda)} \cdot c \cdot l \quad (\text{Gl. 1})$$

mit

$A_{(\lambda)}$: Absorption bei Wellenlänge λ

$\varepsilon_{(\lambda)}$: molarer Absorptionskoeffizient bei Wellenlänge λ [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

c : Konzentration [mol/L]

l : Schichtdicke der Küvette [cm].

2.3.1.2 Bestimmung des Hämoglobingehalts

Eine Standardmethode für die quantitative Bestimmung des Hb ist die Cyanmethämoglobin-Methode. Bei dieser Methode wird das gesamte Hb durch Kaliumhexacyanoferrat(III) ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) zu Methämoglobin (MetHb) oxidiert. Anschließend bildet MetHb mit den Cyanidionen einen stabilen Komplex, das Cyanmethämoglobin (HiCN), welches ein Absorptionsmaximum bei 540 nm hat [123–125].

Der molare Absorptionskoeffizient vom Rinder-HiCN bei 540 nm beträgt in Bezug auf das Hb-Monomer $10,96 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, d. h. es besteht kein signifikanter Unterschied zu Human-HiCN ($11,01 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [126].

Die Hb-Stocklösung wurde mit der Cyanmethämoglobinmethode quantitativ bestimmt. Dabei wurde die Hb-Stocklösung mit einer Transformationslösung verdünnt und nach 20 min Inkubation bei 540 nm im Spektralphotometer vermessen (Absorption A_{540}). Die Konzentration des gesamten Hb (ctHb) wurde nach folgender Gleichung berechnet [123]:

$$ctHb = \frac{A_{540} \cdot f \cdot M}{\epsilon_{540}^{HiCN} \cdot 1000 \cdot l} \quad (\text{Gl. 2})$$

mit

ctHb: gesamte Hb-Konzentration [g/L]

A_{540} : Absorption von HiCN bei 540 nm

M : molekulare Masse des Hb-Monomers, 16133 g/mol [126]

f : Verdünnungsfaktor

ϵ_{540}^{HiCN} : 10,96 L·mmol⁻¹·cm⁻¹

l : 1 cm

Eine alternative einfache Methode für die quantitative Bestimmung des Hb ist die direkte photometrische Messung der verdünnten Hb-Lösung bei 415 nm. Die Hb-Stocklösung wurde auf 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL und 0,4 mg/mL verdünnt und bei 415 nm vermessen. Eine Kalibriergerade wurde anschließend erstellt, die Gleichung lautet:

$$y = 4,1602x + 0,0069 \quad (\text{Gl. 3})$$

mit Determinationskoeffizient $R^2 = 0,9976$

wobei x die Hb-Konzentration in mg/mL und y die Absorption bei 415 nm ist.

2.3.1.3 Bestimmung des Methämoglobin (MetHb)-Gehalts

Das Prinzip der MetHb-Bestimmung beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von MetHb nach Cyanid-Zugabe. MetHb besitzt bei 630 nm ein Absorptionsmaximum, das beim HiCN fehlt [125,127]. Der Zusatz von Cyanidionen führt bei 630 nm zu einer Absorptionsabnahme, die dem MetHb-Gehalt proportional ist. Um den

relativen MetHb-Anteil zu bestimmen, wird das gesamte Hb mit $K_3Fe(CN)_6$ zu MetHb oxidiert und parallel dazu behandelt.

Für die Bestimmung des MetHb-Gehalts wurde die Hb-Lösung (Konzentration ca. 10 mg/mL) 1 : 2 mit 67 mM Phosphat Puffer pH 6,8 verdünnt. Das Hb-Puffer-Gemisch wurde auf vier Proben aufgeteilt und mit Ampuwa®, KCN-Lösung, Ferricyanid-Lösung wie in **Tabelle 2-5** angegeben versetzt und intensiv geschüttelt. Nach 5 min wurden die Proben im Spektralphotometer gegen Ampuwa® gemessen [127].

Tabelle 2-5: Pipettierschema für die MetHb-Bestimmung der Hb-Stocklösung oder Hb-Partikel

Probe-Nr.	1	2	3	4
Hb (oder Partikel)-Puffer-Gemisch [μL]	1.200	1.200	1.200	1.200
Ampuwa® [μL]	40	0	80	40
KCN-Lösung [μL]	0	40	0	40
Ferricyanid-Lösung [μL]	40	40	0	0
Absorption bei 630 nm	A1	A2	A3	A4

Der relative MetHb-Anteil wurde mit folgender Gleichung berechnet [125,127]:

$$MetHb\% = \frac{A3 - A4}{A1 - A2} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 4})$$

wobei A3 die Absorption von MetHb vor der Zugabe von Cyanid bei 630 nm und A4 die Absorption von HiCN bei 630 nm ist. Die Differenz $A3 - A4$ ist zum MetHb-Gehalt proportional.

Für die Bestimmung des MetHb-Gehalts in den Hb-Partikeln wurde eine 1 %ige (Volumen/Volumen, v/v) Hb-Partikelsuspension 1 : 2 mit 67 mM Phosphat Puffer pH 6,8 verdünnt. Das Partikel-Puffer-Gemisch wurde auf vier Proben aufgeteilt und nach dem Pipettierschema in **Tabelle 2-5** aufgearbeitet. Nach 15 min wurden die Proben im Spektralphotometer gegen Ampuwa® gemessen. Zusätzlich zur Messung bei 630 nm wurden die Proben auch bei 597 nm (isosbestischen Punkt von MetHb und HiCN)

gemessen, um den Einfluss der Streuung der Mikropartikel (MP) zu berücksichtigen (s. **Abb. 2-10**). Nach der Korrektur wurde der MetHb-Gehalt nach Gl. 4 berechnet.

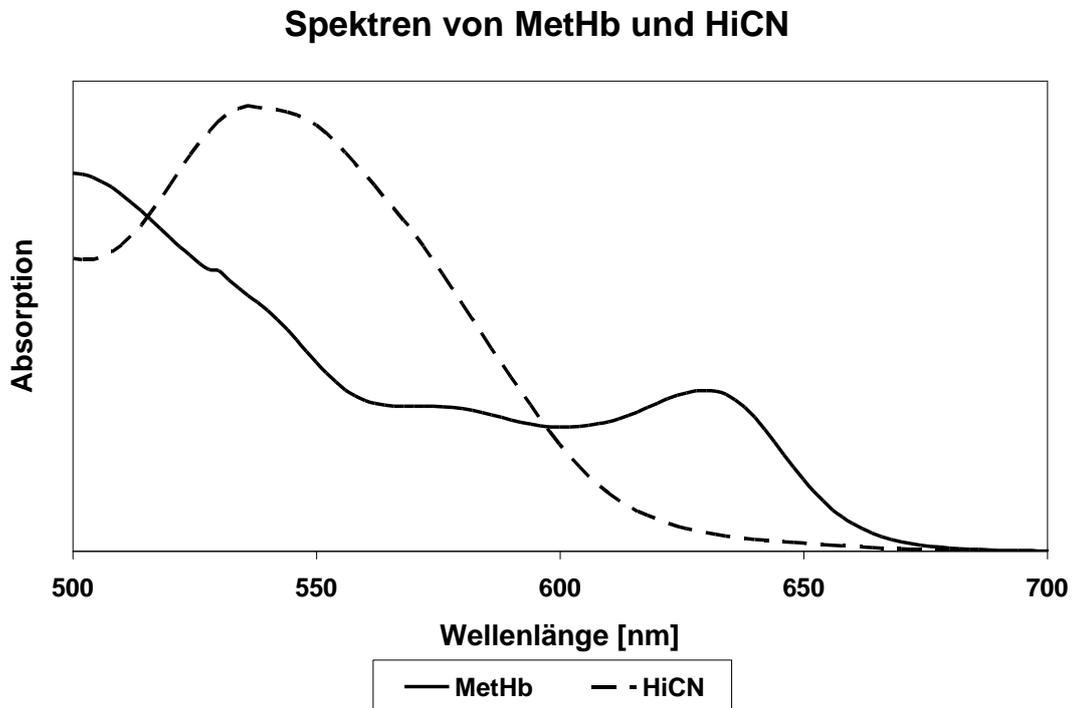


Abb. 2-10: Spektren von MetHb und HiCN. MetHb und HiCN haben den gleichen molaren Absorptionskoeffizient bei Wellenlänge 597 nm (isosbestischer Punkt).

2.3.1.4 Effizienz der Hb-Einkapselung der Mikropartikel

Um die Effizienz der Hb-Einkapselung der MP zu ermitteln, wurden Versuchsreihen der Copr-äzipitation durchgeführt, bei denen die Konzentration sowohl der $\text{CaCl}_2 / \text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösungen als auch der Hb-Lösungen variiert wurden. Nach jeder Zentrifugation (nach Präzipitation und nach Waschgängen) wurde die Hb-Konzentration im Überstand photometrisch bei 415 nm dreifach mit Gl. 3 bestimmt. Somit wurde der Hb-Verlust bei der Copr-äzipitation und den Waschgängen ermittelt. Die Differenz zwischen Hb-Ausgangsmenge (Hb_1) und den Hb-Verlust (Hb_2) ist die absolute Hb-Einkapselungsmenge der MP. Die relative Einkapselungseffizienz (EE) der MP wurde nach folgender Formel berechnet:

$$EE\% = \frac{Hb_1 - Hb_2}{Hb_1} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 5})$$

Jeder Versuch wurde 4 Mal wiederholt.

2.3.1.5 Bestimmung des Hb-Gehalts in Hb-MP-Suspensionen

Da die Lichtstreuung der Hb-MP hoch ist, ist die Gehaltsbestimmung des Hb in Hb-MP Suspensionen durch eine direkte photometrische Messung nicht möglich, weshalb der Hb-Gehalt in Hb-MP Suspension indirekt bestimmt wurde.

Dazu wurden die Hb-Konzentrationen der Ausgangslösung, im Überstand nach der Copr äzipitation sowie nach jedem Waschschrift vor und nach der Hb-CaCO₃-Partikelaufl ösung photometrisch bei 415 nm bestimmt. Aus der Differenz zwischen eingesetzter Hb-Menge und den Hb-Verlusten bei jedem Pr äparationsschrift ergibt sich die Hb-Menge in der Hb-MP-Suspension.

2.3.1.6 Partikelkonzentration

Die Hb-MP-Volumenkonzentration der Partikelsuspension wurde analog zur H ämatokritbestimmung im Vollblut durchgeföhrt. Dazu wurden H ämatokrit-Kapillaren mit der Hb-MP-Suspension gefüllt und ein Kapillarende mit Wachs verschlossen. Anschließend wurden die gefüllten Kapillaren in einer H ämatokrit-Zentrifuge bei 23.000 g für 10 min abzentrifugiert. Die Volumenkonzentration kann dann direkt abgelesen werden.

2.3.2 Charakterisierung der morphologischen Eigenschaften der Partikel

2.3.2.1 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM)

Das Prinzip der CLSM führt zu einer erheblichen Erhöhung von Bildschärfe und Bildkontrast im Vergleich zur normalen Lichtmikroskopie. Das Objekt wird von einem Laser Punkt für Punkt abgetastet, wobei der Laserstrahl über ein Objektiv in der Probe fokussiert wird. Licht aus diesem Fokus wird durch das gleiche Objektiv zum Detektor weitergeleitet. Vor dem Detektor befindet sich eine konfokale Blende (Pinhole), so dass das Licht aus Ebenen über oder unter der Fokusebene von der Blende blockiert wird und nicht zum Detektor gelangt [128] (**Abb. 2-11**). Durch Sammlung der Informationen von verschiedenen Fokusebenen kann die Probe in 3D rekonstruiert werden.

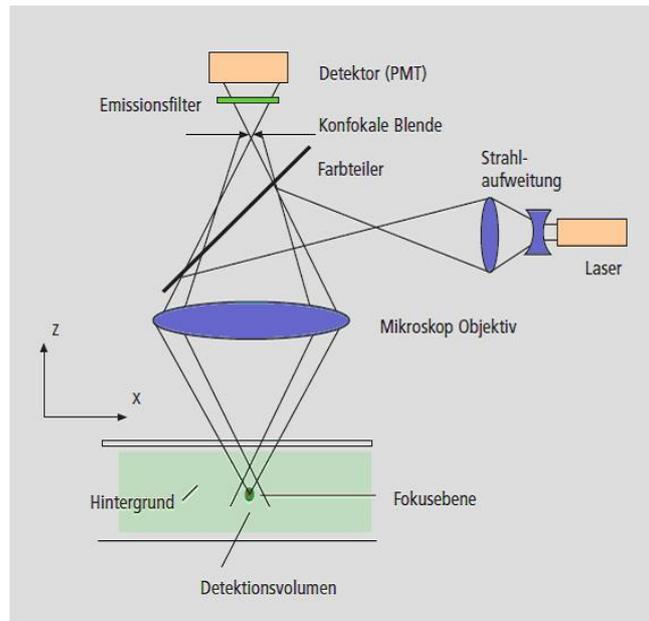


Abb. 2-11: Messprinzip der Konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie [128]

In dieser Arbeit wurde das Konfokalmikroskop von Zeiss LSM 510 Meta mit einem $100\times$ Ölimmersionsobjektiv benutzt.

2.3.2.2 Rasterelektronenmikroskopie (SEM)

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (scanning electron microscopy, SEM) wird die Oberfläche der Probe durch einen feingebündelten Elektronenstrahl zeilenweise abgetastet.

Ein von der Kathode in Vakuum erzeugter Primärelektronenstrahl wird in einem Steuerzylinder fokussiert und durch eine Hochspannung beschleunigt. Anschließend wird der Primärelektronenstrahl durch Kondensoren und Endlinse feingebündelt und auf die Probe fokussiert. Der Primärelektronenstrahl tastet das Objekt Zeile für Zeile ab, nach Wechselwirkung der Primärelektronen mit den Atomen der Probe entstehen verschiedene Sekundärsignale, z. B. Sekundärelektronen, rückgestreute Elektronen und Röntgenstrahlung, welche mit geeigneten Detektoren empfangen und ausgewertet werden.

Da die Aufnahmen im Hochvakuum gemacht werden, müssen die Proben wasserfrei sein. Verdünnte Hb-MP in Ampuwa® wurden auf einen Glas-Objektträger gebracht und an der Luft bei RT über Nacht getrocknet. Vor der Untersuchung wurde die Probe mit Gold gesputtert (BAL-TEC SCD 050 sputter coater, BAL-TEC AG, Liechtenstein). Die

Aufnahmen wurden mit einem SEM von Instrument Gemini Leo 1550 (Zeiss, Deutschland) bei einer Betriebsspannung von 3 kV im Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Potsdam angefertigt.

2.3.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Das Prinzip der Transmissionselektronenmikroskopie (Transmission electron microscopy, TEM) ist der Lichtmikroskopie sehr ähnlich. Die Probe wird mit Elektronen statt mit Licht durchstrahlt. Eine Glühkathode dient als Elektronenquelle. Die Elektronen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und durch einen Kondensator gebündelt. Anschließend durchdringen die Elektronen die Probe, die sehr dünn präpariert werden muss. Die Elektronen können elastisch, inelastisch oder gar nicht gestreut werden. Die nicht gestreuten Elektronen (transmittierte Elektronen) generieren das Bild der Probe.

TEM und SEM nutzen das Prinzip des Welle-Teilchen-Dualismus, d. h. den Elektronen kann eine Materiewelle zugeordnet werden. Diese ist wesentlich kleiner als die Wellenlänge von Licht, weshalb das Auflösungsvermögen bei TEM und SEM deutlich höher ist.

Die Hb-MP wurden mit Ethanol schrittweise entwässert (zuerst mit 30 % Ethanol, dann 50 %, 80 %, zuletzt mit absolutem Ethanol) und in Acrylharze eingebettet. Ultradünne Schnitte mit Dicken von 50 - 100 nm wurden unter Verwendung eines Ultramikrotoms (Leica Ultracut UCT, Leica, Deutschland) präpariert, die dann auf ein mit Kohlenstoff beschichtetes Kupfer-Grid übertragen und mit Hilfe eines Zeiss EM 912 Omega Transmissions-elektronenmikroskops (Zeiss, Deutschland) bei 120 kV untersucht wurden. Die TEM-Aufnahmen in der vorliegenden Arbeit wurden im Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Potsdam angefertigt.

2.3.2.4 Partikelgröße

Hb-MP wurden mittels CLSM mikroskopiert und die Partikelgröße mit Hilfe der Software LSM Image Browser Release 4.2 bestimmt. Der durchschnittliche Wert und die Standardabweichung wurden aus der Vermessung von mindestens 100 Partikeln pro

Charge berechnet. Zum Vergleich wurden Hb-MP mit CASY® ton verdünnt und mit dem CASY® 1 Cell Counter gemessen.

2.3.3 Charakterisierung der physiko-chemischen Eigenschaften der Partikel

2.3.3.1 Partikelaggregation

Das Aggregationsverhalten der Hb-MP wurde mit dem CASY® 1 Cell Counter bestimmt. Der CASY® 1 Cell Counter arbeitet nach dem Widerstandsmessprinzip. In der Messkapillare befinden sich zwei Platinelektroden. Die angelegte elektrische Spannung ändert sich bei der Passage der Partikel/Zellen in Abhängigkeit vom verdrängten Elektrolytvolumen. Es kommt zu einer Widerstandserhöhung, die als Maß für das Volumen der Partikel/Zelle dient. Jedes Meßsignal wird mittels Pulsflächenanalyse ausgewertet. Die Größenverteilung wird aus der originalen Volumenverteilung berechnet [129].

Die ca. 3 %igen (v/v) Partikel wurden mit CASY® ton 1 : 5.000 verdünnt und sofort gemessen. Partikel mit einem Volumen von > 524 fL (entsprechender Partikeldurchmesser > 10 µm) wurden als Aggregate gezählt definiert.

2.3.3.2 Zetapotential

Das Zetapotential ist das elektrische Potential in der hydrodynamischen Scherebene in der elektrischen Doppelschicht eines elektrisch geladenen Partikels. Es ist eine wichtige Kenngröße der elektrokinetischen Eigenschaften der Partikel und Partikel-Elektrolyt-Grenzflächen.

Das Zetapotential der Partikel mit ideal glatter Oberfläche kann mit der Helmholtz-Smoluchowski-Theorie vereinfacht erklärt werden. Werden die z. B. negativ geladene Partikel in einer Elektrolytlösung dispergiert, lagern sich bevorzugt die Anionen an die negativen Oberflächen. Die Anionen sind weniger stark hydratisiert als die Kationen und sind somit weniger stark abgeschirmt. Die Partikeloberfläche adsorbiert die Anionen über van der Waals-Wechselwirkungen. Durch diese spezifische Adsorption verlieren die Anionen ihre Hydrathülle und bilden eine fixierte dehydratisierte Monoschicht. Diese

Monoschicht wird als innere Helmholtz-Schicht bezeichnet. Die darauf folgenden stark elektrostatisch gebundenen hydratisierten Kationen bilden die äußere Helmholtz-Schicht. Die beiden Helmholtzschichten werden als Sternschicht bezeichnet [130]. Weitere Ionen (hydratisierte Anionen und Kationen) lagern sich locker in einer diffusen Schicht an und kompensieren die Partikelladung. So erscheinen die Partikel aus großer Entfernung elektrisch neutral [130]. Wenn sich die Partikel bewegen (z. B. durch Diffusion, Sedimentation oder durch die Einwirkung eines äußeren elektrischen Feldes), wird ein Teil der locker gebundenen diffusen Schicht abgeschert und die Partikel besitzen wieder ein elektrisches Potential. Dieses Potential an der Abscherebene wird als Zetapotential bezeichnet [130,131] (s. **Abb. 2-12**).

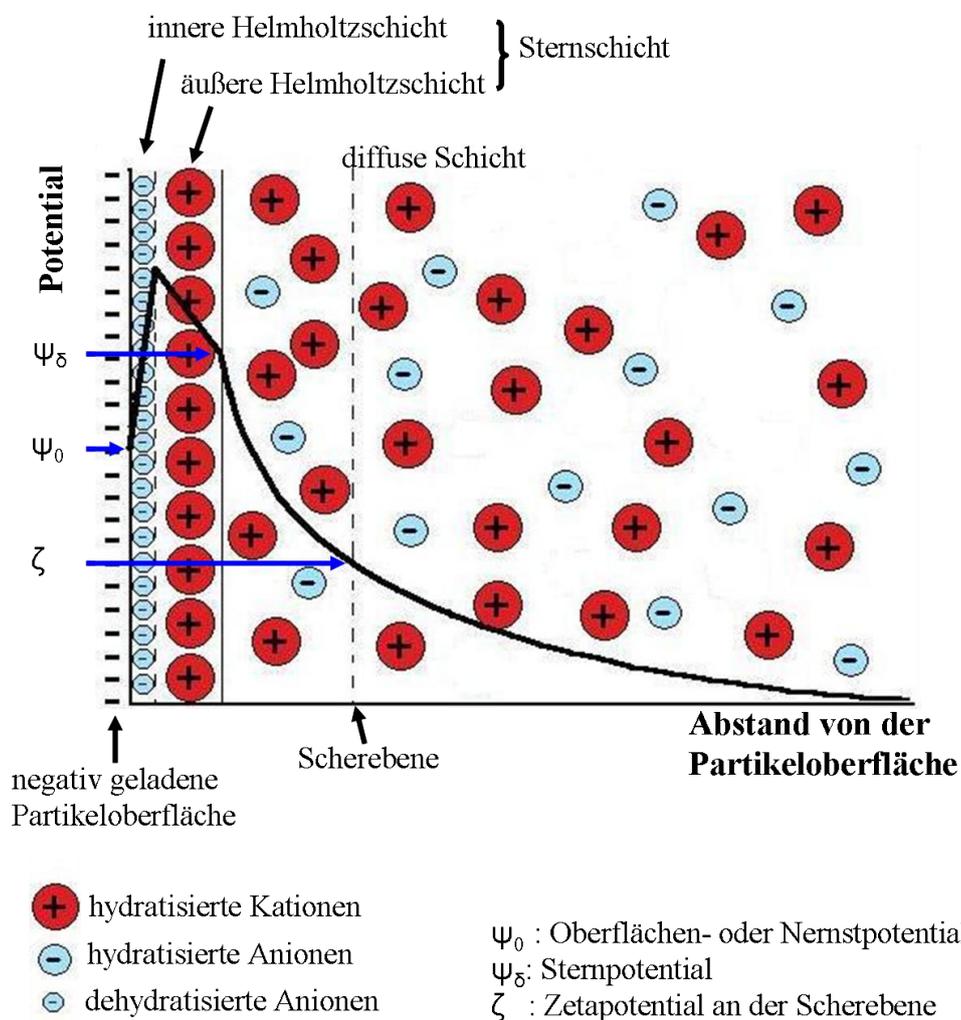


Abb. 2-12: Potentialverlauf eines dispergierten Partikels mit negativer glatter Oberfläche in Elektrolytlösung; modifiziert nach Müller [130].

Durch Messung der elektrophoretischen Mobilität (μ_e) der Partikel, die sich in Elektrolytlösung durch ein angelegtes elektrisches Feld bewegen, kann das Zetapotential nach der Henry Gleichung berechnet werden [131,132]:

$$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{2\varepsilon \cdot \zeta \cdot f(\kappa a)}{3\eta} \quad (\text{Gl. 6})$$

mit

μ_e : elektrophoretische Mobilität

ε : Dielektrizitätskonstante

ζ : Zetapotential

$f(\kappa a)$: Henry-Funktion

η : Viskosität

v : Partikelgeschwindigkeit

E : Feldstärke

Für ein großes Teilchen ($> 0,2 \mu\text{m}$) mit dünner Doppelschicht beträgt $f(\kappa a)$ 1,5 und man kann das Zetapotential nach der Smoluchowski-Näherung berechnen [131,132]:

$$\zeta = \frac{\mu_e \cdot \eta}{\varepsilon} \quad (\text{Gl. 7})$$

Die Anwendung der Helmholtz-Smoluchowski-Theorie ist auf Partikel mit ideal glatter Oberfläche begrenzt. Die meisten realen Partikel und Grenzflächen erfüllen diese Anforderung jedoch nicht [133,134].

In der Regel sind die realen Partikeloberflächen nicht glatt. Meistens können die realen Partikeloberflächen mit einem „Hairy layer“-Modell beschrieben werden. „Hairy layer“ ist eine hydrodynamisch durchdringbare Schicht. Die elektrischen Oberflächenladungen sind in dieser Oberflächenschicht räumlich verteilt. Die hydrodynamische Strömung durch den „Hairy layer“ kann das scheinbare Zetapotential erhöhen. Die Berechnung des Zetapotentials ist dann komplizierter [133,135,136].

In der vorliegenden Arbeit wurde das Zetapotential jedoch näherungsweise nach der Helmholtz-Smoluchowski-Theorie berechnet.

Die elektrophoretischen Mobilität der Partikel im elektrischen Feld kann mittels der Laser Doppler Anemometrie (LDA) bestimmt werden [130,132,137]. Das Laserlicht wird in die Messzelle eingestrahlt und von den Partikeln gestreut. Aufgrund des Dopplereffekts kommt es zu einer Frequenzverschiebung im Vergleich zu dem ursprünglichen Laserstrahl. Diese Frequenzverschiebung ist abhängig von der Partikelgeschwindigkeit und ist in folgender Gleichung beschrieben [137]:

$$\Delta f = \frac{2v \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda} \quad (\text{Gl. 8})$$

mit

Δf : Frequenzverschiebung

v : Partikelgeschwindigkeit

θ : Detektionswinkel

λ : Wellenlänge des Laserlichts

Da die Elektrophoretische Mobilität $\mu_e = \frac{v}{E}$,

gilt

$$\mu_e = \frac{\Delta f \cdot \lambda}{2E \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)} \quad (\text{Gl. 9})$$

Die Hb-MP wurden mit bestimmten Lösungen zur gewünschten Trübung verdünnt und mit dem Zetasizer nano ZS gemessen. Für jede Probe wurden fünf Messungen durchgeführt; jede Messung beinhaltete 30 Messzyklen.

Da das Zetapotential abhängig von der Ionenstärke der Lösung ist, wurden verschiedene Lösungen zur Verdünnung der Partikel eingesetzt. Die Lösungen waren 0,25 mM NaCl, 2,5 mM NaCl und 150 mM NaCl (pH 7,0).

2.3.4 Charakterisierung der immunologischen Eigenschaften der Partikel

Ein idealer Sauerstoffträger sollte biokompatibel sein, d. h. nicht als körperfremd erkannt werden. Er sollte das Komplementsystem nicht aktivieren, keine Thrombozyten aktivieren, wenig phagozytiert werden und lange in der Blutbahn zirkulieren. Deshalb sind die immunologischen Eigenschaften der MP von zentraler Bedeutung und müssen mit verschiedenen Tests erfasst werden.

2.3.4.1 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie (hier Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, *fluorescence activated cell sorting*, FACS) ist ein optisches Messverfahren, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner Zellen oder Partikel in Suspension analysiert. Durch die Anregung mit Laserlicht können die relative Zellgröße, die Granularität und verschiedene Fluoreszenzsignale der Zellen oder Partikel simultan gemessen werden.

Bei der Messung werden Zellen / Partikel durch einen fokussierten Lichtstrahl geleitet. Trifft der Laserstrahl auf einen passierenden Partikel, entsteht Streulicht. Dieses Streulicht wird von Detektoren in dem Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) und dem Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*, SSC) getrennt registriert. Die Vorwärtsstreuung ist abhängig von der Partikelgröße, während die Seitwärtsstreuung durch die Granularität und Membraneigenschaften des jeweiligen Partikels oder der jeweiligen Zelle bestimmt wird. Die Zellen / Partikel in der Suspension können dadurch unterschieden werden. Werden die Zellen / Partikel Fluoreszenz markiert, können die Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Wellenlängen zusätzlich simultan registriert werden.

Für die FACS-Messungen wurde ein Durchflusszytometer FACS-Canto II mit der BD FACSDiva Software v 6.1.1 genutzt.

2.3.4.2 Phagozytoseaktivität

Die Phagozytoseaktivität von Granulozyten (GCs) und Monozyten (MCs) in heparinisiertem menschlichem Vollblut nach der Zugabe von Hb-MP wurde mittels Phagotest®-Kit im Durchflusszytometer *in vitro* bestimmt.

Das Phagotest®-Kit enthält eine stabilisierte, opsonierte, Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierte *E. coli* Bakterien-Suspension, Quenclösung, Lyselösung, DNA-Färbelösung und Instamed-Salze für die Waschlösung. Der Test ermöglicht die quantitative Bestimmung der Leukozytenphagozytose [138].

Die Testpartikel wurden mit FITC-Fluoreszenz markiert, indem Fluoresceinisothiocyanat konjugiertes Rinder-Albumin (FITC-BSA) zu Hb im Gewichtsverhältnis von 1 : 50 bei der Copräzipitation eingesetzt wurde. Die Hb-MP wurden mit 0,9 % NaCl auf 0,3 % (v/v) eingestellt und 0,5 mL Partikel wurden mit dem Ultraschall-Stab 3 s behandelt. 10 µL Partikel wurden mit 50 µL heparinisiertem menschlichem Vollblut bei 37 °C für 30 min inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Überführen der Probe in ein Wasser-Eis-Bad gestoppt. Durch Zugabe von eiskalter Quenclösung wurde die Unterscheidung zwischen adhärenen und tatsächlich phagozytierten Partikeln gewährleistet. Nach dem Waschen (250 g, 5 min, 4 °C) wurden die Erythrozyten mit Lyselösung lysiert, wobei gleichzeitig durch die Lyselösung eine Fixierung der Leukozyten stattfindet. Der Ansatz wurde ein weiteres Mal gewaschen (250 g, 5 min, 4 °C). Zum Schluss wurde eine DNA-Färbelösung aus Propidiumiodid (PI) hinzugegeben, um den Zellkern der Leukozyten mit Fluoreszenz rot zu markieren. Der Ansatz wurde dann innerhalb von 1 h mit Hilfe des Durchflusszytometers FACS-Canto II analysiert.

Die GCs oder MCs, bei denen gleichzeitig FITC- und PI-Signale detektiert wurden, entsprachen den Phagozyten, die Partikel phagozytiert hatten; die GCs oder MCs, bei denen nur ein PI-Signal detektiert wurde, entsprachen den Phagozyten, die keine Partikel phagozytiert hatten.

Parallel zur Inkubation bei 37 °C wurde ein Ansatz im Eis-Wasser-Bad bei 0 °C inkubiert (Negativkontrolle). Außerdem wurden Ansätze mit im Testkit enthaltenen opsonierten FITC-markierte *E. coli* jeweils bei 37 °C und 0 °C durchgeführt, wobei die opsonierten

FITC-markierte *E. coli* laut Kit-Beschreibung mindestens von 95 % der GCs und 65 % der MCs bei 37 °C phagozytiert werden sollen.

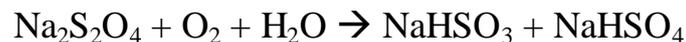
2.3.4.3 Inkubation in plättchenreichem Plasma (PRP)

Hb-MP wurden in 0,9 % NaCl suspendiert und die Konzentration auf 4 - 6 % (v/v) eingestellt. 0,5 mL Hb-MP wurden mit einem Ultraschall-Stab 10 s behandelt. Frisches Blut (Citrat als Antikoagulant) wurde bei 140 g ohne Bremse für 15 min zentrifugiert. Das Blut-Röhrchen wurde danach 15 min bei RT stehengelassen. 100 µL des Überstandes (plättchenreiches Plasma, PRP) wurden mit 20 µL Hb-MP-Suspension vorsichtig mit einer Pipette vermischt. Anschließend wurde die Mischung in einem Rotator (5 RPM, Winkel 15 °) im Brutschrank bei 37 °C für 30 min sanft geschaukelt. Als Kontrolle diente eine Mischung aus 100 µL PRP und 20 µL 0,9 % NaCl. Nach der Inkubation wurden die Ansätze mittels CLSM mikroskopiert.

2.3.5 Charakterisierung des Gasaustausches

2.3.5.1 Sauerstofftransportfunktion

Die Fähigkeit zur Oxygenierung und Desoxygenierung der Hb-MP wurden spektrophotometrisch nachgewiesen. Die Hb-MP wurden mit Ampuwa® verdünnt und am Spektralphotometer zwischen 380 und 700 nm gescannt. Danach wurde der Sauerstoff in der Suspension mit Hilfe von 0,1 % Natriumdithionit (SDT, Na₂S₂O₄) entfernt und die Suspension sofort noch einmal gescannt. Die SDT ist ein starkes Reduktionsmittel, welches mit Sauerstoff der Lösung reagiert und ein anaerobes Milieu erzeugt:



Zum Vergleich wurde das freie Hb gleich wie die Hb-MP behandelt und gescannt.

2.3.5.2 Sauerstoffbindungskurve (ODC)

Die Sauerstoffbindungskurve (Sauerstoff-Dissoziations-Kurve, ODC, *oxygen dissociation curve*) wurde mit einer Methode modifiziert nach Zhang et al. [139] bestimmt. Ein Sulfierkolben diente als Reaktionsgefäß (s. **Abb. 2-13**). Im mittleren Hals des Kolbens wurde eine Sauerstoffelektrode eingebaut, um den pO_2 der Hb-MP-Suspension/Hb-Lösung zu bestimmen. Ein Seitenhals wurde mit einer Gasflasche (Sauerstoff oder Argon) verbunden. Ein zweiter Seitenhals wurde mit einer Küvette mittels gasdichten Schlauchs verbunden und ein anderer Seitenhals diente als Entlüftung. Der Kolben wurde im Wasserbad auf 37 °C gebracht. Hb oder Hb-MP wurden mit 0,3 M Phosphat Puffer pH 7,4 1 M NaCl und Ampuwa® so verdünnt, dass die Endkonzentration des Hb ca. 10 µM, die Konzentration von Cl^- 0,1 M [140] und der pH Wert 7,4 betragen.

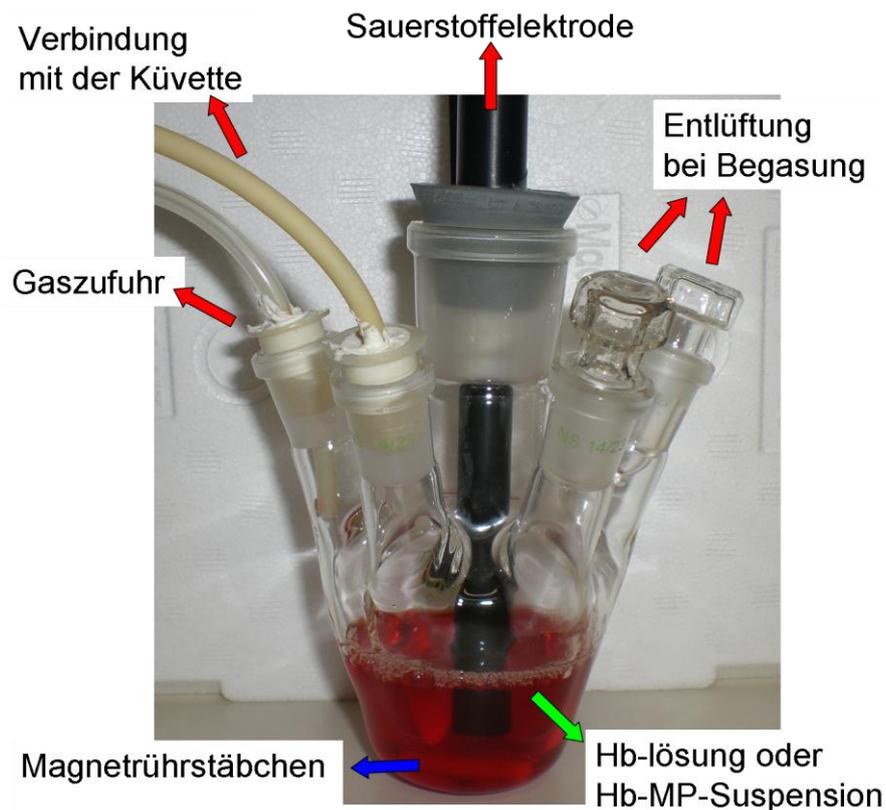


Abb. 2-13: Sulfierkolben für die Bestimmung der ODC.

Ca. 40 mL Hb-Lösung oder Hb-MP-Suspension wurde in den Sulfierkolben überführt und mit Argon begast bis der Sauerstoff komplett entfernt wurde. Die Lösung oder Suspension wurde danach langsam mit Luftsauerstoff schrittweise oxygeniert. Um eine 100 %ige

Sauerstoffsättigung zu erreichen, wurde am Ende die Lösung oder Suspension mit reinem Sauerstoff begast bis der pO_2 bei mindestens 160 mmHg (21,3 kPa) lag.

Die optischen Absorptionen der Hb-Lösung oder Hb-MP-Suspension bei pO_2 0 mmHg und über 160 mmHg und bei mindestens fünf Werten des pO_2 zwischen 0 mmHg und 160 mmHg wurden mittels Spektralphotometer gemessen. Dabei wurde die Lösung oder Suspension mit Hilfe einer Spritze über einen gasdichten Schlauch in die Küvette überführt und mit dem Spektralphotometer zwischen 550 und 700 nm gescannt. Die Absorptionen bei 584 nm dienten der Kontrolle von Verdunstung und Streuung, bei dem das oxygenierte Hb (OxyHb) und desoxygenierte Hb (DeoxyHb) den isosbestischen Punkt haben.

Die Sauerstoffsättigung (sO_2) bei bestimmtem pO_2 wurden mit folgender Formel berechnet [141]:

$$sO_2 \% = \frac{A_{(\lambda)} - A_{(\lambda)deoxy}}{A_{(\lambda)oxy} - A_{(\lambda)deoxy}} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 10})$$

mit

sO_2 : die Sauerstoffsättigung bei bestimmtem pO_2 [%]

$A_{(\lambda)}$: optische Absorption der Hb-Lösung oder Hb-MP-Suspension bei Wellenlänge λ und bei bestimmtem pO_2

$A_{(\lambda)deoxy}$: optische Absorption der Hb-Lösung oder Hb-MP-Suspension bei Wellenlänge λ und bei pO_2 von 0 mmHg

$A_{(\lambda)oxy}$: optische Absorption der Hb-Lösung oder Hb-MP-Suspension bei Wellenlänge λ und bei pO_2 von 160 mmHg

sO_2 wurde bei Wellenlängen zwischen 574 und 582 nm bzw. 586 und 590 nm berechnet und gemittelt. Die sO_2 wurden gegen korrespondierende pO_2 -Werte in einem Diagramm aufgetragen (sO_2 als Y-Achse und pO_2 als X-Achse). Anschließend wurde die ODC an diese Koordinaten angepasst. Der $p50$ entspricht dem Sauerstoffpartialdruck pO_2 bei Halbsättigung.

3 Ergebnisse

Die Effizienz der Hb-Einkapselung durch Copräzipitation wurde ermittelt, das Hb anschließend in den MP mit unterschiedlichen GA-Konzentrationen vernetzt und danach das CaCO_3 aus den Hb-MP herausgelöst. Diese Hb-MP wurden hinsichtlich ihrer morphologischen, physikochemischen, immunologischen Eigenschaften und ihrer Sauerstoffbindungseigenschaften charakterisiert.

Die Hb-MP mit den besten Eigenschaften wurden dann mit verschiedenen Polymeren (mPEG, HA, HSA, Dx) modifiziert oder als Mischpartikel hergestellt und hinsichtlich veränderter Eigenschaften untersucht.

3.1 Effizienz der Hb-Einkapselung

Um die Effizienz der Hb-Einkapselung der MP zu ermitteln, wurde die Copräzipitation mit unterschiedlichen Konzentrationen der Ausgangssubstanzen (s. **Tabelle 3-1**) durchgeführt. Die Hb-Konzentration in den Überständen wurde photometrisch bei 415 nm bestimmt und aus den Differenzen zwischen der Hb-Ausgangsmenge und den Hb-Mengen in den Überständen wurde die eingekapselte Hb-Menge berechnet und als Einkapselungseffizienz (EE) der MP definiert (s. Gl. 5).

Tabelle 3-1: Eingesetzte Konzentrationen der Ausgangssubstanzen für die Ermittlung der EE.

Ausgangssubstanz	Konzentration
Hb (in CaCl_2 -Lösung)	2,5 / 5,0 / 7,5 / 10,0 / 15,0 [mg/mL]
CaCl_2 -Lösung	0,15 / 0,25 / 0,5 [M]
Na_2CO_3 -Lösung	0,15 / 0,25 / 0,5 [M]

Die EE der MP war von den Konzentrationen der Ausgangssubstanzen (CaCl_2 , Na_2CO_3 , Hb) abhängig. Diese Abhängigkeit ist in **Abb. 3-1** dargestellt. Mit steigender Konzentration von CaCl_2 , Na_2CO_3 stieg die EE der MP. Mit steigender Hb-Konzentration und konstanter Konzentration von CaCl_2 / Na_2CO_3 senkte sich jedoch die EE der MP. Die

EE variierten zwischen 8 und 50 % abhängig von der Ausgangskonzentration der CaCl_2 , Na_2CO_3 oder Hb-Lösungen.

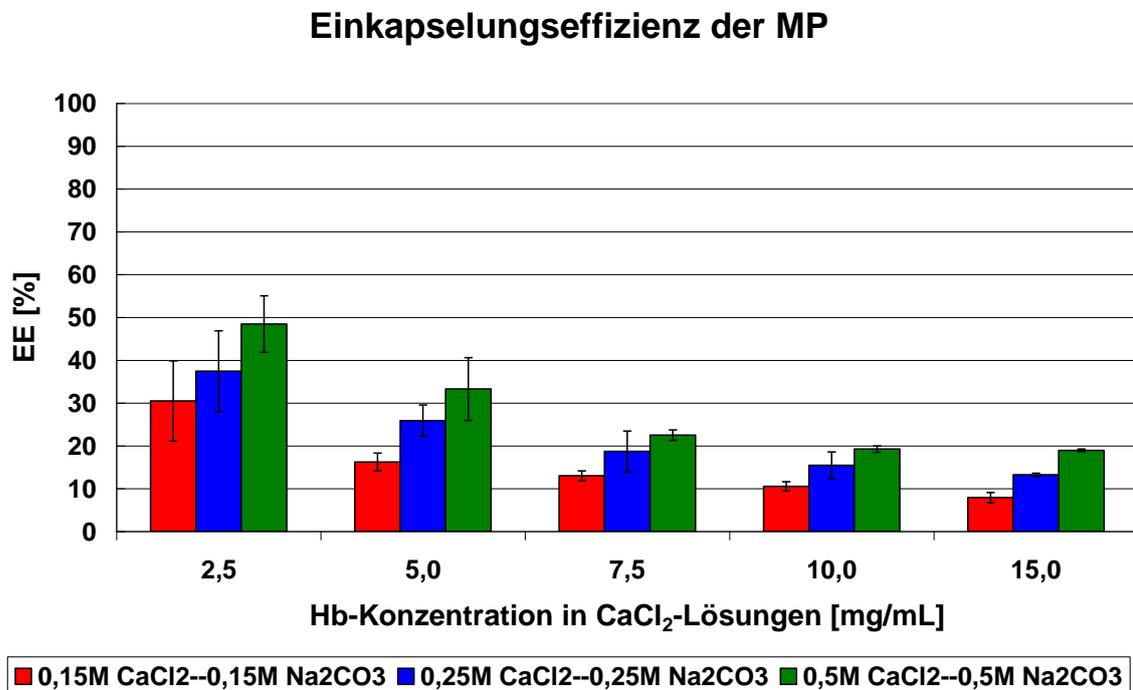


Abb. 3-1: Hb-Einkapselungseffizienz (EE) der MP in Abhängigkeit von der Konzentration der Ausgangssubstanzen

Die Hb-Beladung in MP (absolute Menge des eingekapselten Hb in MP) in mg Hb / mmol CaCO_3 wurde in Abhängigkeit von der Hb-Ausgangskonzentration in **Abb. 3-2** dargestellt. Bei konstanter CaCl_2 / Na_2CO_3 -Konzentration stieg die absolute Menge des eingekapselten Hb mit steigender Hb-Konzentration. Bei konstanter Hb-Konzentration stieg die absolute Menge des eingekapselten Hb mit sinkender CaCl_2 / Na_2CO_3 -Konzentration. Eine Ausnahme bildete die Hb-Konzentration von 15,0 mg/mL. Hier war die Hb-Beladung mit den Werten von 0,15 M und 0,25 M CaCl_2 / Na_2CO_3 vergleichbar.

Hb-Beladung in MP

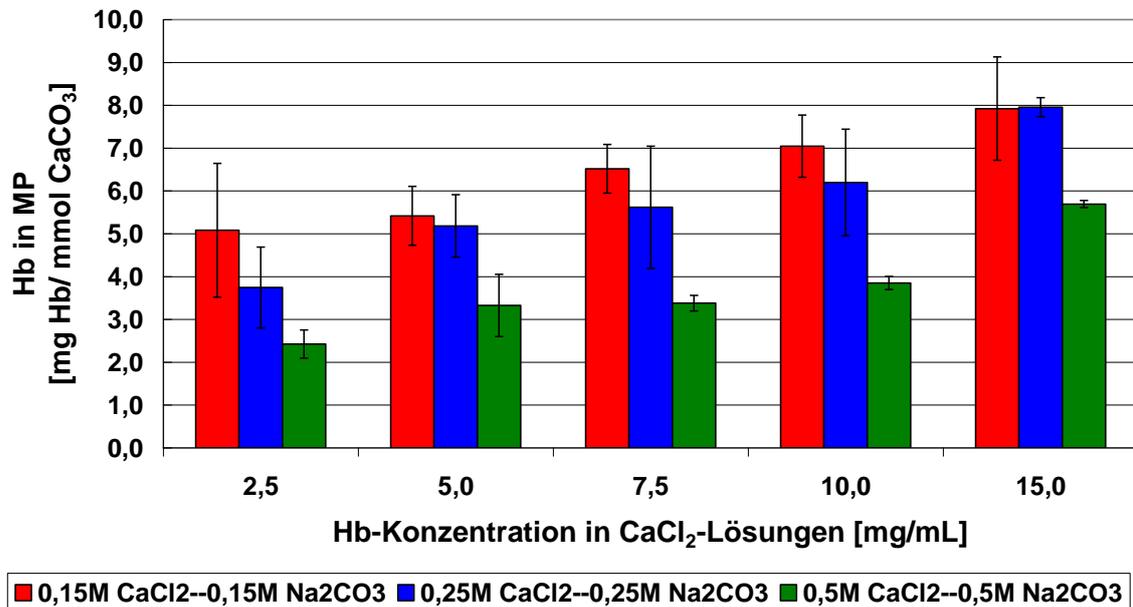


Abb. 3-2: Absolute Menge des eingekapselten Hb der MP nach der Copräzipitation in Abhängigkeit von der Konzentration der Ausgangssubstanzen

Nach der Copräzipitation von 0,25 M CaCl₂ - 15,0 mg/mL Hb mit 0,25 M Na₂CO₃ ergab sich eine Hb-Beladung von 8,0 mg Hb / mmol CaCO₃, was den besten Wert in den durchgeführten Versuchsreihen darstellte. Für weitere Versuche wurden also diese Konzentrationen (0,25 M CaCl₂ - 15,0 mg/mL Hb mit 0,25 M Na₂CO₃) eingesetzt.

Der Zusatz von anderen Polymeren bei der Copräzipitation beeinflusste die Hb-EE der MP. Wenn Hb und andere Polymere zusammen mit CaCO₃ copräzipitiert werden, wird die Hb-Beladung in den MP erniedrigt. **Tabelle 3-2** zeigt den Hb-Gehalt in CaCO₃-MP nach den modifizierten Copräzipitationen bei 0,25 M CaCl₂ - 15,0 mg/mL Hb mit 0,25 M Na₂CO₃ und den dabei eingesetzten Polymeren.

Tabelle 3-2: Änderung der Hb-EE der MP nach Zugabe von anderen Polymeren bei der Copräzipitationen von 0,25 M CaCl₂ - 15,0 mg/mL Hb mit 0,25 M Na₂CO₃.

Polymer bei der Copräzipitation	Hb-Einkapselung der MP nach der Copräzipitation (n=4)	
	eingekapselten Hb in MP [mg Hb / mmol CaCO₃]	EE [%]
Hb	8,0 ± 0,2	13,3 ± 0,4
Hb:HA = 10 : 1 (w/w)	3,8 ± 0,7	6,4 ± 1,1
Hb:HA = 20 : 1 (w/w)	6,3 ± 0,6	10,6 ± 1,0
Hb:HSA = 5 : 1 (w/w)	3,3 ± 0,3	5,6 ± 0,5
Hb:HSA = 10 : 1 (w/w)	4,5 ± 0,4	7,5 ± 0,6
Hb:Dx = 5 : 1 (w/w)	7,0 ± 0,2	11,6 ± 0,4

3.2 Hb-MP ohne Modifikation mit anderen Polymeren

Um die optimale GA-Konzentration in Bezug auf die morphologischen, physikochemischen, immunologischen Eigenschaften und Sauerstoffbindungseigenschaften der MP zu ermitteln, bei denen das Hb in den MP vernetzt werden muss, wurden vier verschiedene GA-Konzentrationen bei der Vernetzung eingesetzt: 1,0 %, 0,1 %, 0,01 % und 0,005 % (v/v). Die Inkubationszeit betrug jeweils 1 h. Die Probenamen sind in **Tabelle 3-3** gelistet.

Tabelle 3-3: Probenbezeichnungen von Hb-MP

Probenname	Beschreibung
Hb-MP-GA1%	Partikel wurde mit 1,0 % (v/v) GA über 1 h vernetzt
Hb-MP-GA0,1%	Partikel wurde mit 0,1 % (v/v) GA über 1 h vernetzt
Hb-MP-GA0,01%	Partikel wurde mit 0,01 % (v/v) GA über 1 h vernetzt
Hb-MP-GA0,005%	Partikel wurde mit 0,005 % (v/v) GA über 1 h vernetzt
Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH ₄	Partikel wurde mit 0,01 % (v/v) GA über 1 h vernetzt, mit Glycin gequench und mit NaBH ₄ reduziert.

3.2.1 Hb-Beladung in MP nach der Herstellung

Nach der Copr äzipitation von 0,25 M CaCl₂ - 15,0 mg/mL Hb mit 0,25 M Na₂CO₃ wurde 8,0 mg Hb von 1 mmol CaCO₃ aufgenommen. Dies entsprach bei 20 mL gesamtem Reaktionsvolumen 20,0 mg Hb. Nach der Auflösung der MP wurde Hb, das nicht oder nicht genug vernetzt worden ist, durch waschen entfernt. In **Abb. 3-3** ist erkennbar, dass bis zu einer GA-Konzentration von 0,01 % der Hb-Betrag in den Partikeln konstant bei 19 mg lag. Wurde das Hb in den MP nur mit einer GA-Konzentration von 0,005 % vernetzt war nach jedem Waschvorgang Hb im Überstand nachweisbar, d. h. diese Konzentration ist für eine komplette Vernetzung und damit die Herstellung stabiler Hb-MP nicht ausreichend.

Für die weiteren Versuche wurden daher nur GA-Konzentrationen von 1,0 %, 0,1 % und 0,01 % GA verwendet.

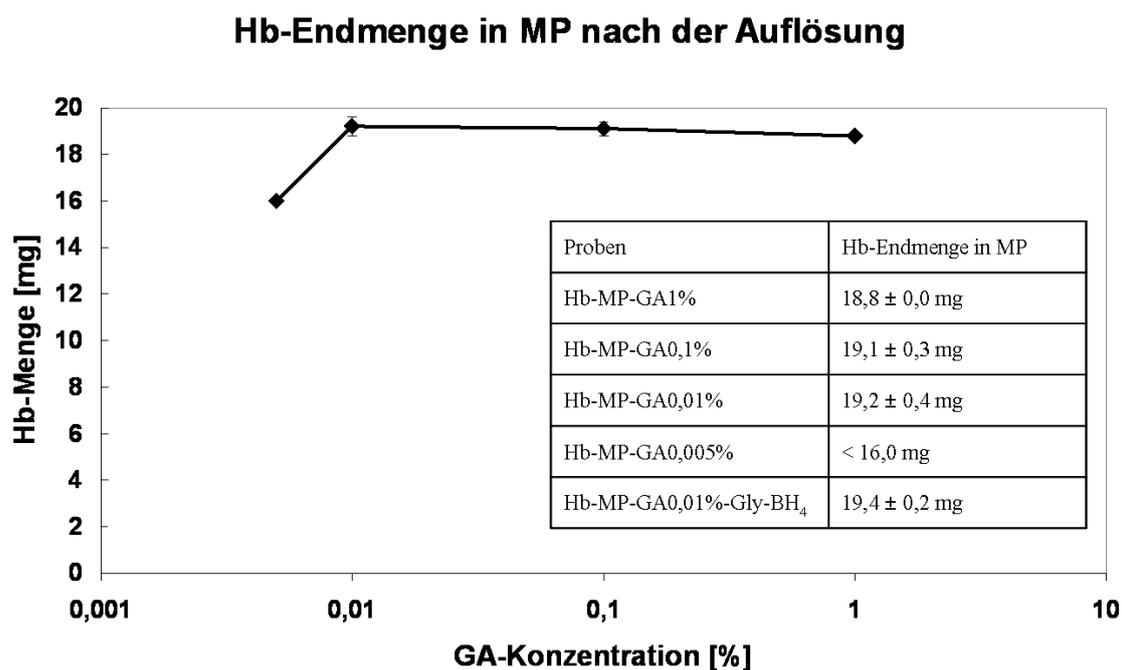


Abb. 3-3: Hb-Menge in MP nach der Auflösung: die Hb-Menge in MP vor der Auflösung betrug 20,0 mg; n=3.

3.2.2 MetHb-Gehalt der Hb-MP

Der MetHb-Gehalt der Hb-Stocklösung betrug weniger als 4 %. Nach der Herstellung stieg der MetHb-Gehalt in den Partikeln an und sank mit sinkender GA-Konzentration (s. **Tabelle 3-4**).

Tabelle 3-4: MetHb-Gehalt der Partikel nach der Herstellung (n=3).

Probe	MetHb-Gehalt [%]
Hb-MP-GA1%	32,8 ± 5,9
Hb-MP-GA0,1%	25,3 ± 5,4
Hb-MP-GA0,01%	18,6 ± 3,8
Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH ₄	15,0 ± 5,1
Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH ₄ nach Postreduktion	6,9 ± 2,0

MetHb-Gehalt in MP

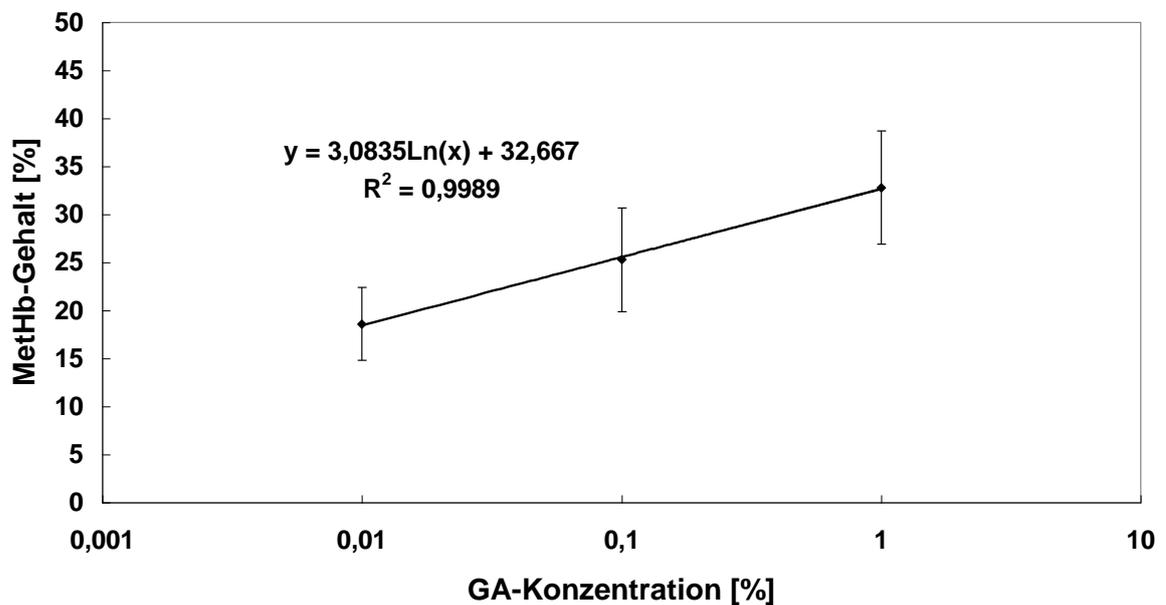


Abb. 3-4: Logarithmischer Zusammenhang zwischen der eingesetzten GA-Menge und dem Met-Hb-Gehalt der Hb-MP.

In dem untersuchten GA-Konzentrationsbereich gab es einen logarithmischen Zusammenhang zwischen der eingesetzten GA-Menge und dem Met-Hb-Gehalt (s. **Abb. 3-4**). Nach dem Quenchen mit Glycin und der Reduktion mit NaBH₄ erniedrigte sich der

MetHb-Gehalt auf $15,0 \pm 5,1$ % und konnte nach der Postreduktion mit Ascorbinsäure auf $6,9 \pm 2,0$ % reduziert werden (s. **Abb. 3-4** und **Tabelle 3-4**).

3.2.3 Partikelgröße und Morphologie

Die Größenverteilung der Hb-MP wurde mittels CASY® 1 Cell Counter (**Abb. 3-5**) anschaulich dargestellt.

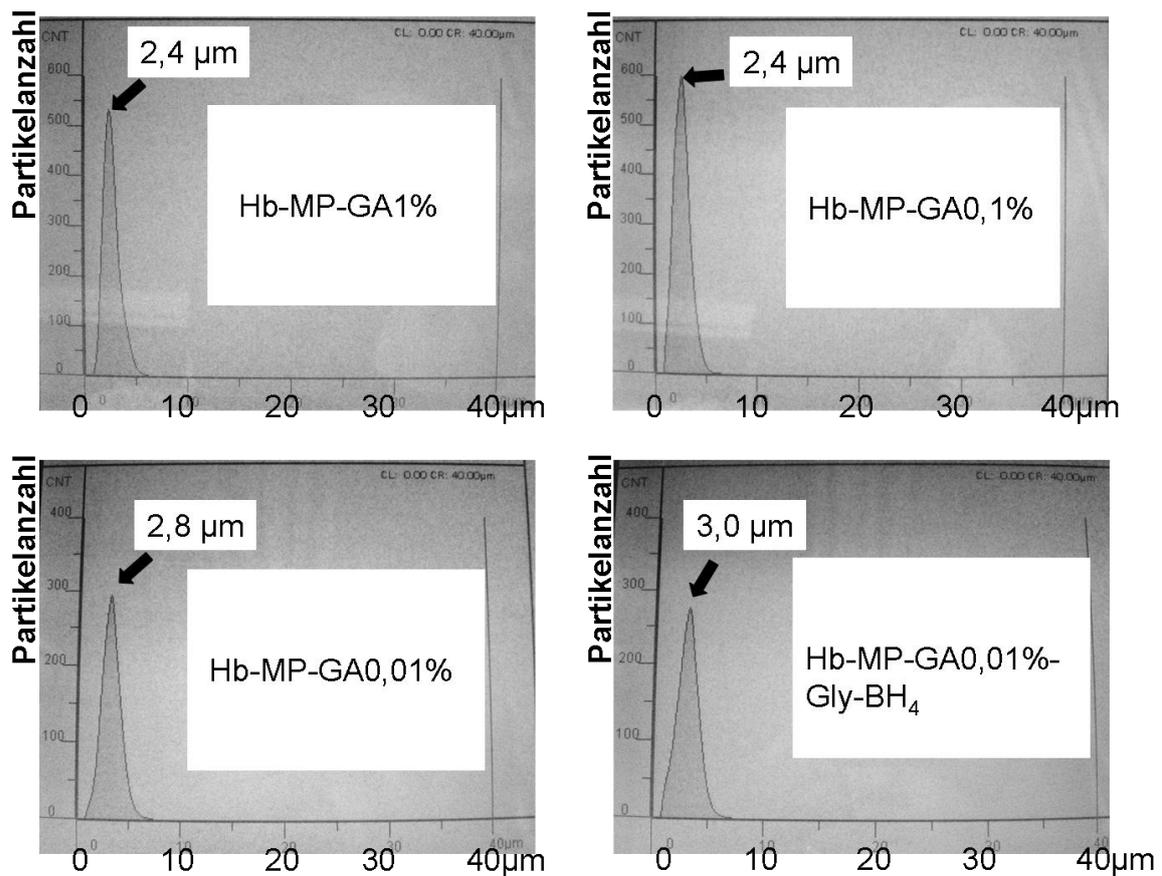


Abb. 3-5: Größenverteilung der Hb-MP im CASY® 1 Cell Counter. Die Hb-MP waren in isotonischer CASY® ton Lösung (pH 7,3) suspendiert.

Die Partikelgröße (mittels LSM Image Browser Release 4.2 Software bei CLSM-Bildern bestimmt) schwankte von Charge zu Charge und lag zwischen 2,5 und 4,5 µm. Durchschnittlich waren die Partikel ca. 3,2 µm groß. Die Konzentration von GA hatte keinen Einfluss auf die Partikelgröße (s. **Tabelle 3-5** und **Abb. 3-6**).

Ergebnisse

Tabelle 3-5: Partikelgröße der Hb-MP vernetzt mit verschiedenen GA-Konzentrationen (mittels LSM Image Browser Release 4.2 Software bei CLSM-Bildern bestimmt).

Probe	Partikelgrößen [μm]
Hb-MP-GA1% (Abb. 3-6 a)	$3,3 \pm 0,7$
Hb-MP-GA0,1% (Abb. 3-6 b)	$3,2 \pm 0,7$
Hb-MP-GA0,01% (Abb. 3-6 c)	$3,2 \pm 0,8$
Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH ₄ (Abb. 3-6 d)	$3,2 \pm 0,7$

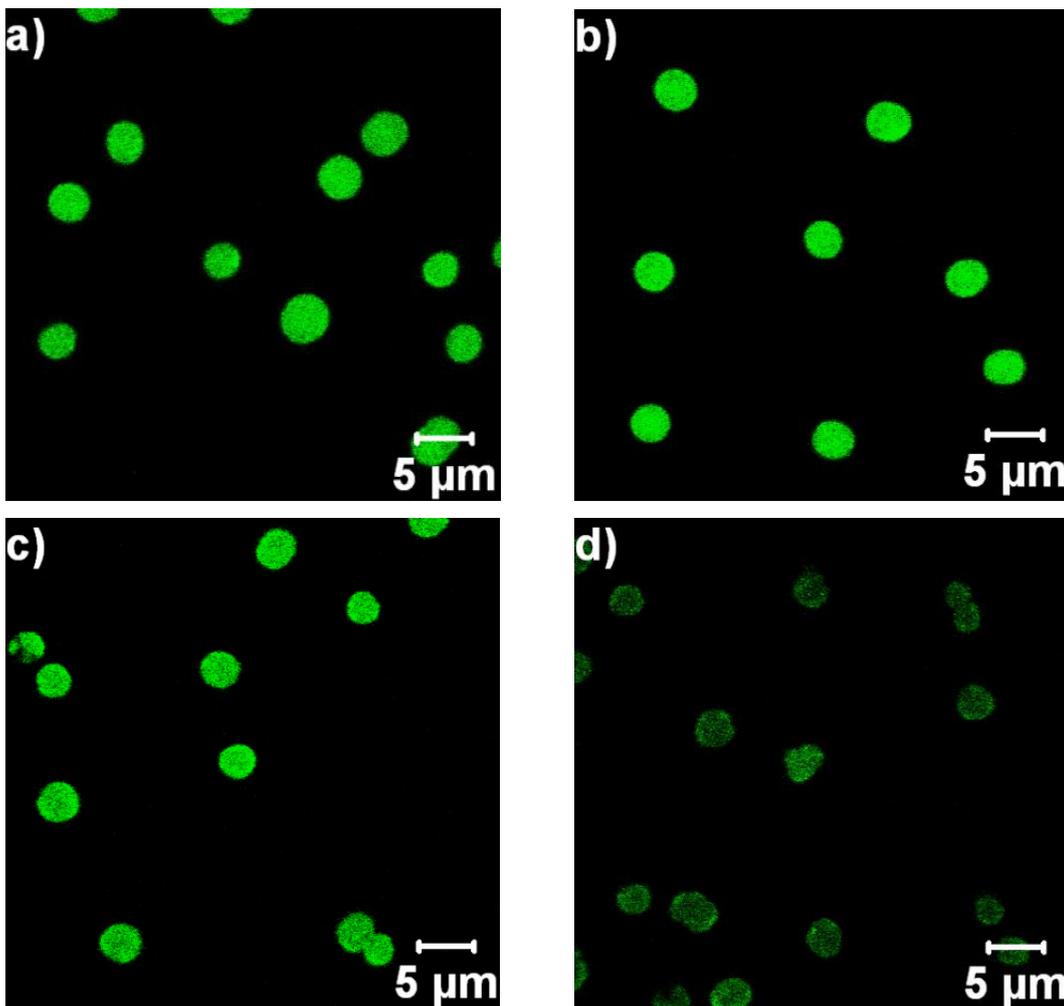


Abb. 3-6: CLSM-Aufnahme von Hb-MP. a) Hb-MP-GA1%. b) Hb-MP-GA0,1%. c) Hb-MP-GA0,01%. d) Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄.

Die Hb-MP wurden mittels CLSM, SEM und TEM charakterisiert. Sie sind sphärisch, monodispers und bei GA-Vernetzung des Hb autofluoreszierend. Nach der Reduktion des vernetzten Hb mit NaBH₄ war die Intensität der Autofluoreszenz schwächer (s. CLSM-Bilder in **Abb. 3-6**). Die homogene Fluoreszenzverteilung dient als Nachweis

für eine gleichmäßige Hb-Verteilung in den Partikeln, was durch die TEM-Aufnahmen bestätigt wurde (s. **Abb. 3-7**). Durch die Untersuchung mittels SEM konnte ein Einblick in die Oberflächenstruktur der Partikel gewonnen werden (s. **Abb. 3-8**).

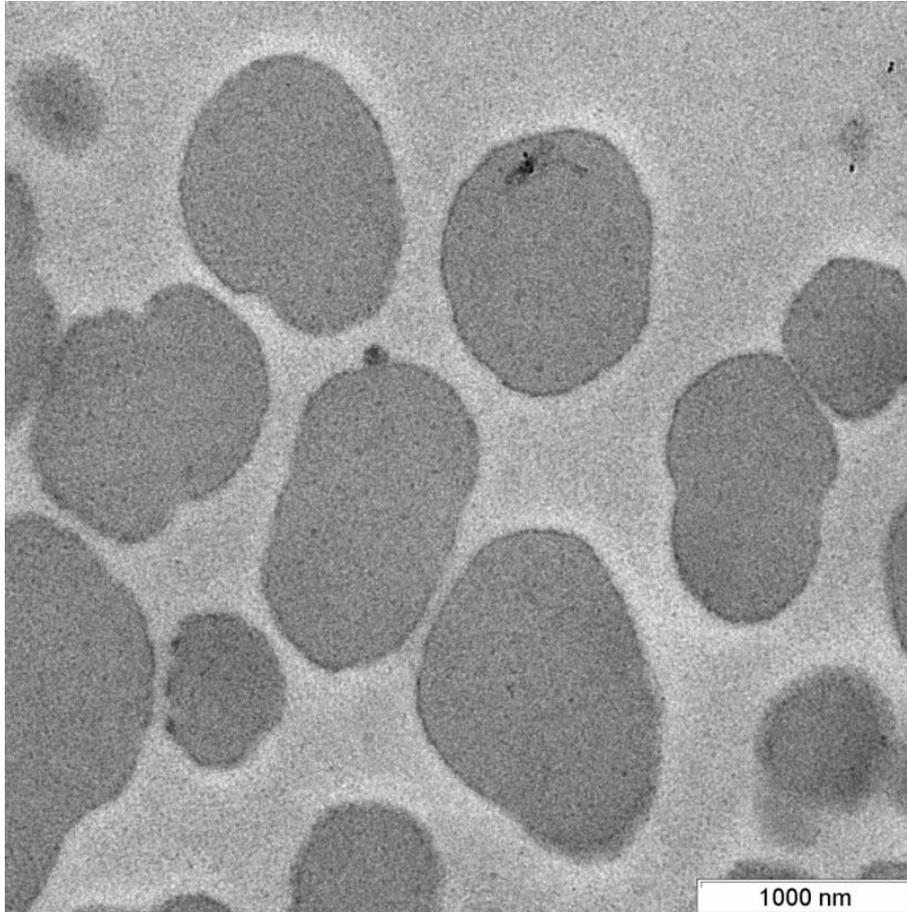


Abb. 3-7: TEM-Aufnahme von Hb-MP-GA0,1%. Hb ist in den MP homogen verteilt. Die unterschiedlichen Größen sind darauf zurückzuführen, dass bei der Herstellung des Dünnschnittes die Partikel aufgrund ihrer Lage in unterschiedlichen Ebenen zerteilt werden.

Ergebnisse

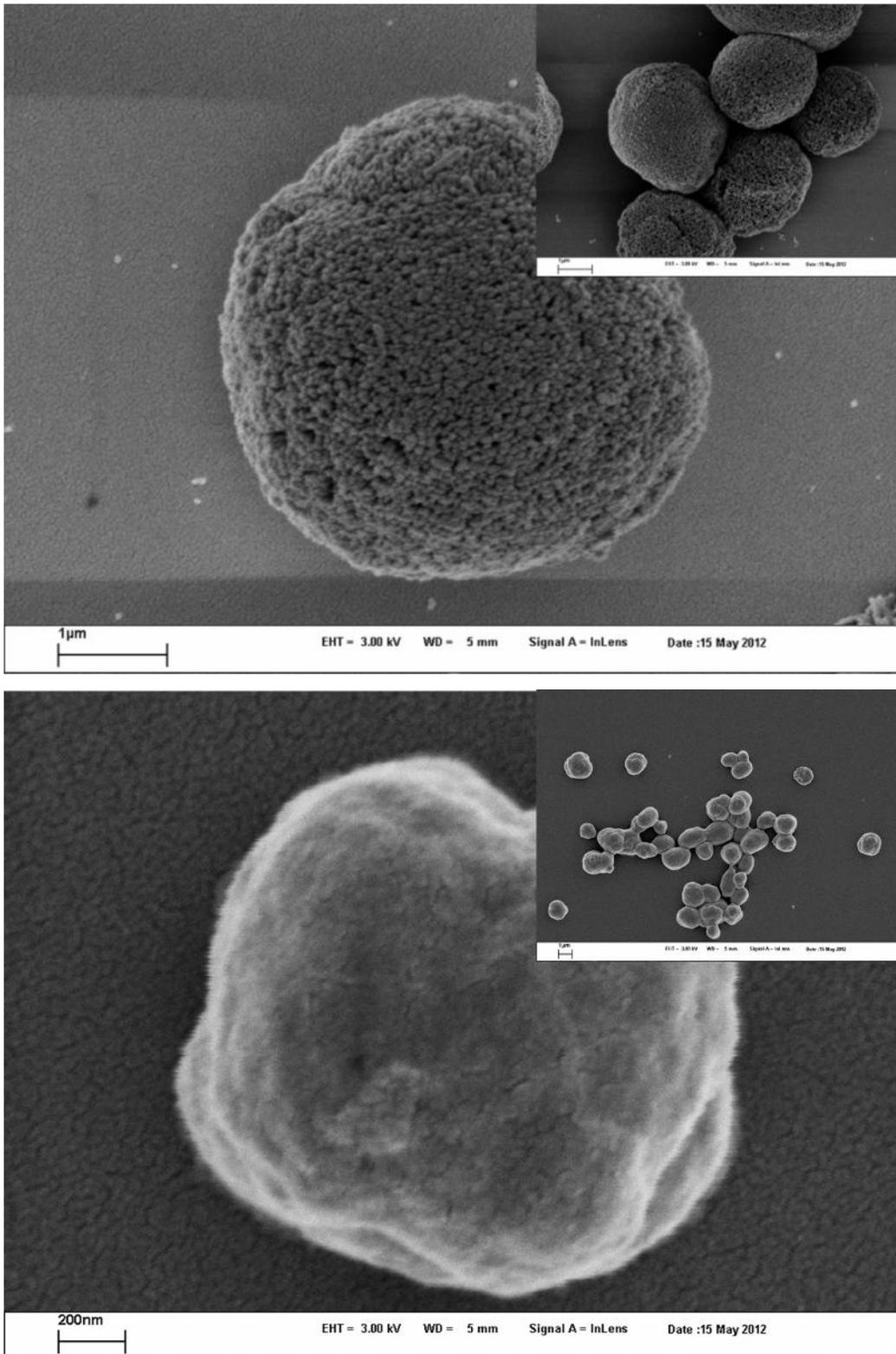


Abb. 3-8: SEM-Aufnahme von CaCO_3 -Partikeln (oben) und Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄ (unten). Die poröse Struktur der CaCO_3 -Partikeln ist leicht zu erkennen. Die Oberfläche der Hb-MP ist im Vergleich zu der Oberfläche der CaCO_3 -Partikeln glatter und die MP erinnern an einen Softball.

3.2.4 Partikelaggregation

Um den Einfluss der GA-Vernetzung des Hb auf eine mögliche Partikelaggregation zu untersuchen, wurden die Volumina der Partikel mit dem CASY® 1 Cell Counter in CASY® ton bestimmt. Partikel mit einem Volumen von > 524 fL (entsprechender Partikeldurchmesser > 10 μm) wurden als Aggregate gezählt. Für jede Partikelsorte wurden die Volumina von drei Chargen bestimmt. Der prozentuale Volumenanteil der Partikelaggregate ist in **Abb. 3-9** dargestellt.

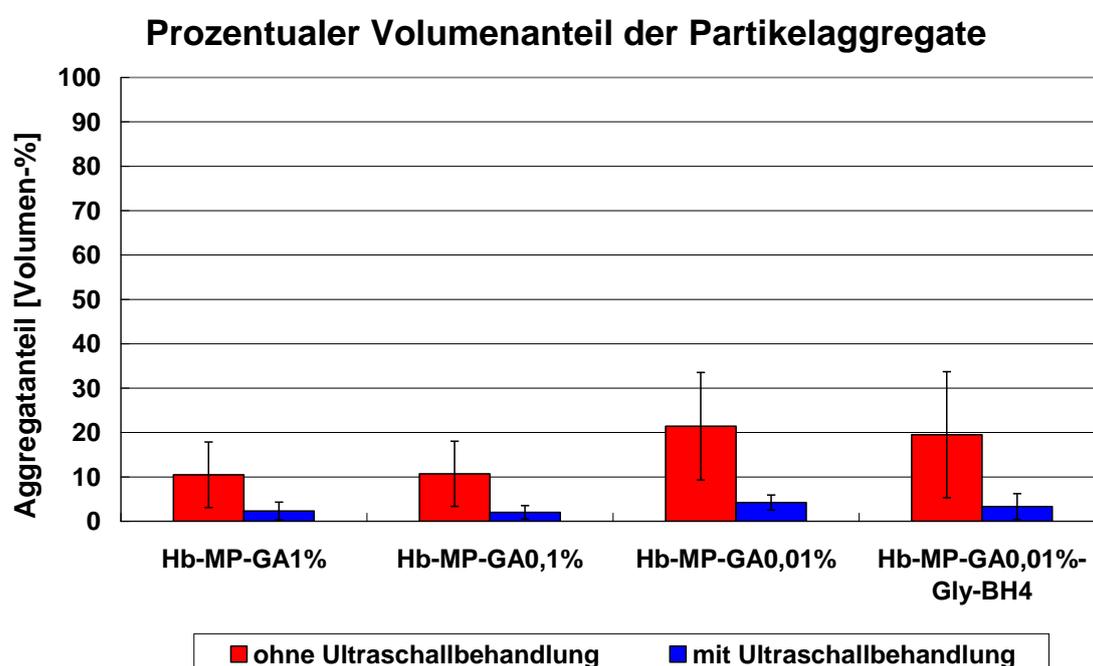


Abb. 3-9: Prozentualer Volumenanteil der Partikelaggregate von verschiedenen Hb-MP (n=3). Partikel mit einem Volumen von > 524 fL (entsprechender Partikeldurchmesser > 10 μm) wurden als Aggregate definiert und gezählt. Die Volumina der Aggregate geteilt durch die gesamten Volumina der Partikel ergaben den Aggregatanteil. Die Partikel wurden in CASY® ton (isotonische Elektrolytlösung mit einem pH Wert von 7,3) suspendiert und gemessen.

Die mit 1,0 % oder 0,1 % GA vernetzten Hb-MP (Hb-MP-GA1% und Hb-MP-GA0,1%) hatten im Vergleich zu den mit 0,01 % GA vernetzten Hb-MP (Hb-MP-GA0,01% und Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄) weniger Aggregate. Die mit 1,0 % oder 0,1 % GA vernetzten Hb-MP hatten einen ähnlichen Aggregatenanteil. Die mit 0,01 % GA vernetzten Partikel wiesen einen fast doppelt so hohen Aggregatanteil auf wie die Hb-MP-GA1% und Hb-MP-GA0,1%. Nach dem Quenchen mit Glycin und der Reduktion mit NaBH₄

veränderte sich der Aggregatanteil bei den mit 0,01 % GA vernetzten Partikeln nicht. Die Hb-MP wurden zusätzlich mit Ultraschall behandelt. Dadurch konnte der Aggregatanteil um bis zu 80 % gegenüber dem Ausgangswert reduziert werden, so dass nach Ultraschallbehandlung weniger als 4 % Hb-MP-Aggregate vorhanden waren.

3.2.5 Zetapotential

Die Hb-MP wurden in drei verschiedenen NaCl-Lösungen mit einer Ionenstärke von 0,25 mM, 2,5 mM und 150 mM (pH 7,0) resuspendiert. In diesen Lösungen wurde das Zetapotential der Partikel als Triplikat gemessen. Alle Partikel hatten ein negatives Zetapotential, was auf verbliebene Carboxygruppen des Hb nach Vernetzung zurückzuführen ist (**Tabelle 3-6**).

Tabelle 3-6: Zetapotential von Hb-MP in NaCl-Lösungen verschiedener Ionenstärke (pH 7,0; n=3).

Probe	Zetapotential [mV]		
	0,25 mM NaCl (Leitfähigkeit: 37 μ S/cm)	2,5 mM NaCl (Leitfähigkeit: 350 μ S/cm)	150 mM NaCl (Leitfähigkeit: 18,2 mS/cm)
Hb-MP-GA1%	-36,3 \pm 0,8	-32,0 \pm 2,0	-13,0 \pm 0,8
Hb-MP-GA0,1%	-34,3 \pm 6,4	-30,3 \pm 2,3	-12,3 \pm 0,9
Hb-MP-GA0,01%	-22,7 \pm 2,9	-20,9 \pm 2,4	-10,5 \pm 1,4
Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH ₄	-25,2 \pm 3,8	-21,9 \pm 3,2	-11,1 \pm 0,9

Das Zetapotential der Partikel sank mit steigender Ionenstärke und stieg mit steigender beim Vernetzen eingesetzter GA-Konzentration. Je höher die GA-Konzentration ist, desto mehr Aminogruppen des Hb reagieren mit GA, so dass die Oberfläche dann stärker negativ geladen ist. Nach dem Quenchen mit Glycin und der Reduktion mit NaBH₄ war das Zetapotential leicht erhöht.

3.2.6 Phagozytose der Hb-MP

Die Phagozytose der Hb-MP durch GCs und MCs in Vollblut (Heparin als Antikoagulant) wurde mit dem Phagotest®-Kit *in vitro* bestimmt. In **Abb. 3-10** sind CLSM-Bilder dargestellt, auf denen die Phagozyten die *E. coli* Bakterien (links) und die Hb-MP (rechts) nach 30 minütiger Inkubation phagozytiert haben.

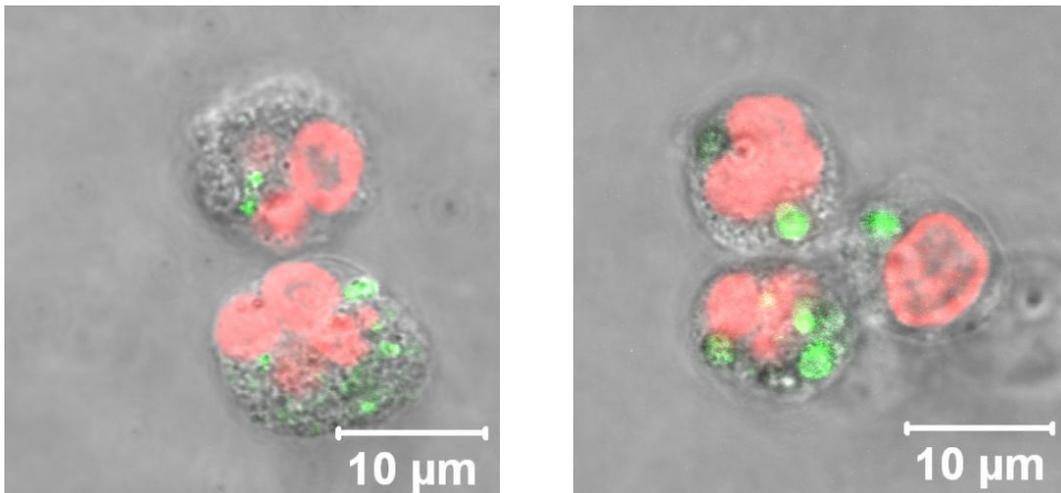


Abb. 3-10: CLSM-Beispielbilder von phagozytierenden Phagozyten nach der Inkubation mit FITC-markierten *E. coli* Bakterien (links) und Hb-MP-GA1% (rechts), die beide grün fluoreszierend sind. Der Phagozytenkern ist mit Propidiumiodid (PI) rot fluoreszierend markiert.

Die Phagozytoseaktivität der GCs und MCs nach der Inkubation in Vollblut mit verschiedenen Hb-MP sowie mit *E. coli* als Kontrolle sind in **Abb. 3-11** zusammengefasst.

Die Anzahl der phagozytierenden Phagozyten stieg mit steigender GA-Konzentration, die bei der Vernetzung eingesetzt wurde. $22,5 \pm 5,8$ % der GCs und $33,7 \pm 10,8$ % der MCs hatten die Hb-MP-GA1% phagozytiert, während die Phagozytoseraten bei den Hb-MP-GA0,1% $17,9 \pm 7,7$ % (GCs) und $24,0 \pm 17,0$ % (MCs) betragen. Bei den Hb-MP-GA0,01% betragen die Phagozytoseraten $6,8 \pm 2,9$ % (GCs) und $8,9 \pm 6,0$ % (MCs). Nach dem Glycin-Quenchen und der Reduktion mit NaBH_4 wurde die Phagozytoserate bei beiden Zelltypen auf weniger als 5 % reduziert (GCs: $4,6 \pm 1,5$ %; MCs: $4,9 \pm 2,1$ %).

Phagozytose der Hb-MP

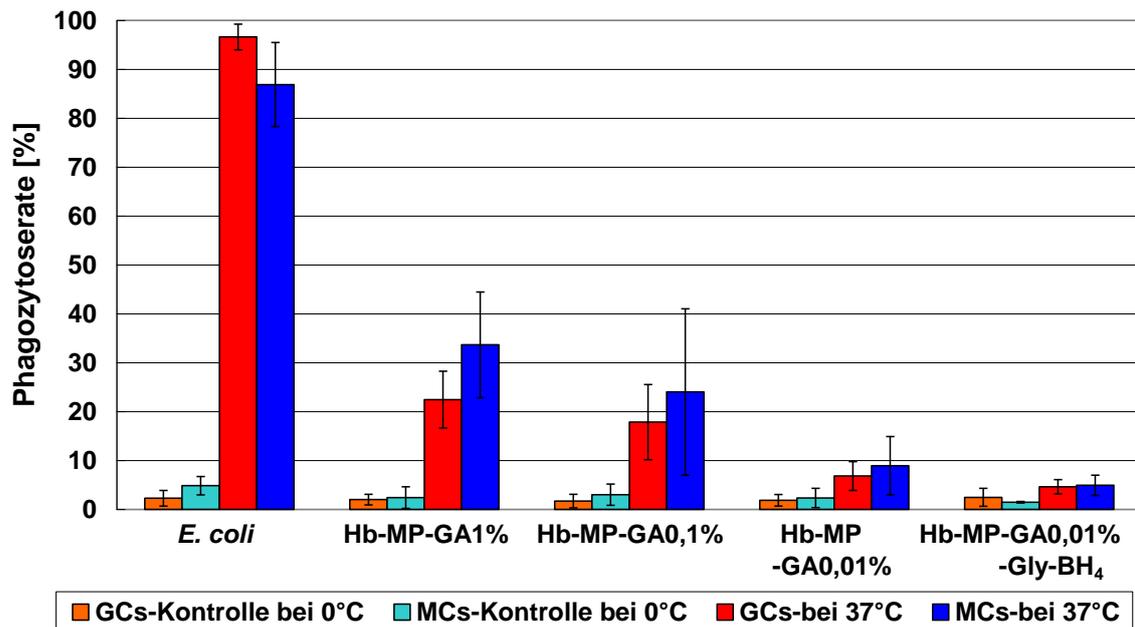


Abb. 3-11: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) des prozentualer Anteils der phagozytierenden Zellen (GCs und MCs) in Vollblut nach Inkubation mit vier verschiedenen Hb-MP und FITC-markierten *E. coli* Bakterien (Kontrolle). Die Mittelwerte und SDs wurden aus drei Versuchen berechnet.

3.2.7 Inkubation in plättchenreichem Plasma (PRP)

Ein idealer Sauerstoffträger sollte biokompatibel sein und lange in der Blutbahn zirkulieren können. Die immunologischen Eigenschaften der Hb-MP sind deswegen von zentraler Bedeutung und müssen erfasst werden. Ob die Hb-MP während der Zirkulation mit Thrombozyten oder Plasmaproteinen interagieren, kann durch verschiedene Tests *in vitro* vorhergesagt werden. Die Hb-MP wurden in PRP *in vitro* inkubiert und das Verhalten der Hb-MP in PRP charakterisiert.

Die Partikel wurden vor der Inkubation mit Ultraschall behandelt, um vorhandene Aggregate zu beseitigen. Anschließend wurden die Partikel in PRP bei 37 °C für 30 min unter sanftem Schaukeln inkubiert. Die Hb-MP-GA1% und Hb-MP-GA0,1% bildeten im PRP Aggregate, die größer als 20 µm und teilweise größer als 50 µm waren. Die Hb-MP-GA0,01% bildeten dagegen Aggregate, die < 20 µm waren, während die Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄ Aggregate zwischen 10 - 15 µm bildeten. In **Abb. 3-12** sind CLSM-Beispielbilder dargestellt.

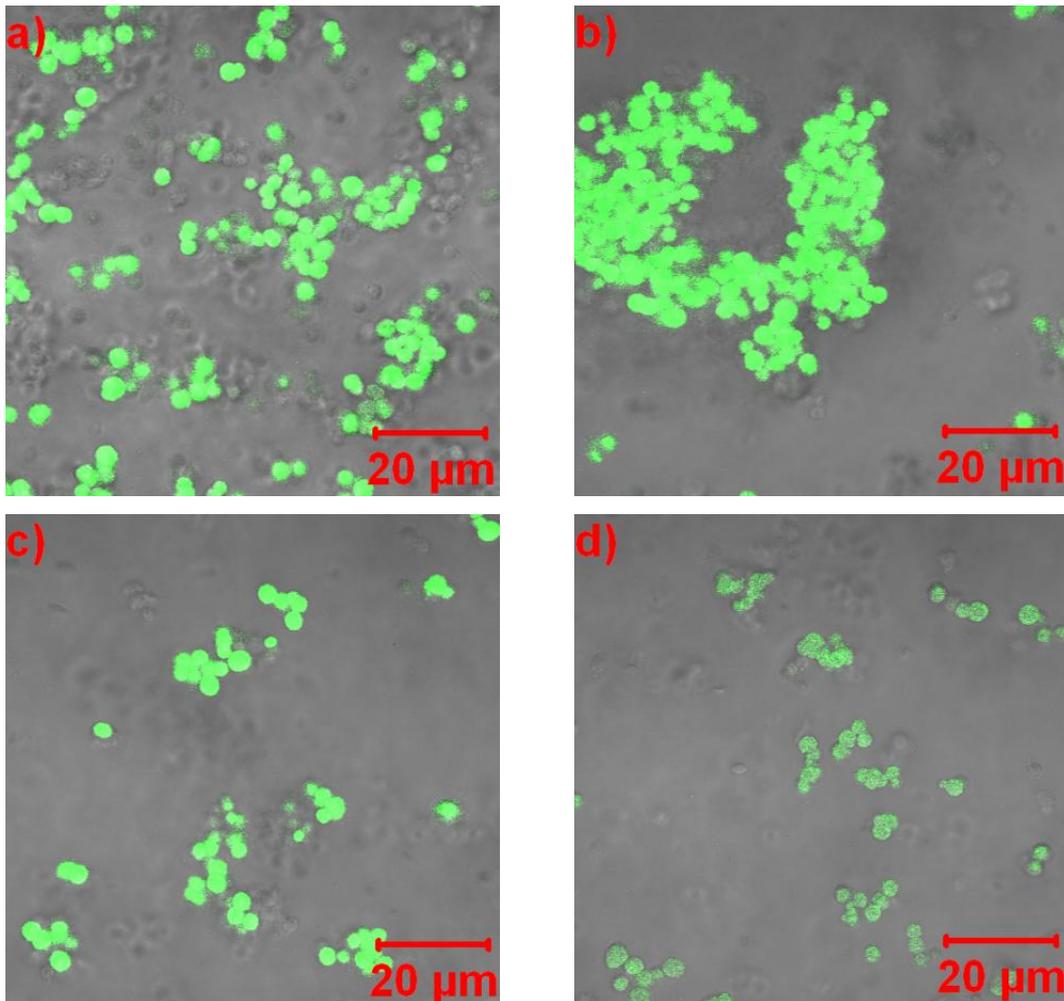


Abb. 3-12: CLSM-Bilder von PRP nach Inkubation mit a) Hb-MP-GA1%. b) Hb-MP-GA0,1%. c) Hb-MP-GA0,01% und d) Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄. Vor der Inkubation wurde die Konzentration der Hb-MP mit 0,9 % NaCl auf 4 % (v/v) eingestellt und die Hb-MP mit Ultraschall behandelt, um vorhandene Aggregate zu beseitigen. Bei der Darstellung wurden Gebiete ausgewählt, in denen eine charakteristische Aggregatbildung sichtbar war.

3.2.8 Sauerstofftransportfunktion der Hb-MP

Das oxygenierte Hb (OxyHb) wurde am Spektralphotometer zwischen 380 und 700 nm gescannt. Anschließend wurde der Sauerstoff in der OxyHb-Lösung mit Hilfe von 0,1 % SDT entfernt und das desoxygenierte Hb (DeoxyHb) sofort zwischen 380 und 700 nm gescannt. Die Hb-MP wurden genauso wie Hb behandelt und gescannt. OxyHb besitzt in seinem Spektrum drei charakteristische Absorptionsmaxima bei 414, 542 und 576 nm. Im Vergleich dazu weist DeoxyHb nur zwei charakteristische Absorptionspeaks bei 432 und 556 nm auf. Beide Spektren sind in **Abb. 3-13** und **Abb. 3-14** anschaulich dargestellt.

Spektren von Hb und Hb-MP nach Oxygenierung

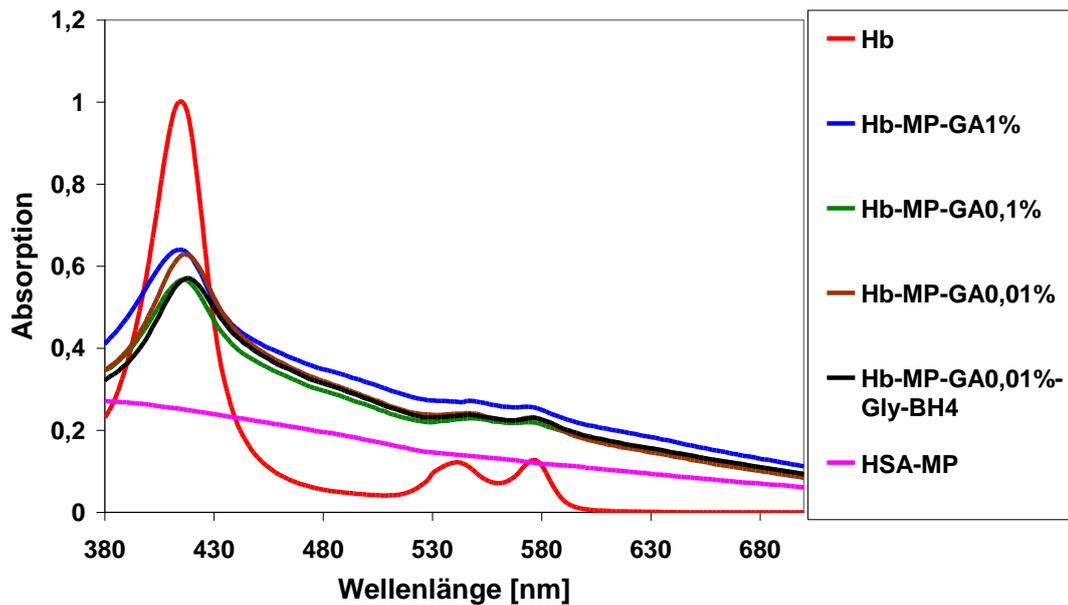


Abb. 3-13: Spektren von oxygeniertem Hb (OxyHb) und oxygenierten Hb-MP. Die Hb-MP zeigen wie OxyHb drei Absorptionsmaxima zwischen 400 und 600 nm (bei 414, 542 und 576 nm). Die allmähliche Zunahme der Basislinie der Spektren von Hb-MP ist auf die Streuung der Partikel zurückzuführen. Die Streuung der Partikel ist durch das Spektrum der HSA-Mikropartikel (HSA-MP) als Beispiel dargestellt.

Spektren von Hb und Hb-MP nach Desoxygenierung

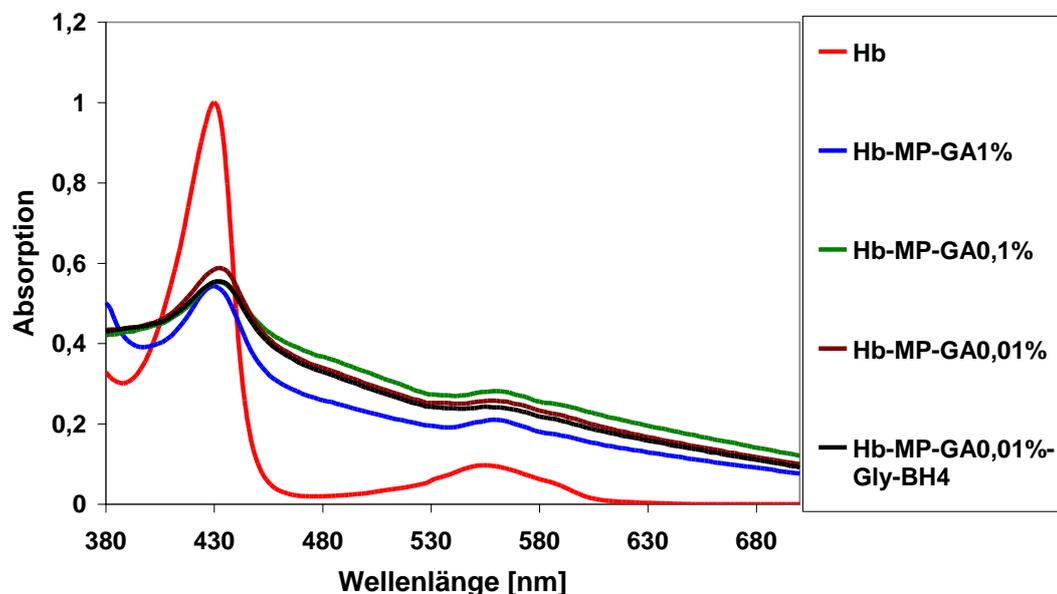


Abb. 3-14: Spektren von desoxygeniertem Hb (DeoxyHb) und desoxygenierten Hb-MP. Die Hb-MP zeigen wie DeoxyHb zwei Absorptionsmaxima zwischen 400 und 600 nm (bei 432 und 556 nm). Die allmähliche Zunahme der Basislinie der Spektren von Hb-MP ist durch die Streuung der Partikel verursacht.

Die Hb-MP verhielten sich ähnlich wie Hb. Nach der Herstellung waren die Partikel oxygeniert. Sie zeigten wie OxyHb auch drei Absorptionsmaxima zwischen 400 und 600 nm. Nach der Behandlung mit SDT waren die Hb-MP desoxygeniert und zeigten DeoxyHb ähnliche Spektren. Die Spektren von oxygenierten und desoxygenierten Hb-MP-GA1%, Hb-MP-GA0,1%, Hb-MP-GA0,01% Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄ sind in **Abb. 3-13** und **Abb. 3-14** dargestellt.

3.2.9 Sauerstoffbindungskurve (ODC)

Die Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄ wiesen von den mit GA vernetzten MP die besten immunologischen Eigenschaften auf, weshalb diese MP für die weiteren Untersuchungen zur Sauerstoffbindung ausgewählt wurden. Die Partikel wurden sowohl unter nicht sauerstoffarmen (normaler Luftsauerstoffpartialdruck) als auch unter sauerstoffarmen Bedingungen (pO_2 weniger als 1 mmHg) vernetzt. Zum Vergleich wurde eine Hb-Lösung gemessen. Die ODCs sind in **Abb. 3-15** zusammen dargestellt.

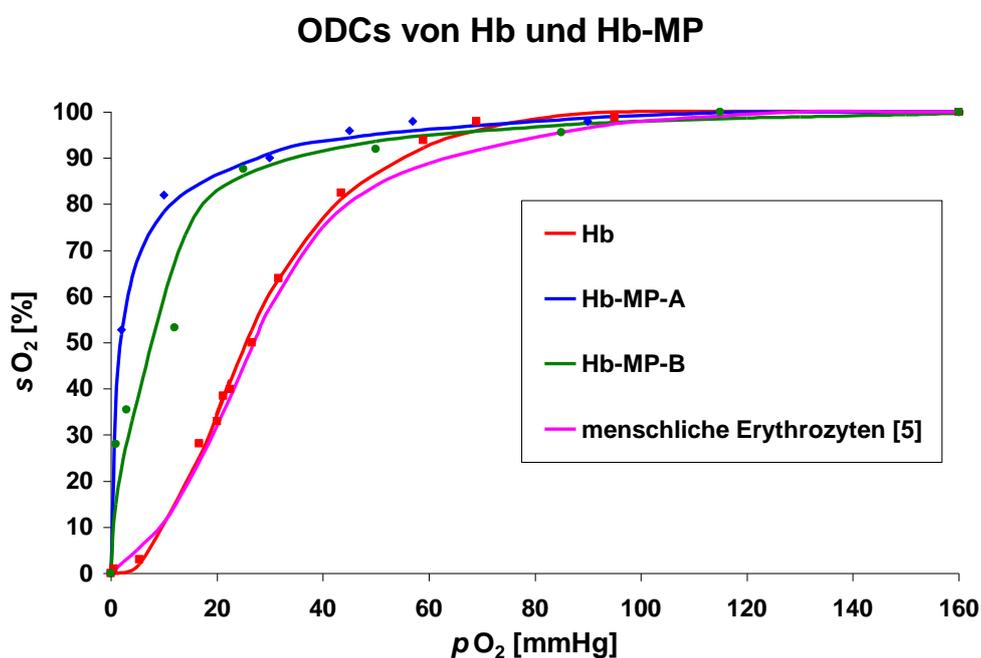


Abb. 3-15: ODCs von Hb, Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄ (Hb-MP-A und B) und menschlichen Erythrozyten. Hb-MP-A: Partikel sind unter normalem Luftsauerstoffpartialdruck vernetzt; Hb-MP-B: Partikel sind bei pO_2 weniger als 1 mmHg vernetzt. Die sO_2 bei bestimmtem pO_2 wurde mit Gl. 10 berechnet. Die sO_2 wurden gegen korrespondierende pO_2 im Diagramm aufgetragen und die ODCs diesen Koordinaten angepasst. Der p_{50} entspricht dem Sauerstoffpartialdruck pO_2 bei Halbsättigung. Die ODCs menschlicher Erythrozyten sind der Literatur entnommen [5].

Das freie Hb hatte einen $p50$ von $26,5 \pm 1,5$ mmHg ($35,3 \pm 2,0$ hPa), was mit den Literaturwerten übereinstimmt [139,142,143]. Die Partikel, die unter normalem Luftsauerstoffpartialdruck vernetzt wurden, hatten einen $p50$ von weniger als 2 mmHg (2,7 hPa). Die Partikel, die unter sauerstoffarmen Bedingungen vernetzt wurden, hatten einen $p50$ von $7,0 \pm 2,0$ mmHg ($9,3 \pm 2,7$ hPa), d. h. beide Partikeltypen besitzen eine sehr hohe Sauerstoffaffinität.

3.3 PEGylierung der Partikel

PEG ist ein neutrales hydrophiles Polymer, das in Wasser und in vielen organischen Lösungsmitteln löslich ist [144]. Aufgrund seiner geringen Toxizität und Immunogenität ist PEG für biomedizinische Anwendungen gut geeignet. Die PEGylierung der Partikeloberfläche wird z. B. verwendet, um eine unerwünschte Proteinadsorption, die Komplement- und Thrombozytenaktivierung und die Clearance von Mikro-/Nanopartikeln durch Phagozyten zu reduzieren sowie die Zirkulationszeiten zu verlängern [97,144–149].

Die Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄ wurden mit cc-mPEG 5.000 PEGyliert. Die Hb-MP nach der PEGylierung (Hb-MP-mPEG) besaßen einen erhöhten MetHb-Anteil von $20,1 \pm 4,9$ % ($n=3$) gegenüber nicht PEGylierten Partikel ($15,0 \pm 5,1$ %). Die Postreduktion der Hb-MP-mPEG mit Ascorbinsäure führte zu einem auf die Hälfte ($9,5 \pm 2,9$ %) reduzierten MetHb-Gehalt.

3.3.1 Größe und Morphologie der PEGylierten Hb-MP

Nach der PEGylierung hatten die Partikel eine Größe von $3,2 \pm 0,6$ μm (bestimmt mit der Software LSM Image Browser Release 4.2 bei CLSM-Bildern), welche sich von der Größe der Partikel vor der PEGylierung ($3,2 \pm 0,7$ μm) nicht unterschieden. Die Größenverteilung der Hb-MP-mPEG wurde mit dem CASY® 1 Cell Counter bestimmt (**Abb. 3-16** links). Sie unterschied sich auch nicht in der Größenverteilung von den Partikeln vor der PEGylierung. Auf den CLSM-Aufnahmen (**Abb. 3-16** rechts) ließen sich keine morphologische Veränderungen der Partikel erkennen.

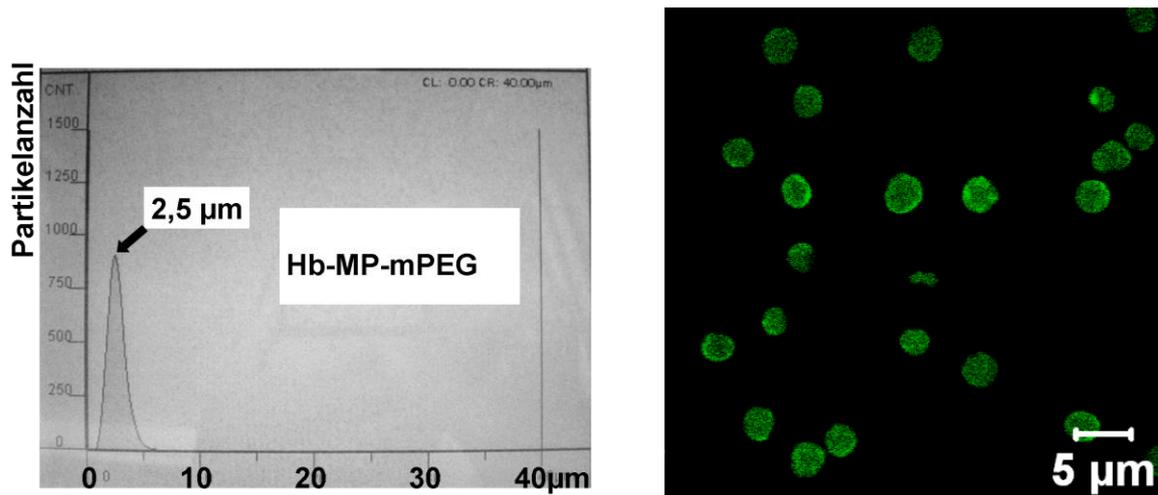


Abb. 3-16: Bestimmung der Größenverteilung der Hb-MP-mPEG mittels CASY® 1 Cell Counter (links). Die Partikel waren in CASY® ton Lösung (pH 7,3) suspendiert. CLSM-Aufnahme von Hb-MP-mPEG (rechts).

3.3.2 Partikelaggregation

Die Volumina der Partikel wurden mit dem CASY® 1 Cell Counter in CASY® ton Lösung bestimmt. Partikel mit einem Volumen von > 524 fL (entsprechender Partikeldurchmesser > 10 µm) wurden als Aggregate gezählt. Der prozentuale Volumenanteil der Partikelaggregate ist in **Abb. 3-17** dargestellt. Zum Vergleich ist der Anteil der Partikelaggregate vor der PEGylierung auch aufgetragen. Die Hb-MP vor und nach der PEGylierung hatten ähnliche prozentuale Volumenanteile an Partikelaggregaten. Nach der Behandlung mit Ultraschall war der Aggregatanteil stark reduziert (< 3 %).

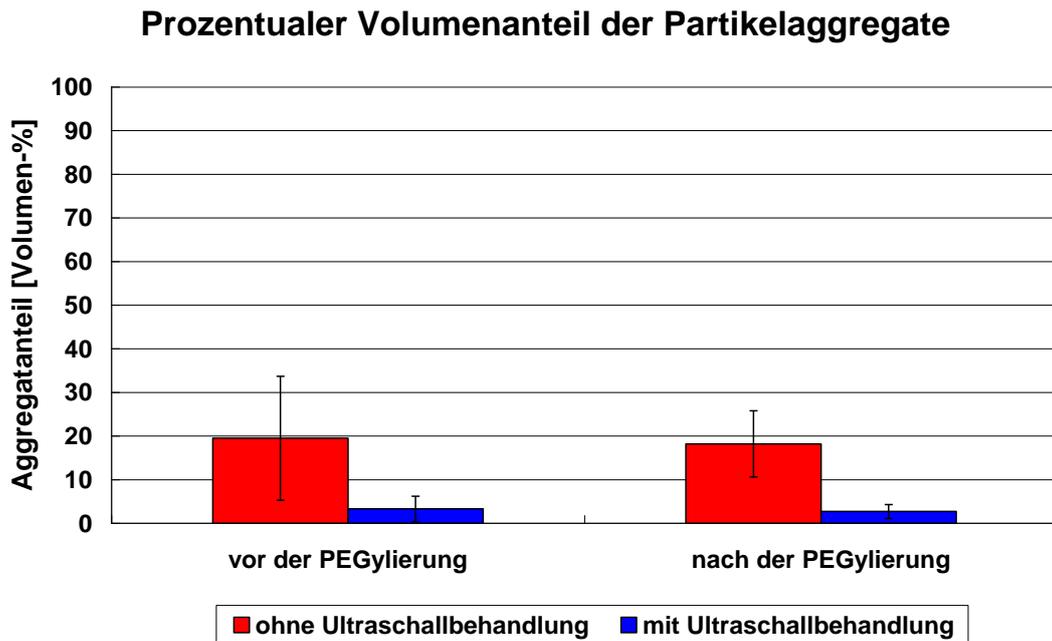


Abb. 3-17: Prozentualer Volumenanteil der Partikelaggregate von Hb-MP vor und nach der PEGylierung (n=3). Partikel mit einem Volumen von > 524 fL (entsprechender Partikeldurchmesser > 10 µm) wurden als Aggregate definiert und gezählt. Die Volumina der Aggregate geteilt durch die Gesamtvolumina der Partikel ergaben den Aggregatanteil. Die Partikel wurden in isotonischer CASY® ton Lösung (pH 7,3) suspendiert und gemessen.

3.3.3 Zetapotential

Das Zetapotential der Partikel in NaCl-Lösungen unterschiedlicher Ionenstärken wurde als Triplikat gemessen (**Tabelle 3-7**). mPEG ist ein neutrales Molekül, so dass durch die PEGylierung die Ladungen der Partikeloberfläche abgeschirmt werden. Deshalb wurde das Zetapotential der Partikel als Nachweis für eine erfolgreiche PEGylierung verwendet.

Tabelle 3-7: Zetapotential der Hb-MP vor und nach PEGylierung in NaCl-Lösungen verschiedener Ionenstärke (pH=7,0; n=3).

Probe	Zetapotential [mV]		
	0,25 mM NaCl (Leitfähigkeit: 37 µS/cm)	2,5 mM NaCl (Leitfähigkeit: 350 µS/cm)	150 mM NaCl (Leitfähigkeit: 18,2 mS/cm)
Hb-MP vor PEGylierung	-25,2 ± 3,8	-21,9 ± 3,2	-11,1 ± 0,9
Hb-MP nach PEGylierung	-18,9 ± 2,1	-15,9 ± 1,9	-5,7 ± 0,8

3.3.4 Phagozytose der PEGylierten Hb-MP

Die Phagozytoseaktivitäten der GCs und MCs in heparinisiertem Vollblut nach der Inkubation mit Hb-MP vor (Hb-MP-GA 0,01%-Gly-BH₄) und nach der PEGylierung (Hb-MP-mPEG) wurden mit dem Phagotest®-Kit *in vitro* bestimmt und dargestellt (**Abb. 3-18**). Nach der Inkubation hatten 3,5 ± 0,7 % der GCs und 5,2 ± 1,0 % der MCs des Vollblutes die PEGylierten Partikel phagozytiert. Die Phagozytoseaktivität der GCs und MCs war vergleichbar mit der bei nicht PEGylierten Partikeln (4,6 ± 1,5 % bei GCs und 4,9 ± 2,1 % bei MCs).

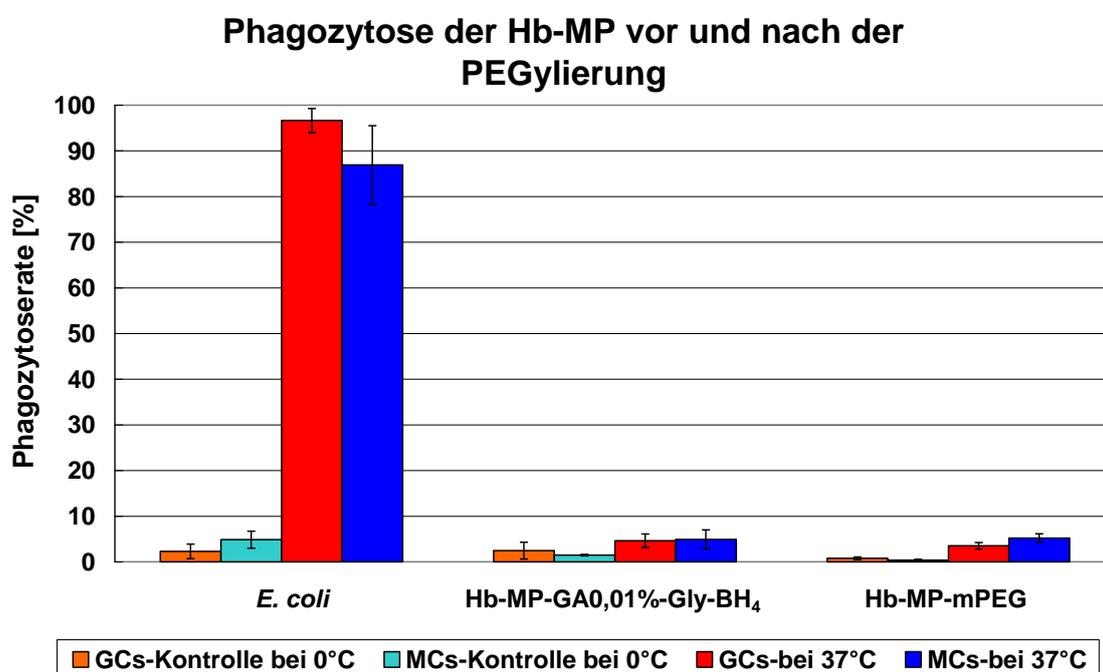


Abb. 3-18: Prozentualer Anteil der phagozytierenden GCs und MCs in Vollblut nach der Inkubation mit Hb-MP vor der PEGylierung (Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄) und nach der PEGylierung (Hb-MP-mPEG) und von FITC-markierten *E. coli* Bakterien. Die Mittelwerte und SDs wurden aus drei Versuchen berechnet.

3.3.5 Inkubation in plättchenreichem Plasma (PRP)

Hb-MP-mPEG wurden vor der Inkubation mit Ultraschall behandelt, um mögliche Aggregate zu beseitigen. Anschließend wurden die Partikel in PRP bei 37 °C für 30 min unter sanftem Schaukeln inkubiert. Nach der Inkubation der Hb-MP-mPEG in PRP waren

nur wenige Aggregate $> 10 \mu\text{m}$ sichtbar (s. **Abb. 3-19**). Die Aggregatbildung PEGylierter MP war schwächer als die der nicht PEGylierten MP.

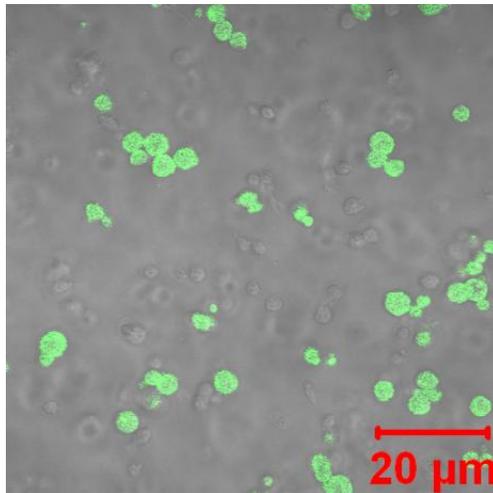


Abb. 3-19: CLSM-Bilder von Hb-MP-mPEG in PRP nach der Inkubation. Vor der Inkubation wurde die Konzentration der Hb-MP-mPEG mit 0,9 % NaCl auf 5 % (v/v) eingestellt und die Hb-MP-mPEG mittels Ultraschall-Stab behandelt, um vorhandene Aggregate zu beseitigen.

3.3.6 Sauerstofftransportfunktion der PEGylierten Hb-MP

Die oxygenierten Hb-MP-mPEG wurden am Spektralphotometer zwischen 380 und 700 nm gescannt. Nach der Desoxygenierung mit Hilfe von 0,1% SDT wurden die Partikel noch einmal zwischen 380 und 700 nm gescannt. Die Hb-MP-mPEG verhielten sich ähnlich wie Hb. Oxygenierte Hb-MP-mPEG zeigten drei Absorptionsmaxima (414, 542 und 576 nm) und Desoxygenierte Hb-MP-mPEG hatten zwei Absorptionsmaxima (432 und 556 nm) zwischen 400 und 600 nm (s. **Abb. 3-20**).

Spektren von Hb und Hb-MP-mPEG

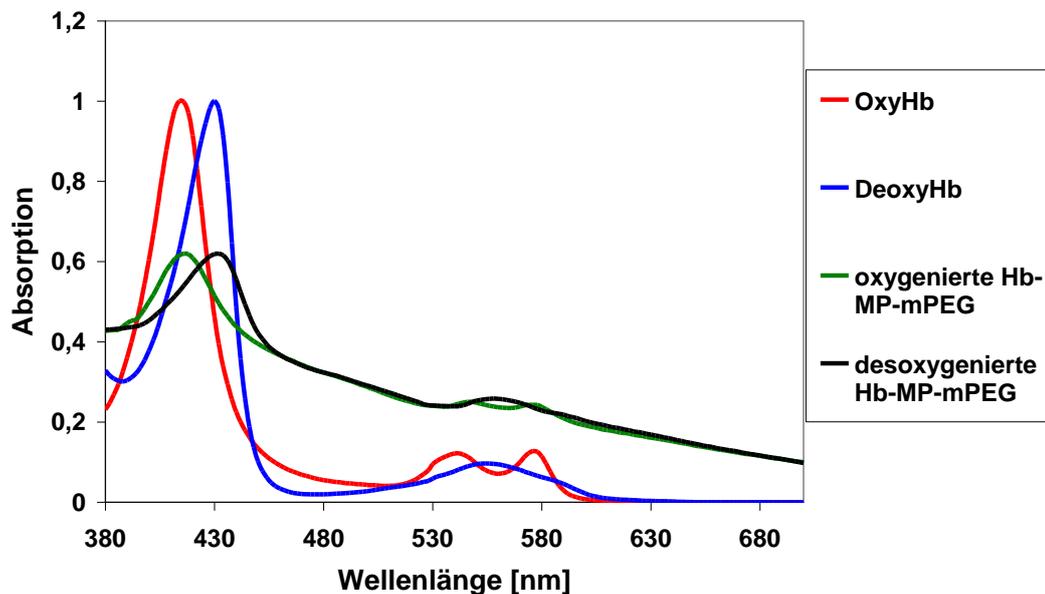


Abb. 3-20: Spektren von Hb und Hb-MP-mPEG (oxygeniert / desoxygeniert). Die oxygenierten Hb-MP-mPEG zeigten wie OxyHb drei Absorptionsmaxima zwischen 400 und 600 nm (bei 414, 542 und 576 nm) und die desoxygenierten Hb-MP-mPEG zeigten wie DeoxyHb zwei Absorptionsmaxima zwischen 400 und 600 nm (bei 432 und 556 nm). Die allmähliche Zunahme der Basislinie der Spektren von Hb-MP-mPEG ist auf die Streuung der Partikel zurückzuführen.

3.3.7 Sauerstoffbindungskurve (ODC)

Die unter normalem Luftsauerstoffpartialdruck vernetzten Hb-MP-mPEG hatten einen $p50$ von weniger als 1 mmHg (1,3 hPa). Die Hb-MP-mPEG, die unter sauerstoffarmen Bedingungen vernetzt waren, hatten einen $p50$ von $5,3 \pm 0,6$ mmHg ($7,1 \pm 0,8$ hPa).

Die Hb-MP nach der PEGylierung (vernetzt unter sauerstoffarmen Bedingungen) wiesen ebenfalls eine hohe Sauerstoffaffinität auf. Der $p50$ der Hb-MP-mPEG ($5,3 \pm 0,6$ mmHg) war kleiner als der $p50$ der Partikel vor der PEGylierung ($7,0 \pm 2,0$ mmHg), d. h. die PEGylierung hat die Sauerstoffaffinität der Partikel erhöht. Die ODCs von Hb-MP vor und nach der PEGylierung sind in **Abb. 3-21** dargestellt.

ODCs von Hb-MP vor und nach der PEGylierung

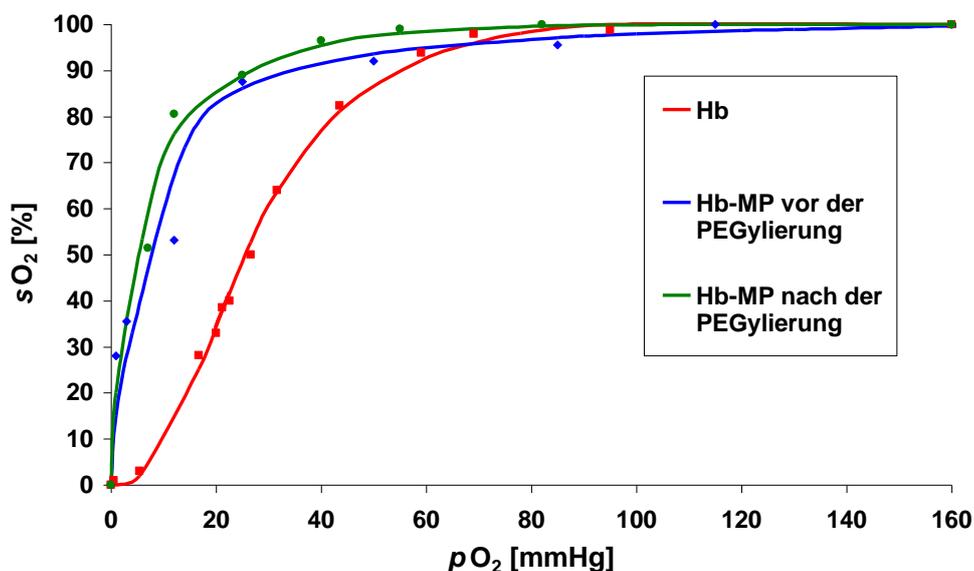


Abb. 3-21: ODCs von Hb-MP vor (Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄) und nach (Hb-MP-mPEG) der PEGylierung und Hb. Die Partikel sind bei pO_2 weniger als 1 mmHg vernetzt. Die sO_2 bei bestimmtem pO_2 wurde mit Gl. 10 berechnet. Die sO_2 wurden gegen korrespondierende pO_2 im Diagramm aufgetragen und die ODCs diese Koordinaten angepasst. Der p_{50} entspricht dem Sauerstoffpartialdruck pO_2 bei Halbsättigung.

3.4 Hb-Hyaluronan-Mischpartikel (Hb-HA-MP)

Bei der Herstellung der Hb-HA-MP wurden Hb und HA in Gegenwart von $CaCl_2$ und Na_2CO_3 copräzipitiert. Die entstandenen Partikel wurden mit 0,01 % GA und 5 mM DVS in 0,9 % NaCl unter sauerstoffarmen Bedingungen für 1 h bei RT vernetzt, mit Glycin gequench und mit $NaBH_4$ reduziert.

Die Hb-HA-MP, bei denen das Gewichtsverhältnis zwischen Hb und HA bei der Copräzipitation 10 : 1 betrug, werden im Folgenden als Hb:HA(10:1)-MP bezeichnet; bei denen das Gewichtsverhältnis 20 : 1 betrug, werden im Folgenden als Hb:HA(20:1)-MP bezeichnet

Bei der mit HA modifizierten Copräzipitation wurde weniger Hb in die $CaCO_3$ -MP eingeschlossen (s. **Tabelle 3-2**). Der MetHb-Gehalt der Partikel stieg nach der Modifikation auf $22,2 \pm 4,8$ % bei den Hb:HA(10:1)-MP und auf $24,5 \pm 4,3$ % bei den

Hb:HA(20:1)-MP (n=3). Die Postreduktion führte zu einem MetHb-Anteil von $9,2 \pm 2,2$ % bei den Hb:HA(10:1)-MP und $12,2 \pm 2,5$ % bei den Hb:HA(20:1)-MP (n=3).

3.4.1 Größe und Morphologie der Hb-HA-MP

Die Größenverteilungen der Hb-HA-MP in CASY® ton Lösung (isotonisch, pH 7,3) wurden mit dem CASY® 1 Cell Counter bestimmt (**Abb. 3-22**). Die Partikelgröße der Hb-HA-MP schwankte von Charge zu Charge zwischen 2 und 10 μm (bestimmt mit der Software LSM Image Browser Release 4.2 bei CLSM-Bildern). Die durch den CASY® 1 Cell Counter bestimmten Partikelgrößen unterschieden sich stark von den mit LSM Image Browser Release 4.2 bestimmten Größen (**Abb. 3-22** und **Abb. 3-23** b, d). Beispielsweise sind die Partikelgrößen der drei Chargen der Hb-HA-MP in **Tabelle 3-8** dargestellt.

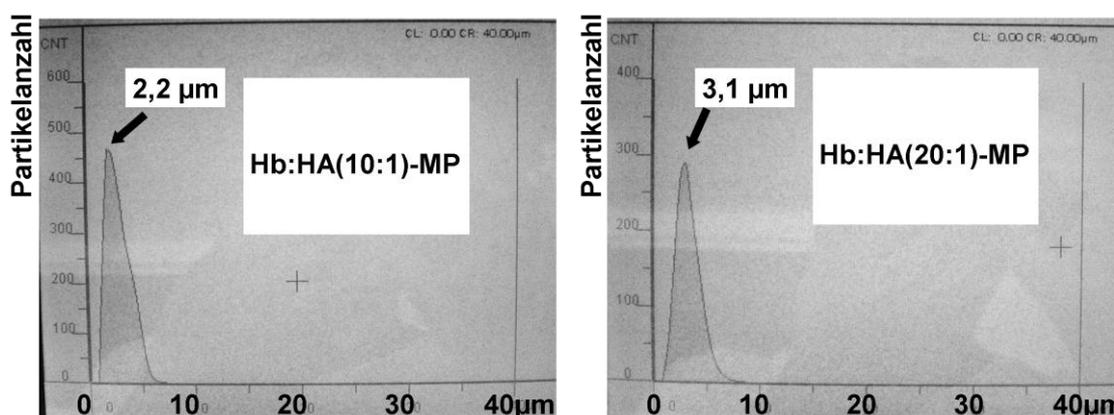


Abb. 3-22: Größenverteilung der Hb-HA-MP im CASY® 1 Cell Counter. Die Partikel waren in isotonischer CASY® ton Lösung (pH 7,3) suspendiert. Die durch den CASY® 1 Cell Counter bestimmten Partikelgrößen unterschieden sich stark von den mit LSM Image Browser Release 4.2 bestimmten Größen: das links entsprechende CLSM-Bild ist **Abb. 3-23** b zu finden; das rechts entsprechende CLSM-Bild ist in **Abb. 3-23** d dargestellt.

Tabelle 3-8: Partikelgrößen der Hb-HA-MP in verschiedenen Chargen (mit der LSM Image Browser Release 4.2 Software bei CLSM-Bildern bestimmt).

Probe	Partikelgröße [μm]		
	Charge 1	Charge 2	Charge 3
Hb:HA(10:1)-MP	$3,3 \pm 0,5$	$6,6 \pm 0,9$	$9,0 \pm 1,0$
Hb:HA(20:1)-MP	$3,4 \pm 0,5$	$5,9 \pm 1,1$	$8,3 \pm 0,7$

Die Hb-HA-MP wurden mittels CLSM und TEM charakterisiert. Die Hb:HA(10:1)-MP und Hb:HA(20:1)-MP waren sphärisch. Die beiden Partikeltypen unterschieden sich nicht in der Morphologie. In **Abb. 3-23** ist erkennbar, dass das Hb nicht gleichmäßig in den Partikeln verteilt ist. Besonders bei den großen Partikeln war eine interessante Struktur zu erkennen, die an eine Rose erinnert. Die TEM-Aufnahmen bestätigten diese Heterogenität (s. **Abb. 3-24**).

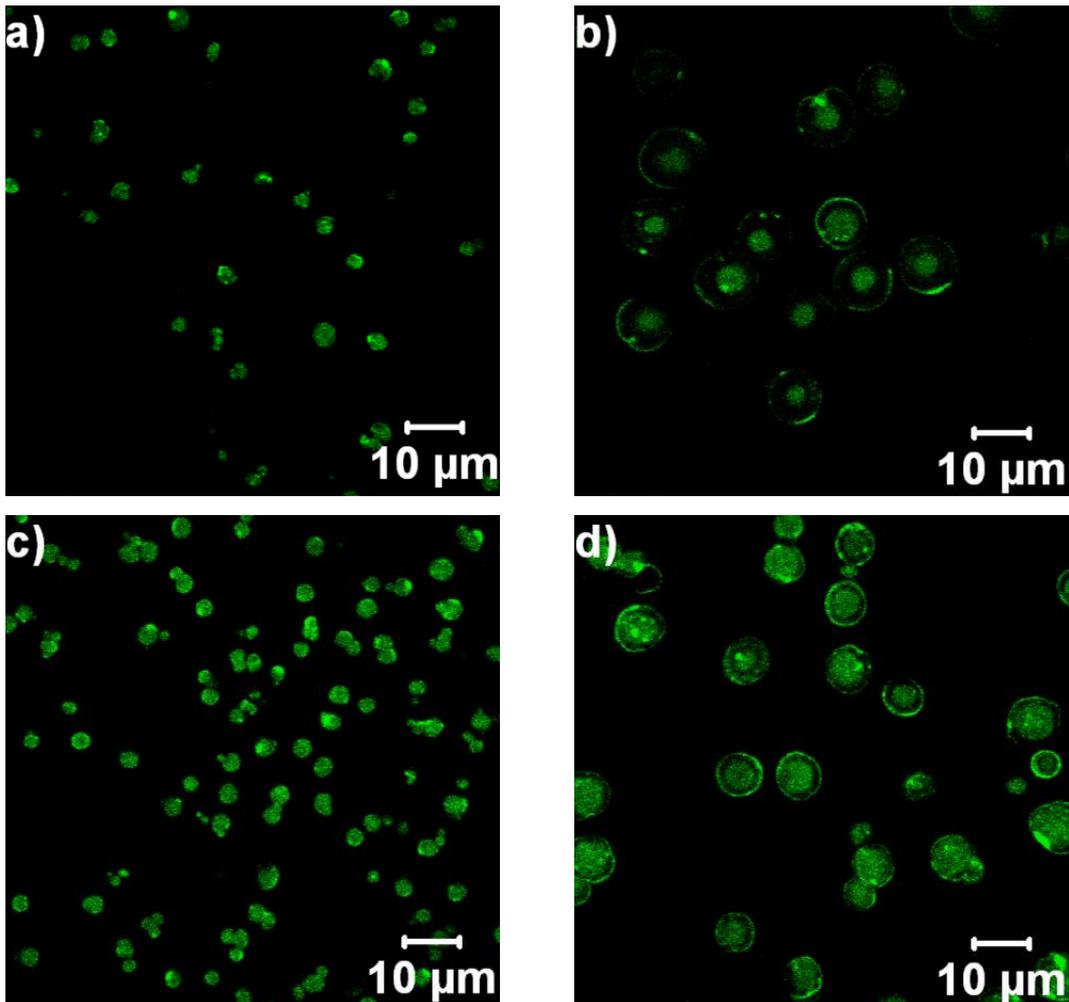


Abb. 3-23: CLSM-Aufnahmen (Beispiel) von Hb:HA(10:1)-MP (a und b), Hb:HA(20:1)-MP (c und d); jeweils aus zwei verschiedenen Chargen.

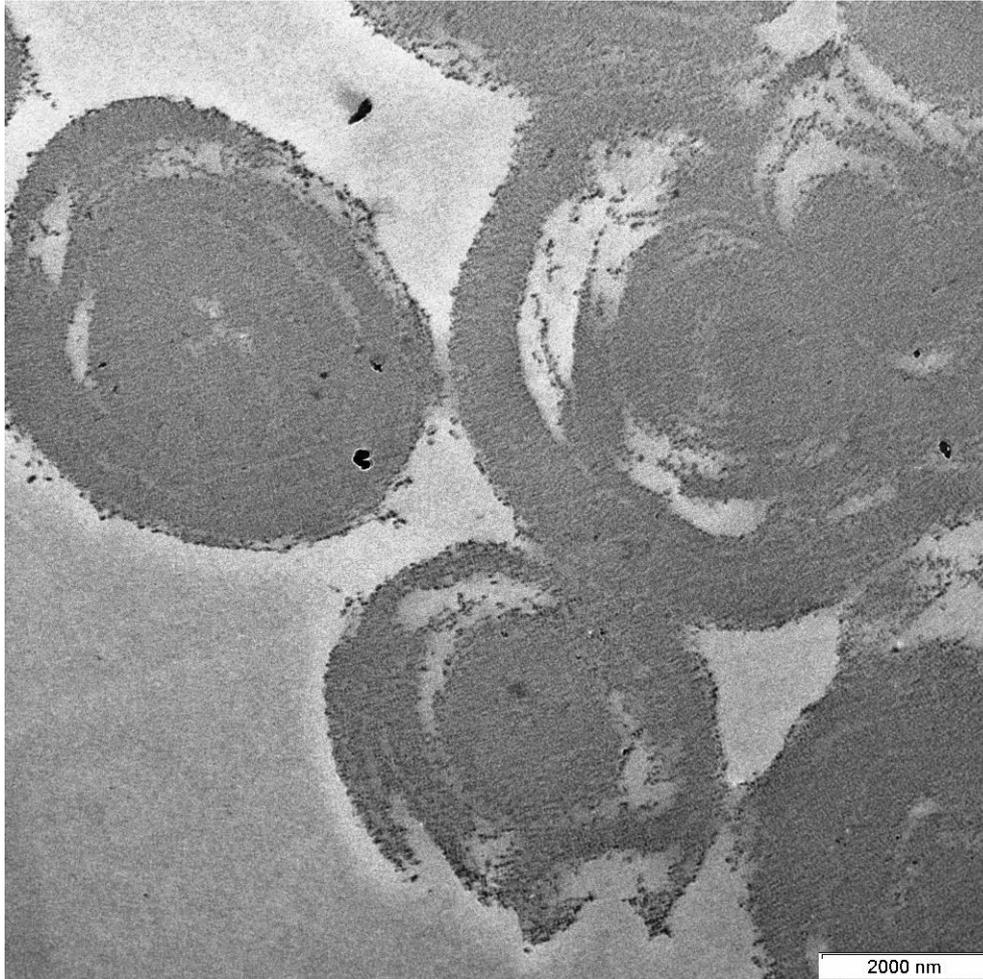


Abb. 3-24: TEM-Aufnahme von Hb:HA(20:1)-MP. Das Hb ist nicht homogen in den Partikeln verteilt, sondern bildet eine „Rosen“-Struktur.

3.4.2 Partikelaggregation

Der prozentuale Volumenanteil der Partikelaggregate der Hb-HA-MP wurde mittels CASY® 1 Cell Counter in CASY® ton Lösung bestimmt. Partikel mit einem Volumen von > 524 fL (entsprechender Partikeldurchmesser > 10 μm) wurden als Aggregate gezählt. Ein positiver Effekt wurde nach der Einführung mit HA in Hinblick auf die Aggregatbildung beobachtet. Ohne HA hatten die Partikel einen Aggregatanteil von $19,5 \pm 14,2$ %. Die Hb-HA-MP hatten deutlich weniger Aggregate nach der Herstellung. Der Aggregatanteil sank mit steigender HA-Konzentration, die bei der Copräzipitation eingesetzt war: $4,0 \pm 2,0$ % bei Hb:HA(10:1)-MP und $7,5 \pm 6,3$ % bei Hb:HA(20:1)-MP (s. **Abb. 3-25**). Nach der Behandlung mit Ultraschall betrug der Aggregatanteil bei den Hb:HA(10:1)-MP weniger als 0,5 % und bei den Hb:HA(20:1)-MP weniger als 1,8 %.

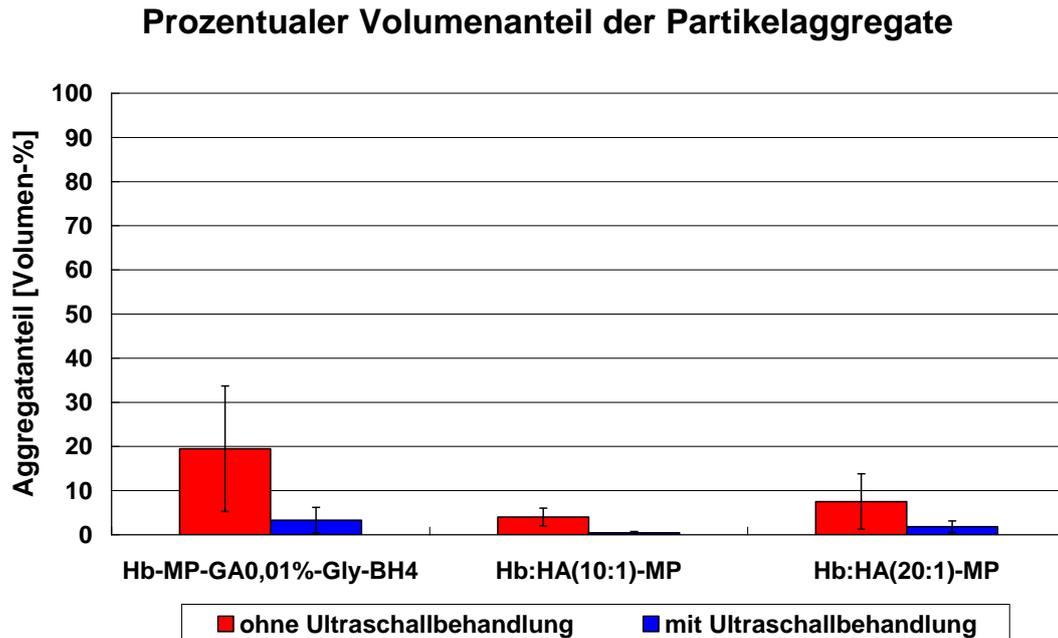


Abb. 3-25: Prozentualer Volumenanteil der Partikelaggregate von Hb-MP ohne HA (Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄) und Hb-HA-MP (n=3). Hb-HA-MP wurden mit 0,01 % GA und 5 mM DVS vernetzt, auch mit Glycin gequencht und mit NaBH₄ reduziert. Partikel mit einem Volumen von > 524 fL (entsprechender Partikeldurchmesser > 10 µm) wurden als Aggregate definiert und gezählt. Die Volumina der Aggregate geteilt durch die gesamten Volumina der Partikel ergaben den Aggregatanteil. Die Partikel wurden in CASY® ton (isotonische Elektrolytlösung mit einem pH Wert von 7,3) suspendiert und gemessen.

3.4.3 Zetapotential

Das Zetapotential der Hb-HA-MP in verschiedenen NaCl-Lösungen unterschiedlicher Ionenstärke wurde jeweils in drei Ansätzen gemessen (**Tabelle 3-9**).

Das Zetapotential der Partikel sank mit steigender Ionenstärke. Im Vergleich zu Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄ hatten die Hb-HA-MP ein deutlich stärker negatives Zetapotential. Je höher die HA-Konzentration bei der Copräzipitation war, desto höher war das Zetapotential der Partikel.

Ergebnisse

Tabelle 3-9: Zetapotential der Hb-MP und Hb-HA-MP in NaCl-Lösungen verschiedener Ionenstärke (pH 7,0; n=3).

Probe	Zetapotential [mV]		
	0,25 mM NaCl (Leitfähigkeit: 37 $\mu\text{S/cm}$)	2,5 mM NaCl (Leitfähigkeit: 350 $\mu\text{S/cm}$)	150 mM NaCl (Leitfähigkeit: 18,2 mS/cm)
Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH ₄	-25,2 \pm 3,8	-21,9 \pm 3,2	-11,1 \pm 0,9
Hb:HA(10:1)-MP	-70,6 \pm 2,3	-55,6 \pm 1,9	-22,0 \pm 0,7
Hb:HA(20:1)-MP	-57,8 \pm 1,3	-54,9 \pm 2,1	-21,1 \pm 1,4

3.4.4 Phagozytose der Hb-HA-MP

Die Phagozytoseaktivitäten der GCs und MCs in heparinisiertem Vollblut nach Inkubation mit Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄, Hb-HA-MP und FITC-markierten *E. coli* Bakterien wurden mit Hilfe des Phagotest®-Kits *in vitro* bestimmt und sind in **Abb. 3-26** dargestellt.

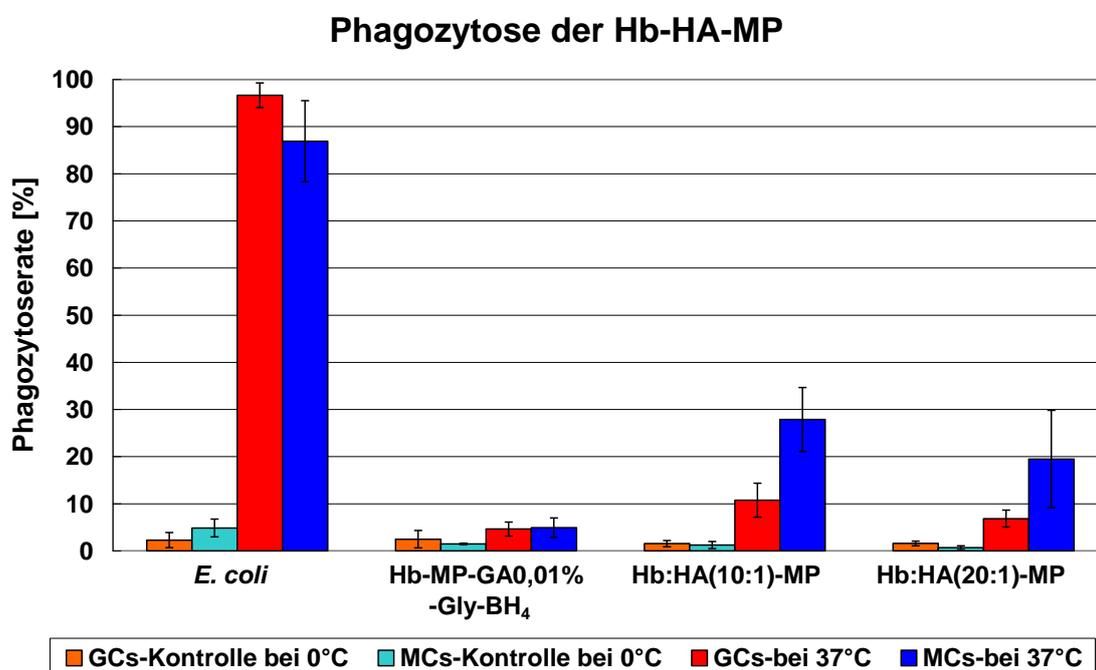


Abb. 3-26: Prozentualer Anteil der phagozytierenden Zellen (GCs und MCs) im Vollblut nach der Inkubation mit Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄, Hb-HA-MP und FITC-markierten *E. coli* Bakterien. Die Mittelwerte und SDs wurden aus drei Versuchen berechnet. Hb-HA-MP wurden mit 0,01 % GA und 5 mM DVS vernetzt, auch mit Glycin gequencht und mit NaBH₄ reduziert.

Im Vergleich zu Partikeln ohne HA wurden Hb-HA-MP stärker durch GCs und MCs phagozytiert. Während die GC-Phagozytoserate bei Hb-HA-MP auf bis zum 2,5-fache im Vergleich zum Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄ gestiegen war, erhöhte sich die MC-Phagozytoserate der Hb-HA-MP bis auf das 6-fache. Je höher die eingesetzte HA-Konzentration bei der Coprädipitation war, desto stärker hatten GCs und MCs die Partikel phagozytiert.

3.4.5 Inkubation in plättchenreichem Plasma (PRP)

Die Hb-HA-MP wurden vor der Inkubation mit Ultraschall behandelt, um die bereits vorhandene Aggregate zu beseitigen. Anschließend wurden die Partikel in PRP bei 37 °C für 30 min unter sanftem Schaukeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde keine Aggregatbildung beobachtet (s. **Abb. 3-27**).

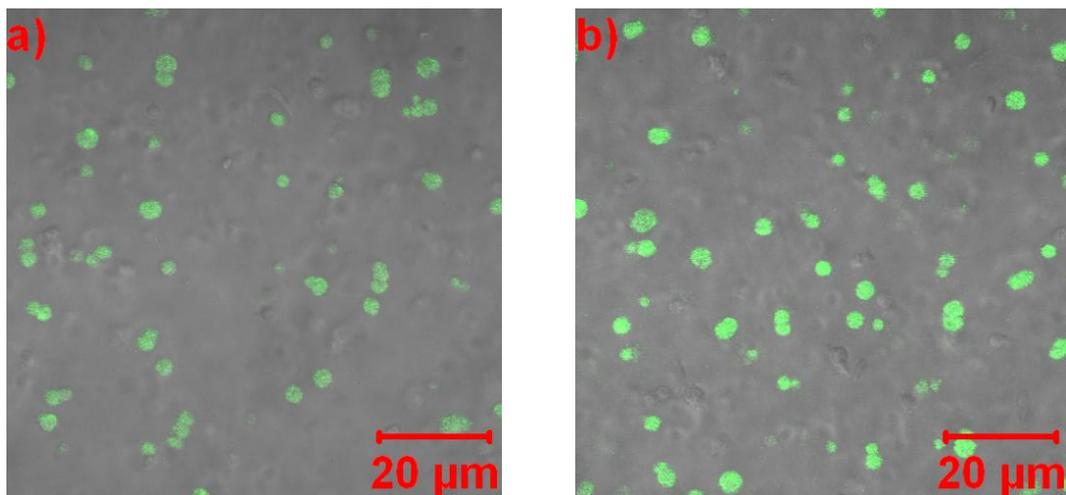


Abb. 3-27: CLSM-Bilder von PRP nach der Inkubation mit a) Hb:HA(10:1)-MP und b) Hb:HA(20:1)-MP. Vor der Inkubation wurde die Konzentration der Hb-HA-MP mit 0,9 % NaCl auf 5 % (v/v) eingestellt und die Hb-HA-MP mit Ultraschall behandelt, um vorhandene Aggregate zu beseitigen.

3.4.6 Sauerstofftransportfunktion der Hb-HA-MP

Die oxygenierten Hb-HA-MP wurden am Spektralphotometer zwischen 380 und 700 nm gescannt. Nach der Desoxygenierung mit Hilfe von 0,1% SDT wurden die desoxygenierten Partikel noch einmal zwischen 380 und 700 nm gescannt. Die Hb-HA-MP verhielten sich auch ähnlich wie das Hb beim photometrischen Scannen. Oxygenierte Hb-HA-MP hatten wie das OxyHb drei Peaks bei ca. 415, 542 und 576 nm. Nach der Behandlung mit SDT waren die Partikel desoxygeniert und hatten wie das DeoxyHb zwei Absorptionsmaxima bei 432 und 556 nm (s. **Abb. 3-28** und **Abb. 3-29**).

Spektren von Hb und Hb-HA-MP nach Oxygenierung

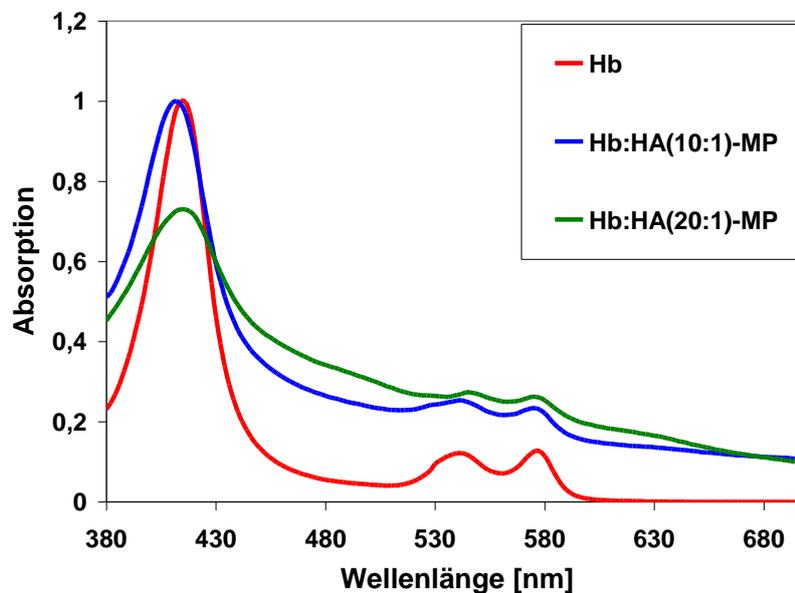


Abb. 3-28: Spektren von OxyHb und oxygenierten Hb-HA-MP. Die oxygenierten Hb-HA-MP zeigten wie OxyHb deutlich drei Absorptionsmaxima zwischen 400 und 600 nm (bei 414, 542 und 576 nm). Die allmähliche Zunahme der Basislinie der Spektren von Hb-HA-MP ist auf die Streuung der Partikel zurückzuführen.

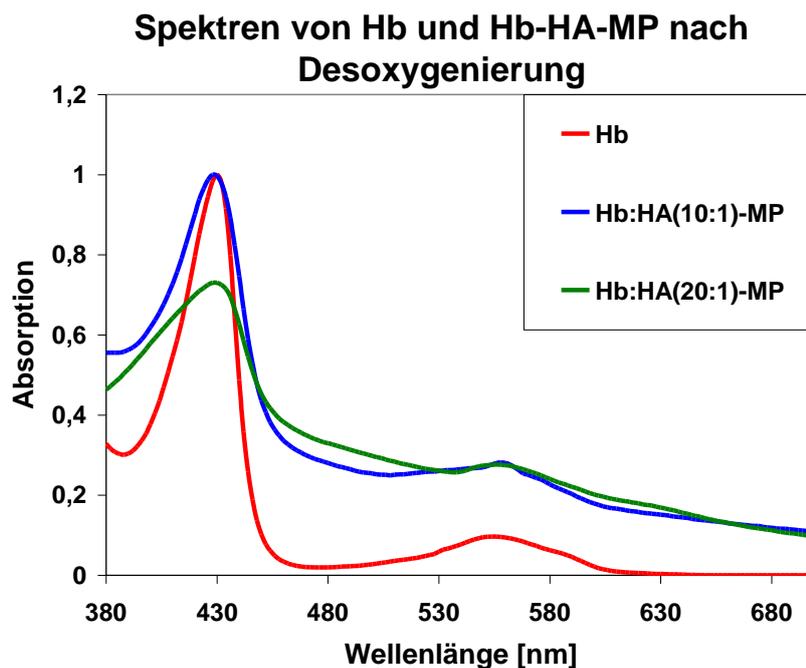


Abb. 3-29: Spektren von DeoxyHb und desoxygenierten Hb-HA-MP. Die Hb-HA-MP zeigten zwei Absorptionsmaxima zwischen 400 und 600 nm (bei 432 und 556 nm) genau wie DeoxyHb. Die allmähliche Zunahme der Basislinie der Spektren von Hb-HA-MP ist auf die Streuung der Partikel zurückzuführen.

3.4.7 Sauerstoffbindungskurve (ODC)

Die ODCs von Hb-HA-MP wurden bestimmt. Hb-HA-MP wurden unter sauerstoffarmen Bedingungen vernetzt. Hb:HA(10:1)-MP hatten einen p_{50} von weniger als 0,5 mmHg (0,7 hPa). Hb:HA(20:1)-MP hatten einen p_{50} von $4,0 \pm 0,6$ mmHg ($5,3 \pm 0,8$ hPa). Die ODCs sind in **Abb. 3-30** dargestellt.

Die beiden Hb-HA-MP hatten sehr hohe Sauerstoffaffinitäten. Beide p_{50} waren niedriger als der p_{50} der Partikel ohne HA ($7,0 \pm 2,0$ mmHg). Der p_{50} von Hb:HA(10:1)-MP war niedriger als der p_{50} von Hb:HA(20:1)-MP. Je höher die HA-Konzentration bei der Copräzipitation war, desto niedriger war der p_{50} der Partikel. Die Anwesenheit von HA in den Partikeln erschwerte die Abgabe von Sauerstoff (hohe Sauerstoffaffinität).

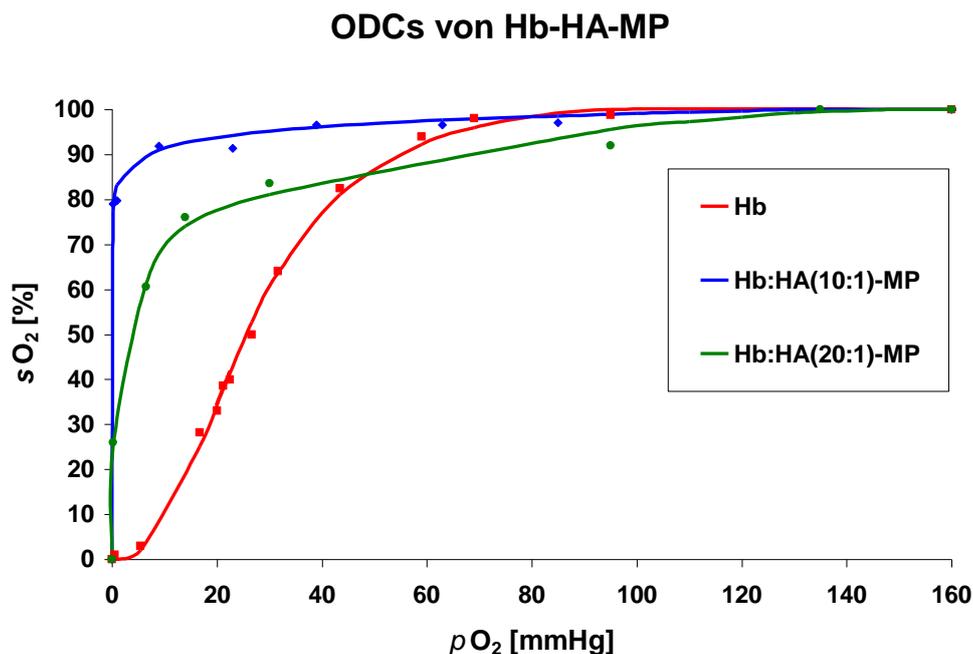


Abb. 3-30: ODCs von Hb-HA-MP und Hb. Die Partikel sind bei pO_2 weniger als 1 mmHg vernetzt. Die sO_2 bei bestimmtem pO_2 wurde mit Gl. 10 berechnet. Die sO_2 wurden gegen korrespondierende pO_2 im Diagramm aufgetragen und die ODCs an diese Koordinaten angepasst. Der $p50$ entspricht dem Sauerstoffpartialdruck pO_2 bei Halbsättigung.

3.5 Hb-Humanalbumin-Mischpartikel (Hb-HSA-MP)

Bei der Herstellung der Hb-HSA-MP wurden Hb und HSA in Gegenwart von $CaCl_2$ und Na_2CO_3 copräzipitiert. Die Partikel wurden mit 0,01 % GA unter sauerstoffarmen Bedingungen für 1 h bei RT vernetzt, mit Glycin gequench und mit $NaBH_4$ reduziert.

Die Hb-HSA-MP, bei denen das Gewichtsverhältnis zwischen Hb und HSA bei der Copräzipitation 5 : 1 betrug, sind im Folgenden als Hb:HSA(5:1)-MP bezeichnet; Partikel, bei denen das Gewichtsverhältnis zwischen Hb und HSA bei der Copräzipitation 10:1 betrug, sind im Folgenden als Hb:HSA(10:1)-MP bezeichnet.

Nach der modifizierten Copräzipitation mit HSA wurde die Hb-Einkapselungseffizienz der MP stark erniedrigt (s. **Tabelle 3-2**). Der MetHb-Gehalt der Partikel stieg nach der Modifikation auf $24,6 \pm 15,7$ % bei Hb:HSA(5:1)-MP und $23,3 \pm 15,3$ % bei Hb:HSA(10:1)-MP (n=3), während der MetHb-Gehalt der Partikel nach der Postreduktion

mit Ascorbinsäure wieder auf $12,1 \pm 5,0$ % bei Hb:HSA(5:1)-MP und $11,5 \pm 6,1$ % bei Hb:HSA(10:1)-MP (n=3) reduziert wurde.

3.5.1 Größe und Morphologie der Hb-HSA-MP

Die Größenverteilungen der Hb-HSA-MP in CASY® ton Lösung (isotonisch, pH 7,3) wurden mit dem CASY® 1 Cell Counter bestimmt (Abb. 3-31). Die Partikelgröße der Hb-HSA-MP schwankte von Charge zu Charge zwischen 2,5 und 4,5 μm (bestimmt mit der Software LSM Image Browser Release 4.2 bei CLSM-Bildern). Durchschnittlich hatten die Hb:HSA(5:1)-MP und Hb:HSA(10:1)-MP die gleiche Größe von $3,0 \pm 0,5$ μm . Die Hb-HSA-MP wurden mit dem CLSM gemessen. Die Hb-HSA-MP waren sphärisch und monodispers innerhalb einer Charge. (s. Abb. 3-32).

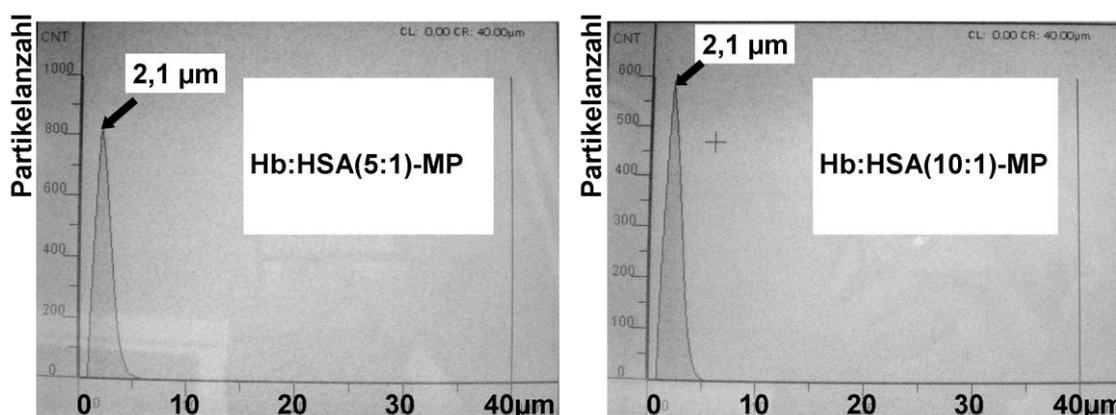


Abb. 3-31: Größenverteilung der Hb-HSA-MP im CASY® 1 Cell Counter. Die Partikel waren in isotonischer CASY® ton Lösung (pH 7,3) suspendiert.

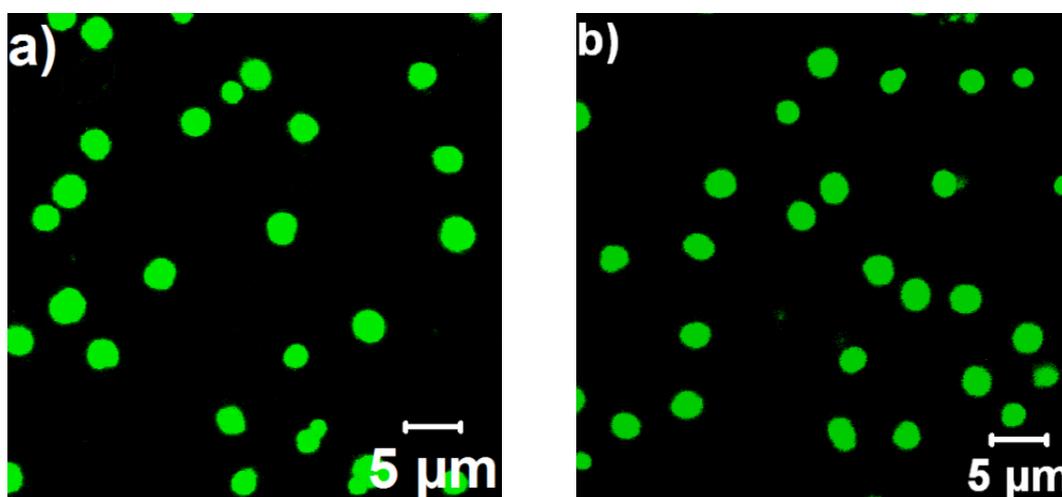


Abb. 3-32: CLSM-Aufnahmen von a) Hb:HSA(5:1)-MP und b) Hb:HSA(10:1)-MP.

3.5.2 Partikelaggregation

Der prozentuale Volumenanteil der Partikelaggregate der Hb-HSA-MP wurde mit dem CASY® 1 Cell Counter in CASY® ton Lösung bestimmt. Partikel mit einem Volumen von > 524 fL (entsprechender Partikeldurchmesser > 10 µm) wurden als Aggregate gezählt. Eine reduzierte Aggregatbildung der Partikel nach der modifizierten Copräzipitation mit HSA wurde beobachtet. Ohne Copräzipitation mit HSA hatten die Partikel einen Aggregatanteil von $19,5 \pm 14,2$ %. Die Hb-HSA-MP bildeten deutlich weniger Aggregate bei der Herstellung: $5,2 \pm 1,5$ % bei Hb:HSA(5:1)-MP und $8,2 \pm 7,2$ % bei Hb:HSA(10:1)-MP. Der Aggregatanteil sank mit steigender HSA-Konzentration, die bei der Copräzipitation eingesetzt wurde. Nach der Behandlung mit Ultraschall betrug der Aggregatanteil bei Hb:HSA(5:1)-MP weniger als 0,1 % und bei Hb:HSA(10:1)-MP weniger als 2,1 % (s. **Abb. 3-33**).

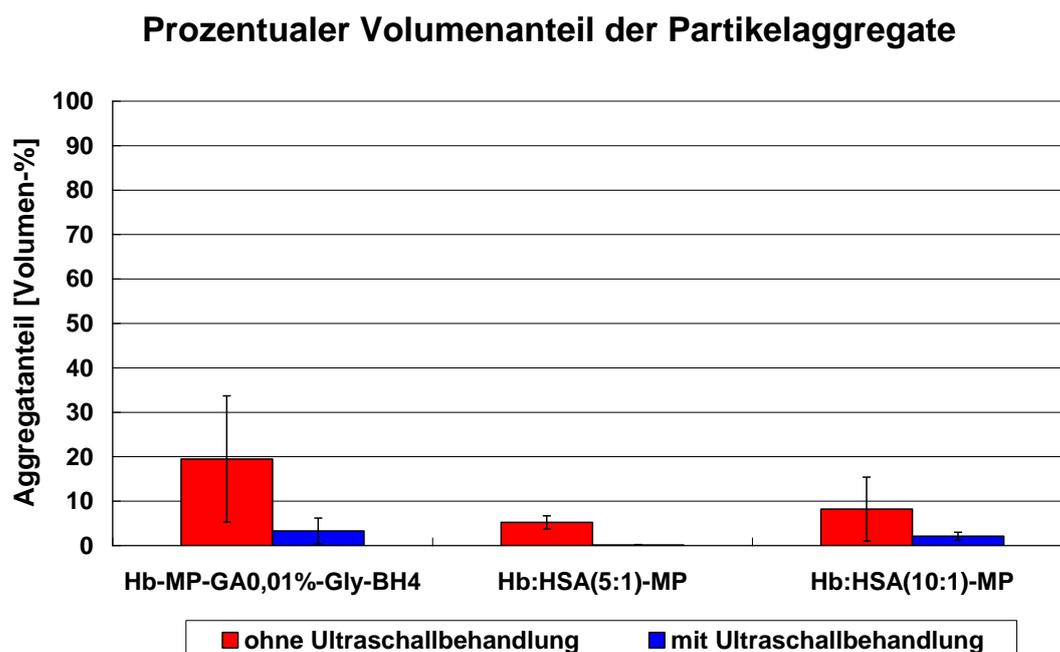


Abb. 3-33: Prozentualer Volumenanteil der Partikelaggregate von Hb-MP ohne Copräzipitation mit HSA (Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄) und Hb-HSA-MP (n=3). Die Partikel wurden mit 0,01 % GA vernetzt, mit Glycin gequench und mit NaBH₄ reduziert. Partikel mit einem Volumen von > 524 fL (entsprechender Partikeldurchmesser > 10 µm) wurden als Aggregate definiert und gezählt. Die Volumina der Aggregate geteilt durch die gesamten Volumina der Partikel ergaben den Aggregatanteil. Die Partikel wurden in CASY® ton (isotonische Elektrolytlösung mit pH Wert von 7,3) suspendiert und gemessen.

3.5.3 Zetapotential

Das Zetapotential der Hb-HSA-MP in NaCl-Lösungen unterschiedlicher Ionenstärken wurde jeweils in drei Ansätzen gemessen. Das Zetapotential der Partikel sank mit steigender Ionenstärke. Das Zetapotential der Hb-HSA-MP hatte sich im Vergleich zu Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄ in 0,25 mM NaCl-Lösung stark erhöht. Das Zetapotential in 0,9 % NaCl war nur leicht negativer geworden. Je höher die eingesetzte HSA-Konzentration bei der Copräzipitation eingesetzt war, desto höher war das Zetapotential der Partikel (s. **Tabelle 3-10**).

Tabelle 3-10: Zetapotential der Hb-MP und Hb-HSA-MP in NaCl-Lösungen verschiedener Ionenstärke (pH 7,0; n=3).

Probe	Zetapotential [mV]		
	0,25 mM NaCl (Leitfähigkeit: 37 µS/cm)	2,5 mM NaCl (Leitfähigkeit: 350 µS/cm)	150 mM NaCl (Leitfähigkeit: 18,2 mS/cm)
Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH ₄	-25,2 ± 3,8	-21,9 ± 3,2	-11,1 ± 0,9
Hb:HSA(5:1)-MP	-46,0 ± 2,1	-33,8 ± 1,8	-12,4 ± 1,0
Hb:HSA(10:1)-MP	-39,7 ± 1,5	-32,4 ± 1,4	-11,7 ± 0,6

3.5.4 Phagozytose der Hb-HSA-MP

Die Phagozytoseaktivitäten der GCs und MCs in heparinisiertem Vollblut nach der Inkubation mit Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄, Hb-HSA-MP und FITC-markierten *E. coli* Bakterien wurden mit dem Phagotest®-Kit *in vitro* bestimmt (**Abb. 3-34**).

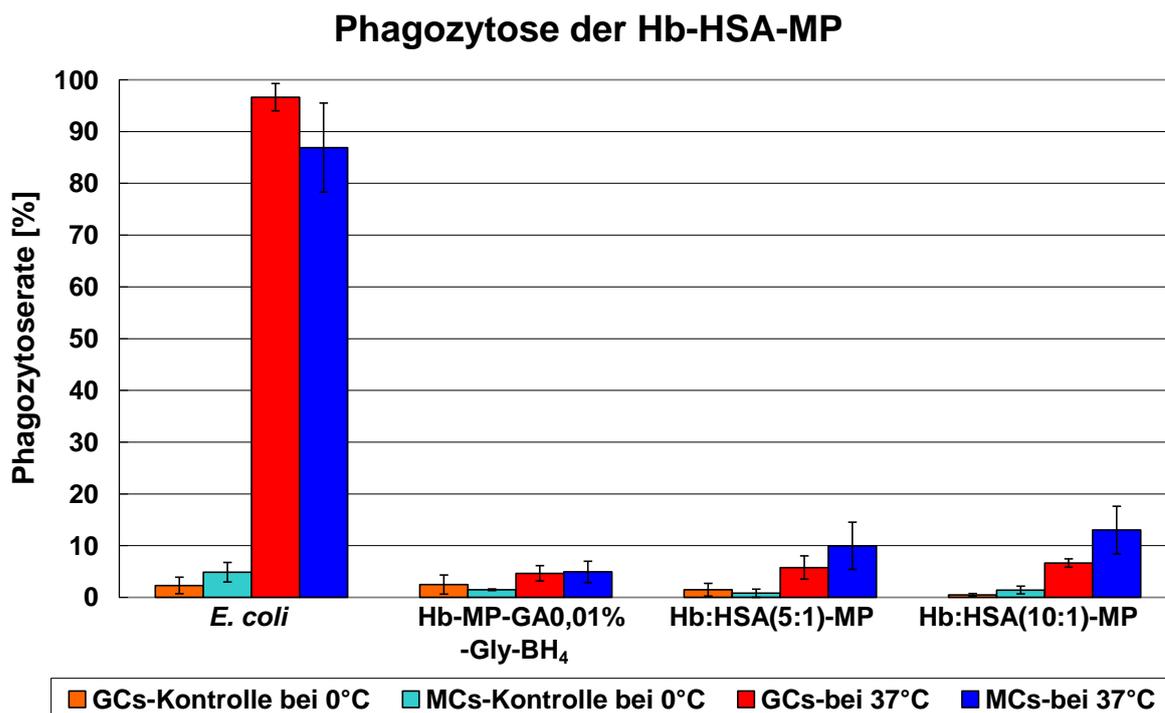


Abb. 3-34: Prozentualer Anteil der phagozytierenden Zellen (GCs und MCs) im Vollblut nach der Inkubation mit Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄, Hb-HSA-MP und FITC-markierten *E. coli* Bakterien. Die Mittelwerte und SDs wurden aus drei Versuchen berechnet. Die Partikel wurden mit 0,01 % GA vernetzt, mit Glycin gequenchet und mit NaBH₄ reduziert.

Die GC-Phagozytoseraten der Hb-HSA-MP waren im Vergleich zu den Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄ leicht erhöht (4,6 ± 1,5 % bei Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄, 5,8 ± 2,3 % bei Hb:HSA(5:1)-MP und 6,6 ± 0,8 % bei Hb:HSA(10:1)-MP). Im Vergleich zu der MC-Phagozytoserate nach Inkubation mit Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄ (4,9 ± 2,1 %) hatten sich die MC-Phagozytoseraten nach Inkubation mit Hb-HSA-MP (10,0 ± 4,6 % bei Hb:HSA(5:1)-MP und 13,0 ± 4,6 % bei Hb:HSA(10:1)-MP) mindestens verdoppelt.

3.5.5 Inkubation in plättchenreichem Plasma (PRP)

Die Hb-HSA-MP wurden vor der Inkubation mit Ultraschall behandelt, um bereits vorhandene Aggregate zu beseitigen. Anschließend wurden die Partikel in PRP bei 37 °C für 30 min unter sanftem Schaukeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden viele Aggregate detektiert, die meist kleiner als 20 µm waren (s. **Abb. 3-35**).

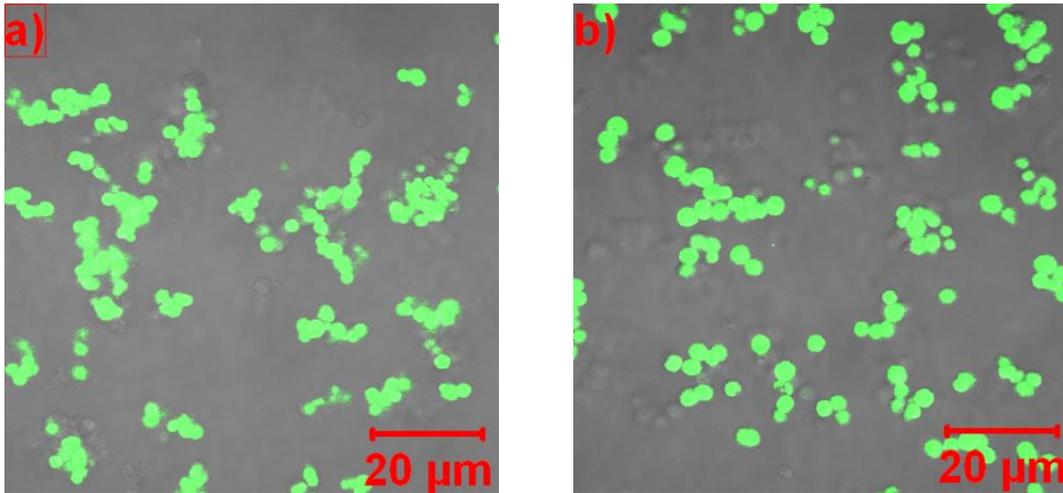


Abb. 3-35: CLSM-Bilder von PRP nach Inkubation mit Hb:HSA(5:1)-MP (links) und Hb:HSA(10:1)-MP (rechts). Vor der Inkubation wurde die Konzentration der Hb-HSA-MP mit 0,9 % NaCl auf 6 % (v/v) eingestellt und die Hb-HSA-MP mit Ultraschall behandelt, um vorhandene Aggregate zu beseitigen.

3.5.6 Sauerstofftransportfunktion der Hb-HSA-MP

Die oxygenierten Hb-HSA-MP wurden am Spektralphotometer zwischen 380 und 700 nm gescannt. Nach der Desoxygenierung mit Hilfe von 0,1 % SDT wurden die desoxygenierten Hb-HSA-MP noch einmal zwischen 380 und 700 nm gescannt. Oxygenierte und desoxygenierte Hb-HSA-MP hatten ähnliche Spektren wie OxyHb und DeoxyHb (s. **Abb. 3-36** und **Abb. 3-37**).

Spektren von Hb und Hb-HSA-MP nach Oxygenierung

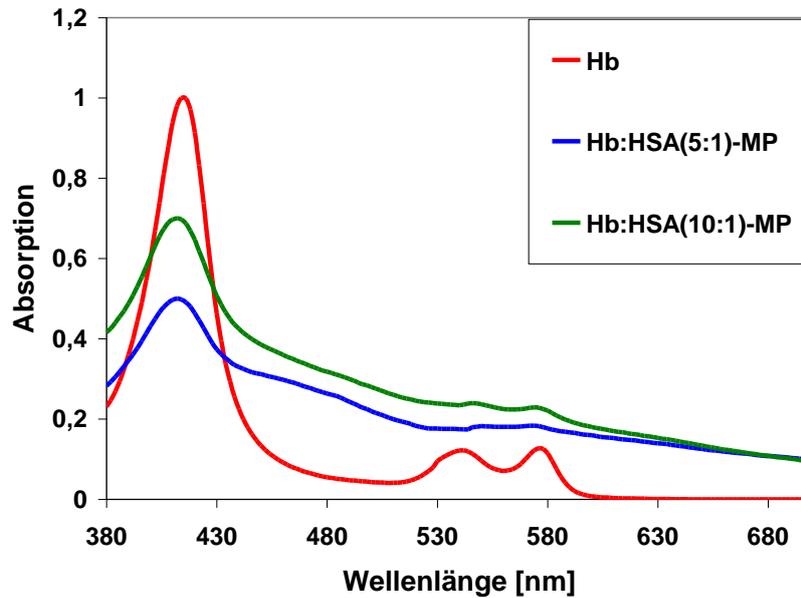


Abb. 3-36: Spektren von OxyHb und oxygenierten Hb-HSA-MP. Die oxygenierten Hb-HSA-MP zeigten wie OxyHb drei Absorptionsmaxima zwischen 400 und 600 nm. Allerdings waren die zwei Peaks zwischen 500 und 600 nm bei Hb:HSA(5:1)-MP sehr schwach. Die allmähliche Zunahme der Basislinie der Spektren von Hb-HSA-MP ist auf die Streuung der Partikel zurückzuführen.

Spektren von Hb und Hb-HSA-MP nach Desoxygenierung

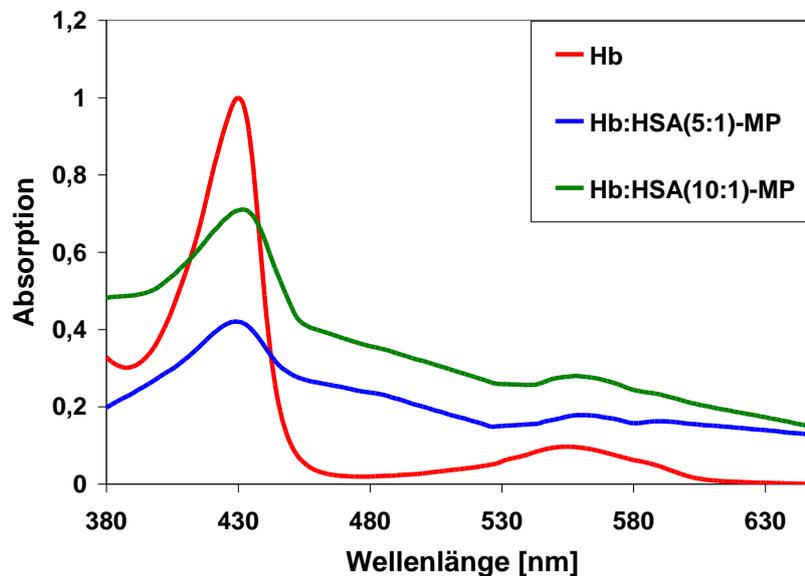


Abb. 3-37: Spektren von DeoxyHb und desoxygenierten Hb-HSA-MP. Die Hb-HSA-MP zeigten wie DeoxyHb zwei Absorptionsmaxima zwischen 400 und 600 nm (bei 432 und 556 nm). Die allmähliche Zunahme der Basislinie der Spektren von Hb-HSA-MP ist auf die Streuung der Partikel zurückzuführen.

3.5.7 Sauerstoffbindungskurve (ODC)

Wie bereits aus den Spektren der desoxygenierten Hb-HSA-MP erkennbar, wurden die Messungen durch die Lichtstreuung der Partikel stark gestört. Aus diesem Grund war es nicht möglich, valide Messwerte für die ODCs zu bestimmen.

3.6 Modifikation mit Dx/Dx-HSA/Dx-mPEG

Bei der Modifikation mit Dx wurden Hb und Dx (Gewichtsverhältnis 5 : 1) mit CaCO_3 copräzipitiert. Die Partikel wurden zuerst mit 0,005 % GA unter sauerstoffarmen Bedingungen für 30 min bei RT vernetzt. Nach dem Waschen wurden die Partikel mit Dx-Lösung inkubiert, um zusätzliches Dx auf der Partikeloberfläche zu adsorbieren. Nach den erneuten Waschgängen wurden die Partikel mit SCl unter sauerstoffarmen Bedingungen weiter vernetzt. Die GA-Konzentration von 0,005 % war für die Partikelbildung ausreichend, da die Partikel zusätzlich mit SCl vernetzt wurden. Die Partikel wurden mit Glycin gequench und mit NaBH_4 reduziert.

Die Partikel nach der Auflösung wurden zusätzlich mit HSA oder mPEG-NH₂ weiter unter sauerstoffarmen Bedingungen modifiziert. Die Carboxygruppen der Partikeloberfläche wurden zuerst mit EDC aktiviert. Mit Hilfe von NHS wurden die aktiven Intermediate als NHS-Ester stabilisiert. Die Aminogruppen der HSA oder mPEG-NH₂ reagierten mit diesen NHS-Estern zu Amiden. HSA oder mPEG-NH₂ sind somit kovalent an die Partikeloberfläche gebunden.

Die mit Dx modifizierten Hb-Partikel (ohne zusätzliche Modifikation) sind im Folgenden als Hb-Dx-MP bezeichnet. Die mit HSA oder mPEG-NH₂ zusätzlich modifizierten Hb-Dx-MP sind im Folgenden als Hb-Dx-HSA-MP oder Hb-Dx-mPEG-MP bezeichnet. Nach der modifizierten Copräzipitation mit Dx wurde die Hb-Einkapselungseffizienz der MP leicht erniedrigt (s. **Tabelle 3-2**). Der MetHb-Gehalt der mit Dx modifizierten Partikel war stark erhöht, reduzierte sich aber nach der Postreduktion (s. **Tabelle 3-11**).

Ergebnisse

Tabelle 3-11: MetHb-Gehalt der Partikel nach der Modifikation mit Dx/Dx-HSA/Dx-mPEG (n=3).

Proben	MetHb-Gehalt nach der Herstellung [%]	MetHb-Gehalt nach der Postreduktion [%]
Hb-Dx-MP	30,2 ± 10,2	15,1 ± 5,0
Hb-Dx-HSA-MP	34,2 ± 9,7	14,5 ± 10,6
Hb-Dx-mPEG-MP	38,4 ± 11,7	14,7 ± 8,9

3.6.1 Größe und Morphologie der Hb-Dx-(HSA/mPEG)-MP

Die Größenverteilungen der Hb-Dx-(HSA/mPEG)-MP in CASY® ton Lösung (isotonisch, pH 7,3) wurden mit dem CASY® 1 Cell Counter bestimmt (Abb. 3-38). Die Partikelgrößen der Partikel wurden mit der Software LSM Image Browser Release 4.2 aus den CLSM-Bildern bestimmt. Sie schwankten von Charge zu Charge zwischen 2,5 und 4,5 µm. Durchschnittlich waren Hb-Dx-MP 3,2 ± 0,5 µm groß. Nach der zusätzlichen Modifikation mit HSA oder mPEG-NH₂ veränderte sich die Partikelgröße nicht wesentlich (3,0 ± 0,6 µm bei Hb-Dx-HSA-MP und 3,2 ± 0,6 µm bei Hb-Dx-mPEG-MP).

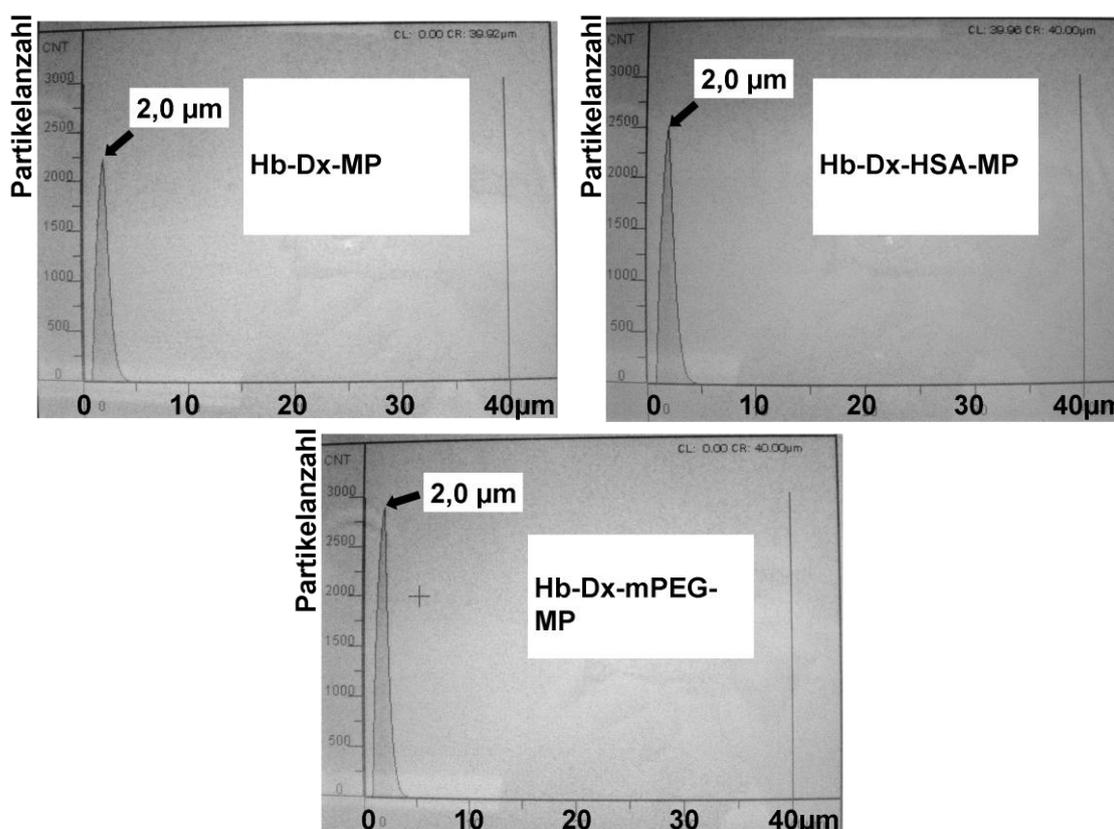


Abb. 3-38: Größenverteilung der Hb-Dx-MP, Hb-Dx-HSA-MP und Hb-Dx-mPEG-MP im CASY® 1 Cell Counter. Die Partikel waren in isotonischer CASY® ton Lösung (pH 7,3) suspendiert.

Ergebnisse

Die Partikel wurden mit dem CLSM vermessen. Alle mit Dx modifizierten Partikel waren sphärisch und monodispers innerhalb einer Charge. Die Partikel zeigten eine erhöhte Autofluoreszenz im Vergleich zu den Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄. Die Oberfläche der Partikel fluoreszierte stärker als das Partikelinnere, was auf eine stärkere Vernetzung der Partikeloberfläche im Vergleich zum Partikelinneren hindeutet (s. **Abb. 3-39**). Das SCl ist sehr reaktiv, hat ein Hydrolysepotential in wässrigem Milieu (s. **Abb. 2-8**) und kann wahrscheinlich hauptsächlich das Hb auf der Partikeloberfläche vernetzen.

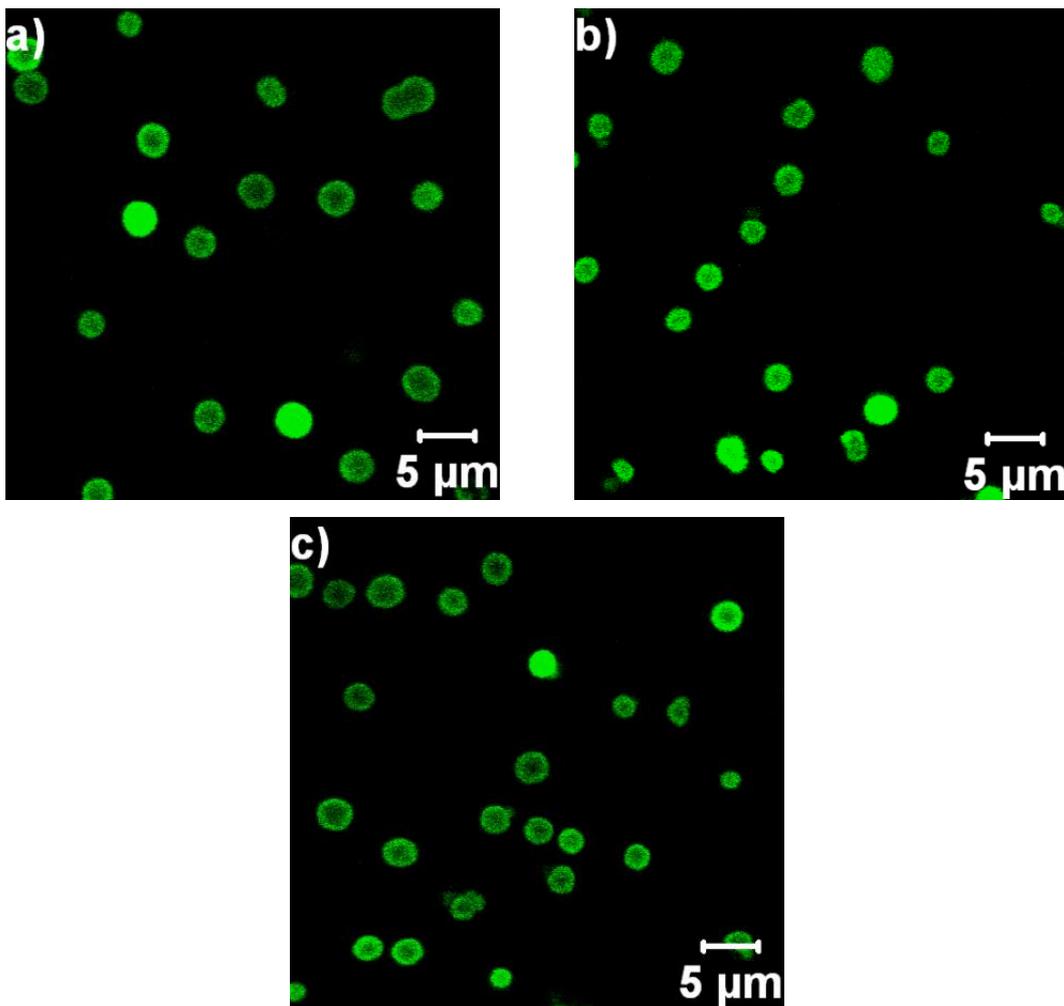


Abb. 3-39: CLSM-Bilder von Hb-MP nach der Modifikation mit Dx. a) Hb-Dx-MP, b) Hb-Dx-HSA-MP, c) Hb-Dx-mPEG-MP.

3.6.2 Partikelaggregation

Der prozentuale Volumenanteil der Partikelaggregate der Hb-Dx-(HSA/mPEG)-MP wurde mit dem CASY® 1 Cell Counter in CASY® ton bestimmt. Partikel mit einem Volumen von > 524 fL (entsprechender Partikeldurchmesser > 10 µm) wurden als Aggregate gezählt. Hb-Dx-MP, Hb-Dx-HSA-MP und Hb-Dx-mPEG-MP hatten ein sehr niedriges Aggregationspotential. Der Volumenanteil der Partikelaggregate betrug bei Hb-Dx-MP nur $1,0 \pm 0,3\%$, bei Hb-Dx-HSA-MP und Hb-Dx-mPEG-MP $1,5 \pm 0,5\%$ und war deutlich niedriger als bei den Partikeln ohne Modifikation ($19,5 \pm 14,2\%$). Nach der Behandlung mit Ultraschall konnten die Aggregate vollständig entfernt werden (Abb. 3-40).

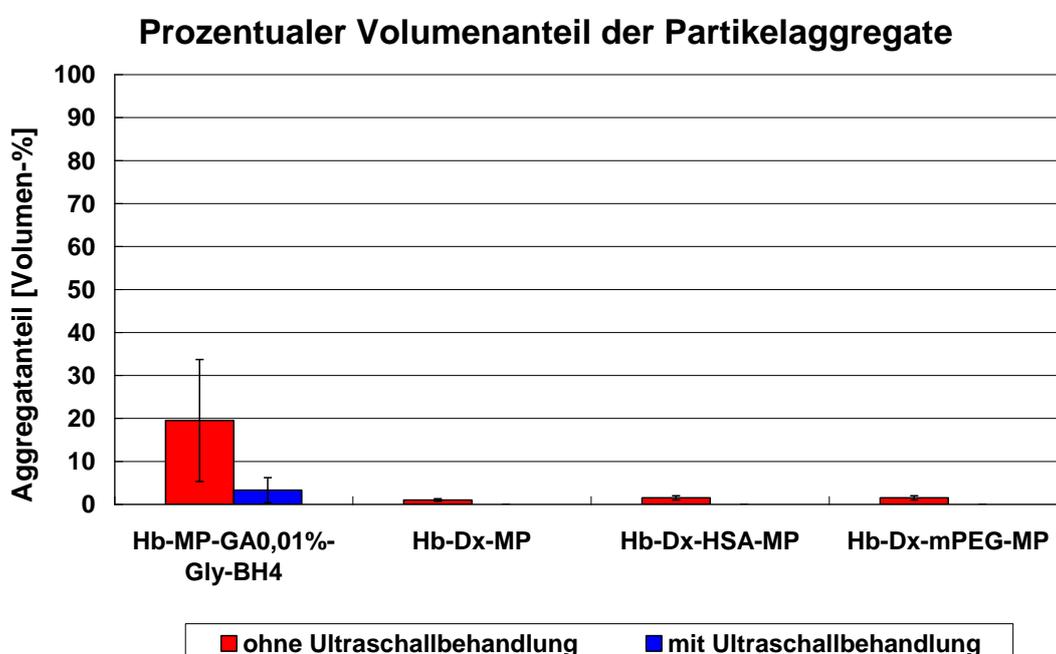


Abb. 3-40: Prozentualer Volumenanteil der Partikelaggregate von Hb-MP ohne Modifikation (Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄) und mit Dx-Modifikation (Hb-Dx-MP, Hb-Dx-HSA-MP und Hb-Dx-mPEG-MP) (n=3). Hb-Dx-MP, Hb-Dx-HSA-MP und Hb-Dx-mPEG-MP wurden mit GA und SCI vernetzt, Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄ wurden nur mit GA vernetzt. Alle Partikel wurden mit Glycin gequench und mit NaBH₄ reduziert. Partikel mit einem Volumen von > 524 fL (entsprechender Partikeldurchmesser > 10 µm) wurden als Aggregate gezählt. Die Volumina der Aggregate geteilt durch die gesamten Volumina der Partikel ergaben den Aggregatanteil. Die Partikel wurden in CASY® ton (isotonische Elektrolytlösung mit pH Wert von 7,3) suspendiert und vermessen.

3.6.3 Zetapotential

Das Zetapotential der mit Dx modifizierten Hb-MP in NaCl-Lösungen unterschiedlicher Ionenstärken wurde jeweils in drei Ansätzen vermessen. Das Zetapotential der Partikel sank mit steigender Ionenstärke. Das Zetapotential der Hb-Dx-MP war deutlich negativer als das Zetapotential der Partikel ohne Modifikation (s. **Tabelle 3-12**). Nach der zusätzlichen Modifikation mit HSA oder mPEG-NH₂ hatten die Partikel ein im Vergleich zu den nicht modifizierten MP ein reduziertes Zetapotential.

Tabelle 3-12: Zetapotential der Hb-MP mit oder ohne Modifikation mit Dx in NaCl-Lösungen verschiedener Ionenstärke (pH 7,0; n=3).

Probe	Zetapotential [mV]		
	0,25 mM NaCl (Leitfähigkeit: 37 µS/cm)	2,5 mM NaCl (Leitfähigkeit: 350 µS/cm)	150 mM NaCl (Leitfähigkeit: 18,2 mS/cm)
Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH ₄	-25,2 ± 3,8	-21,9 ± 3,2	-11,1 ± 0,9
Hb-Dx-MP	-37,2 ± 1,5	-32,9 ± 1,1	-17,0 ± 0,8
Hb-Dx-HSA-MP	-36,2 ± 1,0	-26,1 ± 1,2	-11,6 ± 0,8
Hb-Dx-mPEG-MP	-34,5 ± 0,5	-27,1 ± 1,6	-12,4 ± 0,7

3.6.4 Phagozytose der Hb-Dx-(HSA/mPEG)-MP

Die Phagozytoseaktivitäten der GCs und MCs in heparinisiertem Vollblut nach der Inkubation mit Partikeln wurden mit dem Phagotest®-Kit *in vitro* bestimmt. Alle mit Dx modifizierten Partikel wurden sehr stark durch GCs und MCs phagozytiert. Im Vergleich zu Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄ hatte sich die GC-Phagozytoserate bei Hb-Dx-MP vervierfacht und die MC-Phagozytoserate versechsfacht. Auch die zusätzliche Modifikation mit HSA oder mPEG-NH₂ der Hb-Dx-MP hatte keinen positiven Einfluss in Hinsicht auf die Reduktion der Phagozytose. Die Phagozytoseraten bei Hb-Dx-HSA-MP und Hb-Dx-mPEG-MP unterschieden sich nicht von den Partikel Hb-Dx-MP (s. **Abb. 3-41**).

Phagozytose der Hb-Dx-MP und deren Modifikationen

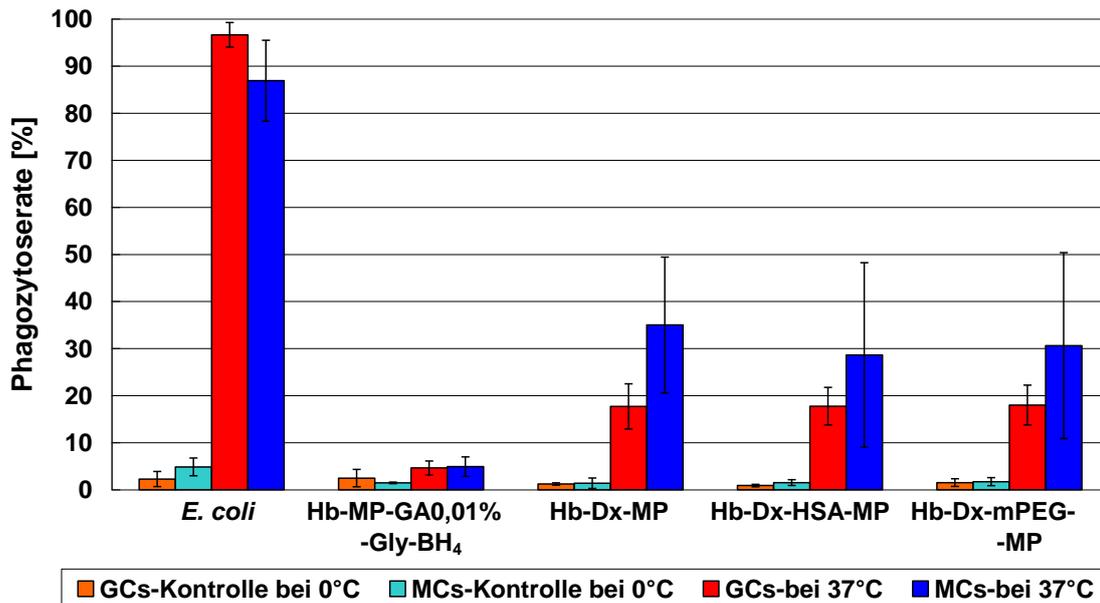


Abb. 3-41: Prozentualer Anteil der phagozytierenden Zellen (GCs und MCs) im Vollblut nach der Inkubation mit Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄, Hb-Dx-MP, Hb-Dx-HSA-MP, Hb-Dx-mPEG-MP und FITC-markierten *E. coli* Bakterien (n=3). Die Mittelwerte und SDs wurden aus drei Versuchen berechnet. Hb-Dx-MP, Hb-Dx-HSA-MP und Hb-Dx-mPEG-MP wurden mit GA und SCI vernetzt, Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄ wurden nur mit GA vernetzt. Alle Partikel wurden mit Glycin gequench und mit NaBH₄ reduziert.

3.6.5 Inkubation in plättchenreichem Plasma (PRP)

Die mit Dx modifizierten Partikel wurden nach der kurzen Ultraschall-Behandlung in PRP bei 37 °C für 30 min unter sanftem Schaukeln inkubiert. Nach der Inkubation entstanden viele große Aggregate (> 20 µm) (**Abb. 3-42 a**). Durch zusätzliche Modifikation mit HSA oder mPEG-NH₂ mit Hilfe von EDC und NHS konnte die Aggregatbildung deutlich verringert werden. Auf den CLSM-Bildern waren keine große Aggregate zu sehen (**Abb. 3-42 b und c**).

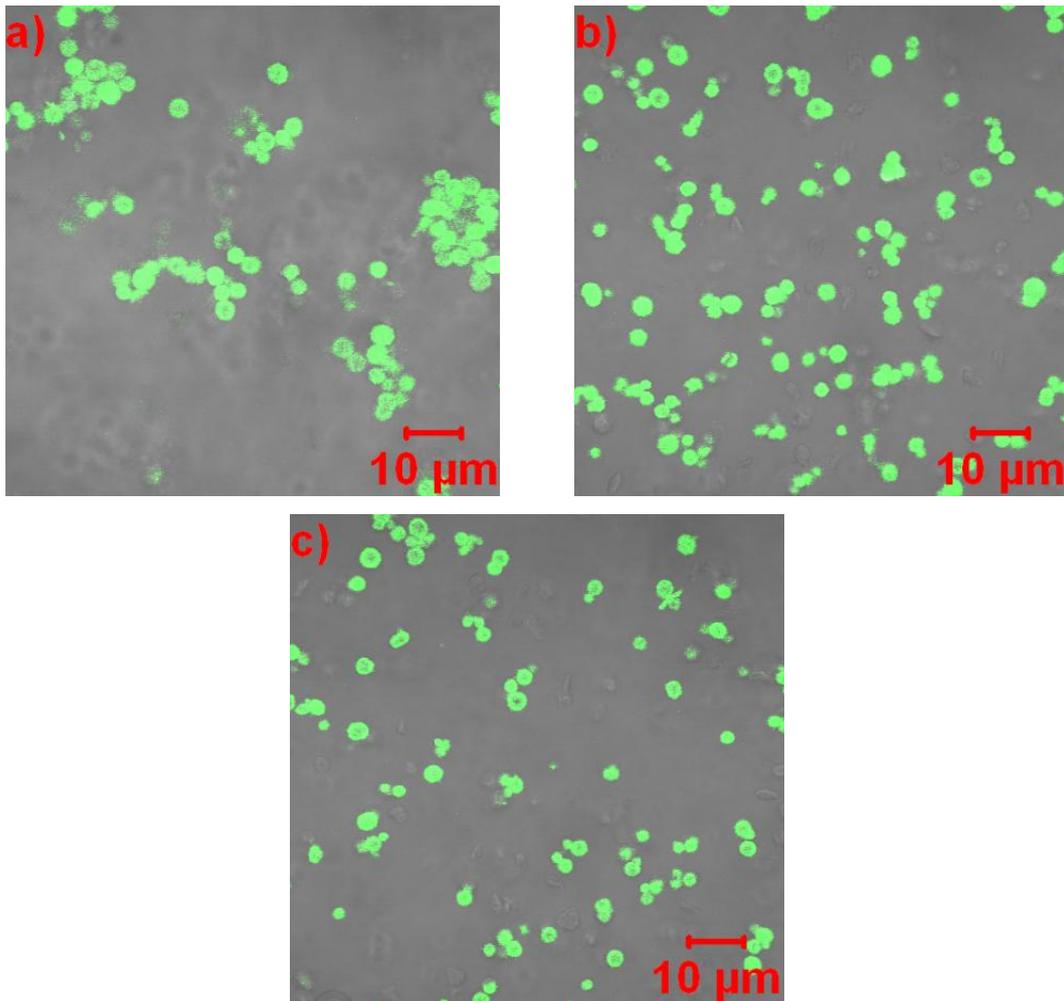


Abb. 3-42: CLSM-Bilder von PRP nach der Inkubation mit a) Hb-Dx-MP. b) Hb-Dx-HSA-MP. c) Hb-Dx-mPEG-MP. Vor der Inkubation wurde die Konzentration der Partikel mit 0,9 % NaCl auf 6 % (v/v) eingestellt.

3.6.6 Sauerstofftransportfunktion der Hb-Dx-(HSA/mPEG)-MP

Die oxygenierten Partikel wurden am Spektralphotometer zwischen 380 und 700 nm gescannt. Nach der Desoxygenierung mit Hilfe von 0,1% SDT wurden die desoxygenierten Partikel noch einmal zwischen 380 und 700 nm gescannt. Die oxygenierten Partikel hatten wie das OxyHb drei Peaks (bei ca. 415, 542 und 576 nm). Nach der Behandlung mit SDT waren die Partikel desoxygeniert und hatten wie das DeoxyHb zwei Absorptionsmaxima (432 und 556 nm). Bei oxygenierten Hb-Dx-MP waren die zwei Peaks zwischen 530 und 600 nm deutlich zu erkennen, während die Hb-Dx-HSA-MP und Hb-Dx-mPEG-MP nur schwache Peaks zwischen 530 und 600 nm zeigten. (s. **Abb. 3-43** und **Abb. 3-44**).

Spektren von Hb und Hb-Dx-(HSA/mPEG)-MP nach Oxygenierung

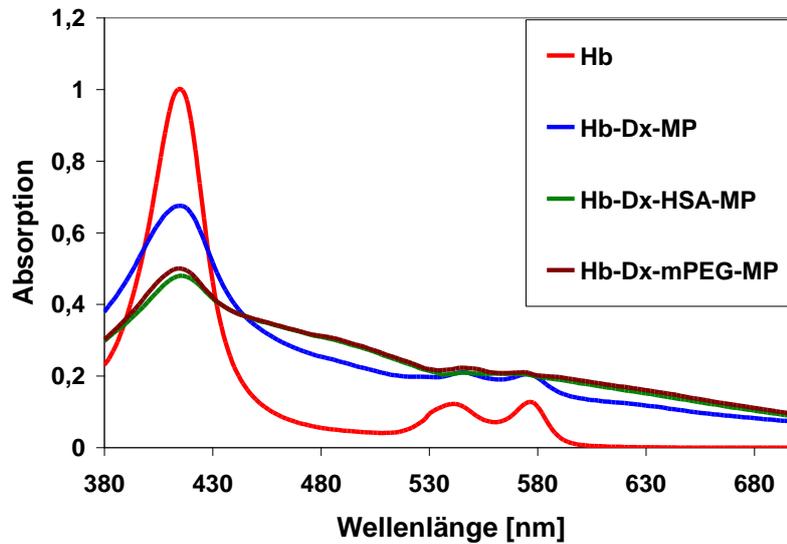


Abb. 3-43. Spektren von oxygeniertem Hb und oxygenierten Hb-Dx-(HSA/mPEG)-MP. Die oxygenierten Partikel zeigten wie OxyHb drei Absorptionsmaxima zwischen 400 und 600 nm (bei 415, 542 und 576 nm). Bei oxygenierten Hb-Dx-MP waren die zwei Peaks zwischen 530 und 600 nm deutlich zu erkennen, während die Hb-Dx-HSA-MP und Hb-Dx-mPEG-MP nur schwache Peaks zwischen 530 und 600 nm zeigten. Die allmähliche Zunahme der Basislinie der Spektren von Hb-HA-MP ist auf die Streuung der Partikel zurückzuführen.

Spektren von Hb und Hb-Dx-(HSA/mPEG)-MP nach Desoxygenierung

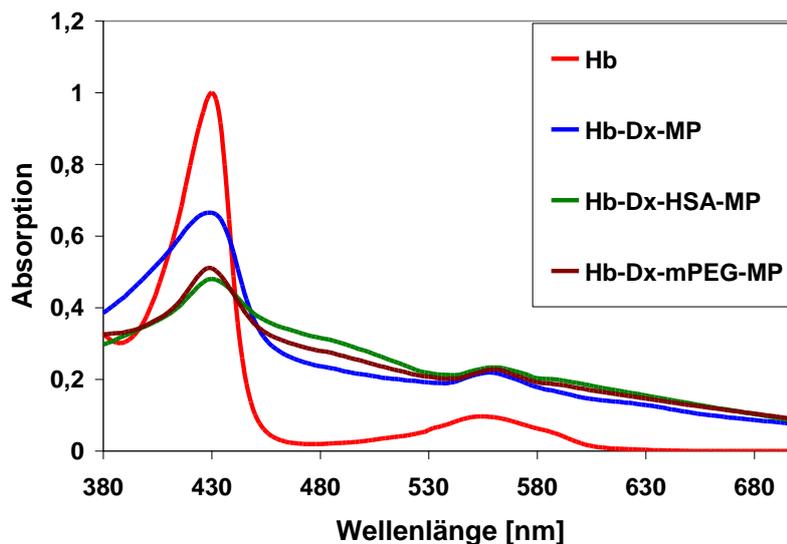


Abb. 3-44: Spektren von DeoxyHb und desoxygenierten Hb-Dx-(HSA/mPEG)-MP. Die Partikel zeigten wie DeoxyHb zwei Absorptionsmaxima zwischen 400 und 600 nm (bei 432 und 556 nm). Die allmähliche Zunahme der Basislinie der Spektren von Hb-HSA-MP ist auf die Streuung der Partikel zurückzuführen.

3.6.7 Sauerstoffbindungskurve (ODC)

Die ODCs von mit Dx modifizierten Partikeln wurden bestimmt. Die mit Dx modifizierten Partikel hatten eine sehr hohe Sauerstoffaffinität. Die Hb-Dx-MP hatten einen p_{50} von ca. 1,5 mmHg (2 hPa). Nach der zusätzlichen Modifikation mit HSA oder mPEG-NH₂ sank der p_{50} der Partikel weiter ($< 0,5$ mmHg). Die zusätzliche Modifikation mit HSA oder mPEG-NH₂ erhöhte die Sauerstoffaffinität der Partikel. Die ODCs sind in **Abb. 3-45** dargestellt.

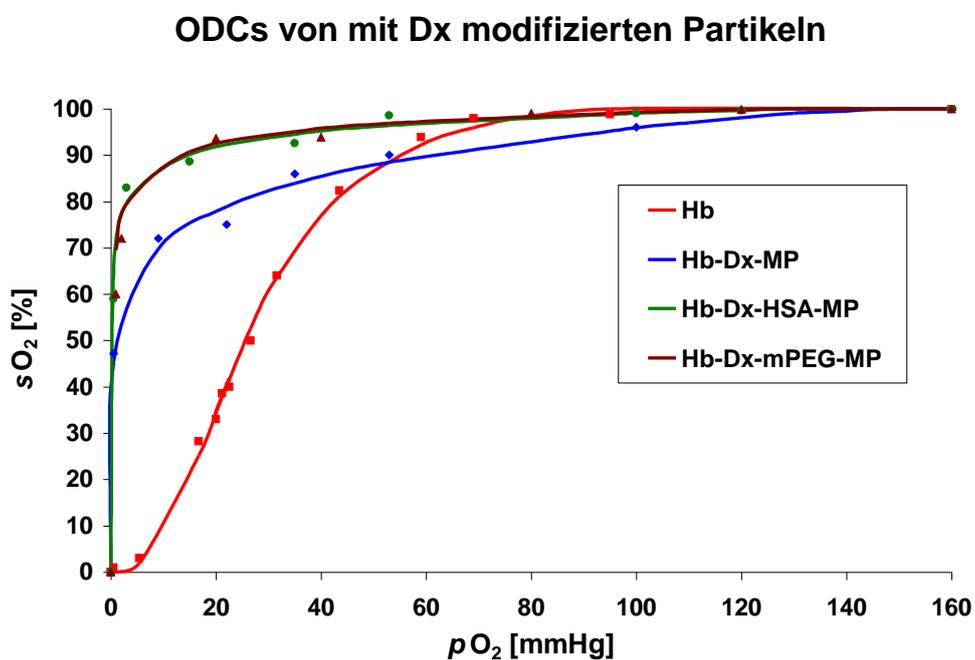


Abb. 3-45: ODCs von Hb, Hb-Dx-MP, Hb-Dx-HSA-MP und Hb-Dx-mPEG-MP. Die Partikel sind bei pO_2 weniger als 1 mmHg vernetzt. Die sO_2 bei bestimmtem pO_2 wurde mit Gl. 10 berechnet. Die sO_2 wurden gegen korrespondierende pO_2 im Diagramm aufgetragen und die ODCs an diese Koordinaten angepasst. Der p_{50} entspricht dem Sauerstoffpartialdruck pO_2 bei Halbsättigung.

4 Diskussion

Hämoglobin-basierte Sauerstoffträger (HBOCs) wurden in den letzten 30 Jahren und werden auch gegenwärtig aufgrund der begrenzten Nutzung des menschlichen Blutes intensiv erforscht. Stromafreies Hb ist nicht als Blutersatz geeignet, da Hb außerhalb der RBC schnell in zwei $\alpha\beta$ -Dimere zerfällt, was zu akutem Nierenversagen und einer kurzen Verweildauer in der Blutbahn führt [4,5,49–51]. *In vivo* induziert freies Hämoglobin Vasokonstriktion, was Blutdruckanstieg, Erhöhung des pulmonalarteriellen und peripheren Widerstandes, Reduktion der Herzfrequenz, des Herzzeitvolumens und der Gewebedurchblutung verursacht [5,50,55–60]. Um Hb als Sauerstoffträger verwenden zu können, muss es durch z. B. intra- oder intermolekulare Vernetzung oder Einkapselung in Mikro- oder Nanopartikel modifiziert werden.

Viele HBOCs konnten zwar die gewünschte Wirksamkeit zeigen (z. B. Reduktion der Fremdbluttransfusion), hatten aber gleichzeitig schwerwiegende Nebenwirkungen wie die Ausbildung einer Hypertonie aufgrund der Vasokonstriktion der Gefäße. Die Polymerisation des Hämoglobins zu einem höheren Molekulargewicht bei gleichzeitig niedrigerem $p50$ wäre ein Lösungsansatz zur Verhinderung der Vasokonstriktion und würde einen geeigneten „Blutersatz“ ergeben [75,115].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Hb-MP als potentielle Sauerstoffträger herzustellen. Die Partikel sollten einfach, effizient und kosteneffektiv hergestellt werden. Dabei sollte das kürzlich von Bäumler und Georgieva [119] entwickelte Verfahren angewendet werden. Das Hb wurde zuerst mit CaCl_2 und Na_2CO_3 zu Hb- CaCO_3 -Mikropartikeln copr äzipitiert. Durch die anschließende Vernetzung des Hb und Auflösung des CaCO_3 entstehen Hb-MP. Es sollten die morphologischen, physikochemischen und immunologischen Eigenschaften sowie die Sauerstoffaffinit ä der Hb-MP charakterisiert werden, um die Ausgangsbedingungen für die Herstellung der Hb-MP zu definieren. Desweiteren sollte der Gasaustausch und die MetHb-Konzentration in den Partikeln und der Einfluss der Oberflächenmodifikation der Hb-MP mit ausgew ählten Polymeren auf ihre Immunreaktion und ihr Aggregationsverhalten untersucht werden.

Als Ausgangssubstanz für HBOCs stehen menschliches Hämoglobin, gentechnisch hergestelltes Hämoglobin und tierisches Hämoglobin wie Rinder-Hämoglobin (*bovine hemoglobin*) oder Schweinehämoglobin zur Verfügung. Menschliches Hämoglobin wird üblicherweise aus verfallenen Blutkonserven gewonnen. Die Verfügbarkeit ist somit limitiert [5,27,73,150]. Gentechnisch hergestelltes Hämoglobin ist noch zu teuer und steht auch nicht in ausreichender Menge zur Verfügung [5,27]. Tierisches Hämoglobin ist daher eine gute Alternative, da z. B. Rinder-Hämoglobin dem Human-Hämoglobin strukturell sehr ähnlich ist. Das Übertragungsrisiko für bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) [5,27,73] kann minimiert werden, indem Blut von Rindern aus BSE-freien Herden verwendet wird.

Ein wichtiger Unterschied zwischen beiden Proteinen ist die Regulation der Sauerstoffaffinität. Die Sauerstoffaffinität des Human-Hämoglobins wird hauptsächlich durch 2,3-BPG reguliert, während für Rinder-Hämoglobin Cl^- statt 2,3-BPG als allosterischer Regulator dient [5,73,151–154]. Ein Vorteil der allosterischen Regulation durch Cl^- anstatt 2,3-BPG ist, dass die Cl^- -Ionen natürliche Bestandteile des menschlichen Blutplasmas sind, wohingegen 2,3-BPG nur innerhalb der RBCs vorhanden ist. Somit könnte die Sauerstoffaffinität der zellfreien HBOCs aus Rinder-Hämoglobin effektiver in der Blutbahn reguliert werden. Daher wurde Rinder-Hämoglobin in der vorliegenden Arbeit verwendet.

4.1.1 Methode zur Hb-MP-Herstellung

Die Verkapselung von Hb in Nano- oder Mikropartikeln (-kapseln) kann mit verschiedenen Methoden erzielt werden. Hb-Mikrokapseln wurden mittels Grenzflächen-Polykondensation [93] oder Grenzflächen-Crosslinking [155] hergestellt. Hb-Nano- oder Mikrosphären ließen sich mittels Doppemulsionsverfahren präparieren [156–158]. Hb konnte ebenfalls in Liposomen [5,96] oder in Nanokapseln mit bioabbaubaren Polymeren als Membran [104] eingeschlossen werden.

Chang war der Erste, der die Hb-Mikrokapseln mit Nylonmembranen durch Grenzflächen-Polykondensation oder Grenzflächen-Koazervation hergestellt hat [93]. Dabei wurden das Erythrozyten-Hämolysat und 1,6-Hexandiamin in Chloroform-Cyclohexan mit Hilfe des Emulgators zu Mikrotröpfchen emulgiert. Dicarbonsäurechlorid (Sebacoylchlorid, ebenso

in Chloroform-Cyclohexan) wurde als Vernetzer anschließend hinzugegeben. 1,6-Hexandiamin wurde an der Grenzfläche des Mikrotröpfchens zu Nylon polymerisiert, so dass Hb-Mikrokapseln entstanden [93]. Diese Nylonmembran ist semipermeabel, jedoch nicht bioabbaubar, so dass auf 1,6-Hexandiamine verzichtet wurde, um bioabbaubare Mikrokapseln herzustellen [155]. Dabei wurde Hb an der Grenzfläche des Mikrotröpfchens mit Dicarbonsäurechlorid zur Kapselmembran vernetzt (Grenzflächen-Crosslinking). Zusätzlich wurde GA eingesetzt, um die Kapselwand verstärkt zu vernetzen, damit das Hb nicht aus den Mikrokapseln freigesetzt wird [155]. Hb lässt sich gut mittels Grenzflächen-Polykondensation oder Grenzflächen-Crosslinking mikroverskapseln. Die Größe der Mikrokapseln ist durch die Rührgeschwindigkeit bei der Herstellung einstellbar. Die Größenverteilung der Mikrokapseln ist jedoch breit [155]. Die Kapselmembranen sind stabil gegen Freisetzung des Hb aus dem Kapselinneren. Derartige Mikrokapseln ließen sich lyophilisieren und rehydrieren. Allerdings war der MetHb-Gehalt hoch (20 - 25 %). Außerdem wurden große Mengen organischer Lösungsmittel und Tenside bei der Herstellung eingesetzt (ein Teil Hb-Lösung wurde am Ende mit zwölf Teilen des organischen Lösungsmittel emulgiert [93,155]). Der Einsatz der organischen Lösungsmittel kann einerseits das Hb denaturieren / beschädigen, andererseits erhöht es die Herstellungskosten erheblich.

Das Verfahren der Doppelemulsion und Lösungsmittel-Verdampfung / -Diffusion (solvent diffusion / evaporation) wird häufig bei der Herstellung der Polymerpartikel angewandt. Hb beladene Polymer-Nano- oder Mikropartikel können ebenso mit dieser Methode hergestellt werden [157–159]. Das Matrixpolymer wird zuerst in einem nicht mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel gelöst (O-Phase); die Hb-Lösung (W1-Phase) wird dann in diesem organischen Lösungsmittel emulgiert (W1/O-Emulsion). Die primäre W1/O-Emulsion wird anschließend in einer externen Wasserphase emulgiert und die Doppelemulsion W1/O/W2 entsteht. Das organische Lösungsmittel wird durch Evaporation oder Diffusion entfernt und das Polymer als Mikro- oder Nanopartikel präzipitiert. Dabei wird das Hb gleichzeitig in den Partikeln eingeschlossen [157–159]. Im Vergleich zur Grenzflächen-Polykondensation ist die Menge des eingesetzten organischen Lösungsmittels beim Doppelemulsionsverfahren reduziert. Das Volumen des organischen Lösungsmittels ist aber immer noch vier bis zehn Mal höher als das Hb-Volumen. Der Materialverbrauch ist relativ hoch. Für eine 0,5 mL Hb-Lösung müssen z. B. 5 mL organisches Lösungsmittel (O-Phase) und 200 mL - 400 mL externe wässrige Phase

benutzt werden [157–159]. Das in diesen Polymerpartikeln immobilisierte Hb ist nicht stabilisiert, so dass bis zu 40 % des Hb in den ersten zehn Stunden nach der Resuspension der lyophilisierten Partikel in PBS schlagartig freigesetzt werden (burst release) [160].

In Liposomen eingekapseltes Hb (LEH) wird ebenfalls intensiv untersucht. Für die LEH-Herstellung ist allerdings die Verwendung teurerer Lipide unerlässlich. Ältere Generationen von LEH hatten eine schlechte Hb-Verkapselungseffizienz und Stabilität [94]. Neuere Entwicklungen der LEH (Hämoglobin-Vesikel, HbV) zeigen jedoch Fortschritte hinsichtlich der Hb-Verkapselungseffizienz, Stabilität und immunologischen Eigenschaften [15,95,96]. Die HbV werden mit Hilfe der Extrusionsmethode hergestellt. Die Lipide werden zuerst in einem organischen Lösungsmittel wie Chloroform gelöst. Das organische Lösungsmittel wird dann mittels Rotationsverdampfung entfernt, so dass ein Lipidfilm entsteht. Der Lipidfilm wird danach in einer NaOH-Lösung dispergiert. Die erhaltenen großen, multilamellaren Vesikel (MLV) werden durch eine Membran mit 10 µm Porengröße extrudiert. Die erhaltenen Vesikel (kleiner als 10 µm) werden dann durch Einfrieren-Auftauen behandelt (Vesikelgröße kann somit auf 500 nm reduziert werden) und anschließend lyophilisiert. Das lyophilisierte Pulver wird in konzentrierter Hb-Lösung dispergiert und die 500 nm großen Vesikel werden dann durch Membranfilter zunächst mit einer Porengröße von 0,45 µm, dann 0,3 µm und schließlich 0,22 µm extrudiert. Dabei entstehen HbV mit einer durchschnittlichen Größe von 250 nm [95,161]. Durch die komplizierte Herstellung und die Anwendung von teureren Lipiden lassen sich die HbV nicht kosteneffektiv herstellen. Der Produktionsmaßstab von Liposomen ist immer noch begrenzt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Produktion noch nicht ausreichend für klinische Studien [5,95]. Große Lipidmengen können die phagozytische Funktion des mononukleären Systems (MPS) abschwächen. Außerdem ist die Lipidmembran der LEH oder HbV für Reduktionsmittel und Glucose nicht durchlässig, was die MetHb-Bildung begünstigen kann [15].

Chang's Gruppe hat neuartige Hb-Nanokapseln mit bioabbaubaren Polymeren als Membran entwickelt [103]. Die Polylactide und Lipide wurden zuerst in den organischen Lösungsmitteln Ethanol und Aceton gelöst. Diese Lösung wurde langsam in eine tensidhaltige Hb-Lösung unter Rühren injiziert. Die Diffusion von Ethanol und Aceton in der wässrigen Phase bewirkte die Bildung von Hb-Nanokapseln [103]. Diese Methode ist

einfach. Jedoch müssen auch hier organische Lösungsmittel und die teureren Lipide verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit hingegen erfordert die verwendete Methode keine Verwendung organischer Lösungsmittel. Die eingesetzten anorganischen Ausgangssubstanzen für die Partikelherstellung wie CaCl_2 und Na_2CO_3 sind preisgünstig und nicht toxisch. Es ist keinerlei spezielles Gerät notwendig; bei der Copräzipitation ist ein klassischer Magnetprüher ausreichend; für die Reinigung der Partikel kommt die Zentrifuge zum Einsatz. Zusammenfassend ist die hier beschriebene Methode für die Herstellung von Hb-MP einfach, effizient und kosteneffektiv.

Die Präzipitation von CaCO_3 ist ein komplexer Prozess, der bereits mehr als 100 Jahre untersucht wird [162]. CaCO_3 kommt in verschiedenen Modifikationen vor. Drei wasserfreie Polymorphe (Calcit, Aragonit und Vaterit) existieren neben zwei Hydratformen und dem amorphen CaCO_3 [163]. Die drei wasserfreien kristallinen Polymorphe haben typische Morphologien: Calcit liegt als Rhomboeder vor, Aragonit als Nadeln und Vaterit als polykristalline Sphären. Während Calcit die thermodynamisch stabile Form ist, sind die anderen Modifikationen nur metastabil oder instabil [163]. Die Präzipitation / Kristallisation von CaCO_3 wird durch die Salzarten, die Konzentration der Salzlösungen, den pH-Wert, die Temperatur, die Rührdauer und die Rührgeschwindigkeit beeinflusst. Verschiedene Zusatzstoffe wie zweiwertige Kationen, organisches Lösungsmittel und Makromoleküle haben ebenfalls Einfluss auf die Morphologie von CaCO_3 [162–165].

In der Regel ist der erste Schritt der CaCO_3 -Präzipitation die Bildung von amorphem CaCO_3 , das bei RT vorzugsweise in Vaterit und schließlich in Calcit umgewandelt wird [162,166,167]. Beim Mischen von CaCl_2 - und Na_2CO_3 -Lösungen entstehen zuerst amorphe CaCO_3 -Nanopartikel. Diese aggregieren dann zu sphärischen MP, was in **Abb. 4-1** schematisch dargestellt ist [167].

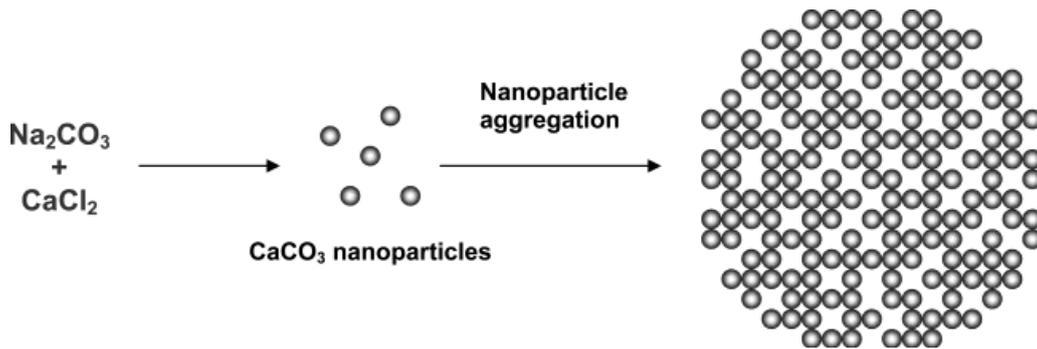


Abb. 4-1: Entstehung von CaCO₃-Mikropartikel [167].

Derartige CaCO₃-MP haben einen isoelektrischen Punkt von 8,5. Die Partikel sind porös und haben Porengrößen von 20 - 60 nm [167]. Die effektive Oberfläche der CaCO₃-MP ist somit stark vergrößert und etwa elf Mal größer als die von nicht-porösen MP [164]. Aufgrund der großen Oberfläche und der nanometergroßen Poren sind die sphärischen CaCO₃-MP in der Lage, Makromoleküle wie z. B. Proteine oder Polysaccharide über physikalische Adsorption / Porendiffusion effektiv zu immobilisieren [164,167].

Wenn die Biopolymere gleichzeitig mit CaCO₃ copräzipitiert werden, werden sie noch effektiver in die CaCO₃-MP integriert. Die während der Kristallisation anwesenden Biopolymere können bereits an die Oberfläche der primären CaCO₃-Nanopartikel adsorbieren, wodurch den Makromolekülen für die Adsorption eine wesentlich größere Gesamtoberfläche zur Verfügung steht [168]. Während der Copräzipitation können die Biopolymere auch in das Netzwerk von Kapillaren und Hohlräumen, die bei der kolloidalen Aggregation der primären Nanopartikel zu MP gebildet werden, eingekapselt werden [168]. Durch die Copräzipitation der Biomakromoleküle mit CaCO₃ kann die Einkapselungseffizienz der CaCO₃-MP ca. um das 5-fache erhöht werden [168].

Da das Ziel der Arbeit u. a. darin bestand, eine optimale Hb-Konzentration bei der Copräzipitation zu erreichen, ist der Vergleich mit menschlichen Erythrozyten sinnvoll. Das mittlere Erythrozytenvolumen (mean corpuscular volume, MCV) liegt bei 90 fL [169], der mittlere Hämoglobingehalt je Erythrozyt (mean corpuscular hemoglobin, MCH) bei 30 pg Hb [169]. Die höchste Hb-Bindungseffektivität der CaCO₃-MP in den Versuchsreihen betrug 8,0 mg Hb / mmol CaCO₃-MP. Die CaCO₃-MP haben eine Dichte von 1,6 g/mL [170]. Damit entsprechen 8,0 mg Hb / mmol CaCO₃-MP 2,2 pg Hb / Partikel, wenn eine mittlere Partikelgröße von 3,2 µm angenommen wird oder 11,5 pg Hb / 90 fL

CaCO₃-MP. Das heißt, die Hb-Beladung der CaCO₃-MP entsprach einem Drittel der Hb-Konzentration der Erythrozyten.

Durch die Copr äzipitation des Hb in Gegenwart von anderen Polymeren z. B. HSA, HA oder Dx wurde die Hb-Einkapselungseffizienz der CaCO₃-MP erniedrigt. Wenn andere Polymere bei der Copr äzipitation auch vorhanden sind, wird ein Teil der anderen Polymere ebenfalls in CaCO₃-MP eingekapselt. Da nur eine bestimmte Menge Polymer in CaCO₃-MP immobilisiert werden kann, wird weniger Hb eingekapselt.

Um die Größe des HBOCs zu erhöhen, wird das Hb häufig in freier Lösung polymerisiert oder nano- / mikroverkapselt [5]. Die Polymerisation des Hbs mit GA in freier Lösung führt zu einem inhomogenen Produkt mit breiter Größenverteilung [171]. So ergibt sich z. B. bei einer zweistündigen Polymerisation des Hb mit GA in einem molaren Verhältnis von 1 : 60 polymerisiertes Hb mit 15 - 500 Hb-Tetrameren [171]. Im Gegensatz dazu führt das Verfahren der Copr äzipitation zu MP zu einer homogenen Größenverteilung. Durchschnittlich hat ein MP 2,2 pg Hb, das entspricht ca. $2 \cdot 10^7$ Hb-Tetrameren. Nach einer einstündigen Inkubation mit einer 0,01 %igen GA-Konzentration in der Lösung (molares Verhältnis zu Hb 68 : 1) werden $2 \cdot 10^7$ Hb-Tetramere in einem Mikropartikel vernetzt, was wesentlich effizienter als in freier Lösung ist und den Verbrauch an GA deutlich reduziert.

Die Anwendung dieser Methode ist dabei nicht nur auf Hb begrenzt. MP aus anderen Biopolymeren wie z. B. Albuminen, Enzymen und Polysacchariden können ebenso hergestellt werden [122,172].

4.1.2 Methämoglobinbildung

Da MetHb keinen Sauerstoff transportieren kann, ist eine hohe Methämoglobinbildung nachteilig bei der Herstellung von HBOCs. Es wurde ein hoher MetHb-Gehalt (> 15 %) in allen Hb-MP nach der Herstellung beobachtet. Je höher die Vernetzer- (GA-) Konzentration, die bei der Vernetzung eingesetzt wurde, desto mehr MetHb wurde gebildet. Bei nicht modifizierten Partikeln erhöhte sich der MetHb-Gehalt auf mindestens 18 %, während er vor der Herstellung weniger als 4 % betrug. Quenchen mit Glycin und Reduktion mit NaBH₄ können den MetHb-Gehalt erniedrigen. Der

MetHb-Gehalt blieb trotzdem hoch (15 %). Sämtliche Modifikationen der Hb-MP und die Herstellung der Mischpartikel mit anderen Biopolymeren ergaben einen höheren MetHb-Anteil (mehr als 20 % MetHb) im Vergleich zu reinen, nicht modifizierten Hb-Partikeln. Ein besonders hoher MetHb-Gehalt wurde bei mit Dx modifizierten Partikeln (GA und SCl als Vernetzer) ermittelt. Hier wurde ca. ein Drittel des Hb zum MetHb umgewandelt.

Das Hb neigt zu spontaner Autooxidation zu MetHb in Gegenwart von Sauerstoff. In RBCs existiert jedoch das intraerythrozytäre Reduktionssystem, das die MetHb-Konzentration im Allgemeinen 1 - 2 % nicht überschreiten lässt [5,36,43]. Zellfreies Hb ist nicht durch das intraerythrozytäre Reduktionssystem geschützt. Bei unmodifiziertem Hb stellt die Globinkette des Hb einen schützenden Mantel dar. Sie schützt das Eisen im Häm vor einer Oxidation durch Sauerstoff [38]. Modifiziertes Hb autooxidiert meistens schneller als unmodifiziertes Hb. Die Präparation von mit GA vernetztem Hb ist immer mit einer starken Bildung des MetHb und einer erhöhten Autooxidation verbunden [5,75,140,171]. Es wird vermutet, dass sich die Konformation des Hb während der Vernetzung mit GA verändert und der Schutzmantel des Häms durch die Globinkette verloren geht (Öffnung der Häm-Tasche), so dass das modifizierte Hb weniger vor der Oxidation geschützt wird [5].

In dem untersuchten GA-Konzentrationsbereich gab es vermutlich einen logarithmischen Zusammenhang zwischen der eingesetzten GA-Menge und dem MetHb-Gehalt. In niedrigem GA-Konzentrationsbereich reagieren vermutlich die beiden Aldehydgruppen des GA mit Aminogruppen des Hb, was zu stärkeren Konformationsänderungen des Hb und schließlich zu schnellem MetHb-Anstieg bei Erhöhung der GA-Konzentration führte. Im höheren GA-Konzentrationsbereich würde vermehrt nur eine Aldehydgruppe von GA mit Aminogruppen des Hb reagieren, da die Anzahl der Aminogruppen des Hb begrenzt ist und GA-Moleküle unter einander konkurrieren würden. Steigt also die GA-Konzentration in einen höheren Bereich, würde sich die Konformation des Hb nicht mehr so stark wie im niedrigen GA-Konzentrationsbereich ändern. Der Anstieg des MetHb-Gehalts ist somit langsamer.

Die Partikel lassen sich nachträglich mit einem geeigneten Reduktionsmittel behandeln, um den MetHb-Gehalt zu reduzieren. In der vorliegenden Arbeit wurde z. B.

Ascorbinsäure nach der Herstellung eingesetzt, womit der MetHb-Gehalt erfolgreich reduziert wurde. Bei nicht mit anderen Polymeren modifizierten Partikeln konnte der MetHb-Anteil somit auf weniger als 7 % reduziert werden. Ascorbinsäure ist ein starkes Reduktionsmittel, welches das MetHb deutlich reduzieren kann [5].

4.1.3 Morphologische Eigenschaften der Partikel

Die Bildung von CaCO_3 -MP ist ein komplexer Vorgang. Bei der Präzipitation bilden sich zuerst amorphe CaCO_3 -Nanopartikel. Diese Nanopartikel aggregieren dann zu sphärischen Mikropartikeln (**Abb. 4-1**) [167]. Wenn die CaCO_3 -MP nicht stabilisiert werden, rekristallisieren sie zu rhomboedrischem Calcit [162,166,167]. Verschiedene Zusatzstoffe wie Makromoleküle können den Kristallisationsprozess von CaCO_3 stark beeinflussen [163,168]. Sie können die Keimbildung erhöhen und die Partikelgröße verringern oder die Keimbildung hemmen und damit die Partikelgröße erhöhen [168]. Beispielsweise adsorbieren Proteine sowohl auf der Oberfläche der primären Nanopartikel als auch der Mikropartikel und können damit die Morphologie der Partikel stabilisieren [163,168,173]. Durch die Auswahl geeigneter Zusatzpolymere lassen sich CaCO_3 -Hybridpartikel mit bestimmter Struktur herstellen [173].

Nach der Copräzipitation von Hb mit CaCO_3 adsorbiert Hb auf der Oberfläche der primären Nanopartikel und der Mikropartikel. Die Hb- CaCO_3 -MP sind somit in sphärischer Form stabilisiert. Nach der Vernetzung des Hb und Auflösung des CaCO_3 entstehen schwammartige Hb-MP; die Form und Größe der Partikel bleiben erhalten.

Alle in der vorliegenden Arbeit hergestellten Hb-MP waren sphärisch, innerhalb einer Charge waren die Partikel monodispers. Eine gleichmäßige Verteilung des Hb wurde in nicht mit Polymeren modifizierten Hb-MP, in PEGylierten, in mit Dx modifizierten Partikeln sowie in Hb-HSA-Mischpartikeln gefunden. Die nicht mit Polymeren modifizierte Hb-MP waren durchschnittlich 3,2 μm groß. Die GA-Konzentration hatte keinen Einfluss auf die Form und Größe der Partikel, führte aber zur Autofluoreszenz der Partikel. Nach Behandlung mit NaBH_4 wurde die Intensität der Autofluoreszenz reduziert. Bei Hb-HSA-Mischpartikeln wurden die Form und Größe der Partikel nicht wesentlich verändert. Bei Hb-Dx-MP wurden Hb und Dx zuerst mit CaCO_3 copräzipitiert. Das Dx wurde zusätzlich auf die Partikeloberfläche adsorbiert und vernetzt. Die Form und Größe

der Hb-Dx-MP wurde im Vergleich zu nicht mit Polymeren modifizierten Hb-MP auch nicht wesentlich verändert. Auch sämtliche Modifikationen an den Partikeln nach der Auflösung änderten die Form und die Größe nicht (im Vergleich zu Partikeln vor den Modifikationen). Dazu zählen die PEGylierung der Hb-MP und die Oberflächenmodifikationen mit HSA oder mPEG-NH₂ mittels EDC / NHS bei Hb-Dx-MP.

Die Hb-HA-Mischpartikel hatten eine ganz andere Form. Eine ungleichmäßige Verteilung des Hb wurde in Hb-HA-MP gefunden. Die Partikelgrößen schwankten deutlich stärker von Charge zu Charge im Vergleich zu Hb-MP, Hb-HSA-MP und Hb-Dx-MP. Wie oben schon erwähnt, wird der Kristallisationsprozess der CaCO₃ durch die Anwesenheit von Polymeren beeinflusst [163]. Insbesondere wenn acidische Polymere verwendet werden. Die Carboxygruppen der acidischen Polymere können Ca²⁺ koordinativ binden und die acidischen Polymere hemmen die Kristallisation und stabilisieren die CaCO₃-Nanopartikel [174–179]. HA ist ein acidisches Polysaccharid mit hohem Wasserbindevermögen [180]. Vernetzte HA ist ebenfalls fähig, große Mengen an Wasser zu binden und zu quellen [181,182]. Die Stärke der Quellung ist abhängig z. B. von der Salzkonzentration und dem pH-Wert. Die Stärke der Quellung sinkt mit steigender Salzkonzentration [181,182]. Das Hb ist ein globuläres Protein mit isoelektrischem Punkt von pH 6,8 [183]. Es ist kein acidisches Polymer und die Quellungseigenschaft ist bei Hb nicht bekannt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass bei der Copräzipitation eine Entmischung stattfand. Nach der Auflösung des CaCO₃ wurden die Partikel mit Ampuwa® (durch Destillation hergestelltes Wasser für Injektionszwecke) gewaschen. Dabei konnte die HA stark quellen und das Hb weiter verdrängen, was in den ungleichmäßigen „Mantel“- oder „Rosen“-Strukturen resultierte.

Die mit CASY® 1 Cell Counter bestimmten Partikelgrößen waren kleiner als die mikroskopisch bestimmten Größen. Der CASY® 1 Cell Counter arbeitet nach dem Widerstandsmessprinzip. Bei der Passage der Partikel durch die Messkapillare wird ein partikelabhängiges Elektrolytvolumen verdrängt, was zur Änderung der angelegten elektrischen Spannung und zu einer Widerstandserhöhung führt. Diese Widerstandserhöhung ist ein Maß für das Volumen der Partikel. Aus der Volumenverteilung wird die Größenverteilung berechnet [129]. Hb-MP sind nach der Auflösung von CaCO₃ schwammartig und enthalten Elektrolyte. Wenn ein Partikel die Messkapillare passiert, verdrängt der Partikel zwar genau so viel Elektrolyt wie ein

kompakter Partikel. Im Partikel selbst wird jedoch Elektrolyt mitgeführt, so dass dessen Leitfähigkeit höher ist als die eines kompakten Partikels. Das führt zu einem geringeren elektrischen Widerstand und damit zu einer scheinbar geringeren Größe. Die berechnete Partikelgröße ist somit kleiner als die mikroskopisch bestimmte Größe. Insbesondere bei den Hb-HA-MP lässt sich aufgrund der Anschwellung der HA und der „Rosen“-Struktur vermuten, dass die Partikel viele hohle Räume besitzen. Daher sind manche Hb-HA-MP unter dem CLSM zwar ca. 10 µm groß, aber im CASY® 1 Cell Counter als 2 - 3 µm berechnet.

4.1.4 Physiko-chemische Eigenschaften der Partikel

4.1.4.1 Zetapotential

Alle Partikel hatten negative Ladungen an ihrer Oberfläche (negatives Zetapotential). Hb hat einen isoelektrischen Punkt von pH 6,8 [183], d. h. Hb hat mehr anionische (wie Carboxygruppen) als kationische Gruppen (wie Aminogruppen). Während der Vernetzung reagieren die nukleophilen Aminogruppen mit dem Vernetzer, so dass die Carboxygruppen nach der Vernetzung deutlich im Überschuss sind, was zu einem negativen Zetapotential der Partikel in neutraler NaCl-Lösung führte. Das Zetapotential der Partikel stieg mit steigender GA-Vernetzerkonzentration, da mehr Aminogruppen des Hb mit GA reagieren (s. **Abb. 2-3**), die Oberfläche wird dann stärker negativ beladen. Nach dem Quenchen mit Glycin und der Reduktion mit NaBH₄ war das Zetapotential leicht erhöht. Beim Quenchen reagiert die Aminogruppe des Glycins mit der restlichen Aldehydgruppe von GA und, die Carboxygruppe des Glycins trägt mit seiner zusätzlichen negativen Ladung zu einer Verringerung des Zetapotentials bei.

Bei der PEGylierung wird die Ladung der Partikeloberfläche durch die Hydratationsschicht des PEG abgeschirmt. Da sich durch die Hydratationsschicht die hydrodynamische Scherebene verschiebt, erniedrigt sich das Zetapotential der Partikel nach der PEGylierung.

Die Hb-HSA-Mischpartikel hatten ein leicht erhöhtes (negativeres) Zetapotential im Vergleich zu den Hb-MP. Der isoelektrische Punkt von HSA liegt zwischen pH 4,6 und pH 5,3 [184,185] und ist somit niedriger als der von Hb (pH 6,8 [183]). Das ist darauf

zurückzuführen, dass HSA im Vergleich zum Hb mehr anionische Gruppen hat. Das spiegelt sich auch im erhöhten Zetapotential der Hb-HSA-MP im Vergleich zu den Hb-MP wider.

Die Hb-HA-Mischpartikel hatten ein stark erhöhtes Zetapotential im Vergleich zu den Hb-MP. HA ist ein stark acidisches Polymer und hat viele freie Carboxygruppen. Durch Einführung von HA kann das Zetapotential der Partikel stark erhöht werden.

Die mit GA und SCl vernetzten Hb-Dx-MP hatten ebenfalls ein stark negatives Zetapotential, da bei der Vernetzung neue Carboxygruppen bei der Nebenreaktion von SCl mit H₂O entstehen. Dabei reagiert eine funktionelle Gruppe des SCl mit Hb oder Dx und die andere funktionelle Gruppe des SCl wird zur Carbonsäure hydrolysiert (s. **Abb. 2-8**). Nach zusätzlicher Modifikation mit HSA oder mPEG-NH₂ mittels EDC / NHS bei Hb-Dx-MP hatten die Partikel ein reduziertes Zetapotential, da viele Carboxygruppen der Partikeloberfläche mit Hilfe von EDC und NHS mit den Aminogruppen von HSA oder mPEG-NH₂ reagierten (s. **Abb. 2-9**) und die Anzahl von Carboxygruppen auf der Partikeloberfläche reduziert wurde.

4.1.4.2 Stabilität der Partikel in Salzlösungen

Die nicht modifizierten Hb-MP aggregierten stark. Die Partikel sind nur stabil, solange die Repulsionskräfte die Attraktionskräfte überwiegen. Repulsionskräfte sind elektrostatisch, sterisch oder die Kombination aus beiden Kräften, während Attraktionskräfte von der Waals-Kräfte oder Depletionskräfte sind. Die elektrostatische Stabilisierung kann bei Partikeln mit geladener Oberfläche ausreichend sein. Die Oberflächenladungen werden durch Gegenionen kompensiert, welche sich in einer diffusen Ionenschicht um die Partikel befinden. Die Abstoßung zwischen den diffusen Ionenschichten stabilisiert die Partikel, wenn die Abstoßkräfte größer als die Anziehungskräfte sind. Eine sterische Stabilisierung wird durch Adsorption oder kovalente Bindung von hochmolekularen oder polymeren Molekülen an der Partikeloberfläche erreicht. Nähern sich die Partikel an und durchdringen sich die Polymere, kommt es zu einer Erhöhung der thermodynamisch ungünstigen Ordnung des Systems und einer lokalen Erhöhung des osmotischen Druckes, was zur Abstoßung der Partikel führt. Die elektrosterische Stabilisierung ist die Kombination aus elektrostatischer und sterischer Stabilisierung [186,187].

Das Zetapotential der nicht modifizierten Partikel war negativ und sank mit steigender Ionenstärke der Partikelsuspension. In physiologischer NaCl-Lösung betrug das Zetapotential der Partikel nur -10 bis -13 mV. Die elektrostatische Abstoßung war nicht ausreichend, um die Partikel zu stabilisieren, so dass die nicht modifizierten Partikel stark aggregierten.

Die PEGylierung der MP reduzierte ihre Aggregation nicht. Nach der PEGylierung wurde die Ladung der Partikeloberfläche von neutralem mPEG abgeschirmt. Die elektrostatischen Abstoßungskräfte waren damit vermindert. Das cc-mPEG mit einem Molekulargewicht von 5.000 Da ist ein kleines Polymer und war nicht in der Lage, die Partikel sterisch zu stabilisieren.

Die Hb-HSA-MP aggregierten im Vergleich zu nicht modifizierten Partikeln weniger. Hb-HSA-MP hatten ein negativeres Zetapotential im Vergleich zu den Hb-MP. Die Copräzipitation mit HSA führt zu mehr anionischen Gruppen an der Partikeloberfläche, was zu stärkeren elektrostatischen Abstoßungskräften der Partikel untereinander und damit zu einer schwächeren Aggregation führte.

Die Hb-HA-MP aggregierten deutlich schwächer. HA ist ein großes acidisches Polymer. Nach der Copräzipitation mit HA wurde die Ladung der Partikeloberfläche stark erhöht (stark erhöhtes Zetapotential). Die elektrostatische Abstoßung wurde somit deutlich verstärkt. Das Molekulargewicht von HA ist im Megadalton-Bereich, so dass man eine sterische Stabilisierung der Hb-HA-MP nicht ausschließen kann.

Die mit Dx modifizierten und mit GA und SCl vernetzten Partikel hatten die geringsten Aggregatanteile. Langkettiges Dx trug zur sterischen Stabilisierung der Partikel bei. Die elektrostatische Stabilisierung basiert auf der Nebenreaktion von SCl. Eine funktionelle Gruppe des SCl reagierte mit Hb oder Dx, während die andere funktionelle Gruppe des SCl zur Carbonsäure hydrolysierte, womit neue Säuregruppen / Carboxygruppen auf der Partikeloberfläche entstehen (**Abb. 2-8**). Die negative Ladung der Partikeloberfläche wurde stark erhöht und die Partikel waren somit auch elektrostatisch stabilisiert. Hb-Dx-MP waren somit sowohl sterisch als auch elektrostatisch stabilisiert. Auch nach der zusätzlichen Modifikation mit HSA oder mPEG-NH₂ der Hb-Dx-MP nach der Auflösung erhöhte sich die Zahl der Aggregate nicht wesentlich; die Partikel waren immer noch gut

sterisch stabilisiert. Die Modifikation mit HSA (GA als Vernetzer), HA (GA und DVS als Vernetzer) und Dx (GA und SCl als Vernetzer) hatten einen positiven Effekt in Hinsicht auf die Aggregationsreduktion der Partikel.

4.1.4.3 Stabilität der Partikel in PRP

Im PRP befinden sich neben den Plasmaproteinen Blutplättchen und Leukozyten. Da die Wechselwirkung der MP mit den Blutzellen zu unterschiedlichen die Stabilität der Partikelsuspension betreffenden Ergebnissen führt, wird die Stabilität der Partikel in PRP detailliert in 4.1.5.2 nach der Diskussion der immunologischen Eigenschaften der MP behandelt.

4.1.5 Immunologische Eigenschaften der Partikel

4.1.5.1 Phagozytose der Partikel

Das Immunsystem ist ein komplexes System von Zellen und Faktoren, das den Organismus in die Lage versetzt, Infektionserreger und Fremdstrukturen zu beseitigen [188]. Zellen nehmen aus ihrer Umgebung Makromoleküle und Partikel über Endozytose auf. Dabei stülpt sich die Plasmamembran unter dem aufzunehmenden Material ein und bildet anschließend einen Vesikel darum [189]. Die Aufnahme von Flüssigkeiten und gelösten Substanzen wird Pinozytose genannt. Die Phagozytose beschreibt die Aufnahme von festen, größeren Partikeln ($> 0,5 \mu\text{m}$) durch professionelle Phagozyten (z. B. Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen) und ist ein Teil der angeborenen Immunabwehr [188,190]. Die bei der Pinozytose entstandenen Vesikel werden als Pinosomen und bei der Phagozytose als Phagosomen bezeichnet.

Am Prozess der Phagozytose sind verschiedene Rezeptoren auf der Oberfläche der Phagozyten beteiligt, die zur Erkennung, Bindung und Internalisierung der Fremdpartikel beitragen. Dazu gehören z. B. Rezeptoren für den Fc-Teil von Antikörpern und Faktoren der Komplementkomponenten. Werden die Fremdpartikel z. B. Mikroorganismen an Antikörper oder / und Komplementkomponenten gebunden, werden sie effizienter phagozytiert. Dieser Vorgang wird als Opsonisierung bezeichnet. Zu den wichtigsten

Opsoninen zählen IgG-Antikörper und das C3b-Fragment des Komplementsystems [189,190]. Darüber hinaus existieren andere Serumproteine wie z. B. Fibronectin und C-reaktives Protein, die als Opsonine wirksam sind [191]. Neben der opsoninabhängigen Phagozytose ist die opsoninunabhängige Phagozytose bekannt. Die opsoninunabhängige Phagozytose ist durch verschiedene Rezeptoren wie Scavenger-Rezeptoren, Mannose-Rezeptoren und Toll-ähnliche Rezeptoren (*toll-like receptors*) vermittelt [188,191].

Die Phagosomen werden mit zahlreichen im Inneren der Phagozyten existierenden Vesikeln wie Granula und Lysosomen verschmolzen (Degranulation oder Phagolysosomenbildung). Die phagozytierten Fremdpartikel werden dann durch zahlreiche reaktive Metabolite und Enzyme abgebaut [189].

Die Phagozytose der Hb-MP wurde durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Je höher die GA-Konzentration bei der Vernetzung war, desto stärker wurden die Partikel phagozytiert, falls die Partikel nicht mit anderen Polymeren modifiziert wurden. Hohe GA-Konzentrationen bei der Vernetzung führten zu zahlreichen freien Aldehydgruppen auf der Partikeloberfläche. Die Restaldehydgruppen können sowohl mit Plasmaproteinen reagieren als auch die Komplement-Aktivierung bewirken, was zu einer verstärkten Opsonisierung der Partikel führt. Nach dem Quenchen mit Glycin und der Reduktion mit NaBH₄ wurden die Restaldehydgruppen irreversibel abreagiert. Im Ergebnis wurden die Partikel dann weniger phagozytiert. Tatsächlich hatten die Partikel, die mit der niedrigsten GA-Konzentration (0,01 %) vernetzt wurden, mit Glycin gequencht und mit NaBH₄ reduziert waren (Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄), die niedrigste Phagozytoserate (< 5 %). PEGylierung der Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH₄ konnte die Phagozytose jedoch nicht weiter reduzieren.

Bei den Mischpartikeln (Hb-HSA-MP und Hb-HA-MP) und nach der Modifikation mit Dx wurden die Eigenschaften der Partikel verändert. Die Partikel wurden stärker phagozytiert. Während die Hb-HSA-MP eine leicht erhöhte Phagozytose gegenüber nicht modifizierten Partikeln auslösten, hatten die GCs und MCs die Hb-HA-MP oder die mit Dx modifizierten Partikel stark aufgenommen. Es wird angenommen, dass elektrostatisch geladene Partikel aufgrund einer unspezifischen elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Zellen und Partikeln stärker als nicht geladene Partikel phagozytiert werden. Je

stärker negativ das Zetapotential der Partikel ist, desto stärker werden die Partikel phagozytiert [192–195]. Dadurch kann die erhöhte Phagozytoserate bei Hb-HA-MP und Hb-Dx-MP erklärt werden, da diese ein stark negatives Zetapotential aufwiesen. Die hohe Phagozytoserate der MCs kann auf eine mögliche starke Aufnahme der Partikel durch das Mononukleäre Phagozytensystem (MPS) *in vivo* hinweisen.

Die mit Dx modifizierten Partikel wurden stärker als die Hb-HA-MP phagozytiert, obwohl ihr Zetapotential niedriger war. Die zusätzliche Modifikation mit HSA oder durch PEGylierung der mit Dx modifizierten Partikeln reduzierte die Phagozytoserate nicht. In der Literatur wurde eine erhöhte Komplement-Aktivierung der Isobutylcyanoacrylat-Nanopartikel nach der Beschichtung mit Dx beobachtet [196]. Wahrscheinlich war die Oponisierung der mit Dx modifizierten Partikel durch eine erhöhte Komplement-Aktivierung verstärkt und führte somit zu einer erhöhten Phagozytose.

4.1.5.2 Partikelaggregation / Thrombozytenaktivierung

Die Partikel wurden vor der Inkubation mit Ultraschall behandelt, um vorhandene Aggregate zu beseitigen. Anschließend wurden die Partikel in PRP bei 37 °C für 30 min unter sanftem Schaukeln inkubiert. Nach der Inkubation der nicht modifizierten Hb-MP in PRP entstanden Aggregate größer als 10 µm. Diese Aggregate bestanden aus Hb-MP und Thrombozyten. Je höher die GA-Konzentration bei der Vernetzung war, desto stärker aggregierten die Partikel mit den Thrombozyten in PRP. Die Hb-HSA-Mischpartikel aggregierten ebenfalls mit den Thrombozyten in PRP. Die nicht modifizierten Hb-MP und Hb-HSA-MP waren nicht genug elektrostatisch und sterisch stabilisiert. Die Hb-MP stellen für die Thrombozyten Fremdoberflächen dar. Wahrscheinlich führt der Kontakt der Thrombozyten mit den Hb-MP zur Aktivierung der Thrombozyten und ihrer Aggregation. Bei der Aggregation könnten sich Fibrinnetze bilden, in denen die MP gefangen werden.

Die PEGylierung der Hb-MP konnte die Aggregation reduzieren. mPEG bildet eine dicke Hydratschicht auf der Partikeloberfläche und kann mögliche Interaktionen zwischen Partikeln und Plasmaproteinen reduzieren. Es ist bekannt, dass PEG die Biokompatibilität der Partikel erhöht und die Komplement-Aktivierung reduzieren oder verhindern kann [144,148,149,197,198].

Bei Hb-HA-MP wurde keine Aggregation im PRP beobachtet. HA hat ein starkes Wasserbindungsvermögen, wodurch eine dicke Hydrathülle um die Partikel aufgebaut wird und mögliche Interaktionen zwischen Partikel und Thrombozyten oder Plasmaproteinen so verhindert werden können.

Die Modifikation mit Dx verstärkte jedoch die Aggregation in PRP. Die verstärkte Komplement-Aktivierung durch Dx [196] könnte dafür verantwortlich sein. Aktivierte Komplementkomponenten wie Antigen-Antikörper-Komplexe können eine Thrombozytenaggregation hervorrufen [199]. Die bei Modifikation mit Dx induzierte vermehrte Aggregation der MP konnte durch die zusätzliche Beschichtung mit HSA bzw. mit mPEG-NH₂ reduziert werden. Die Partikeloberfläche wurde durch HSA bzw. mPEG-NH₂ bedeckt, so dass sowohl die Bindung von C1 als auch IgG oder IgM erschwert oder völlig verhindert werden kann.

4.1.6 Sauerstoffbindung und Sauerstoffabgabe

Die Hb-MP sind auch nach der Modifikation in der Lage den Sauerstoff zu binden und abzugeben. Im Vergleich zu freiem Hb, war die ODC von allen Hb-Partikeln nach links verschoben. Der $p50$ der Partikel (< 9 mmHg) war deutlich niedriger als der $p50$ des Hb (ca. 26,5 mmHg). Demnach hatten die Hb-MP eine höhere Sauerstoffaffinität als freies Hb.

Wenn das Hb mit GA vernetzt wird, sinkt der $p50$ des polymerisierten Hb mit steigender GA-Konzentration. Wird die Polymerisation des freien Hb mit GA im molaren Verhältnis GA zu Hb von z. B. 40 : 1 durchgeführt, ergibt sich schwach polymerisiertes Hb mit einem Molekulargewicht von 640 - 980 kDa (10 - 15 Hb-Tetramere) und einen $p50$ von 13 mmHg (17 hPa) [171]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein höheres molares Verhältnis GA zu Hb $> 60 : 1$ verwendet. Im Gegensatz zur Polymerisation des freien Hb wird das Hb bei der Copräzipitation zu größeren Mikropartikeln polymerisiert. Das Hb war so stark fixiert, dass die R-Konformation vermutlich nicht mehr so schnell in die T-Konformation übergeht. Daher hatten die Hb-MP einen niedrigen $p50$. Durch „Zero-Link Polymerisation“ hergestelltes OxyVita™ ist ca. 36 nm groß mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 17 Megadalton. Es hat ebenfalls eine sehr hohe Sauerstoffaffinität mit einem $p50$ von 6 mmHg (8 hPa) [88].

Wenn die Partikel unter normalem Luftsauerstoffpartialdruck vernetzt wurden, hatten die Hb-MP einen sehr niedrigen p_{50} von weniger als 2 mmHg (2,7 hPa); niedriger als der p_{50} der Partikel, die unter sauerstoffarmen Bedingungen vernetzt waren. Unter normalem Luftsauerstoffpartialdruck ist Hb mit Sauerstoff gesättigt und es liegt die R-Konformation vor. Wenn das Hb unter dieser Bedingung vernetzt wird, wird das Hb in R-Konformation „eingefroren“. Nach der Vernetzung kann das polymerisierte Hb den Sauerstoff nur erschwert abgeben [75,200]. Daher hatten die unter normalem Luftsauerstoffpartialdruck vernetzten Hb-MP eine extrem hohe Sauerstoffaffinität.

Nach der Modifikation oder als Mischpartikel war die Sauerstoffaffinität der Partikel höher als die der nicht modifizierten Hb-MP. Die kovalente Bindung von mPEG oder Dx an die Partikeloberfläche stellte eine zusätzliche Barriere für die O₂-Freisetzung dar, was die Abgabe von Sauerstoff zusätzlich erschwert und den p_{50} erniedrigt. Hemospan® (MP4) von Sangart Inc. ist ein Produkt aus mit Maleinimid-Polyethylenglykol konjugiertem Human-Hämoglobin, wobei jedes Hämoglobintetramer mit sechs PEG-Ketten modifiziert ist. Hemospan® hat eine sehr hohe Sauerstoffaffinität mit einem niedrigen p_{50} von 4 - 6 mmHg (5,3-8 hPa) [90]. Bei den Hb-HA-MP behindert die Hydrathülle die Sauerstoffabgabe, so dass es auch bei diesen Partikeln zu einer starken Linksverschiebung der Sauerstoffdissoziationskurve kommt.

Ein niedriger p_{50} (hohe Sauerstoffaffinität) ist notwendig für die neue Generation von HBOCs, da der HBOC mit hohem p_{50} den Sauerstoff frühzeitig in der präkapillaren Arteriole freisetzt und diese mit Sauerstoff überversorgt. Diese Überversorgung des Sauerstoffs in Arteriolen kann dann eine arterioläre Vasokonstriktion auslösen [115,118]. Winslow hatte vorgeschlagen, dass die neue Generation der HBOCs einen p_{50} von 5 - 10 mmHg (6,6 - 13 hPa) haben sollten [115]. Die nicht modifizierten Hb-MP und die PEGylierten Hb-MP erfüllten diese Kriterien (p_{50} jeweils 7 mmHg und 5,3 mmHg).

Aufgrund der Größe im Mikrometer-Bereich und der hohen Sauerstoffaffinität ist daher zu vermuten, dass die Partikel nicht in den interstitiellen Raum gelangen und damit ein begrenztes NO-Scavenging haben würden, und dass sie den Sauerstoff nicht vorzeitig in den präkapillaren Arteriolen freigeben würden. Demzufolge würden die Partikel keine Vasokonstriktion auslösen.

Diskussion

Aufgrund des niedrigen p_{50} der Hb-Partikel könnten die Partikel den Sauerstoff gezielt an Gewebe mit sehr niedrigem Sauerstoffgehalt liefern, z. B. bei starker Hypoxie oder Tumorthherapie.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Sphärische, funktionsfähige Hämoglobin-Mikropartikel (Hb-MP) wurden erfolgreich mittels einer neuen einfachen, effizienten und kosteneffektiven drei-Schritt-Methode hergestellt: Copräzipitation von Hb mit CaCO_3 zu Hb- CaCO_3 -MP, Vernetzung des Hb und Auflösung des CaCO_3 zu Hb-MP. Die Hb-Einkapselungseffizienzen der MP variierten zwischen 8 und 50 % abhängig von der Ausgangskonzentration der CaCl_2 -, Na_2CO_3 - und Hb-Lösungen. Die Hb-Beladung kann mindestens ein Drittel der Hb-Konzentration in Erythrozyten erreichen.

Der MetHb-Gehalt war nach der Herstellung stark erhöht, konnte aber mittels Ascorbinsäure in einen akzeptablen Bereich reduziert werden.

Die unmodifizierten Partikel waren durchschnittlich $3,2 \mu\text{m}$ groß; ein nicht modifizierter Partikel enthielt durchschnittlich $2,2 \text{ pg Hb}$ (ca. $2 \cdot 10^7$ Hb-Tetramere). Die Partikel waren aufgrund der GA-Vernetzung autofluoreszierend. Die nicht modifizierten Hb-MP hatten ein negatives Zetapotential. Nach der Herstellung waren durchschnittlich 7 - 20 % der Partikel in Abhängigkeit von der bei der Vernetzung eingesetzten GA-Konzentration aggregiert ($> 10 \mu\text{m}$). Mittels Ultraschall-Behandlung konnten die Aggregate stark reduziert oder beseitigt werden. Die Partikel wurden nach der Inkubation mit Vollblut oder plättchenreichem Plasma *in vitro* analysiert. Je niedriger die eingesetzte GA-Konzentration bei der Vernetzung war, desto weniger wurden die Partikel phagozytiert, und desto schwächer aggregierten die Partikel in plättchenreichem Plasma. Das Quenchen mit Glycin und die Reduktion mit NaBH_4 brachten ebenfalls viele Vorteile. Die Partikel wurden weniger phagozytiert und aggregierten weniger in plättchenreichem Plasma. Die Hb-MP hatten eine starke Sauerstoffaffinität (also einen niedrigen $p50$). Wird das Hb mit 0,01 % GA unter normalem Luftsauerstoffpartialdruck vernetzt, mit Glycin gequencht und mit NaBH_4 reduziert, so haben die Hb-MP einen $p50$ von weniger als 2 mmHg. Der $p50$ betrug 7,0 mmHg, wenn die Partikel unter sauerstoffarmen Bedingungen vernetzt wurden.

Die PEGylierung der Partikel konnte zwar die Aggregation der MP nach der Herstellung nicht reduzieren, die immunologischen Eigenschaften der Partikel wurden jedoch positiv beeinflusst. Die PEGylierten Partikel aggregierten kaum in plättchenreichem Plasma. Die Partikel hatten ein reduziertes Zetapotential und eine erhöhte Sauerstoffaffinität mit einem $p50$ von 5,3 mmHg.

Hb-Mischpartikel mit HA, HSA oder modifiziert mit Dx wiesen eine reduzierte Aggregation der Partikel nach der Herstellung auf. Im Vergleich zu Hb-MP ohne Modifikation, wurde das Zetapotential der Partikel moderat (bei Hb-HSA-MP) oder stark (bei Hb-HA-MP oder Hb-Dx-MP) erhöht. Eine leicht erhöhte Phagozytose der Hb-HSA-MP und eine stark erhöhte Phagozytose bei Hb-HA-MP oder Hb-Dx-MP waren die Folge. Die modifizierte Copräzipitation mit HSA oder die Modifikation mit Dx konnten die Aggregation der Partikel in plättchenreichem Plasma nicht reduzieren. Es wurde jedoch keine Aggregation nach der Inkubation der Hb-HA-MP mit plättchenreichem Plasma beobachtet. Nach der Einführung von HA, HSA und der Modifikation mit Dx wurde die Sauerstoffaffinität noch einmal erhöht; die $p50$ von diesen Partikeln waren kleiner als 4 mmHg.

Aufgrund der Größe im Mikrometer-Bereich und der hohen Sauerstoffaffinität ist zu vermuten, dass die Partikel nicht in den interstitiellen Raum gelangen und damit ein begrenztes NO-Scavenging haben, und dass sie den Sauerstoff nicht vorzeitig in den präkapillaren Arteriolen freigeben. Somit würden die Partikel keine Vasokonstriktion auslösen. Der niedrige $p50$ der Hb-MP würde den Einsatz der Partikel bei starker Hypoxie oder in der Tumorthherapie erlauben.

5.2 Ausblick

Die untersuchten Hb-MP stellen eine sehr gute Grundlage für weitere Experimente dar. Dabei können verschiedene sowohl physiko-chemische als auch biologische Fragen bearbeitet werden. Dazu gehören Oberflächenmodifikationen, Partikelwechselwirkungen und die Morphologie der Partikel. Besonders interessant ist auch der Aspekt der Freisetzung der in den Partikeln immobilisierten Moleküle. Dadurch könnte ein weiterer Schritt in Richtung eines kompletteren Blutersatzes gegangen werden.

5.3 Summary

Spherical functioning hemoglobin microparticles (Hb-MPs) were successfully produced by a new simple, efficient and cost-effective 3-step method: co-precipitation of Hb with CaCO_3 to form Hb- CaCO_3 microparticles, cross-linking of Hb and dissolution of CaCO_3 template to obtain pure Hb-MPs. The Hb encapsulation efficiencies ranged from 8 to 50 % of the initial amount of Hb depending on the concentration of CaCl_2 , Na_2CO_3 or Hb solution used. The Hb-loading of the CaCO_3 -MPs was at least one third of the Hb content of the RBCs.

The methemoglobin content was significantly increased after preparation, but could be reduced to an acceptable range after a post-reduction of the Hb-MPs with ascorbic acid at pH 7.4.

The unmodified particles had an average diameter of about 3.2 μm ; one unmodified particle contained 2.2 pg Hb (approximately $2 \cdot 10^7$ Hb tetramers). The particles were auto-fluorescent due to the glutaraldehyde (GA) cross-linking. The unmodified Hb-MPs had a negative zeta potential. Depending on the GA concentration used for cross-linking, 7 - 20 % of the particles were aggregated ($> 10 \mu\text{m}$). The amount of aggregates could be reduced greatly or eliminated by sonication. The particles were analyzed after incubation with whole blood or platelet rich plasma *in vitro*. The lower the concentration of GA during cross-linking, the less particles were phagocytized, and the weaker the particles aggregated in the platelet rich plasma. Quenching with glycine and the reduction with NaBH_4 also brought benefits. The particles were less phagocytized and less aggregated in platelet rich plasma. The Hb-MPs had a high oxygen affinity (low $p50$). In the case where 0.01 % GA cross-linked Hb-MPs, which were also quenched with glycine and reduced with sodium borohydride, the $p50$ was less than 2 mmHg, if the particles were cross-linked under normal atmospheric oxygen partial pressure. The $p50$ was 7.0 mmHg, if the particles were cross-linked under low-oxygen condition.

PEGylation of the particles could not reduce the aggregation after preparation. However, it positively affected the immunological properties of the particles. After sonication, the

PEGylated particles hardly aggregated in platelet rich plasma. The particles had a reduced zeta potential and increased oxygen affinity with a $p50$ of 5.3 mmHg.

The preparation of Hb mixture-particles with hyaluronan (HA) or human serum albumin (HSA) or modification with dextran (Dx) reduced the aggregation of the particles after preparation. Compared to unmodified Hb-MPs, the zeta potential of particles was moderately (by Hb-HSA-MPs) or strongly (by Hb-HA-MPs and Hb-Dx-MPs) increased. A slightly increased phagocytosis of particles which were co-precipitated with HSA and significantly increased phagocytosis of particles which were co-precipitated with HA or modified with Dx were observed. The preparation of mixture-particles of Hb and HSA or modification with Dx could not reduce the aggregation of the particles in platelet rich plasma. After incubation of the Hb-HA-MPs with platelet rich plasma, no aggregation was observed. After modification with HA, HSA or Dx, the oxygen affinity was increased again; the $p50$ s from these particles were smaller than 4 mmHg.

Due to their size in the micron range and their high oxygen affinity, it is to expect that our particles would not access to vascular space and thus would have a limited scavenging of the vasodilating agent nitric oxide (NO), and they would not release O_2 prematurely in the precapillary arterioles. Therefore, the particles would not cause vasoconstriction.

The low $p50$ of the Hb-MPs would allow their use as targeted oxygen delivery system to hypoxic tissues which are observed in case of severe hypoxia and tumors.

5.4 Perspectives

The characterized Hb-MPs represent a very good basis for further developments. Various physicochemical as well as biological questions can be answered. These include surface modifications, particles interactions and the morphology of the particles. The aspect of the release of immobilized molecules from the particles is enormously interesting. This could be another step towards a more complete blood substitute.

Abkürzungen

2,3-BPG	2,3-Bisphosphoglycerat
cc-mPEG 5.000	Methoxypolyethylenglykol 5.000, aktiviert mit Cyanurchlorid
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaCO ₃	Calciumcarbonat
CAT	Katalase
CLSM	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie
ctHb	gesamte Hb-Konzentration
DBBF	Bis-3,5-dibromosalicylfumarat
DeoxyHb	desoxygeniertes Hb
DVS	Divinylsulfon
Dx	Dextran
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Einkapselungseffizienz
EK	Erythrozytenkonzentrate
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FITC-BSA	Fluoresceinisothiocyanat konjugiertes Rinder-Albumin
GA	Glutaraldehyd
GCs	Granulozyten
HA	Natriumhyaluronat/Hyaluronan
Hb	Rinder-Hämoglobin
Hb-CaCO ₃ -MP	Hb-CaCO ₃ -Mikropartikel
Hb-Dx-HSA-MP	mit Dx und HSA modifizierte Hb-MP
Hb-Dx-MP	mit Dx modifizierte Hb-MP
Hb-Dx-mPEG-MP	mit Dx und mPEG-NH ₂ modifizierte Hb-MP
Hb-HA-MP	Hb-HA-Mischpartikel

Abkürzungen

Hb-HA10-MP	Hb-HA-MP, bei denen das Gewichtsverhältnis zwischen Hb und HA bei der Copräzipitation 10:1 betrug
Hb-HA20-MP	Hb-HA-MP, bei denen das Gewichtsverhältnis Zwischen Hb und HA bei der Copräzipitation 20:1 betrug
Hb-HSA-MP	Hb-HSA-Mischpartikel
Hb-HSA10-MP	Hb-HSA-MP, bei denen das Gewichtsverhältnis zwischen Hb und HA bei der Copräzipitation 10:1 betrug
Hb-HSA5-MP	Hb-HSA-MP, bei denen das Gewichtsverhältnis zwischen Hb und HA bei der Copräzipitation 5:1 betrug
Hb-MP	Hämoglobin-Mikropartikel
Hb-MP-GA0,01%	mit 0,01 % GA vernetzte Hb-MP
Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH ₄	mit 0,01 % GA vernetzte, mit Glycin gequenchte und mit NaBH ₄ reduzierte Hb-MP
Hb-MP-GA0,1%	mit 0,1 % GA vernetzte Hb-MP
Hb-MP-GA1%	mit 1,0 % GA vernetzte Hb-MP
Hb-MP-mPEG	Hb-MP-GA0,01%-Gly-BH ₄ nach der PEGylierung
HBOC	Hämoglobin-basierte Sauerstoffträger
HBV	Hepatitis-B-Virus
HbV	Hämoglobin-Versikel
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis-C-Virus
HiCN	Cyanmethämoglobin
HIV	Humaner Immundefizienz-Virus
HSA	Humanalbumin
K ₃ Fe(CN) ₆	Kaliumhexacyanoferrat (III)
KCN	Kaliumcyanid
kDa	Kilodalton
LDA	Laser Doppler Anemometrie
LEH	liposomenverkapseltes Hämoglobin
MCs	Monozyten

Abkürzungen

MetHb	Methämoglobin
MP	Mikropartikel
mPEG-NH ₂	Methoxypolyethylenglykolamin 5.000
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₂ S ₂ O ₄	Natriumdithionit
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NO	Stickstoffmonoxid
ODC	Sauerstoffbindungskurve
OxyHb	oxygeniertes Hb
PBS	phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglykol
PFC	Perfluorcarbon
PI	Propidiumiodid
PLA	Poly lactide
<i>p</i> O ₂	Sauerstoffpartialdruck
RBCs	Erythrozyten
RT	Raumtemperatur
SCl	Succinylchlorid
SEM	Rasterelektronenmikroskopie
SFH	stromafreies Hämoglobin
<i>s</i> O ₂	Sauerstoffsättigung
SOD	Superoxiddismutase
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewicht/ Gewicht

Literaturverzeichnis

- [1] J. W. Von Goethe, *Faust. Der Tragödie erster Teil* **1808**.
- [2] E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, P. Ruth, M. Schäfer-Korting, *Mutschler Arzneimittelwirkungen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MbH Stuttgart, **2008**.
- [3] K. Landsteiner, *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten* **1900**, 27, 357-362.
- [4] J. E. Squires, *Science* **2002**, 295, 1002-1005.
- [5] J. G. Riess, *Chemical Reviews* **2001**, 101, 2797-2920.
- [6] T. F. Zuck, T. A. Bensinger, C. C. Peck, R. K. Chillar, E. Beutler, L. N. Button, P. R. McCurdy, A. M. Josephson, T. J. Greenwalt, *Transfusion* **1977**, 17, 374-382.
- [7] World-Health-Organization, *Blood Safety: Key Global Fact and Figures in 2011*, **2011**.
- [8] O. Henseler, M. Heiden, B. Haschberger, J. Hesse, R. Seitz, *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* **2010**, 53, 1089-1103.
- [9] Bundesärztekammer, *Querschnitts-Leitlinien (BÄK) Zur Therapie Mit Blutkomponenten Und Plasmaderivaten 4. Auflage 2008*, **2008**.
- [10] L. T. Goodnough, M. E. Brecher, M. H. Kanter, J. P. AuBuchon, *The New England Journal of Medicine* **1999**, 340, 438-447.
- [11] M. Fopp, M. Wernli, *Swiss Medical Forum* **2006**, 6, 139-144.
- [12] M. Funk, C. Volz-Zang, *Hämovigilanz-Bericht Des Paul-Ehrlich-Instituts 2009*, **2011**.
- [13] D. M. Dwyre, L. P. Fernando, P. V. Holland, *Vox sanguinis* **2011**, 100, 92-98.
- [14] AABB, *Circular of Information for the Use of Human Blood and Blood Components.*, **2009**.
- [15] T. M. S. Chang, *Artificial Cells*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., **2007**.
- [16] DRK-Generalsekretariat, *Anmerkungen Der Blutspendedienste Des Deutschen Roten Kreuzes Zur Sendung Frontal 21, ZDF 18.11. 2008*, **2008**.
- [17] B. von Bormann, *Der Anaesthesist* **2007**, 56, 380-384.

- [18] K.-peter Krause, in *Sind Blutprodukte Eine Ware? - Der Markt Der Blutprodukte in Deutschland*, **2010**.
- [19] A. Hofmann, S. Farmer, A. Shander, *ISBT Science Series* **2009**, 4, 258-265.
- [20] A. Shander, A. Hofmann, H. Gombotz, O. M. Theusinger, D. R. Spahn, *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* **2007**, 21, 271-289.
- [21] M. Goh, C. G. Klee, P. Kielczewski, K. J. Wojno, K. Kim, J. E. Oesterling, *Urology* **1997**, 49, 569-574.
- [22] Blutspende-Zürich, "Preisliste Blutspende Zürich," can be found under http://www.zhbsd.ch/Media/File/Preisliste_Version_2_2012_mAGB.pdf, **2012**.
- [23] I. Abraham, D. Sun, *Transfusion* **2012**, 1-6.
- [24] A. Shander, A. Hofmann, S. Ozawa, O. M. Theusinger, H. Gombotz, D. R. Spahn, *Transfusion* **2010**, 50, 753-765.
- [25] U. Kaisers, K. P. Kelly, T. Busch, *British Journal of Anaesthesia* **2003**, 91, 143-151.
- [26] T. Frietsch, C. Lenz, K. F. Waschke, *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **2000**, 125, 465-472.
- [27] M. Schäfer, T. Frietsch, C. Jambor, R. Knels, *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **2010**, 135, 575-581.
- [28] C. I. Castro, J. C. Briceno, *Artificial organs* **2010**, 34, 622-634.
- [29] L. C. Clark, F. Gollan, *Science* **1966**, 152, 1755-1756.
- [30] J. G. Riess, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* **2006**, 34, 567-580.
- [31] S. I. Vorob'ev, *Pharmaceutical Chemistry Journal* **2009**, 43, 209-218.
- [32] S. E. Hill, H. P. Grocott, B. J. Leone, W. D. White, M. F. Newman, *The Annals of thoracic surgery* **2005**, 80, 1401-1407.
- [33] P. E. Keipert, in *Blood Substitutes* (Ed.: R.M. Winslow), Elsevier, **2006**, pp. 312-323.
- [34] J. G. Riess, M. P. Krafft, in *Blood Substitutes* (Ed.: R.M. Winslow), Elsevier, **2006**, pp. 259-275.
- [35] R. F. Shaw, T. J. Richard, in *Blood Substitutes* (Ed.: R.M. Winslow), Elsevier, **2006**, pp. 298-311.
- [36] P. E. Petrides, in *Biochemie Und Pathobiochemie* (Eds.: G. Löffler, P.E. Petrides, P.C. Heinrich), Springer-verlag, **2007**, pp. 952-1000.

- [37] M. F. Perutz, M. G. Rossmann, A. F. Cullis, H. Muirhead, G. Will, A. C. T. North, *Nature* **1960**, *185*, 416-422.
- [38] H. R. Kalbitzer, P. E. Petrides, in *Biochemie Und Pathobiochemie* (Eds.: G. Löffler, P.E. Petrides, P.C. Heinrich), Springer-verlag, **2007**, pp. 56-98.
- [39] C. Bohr, K. A. Hasselbalch, A. Krogh, *Scand. Archiv Physiol* **1904**, *16*, 402-412.
- [40] M. F. Perutz, G. Fermi, C. Poyart, J. Pagnier, J. Kister, *Journal of molecular biology* **1993**, *233*, 536-545.
- [41] M. F. Perutz, *Nature* **1970**, *228*, 726 - 734.
- [42] J. Monod, J. Wyman, J. P. Changeux, *Journal of molecular biology* **1965**, *12*, 88-118.
- [43] A. Bellelli, M. Brunori, in *Blood Substitutes* (Ed.: R.M. Winslow), Elsevier, **2006**, pp. 327-340.
- [44] G. Von Starck, *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **1898**, *24*, 805-808.
- [45] A. W. Sellards, G. R. Minot, *The Journal of medical research* **1916**, *34*, 469-494.
- [46] W. R. Amberson, J. J. Jennings, C. M. Rhode, *J Appl Physiol* **1949**, *1*, 469-489.
- [47] J. H. MILLER, R. K. McDONALD, *The Journal of clinical investigation* **1951**, *30*, 1033-1040.
- [48] S. F. Rabiner, J. R. Helbert, H. Lopas, L. H. Friedman, *The Journal of Experimental Medicine* **1967**, *126*, 1127-1142.
- [49] H. F. Bunn, W. T. Esham, R. W. Bull, *The Journal of experimental medicine* **1969**, *129*, 909-923.
- [50] J. R. Hess, R. F. Reiss, *Transfusion Medicine Reviews* **1996**, *10*, 276-285.
- [51] A. D. Baines, in *Blood Substitutes* (Ed.: R.M. Winslow), Elsevier, **2006**, pp. 217-226.
- [52] S. M. Sadrzadeh, D. K. Anderson, S. S. Panter, P. E. Hallaway, J. W. Eaton, *The Journal of clinical investigation* **1987**, *79*, 662-664.
- [53] R. F. Regan, S. S. Panter, *Neuroscience Letters* **1993**, *153*, 219-222.
- [54] S. S. Panter, B. L. Ellington, R. F. Regan, in *Blood Substitutes* (Ed.: R.M. Winslow), Elsevier, **2006**, pp. 227-234.
- [55] J. Everse, N. Hsia, *Free radical biology & medicine* **1997**, *22*, 1075-1099.

- [56] H. W. Kim, A. G. Greenburg, *The Journal of laboratory and clinical medicine* **2000**, 135, 180-187.
- [57] T. J. Reid, *Transfusion* **2003**, 43, 280-287.
- [58] W. Martin, G. M. Villani, D. Jothianandan, R. F. Furchgott, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **1985**, 232, 708-716.
- [59] B. Vollrath, B. K. Weir, D. A. Cook, *Biochemical and biophysical research communications* **1990**, 171, 506-511.
- [60] R. L. Macdonald, B. K. Weir, *Stroke* **1991**, 22, 971-982.
- [61] L. Sunder-Plassmann, R. Dieterle, J. Seifert, F. Jesch, K. Meßmer, *European Journal of Intensive Care Medicine* **1975**, 1, 37-42.
- [62] A. G. Greenburg, M. Schooley, K. A. Ginsburg, G. W. Peskin, *Surgical forum* **1978**, 29, 44-6.
- [63] L. R. Sehgal, A. L. Rosen, G. Noud, H. L. Sehgal, S. A. Gould, R. DeWoskin, C. L. Rice, G. S. Moss, *The Journal of surgical research* **1981**, 30, 14-20.
- [64] J. A. Walder, R. H. Zaugg, R. Y. Walder, J. M. Steele, I. M. Klotz, *Biochemistry* **1979**, 18, 4265-4270.
- [65] R. H. Zaugg, J. A. Walder, R. Y. Walder, J. M. Steele, I. M. Klotz, *The Journal of biological chemistry* **1980**, 255, 2816-2821.
- [66] W. K. Bleeker, J. van der Plas, R. I. Feitsma, J. Agterberg, G. Rigter, A. de Vries-van Rossen, E. K. Pauwels, J. C. Bakker, *The Journal of laboratory and clinical medicine* **1989**, 113, 151-61.
- [67] R. Chatterjee, E. V. Welty, R. Y. Walder, S. L. Pruitt, P. H. Rogers, A. Arnone, J. A. Walder, *The Journal of biological chemistry* **1986**, 261, 9929-9937.
- [68] F. A. Highsmith, C. M. Driscoll, B. C. Chung, M. D. Chavez, V. W. Macdonald, J. M. Manning, L. E. Lippert, R. L. Berger, J. R. Hess, *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* **1997**, 25, 257-68.
- [69] J.-Y. Chen, M. Scerbo, G. Kramer, *Clinics (São Paulo)* **2009**, 64, 803-813.
- [70] D. J. Nelson, in *Blood Substitutes* (Ed.: R.M. Winslow), Elsevier, **2006**, pp. 399-414.
- [71] R. J. Przybelski, in *Blood Substitutes* (Ed.: R.M. Winslow), Elsevier, **2006**, pp. 415-423.
- [72] E. P. Sloan, M. Koenigsberg, D. Gens, M. Cipolle, J. Runge, M. N. Mallory, G. Rodman, *JAMA : the journal of the American Medical Association* **1999**, 282, 1857-1864.

- [73] R. M. Winslow, in *Blood Substitutes* (Ed.: R.M. Winslow), Elsevier, **2006**, pp. 341-353.
- [74] J. C. Bakker, G. A. Berbers, W. K. Bleeker, P. J. den Boer, P. T. Biessels, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology* **1992**, *20*, 233-241.
- [75] N. Zhang, Y. Jia, G. Chen, P. Cabrales, A. F. Palmer, *Tissue Engineering Part A* **2011**, *17*, 927–940.
- [76] J. H. Levy, L. T. Goodnough, P. E. Greilich, G. V. S. Parr, R. W. Stewart, I. Gratz, J. Wahr, J. Williams, M. E. Comunale, D. Doblar, G. Silvay, M. Cohen, J. S. Jahr, G. J. Vlahakes, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **2002**, *124*, 35-42.
- [77] W. Lieberthal, R. Fuhro, J. E. Freedman, G. Toolan, J. Loscalzo, C. R. Valeri, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *288*, 1278-1287.
- [78] S. A. Gould, E. E. Moore, D. B. Hoyt, J. M. Burch, J. B. Haenel, J. Garcia, R. DeWoskin, G. S. Moss, *Journal of the American College of Surgeons* **1998**, *187*, 113-120.
- [79] J. Sprung, J. D. Kindscher, J. A. Wahr, J. H. Levy, T. G. Monk, M. W. Moritz, P. J. O'Hara, *Anesthesia and analgesia* **2002**, *94*, 799-808.
- [80] E. E. Moore, F. A. Moore, T. C. Fabian, A. C. Bernard, G. J. Fulda, D. B. Hoyt, T. M. Duane, L. J. Weireter, G. A. Gomez, M. D. Cipolle, G. H. Rodman, M. A. Malangoni, G. A. Hides, L. A. Omert, S. A. Gould, *Journal of the American College of Surgeons* **2009**, *208*, 1-13.
- [81] C. Weinstock, S. Dinkelmann, H. Northoff, in *Transfusionsmedizin Und Immunhämatologie* (Ed.: V. Kiefel), Springer, **2011**, pp. 499-507.
- [82] F. D'Agnillo, T. M. S. Chang, *Nature Biotechnology* **1998**, *16*, 667–671.
- [83] T. M. S. Chang, in *Blood Substitutes* (Ed.: R.M. Winslow), Elsevier, **2006**, pp. 451-459.
- [84] E. A. Quebec, T. M. S. Chang, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology* **1995**, *23*, 693-705.
- [85] T. M. S. Chang, F. D'Agnillo, W. P. Yu, S. Razack, *Advanced drug delivery reviews* **2000**, *40*, 213-218.
- [86] A. Razynska, E. Bucci, in *Blood Substitutes, Present and Future Perspectives* (Ed.: E. Tsuchida), Elsevier, **1998**, pp. 265–279.
- [87] B. Matheson, H. E. Kwansa, E. Bucci, A. Rebel, R. C. Koehler, *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **2002**, *93*, 1479-86.
- [88] J. P. Harrington, J. Wollocko, E. Kostecki, H. Wollocko, *Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology* **2011**, *39*, 12-18.

- [89] J. P. Harrington, H. Wollocko, *Journal of artificial organs* **2010**, *13*, 183-188.
- [90] R. M. Winslow, K. W. Chapman, K. D. Vandegriff, M. Young, in *Blood Substitutes* (Ed.: R.M. Winslow), Elsevier, **2006**, pp. 470-482.
- [91] “Sangart » Research » Clinical Trials,” can be found under <http://www.sangart.com/research/trials.htm>, **n.d.**
- [92] W. K. R. Barnikol, H. Pätzschke, *Anesthesiologie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie* **2005**, *40*, 46-58.
- [93] T. M. S. Chang, *Science* **1964**, *146*, 524-525.
- [94] V. D. Awasthi, E. A. Goins, W. T. Phillips, in *Blood Substitutes* (Ed.: R.M. Winslow), Elsevier, **2006**, pp. 501-513.
- [95] H. Sakai, K. Sou, S. Takeoka, K. Kobayashi, E. Tsuchida, in *Blood Substitutes* (Ed.: R.M. Winslow), Elsevier, **2006**, pp. 514-522.
- [96] H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, *Artificial organs* **2009**, *33*, 139-145.
- [97] H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, *Journal of internal medicine* **2008**, *263*, 4-15.
- [98] B. Neu, A. Voigt, R. Mitlöhner, S. Leporatti, C. Y. Gao, E. Donath, H. Kiesewetter, H. Mähwald, H. J. Meiselman, H. Bäumler, *Journal of microencapsulation* **n.d.**, *18*, 385-395.
- [99] S. Schäling, Polyelektrolytmikrokapseln Als Potenzielle Künstliche Rote Blutzellen Unter Besonderer Berücksichtigung Ihrer Eigenschaften Als Sauerstofftransporter, **2005**.
- [100] *Schlussbericht Zum Forschungsvorhaben Im BMBF-Programm: Künstliche Rote Blutzellen Als Deformierbare Mikrokapseln Mit Definierter Permeabilität Und Sauerstofftransportfunktion; Teilprojekt 1*, **2006**.
- [101] H. Bäumler, C. Kelemen, R. Mitlöhner, R. Georgieva, A. Krabi, S. Schäling, G. Artmann, H. Kiesewetter, in *Artificial Oxygen Carrier, Its Front Line, Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine* (Eds.: K. Kobayashi, E. Tsuchida, H. Horinouchi), Springer-verlag, Tokyo, **2005**, pp. 205-216.
- [102] R. Georgieva, S. Moya, E. Donath, H. Bäumler, *Langmuir* **2004**, *20*, 1895-1900.
- [103] W. P. Yu, T. M. S. Chang, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology* **1994**, *22*, 889-893.
- [104] W. P. Yu, T. M. S. Chang, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology* **1996**, *24*, 169-183.

- [105] T. M. S. Chang, in *Blood Substitutes* (Ed.: R.M. Winslow), Elsevier, **2006**, pp. 523-531.
- [106] T. M. S. Chang, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2010**, 2, 418-430.
- [107] R. M. Winslow, *Seminars in hematology* **2007**, 44, 51-59.
- [108] P. W. Buehler, A. I. Alayash, *Transfusion* **2004**, 44, 1516-1530.
- [109] T. M. S. Chang, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* **2006**, 34, 551-566.
- [110] S. A. Gould, G. S. Moss, *World Journal of Surgery* **1996**, 20, 1200-1207.
- [111] A. I. Alayash, *Nature biotechnology* **1999**, 17, 545-549.
- [112] P. Cabrales, G. Sun, Y. Zhou, D. R. Harris, A. G. Tsai, M. Intaglietta, A. F. Palmer, *Journal of applied physiology* **2009**, 107, 1548-1558.
- [113] H. Sakai, H. Hara, M. Yuasa, A. G. Tsai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Intaglietta, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **2000**, 279, H908-H915.
- [114] R. M. Winslow, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, 40, 131-142.
- [115] R. M. Winslow, *Journal of internal medicine* **2003**, 253, 508-517.
- [116] J. . T. Coin, J. S. Olson, *The Journal of biological chemistry* **1979**, 254, 1178-1190.
- [117] K. D. Vandegriff, J. S. Olson, *Biophysical journal* **1984**, 45, 825-835.
- [118] A. G. Tsai, K. D. Vandegriff, M. Intaglietta, R. M. Winslow, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **2003**, 285, H1411-H1419.
- [119] H. B äumler, R. Georgieva, *Micro-particles, Blood-substitute and Method for Forming Same*, **2007**, European Patent Application EP 2014280A1.
- [120] R. Linberg, C. D. Conover, K. L. Shum, R. G. Shorr, *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology* **1998**, 26, 133-148.
- [121] C. R. Haney, P. W. Buehler, A. Gulati, *Advanced drug delivery reviews* **2000**, 40, 153-169.
- [122] H. B äumler, R. Georgieva, *Biomacromolecules* **2010**, 11, 1480-1487.
- [123] W. G. Zijlstra, *Comparative Haematology International* **1997**, 7, 125-132.
- [124] A. SINGH, N. SHINTON, *Journal of clinical pathology* **1965**, 18, 353.

- [125] E. J. van Kampen, W. G. Zijlstra, *Advances in Clinical Chemistry* **1966**, 8, 141-187.
- [126] W. G. Zijlstra, A. Buursma, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **1997**, 118B, 743-749.
- [127] H. Schneemann, G. Wurm, *Hagers Handbuch Der Pharmazeutischen Praxis. Folgebd. 1. Waren Und Dienste*, Springer, **1995**.
- [128] S. Wilhelm, B. Gröber, M. Gluch, H. Heinz, *Carl Zeiss AG* **2000**.
- [129] Schärfe-System-GmbH-jetzt Roche-Innovatis-AG, *CASY® 1 Cell Counter + Analyser System Model TTC Bedienungsanleitung*, **1999**.
- [130] R. H. Müller, *Zetapotential Und Partikelladung in Der Laborpraxis*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MbH Stuttgart, **1996**.
- [131] Malvern-Instruments-Ltd., in *Zetasizer Nano Series Technical Note*, **2005**.
- [132] Malvern-Instruments-Ltd., in *Zetasizer Nano Series User Manual*, **2007**.
- [133] E. Donath, P. Kuzmin, A. Krabi, A. Voigt, *Colloid & Polymer Science* **1993**, 271, 930-939.
- [134] A. Budde, E. Knippel, G. Grümmer, J. Treichler, H. Brockmann, E. Donath, H. Bäumler, *Electrophoresis* **1996**, 17, 507-511.
- [135] E. Donath, A. Budde, E. Knippel, H. Bäumler, *Langmuir* **1996**, 12, 4832-4839.
- [136] E. Donath, D. Walther, V. N. Shilov, E. Knippel, A. Budde, K. Lowack, C. A. Helm, H. Mähwald, *Langmuir* **1997**, 13, 5294-5305.
- [137] Malvern-Instruments-Ltd., in *Zetasizer Nano Application Note*, **n.d.**
- [138] Glycotope-Biotechnology-GmbH, *Arbeitsanweisung Phagotest Version 03/09*, **2009**.
- [139] X. Zhang, C. Liu, Y. Yuan, X. Shan, Y. Sheng, F. Xu, *Journal of materials science. Materials in medicine* **2009**, 20, 1025-1030.
- [140] A. I. Alayash, A. G. Summers, F. Wood, Y. Jia, *Archives of biochemistry and biophysics* **2001**, 391, 225-234.
- [141] B. Giardina, G. Amiconi, *Methods in enzymology* **1981**, 76, 417-427.
- [142] J. Simoni, G. Simoni, M. Feola, *Analytica Chimica Acta* **1993**, 279, 73-88.
- [143] M. Feola, H. Gonzalez, P. C. Canizaro, D. Bingham, P. Periman, *Surgery gynecology obstetrics* **1983**, 157, 399-408.
- [144] U. Wattendorf, H. P. Merkle, *Journal of pharmaceutical sciences* **2008**, 97, 4655-4669.

- [145] A. Abuchowski, T. van Es, N. C. Palczuk, F. F. Davis, *The Journal of biological chemistry* **1977**, 252, 3578-3581.
- [146] R. Gref, M. Lück, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, R. . Müller, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2000**, 18, 301-313.
- [147] V. Torchilin, *Journal of microencapsulation* **1998**, 15, 1–19.
- [148] F. Madani, M. Bessodes, A. Lakrouf, C. Vauthier, D. Scherman, J.-C. Chaumeil, *Biomaterials* **2007**, 28, 1198-1208.
- [149] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, P. Simard, J. Leroux, J. Benoit, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2006**, 78, 620–628.
- [150] N. Dietz, M. Joyner, M. Warner, *Anesth. Analg.* **1996**, 82, 390-405.
- [151] P. M. Breepoel, F. Kreuzer, M. Hazevoet, *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **1981**, 389, 219-225.
- [152] C. Fronticelli, T. Sato, C. Orth, E. Bucci, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology* **1986**, 874, 76–81.
- [153] C. Fronticelli, E. Bucci, C. Orth, *The Journal of Biological Chemistry* **1984**, 259, 10841-10844.
- [154] H. F. Bunn, *Science* **1971**, 172, 1049-1050.
- [155] M. C. L évy, P. Rambourg, J. L évy, G. Potron, *Journal of pharmaceutical sciences* **1982**, 71, 759-762.
- [156] N. Cedrati, F. Bonneaux, P. Labrude, P. Maincent, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology* **1997**, 25, 457-462.
- [157] F. Meng, G. Ma, Y. Liu, W. Qiu, Z. Su, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* **2004**, 33, 177–183.
- [158] J. Zhao, C.-S. Liu, Y. Yuan, X.-Y. Tao, X.-Q. Shan, Y. Sheng, F. Wu, *Biomaterials* **2007**, 28, 1414-1422.
- [159] F. Meng, W. Zhang, G. Ma, Z. Su, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology* **2003**, 31, 279-292.
- [160] X. Zhang, C. Liu, Y. Yuan, S. Zhang, X. Shan, Y. Sheng, F. Xu, *Journal of materials science: Materials in medicine* **2008**, 19, 2463-2470.
- [161] K. Sou, Y. Naito, T. Endo, S. Takeoka, E. Tsuchida, *Biotechnology progress* **2003**, 19, 1547-1552.
- [162] J. Rieger, J. Thieme, C. Schmidt, *Langmuir* **2000**, 16, 8300-8305.

- [163] H. Cölfen, *Current opinion in colloid & interface science* **2003**, 8, 23–31.
- [164] G. B. Sukhorukov, D. V. Volodkin, A. M. Günther, A. I. Petrov, D. B. Shenoy, H. Möhwald, *Journal of Materials Chemistry* **2004**, 14, 2073-2081.
- [165] F. C. Meldrum, H. Cölfen, *Chemical reviews* **2008**, 108, 4332-4432.
- [166] K. Sawada, *Pure and Applied Chemistry* **1997**, 69, 921-928.
- [167] D. V. Volodkin, N. I. Larionova, G. B. Sukhorukov, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 1962-1972.
- [168] A. I. Petrov, D. V. Volodkin, G. B. Sukhorukov, *Biotechnology progress* **2005**, 21, 918-925.
- [169] K. S. Zuckerman, in *Goldman: Cecil Medicine* (Eds.: L. Goldman, D.A. Ausiello), Saunders Elsevier, Philadelphia, **2007**.
- [170] D. V. Volodkin, A. I. Petrov, M. Prevot, G. B. Sukhorukov, *Langmuir* **2004**, 20, 3398-3406.
- [171] J. H. Eike, A. F. Palmer, *Biotechnology progress* **2004**, 20, 1225-1232.
- [172] W. C. Mak, R. Georgieva, R. Renneberg, H. Bäumler, *Advanced Functional Materials* **2010**, 20, 4139-4144.
- [173] H. Cölfen, M. Antonietti, *Langmuir* **1998**, 14, 582-589.
- [174] C. Zhong, C. C. Chu, *Langmuir* **2009**, 25, 3045-3049.
- [175] S. Weiner, L. Addadi, *Trends in biochemical sciences* **1991**, 16, 252-256.
- [176] L. A. Gower, D. A. Tirrell, *Journal of Crystal Growth* **1998**, 191, 153-160.
- [177] W. T. Winter, S. Arnott, *Journal of molecular biology* **1977**, 117, 761-84.
- [178] J. Rieger, T. Frechen, G. Cox, W. Heckmann, C. Schmidt, J. Thieme, *Faraday Discussions* **2007**, 136, 265-277.
- [179] T. Wang, M. Antonietti, H. Cölfen, *Chemistry - A European Journal* **2006**, 12, 5722-5730.
- [180] T. C. Laurent, J. R. E. Fraser, *The FASEB Journal* **1992**, 6, 2397-2404.
- [181] M. N. Collins, C. Birkinshaw, *Journal of Applied Polymer Science* **2008**, 109, 923–931.
- [182] C. B. Shah, S. M. Barnett, *Journal of Applied Polymer Science* **1992**, 45, 293-298.
- [183] D. Musale, S. Kulkarni, *Journal of membrane science* **1997**, 136, 13–23.

- [184] D. Malamud, J. W. Drysdale, *Analytical biochemistry* **1978**, *86*, 620-647.
- [185] H. Reis, O. Wetter, *Journal of Molecular Medicine* **1969**, *47*, 426-430.
- [186] G. Fritz, V. Schädler, N. Willenbacher, N. J. Wagner, *Langmuir* **2002**, *18*, 6381-6390.
- [187] A.-M. Sung, I. Piirma, *Langmuir* **1994**, *10*, 1393-1398.
- [188] S. Ansorge, in *Biochemie Und Pathobiochemie* (Eds.: G. Löffler, P.E. Petrides, P.C. Heinrich), Springer-verlag, **2007**, pp. 1104-1140.
- [189] S. H. E. Kaufmann, in *Medizinische Mikrobiologie Und Infektiologie* (Eds.: S. Suerbaum, H. Hahn, G.-D. Burchard, S.H.E. Kaufmann, T.F. Schulz), Springer, **2012**, pp. 89-96.
- [190] A. Aderem, D. M. Underhill, *Annual review of immunology* **1999**, *17*, 593-623.
- [191] D. M. Underhill, A. Ozinsky, *Annual review of immunology* **2002**, *20*, 825-852.
- [192] M. Hsu, R. Juliano, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1982**, *720*, 411-419.
- [193] F. Ahsan, I. P. Rivas, M. a Khan, A. I. Torres Suarez, *Journal of controlled release* **2002**, *79*, 29-40.
- [194] Y. Tabata, Y. Ikada, *Biomaterials* **1988**, *9*, 356-362.
- [195] M. Roser, D. Fischer, T. Kissel, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **1998**, *46*, 255-263.
- [196] I. Bertholon, C. Vauthier, D. Labarre, *Pharmaceutical research* **2006**, *23*, 1313-1323.
- [197] A. S. Sawhney, J. A. Hubbell, *Biomaterials* **1992**, *13*, 863-870.
- [198] M. A. Dobrovolskaia, P. Aggarwal, J. B. Hall, S. E. McNeil, *Molecular pharmaceutics* **2008**, *5*, 487-495.
- [199] G. Müller-Berghaus, *Journal of Molecular Medicine* **1977**, *55*, 663-672.
- [200] A. F. Palmer, G. Sun, D. R. Harris, *Biotechnology progress* **2009**, *25*, 1803-1809.

Publikationen

Paper

Yu Xiong, Radostina Georgieva, Angelika Müller, Susanne Müller, Axel Steffen, Nadine Sternberg, Hans Bäumler: Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Microparticles Fabricated by a Novel Simple Technique – Properties and Behaviour *in vivo*. 2012 Submitted

Susana Moreno-Flores, Radostina Georgieva, **Yu Xiong**, Kathryn Melzak, Hans Bäumler, José Luis Toca-Herrera: Physical attachment of fluorescent protein particles to atomic force microscopy probes in aqueous media: Implications for surface pH, fluorescence, and mechanical properties studies. *Microscopy Research and Technique*, 2010, 73, 746–751.

Abstract

Yu Juan Zhang, **Yu Xiong**, Hans Bäumler and Rainer H. Müller: Blood Substitutes: Adsorption Protein Patterns on Different Hemoglobin Particles. *AAPS*, 2012.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn **PD Dr. rer. nat. Hans Bäumler** für die Aufnahme in seiner Forschungsgruppe, die Überlassung dieses interessanten Themas sowie die Unterstützung bei auftretenden Problemen, die intensive fachliche Betreuung und die motivierenden Anregungen.

Herrn **Prof. Dr. Rainer H. Müller** möchte ich im gleichen Maße für die Zusammenarbeit und Betreuung dieser Arbeit sowie seine wertvollen Ratschläge bei der Diskussion fachlicher Fragen herzlich danken.

Bei Frau **Dr. rer. nat. Radostina Georgieva** möchte ich mich recht herzlich für ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion fachlicher Fragen sowie ihrer großen Hilfe und Unterstützung während der gesamten Promotionszeit bedanken.

Den Mitarbeitern der AG Bäumler möchte ich für die schöne gemeinsame Zeit und nette Arbeitsatmosphäre danken. Dem „Bastelmeister“, Herrn **M. Sc. Axel Steffen**, möchte ich für seine hilfreichen ingenieurstechnischen Fertigkeiten und Werke sowie die Rinderblut-Besorgung danken. Ebenfalls möchte ich Frau **M. Sc. Kathrin Smuda** für die tatkräftige Unterstützung im Labor und das Korrekturlesen meiner Publikation und Promotionsarbeit danken.

Den Mitdoktoranden der AG Bäumler, Frau **Dipl.-Ing. Nadine Sternberg** und Frau Tierärztin **Angelika Müller**, danke ich für den wissenschaftlichen Austausch. Den ehemaligen Kolleginnen Frau **Ines Schwarzkopf** und **Carmen Röhe** und unserer Werkstudentin Frau **B. Sc. Karolin Duft** danke ich für die Laborunterstützung.

Dem Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung (besonders Frau **Dimitriya Borisova**) danke ich für die SEM- und TEM-Messungen. Frau **Bianka Marklein** danke ich für die SDS-PAGE-Analyse der Hb-Lösung.

Mein großer Dank gilt auch **meiner Familie**, die mich während meiner Studiums- und Promotionszeit immer unterstützt hat.

Curriculum Vitae

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