Entwicklung und Charakterisierung nanoskaliger Lipidformulierungen als Ultraschallkontrastmittel zur sonothrombolytischen Therapie

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Jana Brüßler
aus Lüdenscheid

Marburg/Lahn 2012

vom Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 06.08.2012 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Udo Bakowsky

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Keusgen

Tag der mündlichen Prüfung am 07.08.2012

Die vorliegende Arbeit entstand
auf Anregung und unter Leitung von

Prof. Dr. Udo Bakowsky

am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
der Philips-Universität Marburg

Meiner Familie
in Liebe und Dankbarkeit

Inhalt

1. Einleitung 1

1.1 Blutgerinnung 2

1.2 Thromboembolische Erkrankungen 6

1.3 Thrombolytische Therapie 12

1.4 Ultraschall zur Diagnose und Therapie thromboembolischer Erkrankungen 14

1.5 Ultraschallkontrastverstärker 18

1.6 Aufgaben und Ziele der Arbeit 22

2. Methoden 24

2.1 Herstellung nanoskaliger Ultraschallkontrastmittel 25

2.1.1 Herstellung der DPPC/CH-Formulierungen 25

2.1.2 Herstellung der DPPC/PEG40S und der DSPC/PEG40S-Formulierungen 27

2.2 Charakterisierung nanoskaliger Ultraschallkontrastmittel 30

2.2.1 Dynamische Lichtstreuung 30

2.2.2 Laser-Doppler-Anemometrie 31

2.2.3 Raster-Kraft-Mikroskopie 31

2.2.4 cryo-Transmissionselektronenmikroskopie 32

2.2.5 Kernspinresonanzspektroskopie 33

2.3 Untersuchungen der Echogenizität nanoskaliger Kontrastmittel 34

2.3.1 Messung der Ultraschallkontrastverstärkung 34

2.3.2 Stabilität des Ultraschallkontrastes 36

2.4 Mischbarkeitsstudien an Lipiden 38

2.4.1 Monoschichtmessungen an der Langmuir-Filmwaage 38
2.4.2 Epifluoreszenzmessungen an Monoschichten 41

2.5 *in vitro* Untersuchungen nanoskaliger Kontrastmittel 42

2.5.1 Herstellung der Thromben 42
2.5.2 *in vitro* Modell 42
2.5.3 Versuchsablauf und Bestimmung des Masseverlustes der Thromben 45
2.5.4 Fixierung und Abbildung der Thromben 46

3. Herstellung und Charakterisierung nanoskaliger Ultraschallkontrastmittel 48

3.1 Ergebnisse 49

3.1.1 Dynamische Lichtstreuung und Laser-Doppler-Anemometrie 49
3.1.2 Raster-Kraft-Mikroskopie 56
3.1.3 cryo-Transmissionselektronenmikroskopie 58
3.1.4 Kernspinresonanzspektroskopie 62

3.2 Diskussion 65

4. Untersuchung der Echogenizität nanoskaliger Ultraschallkontrastmittel 72

4.1 Ergebnisse 73

4.1.1 Messung der Ultraschallkontrastverstärkung 73
4.1.2 Stabilität des Ultraschallkontrastes 81

4.2 Diskussion 87

5. Mischbarkeitsstudien an Lipiden 94

5.1 Ergebnisse 95

5.1.1 Monoschichtmessungen an der Langmuir-Filmwaage 95
5.1.2 Epifluoreszenzmessungen an Monoschichten 97

5.2 Diskussion 100

6. *in vitro* Untersuchungen nanoskaliger Ultraschallkontrastmittel 105

6.1 Ergebnisse 106

6.1.1 Bestimmung des Masseverlustes der Thromben 106
6.1.2 Abbildung der Thromben 108

6.2 Diskussion 110

7. Zusammenfassung und Ausblick 114

7.1 Zusammenfassung 115

7.2 Ausblick 118

8. Literaturverzeichnis 119

9. Anhang 130

9.1 Abkürzungsverzeichnis 131

9.2 Publikationsliste 134

9.3 Lebenslauf 138
9.4 Danksagung 140
9.5 Erklärung 142

1. Einleitung

1.1 Blutgerinnung

Zu den häufigsten Todesursachen in den Industrieländern zählen die kardiovaskulären Erkrankungen. 41,1 % aller Todesfälle in der Bundesrepublik Deutschland ließen sich im Jahre 2010 auf diese Erkrankungen zurückführen [1]. Dazu zählen thromboembolische Erkrankungen wie Myokardinfarkt, Apoplexie, Tiefe Beinvenenthrombose und Lungenembolie, die mit schwerwiegenden persistierenden Gesundheitsproblemen und einer hohen Sterblichkeit verbunden sind [2]. Diese thromboembolischen Erkrankungen werden durch eine Störung der Blutgerinnung, einem komplizierten Mechanismus aus primärer Hämostase, bei der die Thrombozyten aggregieren und einen vorläufigen Wundverschluss bilden, und sekundärer Hämostase, bei der eine Kaskade von Gerinnungsfaktoren die Produktion von Fibrin und damit die Bildung eines endgültigen Wundverschlusses steuert, hervorgerufen [3].

Nach einer Gefäßverletzung startet die primäre Hämostase (Abb. 1.1) mit der Bindung des auf der Thrombozytenoberfläche exprimierten Glykoproteins Ib (GPIb) an den subendothelialen von-Willebrand-Faktor (vWF). Diese erste Verbindung zwischen Thrombozyten und Kollagen aktiviert die Expression von Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) auf der Thrombozytenoberfläche. Auch dieses Protein bindet an den vWF, woraus eine festere

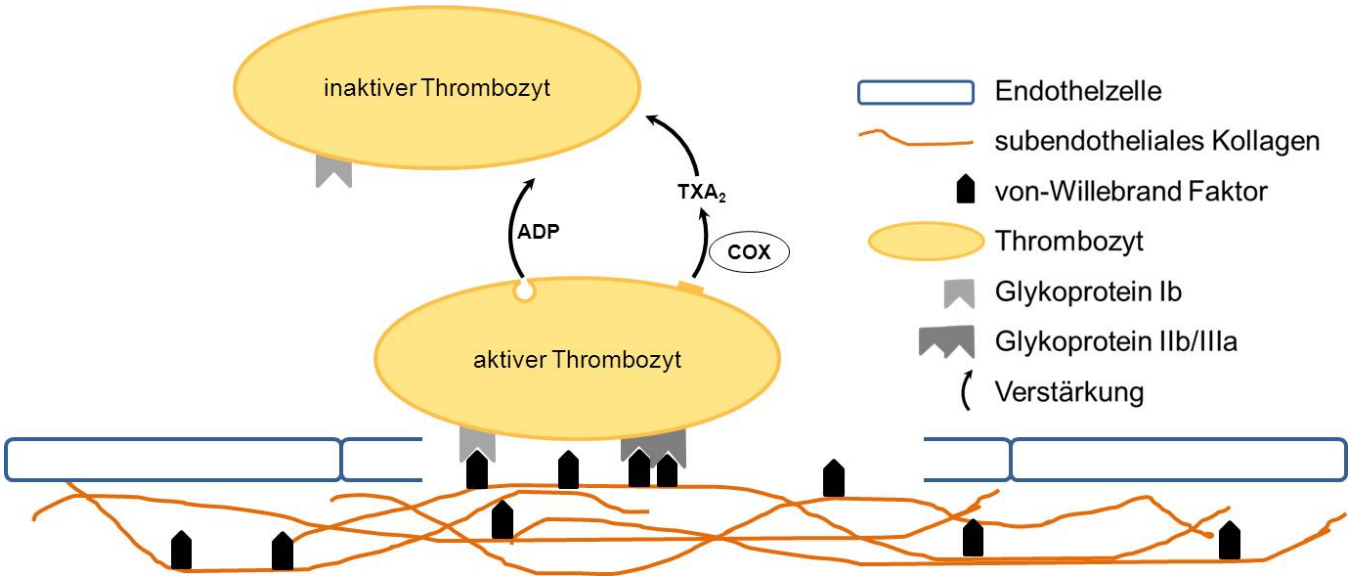

Abb. 1.1: primäre Hämostase

Aggregation der Thrombozyten resultiert [4]. Verschiedene Amplifikationsmechanismen zur Aktivierung weiterer Thrombozyten sichern eine adäquate Aggregation: zum einen wird Adenosindiphosphat (ADP) aus Granula der aktivierten Thrombozyten freigesetzt, zum anderen bildet die Cyclooxygenase (COX) aus Arachidonsäure der Zellmembran Thromboxan A_2 (TXA_2) [4]. Im letzten Schritt der primären Hämostase verbindet Thrombin, das in der Koagulationskaskade der sekundären Blutgerinnung entsteht, die Thrombozyten zu irreversiblen Aggregaten.

Die Bildung des Fibrins, und damit die sekundäre Hämostase, startet mit der Aktivierung des Koagulationsfaktors VII (FVII) durch einen Kontakt mit verletztem Endothel zum aktivierten Faktor VII (FVIIa) (Abb. 1.2). Aktivierter Faktor VII (FVIIa) ist jetzt in der Lage Faktor X (FX) zu aktivieren (FXa), der wiederum Faktor V (FV) in aktivierten Faktor V (FVa) umwandelt. Jetzt bildet sich ein Komplex aus Faktor Xa und Faktor Va, der Prothrombin zu Thrombin (auch Faktor II bzw. Faktor IIa genannt) aktiviert. Das gebildete Thrombin wandelt Fibrinogen

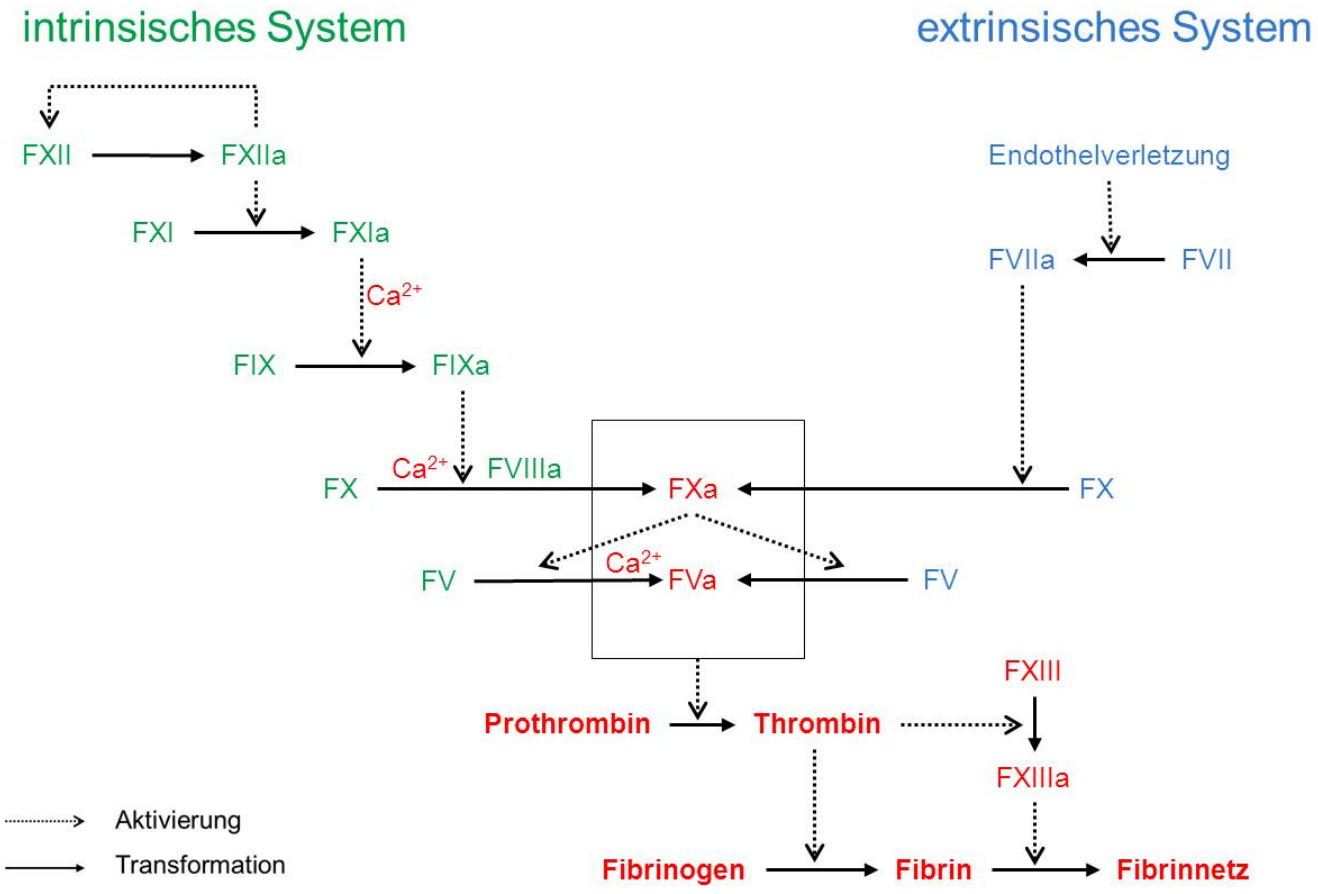

Abb. 1.2: sekundäre Hämostase

in Fibrin um [4]. Diese kurze Kaskade, extrinsisches System genannt, ist in der Lage sehr schnell kleine Mengen Fibrin zu produzieren und so eine gute primäre Hämostase zu gewährleisten. Die längere Kaskade des intrinsischen Systems produziert größere Mengen Fibrin, das in der Lage ist einen stabilen Thrombus als Wundverschluss auszubilden. Das intrinsische System startet mit einer Aktivierung des Faktors XII (FXII) durch Kontakt zu einer negativ geladenen Oberfläche. Aktivierter Faktor XII (FXIIa) aktiviert daraufhin den Faktor XI (FXI) und einen Verstärkungsmechanismus seiner eigenen Aktivierung. Im nächsten Schritt wandelt aktivierter Faktor XI (FXIa) in Gegenwart von Calcium-Ionen (Ca^{2+}) Faktor IX (FIX) zu aktiviertem Faktor IX (FIXa) um. FIXa kann in Gegenwart von aktiviertem Kofaktor VIII (FVIIIa) und Calcium-Ionen und wiederum den Faktor X aktivieren. Wie oben beschrieben wird Faktor V von Faktor X aktiviert und ein Komplex von FXa, FVa und Calcium-Ionen bildet sich an der Oberfläche eines Thrombozyten. Dieser Komplex ist jetzt in der Lage große Mengen Thrombin aus Prothrombin freizusetzen. Das Thrombin spaltet Fibrinogen zu Fibrin und aktiviert außerdem Faktor XIII (FXIII). Freigesetztes Fibrin polymerisiert zu Fasern, die von aktiviertem Faktor XIII (FXIIIa) zu einem den Thrombus stabilisierenden Fibrinnetz verknüpft werden [3].

Parallel zu der oben beschriebenen Hämostase startet die Fibrinolyse (Abb. 1.3), um eine

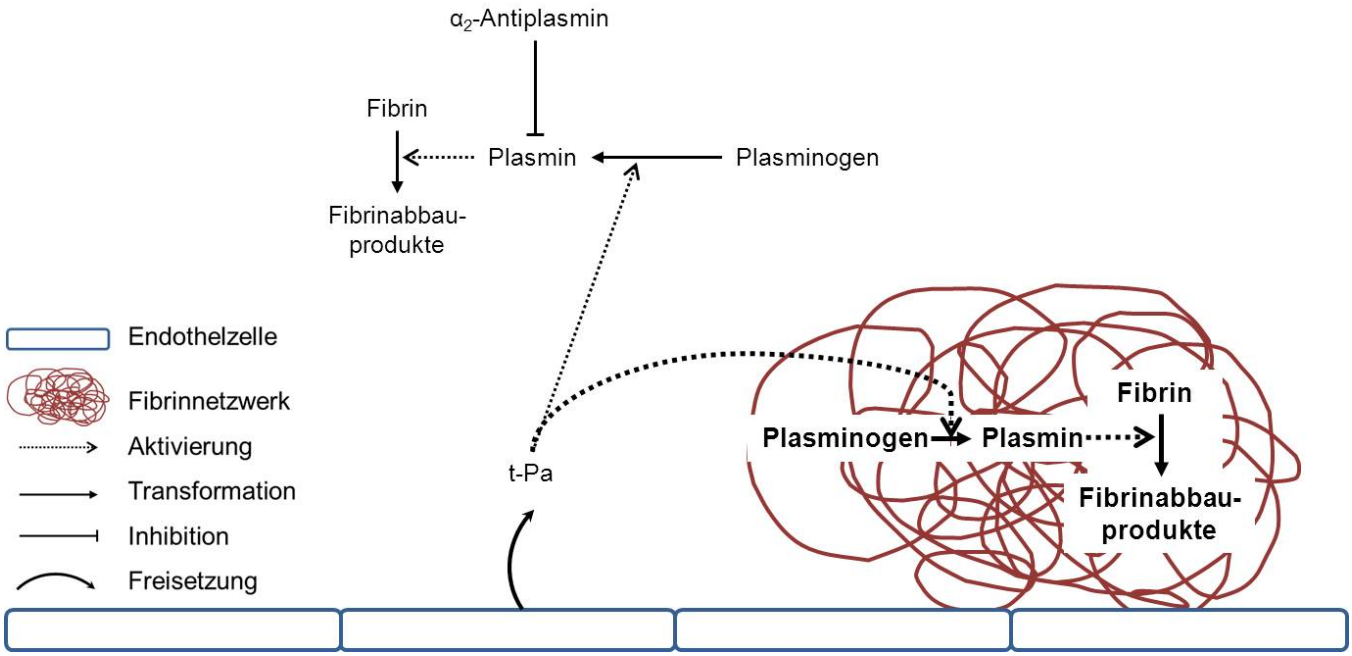

Abb. 1.3: Fibrinolyse

überschießende Fibrinproduktion zu verhindern. Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tissue plasminogen activator, t-Pa) wird von Endothelzellen freigesetzt und aktiviert Plasminogen zu Plasmin, das quervernetztes Fibrin abbauen kann. Zur Vermeidung von Blutungskomplikationen wird zirkulierendes Plasmin direkt von α_2-Antiplasmin inaktiviert. Auch bewirkt die Bindung von Plasminogen und t-Pa an Fibrin eine Verstärkung der Plasminbildung. Im Inneren eines Thrombus reichern sich partielle Fibrinabbauprodukte mit C-terminalen Lysinresten an. Diese Abbauprodukte verstärken die Bindung von Plaminogen, Plasmin und t-Pa an Fibrin und verringern somit den zirkulierenden Anteil des Plasmins und verstärken den Fibrinabbau innerhalb des Thrombus [4].

1.2 Thromboembolische Erkrankungen

Rudolf Virchow postulierte im Jahr 1859 eine nach ihm benannte Trias von Problemen, die zur Thrombusentstehung führen (Abb. 1.4) [5].

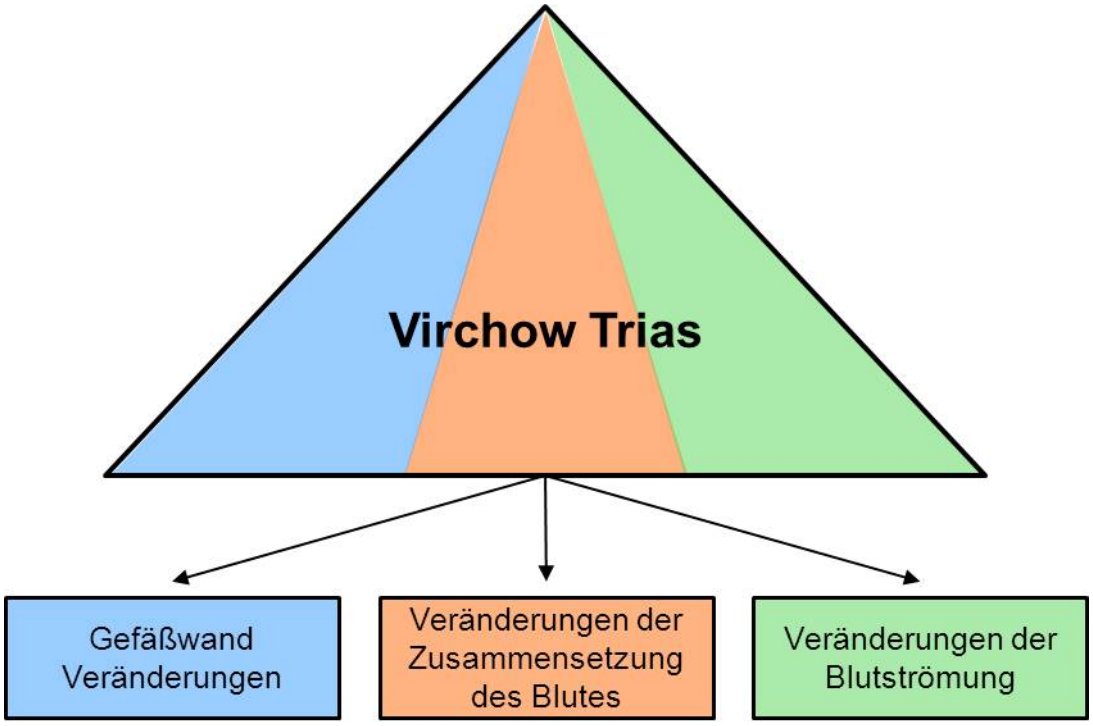

Abb. 1.4: Virchow Trias

Veränderungen der Gefäßwand, ein verlangsamter Blutfluss und eine erhöhte Tendenz des Blutes zu koagulieren sind gemäß Virchow Gründe für die Entstehung von Thromben. Schäden der Gefäßwand, die durch Endotoxine, Hypoxie, allergische Reaktionen oder mechanische Verletzungen hervorgerufen werden können, legen subendotheliale Strukturen frei und führen somit zu einer Aggregation von Thrombozyten. Außerdem wird der antithrombotische Effekt des gesunden Endothels gestört [5]. Eine verlangsamte Blutströmung aufgrund der Verengung eines Blutgefäßes vergrößert die Wahrscheinlichkeit der Thrombozytenaggregation. Zirkulationsprobleme des Blutes können einfache Ursachen wie beispielsweise Langstreckenflüge und lange Bus- oder Autofahrten mit unveränderter Beinposition sein. Auch der Wegfall der Muskelpumpe bei bettlägerigen Patienten, Herzinsuffizienz oder lokale Verengungen durch bestehende Thromben oder arterio-sklerotische Plaques können zu einer Stase des Blutes führen [5]. Bei der Änderung der

Blutzusammensetzung ist die Erhöhung der Viskosität durch Exsikkose, erhöhter Hämatokritwert oder erhöhte Plasmaproteinkonzentration (vor allem Albumin) zu beachten, da sie die Blutflussgeschwindigkeit verlangsamen und dadurch die Thromboseneigung wie oben beschrieben verstärken. Eine verminderte Aktivität der Fibrinolyse oder eine gesteigerte Aktivität der Hämostase sind weitere Gründe, die zu einer Thrombusbildung führen können [5]. Genetische Faktoren können zu einer unterschiedlichen Struktur des Fibrins und so zu einem veränderten Risiko für thromboembolische Erkrankungen führen [6]. Basierend auf diesen grundlegenden Überlegungen sollen im Folgenden die einzelnen thromboembolischen Erkrankungen kurz erläutert werden.

Die „Tiefe Beinvenenthrombose“ ist ein häufiges Problem und tritt bei bettlägerigen Patienten besonders nach Operationen oder Knochenbrüchen der unteren Extremitäten oder im Wochenbett auf. 15-20 % der Fälle führen zu einer Lungenembolie, die in 40 % der Fälle tödlich verläuft [3]. Aufgrund der unspezifischen und teilweise vollständig fehlenden Symptome ist die Diagnose der „Tiefen Beinvenenthrombose“ erschwert. Schmerz, Rötung, Schwellung und Erwärmung des betroffenen Beines sind die häufigsten Symptome, aber auch bettlägerige Patienten, die über Krämpfe oder muskelkaterartige Schmerzen der Beine klagen, sollten auf eine „Tiefe Beinvenenthrombose“ hin untersucht werden. Als Diagnosemethoden kommen dabei Duplex-Ultraschall (Duplex-US) und Phlebographie in Frage. Die generelle Therapie beginnt normalerweise mit Bettruhe und Hochlagerung des betroffenen Beines. Im zweiten Schritt muss dann durch Thrombolyse, Antikoagulationstherapie oder operativer Entfernung des Thrombus der Blutfluss wieder hergestellt werden. Diese Methoden werden im Kapitel 1.3 genauer beschrieben [5].

Die Thrombophlebitis muss von der „Tiefen Beinvenenthrombose“ abgegrenzt werden. Diese lokale Entzündung und Thrombosierung oberflächlicher Venen zeigt ähnliche Symptome [3], führt aber sehr selten zu Komplikationen wie beispielsweise Lungenembolien [5]. Als Therapie werden hier anti-inflammatorische Medikamente und Bewegung empfohlen. Eine Ruhigstellung des betroffenen Beines kann zu einer Verlagerung der Entzündung in die tiefen Venen führen [5].

Die Lungenembolie ist einer der Hauptgründe für plötzliche Todesfälle. Dabei wird ein Teil eines Thrombus des venösen Systems (90 %) oder des rechten Herzens (10 %) als Embolus in die Lunge gespült und verschließt dort ein Blutgefäß. In den nichtdurchbluteten Alveolen sinkt die Konzentration des Surfactant ab und es kommt zu einer Atelektase, gefolgt von Hypoxie und rechtsventrikulärem Hochdruck [3]. Subjektive Symptome einer Lungenembolie sind Dyspnoe, Schmerzen der Brust, Herzrasen und Husten. Als objektive Symptome sind Tachypnoe (Atemfrequenz > 16 /min), Zyanose, Tachykardie, Hypotension, Rasselgeräusche der Lungen und nach einiger Zeit Fieber (Temperatur > 38 °C) nachweisbar [5]. Leichte Lungenembolien verlaufen oft symptomlos. Zur gesicherten Diagnose sollten mehrere der folgenden Symptome nachweisbar sein: Zwerchfellhochstand auf dem Röntgenthorax, Arrhythmien im Elektrokardiogramm (EKG) und Veränderungen der Gaspartialdrücke des Blutes. Zur Verifizierung der Diagnose werden eine Perfusionsszinthigraphie und eine Pulmonalisangiographie durchgeführt. Die pathophysiologischen Konsequenzen einer Lungenembolie sind abhängig von der eingeleiteten Therapie, wobei eine Sauerstoffversorgung und der schnelle Beginn einer thrombolytischen Therapie das klinische Ergebnis deutlich verbessern [5].

Der Myokardinfarkt, hervorgerufen durch den Verschluss eines Koronargefäßes, führte im Jahr 2010 zu 59.107 Todesfällen in Deutschland [1]. Eine arteriosklerotische Plaque ist oft der Auslöser der Thrombusentstehung in den Koronargefäßen. Das geschädigte Endothel ist nicht mehr in der Lage vasodilatative und antiaggregatorische Substanzen freizusetzen,

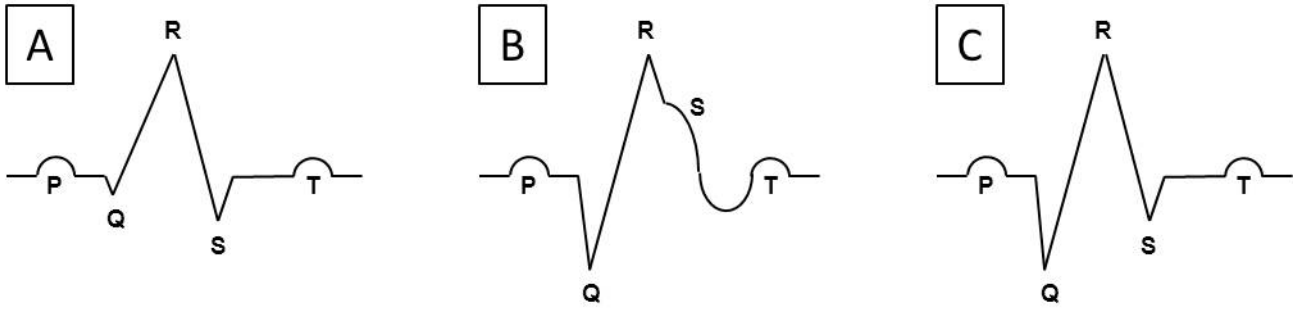

Abb. 1.5: EKG-Kurven; A: normales EKG, B: EKG kurz nach einem Myokardinfarkt, C: EKG nach einem länger zurück liegenden Myokardinfarkt

daher ist die Entstehung von Thrombozytenaggregaten und Thromben in diesen Bereichen verstärkt [4]. Der Gefäßverschluss führt zu einer Ischämie und daraus folgend einer Nekrose im dahinterliegenden Gebiet. Je nach Lage und Ausdehnung der Ischämie differieren die klinischen Symptome eines Myokardinfarktes deutlich. Als subjektive Symptome sind „vernichtender“ Schmerz in der Brust, Angstzustände, Übelkeit und Erbrechen zu nennen. Objektiv lassen sich Konzentrationen verschiedener Marker im Blut und Veränderungen des EKG nachweisen: Kurz nach einem Infarkt steigen die Konzentrationen der Muskelproteine Myoglobin und Troponin im Blut an, die aus zerstörten Herzmuskelzellen freigesetzt werden. Als dritter Marker kann die herzspezifische Kreatininkinase CK-MB dienen, die nach etwa 4-6 h ansteigt. Nach wenigen Tagen normalisieren sich die Werte von Myoglobin und CK-MB wieder, während Troponin mehrere Wochen benötigt um auf normale Konzentrationen abzusinken. Veränderungen der EKG-Kurve können auch Aufschluss über einen Myokardinfarkt und den Zeitpunkt seines Auftretens geben. Wie auf Abbildung 1.5 zu sehen ist, zeigt sich kurz nach einem Myokardinfarkt eine ST-Strecken Erhöhung, während der Ausschlag bei Q deutlich verstärkt wird. Die Erhöhung normalisiert sich nach wenigen Wochen, die Verstärkung von Q bleibt mehrere Monate sichtbar [7]. Myokardinfarkte können nach dem Auftreten der Ischämien eingeteilt werden. Dabei unterscheidet man zum einen den Vorderwand- und Hinterwandinfarkten, wobei ein Thrombus in der linken Koronararterie einen Vorderwand- und ein Verschluss der rechten einen Hinterwandinfarkt hervorruft. Außerdem wird von einem transmuralen Infarkt gesprochen, wenn die vollständige Herzwand betroffen ist, während sich ein subendothelialer Infarkt auf die inneren Schichten der Herzwand beschränkt [3]. Abbildung 1.6 zeigt eine weitere Möglichkeit Myokardinfarkte anhand des Auftretens der Symptome einzuteilen. Der Akute Myokardinfarkt (acute myocardial infarction AMI) zeigt alle oben beschriebenen subjektiven Symptome, den Konzentrationsanstieg der Markerproteine und Veränderungen im EKG. Davon abgegrenzt werden STEMI (ST elevated myocardial infarction) und NSTEMI (non ST elevated myocardial infarction) bei denen jeweils die Markerproteine oder die EKG-Veränderungen nicht nachgewiesen werden können. Myokardinfarkte der vierten Gruppe zeigen auch wieder

AMI (=acute myocardial infarction)	STEMI (=ST elevated myocard infarct)	NSTEMI (=non ST elevated myocard infarct)	non Q-wave MI (=non Q-wave myocard infarct)
- klinische Symptome - Markerproteine - EKG Veränderungen	- klinische Symptome - EKG Veränderungen	- klinische Symptome - Markerproteine	- klinische Symptome - Markerproteine - EKG Veränderungen ohne Q-Verstärkung

Abb. 1.6: Einteilung Myokardinfarkt

alle klinischen Symptome und erhöhte Konzentrationen der Proteine. Bei den EKG-Veränderungen fehlt allerdings die Verstärkung bei Q (non Q-wave myocardial infarction) [7]. Die Mortalitätsrate und das klinische Ergebnis der Myokardinfarkte hängen von verschiedenen Komplikationen ab. Ein wichtiger Faktor für ein gutes klinisches Ergebnis ist die Ausbildung von Kollateralen, die das ischämische Gewebe während des Gefäßverschlusses versorgen, wenn diese Kollateralen gut ausgebildet sind, nekrotisiert nur ein kleinerer Anteil des Gewebes. Die Größe und Lage des Infarktes ist wichtig für die Überlebensrate. Nach einem Infarkt bildet sich das betroffene Gewebe in Narbengewebe um und kann somit seine Funktion nicht mehr erfüllen. Eine großflächige Vernarbung des linken Ventrikels oder ein Untergang vieler reizleitender Zellen bedingen eine niedrige Überlebensrate. Früh nach einem Infarkt können freigesetzte Kalium-Ionen aus den zerstörten Muskelzellen zu einer teils schweren Arrhythmie führen [7]. Ein Patient mit Verdacht auf Herzinfarkt sollte aufgrund dieser möglichen Komplikationen umgehend in ein Krankenhaus eingewiesen werden. Der frühe Beginn einer Therapie und die engmaschige Überwachung des Patienten sind entscheidend für die Überlebensrate.

9,9 % aller Todesfälle ließen sich im Jahr 2010 auf Ischämien im Gehirn zurückführen [1]. Die verschiedenen Ischämien werden als Apoplex, Schlaganfall oder englisch stroke bezeichnet, und in „minor stroke“ und „major stroke“ eingeteilt (Abb. 1.7). Der Unterschied zwischen den beiden Arten des Apoplex ist die Reversibilität (minor stroke) und Persistenz (major stroke) der Symptome. Als Symptome treten Hemianopsien, Aphasien, starke

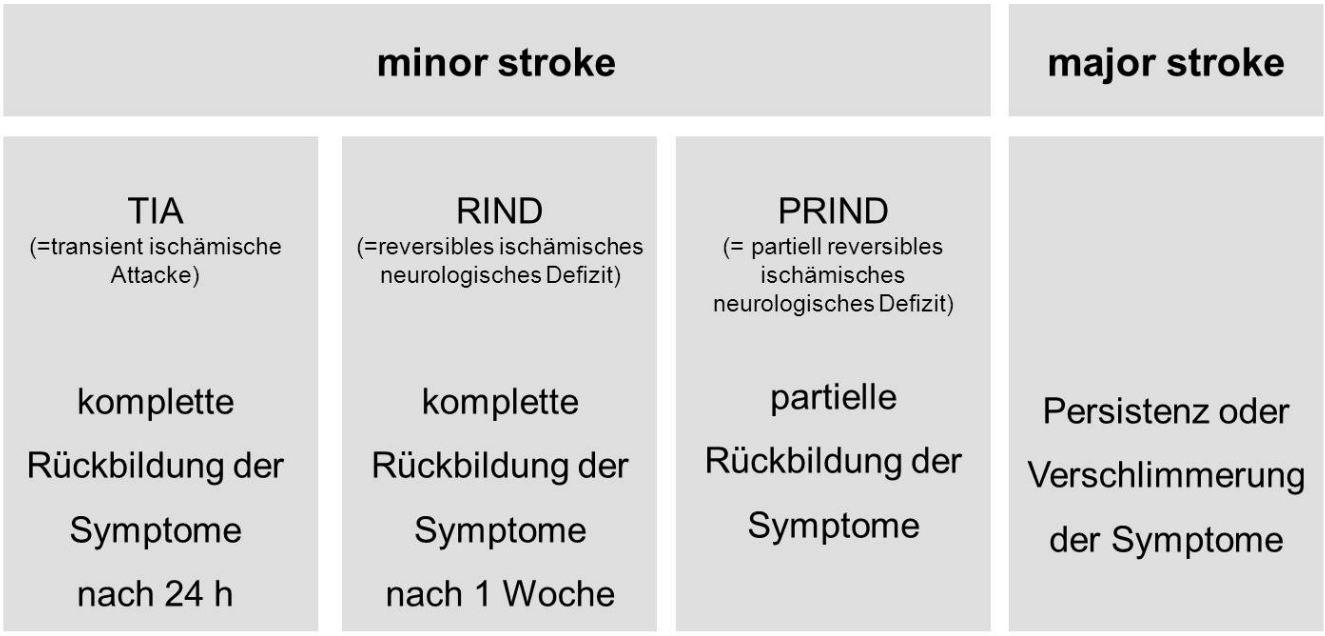

Abb. 1.7: Einteilung Apoplex

Kopfschmerzen, Ohnmacht, Übelkeit und Erbrechen auf. Beginnen die Symptome nach körperlicher Anstrengung oder gehen sie mit einer Hypertonie einher weist dies ebenfalls auf einen Apoplex hin [5]. Bei Verdacht auf Apoplex sollte der betroffene Patient schnellstmöglich in einer Klinik mit neurologischer Spezialeinheit oder „stroke unit“ behandelt werden. Zur Diagnose wird in der Klinik eine Kombination aus Magentresonanztomographie (MRT), Computertomographie (CT) und Ultraschall (US) verwendet, wobei die Unterscheidung zwischen hämorrhagischem und ischämischem Apoplex entscheidend für den weiteren Therapieverlauf ist [5]. Der ischämische Apoplex, hervorgerufen durch den Verschluss eines Blutgefäßes im Gehirn, ist mit 80% der Fälle häufiger und kann mit thrombolytischer Therapie behandelt werden. Nur 20% aller Schlaganfälle sind hämorrhagisch, hier tritt Blut aus einem zumeist vorher arteriosklerotisch veränderten Gefäß in das Hirngewebe aus. Die Therapie darf hier natürlich nicht zu einer Verstärkung der Blutung führen [3]. Allgemeines Therapieziel ist Minimierung des ischämischen Bereichs, da nekrotische Nervenzellen ihre Funktion niemals zurückgewinnen und so dauerhafte Gesundheitsprobleme entstehen können.

1.3 Thrombolytische Therapie

Aufgrund der thrombolytischen Therapie ist es in den letzten Jahren gelungen die Sterblichkeitsrate thromboembolischer Erkrankungen drastisch zu senken [2]. Das vordringliche Ziel der thrombolytischen Therapie ist eine frühzeitige Wiederherstellung des Blutflusses in einem verschlossenen Gefäß. Für den ischämischen Apoplex konnte gezeigt werden, dass eine frühzeitige Wiederherstellung der Durchblutung eng verknüpft ist mit einem verbesserten klinischen Ergebnis und einer reduzierten Sterblichkeit nach drei Monaten [8].
Das Wirkprinzip aller thrombolytischen Arzneimittel ist die Verstärkung des fibrinolytischen Systems (Abb. 1.3) des menschlichen Körpers. Wirkstoffe der ersten Generation, wie Urokinase (UK) und Streptokinase (SK), aktivieren sowohl zirkulierendes als auch thrombusgebundenes Plaminogen. Der rekombinante Gewebe-Plasminogen-Aktivator (recombinant tissue plasminogen activator, rt-Pa) und die Pro-Urokinase (Pro-UK) aktivieren als thrombolytische Arzneimittel der zweiten Generation verstärkt Plasminogen, das an einen Thrombus gebunden ist [4]. SK ist ein Metabolit β-hämolysierender Streptokokken und wirkt als indirektes Thrombolytikum, da ein SK-Plasminogen-Komplex entsteht, der dann weiteres Plasminogen aktiviert. Diese indirekte Aktivierung führt zu einer inversen Dosis-Wirkungsbeziehung. Je mehr SK vorliegt, desto höher ist die Konzentration des SK-Plansminogen-Komplexes, wodurch die Konzentration des freien Plasminogens, das aktiviert werden kann, absinkt. Starke allergische Reaktionen können als Nebenwirkungen auftreten, da SK antigene Eigenschaften besitzt [5]. Urokinase, die zuerst aus Urin isoliert werden konnte, zeichnet sich durch eine direkte Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin aus [5]. Thrombolytische Arzneimittel der zweiten Generation (rt-Pa und Pro-UK) aktivieren Plasminogen, welches an Fibrin gebunden ist, besser als frei zirkulierendes Plasminogen, daher sollte die Thrombolyse hier stärker auf den Thrombus konzentriert sein [5]. Widererwarten wurden in einer Studie verstärke Blutungskomplikationen nach Anwendung von rt-Pa beschrieben. Als Gründe für diese Beobachtungen wurde eine Komplexierung mit Fibrinspaltprodukten angegeben, die den thrombolytischen Effekt verstärkt [2]. Allgemein ist

das Auftreten von Blutungskomplikationen ein limitierender Faktor der thrombolytischen Therapie, der häufiger auftritt, je länger die Behandlung andauert. Leichte Blutungen an der Injektionsstelle oder Hämaturie treten häufig auf. Problematisch sind intracerebrale Hämorrhagien (ICH), die bei ca. 1 % der Patienten auftreten und zumeist tödlich verlaufen [5]. Zur Reduktion der ICH wurde die intra-arterielle Injektion von Pro-UK und Urokinase mittels Katheter mit vielversprechenden Resultaten in Studien getestet [9-11]. Ein großer Nachteil der intra-arteriellen Therapie ist die Tatsache, dass speziell geschulte Mitarbeiter und spezielles Material vorhanden sein müssen. Daher ist diese Therapieform nur für „stroke units“ als Standardtherapie anwendbar.

Sprechen medizinische Gründe gegen eine thrombolytische Therapie, kann als Alternative die mechanische Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes genutzt werden. Je nach Lage des Thrombus und Gesamtsituation des Patienten können Ballon- oder Absaug-katheter, Implantation eines Stent oder operative Entfernung des thrombotischen Materials zur Anwendung kommen [5].

1.4 Ultraschall zur Diagnose und Therapie thromboembolischer Erkrankungen

Seit im Jahre 1965 eine Echtzeit-Beobachtung von Gewebe möglich geworden ist, hat Ultraschall (US) eine große Bedeutung in der Diagnose verschiedener Erkrankungen erlangt [12]. Als Diagnosehilfsmittel ist er ökonomisch effizient, sicher für den Patienten und besitzt eine hohe diagnostische Aussagekraft [13]. Als US wird Schall mit einer Frequenz von mehr als 16.000 Hz bezeichnet, der für das menschliche Ohr nicht mehr wahrnehmbar ist [14]. Er propagiert als Welle mit alternierenden Kavitations- und Kompressionsphasen durch das Gewebe, wobei die Ausbreitung der Welle von Dichte und Härtegrad des Gewebes abhängt [13]. Die verschiedenen Parameter zur Beschreibung einer solchen Welle sollen an dieser Stelle kurz besprochen werden (Abb. 1.8). Die Periode (T) bezeichnet die Zeit, die während einer vollständigen Oszillation der Welle vergeht, während die Frequenz (f) die Oszillationen pro Sekunde angibt. Gepulster US wird weiterhin mit der Pulsdauer (PD) und der Pulsrepetitionsperiode (PRP) beschrieben. Die Pulsdauer gibt die Zeit eines einzelnen Pulses an, die Pulsrepetitionsperiode die Zeit zwischen den Beginnen zweier aufeinanderfolgender Pulse [14]. Zur Induktion von US in medizinischen Geräten wird der Piezo-Effekt genutzt. Wird ein Kristall oder ein moderner Kunststoff mit kristallinen Einschlüssen einer Spannung ausgesetzt verformt sich das Material. Bei Verwendung einer Wechselspannung kommt es zu einer Oszillation, die Ultraschallwellen hervorruft [13]. Trifft US auf Grenzflächen treten immer die Phänomene Reflexion, Brechung und Streuung auf. Dies macht man sich bei diagnostischer Anwendung des US zunutze, indem der reflektierte und in Anteilen auch der gestreute US detektiert werden. Die Zeit, die zwischen Aussendung des

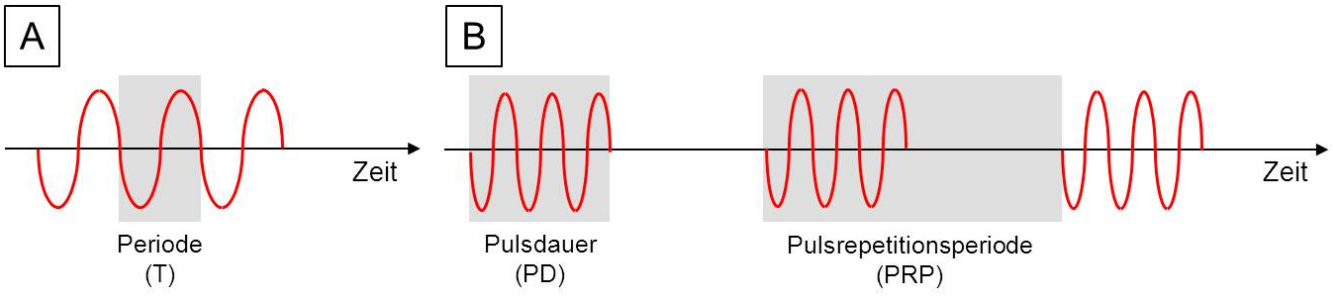

Abb. 1.8: Parameter einer Ultraschallwelle; A: kontinuierlicher US, B: gepulster US

US und Empfang der Echos vergeht, gibt dabei Aufschluss über den Abstand zwischen Ultraschallquelle und reflektierender Grenzfläche [13]. Die Absorption eines Teils der Ultraschallenergie durch das Gewebe macht eine Verstärkung später eintreffender Echos für ein gleichmäßiges Ultraschallbild nötig. Die B-Mode Bilder, die in dieser Arbeit verwendet werden, präsentieren die Echos als Grauwertpixel, bei denen die Helligkeit dem Ausmaß des reflektierten US entspricht. Da ein Piezoelement immer nur einen eindimensionalen Impuls aussendet ist zur Darstellung zweidimensionaler Bilder die Abtastung einer Fläche nötig. Dazu werden mehrere Piezoelemente parallel geschaltet, oder ein einzelnes Element wird so abgelenkt, dass jeder Impuls auf einen anderen Bereich der Fläche trifft [14]. Diese Technik ermöglicht uns die Darstellung stationärer Grenzflächen. Bewegliche Grenzflächen, wie zum Beispiel Blutkörperchen, können mit Hilfe des Doppler-Effektes dargestellt werden. Die Frequenzverschiebung bei Abstandsveränderung zwischen Messobjekt und Schallquelle wird dabei verwendet, um zum Beispiel die Blutflussgeschwindigkeit zu messen. Die Genauigkeit der Messergebnisse hängt von dem Winkel zwischen Schallquelle und Blutgefäß ab, wobei Winkel über 60° zu großen Messfehlern führen und vermieden werden sollten [14]. Die charakteristischen Messergebnisse bei Stenosen haben zu einer routinemäßigen Verwendung von Doppler-US bei der Diagnose von thromboembolischen Erkrankungen geführt. Heutzutage werden oft B-Bild und Doppler-Messung zum sogenannten Duplex-US kombiniert. Angezeigt wird dabei ein US-Bild im B-Mode, in das die Doppler-Messung eingebettet wird [14].

In den letzten Jahren wurde US oft zur Unterstützung der Therapie verschiedener Erkrankungen eingesetzt [15, 16]. Das Potential der ultraschallunterstützten thrombolytischen Therapie (Sonothrombolyse) zur Herbeiführung einer frühen Rekanalisation wurde zuerst 1976 von Trübestein *et al.* [17] vorgestellt. Verschiedene Studien konnten verbesserte Thrombolyse nach Therapie mit US oder mit einer Kombination von US und thrombolytischen Arzneimitteln zeigen [18-23]. Alexandrov *et al.* [22] beobachteten einen hohen Anteil früher Rekanalisation nach transkraniellem Monitoring der Thrombolyse mit 2 MHz Doppler-US. Die Studie umfasste 40 Patienten mit einem Durchschnittsalter von

70 ± 16 Jahren. Das transkranielle Monitoring wurde vor der Therapie mit rt-Pa (0,9 mg/kg Körpergewicht) gestartet und während der ganzen Therapie aufrechterhalten. 70 % der Patienten zeigte nach dem Ende der rt-Pa Infusion eine partielle oder vollständige Rekanalisation des betroffenen Blutgefäßes. Als Erklärung für diese hohe Rate an Rekanalisation wird eine Vergrößerung der für rt-Pa zugänglichen Thrombusoberfläche durch die US-Wellen vermutet [22]. Diese Erklärung wird durch Francis *et al.* [19] unterstützt, die zeigen konnten, dass 1 MHz US mit einer Intensität von 4 W/cm^2 die Verteilung von rt-Pa in einem Thrombus verändert. Die Thromben wurden aus recalcifiziertem menschlichem Plasma durch einstündige Inkubation bei 37 °C hergestellt. Nach Zugabe von inaktiviertem, radioaktiv markiertem rt-Pa und Beschallung mit dem oben beschriebenen US für 1, 2 oder 4 h wurde die Radioaktivität von Thrombus und überstehender Lösung gemessen. So konnte eine stärkere Aufnahme und tiefere Penetration von rt-Pa in den Thrombus nach Beschallung nachgewiesen werden [19].

Die Frequenzen, die zur Sonothrombolyse verwendet werden, liegen typischerweise zwischen 20 kHz und 1 MHz und damit unterhalb der Frequenzen des diagnostischen US. Zwei mögliche Erklärungen werden hierfür gegeben: zum einen scheint die Thrombolyse abhängig von der Frequenz und bei niedrigen Frequenzen besser als bei höheren zu sein [18, 24]. Auf der anderen Seite kann eine Beschallung über einen langen Zeitraum immer unerwünschten Effekten im Gewebe hervorrufen. Niederfrequenter US führt dabei vor allem zu mechanischen Effekten, während bei höheren Frequenzen thermische Effekte im Vordergrund stehen [18]. Die mechanischen Effekte werden durch oszillierende Gasblasen ausgelöst, die aufgrund der Druckunterschiede der US-Welle entstehen. Bei starken Druckunterschieden können diese Blasen platzen und so eine Schockwelle, freie Radikale und eine lokale Erwärmung hervorrufen [25]. Die stabile Kavitation zeichnet sich durch gleichmäßige Oszillation der Gasblasen aus, während die verzögerte Kavitation zu einem Platzen der Blasen führt [26]. Abhängig von der Intensität des verwendeten US tritt dabei eher die Stabile, eher die verzögerte oder keine Kavitation auf. Als Maß für die Wahrscheinlichkeit der akustischen Kavitation wurde der mechanische Index (MI) eingeführt

[18]. Für die Sonothrombolyse wird zumeist US mit einem mechanischen Index von 0,1 - 0,5 verwendet, bei dem eine Gewebeschädigung durch die Kavitation unwahrscheinlich ist. Die thermischen Effekte höherfrequenten US sind auch intensitätsabhängig, da die Propagation des US im Gewebe aber von der Frequenz abhängt, muss zusammen mit der Frequenz auch die Intensität gesteigert werden [14]. Während der langen Beschallungszeiten der Sonothrombolyse steigt die Temperatur im Gewebe kontinuierlich an und könnte problematische Temperaturen von mehr als 40 °C erreichen.

1.5 Ultraschallkontrastverstärker

Die erste Verstärkung des Ultraschallkontrastes konnten Gramiak und Shah [27] im Jahr 1968 nach der Injektion gashaltiger physiologische Kochsalzlösung beobachten. Ein großer Nachteil der Gasbläschen als Ultraschallkontrastmittel (ultrasound contrast agents, UCAs) ist ihre schnelle Auflösung im Blut. Inzwischen werden daher mit einer Hülle stabilisierte Gasbläschen, die lipophile Gase wie Sulfurhexafluorid oder Fluorkarbon enthalten, als UCAs verwendet [26]. Tabelle 1.1 fasst die Handelsnamen, die verwendeten Gase und die Hüllmaterialien in Deutschland verkaufsfähiger UCAs zusammen. Die Streuung und Reflexion von US-Wellen ist eine sehr wichtige Eigenschaft der UCAs, von der das Ausmaß ihrer Kontrastverstärkung abhängt. Beeinflusst wird dieses Potential von dem Durchmesser der Gasbläschen, der Wellenlänge des US und der Dichte und Kompressibilität des umgebenden Mediums und des enthaltenen Gases [14]. Die kommerziell erhältlichen UCAs weisen einen Durchmesser zwischen 2 und 8 µm auf, der einen guten Kompromiss zwischen maximaler Kontrastverstärkung und Penetration kleiner Kapillaren darstellt. Nach einer intravenösen Injektion muss das Kontrastmittel die Lunge und das Herz passieren um den Körperkreislauf zu erreichen. Die Kontrastverstärkung beginnt daher nach kurzer Verzögerung mit einem sehr hellen Signal, dass sich schnell zu der diagnostisch nutzbaren Kontrastverstärkung verringert [14]. Um das Potential der UCAs vollständig ausnutzen zu können, sind in den letzten Jahren neue Abbildungstechniken entwickelt worden. Die

Ultraschallkontrastverstärker	eingeschlossenes Gas	Hüllmaterial
Echovist®	Luft	Galaktose Mikropartikel
Levovist®	Luft	Galaktose Mikropartikel, Palmitinsäure
Optison™	Perfluorpropan	Albumin
SonoVue®	Sulfurhexafluorid	Phospholipide

Tab. 1.1: kommerziell erhältliche Ultraschallkontrastmittel in Deutschland

Bläschen der UCAs beginnen in einem Ultraschallfeld zu oszillieren, wie bei der akustischen Kavitation beschrieben, und führen daher zu nichtlinearer Streuung des US [26]. Dabei reagieren weiche Formulierungen, wie beispielsweise Lipidformulierungen, auf US mit niedrigerer Energie als härtere Formulierungen, wie Nanopartikel [28]. Die entstehenden harmonischen und subharmonischen Frequenzen werden von den neuen, oft „Harmonic Imaging“ genannten, Abbildungstechniken ausgenutzt [29-31]. Zur Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses werden Reflexionen der Fundamentalfrequenz aus der Abbildung rechnerisch entfernt und nur die harmonischen und subharmonischen Frequenzen abgebildet [14]. Daher wirkt das Gewebe bei dieser Technik schwarz und nur die Bläschen des Kontrastmittels werden als helle Pixel angezeigt.

In Studien konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von UCAs während einer sono-thrombolytischen Therapie oder sogar die Verwendung von UCAs und US ohne thrombolytische Arzneistoffe die Rekanalisation eines Gefäßes beschleunigen kann [32-38]. Ein signifikanter Anstieg des Verlustes an Thrombusmasse konnte von Cintas *et al.* [33] und Ren *et al.* [34] mit der Kombination von UCAs, US und thrombolytischen Arzneimitteln (rt-Pa oder UK) nachgewiesen werden. Die akustische Kavitation wird dabei als Begründung für die US-induzierte Thrombolyse im Zusammenhang mit UCAs genannt [33, 39]. Dabei scheint die stabile Kavitation zu größeren Verlusten an Thrombusmasse zu führen als die Kombination von stabiler und verzögerter Kavitation [39, 40]. Als Begründung werden die periodische Oszillation und der dadurch hervorgerufene Pumpeffekt stabiler Kavitation angeführt. Die Thrombusoberfläche wird gelockert, Abbauprodukte von der Oberfläche gespült und so mehr Fibrin für die Bindung von Arzneistoffen und Plasminogen freigelegt [39]. Im Jahr 2009 wurde die TUCSON Studie, eine klinische Studie der Phase II, als Sicherheitsstudie für Kontrastmittel unterstützte Sonothrombolyse an 35 Patienten durchgeführt [35, 36]. Alle Patienten erhielten eine Standardtherapie mit rt-Pa (0,9 mg/kg Körpergewicht) und wurden randomisiert der Kontroll- oder Targetgruppe zugeteilt. Die Targetgruppe erhielt zusätzlich eine 90 min Infusion eines Perflutren-haltigen Kontrastmittels kombiniert mit kontinuierlichem transkraniellem Doppler-Monitoring. Eine Kochsalzinfusion kombiniert mit kurzen trans-

kraniellen Doppler-Untersuchungen wurde bei der Kontrollgruppe angewendet. Die vielversprechenden Resultate deuten auf frühere Rekanalisation und bessere klinische Ergebnisse bei kontinuierlichem Doppler-Monitoring hin.

Die kommerziell erhältlichen UCAs zeigen wie schon erwähnt einen Durchmesser zwischen 2 und 8 µm. Daher sind sie zu groß um in die Poren im Fibrinnetz eines Thrombus einzudringen. Kleinere UCAs sollten aber in der Lage sein in den Thrombus einzudringen und durch Kavitation im Inneren des Thrombus diese Poren zu vergrößern und mehr Fibrin für den Angriff thrombolytischer Arzneistoffe freizulegen. Verschiedene Studien wurden mit so genannten „echogenic liposomes“ (ELIPs) durchgeführt [41-46], die vor dem lyophilisieren einen Durchmesser von 500 nm bis 1 µm aufweisen. Das Lyophilisieren in Gegenwart von Mannitol führt dann zu einem Anstieg des Durchmessers auf 1,6 µm und damit zu einer den kommerziellen UCAs vergleichbaren Größe [43]. Da diese ELIPs erst nach dem lyophilisieren eine Ultraschallkontrastverstärkung zeigen kann man sie kaum als nanoskalige UCAs betrachten [47]. In den Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass rt-Pa erfolgreich in diese Liposomen verkapselt und mittels Ultraschall wieder freigesetzt werden kann [43]. Xie *et al.* [48] konnten die Effektivität von 1 µm großen Bläschen auf die Rekanalisation verschlossener Blutgefäße nach Applikation von 1 MHz US nachweisen.

Basierend auf diesen Überlegungen wollten wir ein Ultraschallkontrastmittel mit einem Durchmesser von 100 -300 nm entwickeln [49, 50]. Hergestellt aus liposomalen Formulierungen sollte dieses nanoskalige Ultraschallkontrastmittel (nanoscaled ultrasound contrast agent, NUSCA) gute Kontrastverstärkung mit einem kleinen Durchmesser und langen Zirkulationszeiten verbinden. Liposomen als bekanntes „drug delivery system“ bestehen dabei aus Doppelschichten verschiedener Lipide und sind ähnlich aufgebaut wie die Membranen menschlicher Zellen (Abb. 1.9) [51]. Arzneistoffe können auf verschiedene Weise in Liposomen verkapselt werden: wasserlösliche Arzneistoffe werden im Inneren der Liposomen eingeschlossen oder an die polare Oberfläche der Lipiddoppelschicht gebunden. Hydrophobe Arzneistoffe lösen sich in der Lipiddoppelschicht und amphiphile Substanzen können sich in dieser Schicht so orientieren, dass der hydrophile Teil zum wässrigen

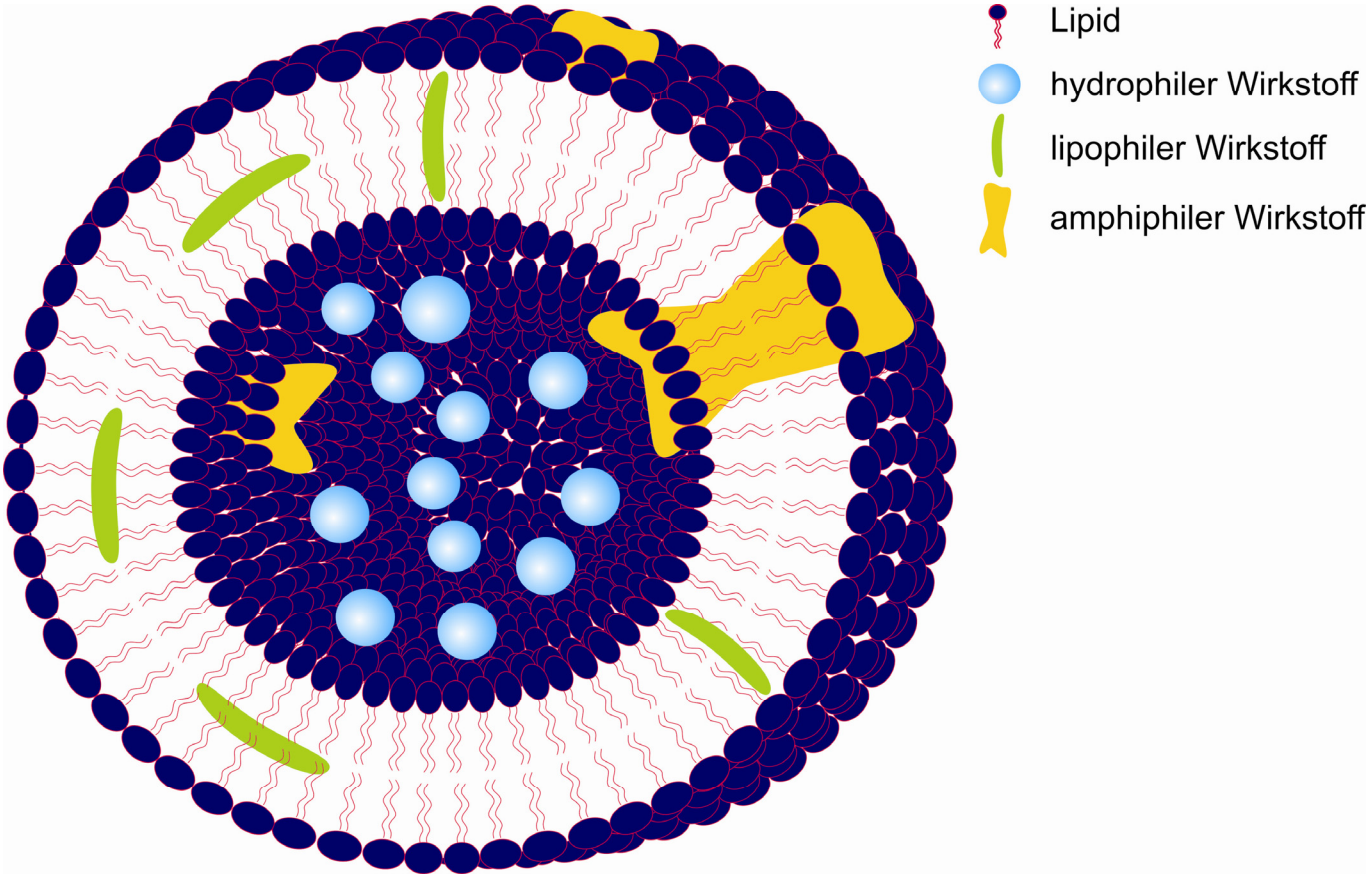

Abb. 1.9: Schematischer Aufbau eines Liposomes mit eingeschlossen Wirkstoffen.

Medium und der lipophile Teil zum Inneren der Lipiddoppelschicht steht [51-53]. Da Liposomen im Blut schnell von Makrophagen gefunden und eliminiert werden, konnten sie sich erst nach der Entdeckung des Stealth®-Effektes in den 90'er Jahren als „drug delivery system" durchsetzen [54-57]. Hier wird der Effekt von Polyethylenglycolen ausgenutzt, deren großer hydrophiler Anteil, nach Verankerung in der Lipiddoppelschicht, in das Medium herausragt und so die Erkennung durch Makrophagen erschwert.

1.6 Aufgaben und Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines neuen nanoskaligen Ultraschallkontrastmittels (NUSCA) auf der Basis verschiedener Lipidformulierungen für die Anwendung bei der sonothrombolytischen Therapie.

Die in dieser Arbeit verwendeten Herstellungs- und Charakterisierungsmethoden mit ihren theoretischen Hintergründen sind in **Kapitel 2** zusammengefasst.

In **Kapitel 3** werden die Einflüsse verschiedener Herstellungsmethoden auf die Eigenschaften der NUSCA beschrieben. Im ersten Schritt wurden Größe und Zetapotential aller Verbindungen analysiert, um anschließend die Struktur ausgewählter Formulierungen genauer mittels Raster-Kraft-Mikroskopie, cryo-Transmissionselektronenmikroskopie und Magnetresonanzspektroskopie zu beleuchten.

Kapitel 4 beschäftigt sich mit den Ultraschalleigenschaften der hergestellten NUSCA. Dabei wurde die Kontrastverstärkung in einem *in vitro* Modell bestimmt und mit dem kommerziell erhältlichen Ultraschallkontrastmittels (UCA) SonoVue® verglichen. Ein möglicher Einfluss der Struktur auf den Kontrast der NUSCA wird diskutiert.

Zur genaueren Aufklärung der Struktur der Formulierungen wurden die verwendeten Lipidmischungen untersucht und die Ergebnisse in **Kapitel 5** dargestellt. Dazu wurden Monoschichten der Lipide und ihrer Mischungen mit Hilfe an der Filmwaage gemessener Isothermen und Epifluoreszenzuntersuchungen auf ihr Mischungsverhalten hin untersucht. Der Einfluss der Mischbarkeit der Lipide auf die Struktur und Echogenizität der NUSCA stand dabei im Vordergrund der Studien.

In **Kapitel 6** wird der thrombolytische Effekt des NUSCA mit den besten kontrast-verstärkenden Eigenschaften der vorhergehenden Studien bestimmt. Dazu wurde der Massenverlust von Thromben aus menschlichem Vollblut in einem *in vitro* Modell nach Behandlung mit Ultraschall, thrombolytischen Arzneistoffen und dem neuen Kontrastmittel gemessen. Mit Hilfe von Raster-Elektronenmikroskopie wurden die Thromben zusätzlich auf Veränderungen ihrer Oberfläche getestet.

Kapitel 7 gibt eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit und einen Ausblick auf mögliche weitere Untersuchungen.

2. Methoden

2.1 Herstellung nanoskaliger Ultraschallkontrastmittel

2.1.1 Herstellung der DPPC/CH-Formulierungen

Allgemeine Herstellung

Zur Herstellung dieser Liposomen wurde die Filmbildungs-Rehydratations-Methode verwendet [49, 52]. Das Phospholipid 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC, bezogen von Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland) wurde mit dem Sterol Cholesterol (CH, bezogen von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) im molaren Verhältnis 70:30 aus Stammlösungen der Lipide in Chloroform/Methanol 2:1 (V/V, HPLC-Qualität bezogen von Fisher Scientific, Loughborough, Großbritannien) gemischt. Die Mischung der Stammlösungen wurde mit Hilfe des Rotationsverdampfers Heidolph Laborota 4000 efficient (Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) und eines speziell den Lösungsmitteln angepassten Programmes zur Druckabsenkung zu einem Lipidfilm getrocknet. Dabei wurde das Wasserbad des Rotationsverdampfers auf 40 °C geheizt und der Druck in folgenden Schritten abgesenkt: innerhalb von 30 s auf 800 mbar, nach weiteren 5 min auf 300 mbar und zuletzt in 10 min bis auf minimal 2 mbar. Zur Gewährleistung einer vollständigen Entfernung der Lösungsmittel aus dem Lipidfilm wurde der Druck für weiter 10 min bei 2 mbar gehalten. An der Kolbenwand musste ein gleichmäßiger und klarer Lipidfilm entstehen, der mit Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS 0,15mol/l) rehydriert wurde, sodass eine Endkonzentration von 10 mg Lipid in 1 ml Produkt entstand. Starkes Schütteln löste den Lipidfilm von der Wand des verwendeten Glaskolbens und ließ große Liposomen entstehen. Eine Behandlung im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex RK 100H, Bandelin Electronics, Berlin, Deutschland) bei maximaler Energie und 55 °C für 2 min führte zu einer Verkleinerung der Liposomen bis in den gewünschten Größenbereich.

Herstellung mit nachfolgender Extrusion

Bei dieser ersten Abwandlung der oben beschriebenen Herstellungsmethode sollte der Einfluss der Größe, der Größenverteilung und der Lamellarität auf die Eigenschaften der NUSCA getestet werden. Die wie oben beschrieben hergestellten Liposomen wurden mit Hilfe eines Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster (Alabama), USA), der mit 100 nm oder 200 nm Membranen ausgestattet wurde, bei 70 °C extrudiert, um so eine enge Größenverteilung und unilamellare Liposomen zu erhalten. Die Liposomen wurden in eine 1 ml Hamilton®-Spritze aufgezogen und von Hand elf Mal durch die entsprechende Membran gedrückt.

Herstellung mit nachfolgender Lyophilisation

Die Lyophilisation nach der Herstellung der Liposomen sollte zu einem besser lagerungsfähigen Produkt und einem höheren Ultraschallkontrast führen. Dabei wurden zum einen 125 µl 0,5 %iger (m/V) PEG4000-Lösung zu 1 ml fertiger Liposomen gegeben. Zum anderen wurde 1:1 mit 0,2 M Mannitol-Lösung verdünnt. Das Mannitol ist für sein Potential bekannt, den Ultraschallkontrast nach dem Lyophilisieren deutlich zu verbessern [58].

Herstellung mit Zusatz von DPPG

Die Zugabe von 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol (DPPG, bezogen von Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland) in den Konzentrationen 1, 2, 5, 8 und 10 mol% sollte das Zetapotential der Liposomen erniedrigen und so eine Aggregation dieser verhindern. Bei der Herstellung wurde jeweils der DPPC-Anteil der Mischung um die Menge des zugesetzten DPPG herabgesetzt.

2.1.2 Herstellung der DPPC/PEG40S und der DSPC/PEG40S-Formulierungen

Allgemeine Herstellung

Formulierungen aus Mischungen eines der Phospholipide 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC, bezogen von Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland) oder 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DSPC, bezogen von Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland) mit dem Polyethylenglykolderivat Polyethylenglykol-40-sterat (PEG40S, bezogen von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurden im molaren Verhältnis von 98:2 mol% ähnlich der oben beschriebenen Methode hergestellt. Die Stammlösungen wurden zu einem gleichmäßigen, leicht trüben Lipidfilm getrocknet, der anschließend mit PBS-Puffer zu einer Lipidkonzentration von 10 mg/ml rehydriert wurde. Auch hier schloss sich eine Behandlung im Ultraschallbad an. Die DPPC/PEG40S-Formulierungen wurden dabei bei 55 °C, die DSPC/PEG40S-Formulierungen bei 65 °C behandelt. Nach einer kurzen Beschallung von 20 s im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex RK 100H, Bandelin Electronics, Berlin, Deutschland), die dazu diente restliches Lipid von der Glaswand zu lösen, folgte eine Inkubation im Wasserbad für 60 min bei den erwähnten Temperaturen. Anschließend wurde für 2 min im Ultraschallbad bei maximaler Energie und den oben beschriebenen Temperaturen beschallt.

Herstellung mit nachfolgender Extrusion

Bei diesen Formulierungen sollte ebenfalls der Einfluss der Größe, der Größenverteilung und der Lamellarität auf die Eigenschaften der NUSCA getestet werden. Die Formulierungen wurden mit Hilfe des Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster (Alabama), USA), der mit 100 nm oder 200 nm Membranen ausgestattet wurde, bei 70 °C 11 mal extrudiert, um so eine enge Größenverteilung und unilamellare Vesikel zu erhalten.

Herstellung mit nachfolgender Lyophilisation

Die Lyophilisation zur Verbesserung der Echogenizität und Lagerfähigkeit wurde ohne Zusatz eines Kryoprotektants und nach 1:1 Verdünnung mit 0,2 M Mannitol-Lösung durchgeführt. Das Mannitol ist für sein Potential bekannt, den Ultraschallkontrast nach dem Lyophilisieren deutlich zu verbessern [58]. Der Versuch ohne Zusatz zu Lyophilisieren wurde durchgeführt, da schon PEG-Ketten in der Membran der Vesikel vorhanden waren, die für eine Protektion beim lyophilisieren sorgen könnten.

Herstellung mit Zusatz von DPPG

Die Zugabe von 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol (DPPG, bezogen von Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland) in den Konzentrationen 1, 2, 5, 8 und 10 mol% sollte auch hier die Aggregationstendenz der Formulierung verhindern. Bei der Herstellung wurde jeweils der DPPC- oder DSPC-Anteil der Mischung um die Menge des zugesetzten DPPG verringert.

Herstellung mit zusätzlicher Beschallung am Ultraschallhomogenisator

Dieser letzte Schritt der Abwandlung der Herstellungsmethode wurde nur für die PEG40S-haltigen Formulierungen durchgeführt. Dabei sollte zum einen der Einfluss einer zusätzlichen Behandlung mit dem Ultraschallhomogenisator Bandelin Sonorex RK 100H (Bandelin Electronics, Berlin, Deutschland) auf die Ultraschallaktivität geprüft werden. Nach der oben beschriebenen allgemeinen Herstellungsmethode wurden die noch warmen Lipid-Suspensionen für 20 s bei maximaler Leistung und 20 % Schallabgabe behandelt. Die Spitze des Homogenisators wurde dabei nur so weit abgesenkt, dass sie die Flüssigkeitsoberfläche gerade durchbrach. Der während der Beschallung entstehende Schaum wurde im Kolben zurück gelassen und nicht in die weiteren Analysen einbezogen. Zum anderen wurde der Einfluss der PEG40S-Konzentration auf die Echogenizität und die Struktur der Formulierungen analysiert. Dazu wurden Konzentrationsreihen der DPPC/PEG40S- und der

DSPC/PEG40S-Formulierungen mit jeweils 1, 2, 4, 6, 8 und 10 mol% PEG40S mit zusätzlicher Beschallung am Ultraschallhomogenisator hergestellt.

2.2 Charakterisierung nanoskaliger Ultraschallkontrastmittel

2.2.1 Dynamische Lichtstreuung

Zur Messung des hydrodynamischen Durchmessers der Formulierungen wurde der Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Herrenberg Deutschland), der mit der Methode der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) arbeitet, genutzt [49]. Licht eines HeNe Lasers (10mW) strahlte dabei in die Probe ein und wurde von dieser gestreut. Gemessen wurde die Streulichtintensität in einem 173° Winkel. Zur Berechnung der Partikelgröße wurde die Brownsche Molekularbewegung herangezogen. Je größer das Partikel ist, desto langsamer bewegt es sich im Medium und desto langsamer ändert sich die von ihm gestreute Lichtmenge. Dieser Zusammenhang wird in der Stokes-Einstein-Beziehung beschrieben:

$$d(H) = \frac{k_B\, T}{3\,\pi\,\eta\, D}$$ Formel 2.1

wobei d(H) den hydrodynamischen Durchmesser der Probe, k_B die Bolzmannkonstante, T die Temperatur in Kelvin, η die Viskosität des Mediums und D den Diffusionskoeffizient angibt [59]. Die Messungen wurden jeweils an mindestens drei unabhängigen Proben durchgeführt und das Ergebnis als Mittelwert ± Standardabweichung der Volumen-Auswertung angegeben. Für jede Probe wurde dabei der Mittelwert aus dreimal mindestens zehn Messungen berechnet. Messposition, Blendeneinstellung und genaue Anzahl der Messläufe wurden vom Zetasizer Nano ZS automatisch festgelegt.

Als Maß für die Einheitlichkeit der gemessenen Größen wird vom Zetasizer Nano ZS der Polydipersitätsindex (PDI) angegeben. Liegt diese einheitslose Zahl unterhalb von 0,200 kann von einer monomodalen Größenverteilung ausgegangen werden. Bei höheren Werten ist das Vorliegen mehrerer Größenklassen anzunehmen.

2.2.2 Laser-Doppler-Anemometrie

Auch zur Bestimmung des Zetapotential der Probe wurde der Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Herrenberg Deutschland) genutzt. Hier wurde jedoch das Messprinzip der Laser-Doppler-Anemometrie (LDA) angewendet, um die elektrophoretische Beweglichkeit der Probe zu bestimmen. An die speziellen Küvetten wurde dabei eine Spannung angelegt, die zur Ausbildung eines elektrischen Feldes führte. Die Oberflächenladung der Partikel führte zu einer Bewegung dieser in Richtung der gegensätzlich geladenen Elektrode. Durch Messung der Streuung eingestrahlten Laserlichtes (Messwinkel 17°) konnte die Geschwindigkeit dieser Bewegung bestimmt und mit Hilfe der Henry-Gleichung zum Zetapotential umgerechnet werden.

$$U_E = \frac{2\,\varepsilon\,\zeta\,f(Ka)}{3\,\eta}$$ Formel 2.2

mit U_E der elektrophoretischen Beweglichkeit, ε der Dielektrizitätskonstante des Mediums, ζ dem Zetapotential, f(Ka) der Henry-Funktion und η der Viskosität des Mediums [59]. Die Messungen wurden jeweils an mindestens drei unabhängigen Proben durchgeführt und das Ergebnis als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Für jede Probe wurde dabei der Mittelwert aus dreimal mindestens zehn Messungen berechnet. Messposition, Blendeneinstellung und genaue Anzahl der Messläufe wurden vom Zetasizer Nano ZS automatisch festgelegt.

2.2.3 Raster-Kraft-Mikroskopie

Bei dieser Methode, auch „atomic force microscopy“ (AFM) genannt, wird zur Visualisierung nanoskaliger Systeme die Oberfläche der Probe von einer sehr feinen Nadel abgetastet. Die Oberflächenstruktur führt zu einer Verbiegung des so genannten Cantilever, an dem die

Nadel befestigt ist, wodurch auf diesen gerichtete Laserstrahlen abgelenkt und gemessen werden. Diese Messwerte können dann als Abbildungen angezeigt werden [60].

Zur Anfertigung der in dieser Arbeit vorgestellten raster-kraft-mikroskopischen Bilder wurden 20 µl der jeweiligen Probe zum Trocknen auf Silicium-Chips überführt, da diese eine besonders glatte Oberfläche aufweisen. Die Messungen wurden, wie zuvor beschrieben [49, 61, 62] mit einem Nanoscope IV Bioscope (Veeco Instruments, Mannheim, Deutschland) unter Verwendung von kommerziell erhältlichen pyramidalen Si_3N_4-Spitzen (NSC16 AIBS, Mikromasch, Tallin, Estland) mit einem Cantilever von 230 µm Länge (Resonanzfrequenz 170 kHz, nominale Kraftkonstante 40 N/m) durchgeführt. Zur Verminderung von Beschädigungen der Probe wurde im tapping mode™ gemessen. Die Geschwindigkeit der Messung wurde abhängig von der Bildgröße eingestellt, während die Messfrequenz zwischen 0,5 und 1,5 Hz lag. Zur Visualisierung wurden Amplitudensignal und Höhensignal des Cantilevers aufgenommen. Die Partikelgröße wurde durch Ausmessen von jeweils mindestens 40 unterschiedlichen Partikeln in einem Bildausschnitt von 5 µm × 5 µm an fünf Proben ermittelt und als Durchmesser ± Standardabweichung angegeben.

2.2.4 cryo-Transmissionselektronenmikroskopie

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchstrahlt ein Elektronenstrahl eine sehr dünne Probe. Zur bildlichen Darstellung wird die Intensität der durchgetretenen Elektronen von einem Detektor erfasst. In dieser Arbeit wurde eine cryo-Fixierung (cryo-TEM) der Proben verwendet, da sie eine gute in situ Darstellung ermöglicht.

Zur Aufnahme der Bilder wurden die unverdünnten Proben auf spezielle Probenträger (Quantifoil® S7/2 Cu 400 mesh, holey carbon film grids, Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Deutschland) aufgebracht. Ein Tropfen der Probenlösung wurde auf den Träger gegeben und der größte Anteil der Flüssigkeit mit Filterpapier wieder entfernt, sodass ein dünner, über die Löcher des Trägers gespannter Film zurückblieb. Wie an anderer Stelle beschrieben [63],

wurde dieser Film in flüssigem Ethan bei 90 K schockgefroren, in das Mikroskop (Leo 912 Ω-mega, Leo Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen, Deutschland) eingebracht und bei etwa 100 K untersucht. Die Partikelgröße wurde durch Ausmessen von jeweils mindestens 40 unterschiedlichen Partikeln an fünf Proben ermittelt und als Durchmesser ± Standardabweichung angegeben.

2.2.5 Kernspinresonanzspektroskopie

^{31}P-Kernspinresonanzsprektroskopie (^{31}P-nuclear magnetic resonance spectroscopy, ^{31}P-NMR), kann ausgenutzt werden, um vesikuläre Strukturen kleiner 150 nm von größeren Strukturen zu unterschieden [64, 65]. Ausgenutzt wird dabei die unterschiedliche Anordnung des Phosphates der Phospholipide in Doppelschichten größerer Liposomen oder in einschichtigen Mizellen. ^{31}P-Kernspinresonanzspektroskopie wurde in dem Lösungsmittel D_2O bei einer Gesamtlipidkonzentration von 10mg durchgeführt. Unter Einstellung einer Spektralweite von 50 ppm bei einer Resonanzfrequenz von 202,47 MHz (11,7 T) konnten die Messungen am JEOL ECA-500 Spektrometer (JEOL GmbH, Echingen, Deutschland) mit einer JEOL Breitband Messsonde (NM-03520TH5) bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Die Summierung von 1000 Messungen mit 4,5 µs Pulsen und einem „line broadening“ von 2 oder 30 Hz, angewendet vor der Fourier-Transformation, ergab die Spektren [66].

2.3 Untersuchungen der Echogenizität nanoskaliger Kontrastmittel

2.3.1 Messung der Ultraschallkontrastverstärkung

Wie zuvor veröffentlicht [49] wurde zur Bestimmung der Kontrastverstärkung unserer NUSCA nach den Vorgaben von Kollmann *et al.* [67] ein Durchflussmodell gebaut (Abb. 2.1). Das Herzstück dieses Modells ist ein mit Agar-Gel gefülltes 2,5 l Kunststoffbecherglas. In einem Winkel von 30° wurde ein spezieller Silikonschlauch (C-flex®, Cole-Parmer Inc., Illinois, USA) in das Gel eingebettet. Die Ultraschalleigenschaften des Schlauches entsprechen dabei etwa den Ultraschalleigenschaften menschlicher Blutgefäße, während das Agar-Gel die Eigenschaften menschlichen Gewebes nachstellt. Für gleichbleibende Eigenschaften musste bei der Lagerung des Modells darauf geachtet werden, dass das

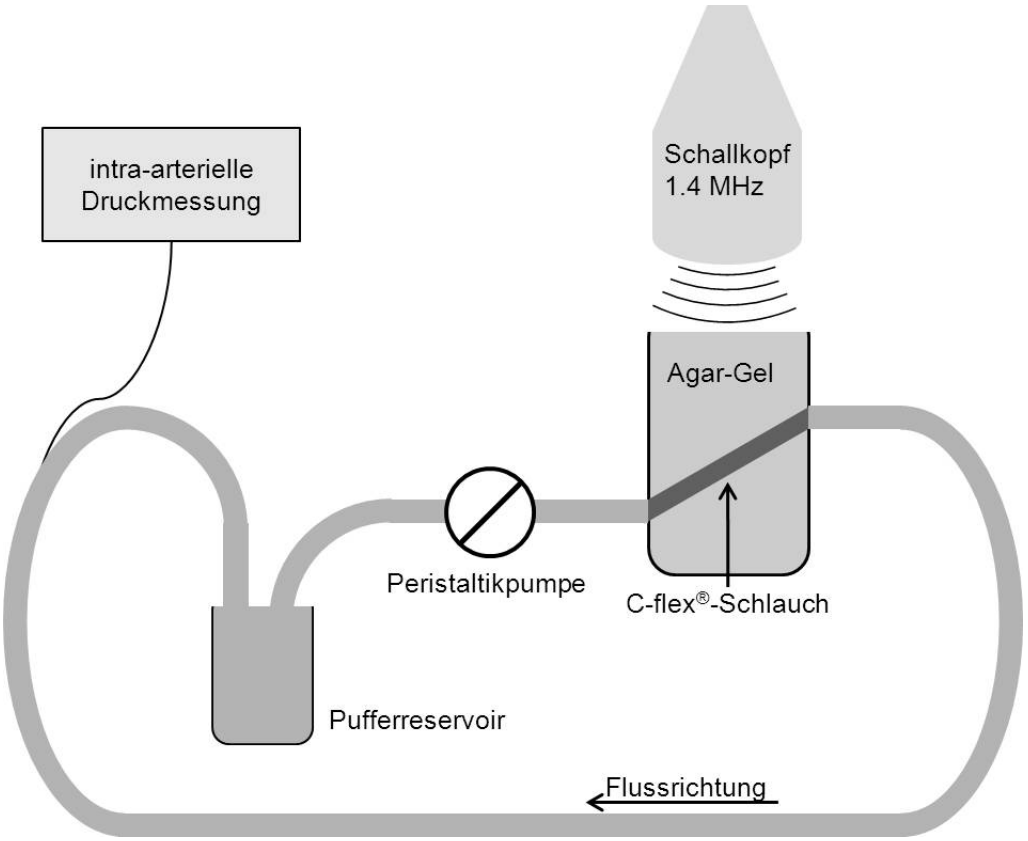

Abb. 2.1: Schematischer Aufbau des Durchflussmodells zur Bestimmung der Kontrastverstärkung

Agar-Gel nicht austrocknete [67]. Mit Hilfe von laborüblichen Silikonschläuchen wurde der eingebettete Spezialschlauch an eine Peristaltikpumpe angeschlossen. In einem Schlauch lag dabei eine Sonde zur Messung intra-arterieller Blutdrücke, die eine Überwachung des Druckes in dem Schlauchsystem garantierte. Die Peristaltikpumpe war so eingestellt, dass der Druck im System etwa dem menschlichen Normblutdruck von 120/80 mmHg entsprach. Als Trägermedium diente auf 37 °C temperierter Tris-Albumin-Puffer pH 7,4. 50 ml des Puffers zirkulierten durch die Schläuche, während sich weitere 50 ml in einem temperierten Reservoir befanden, um ein Auskühlen zu vermeiden. Die Kontrastmittel (NUSCA und SonoVue®) wurden in das Pufferreservoir eingespritzt und verteilten sich durch die Strömung im Schlauchsystem. Eine Verzögerung der Schallverstärkung von etwa 12-15 s und ein langsames Anfluten des Kontrastes lassen sich durch dieses Vorgehen begründen. Die Mengen der Kontrastmittel wurden dabei so gewählt, dass die enthaltenen Bläschen bzw. Liposomen äquivalente Volumina umschlossen. Typische Ultraschallbilder (erhalten mit SonoVue®), die das langsame Ansteigen des Ultraschallkontrastes zeigen sind in Abbildung 2.2 zu sehen.

Die Ultraschallsonde (2,5 MHz Sektorschallkopf) eines SONOLINE Elegra (Siemens AG, Erlangen, Deutschland) wurde so auf dem Agar-Gel positioniert, dass der C-flex® Schlauch

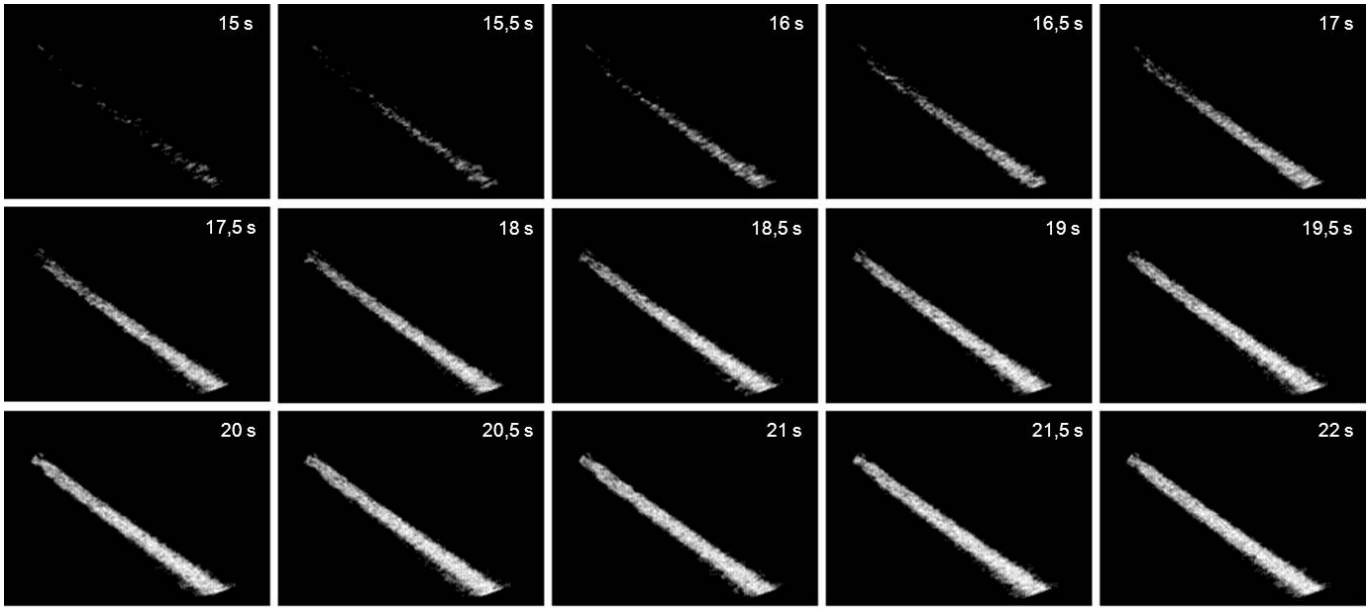

Abb. 2.2: Anstieg des Ultraschallkontrastes im Durchflussmodell, aufgenommen mit SonoVue®

in der Bildmitte gut zu sehen war. Zur Gewährleistung einer ultraschalldurchlässigen Verbindung diente eine Schicht Ultraschallkontaktgel zwischen Schallkopf und Agar-Oberfläche. Die axiale Auflösung der Sonde wurde mit 0,7 mm angegeben, die laterale Auflösung hängt von der Breite des gescannten Bereiches ab und lag bei den verwendeten Einstellungen bei 3 mm. Gearbeitet wurde mit einer Frequenz von 1,4 MHz, einer Penetrationstiefe von 10 cm und einem dynamischen Bereich von 40 dB. Als MI wurde 0,4 gewählt, um eine stabile, nicht-lineare Oszillation der Kontrastmittel zu gewährleisten.

Nach der Zugabe der Kontrastmittel wurden jede Sekunde zwei Ultraschallbilder auf einer magnetooptischen Diskette als 8-bit Grauwertbilder abgespeichert. Mit der Software ImageJ 1.42q (National Institute of Health, Bethesda (Maryland), USA) wurde der mittlere Grauwert jedes Bildes in einer definierten „region of interest“ (ROI) von mindestens 20 Bildern jeder Probe bestimmt. Der mittlere Grauwert des ersten gespeicherten Bildes wurde von allen weiteren Bildern einer Testreihe subtrahiert, da leichte Schallphänomene des Agar-Gels oder des Becherglases nicht bei jeder Versuchsreihe identisch waren. Um die Vergleichbarkeit der mittleren Grauwerte zu ermöglichen wurde das kommerzielle UCA SonoVue® als Vergleich benutzt. Die Kontrastverstärkung von frisch nach Herstelleranweisungen angefertigtem SonoVue® wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Messwerte als prozentuale Anteile dieses Wertes angegeben.

Es wurden jeweils mindestens drei voneinander unabhängige Proben vermessen.

2.3.2 Stabilität des Ultraschallkontrastes

Die Stabilität des Ultraschallkontrastes wurde in dem gerade beschriebenen Durchflussmodell auf zwei verschiedene Arten getestet. Zum einen wurde die Stabilität des Kontrastes nach dem Einspritzen der Probe für 5 min beobachtet. Die Schallstabilität im Modell diente dabei zur Abschätzung der Schallstabilität im menschlichen Blutkreislauf. Eine

lange Zirkulationszeit ist dabei für den Untersucher vorteilhaft, da Nachdosierungen des Kontrastmittels vermieden werden sollten.

Außerdem wurden Proben für 14 Tage bei 2-8 °C gelagert. Ultraschallkontrastmessungen dieser Proben wurden am Tag der Herstellung und nach 2, 4, 7 und 14 Tagen durchgeführt und anhand der mittleren Grauwerte analog zu der oben beschriebenen Methode ausgewertet. Eine hohe Lagerungsstabilität könnte dabei für eine Mehrfachanwendung geöffneter Behältnisse entscheidend sein.

2.4 Mischbarkeitsstudien an Lipiden

2.4.1 Monoschichtmessungen an der Langmuir-Filmwaage

Die von I. Langmuir im Jahre 1917 [68] entwickelte Technik eignet sich, um die Phasenlage und Mischbarkeit von amphiphilen Substanzen zu untersuchen. Ausgenutzt wird dabei der Effekt, dass sich amphiphile Substanzen an der Oberfläche einer hydrophilen Flüssigkeit (Wasser oder wässrige Lösungen) spontan auf eine bestimmte Weise anordnen. Dabei orientieren sich die hydrophilen Molekülteile zur Flüssigkeit, während die lipophilen sich zur Gasphase ausrichten. Die erniedrigte Grenzflächenspannung des Wassers durch die entstehende Monoschicht kann mit der von L. Wilhelmy 1863 beschriebenen Methode gemessen werden [69]. Der Unterschied zwischen der Grenzflächenspannung reinen Lösungsmittels und der entstandenen Monoschicht wird als Lateraldruck (Π) oder Spreitungsdruck bezeichnet und zur Auswertung der Messungen genutzt.

Eine Langmuir-Filmwaage (Abb. 2.3) besteht aus einem Trog aus inertem Material (meist Teflon), der mit der Wasserphase gefüllt und thermostatiert wird. Begrenzt wird die Oberfläche der Wasserphase von beweglichen Barrieren, an die eine Messeinrichtung zur Bestimmung der aktuellen Fläche angeschlossen ist. Die beschriebene Wilhelmy-Platte dient der Messung der Oberflächenspannung. Computergesteuert wird die Oberfläche der

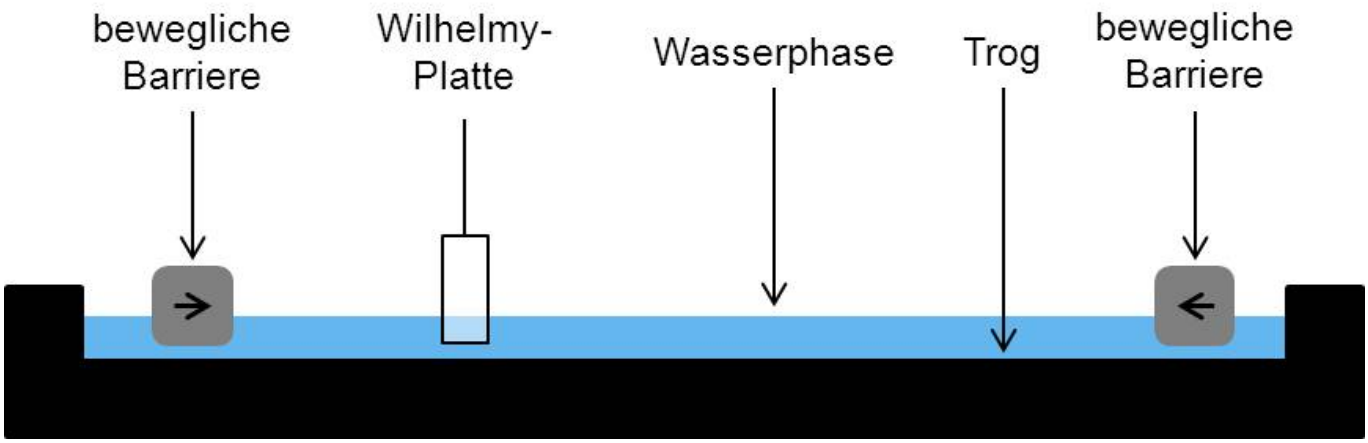

Abb. 2.3: Schematischer Aufbau einer Filmwaage

Flüssigkeit gleichmäßig verkleinert (Dynamische Kompressionsmethode) und der entstehende Lateraldruck (Π) gegen die Gesamtfläche oder die Fläche pro Molekül (A) als Diagramm (Π/A-Isotherme) aufgetragen. Durch die Verkleinerung der Fläche wird die Wechselwirkung zwischen den amphiphilen Molekülen verstärkt und es können verschiedene Phasenlagen durchlaufen werden. So ist es möglich ein zweidimensionales Phasendiagramm bei konstanter Temperatur zu erstellen [60]. Abbildung 2.4 zeigt die theoretisch möglichen Phasenzustände am Beispiel des DPPC. Bei geringem Druck, bevor die Fläche verkleinert wird, stellt sich eine Koexistenz zwischen der gas-analogen und der flüssig-expandierten Phase ein. In der gas-analogen Phase existieren fast keine intermolekularen Wechselwirkungen, während bei der flüssig-expandierten Phase die Moleküle beginnen sich aufzurichten und mit einander in Wechselwirkung zu treten. Der nachfolgende Anstieg des Druckes kennzeichnet die reine flüssig-expandierte Phase, gefolgt von einem „Plateau“, welches die Koexistenz von flüssig-expandierter und flüssig-kondensierter Phase darstellt. Im steil ansteigenden letzten Teil der Kurve liegt die reine flüssig-kondensierte Phase, in der die Moleküle sich aufgerichtet haben und alle miteinander

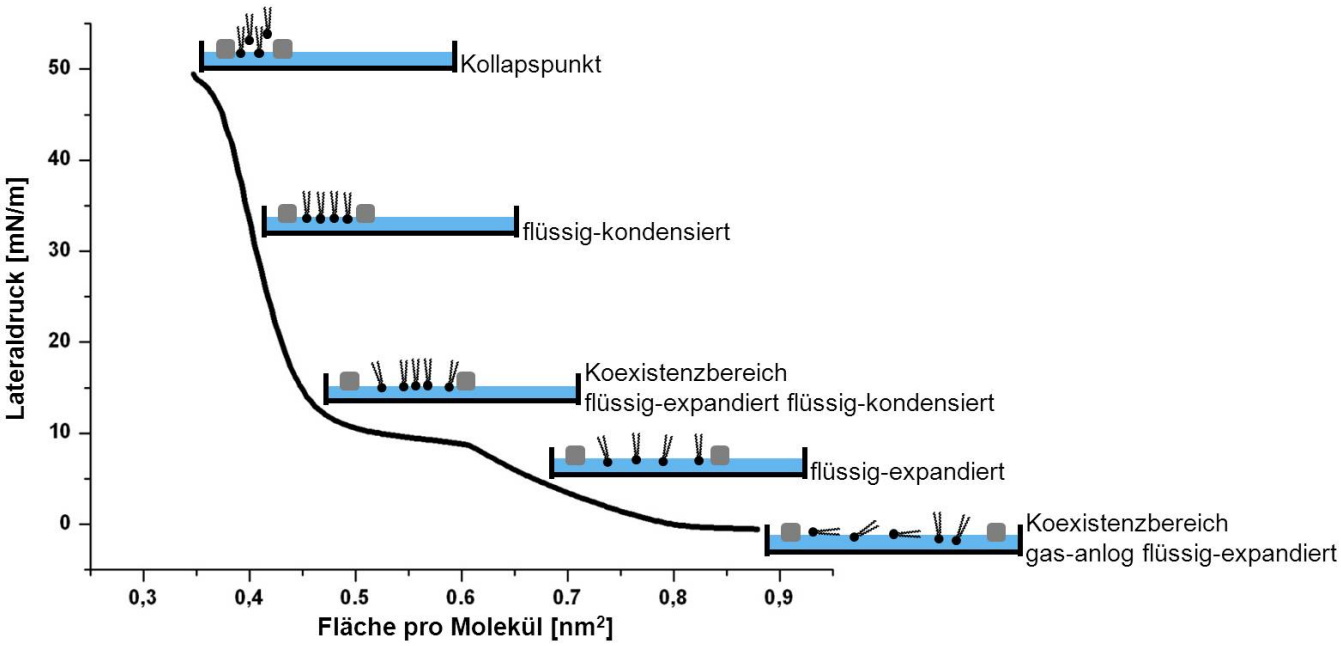

Abb. 2.4: Π/A-Isotherme von DPPC bei 25 °C mit Bezeichnung der durchlaufenen Phasenzustände

in Wechselwirkung stehen. Am Endpunkt, dem sogenannten Kollapspunkt, wird der Druck so groß, dass die Monoschicht aufbricht und die Lipide übereinander geschoben werden. Diese Phasen sind für jede Substanz sehr charakteristisch und können zur Bestimmung von Reinheit bzw. Gehalt einer Probe verwendet werden. Auch die Mischbarkeit amphiphiler Substanzen kann an den Π/A-Isothermen abgelesen werden. Bei vollständiger Mischbarkeit ergibt sich das Diagramm der Mischung aus dem Mittelwert der Einzelsubstanzen, bei teilweiser Entmischung entstehen häufig zusätzliche Kollapspunkte, an denen eine Substanz aus dem Film verdrängt wird [70].

In dieser Arbeit wurde eine speziell angefertigte, an anderer Stelle beschriebene [71], Langmuir-Filmwaage verwendet. Der rechteckige Teflon-Trog mit einer Fläche von 160 cm^2 und einer Tiefe von 3 mm wurde mit frisch hergestelltem und gefilterten (Filterporen 0,2 µm) bidestilliertem Wasser gefüllt und auf 25 °C temperiert. Ein kommerziell erhältliches Wilhelmy-System der Firma R&K GmbH (Mainz, Deutschland) diente zur Messung des Lateraldruckes. Die zu untersuchenden Substanzen (DPPC, DSPC, PEG40S und ihre Mischungen), in Chloroform zu einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst, wurden mit Hilfe einer Mikroliterspritze auf die Luft-Wasser-Grenzfläche aufgebracht, nachdem die Wasserphase 25 °C stabil erreicht hatte. Berechnet wird das Volumen der Stammlösung so, dass bei kleinstmöglichem Abstand der Barrieren die Oberfläche vollständig mit Molekülen besetzt war. Nach dem Aufbringen der Lösung spreiten die amphiphilen Moleküle auf der Wasseroberfläche und bilden eine Monoschicht aus, um dies zu gewährleisten wurde eine Inkubationszeit von 5 min eingehalten, nach der die Barrieren den Film mit einer konstanten Geschwindigkeit von 0,02 nm^2 pro Minute und Molekül komprimierten. Zur Auswertung der Messung wurden die aufgezeichneten Π/A-Isothermen dreier unabhängiger Experimente gemittelt.

2.4.2 Epifluoreszenzmessungen an Monoschichten

Eine weitere Möglichkeit die Mischbarkeit amphiphiler Substanzen zu untersuchen ist die Kombination einer Langmuir-Filmwaage mit einem Fluoreszenzmikroskop [60]. Bei diesem Verfahren wird den Monoschichten ein fluoreszenzmarkiertes Lipid beigemischt, das sich ausschließlich in der flüssig-expandierten Phase löst und die Phasenlage der Substanzen nicht verändert. Daher erscheinen die flüssig-expandierten Phasen auf dem Fluoreszenzbild hell, während alle anderen Phasen dunkel bleiben. Die Verteilung heller und dunkler Domänen ist dabei abhängig von dem Lateraldruck und der verwendeten Substanz. Bei Mischungen können veränderte Verteilungen im Vergleich zu den Reinsubstanzen beobachtet werden. Eine fluide Substanz vergrößert dabei die hellen Domänen im Film einer rigiden Substanz, wenn beide nicht miteinander mischbar sind. Ein rigides Lipid würde im Gegenzug früher dunkle Domänen der flüssig-kondensierten Phase in einem eher fluiden Film bilden.

In dieser Studie wurde die Filmwaage mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Olympus Optical Co. GmbH (Hamburg, Deutschland) und einer Kamera (Proxicam, Proxitronic KG, Bensheim, Deutschland) kombiniert. Als Fluoreszenzmarker wurde den Filmen N-NBD-PE (1, 2- dipalmitoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine-N- (7-nitro-2-1, 3- benzoxadiazol-4- yl), Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster (Alabama), USA) in einer Konzentration von 0,5 mol% zugesetzt. Wie oben beschrieben wurden Isothermen der Lipidmischungen aufgenommen. Bei Lateraldrücken von 10, 20 und 40mN/m wurden Bilder digital abgespeichert und mit Biorad Quantity one Software v1.1 (Biorad, München, Deutschland) ausgewertet.

2.5 *in vitro* Untersuchungen nanoskaliger Kontrastmittel

2.5.1 Herstellung der Thromben

Zur Herstellung der Thromben wurde die spontane Gerinnung ruhig gelagerten Blutes ausgenutzt [50]. Dabei wurde menschliches Vollblut, das regelmäßig von einem gesunden Probanden durch sterile Venenpunktion gewonnen wurde, verwendet, um möglichst genau die Bedingungen einer Thrombolyse *in vivo* nachzustellen. Der Einfluss der Zusammensetzung der Thromben auf die thrombolytische Resistenz ist in verschiedenen Studien beschrieben worden [72, 73]. Jeweils 500 µl des Blutes wurden ohne Verzug in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und zur Bildung von Thromben für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert, wobei auf erschütterungsfreie Lagerung zu achten war. Durch vorsichtiges Umdrehen der Gefäße nach 20 und 40 min wurde die vollständige Sedimentation der Blutzellen verhindert. Zur Sicherstellung maximaler thrombolytischer Resistenz wurden die Thromben vor Versuchsbeginn für 72 h bei 2-8 °C gelagert [50].

2.5.2 *in vitro* Modell

Das Modell zur Bestimmung der sonothrombolytischen Eigenschaften wurde ähnlich dem Modell von Cintas *et al.* [33] entwickelt und gebaut. Eine Teflon-Kammer mit einem inneren Durchmesser von 30 mm, einem eingebauten Filter und beidseitigen Schlauchanschlüssen wurde in ein geschlossenes Schlauchmodell integriert (Abb. 2.5). Eine Cellophanfolie (20 × 15 mm) wurde mit Hilfe eines Rahmens in der Oberseite der Kammer befestigt und garantierte ein ungehindertes Eindringen des US in die Kammer. Der eingebaute Filter verhinderte ein mögliches Ausspülen des Thrombus aus der Kammer in das Schlauchsystem. Durch in das Schlauchsystem eingebaute Dreiwegehähne konnten NUSCA

und Arzneistoffe eingespritzt werden. Eine weitere kleine Kammer diente als Auffangbehältnis für evtl. im Schlauchsystem verbliebene Luftblasen, die sich sonst direkt unter der Cellophanfolie gesammelt und den Eintritt des US in die Kammer gestört hätten. Als Antrieb der Strömung diente auch hier eine Peristaltikpumpe (Pumpdrive 5001, SP standard, Heidolph instruments, Schwabach, Deutschland), die einen pulsatilen Fluss mit einer Geschwindigkeit von 40 ml/min aufbaute. Das Trägermedium war auch bei diesen Versuchen Tris-Albumin-Puffer pH 7,4, von dem sich 90 ml im Schlauchsystem und der Kammer befanden. Nach dem Einlegen eines Thrombus in die Kammer wurde das ganze Modell mit frischem Puffer gefüllt und so lange gespült, bis sich keine Blasen mehr unter der Cellophanfolie sammelten. Damit die Blasen aus der Kammer gespült werden konnten, musste diese senkrecht gehalten werden. Erst nachdem bei leichtem Aufklopfen auf eine Tischplatte keine Blasen mehr in der Kammer sichtbar wurden, konnte die Schlauchverbindung zu einem geschlossenen Kreislauf verbunden und der Versuch gestartet werden. Zur Gewährleistung einer konstanten Temperatur wurde die gesamte

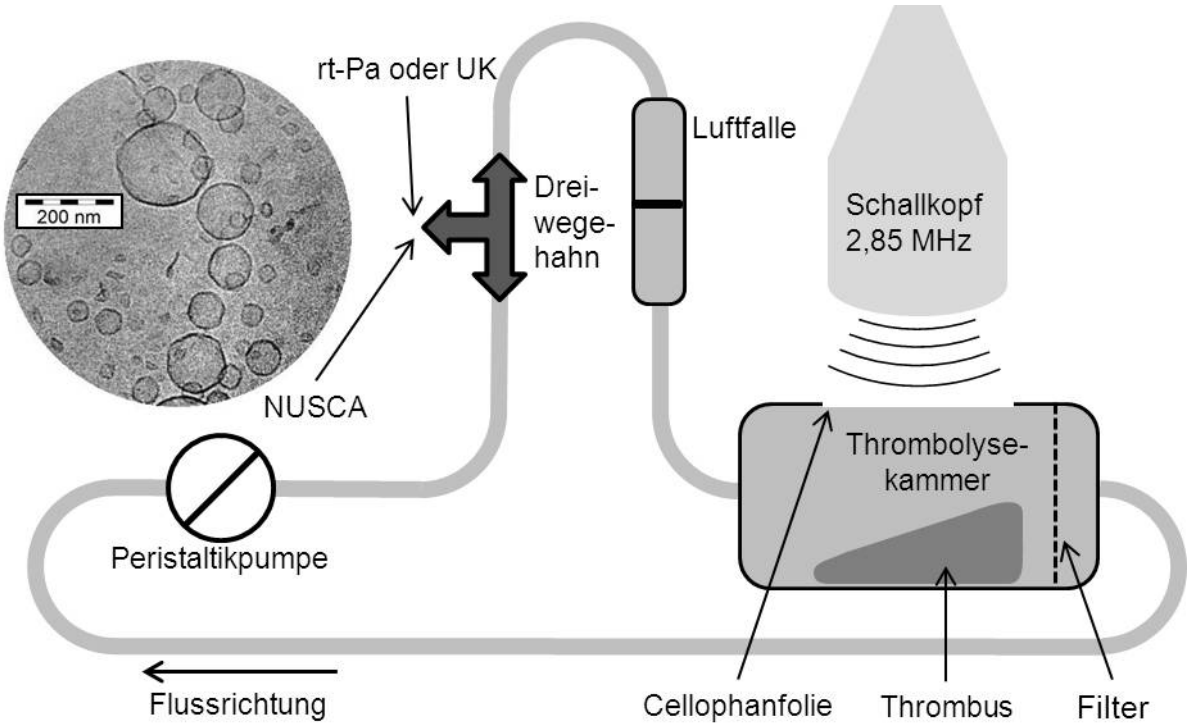

Abb. 2.5: Schematischer Aufbau des Modells zur Bestimmung der sonothrombolytischen Eigenschaften

Kammer in ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad gestellt. Der Ultraschallkopf wurde so eingestellt, dass sich der schallabgebende Teil unter der Wasseroberfläche befand. Dabei wurde kontrolliert, dass der Thrombus gut mittig unter der Cellophanfolie und so im Ultraschallfokus lag (Abb. 2.6 A). Nach dem Einspritzen der NUSCA musste sich die Kammer mit einem gleichmäßigen Ultraschallkontrast füllen (Abb. 2.6 B), so war sichergestellt, dass im Modell ein gleichmäßiger Fluss generiert wurde, ohne dass sich die Arzneistoffe oder NUSCA an einer Stelle sammelten und dadurch nicht zu ihrem Wirkort, dem Thrombus, gelangen konnten.

Als Arzneistoffe wurden UK und rt-Pa verwendet, die wie folgt dosiert wurden. In der Klinik wird rt-Pa mit 0,9 mg/kg Körpergewicht dosiert. Geht man von einem Blutvolumen von 6-8% des Körpergewichtes aus entspricht das einer Masse von 0,9 mg rt-Pa auf etwa 54 ml Blutvolumen. Umgerechnet auf unsere 90 ml Puffervolumen im Schlauchsystem sind das 1,5 mg rt-Pa für einen Versuch. Die UK wird nicht auf das Körpergewicht bezogen dosiert, sondern es werden immer zuerst 250.000 I.E. gegeben, tritt dann keine Rekanalisation ein werden weitere 250.000 I.E. gespritzt. Bei unseren Thrombolyseversuchen werden zu Beginn eines Versuches 250.000 I.E. in das Schlauchsystem gespritzt.

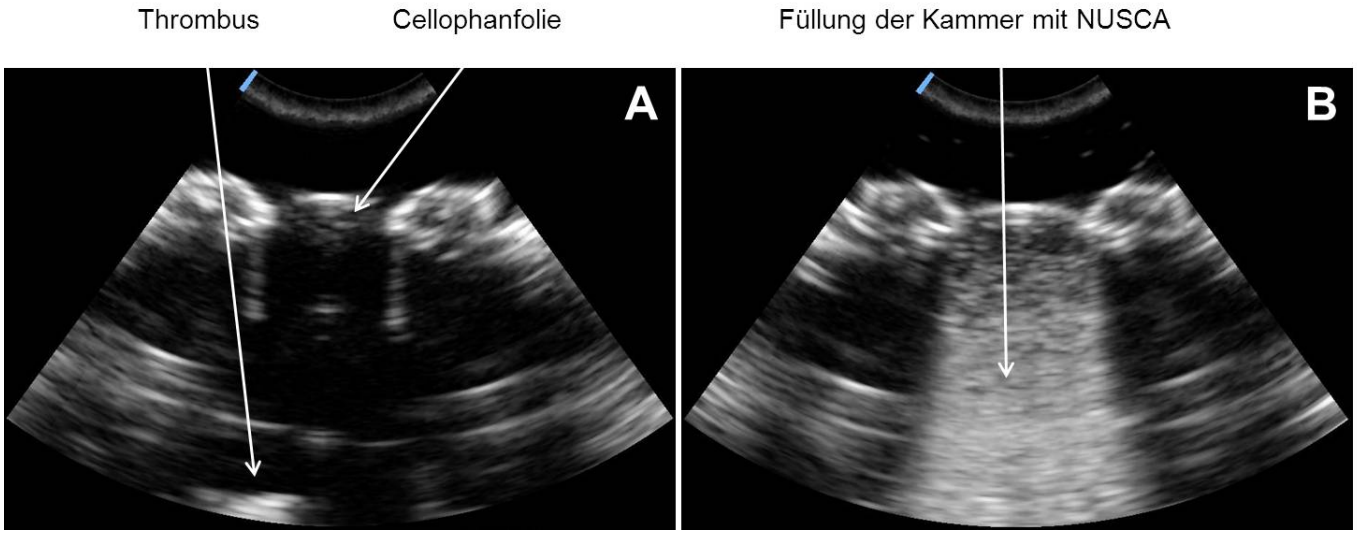

Abb. 2.6: Ultraschallbilder der Thrombolysekammer; A: vor Injektion des NUSCA sind Cellophanfolie und Thrombus gut zu sehen, B: nach Injektion des NUSCA füllt eine guter Kontrast die Kammer

Zur US-Erzeugung wurde in dieser Versuchsreihe ein tragbares Ultraschallgerät der Firma eZono (eZono 3000, eZono AG, Jena, Deutschland) verwendet, das mit einem 3,5 MHz Konvexschallkopf (35CL20-PRB, Prosonic CO. LTD, Gyonju-Si, GyongBuk, Korea) ausgestattet war. US wurde mit einer Frequenz von 2,85 MHz, einer Intensität von 1,49 mW/cm^2 und einem MI von 0,5 ausgesendet. Der Ultraschallkopf wurde zur Sicherung der ungehinderten Ausbreitung des US so angebracht, dass der schallemittierende Bereich unterhalb der Wasseroberfläche lag, und in einem Abstand von 60 mm zum Thrombus fixiert, dem Abstand, der auch als Fokus eingestellt wurde. Zur Vereinfachung der Einstellung des Schallkopfes diente ein Abstandshalter, der an der Kammer befestigt und beim Austausch des Thrombus einfach gelöst werden konnte. So musste der richtige Abstand zwischen Schallkopf und Kammer nicht nach jedem Wechsel des Thrombus neu eingestellt werden.

2.5.3 Versuchsablauf und Bestimmung des Masseverlustes der Thromben

Zur Bestimmung der sonothrombolytischen Eigenschaften wurden Gruppen von jeweils zehn Thromben für 30 min mit dem beschriebenen US, evtl. zusätzlichem Arzneistoff (rt-Pa oder UK) und/oder NUSCA behandelt. Dabei wurden die in Tabelle 2.1 beschriebenen Gruppen gebildet. Die Bestimmung des prozentualen Masseverlustes ($MV_{\%}$) der, wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben hergestellten, Thromben diente der Auswertung der Versuchs-

Gruppe	Behandlung
A	nur US
B	US + NUSCA
C	US + UK
D	US + UK + NUSCA
E	US + rt-Pa
F	US + rt-Pa + NUSCA

Tab. 2.1: Gruppeneinteilung der sonothrombolytischen Messungen

reihe. Vor dem Einlegen in die Thrombolysekammer wurde das Ausgangsgewicht (M_A) der Thromben ohne vorherigen Trocknungsschritt auf einer mit einem Drahtkörbchen ausgestatteten Analysenwaage (Denver Instruments, Göttingen, Deutschland) auf die vierte Nachkommastelle genau bestimmt. Direkt nach dem Ende der Beschallung konnte so auch das Endgewicht (M_E) ermittelt werden. Der prozentuale Massenverlust berechnete sich nach folgender Formel:

$$MV_{\%} = \frac{M_A - M_E}{M_A} \times 100\%$$ Formel 2.3

Alle Versuchsreihen wurden auf Ausreißer und statistische Signifikanz untereinander getestet. Der Ausreißertest nach Grubbs und der studentische t-Test wurden mit Hilfe des Programmes Excel (Version 14.0.6112.5000, Microsoft Office, Microsoft Corporation, Redmond, USA) berechnet, wobei $p \leq 0{,}002$ als statistisch signifikant angesehen wurde.

2.5.4 Fixierung und Abbildung der Thromben

Zur Untersuchung der Thrombusoberfläche nach den sonothrombolytischen Messungen wurde die Rasterelektronenmikroskopie (REM) verwendet, die ähnlich der Transmissions-elektronenmikroskopie die Probe mit einem Elektronenstrahl abtastet. Bei dieser Methode wird aber der reflektierte Anteil der Elektronen von dem Detektor ermittelt und zu einer Abbildung der Oberfläche der Probe verarbeitet.

Die Thromben wurden vor der Untersuchung für 24 h bei 4 °C in 2,5 %iger Glutaraldehydlösung fixiert [34]. Anschließend wurde durch jeweils 10 minütiges Einlegen der Thromben in Lösungen mit ansteigenden Ethanolkonzentration (50 %, 70 %, 95 % und 100 %) das Wasser aus der Probe verdrängt, diese danach mit Leitsilber auf einem Aluminiumprobenhalter fixiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Das Aufbringen einer dünnen Goldschicht durch Kathodenzerstäubung mit einem S 150 SPUTTER COATER

(Edwards High Vacuum International LTD, Crawley, Großbritannien) unter Argon-Atmosphäre diente zur Verbesserung der Bildqualität. Mit Hilfe eines Hitachi S-510 (Hitachi High-Technologies Europe GmbH, Krefeld, Deutschland) wurden die Proben bei 25 kV untersucht und die Bilder digital abgespeichert.

3. Herstellung und Charakterisierung nanoskaliger Ultraschallkontrastmittel

Das Ziel dieses Teiles der Arbeit ist die Entwicklung eines neuen Ultraschallkontrastmittels im Größenbereich bis 300 nm. Dieses NUSCA sollte dabei eine gute Kontrastverstärkung mit langen Zirkulationszeiten und guter Verträglichkeit verknüpfen. Die Verwendung von liposomalen Formulierungen erschien aufgrund der zusätzlichen Möglichkeit zur Verkapselung von Arzneistoffen sehr geeignet. Die Verwendung von Liposomen zur kontrollierten und verzögerten Wirkstofffreisetzung ist ein bekanntes Prinzip [52]. In diesem Kapitel wurden verschiedene Formulierungen und das kommerzielle Kontrastmittel SonoVue® auf ihre physikochemischen Eigenschaften untersucht.

3.1 Ergebnisse

3.1.1 Dynamische Lichtstreuung und Laser-Doppler-Anemometrie

Allgemeine Herstellung

Der hydrodynamische Durchmesser und das Zetapotential der nach allgemeiner Herstellungsmethode produzierten Formulierungen wurden wie in den Kapiteln 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben bestimmt und in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Für die DPPC/CH-Formulierung konnte eine Größe von 218,7 ± 19,8 nm gemessen werden. Die DPPC/PEG40S-Formulierungen waren 173,4 ± 18,2 nm groß und die DSPC/PEG40S-Formulierungen 195,8 ± 25,7 nm. Der PDI lag für alle Formulierungen zwischen 0,45 und 0,54 und zeigte damit an, dass keine monomodale Größenverteilung vorlag.

Das Zetapotential aller Formulierungen ist in Tabelle 3.1 aufgeführt und liegt, wie zu erwarten war, im negativen Bereich. Für die DPPC/CH-Formulierungen konnten -5,35 mV, für DPPC/PEG40S -1,70 mV und für DSPC/PEG40S -3,31 mV gemessen werden.

NUSCA	Zetapotential [mV]	Durchmesser ± Standardabweichung [nm]	PDI
DPPC/CH (70:30)	-5,35 ± 3,24	218,69 ± 19,81	0,455
DPPC/PEG40S (98:2)	-1,70 ± 0,82	173,42 ± 18,23	0,472
DSPC/PEG40S (98:2)	-3,31 ± 1,03	195,78 ± 25,75	0,543
DPPC/CH (70:30) Extrusion 200 nm	-8,84 ± 3,63	196,61 ± 10,83	0,145
DPPC/PEG40S (98:2) Extrusion 200 nm	-5,04 ± 1,65	118,14 ± 9,26	0,289
DSPC/PEG40S (98:2) Extrusion 200 nm	-7,18 ± 1,54	126,32 ± 19,80	0,257
DPPC/CH (70:30) Extrusion 100 nm	-8,00 ± 4,22	142,89 ± 13,35	0,150
DPPC/PEG40S (98:2) Extrusion 100 nm	-6,17 ± 2,40	131,60 ± 5,77	0,354
DSPC/PEG40S (98:2) Extrusion 100 nm	-4,31 ± 1,22	117,09 ± 4,71	0,377
DPPC/CH (70:30) lyophilisiert mit PEG 4000	-7,72 ± 1,71	205,61 ± 47,99	0,959
DPPC/PEG40S (98:2) lyophilisiert ohne Zusatz	-3,17 ± 2,66	351,06 ± 295,14	1,000
DSPC/PEG40S (98:2) lyophilisiert ohne Zusatz	-4,05 ± 1,10	363,15 ± 330,00	0,785
DPPC/CH (70:30) lyophilisiert mit Mannitol	-8,28 ± 3,97	222,72 ± 25,81	0,926
DPPC/PEG40S (98:2) lyophilisiert mit Mannitol	-1,89 ± 0,33	169,66 ± 72,40	0,802
DSPC/PEG40S (98:2) lyophilisiert mit Mannitol	-2,29 ± 0,42	158,04 ± 20,74	0,709

Tab. 3.1: Zetapotential, Größe und PDI unterschiedlich hergestellter NUSCA ermittelt mit Hilfe von Laser-Doppler-Anemometrie und Dynamischer Lichtstreuung

Herstellung mit nachfolgender Extrusion

Durch Extrusion liposomaler Formulierungen kann eine Reduktion der Größe, eine Verbesserung der Größenverteilung und eine Unilamellarität der Vesikel erreicht werden. Die mittels DLS gemessenen Größen sind auch in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Nach der Extrusion durch die 200 nm Membran ergab sich für die DPPC/CH-Liposomen ein hydrodynamischer Durchmesser von 196,61 ± 10,83 nm mit 0,145 als PDI, die DPPC/PEG40S-Formulierung war noch 118,14 ± 9,26 nm groß und hatte einen PDI von 0,289. Für die DSPC/PEG40S konnten 126,32 ± 19,80 nm und ein PDI von 0,257 gemessen werden.

Die Extrusion mit der 100 nm Membran erbrachte eine weitere Verkleinerung der Partikelgröße für DPPC/CH. 142,89 ± 13,34 nm und ein PDI von 0,150 wurden für diese Formulierung nachgewiesen. Der Einfluss auf die PEG40S-haltigen Formulierungen war geringer. Hier konnten 131,60 ± 5,77 nm bei 0,354 als PDI für DPPC/PEG40S und 117,09 ± 4,71 nm mit einem PDI von 0,377 für DSPC/PEG40S gemessen werden.

Auch nach der Extrusion lag das Zetapotential aller NUSCA im negativen Bereich, bei Werte von -4,13 mV bis -8,84 mV. Die Zetapotentiale aller Formulierungen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Herstellung mit nachfolgender Lyophilisation

Die Lyophilisation zeigte einen entgegengesetzten Effekt auf die Partikelgröße und vor allem den PDI (Tab. 3.1). Für die DPPC/CH-Liposomen konnte nach Zusatz von PEG4000 zwar keine Steigerung der Partikelgröße festgestellt werden (205,61 ± 47,99 nm) aber der PDI stieg auf 0,959. DPPC/PEG40S- und DSPC/PEG40S-Formulierungen, die ohne Zusatz eines Kryoprotektants lyophilisiert wurden, verdoppelten beinahe ihre Größe zu 351,06 ± 295,14 nm für DPPC/PEG40S und 363,15 ± 330,00 nm für DSPC/PEG40S wobei die PDIs auf 1,000 und 0,785 anstiegen.

Mannitol konnte diesen starken Größenanstieg der PEG40S-haltigen Formulierungen verhindern. Die Mischung mit DPPC erreichte 169,66 ± 72,40 nm bei einem PDI von 0,802,

DSPC/PEG40S war nach der Lyophilisation mit Mannitol 158,04 ± 20,74 nm groß und zeigte einen PDI von 0,709. Die DPPC/CH-Liposomen lagen bei 222,72 ± 25,81 nm mit 0,926 als PDI.

Auch hier konnte, wie erwartet wurde, kein Einfluss auf das Zetapotential festgestellt werden, welches im schwach negativen Bereich zwischen -1,89 mV und -7,72 mV (Tab. 3.1) lag.

Herstellung mit Zusatz von DPPG

Alle Größen und Zetapotentiale der DPPG-Konzentrationsreihen sind in Tabelle 3.2 und Abbildung 3.1 zusammengefasst. Der Zusatz des negativ geladenen Phospholipids DPPG ließ das Zetapotential sprunghaft auf mindestens -20 mV abfallen, wobei steigende Anteile an DPPG den Effekt verstärkten. Für die DPPC/CH-Liposomen konnten Zetapotentiale von -34,57 ± 0,87 mV bei Zusatz von 1 mol% DPPG, -44,43 ± 1,93 mV für 2 mol% und -62,71 ± 5,89 mV für die Mischung mit 5 mol% DPPG gemessen werden. Bei weiterem Zusatz von DPPG blieb das Zetapotential bei etwa -67 mV konstant (-67,69 ± 4,49 mV für 8 mol% und -67,18 ± 10,21 mV für 10 mol%). Ähnliche Veränderungen wurden für die anderen Lipidmischungen beobachtet. DPPC/PEG40S/DPPG mit 1 mol% DPPG erreichte -23,11 ± 2,43 mV, für 2 mol% ergaben sich -25,62 ± 2,75 mV, ein Anteil von 5 mol% DPPG führte zu -32,10 ± 4,38 mV, gefolgt von -37,86 ± 0,99 mV und -54,33 ± 6,91 mV für molare Konzentrationen von 8 und 10 %. Bei Zugabe ansteigender DPPG-Konzentrationen zu der DSPC/PEG40S-Formulierung wurden Zetapotentiale von -20,62 ± 5,09 mV (1 mol% DPPG), -26,23 ± 4,13 mV (2 mol% DPPG), -37,52 ± 4,36 mV (5 mol% DPPG), -32,62 ± 3,63 mV (8 mol% DPPG) und -48,30 ± 7,52 mV (10 mol% DPPG) erreicht.

Ein Trend für den Einfluss ansteigender DPPG-Konzentrationen auf den hydrodynamischen Durchmesser ließ sich nicht erkennen. Die Größen konnten zwischen 123,11 ± 6,01 nm und 230,88 ± 18,71 nm vermessen werden, während der PDI im mittleren Bereich zwischen 0,360 und 0,713 lag.

NUSCA	Zetapotential [mV]	Durchmesser ± Standardabweichung [nm]	PDI
DPPC/CH/DPPG (69:30:1)	-34,57 ± 0,87	218,73 ± 30,89	0,713
DPPC/CH/DPPG (68:30:2)	-44,43 ± 1,93	230,88 ± 18,71	0,502
DPPC/CH/DPPG (65:30:5)	-62,71 ± 5,89	201,36 ± 27,26	0,360
DPPC/CH/DPPG (63:30:8)	-67,69 ± 4,49	194,07 ± 40,76	0,381
DPPC/CH/DPPG (60:30:10)	-67,18 ± 10,21	218,55 ± 44,54	0,370
DPPC/PEG40S/DPPG (97:2:1)	-23,11 ± 2,43	241,91 ± 123,53	0,465
DPPC/PEG40S/DPPG (96:2:2)	-25,62 ± 2,75	196,59 ± 134,17	0,421
DPPC/PEG40S/DPPG (93:2:5)	-32,10 ± 4,38	131,63 ± 15,59	0,438
DPPC/PEG40S/DPPG (90:2:8)	-37,86 ± 0,99	123,11 ± 6,01	0,415
DPPC/PEG40S/DPPG (88:2:10)	-54,33 ± 6,91	244,18 ± 76,49	0,585
DSPC/PEG40S/DPPG (97:2:1)	-20,62 ± 5,09	218,73 ± 79,85	0,492
DSPC/PEG40S/DPPG (96:2:2)	-26,23 ± 4,13	143,70 ± 34,30	0,396
DSPC/PEG40S/DPPG (93:2:5)	-37,52 ± 4,36	136,32± 16,23	0,434
DSPC/PEG40S/DPPG (90:2:8)	-32,62 ± 3,63	150,23 ± 35,52	0,455
DSPC/PEG40S/DPPG (88:2:10)	-48,30 ± 7,52	157,91 ± 40,93	0,388

Tab. 3.2: Zetapotential, Größe und PDI der DPPG-haltigen NUSCA ermittelt mit Hilfe von Laser-Doppler-Anemometrie und Dynamischer Lichtstreuung

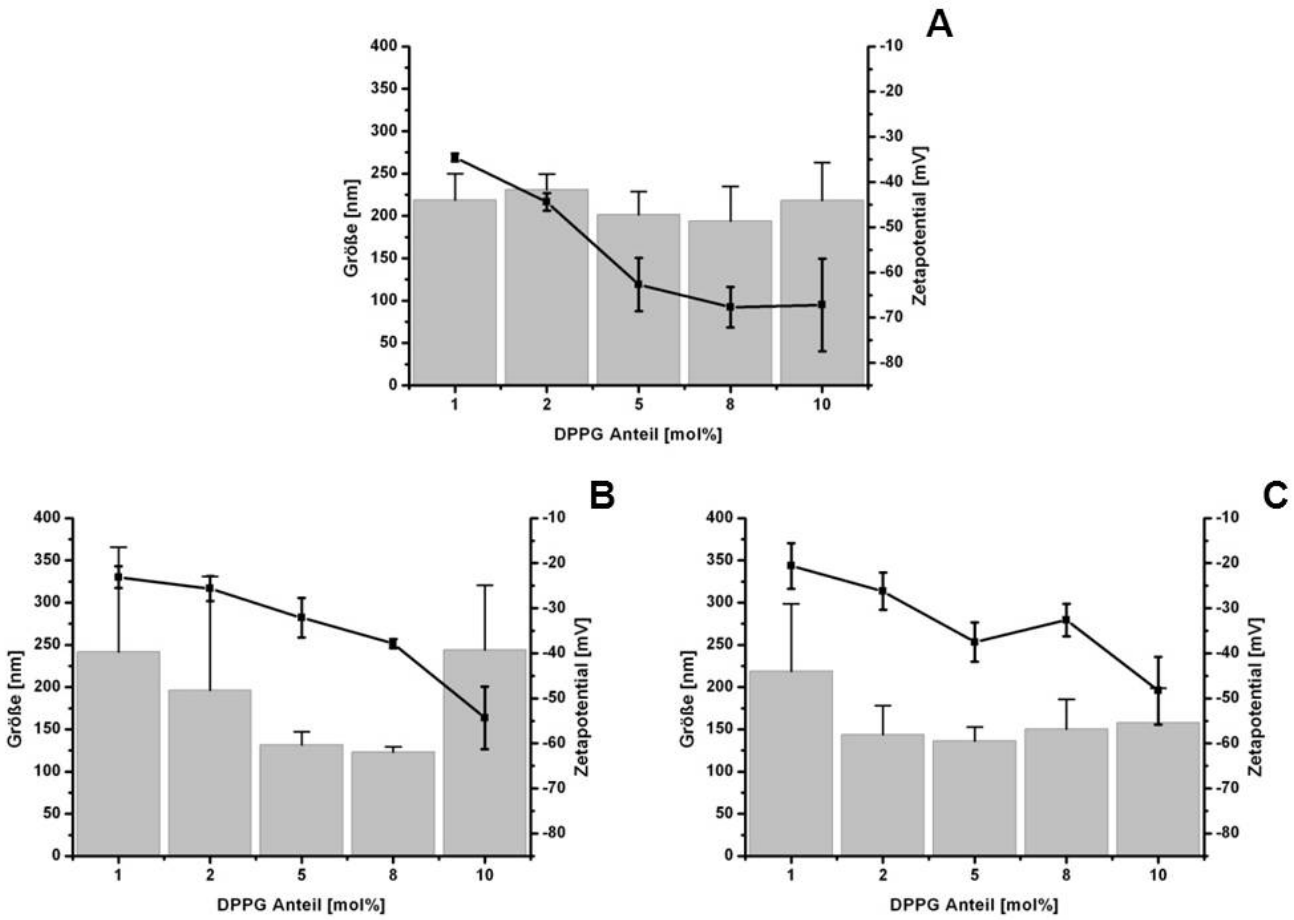

Abb. 3.1: Vergleich der Größen und Zetapotentiale bei ansteigendem DPPG-Anteil, die Größen sind als Säulen, das Zetapotential als Linie dargestellt; A: DPPC/CH, B: DPPC/PEG40S, C: DSPC/PEG40S

Herstellung mit zusätzlicher Beschallung am Ultraschallhomogenisator

Die zusätzliche Beschallung führte allgemein zu einer deutlichen Verkleinerung des hydrodynamischen Durchmessers. Alle Messergebnisse sind in Tabelle 3.3 und in Abbildung 3.2 zusammengefasst. Mit steigendem Anteil an PEG40S stieg die Größe der Formulierungen etwas an. Die DPPC/PEG40S-Formulierung mit einem molaren Anteil von 1 % PEG40S erreichte eine Größe von 52,59 ± 13,09 nm. Mit Steigerung der PEG40S-Konzentration auf 6 mol% stieg auch die Größe der Formulierungen kontinuierlich auf 125,69 ± 21,90 nm (61,62 ± 14,72 nm für 2 mol%, 87,87 ± 18,28 nm für 4 mol%). Bei höheren molaren Verhältnissen von PEG40S zu DPPC stabilisierte sich der

NUSCA	Zetapotential [mV]	Durchmesser ± Standardabweichung [nm]	PDI
DPPC/PEG40S (99:1)	-3,01 ± 1,93	52,59 ± 13,09	0,607
DPPC/PEG40S (98:2)	-3,17 ± 1,59	61,62 ± 14,72	0,476
DPPC/PEG40S (96:4)	-3,60 ± 1,91	87,87 ± 18,28	0,511
DPPC/PEG40S (94:6)	-4,68 ± 2,64	125,69 ± 31,90	0,563
DPPC/PEG40S (92:8)	-5,11 ± 3,12	91,01 ± 32,81	0,461
DPPC/PEG40S (90:10)	-2,66 ± 2,06	98,86 ± 54,86	0,412
DSPC/PEG40S (99:1)	-2,41 ± 1,10	52,30 ± 14,01	0,578
DSPC/PEG40S (98:2)	-3,37 ± 1,79	73,73 ± 17,32	0,514
DSPC/PEG40S (96:4)	-4,56 ± 1,49	87,94 ± 30,06	0,490
DSPC/PEG40S (94:6)	-4,79 ± 2,07	94,01 ± 22,54	0,466
DSPC/PEG40S (92:8)	-5,18 ± 2,01	97,09 ± 33,59	0,389
DSPC/PEG40S (90:10)	-6,16 ± 5,29	103,50 ± 42,76	0,400

Tab. 3.3: Zetapotential, Größe und PDI der mit zusätzlich Homogenisierung und unterschiedlichen PEG40S-Konzentrationen hergestellten NUSCA, ermittelt mit Laser-Doppler-Anemometrie und Dynamischer Lichtstreuung

hydrodynamische Durchmesser bei etwa 100 nm: 91,01 ± 32,81 nm für die Formulierung mit der molaren Zusammensetzung 92:8 mol% und 98,86 ± 54,86 nm für einen Anteil von 10 mol% PEG40S. Die DSPC/PEG40S-Formulierungen vergrößerten sich kontinuierlich von 52,30 ± 14,01 nm bei 1 mol% PEG40S bis zu 103,50 ± 42,76 nm für das molare Verhältnis von 90:10 mol%. Der Polydispersitätsindex lag für alle Formulierungen zwischen 0,389 und 0,607 und indizierte somit, dass keine monomodale Größenverteilung vorlag.

Das Zetapotential ist in Tabelle 3.3 für alle Formulierungen aufgeführt und lag immer im schwach negativen Bereich zwischen -2,41 ± 1,10 mV und -6,16 ± 5,29 mV.

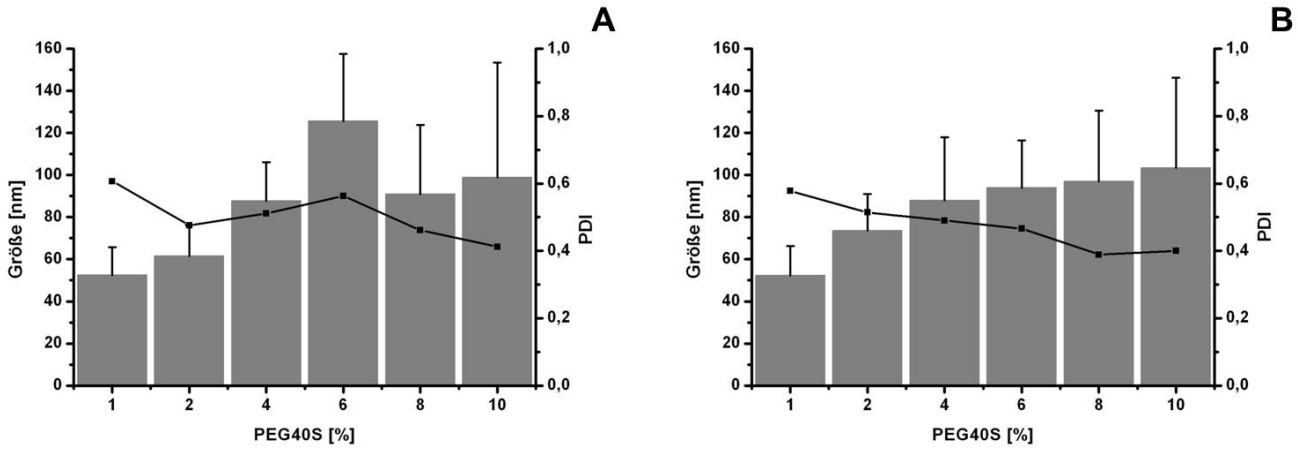

Abb. 3.2: Vergleich der Größen und PDI bei ansteigendem PEG40S-Anteil, die Größen sind als Säulen, der PDI als Linie dargestellt; A: DPPC/PEG40S, B: DSPC/PEG40S

3.1.2 Raster-Kraft-Mikroskopie

Die Raster-Kraft-Mikroskopie (AFM) ermöglicht es die Partikel zu visualisieren und die mittels Dynamischer Lichtstreuung gemessenen Partikelgrößen zu verifizieren. Tabelle 3.4 enthält eine Zusammenfassung der ermittelten Größen und Größenbereiche, der nach allgemeiner Herstellungsmethode produzierten NUSCA und des kommerziellen UCA SonoVue®, das uns

bei den Bestimmungen der Kontrastaktivität der NUSCA als Vergleichssubstanz diente. Abbildung 3.3 zeigt eine Gegenüberstellung der AFM und cryo-TEM-Bilder.

Für die DPPC/CH-Formulierung konnten auf den AFM-Bildern (Abb. 3.3 E) gleichmäßig runde Liposomen gesehen werden, die eine Größenverteilung zwischen 110 und 350 nm mit einem Mittelwert von 232,4 ± 17,1 nm aufwiesen. Dieser Wert lag etwas höher als der mit Dynamischer Lichtstreuung ermittelte Wert, was mit einer leichten Spreitung der Liposomen auf der Silizium-Oberfläche zu erklären war.

Für die PEG40S-haltigen Formulierungen konnte deutlich zwei Partikelpopulationen auf den Bildern ermittelt werden, sowohl gleichmäßig runde als auch ovale oder stäbchenförmige Strukturen. Die erste Population wies Größen von etwa 70 nm auf, während die größeren Partikel 200-300 nm groß waren. Im Mittel ergaben sich folgende Größen: 216,7 ± 15,6 nm für DPPC/PEG40S und 169,6 ± 22,4 nm für DSPC/PEG40S. Die Messwerte der DPPC/PEG40S-Formulierung sind dabei wieder etwas größer als die mit dem Zetasizer ermittelten. Bei der DSPC/PEG40S-Formulierung zeigt sich ein anderes Bild, hier sind die ermittelten Größen aus den AFM-Bildern etwas kleiner als die der Dynamischen Lichtstreuung.

Die mittlere Partikelgröße des kommerziell erhältlichen UCA SonoVue® konnte bei 1981 ± 822 nm mit einer sehr breiten Größenverteilung zwischen 250 nm und 6,5 µm

Lipidformulierungen	Durchmesser ± Standardabweichung [nm]	Größenbereich [nm]
DPPC/CH	232,4 ± 17,1	110-350
DPPC/PEG40S	216,7 ± 15,6	50-500
DSPC/PEG40S	169,6 ± 22,4	75-485
SonoVue®	1981 ± 822	250-6500

Tab. 3.4: Größe und Größenbereich der Kontrastmittel ermittelt mit Raster-Kraft-Mikroskopie

bestimmt werden. Es waren verschieden geformte Strukturen sichtbar, die teilweise durch Fusion einzelner Mikrobläschen entstanden sein könnten.

3.1.3 cryo-Transmissionselektronenmikroskopie

Allgemeine Herstellung

Auch mit der cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (cryo-TEM) lassen sich Größe und Morphologie der Formulierungen betrachten (Abb. 3.3). Im Unterschied zur Raster-Kraft-Mikroskopie konnten die Formulierungen mit Hilfe dieser Methode *in situ* betrachtet werden. Zusätzlich zu den auf den AFM-Bildern gewonnen Informationen waren beim cryo-TEM Aussagen zur Lamellarität der Liposomen möglich. SonoVue® war aufgrund seiner geringen Stabilität im Vakuum leider nicht abzubilden, es ergaben sich nur die gezeigten diffusen Lipidstrukturen die wahrscheinlich geplatzte Mikrobläschen darstellen. Die durch Ausmessen der Partikel ermittelten Größen lagen bei 201,8 ± 20,2 nm für DPPC/CH, bei den PEG40S-haltigen Formulierungen ergaben sich 133,1 ± 17,7 nm für DPPC/PEG40S und 199,4 ± 28,3 nm für DSPC/PEG40S. Betrachtet man die Morphologie, besteht die DPPC/CH-Formulierung aus verschieden großen runden Liposomen. Dabei herrschen unilamellare Liposomen vor, aber auch multilamellare Liposomen und Liposomen in Liposomen sind sichtbar. Multilamellare Liposomen sind erkennbar an der dicker wirkenden Membran (geschlossener Pfeil in Abb. 3.3 A), Liposomen in Liposomen wirken wie konzentrische oder leicht gegeneinander verschobene Kreise (offener Pfeil in Abb. 3.3 A). Für die PEG40S-haltigen Formulierungen konnten zwei verschiedene Strukturtypen nachgewiesen werden: runde bis leicht eckige liposomale Strukturen und kleine runde oder stäbchenförmige Mizellen. Die leichte Eckigkeit der liposomalen Strukturen, die vor allem bei den DSPC/PEG40S-Formulierungen zu sehen war, könnte für eine rigide Lipidmischung sprechen.

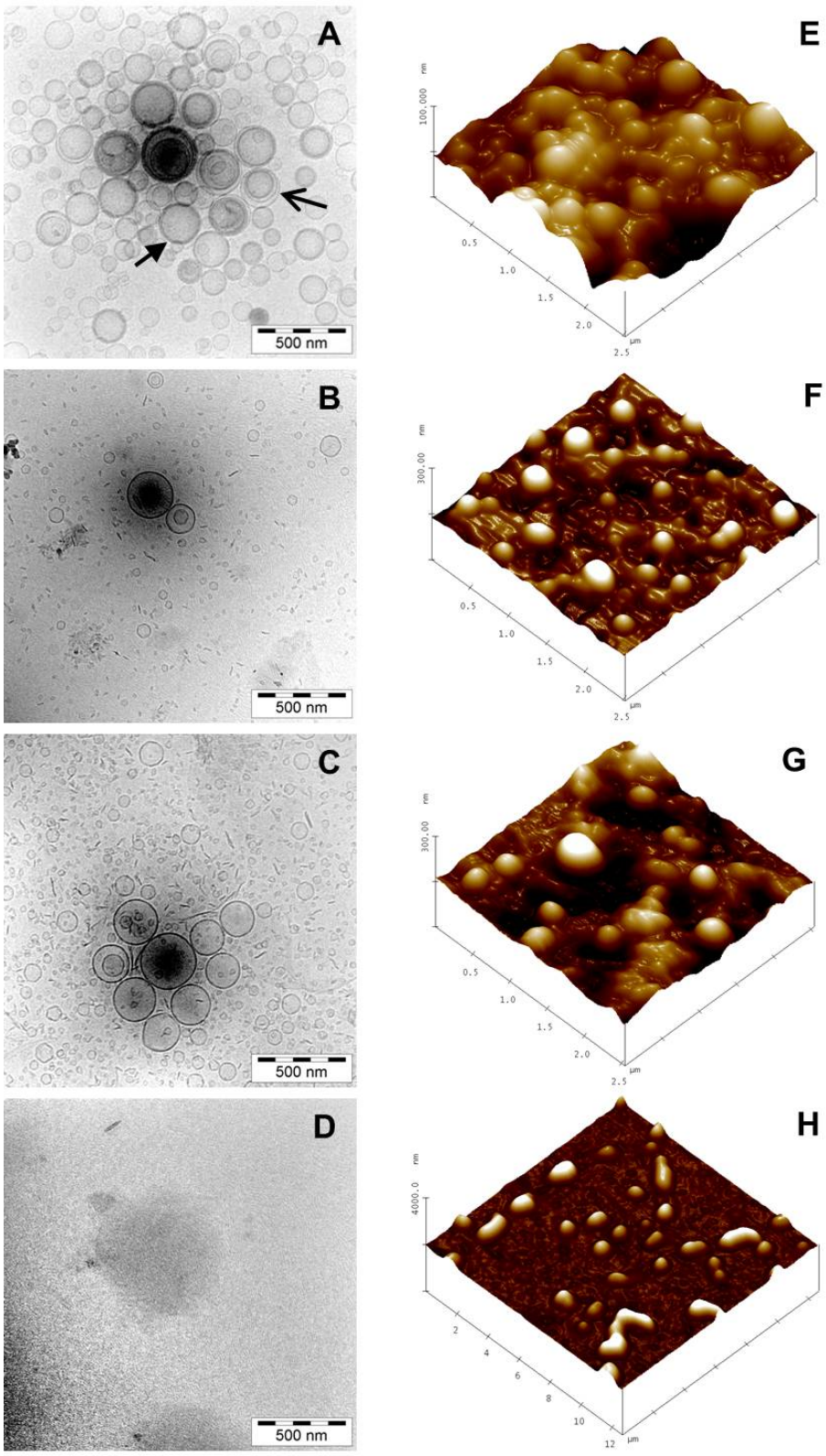

Abb. 3.3: Vergleich der AFM und cryo-TEM-Bilder nach allgemeiner Herstellungsmethode produzierter NUSCA und SonoVue®,

cryo-TEM Aufnahmen; A: DPPC/CH (geschlossener Pfeil: multilamellares Liposom, offener Pfeil: Liposom in Liposom), B: DPPC/PEG40S, C: DSPC/PEG40S, D: SonoVue®

AFM Aufnahmen; E: DPPC/CH, F: DPPC/PEG40S, G: DSPC/PEG40S, H: SonoVue®

Herstellung mit zusätzlicher Beschallung am Ultraschallhomogenisator

Die mit zusätzlicher Beschallung und verschiedenen PEG40S-Konzentrationen hergestellten Formulierungen wurden auch mit Hilfe des cryo-TEM visualisiert. Aufnahmen der DPPC/PEG40S-Formulierungen sind in Abbildung 3.4 A-F zu sehen. Die DSPC-haltigen NUSCA werden in Abbildung 3.4 G-L gezeigt. Die Größe und der Größenbereich wurden durch Ausmessen aller sichtbaren Partikel auf mindestens zwei cryo-TEM-Bildern jeder Formulierung bestimmt und sind in Tabelle 3.5 aufgeführt. Die ermittelten Größen schwankten zwischen 53,97 ± 26,50 nm und 135,18 ± 51,36 nm, ohne dass ein Größentrend ablesbar war. Der hohe PDI, der bei den DLS-Messungen gefunden wurde, ließ sich mit den

NUSCA	Durchmesser ± Standardabweichung [nm]	Größenbereich [nm]
DPPC/PEG40S (99:1)	84,17 ± 24,92	29,33 – 426,69
DPPC/PEG40S (98:2)	89,48 ± 62,35	36,66 – 580,65
DPPC/PEG40S (96:4)	88,01 ± 56,87	41,06 – 304,99
DPPC/PEG40S (94:6)	67,97 ± 20,04	35,19 – 178,89
DPPC/PEG40S (92:8)	94,30 ± 31,16	33,72 – 197,95
DPPC/PEG40S (90:10)	90,28 ± 33,21	36,66 – 674,49
DSPC/PEG40S (99:1)	86,80 ± 41,65	35,19 – 240,47
DSPC/PEG40S (98:2)	67,72 ± 31,35	36,66 – 212,61
DSPC/PEG40S (96:4)	135,18 ± 51,36	74,78 – 321,11
DSPC/PEG40S (94:6)	72,80 ± 20,78	46,92 – 134,90
DSPC/PEG40S (92:8)	53,97 ± 26,50	26,39 – 123,17
DSPC/PEG40S (90:10)	72,18 ± 22,88	35,19 – 159,82

Tab. 3.5: Größe und Größenbereich der mit zusätzlicher Homogenisation hergestellten PEG40S-Konzentrationsreihen; ermittelt mit cryo-TEM

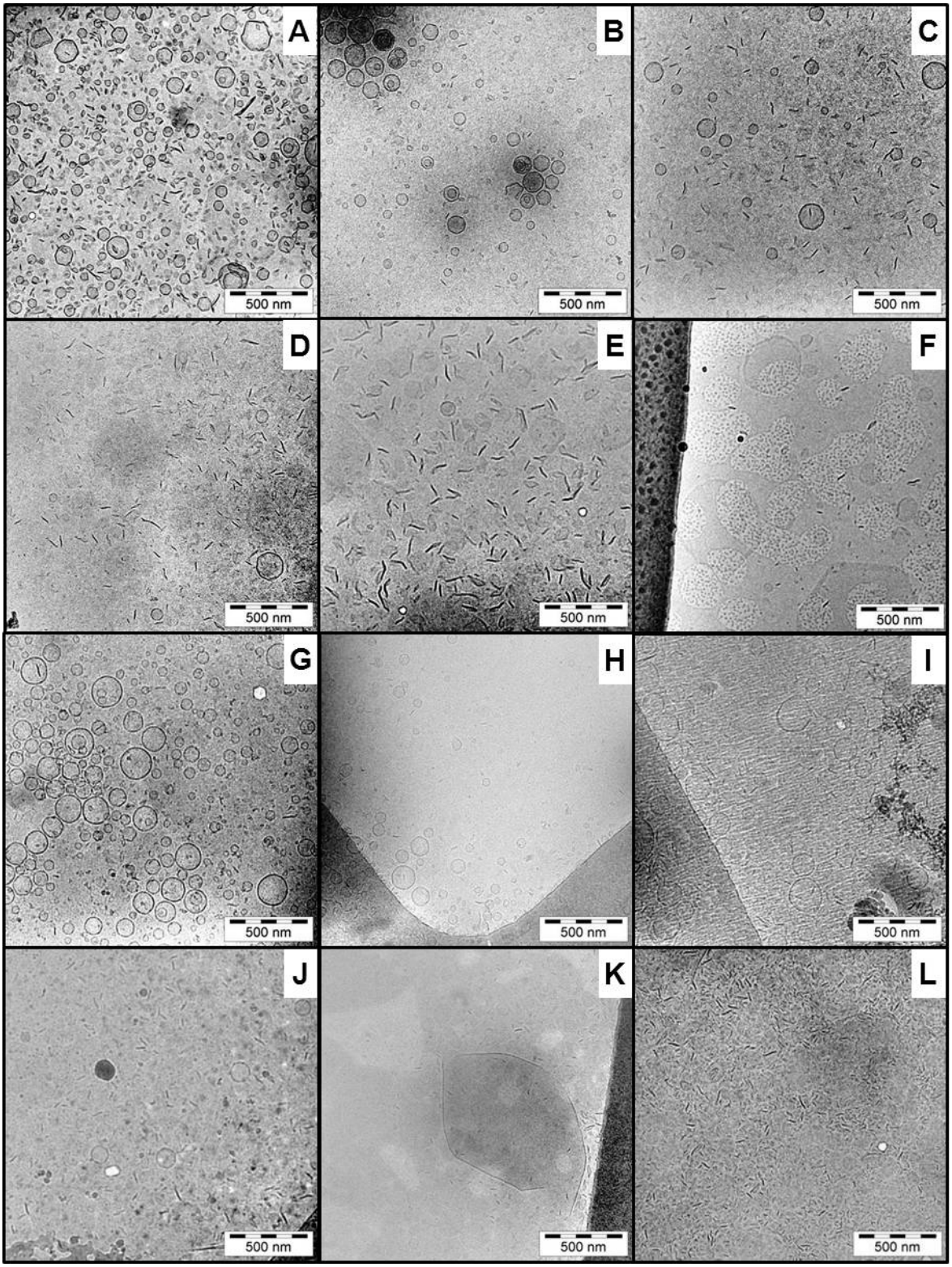

Abb. 3.4: cryo-TEM-Bilder der zusätzlich homogenisierten PEG40S-Konzentrationsreihen;

A-F: DPPC/PEG40S unterschiedlicher Zusammensetzung;

A: 99:1 mol% B: 98:2 mol%, C: 96:4 mol%, D: 94:6 mol%, E: 92:8 mol%, F: 90:10 mol%;

G-L: DSPC/PEG40S unterschiedlicher Zusammensetzung;

G: 99:1 mol% H: 98:2 mol%, I: 96:4 mol%, J: 94:6 mol%, K: 92:8 mol%, L: 90:10 mol%;

deutlich sichtbar unterschiedlichen Populationen der Partikel und den diffusen Lipidstrukturen (Abb. 3.4 K), die auf manchen Bildern zu sehen waren erklären. Größere und kleinere Partikel waren bei allen Proben erkennbar wobei die größeren liposomalen Strukturen mit zunehmendem PEG40S-Anteil abnahmen. Bei einem Anteil von 1 - 2 mol% PEG40S (Abb. 3.4 A, B, G, H) waren viele Liposomen, als runde bzw. leicht eckige Strukturen mit deutlichem Rand, und nur wenige diskoidale Mizellen (stäbchenförmige Strukturen oder runde Strukturen ohne deutlichen Rand) zu erkennen. Bei den mittleren PEG40S-Konzentrationen (4 und 6 mol%) wurden mehr Mizellen gebildet, aber es waren noch einzelne Liposomen erkennbar. Molare Verhältnisse von 92:8 und 90:10 zwischen Phospholipid und PEG40S ergaben fast ausschließlich Mizellen, die teilweise eine runde Struktur aufweisen.

3.1.4 Kernspinresonanzspektroskopie

Leal *et al.* [74] zufolge kann ^{31}P-Kerspinresonanzspektroskopie genutzt werden, um zwischen mizellaren und liposomalen Systemen in Formulierungen zu unterscheiden. Die Breite des ^{31}P-Peaks gibt dabei Aufschluss über Größe und Morphologie der Formulierung. Auch Cullis und de Kruijff [75] konnten durch Simulationen von Spektren zeigen, dass kleine vor allem mizellare Strukturen symmetrische ^{31}P-Peaks ergaben, während bei größeren Liposomen eine Schulter im niedrigen Feld sichtbar war. Ähnliche Ergebnisse fanden Burnell *et al.* [64], die ausführten, dass Vesikel kleiner 150 nm symmetrische Peaks aufweisen. Schubert et al. [65] begründeten die breiten Peaks größerer liposomaler Strukturen mit der anisotropen Bewegung der Lipide in der Doppelmembran der Liposomen.

Allgemeine Herstellung

Betrachtet man mit diesem Wissen die mit einem „line-broadening“ von 30 Hz aufgenommenen ^{31}P-Kernspinresonanzspektren unserer nach allgemeiner Herstellungsmethode produzierten NUSCA (Abb.3.5) fällt für die DPPC/CH-Formulierung die Schulter im niedrigen Feld ins Auge. Dieser Peak gab Anlass zu der Vermutung, dass es sich bei dieser Formulierung um Liposomen handelt. Die PEG40S-haltigen Formulierungen zeigen symmetrischen Peaks, die daraufhin wiesen, dass hier mizellare Strukturen vorlagen.

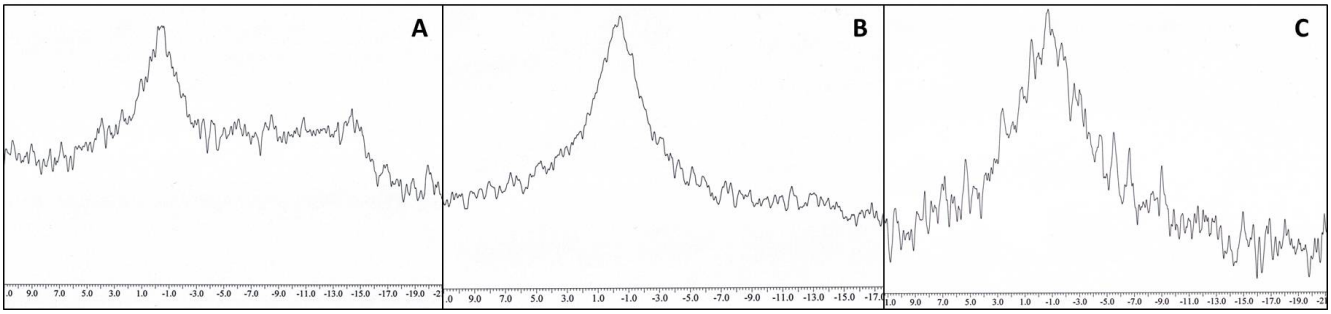

Abb. 3.5: ^{31}P-Kerspinresonanzspektren der Formulierungen nach allgemeiner Herstellungsmethode;
A: DPPC/CH mit Schulter im tiefen Feld die Liposomen anzeigt, B: DPPC/PEG40S, C: DSPC/PEG40S, B und C zeigen symmetrischen Peak, der auf Mizellen hindeutet

Herstellung mit zusätzlicher Beschallung am Ultraschallhomogenisator

Die ^{31}P-NMR Spektren dieser Formulierungen wurden mit einem „line broadening“ von 2 Hz aufgenommen. Abbildung 3.6 zeigt beispielhaft die Spektren der DSPC/PEG40S-Konzentrationsreihe. Alle gemessenen Spektren zeigten einen symmetrischen Peak, der auf kleine Liposomen oder Mizellen hindeutet. Aufgrund der Standardisierung auf 10 mg Gesamtlipid pro ml Probe nimmt das Hintergrundrauschen mit zunehmendem PEG40S-Anteil und somit abnehmendem Phosphatgehalt zu.

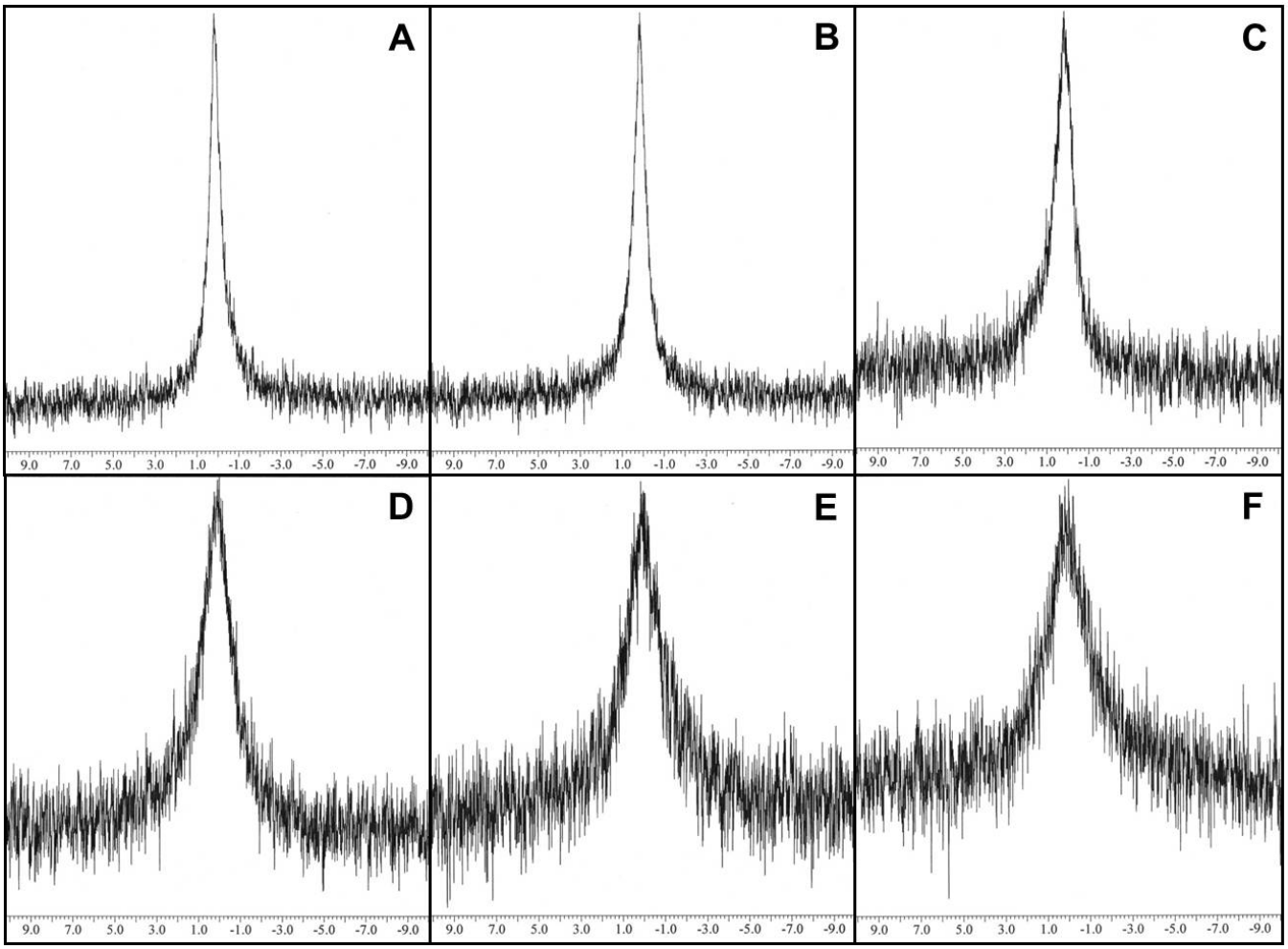

Abb. 3.6: ^{31}P-NMR Spektren der DSPC/PEG40S-Formulierungen unterschiedlicher molarer Verhältnisse; A: 99:1, B: 98:2, C: 96:4, D: 94:6, E: 92:8, F: 90:10

3.2 Diskussion

Die Verwendung von diagnostischem US in Kombination mit Arzneistoffen ist in vielen Bereichen der medizinischen Forschung von Interesse. Bei der thrombolytischen Therapie hat eine zusätzliche Nutzung von diagnostischem US den Vorteil, dass die Rekanalisation des verschlossenen Blutgefäßes in Echtzeit beobachten werden kann. Die Entwicklung eines neuen UCAs, das gute Kontrastverstärkung mit kleiner Partikelgröße, Stabilität, langen Zirkulationszeiten und dem Potential einer Beladung mit Arzneistoffen, die dann gezielt an der Stelle der Okklusion freigesetzt werden können, verbindet, war daher ein folgerichtiger und notwendiger Schritt.

Die Verwendung von Phospholipiden, vor allem DPPC und DSPC, wird von verschiedenen Autoren zur Herstellung liposomaler Arzneistoffträgersysteme und auch zur Stabilisierung gasgefüllter Mikrobläschen als UCA beschrieben [76-78]. Talu *et al.* [79] verwendeten zusätzlich zu DSPC das Polyethyelnglykolderivat PEG40S zur Stabilisierung gasgefüllter Mikrobläschen einer durchschnittlichen Größe von 62 ± 6 µm. Dieses UCA kombinierte eine sehr gute Ultraschallkontrastverstärkung mit einer hohen Stabilität, hervorgerufen durch die Konformation der Polethylenglykolketten. Diese sind für den bekannten Stealth®-Effekt verantwortlich, der eine Erkennung und Eliminierung von Liposomen durch das Immunsystem des Körpers verhindert und oft zur Herstellung langzirkulierender liposomaler Arzneistoffträgersysteme ausgenutzt wird [54-57]. Diese Informationen brachten uns dazu neue UCAs auf der Basis liposomaler Formulierungen, teilweise unter Zusatz von PEG40S, zu entwickeln. Zur Herstellung wurde die bekannte Filmbildungs-Rehydratations-Methode mit einer nachfolgenden Beschallung im Ultraschallbad genutzt. Abwandlungen dieser allgemeinen Herstellung waren Extrusion, Lyophilisation, Beimischung von DPPG und zusätzliche Beschallung am Ultraschallhomogenisator bei Variation der PEG40S-Konzentration.

Nach der allgemeinen Methode hergestellte Formulierungen aus DPPC und CH konnten, wie aus früherer Forschung bekannt [61, 80, 81], als Liposomen im Größenbereich von 110-350 nm, ohne Ausbildung mehrerer Größenklassen, charakterisiert werden. Der PDI der DLS-Messungen dient als Maß für die Partikelgrößenverteilung, wobei ein PDI bis zu 0,2 eine monomodale Größenverteilung anzeigt. Die in dieser Arbeit gemessenen höheren PDIs sprachen für eine multimodale Formulierung, was sich mit der breiten Größenverteilung, die auf den AFM- und cryo-TEM-Bildern sichtbar war, erklären ließ. Weiterhin lag hier eine Mischung unilamellarer und multilamellarer Liposomen vor, die auch das Bild der klassischen liposomalen Struktur bekräftigten. Im Gegensatz dazu zeigten die PEG40S-haltigen Zubereitungen ausschließlich unilamellare Liposomen, die in einem engeren Größenbereich lagen als die DPPC/CH-Liposomen. Zusätzlich ließen sich aber deutlich kleine stäbchenartige und auch kleinere runde Strukturen mit schwächer ausgeprägter Membran erkennen (Abb.3.3 B und C). Die Mischung dieser runden und stäbchenartigen kleinen Strukturen führte zu dem Schluss, dass sich diskoidale Mizellen gebildet haben, die schon von verschiedenen Autoren für Mischungen von Phospholipiden und PEG-Lipiden beschrieben wurden [74, 82-85]. Auf Abbildungen wirken diskoidale Mizellen stäbchenförmig, wenn sie von der Seite abgebildet werden und rund, wenn sie von oben zu sehen sind. Das nichtideale Mischungsverhalten, dass für PEG-Lipide und Phospholipide beschrieben wurde, konnte die Bildung dieser Art von Mizellen erklären [82, 85-88]. Die PEG-Lipide sammeln sich an den Rändern der diskoidalen Mizellen, wo ihre voluminösen hydrophilen Reste in die umgebende Lösung ragen und so den Krümmungsdruck vermindern. Diese Struktur der Mizellen lieferte auch eine Erklärung für die unterschiedlichen Partikelgrößen der DLS und der Ausmessung der visualisierten Partikel. Diskoidale Mizellen können bei der DLS als sehr kleine Partikel gemessen werden, wenn sie seitlich aufgenommen werden, oder als größere, wenn sie flächig von Laser erfasst werden. Beim Ausmessen wurde immer der größere mögliche Durchmesser verwendet. Außerdem waren auf einigen cryo-TEM-Bildern flächige Lipidstrukturen zu erkennen (Abb. 3.4 K), die beim Ausmessen der Partikelgrößen nicht berücksichtigt wurden, bei der DLS aber als große Partikel gezählt haben könnten.

Eine Unterscheidung mizellarer und liposomaler Formulierungen ist auch auf den ^{31}P-Spektren der Kernspinresonanzspektroskopie möglich [64, 65, 74, 75]. Eine Schulter im tiefen Feld, wie sie für DPPC/CH zu sehen war (Abb.3.5 A), spricht für liposomale Strukturen. Die symmetrischen Peaks der anderen Spektren zeigten das Vorliegen mizellarer Systeme an.

Die großen PDIs unserer Formulierungen führten zum Einsatz der Extrusion. Dabei wurden die Lipidformulierungen heiß durch Membrane gepresst, wodurch sie kleiner wurden und eine engere Größenverteilung bekamen, Effekte die gut mit Hilfe der DLS beobachtet werden können. Für die DPPC/CH-Liposomen konnte der stärkste Effekt auf Größe und PDI beobachtet werden. Der PDI sank auf unter 0,2 und damit in einen Bereich, in dem man von annähernd monomodalen Größenverteilungen sprechen konnte. Für die PEG40S-haltigen Formulierungen lag der PDI nach der Extrusion noch zwischen 0,25 und 0,38 und damit nicht im monomodalen Bereich. Durch die oben beschriebenen Untersuchungen mit AFM und cryo-TEM war dieses Phänomen zu erklären. Die diskoidalen Mizellen werden von der Extrusion nicht beeinflusst und so bleiben zwei Größenklassen erhalten. Es ist auch ein Gleichgewicht zwischen Mizellen und Liposomen denkbar, durch das die Liposomen bei Austausch der Lipide wieder anwachsen können.

Bei der zweiten Abwandlung der Formulierungen wurden diese nach ihrer Fertigstellung lyophilisiert, um ihre Lagerstabilität zu erhöhen. Da die Liposomen-Suspensionen wässrig waren, musste immer mit einer Kontamination durch Mikroorganismen gerechnet werden. Das Lyophilisat wäre viel stabiler und auch für eine spätere Nutzung als Arzneimittel vorteilhaft, da wasserfreie Zubereitungen das Wachstum von Mikroorganismen nicht zulassen. Zur Vermeidung der Zerstörung der NUSCA durch gebildete Eiskristalle wurden Kryoprotektantien zugesetzt. Bei den DPPC/CH-Liposomen wurden dabei zwei verschiedene Substanzen verwendet: PEG4000 und Mannitol, wobei letzteres für eine Verstärkung der Echogenizität von UCAs bekannt ist [58]. Die DPPC- und DSPC-Formulierungen wurden ohne Zusatz von Gefrierschutz und mit Mannitol lyophilisiert. Ohne Zusatz wurde gearbeitet, da in die Membranen der Vesikel schon PEG integriert war, das auf seinen kryoprotektiven

Effekt getestet werden sollte. Beide Methoden der Gefriertrocknung führten zu einem starken Anstieg der PDIs auf Werte zwischen 0,7 und 1,0. Damit ist die Größenmessung mit dem Prinzip der DLS nicht mehr zur Vermessung dieser Formulierungen geeignet. Nach dem Gefriertrocknen mit den getesteten Zusätzen konnten daher keine reproduzierbaren Größen garantiert werden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde den Formulierungen das negativ geladene Phospholipid DPPG zugesetzt, um das Zetapotential zu erniedrigen und so eine mögliche Aggregation der Partikel zu verhindern. Konzentrationen bis zu 10 mol% DPPG ersetzten dabei das DPPC oder DSPC. Schon der Zusatz von 1 mol% DPPG, was die Struktur der Formulierung nicht stören sollte, erniedrigte das Zetapotential auf mehr als -20 mV und damit in einen Bereich, in dem eine Aggregation der Vesikel unwahrscheinlich war. Eine Auswirkung auf die Partikelgröße konnte nicht gefunden werden. Eine Aggregation frisch hergestellter Formulierungen war auch nicht zu erwarten, eher könnte Lagerung zu einer Aggregation führen. Dies wird im nächsten Kapitel im Zusammenhang mit der Stabilität des Ultraschallkontrastes diskutiert.

Die beiden Zielsetzungen der letzten Versuchsreihe, die nur mit den PEG40S-haltigen NUSCA durchgeführt wurde, waren die folgenden: der Einfluss einer zusätzlichen Beschallung mit einem Ultraschallhomogenisator und der Einfluss veränderter PEG40S-Konzentration auf die Partikel sollten analysiert werden. Wie zu erwarten war, war der Einfluss der zusätzlichen Beschallung auf die Partikelgröße sehr hoch. Die Größe sank von knapp 200 nm auf 60 bzw. 70 nm ab. Auf den PDI konnte, wie bei der Extrusion, kein Effekt festgestellt werden. Ein geringer Einfluss der PEG40S-Konzentrationen auf die Größe konnte bei der DLS als Trend festgestellt werden, der sich durch Ausmessen der Partikel auf cryo-TEM-Bildern nicht bestätigen ließ. Auf die Struktur konnte ein deutlicher Einfluss der PEG40S-Konzetration nachgewiesen werden, höhere Anteile an PEG40S führten zu einer verstärkten Bildung von Mizellen und einer Verminderung des Anteils an Liposomen. Dies ließ sich mit der molekularen Struktur der Phospholipide und des PEG40S erklären (Abb. 3.7). Bei den gesättigten Phospholipiden DPPC und DSPC ist der Platzbedarf des

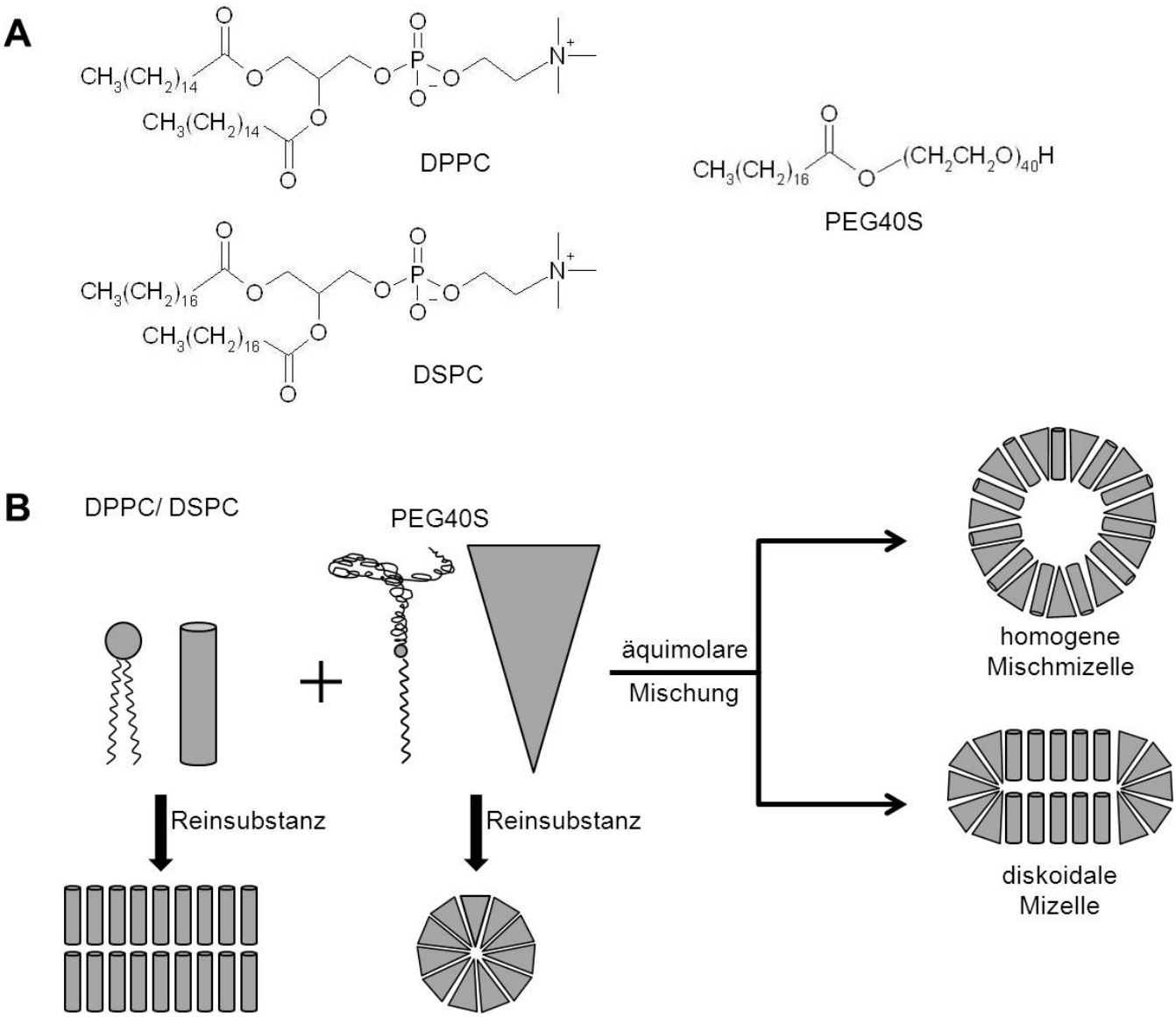

Abb. 3.7: A: Formeln, B: Struktur und idealisierte Anordnung der verwendeten Lipide

hydrophilen Molekülteils etwa so groß wie der der Lipidketten, als Molekülumfang ergibt sich daher ein Zylinder. Mehrere dieser zylinderförmigen Phospholipide lagern sich zu Doppelmembranen zusammen, aus denen dann Liposomen gebildet werden können. Die minimale Größe der Liposomen wird dabei von der potentiellen Krümmung der Doppelmembran begrenzt. Das PEG40S weist als lipophilen Rest nur eine Lipidkette und im hydrophilen Molekülteil eine sehr voluminöse PEG-Kette auf. Die Struktur entspricht daher der Form eines Kegels, die als Reinsubstanz die Bildung kleiner kugelartiger Mizellen bewirkt [52, 89]. Bei Mischung mit den Phospholipiden DPPC oder DSPC erscheint die Bildung von

Liposomen für niedrige PEG40S-Konzentrationen möglich. Höhere Anteile an PEG40S werden aber wahrscheinlich zur Ausbildung homogen gemischter oder phasenseparierter Mizellen führen (Abb. 3.7). Auch die Bildung reiner PEG40S-Mizellen neben DPPC- oder DSPC-Liposomen ist möglich. Eine Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung Mizellen war daher für höhere PEG40S-Konzentrationen zu erwarten. Die Form und Größe dieser Mizellen hing dabei auch von der Konzentration des PEG40S ab. Edwards et al. [87] konnten dabei für Mischungen von Phospholipiden und PEG-Lipiden mit steigendem Anteil an PEG-Lipid eine Abnahme der Größe und eine Veränderung der Form der Mizellen von diskoidalen zu runden Formen nachweisen. Ein ähnliches Verhalten konnte auf den cryo-TEM-Bildern unserer Formulierungen gesehen werden. Ansteigende PEG40S-Konzentrationen führten zu einem Verschwinden der Liposomen und eine Zunahme der Mizellen. Bei PEG40S-Anteilen von 10 mol% konnten neben diskoidalen Mizellen auch kleine runde Mizellen gesehen werden.

Eine Charakterisierung des kommerziellen Kontrastmittels SonoVue® wurde versucht. Da sich die gasgefüllten Mikrobläschen als sehr instabil erwiesen haben, ließen sie sich nicht mit dem cryo-TEM abbilden. Versuche der Vermessung mit DLS brachten auch keine verwertbaren Ergebnisse, da die Bläschen zu schnell flotieren. Die Visualisierung mit dem AFM und anschließende Vermessung der Partikel erbrachte einen Größenbereich von 250 nm-6,5 µm, der in etwa den in der Literatur beschriebenen 2-8 µm entsprach [90]. Die unterschiedlich geformten Partikel, die auf dem AFM-Bild zu sehen waren, ließen auch auf eine geringe Stabilität schließen, da sie wahrscheinlich durch Fusion einzelner Vesikel entstanden waren.

Zusammenfassend konnten positive Einflüsse der Variationen der Herstellung oder der Lipidmischungen auf die NUSCA festgestellt werden. Vor allem die Extrusion ist im Hinblick auf die Verbesserung der Partikelgrößenverteilung vielversprechend. Die Lyophilisation hatte leider keine positiven Effekte, da die PDIs nach der Lyophilisation stark anstiegen. Die Zugabe von DPPG schien keinen Effekt auf die frisch hergestellten NUSCA zu haben, wobei ein Effekt auf die Lagerstabilität abzuwarten bleibt. Wie erwartet konnte die zusätzliche

Beschallung mit dem Ultraschallhomogenisator die Partikelgröße der PEG40S-haltigen NUSCA deutlich senken, wenn auch kein Effekt auf den PDI nachgewiesen werden konnte.

4. Untersuchung der Echogenizität nanoskaliger Ultraschallkontrastmittel

In diesem Kapitel sollen die gerade charakterisierten NUSCA auf ihre Ultraschall-eigenschaften geprüft werden. Dazu wurden die mittleren Grauwerte ihrer Kontrastverstärkungen im Durchflussmodell gemessen und mit dem kommerziellen SonoVue® verglichen. Der Einfluss der verschiedenen Herstellungsmethoden und der Struktur der NUSCA auf die Echogenizität wird diskutiert. Die Zirkulationsstabilität der NUSCA ist dabei von hoher Bedeutung für eine gute Verstärkung der Thrombolyse [91].

4.1 Ergebnisse

4.1.1 Messung der Ultraschallkontrastverstärkung

Allgemeine Herstellung

Ultraschallbilder unserer NUSCA sind in Abbildung 4.1 gezeigt, die mittleren Grauwerte fasst Tabelle 4.1 zusammen. Für alle Formulierungen wurde der Kontrast am zweiten Tag nach der Herstellung gemessen. Die DPPC/CH-Liposomen zeigten einen schwachen aber deutlich sichtbaren Kontrast mit einem mittleren Grauwert von 51,67 %. Eine starke Kontrastverstärkung mit einem homogenen Erscheinungsbild konnte für DPPC/PEG40S mit 121,78 % und DSPC/PEG40S mit 155,06 % nachgewiesen werden.

Abb. 4.1: Ultraschallkontrastverstärkung der neuen NUSCA; A: DPPC/CH, B: DPPC/PEG40S, C: DSPC/PEG40S

NUSCA	mittlerer Grauwert ± Standardabweichung [%]
DPPC/CH (70:30)	51,67 ± 5,63
DPPC/PEG40S (98:2)	121,78 ± 10,94
DSPC/PEG40S (98:2)	155,06 ± 6,13
DPPC/CH (70:30) Extrusion 200nm	5,84 ± 1,63
DPPC/PEG40S (98:2) Extrusion 200nm	88,56 ± 7,92
DSPC/PEG40S (98:2) Extrusion 200nm	45,15 ± 3,69
DPPC/CH (70:30) Extrusion 100nm	0,00
DPPC/PEG40S (98:2) Extrusion 100nm	34,53 ± 4,40
DSPC/PEG40S (98:2) Extrusion 100nm	36,54 ± 3,07
DPPC/CH (70:30) lyophilisiert mit PEG4000	105,58 ± 3,57
DPPC/PEG40S (98:2) lyophilisiert ohne Zusatz	30,60 ± 3,57
DSPC/PEG40S (98:2) lyophilisiert ohne Zusatz	89,85 ± 6,67
DPPC/CH (70:30) lyophilisiert mit Mannitol	14,56 ± 0,38
DPPC/PEG40S (98:2) lyophilisiert mit Mannitol	73,94 ± 3,78
DSPC/PEG40S (98:2) lyophilisiert mit Mannitol	61,13 ± 2,51

Tab. 4.1: Ultraschallkontrastverstärkung unterschiedlich hergestellter NUSCA

Herstellung mit nachfolgender Extrusion

Die Extrusion, die zur Verbesserung der PDIs unserer NUSCA verwendet wurde, führte zu einer starken Abnahme der Echogenizität wie in Abbildung 4.2 und Tabelle 4.1 verdeutlichen. Für die DPPC/CH-Liposomen war nach der Extrusion durch die 200 nm Membran nur noch eine Kontrastverstärkung von 5,84 ± 1,63 % festzustellen. Die Extrusion durch die 100 nm Membran führt zum vollständigen Verlust der Echogenizität. DPPC/PEG40S und DSPC/PEG40S wurden nicht ganz so stark von der Extrusion beeinflusst. Für DPPC/PEG40S sankt der mittlere Grauwert auf 88,56 ± 7,92 % für die 200 nm Membran und nach Extrusion durch die 100 nm Membran konnten noch 34,53 ± 4,40 % gemessen werden. 45,15 ± 3,69 % (200 nm) und 36,54 ± 3,07 % (100 nm) wurden für die DSPC/PEG40S-Formulierung erreicht.

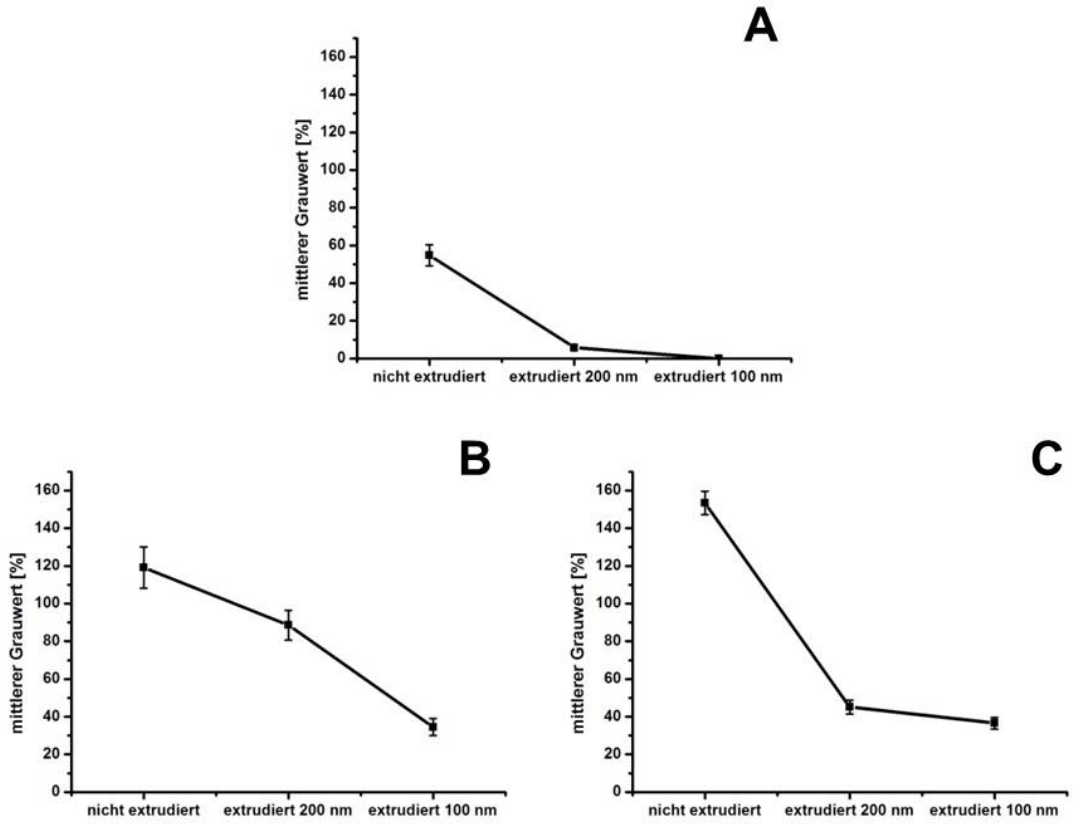

Abb. 4.2: Einfluss der Extrusion auf die Ultraschallkontrastverstärkung

Herstellung mit nachfolgender Lyophilisation

Die Lyophilisation zur Verbesserung der Lagerfähigkeit führte ausschließlich bei den DPPC/CH-Liposomen mit Zusatz von PEG4000 als Kryoprotektant zu einer Verstärkung der Echogenizität (105,58 ± 3,57 %). Die mittleren Grauwerte aller anderen Formulierungen nahmen teilweise deutlich ab (Tab. 4.1). Die PEG40S-haltigen NUSCA, die ohne Zusatz lyophilisiert wurden erreichten nur noch 30,60 ± 3,57 % (DPPC/PEG40S) und 89,85 ± 6,67 % (DSPC/PEG40S). Der Zusatz von Mannitol führt zu Kontrastverstärkungen von 14,56 ± 0,38 % für die DPPC/CH-Liposomen, 73,94 ± 3,78 % für die DPPC/PEG40S-Formulierung und 61,13 ± 2,51 % für die NUSCA aus DSPC und PEG40S. Ultraschallbilder der lyophilisierten NUSCA zeigt Abbildung 4.3.

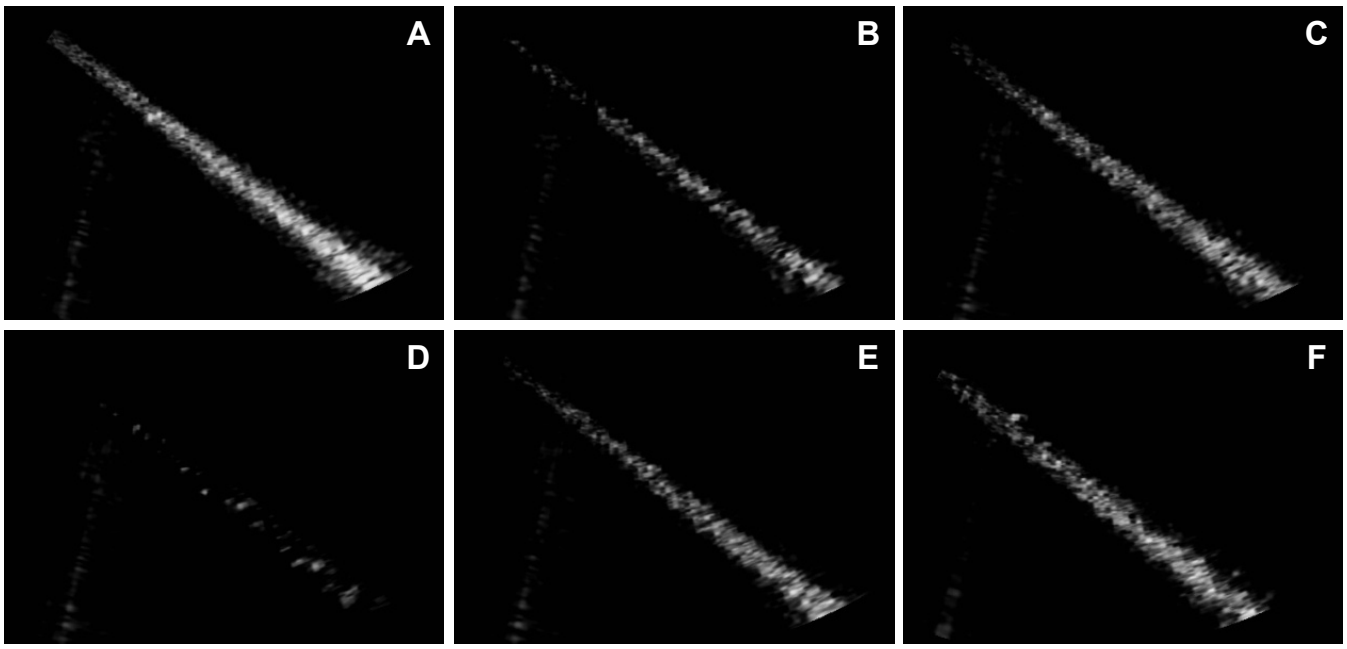

Abb. 4.3: Ultraschallkontrastverstärkung nach Lyophilisation; A: DPPC/CH, Zusatz PEG4000, B: DPPC/PEG40S, ohne Zusatz, C: DSPC/PEG40S, ohne Zusatz, D: DPPC/CH, Zusatz Mannitol, E: DPPC/PEG40S, Zusatz Mannitol, F: DSPC/PEG40S, Zusatz Mannitol

NUSCA	mittlerer Grauwert ± Standardabweichung [%]
DPPC/CH/DPPG (69:30:1)	15,59 ± 2,38
DPPC/CH/DPPG (68:30:2)	18,80 ± 1,02
DPPC/CH/DPPG (65:30:5)	45,65 ± 3,07
DPPC/CH/DPPG (63:30:8)	37,01 ± 3,11
DPPC/CH/DPPG (60:30:10)	25,24 ± 1,31
DPPC/PEG40S/DPPG (97:2:1)	43,47 ± 3,88
DPPC/PEG40S/DPPG (96:2:2)	24,27 ± 2,15
DPPC/PEG40S/DPPG (93:2:5)	35,95 ± 2,45
DPPC/PEG40S/DPPG (90:2:8)	87,62 ± 5,37
DPPC/PEG40S/DPPG (88:2:10)	80,07 ± 4,65
DSPC/PEG40S/DPPG (97:2:1)	94,16 ± 12,84
DSPC/PEG40S/DPPG (96:2:2)	20,19 ± 4,46
DSPC/PEG40S/DPPG (93:2:5)	60,03± 3,88
DSPC/PEG40S/DPPG (90:2:8)	91,66 ± 7,13
DSPC/PEG40S/DPPG (88:2:10)	41,82 ± 2,55

Tab. 4.2: Ultraschallkontrastverstärkung nach Zugabe unterschiedlicher DPPG-Konzentrationen

Herstellung mit Zusatz von DPPG

Der Zusatz von DPPG zu den Lipidmischungen verschlechterte die Echogenizität der NUSCA (Tab. 4.2 und Abb. 4.4). Für die DPPC/CH/DPPG-Liposomen lag der Kontrast der Formulierungen mit unterschiedlichen DPPG-Konzentrationen zwischen 15,69 ± 1,79 % und 45,65 ± 3,07 %, wobei die Echogenizität nach allgemeiner Methode hergestellter DPPC/CH-Liposomen bei etwa 55 % lag. Auf die PEG40S-haltigen Formulierungen war der Einfluss deutlich größer, die Echogenizität sank auf Werte zwischen 20,19 ± 4,46 % und 94,16 ± 12,84 % ab. Nach allgemeiner Methode produzierte PEG40S-haltige NUSCA verstärkten den Kontrast um etwa 120 % (DPPC/PEG40S) oder 150 % (DSPC/PEG40S).

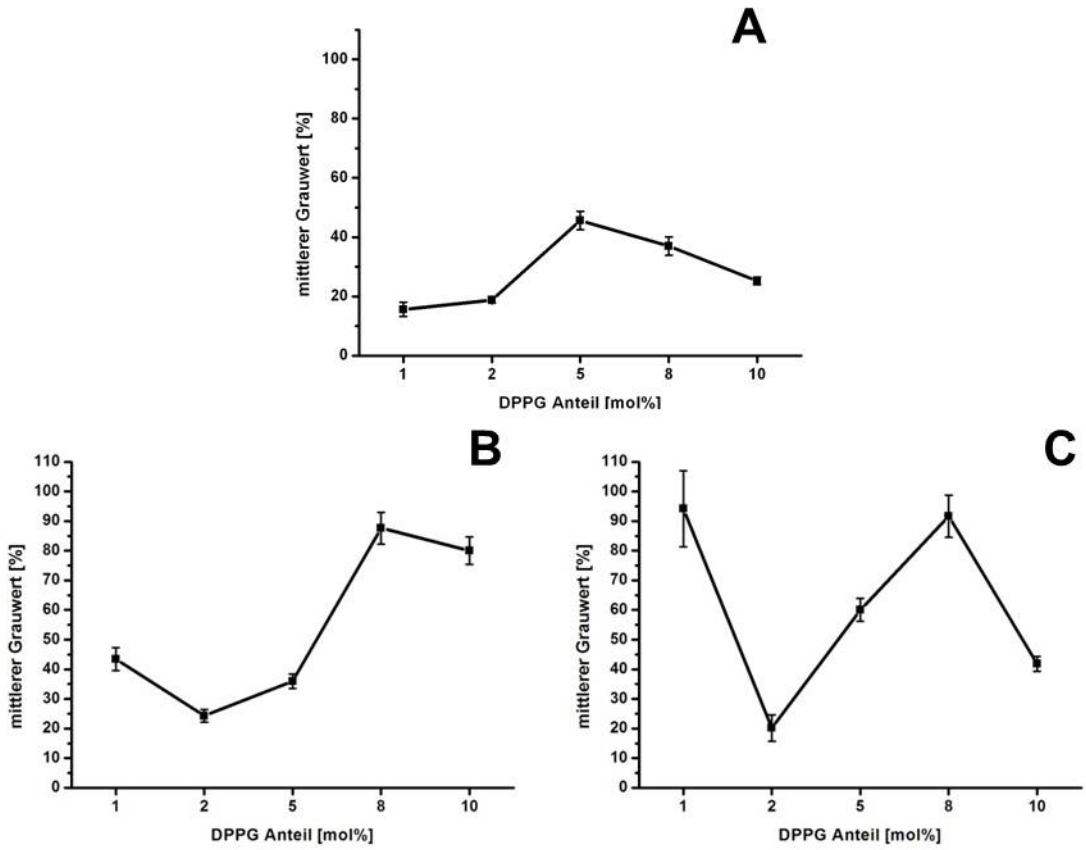

Abb. 4.4: Ultraschallkontrastverstärkung nach Zusatz verschiedener Konzentrationen an DPPG; A: DPPC/CH, B: DPPC/PEG40S, C: DSPC/PEG40S

Herstellung mit zusätzlicher Beschallung am Ultraschallhomogenisator

Die zusätzliche Beschallung an der Oberfläche der Lipid-Formulierung führte wahrscheinlich zu einem Einschluss kleiner Mengen Luft, die aber nicht nachweisbar waren. Beim zweiten Versuchsziel dieser Testreihe konnte ein Einfluss der PEG40S-Konzentration auf die Echogenizität festgestellt werden. In Abbildung 4.5 sind die Kontrastintensitäten der einzelnen NUSCA graphisch dargestellt, die Einzelwerte fasst Tabelle 4.3 zusammen. Bei den DPPC/PEG40S-Formulierungen konnte ein steiler Anstieg der Kontrastverstärkung von 35,90 ± 2,24 % auf 97,42 ± 5,51 % für die Formulierungen mit den molaren Verhältnissen von 94:6 und 92:8 gemessen werden. Ein ähnlicher Anstieg wurde für die DSPC-Formulierungen mit den PEG40S-Konzentrationen von 2 und 4 mol% gefunden. Hier änderte sich der Kontrast sprunghaft von 46,04 ± 3,91 % auf 139,91 ± 9,50 %. Alle Echogenizitäten wurden am zweiten Tag nach der Herstellung der NUSCA gemessen.

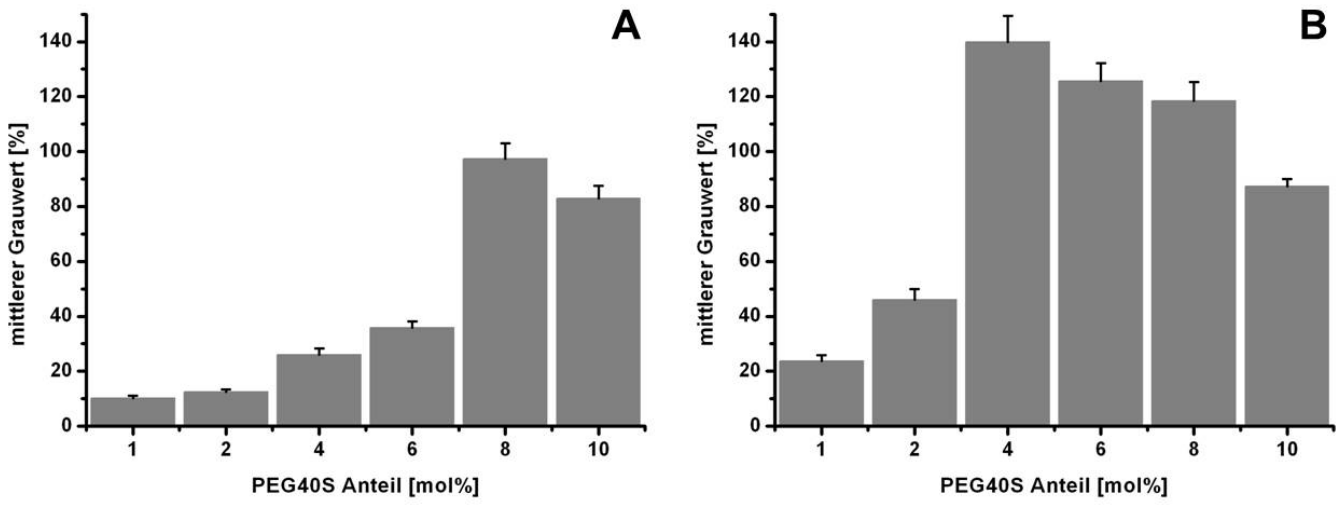

Abb. 4.5: Ultraschallkontrastverstärkung nach Herstellung mit zusätzlicher Beschallung am Ultraschallhomogenisator bei unterschiedlichen PEG40S-Konzentrationen;
A: DPPC/PEG40S, B: DSPC/PEG40S

NUSCA	mittlerer Grauwert ± Standardabweichung [%]
DPPC/PEG40S (99:1)	10,18 ± 0,89
DPPC/PEG40S (98:2)	12,53 ± 0,81
DPPC/PEG40S (96:4)	26,07 ± 2,21
DPPC/PEG40S (94:6)	35,90 ± 2,24
DPPC/PEG40S (92:8)	97,42 ± 5,51
DPPC/PEG40S (90:10)	83,04 ± 4,53
DSPC/PEG40S (99:1)	23,76 ± 2,15
DSPC/PEG40S (98:2)	46,04 ± 3,91
DSPC/PEG40S (96:4)	139,91 ± 9,50
DSPC/PEG40S (94:6)	125,62 ± 6,51
DSPC/PEG40S (92:8)	118,5 ± 6,88
DSPC/PEG40S (90:10)	87,31 ± 2,71

Tab. 4.3: Ultraschallkontrastverstärkung nach Herstellung mit zusätzlicher Beschallung am Ultraschallhomogenisator bei unterschiedlichen PEG40S-Konzentrationen

4.1.2 Stabilität des Ultraschallkontrastes

Allgemeine Herstellung

Bei der Durchflussstabilität zeigten die NUSCA im Modell eine Kontrastverstärkung, die bis zu 5 min anhielt, während sich der Kontrast des SonoVue® nach 2 min so deutlich abschwächte, dass nur noch vereinzelte helle Punkte sichtbar waren.

Die Lagerstabilität der Echogenizität wurde wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben am Tag der Herstellung und nach 2, 4, 7 und 14 Tagen bestimmt. Zusätzlich zur Kontrastverstärkung wurde jeweils die Partikelgröße der Formulierungen mittels DLS gemessen. Alle Daten sind in Tabelle 4.4 und Abb. 4.6 zusammengefasst. Für SonoVue® konnten, wie schon erklärt,

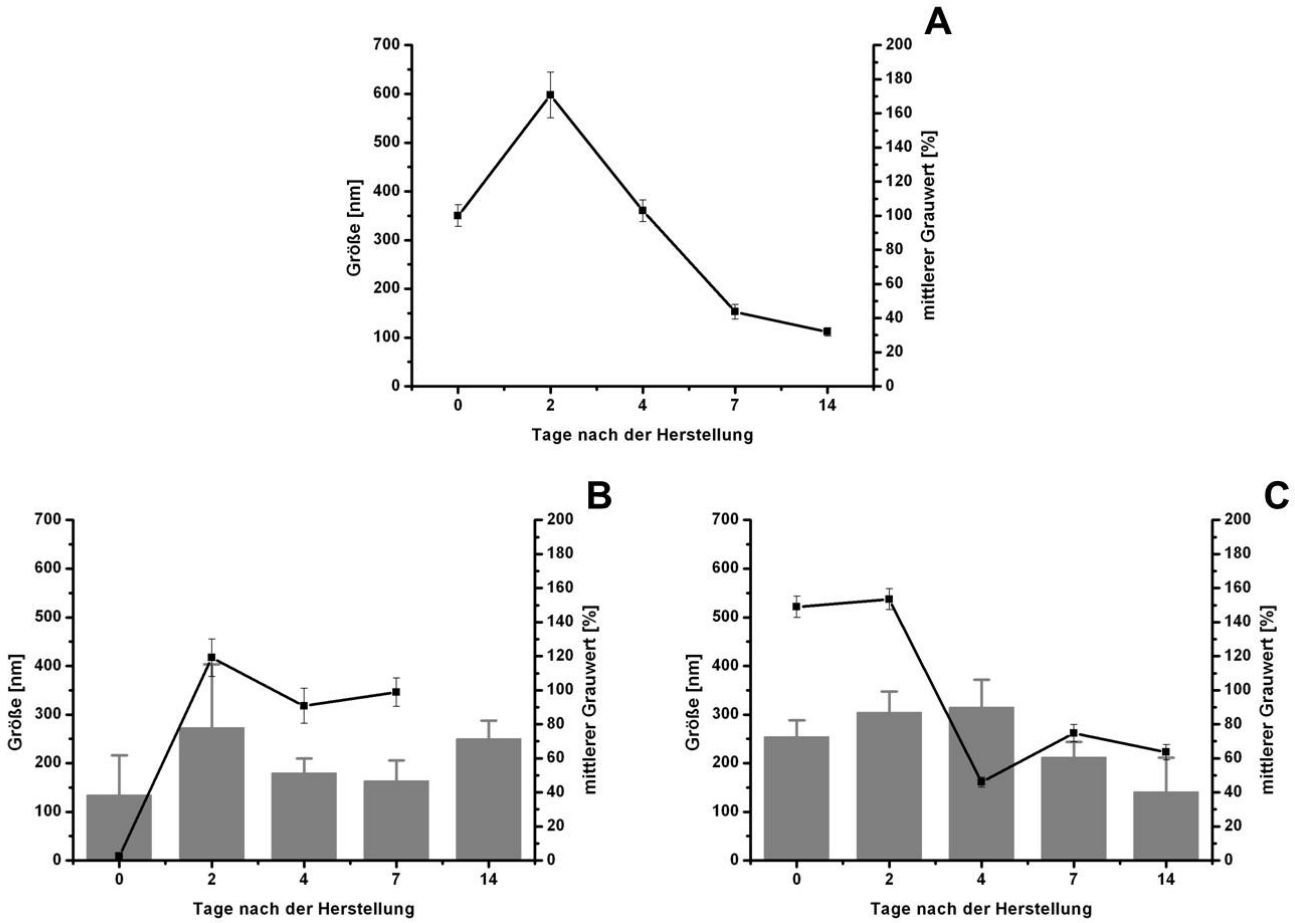

Abb. 4.6: Stabilität des Ultraschallkontrastes und der Partikelgröße nach allgemeiner Herstellung produzierter NUSCA; A: SonoVue®, B: DPPC/PEG40S, C:DSPC/PEG40S

NUSCA	mittlerer Grauwert ± Standardabweichung [%]	Durchmesser ± Standardabweichung [nm]	PDI
Messung am Tag der Herstellung			
SonoVue®	100,01 ± 6,34		
DPPC/PEG40S (98:2)	2,6 ± 0,4	134,81 ± 80,97	0,345
DSPC/PEG40S (98:2)	148,96 ± 6,23	254,44 ± 34,26	0,644
Messung 2 Tage nach der Herstellung			
SonoVue®	170,66 ± 13,45		
DPPC/PEG40S (98:2)	119,05 ± 10,94	272,90 ± 130,65	0,598
DSPC/PEG40S (98:2)	153,44 ± 6,13	304,21 ± 43,01	0,626
Messung 4 Tage nach der Herstellung			
SonoVue®	102,92 ± 6,36		
DPPC/PEG40S (98:2)	90,82 ± 10,29	180,15 ± 29,57	0,555
DSPC/PEG40S (98:2)	45,99 ± 2,87	315,50 ± 55,95	0,732
Messung 7 Tage nach der Herstellung			
SonoVue®	43,64 ± 4,32		
DPPC/PEG40S (98:2)	98,85 ± 8,26	163,32 ± 42,53	0,574
DSPC/PEG40S (98:2)	74,68 ± 5,16	211,86 ± 31,45	0,731
Messung 14 Tage nach der Herstellung			
SonoVue®	31,87 ± 2,42		
DPPC/PEG40S (98:2)	n.d.	249,76 ± 37,95	0,595
DSPC/PEG40S (98:2)	63,55 ± 4,51	141,02 ± 70,17	0,745

Tab. 4.4: Stabilität des Ultraschallkontrastes und der Partikelgröße nach allgemeiner Herstellung produzierter NUSCA und SonoVue®

keine Größendaten ermittelt werden. Die Messreihe der DPPC/CH-Liposomen wurde nicht ausgewertet, da die Kontraste zu schwach waren um klinisch genutzt zu werden. Die anderen Formulierungen zeigten am 2. Tag nach der Herstellung einen deutlichen Anstieg der Ultraschallkontrastverstärkung, die für die DPPC/PEG40S-Formulierungen besonders stabilste war. Nach zwei Tagen war ein Anstieg und nachfolgender leichter Abfall der Echogenizität sichtbar, die Kontrastverstärkung blieb aber bei etwa 90 % konstant. Am 14. Tag nach der Herstellung konnten aufgrund eines technischen Problems leider keine Bilder abgespeichert werden, ein Kontrast war aber mit dem Auge deutlich sichtbar. Für die DSPC/PEG40S-Mischung konnten am zweiten Tag höhere Werte als für die DPPC/PEG40S-Formulierung nachgewiesen werden. Danach sank die Echogenizität aber deutlich auf 45,99 % ab, stieg wieder leicht an und blieb dann bis zum Ende der Versuchsreihe bei etwa 65 % konstant. Das SonoVue®, das uns in allen Versuchen als Bezugspunkt diente, zeigte am zweiten Tag die beste Kontrastverstärkung. Danach nahm dieser Kontrast kontinuierlich bis zum 14. Tag nach der Herstellung ab, am Ende waren nur noch etwa 30 % Kontrastverstärkung nachweisbar.

Bei den gemessenen Partikelgrößen der NUSCA ließ sich kein klarer Trend ablesen.

Herstellung mit nachfolgender Extrusion

Die oben bereits beschrieben Abschwächung der Echogenizität nach Extrusion der Formulierungen wurde in ähnlicher Form auch bei der Stabilität des Kontrastes beobachtet. Nach 5 min konnte für keine der Formulierungen eine Kontrastverstärkung nachgewiesen werden.

Herstellung mit nachfolgender Lyophilisation

Die lyophilisierten Liposomen konnten auch bei der Stabilität der Kontrastverstärkung nicht überzeugen. Einzig die DPPC/CH-Liposomen, die mit Zusatz von PEG4000 lyophilisiert

wurden zeigten nach 5 min noch einen schwachen Ultraschallkontrast. Für alle anderen Formulierungen schwächte die Kontrastverstärkung nach 3 min so weit ab, dass sie nicht mehr gemessen werden konnte.

Herstellung mit Zusatz von DPPG

Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Zirkulationsstabilität der DPPG-haltigen NUSCA. Nach 3 min war für keine der Formulierungen eine Kontrastverstärkung zu beobachten, die über vereinzelte helle Punkte hinausging. Für die Formulierungen, die 1 mol% DPPG enthielten, wurde die Lagerstabilität geprüft (Tab. 4.5 und Abb. 4.7). Der Zusatz von DPPG sollte zu einer stabileren Suspension führen, in der die Liposomen nicht mehr leicht aggregieren konnten. Die DPPC/CH/DPPG-Formulierung zeigte wiederum sehr schwache Kontrast-verstärkungen, sodass auch diese Reihe nicht ausgewertet wurde. Auf den Bildern konnten nur einzelne recht dunkle Kontrastpunkte erkannt werden, die nicht zu einer für die Klinik nutzbaren Kontrastverstärkung führten.

Für die DPPC/PEG40S/DPPG-Formulierung konnte nachgewiesen werden, dass die Partikelgrößen stabiler waren, als ohne Zusatz von DPPG. Ab dem zweiten Tag nach der Herstellung, bis zum 14. Tag nahm der Kontrast der Formulierung stetig zu und erreichte ca.

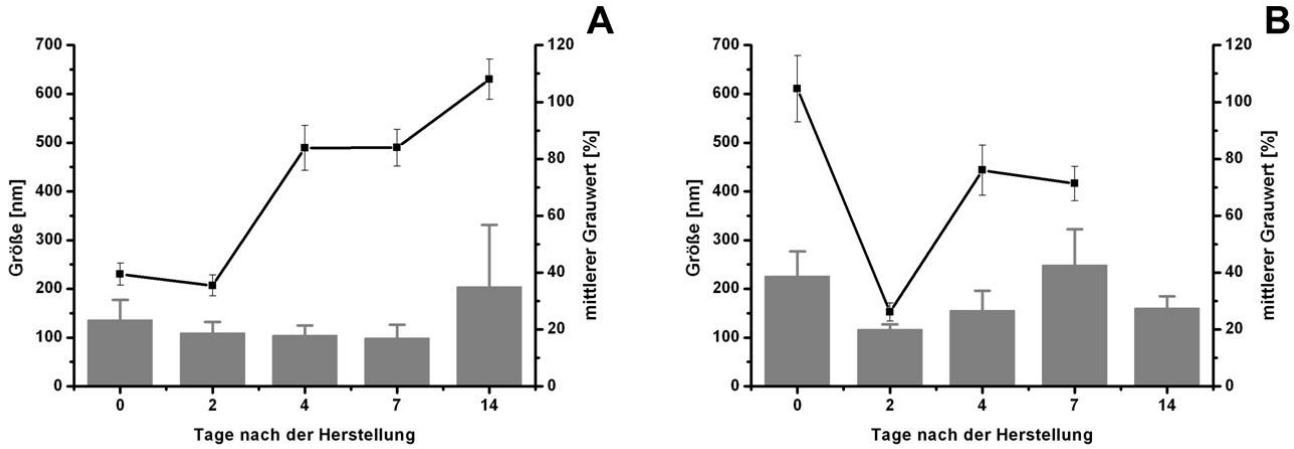

Abb. 4.7: Stabilität des Ultraschallkontrastes und der Partikelgröße nach Zusatz von 1 mol% DPPG; A: DPPC/PEG40S, B: DSPC/PEG40S

NUSCA	mittlerer Grauwert [%]	Durchmesser ± Standardabweichung [nm]	PDI
Messung am Tag der Herstellung			
DPPC/PEG40S/DPPG (97:2:1)	39,38 ± 3,89	136,38 ± 40,92	0,460
DSPC/PEG40S/DPPG (97:2:1)	104,64 ± 11,61	225,62 ± 51,31	0,488
Messung 2 Tage nach der Herstellung			
DPPC/PEG40S/DPPG (97:2:1)	35,46 ± 3,71	109,07 ± 22,81	0,396
DSPC/PEG40S/DPPG (97:2:1)	26,13 ± 3,21	116,50 ± 10,90	0,503
Messung 4 Tage nach der Herstellung			
DPPC/PEG40S/DPPG (97:2:1)	83,85 ± 7,91	104,31 ± 20,20	0,399
DSPC/PEG40S/DPPG (97:2:1)	76,02 ± 8,82	155,16 ± 40,71	0,546
Messung 7 Tage nach der Herstellung			
DPPC/PEG40S/DPPG (97:2:1)	83,92 ± 6,46	98,52 ± 27,69	0,421
DSPC/PEG40S/DPPG (97:2:1)	71,30 ± 5,99	248,28 ± 74,24	0,493
Messung 14 Tage nach der Herstellung			
DPPC/PEG40S/DPPG (97:2:1)	107,95 ± 7,11	204,03 ± 127,00	0,467
DSPC/PEG40S/DPPG (97:2:1)	n.d.	160,22 ± 24,11	0,485

Tab. 4.5: Stabilität des Ultraschallkontrastes und der Partikelgröße nach Zusatz von 1 mol% DPPG

110 %. Vom Tag der Herstellung, bis zum zweiten Tag nach Herstellung lag die Kontrastverstärkung nur bei 35 - 40 %. Für die DSPC/PEG40S/DPPG-Formulierungen konnte ein sehr hoher Kontrast am Tag der Herstellung bestimmt werden, der aber bis zum zweiten Tag nach der Herstellung auf niedrige 18 % absank. Nach einem Anstieg auf 76 % sank der Kontrast bis zum 7. Tag der Messung langsam wieder auf 62 % ab. Auch hier gab es am 14. Tag nach der Herstellung ein technisches Problem, dass ein Abspeichern und Auswerten von Bildern verhinderte. Der Kontrast erschien für das menschliche Auge ähnlich stark wie am 7. nach der Herstellung.

Herstellung mit zusätzlicher Beschallung am Ultraschallhomogenisator

Die zusätzliche Beschallung mit dem Ultraschallhomogenisator ergab deutlich stabilere Kontrastverstärkungen als die allgemeine Herstellungsmethode. Die NUSCA zeigten alle eine gute Kontrastverstärkung, die für 5 min anhielt. Bei der DSPC/PEG40S-Formulierung mit dem molaren Verhältnis von 96:4 konnte eine deutliche Kontrastverstärkung für mehr als 6 min gemessen werden.

4.2 Diskussion

Zur Sicherstellung einer guten und schnellen klinischen Diagnose werden heutzutage oft UCAs eingesetzt, um die Bildqualität zu verbessern [14]. Wichtige Eigenschaften eines UCA sind dabei eine relativ lange Zirkulationsstabilität im Blutkreislauf und eine ausreichende Verstärkung des Ultraschallkontrastes. Auch die gute Verträglichkeit für den Patienten ist, wie bei jedem Arzneimittel, zu beachten. Da liposomale Zubereitungen als gut verträglich bekannt sind, sollen in dieser Arbeit die kontrastverstärkenden Eigenschaften liposomaler Formulierungen getestet werden.

Zur Messung der Ultraschallkontrastverstärkung der von uns entwickelten NUSCA wurde ein Flussmodell mit einem durch eine Pumpe angetriebenen Kreislauf speziell angefertigt. Auch Cintas *et al.* [33] und Smith *et al.* [43] verwendeten durch Pumpen angetrieben Flussmodelle, wobei sie mit Wasser anstelle des von uns verwendeten Agar-Gels arbeiteten und so die Ultraschalleigenschaften des menschlichen Gewebes nicht nachstellten. In diesem Punkt verbesserte Flussmodelle verwendeten Schumann *et al.* [92], die Agar-Gel statt des Wassers verwendet, und Spengos *et al.* [93], die ein menschliches Schläfenbein zwischen US-Sonde und Probe einbauten. In beiden Modelle waren allerdings keine Pumpen eingebaut, sondern der Fluss wurde nur von der Schwerkraft getrieben. Unser Flussmodell stellte mit seinem Agar-Gel und dem C-flex® Schlauch gut die Bedingungen des menschlichen Körpers nach. Ein Schläfenbein wie bei Spengos *et al.* [93] könnte als Verbesserung in unser Modell eingebaut werden. Zusätzlich zu den ultraschallab-schwächenden Eigenschaften des menschlichen Körpers bot unser Modell die Möglichkeit, den Druck in den Schläuchen genau auf den menschlichen Blutdruck einzustellen. Der Einbau eines intra-arteriellen Messsystems garantierte die Überwachung dieses Drucks. Die Temperatur im Modell wurde mit Hilfe eines temperierten Wasserbades auf 37 °C gehalten und Tris-Albumin-Puffer pH 7,4 war als Trägermedium dem Blut näher als das in anderen Studien verwendete reine Wasser. Die NUSCA wurden in das Pufferreservoir des Modells

gegeben und dann mit dem durch die Pumpe generierten Fluss in den Schläuchen verteilt. In Abbildung 4.1 ist zu erkennen, dass die Ultraschallkontrastverstärkung unserer NUSCA teilweise ähnlich stark ausgeprägt war, wie die des kommerziell erhältlichen SonoVue® (Abb. 2.4). Zur Verbesserung der Eigenschaften unserer NUSCA wurden verschiedene Veränderungen der Herstellungsweise oder der Lipidzusammensetzung vorgenommen. In Kapitel 3 wurden die teilweise sehr positiven Einflüsse dieser Veränderungen auf die Partikelgröße der NUSCA diskutiert. Der Einfluss auf die Echogenizität ist Gegenstand dieses Kapitels, wobei sich sehr verallgemeinert zusammenfassen lässt, dass die Veränderungen der Herstellungsmethode und Zusammensetzung fast ausnahmslos einen negativen Einfluss auf die Echogenizität hatten. Die Herstellung mit zusätzlicher Beschallung am Ultraschallhomogenisator war die einzige Veränderung, die zu einer Verstärkung des Kontrastes der NUSCA führte.

Nach allgemeiner Herstellungsmethode produzierte NUSCA zeigten Ultraschallkontrast-verstärkungen zwischen 55 % und 153 %. Die PEG40S-haltigen NUSCA konnte dabei mit einem sehr gleichmäßigen Kontrast überzeugen (Abb. 4.1). Das DPPC/CH zeigte einen eher ungleichmäßigen Kontrast, der die einzelnen Partikel des Kontrastmittels deutlich erkennen ließ. Eine Zirkulationsstabilität von 5 min machte unsere NUSCA dem kommerziellen SonoVue® überlegen, für das in unserem Modell eine deutliche Kontrastverstärkung nur für 2 min nachgewiesen werden konnte. Sehr vielversprechenden für die Anwendung als neues Kontrastmittel, war auch die in Abbildung 4.6 dargestellte deutlich bessere Lagerstabilität der PEG40S-haltigen NUSCA. SonoVue® verlor im Laufe der 14tägigen Lagerung seine kontrastverstärkende Wirkung fast vollständig (Abb. 4.6 A), was sich vermutlich auf den langsamen Verlust des eingeschlossenen Gases Schwefelhexafluorid zurückführen ließ [76]. Die konstante Kontrastverstärkung unserer PEG40S-haltigen NUSCA (Abb. 4.6 B und C) dagegen sprach für die Tatsache, dass deren Kontrastverstärkung nicht oder nicht ausschließlich auf eingeschlossenes Gas zurückführbar war. Die DPPC/CH-Liposomen konnten bei den Untersuchungen der Lagerstabilität der Echogenizität nicht überzeugen. Ihre Kontrastverstärkung war nur sehr schwach ausgeprägt, weshalb diese Reihe nicht

ausgewertet wurde. Eine leichte Verstärkung des Kontrastes, bei der die einzelnen Partikel des NUSCA voneinander zu unterscheiden sind reicht nicht für eine klinische Anwendung aus.

Die Extrusion, die zu einer Verkleinerung der NUSCA und einer Verbesserung ihrer PDIs führte, schwächte den Ultraschallkontrast und vor allem die Kontraststabilität deutlich ab. Für die DPPC/CH-Liposomen konnte nach der Extrusion fast keine Kontrastverstärkung beobachtet werden. Eine Erklärung für diese Ergebnisse kann bei Alkan-Onyuksel *et al.* [78] gefunden werden, die eine angemessene Ultraschallkontrastverstärkung nur für multilamellare Liposomen nachweisen konnten. Wie in Kapitel 3 beschrieben lag für die DPPC/CH-Liposomen eine Mischung aus unilamellaren, multilamellaren und Liposomen in Liposomen vor. Die Extrusion müsste diese Mischung fast ausschließlich zu unilamellaren Liposomen verschoben haben. Der Verlust der Echogenizität der DPPC/CH-Liposomen nach der Extrusion bestätigt also die These von Alkan-Onyuksel *et al.* [78], dass nur multilamellare Liposomen eine gute Ultraschallkontrastverstärkung aufweisen. Dies wirft aber die Frage auf, warum die PEG40S-haltigen NUSCA nicht so stark von der Extrusion beeinflusst wurden. Für sie konnte nach der Extrusion noch eine annehmbare Kontrastverstärkung nachgewiesen werden, die allerdings keine lange Zirkulationsstabilität mehr auswies. Aus den Betrachtungen der Struktur in Kapitel 3 ist bekannt, dass diese NUSCA nicht ausschließlich liposomaler Struktur waren, sondern eine Mischung aus Mizellen und Liposomen darstellten. Diese Mischung war unserer Auffassung nach verantwortlich für ihre gute Ultraschallkontrastverstärkung. Die Extrusion beeinflusst die PEG40S-haltigen NUSCA daher nicht in dem Maße, wie die DPPC/CH-Liposomen. Nach der Extrusion könnten die Liposomen kleiner geworden sein, das Verhältnis zwischen Mizellen und Liposomen oder die Mizellen wurden aber nicht beeinflusst. Die verkürzte Stabilität des Kontrastes könnte mit einer Verdrängung vorher in den NUSCA eingeschlossener Luft zu begründen sein. Die Suspensionen der PEG40S-haltigen NUSCA bildeten beim Schütten schnell Schaum, was zu der Annahme führte, dass kleine Mengen Luft während der Herstellung eingeschlossen worden sein könnten.

Die nächste Veränderung der Herstellungsmethode war die Lyophilisation der fertigen NUSCA. Diese weit verbreitete Methode sollte die Lagerungsstabilität der Kontrastmittel vergrößern und gleichzeitig zur Verstärkung der Echogenizität dienen. Vor allem für das Kryoprotektant Mannitol ist eine Verstärkung des Ultraschallkontrastes nach der Lyophilisation beschrieben worden [58]. Mannitol ist dabei als schwaches Kryoprotektant bekannt, das eine Kristallisation des Wassers als Eis nicht vollständig verhindern kann, was dazu führt, dass die Membranen der Liposomen bzw. Mizellen während des Gefrierens aufreißen [58]. Da sich nach dem Lyophilisieren ein voluminöses Pulver ausbildet, wird bei Resuspendierung dieses Pulvers immer ein wenig Luft mit in die Lösung gebracht. Die aufgerissenen Membranen finden im Wasser wieder zu ihrer ursprünglichen Gestalt und schließen Anteile der Luft ein. Bei unseren Versuchen konnte für das Mannitol dieser von Huang *et al.* [58] gefundene Effekt nicht nachgewiesen werden. Die DPPC/CH-Liposomen zeigten nach Lyophilisation mit Mannitol fast keine Echogenizität mehr. Auch die PEG40S-haltigen Formulierungen wurden in ihrem Ultraschallkontrast nicht verstärkt. Als weiteres Kryoprotektant wurde PEG4000, das dem kommerziellen SonoVue®, zugesetzt ist, bei den DPPC/CH-Liposomen getestet. Dieses konnte den Kontrast deutlich verstärken, aber auch hier wurde keine stabile Kontrastverstärkung erreicht. Auch dem PEG40S in den Membranen der anderen Formulierungen konnte keine kryoprotektive Wirkung nachgewiesen werden. Die Echogenizität der ohne Zusatz eines Kryoprotektant gefriergetrockneten DPPC/PEG40S- und DSPC/PEG40S-Formulierungen sankt deutlich ab und konnte im Flussmodell nicht länger als 2 min beobachtet werden.

Der Zusatz von DPPG zu den Lipidmischungen der NUSCA sollte die mögliche Aggregation der Partikel im Laufe der Lagerung verhindern. Die Echogenizität aller Mischungen mit DPPG lag dabei aber unterhalb der Werte, die nach allgemeiner Herstellungsmethode ermittelt wurden, auch die Stabilität bei Zirkulation im Flussmodell war vermindert. Ein Anteil von 8 mol% DPPG führte bei den PEG40S-haltigen NUSCA zu der besten Kontrastverstärkung, die aber mindestens 30 % niedriger war als die der nach allgemeiner Herstellungsmethode produzierten NUSCA. Für die DPPC/CH-Liposomen ergab sich bei

5 mol% DPPG mit 45 % die beste Kontrastverstärkung, die aber 10 % unter der Kontrastverstärkung der reinen DPPC/CH-Liposomen lag. Eine Beimischung solch hoher Konzentrationen an DPPG führt möglicherweise zu einer Veränderung des molekularen Aufbaus unserer NUSCA, daher wurde die Lagerstabilität der Echogenizität mit einem Anteil von 1 mol% DPPG bestimmt. Diese Menge war ausreichend das Zetapotential auf Werte abzusenken, die einer Aggregation der Partikel entgegen wirken (Tab. 3.2). Für die DPPC/CH-Liposomen mit Zusatz von 1 mol% DPPG konnten keine auswertbaren Ultraschallkontraste bestimmt werden. Die Formulierung zeigte bei der Bestimmung der Kontrastverstärkung ohne Untersuchung der Stabilität nur 15 % Echogenizität, die im Laufe der Lagerung weiter abnahm. Für die DPPC/PEG40S/DPPG-Formulierung konnte eine interessante Verstärkung der Echogenizität über 14 Tage beobachtet werden, was diese Formulierung interessant für eine längere Untersuchung der Stabilität macht. Die mittleren Grauwerte der Kontrastverstärkung blieben bis zum 14. Tag unter denen der NUSCA nach allgemeiner Herstellungsmethode zurück, eine weitere Steigerung kann aber nicht ausgeschlossen werden. Für die DSPC/PEG40S Formulierung mit zusätzlichem DPPG konnte ein starker Abfall der Echogenizität am 2. Tag nach der Herstellung gefunden werden. Ein ähnlicher, wenn auch nicht ganz so ausgeprägter Abfall war schon für die NUSCA nach allgemeiner Herstellungsmethode am 4. Tag sichtbar. Lässt man diesen Wert aus den Betrachtungen heraus, war der Kontrast der Formulierung stabil, lediglich ein Abfall von 105 % auf 70 % konnte bis zum 7. nach der Herstellung festgestellt werden. Zur Klärung der steilen Abfälle am 2. bzw. 4. Tag sollten diese Versuchsreihen mit weiteren Proben wiederholt werden, wobei eine tägliche Messung der Kontrastverstärkung und der Partikelgrößen sinnvoll wäre.

Die Herstellung mit zusätzlicher Beschallung am Ultraschallhomogenisator sollte zu einer Verkleinerung der NUSCA und einer Verstärkung des Ultraschallkontrastes führen. Wie in Kapitel 3 beschrieben konnte der erste Teil sehr gut erfüllt werden, auch wenn die PDIs aufgrund der Mischung von Mizellen und Liposomen nicht deutlich verbessert werden konnten. Eine Verstärkung des Ultraschallkontrastes konnte nicht direkt an den mittleren

Grauwerten festgestellt werden, aber die Stabilität der mit zusätzlicher Beschallung hergestellten NUSCA wurde deutlich verbessert. Alle Formulierungen zeigten eine gute Kontrastverstärkung für 5 min im Flussmodell, wobei für DSPC/PEG40S mit einem molaren Verhältnis von 96:4 eine Echogenizität für mehr als 6 min nachgewiesen werden konnte. Betrachtet man die strukturellen Untersuchungen aus Kapitel 3 gemeinsam mit den Ergebnissen der Kontrastmessungen, ist ein Einfluss des Verhältnisses zwischen Mizellen und Liposomen auf die Echogenizität der NUSCA als sehr wahrscheinlich anzusehen. Auffällig ist bei beiden Konzentrationsreihen ein steiler Anstieg der Echogenizität. Bei den DPPC/PEG40S-Formulierungen war dieser Anstieg bei 8 mol% PEG40S sichtbar, bei den NUSCA, die DSPC als Phospholipid enthielten, konnte der Anstieg bei 4 mol% PEG40S beobachtet werden. Vergleicht man die cryo-TEM-Bilder dieser beiden Formulierungen, sind für die DPPC/PEG40S NUSCA fast ausschließlich diskoidale Mizellen sichtbar, während beim DSPC/PEG40S auch noch Liposomen zu finden waren. Für beide Formulierungen scheint also ein unterschiedliches Verhältnis von Liposomen zu Mizellen notwendig zu sein, um einen guten und stabilen Ultraschallkontrast hervorzubringen.

In diesem Kapitel konnten wir die Effekte der unterschiedlichen Herstellungsmethoden und Lipidmischungen auf die Echogenizität der NUSCA analysieren und die meisten als negativ einstufen. Die Echogenizität konnte durch die Lyophilisation nicht gesteigert werden. Die Extrusion, die so positive Einflüsse auf die Partikelgröße und ihre Verteilung hatte, löschte den Ultraschallkontrast der DPPC/CH-Liposomen vollständig aus und verschlechterte die Stabilität des Kontrastes der PEG40S-haltigen NUSCA. Auch der Zusatz von DPPG verschlechterte sowohl die Echogenizität als auch die Zirkulationsstabilität. Die Lagerungsstabilität der NUSCA wurde nach Zugabe von 1 mol% DPPG getestet. Für die DPPC/CH-Formulierungen konnte die Stabilität aufgrund der schlechten Kontrastverstärkung nicht bestimmt werden. Die PEG40S-haltigen NUSCA zeigten nach Zusatz von 1 mol% DPPG ähnlich stabile Echogenizitäten über 14 Tage, wie ohne Zusatz von DPPG. Dabei blieben die mittleren Grauwerte allerdings hinter denen der NUSCA nach allgemeiner Herstellungsmethode zurück. Nur die zusätzliche Beschallung mit dem Ultraschall-

homogenisator konnte die Echogenizität, vor allem die Stabilität des Ultraschallkontrastes, der PEG40S-haltigen NUSCA verbessern. Hier fiel der Einfluss der PEG40S-Konzentration auf die Kontrastverstärkung auf, der im Weiteren genauer untersucht wird.

5. Mischbarkeitsstudien an Lipiden

Die Charakterisierung und die Ultraschalluntersuchungen haben einen Einfluss der Struktur auf die Echogenizität der NUSCA gezeigt. Dabei konnte der erste Verdacht, dass ein bestimmtes Verhältnisses zwischen Liposomen und Mizellen für einen guten Ultraschallkontrast benötigt wird nur zum Teil bestätigt werden. In dem vorliegenden Kapitel sollen daher die verwendeten Lipidmischungen genauer auf ihre Mischbarkeit untersucht werden.

5.1 Ergebnisse

5.1.1 Monoschichtmessungen an der Langmuir-Filmwaage

Aufgrund der Beobachtungen der vorhergehenden Studien wurde das Mischungsverhalten von DPPC, DSPC und PEG40S mit Hilfe von Monoschichtmessungen analysiert. Abbildung 5.1 zeigt die bei konstanter Temperatur (25 °C) aufgenommenen Graphen des Lateraldrucks gegen die Fläche pro Molekül (Π/A-Isothermen). Für das Phospholipid DPPC konnte dabei die bekannte Isotherme gefunden werden (Abb. 5.1 A, Kurve 1), auf der sich flüssig-expandierte und flüssig-kondensierte Phase unterscheiden ließen [60]. Der Hauptphasen-übergang war deutlich bei einem Lateraldruck von 10 mN/m sichtbar, der dynamische Kollapsdruck wurde bei 49 mN/m und einer Fläche pro Molekül von 0,34 nm^2 erreicht. Für PEG40S (Abb. 5.1 A, Kurve 6) konnten dagegen keine unterschiedlichen Phasen und somit auch keine Phasenübergänge gemessen werden. Der sehr komprimierbare Film verblieb während der gesamten Messung in der flüssig-expandierten Phase und erreichte seinen Kollapsdruck bereits bei 27 mN/m und einer Fläche pro Molekül von 0,89 nm^2. Für die Mischungen beider Substanzen (Abb. 5.1 A, Kurve 2-5) war eine langsame Änderung der Kurvenform von der DPPC-Isotherme zur PEG40S-Isotherme mit steigendem Anteil an PEG40S sichtbar. Eine Zugabe von 1 mol% PEG40S zum DPPC führte schon zu einer

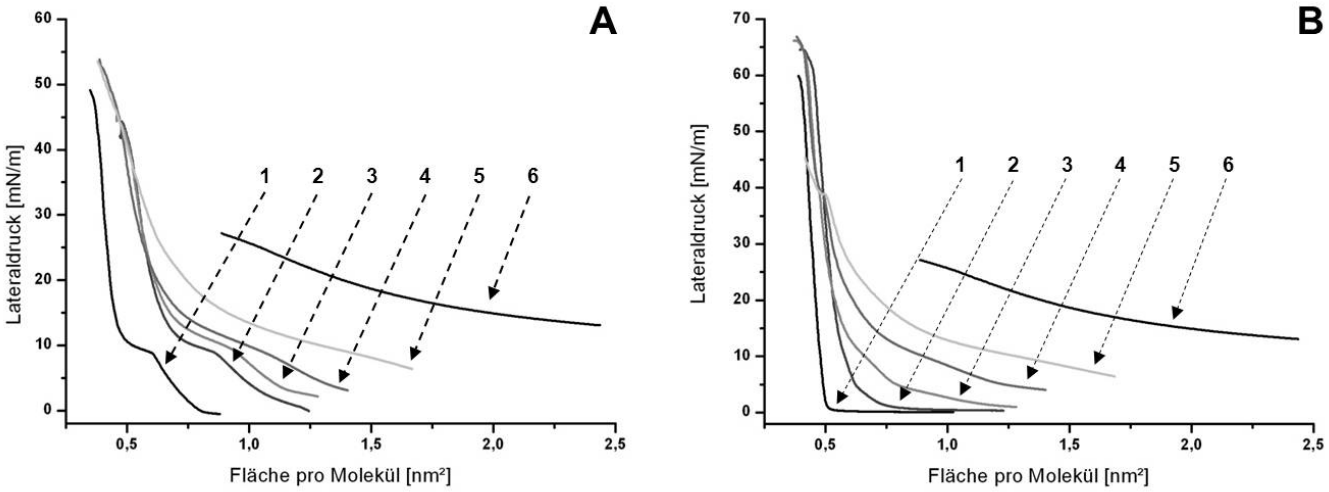

Abb. 5.1: Π/A-Isothermen;

A1: reines DPPC, A2: DPPC/PEG40S 99:1 mol%, A3: DPPC/PEG40S 96:4 mol%,

A4: DPPC/PEG40S 90:10 mol%, A5: DPPC/PEG40S 80:20 mol%, A6: reines PEG40S

B1: reines DSPC, B2: DSPC/PEG40S 99:1 mol%, B3: DSPC/PEG40S 96:4 mol%,

B4: DSPC/PEG40S 90:10 mol%, B5: DSPC/PEG40S 80:20 mol%, B6: reines PEG40S

Verschiebung der gesamten Kurve zu höheren molekularen Flächen. Der „lift off"-Punkt (der Punkt an dem die Isotherme die Nulllinie verlässt) verlagerte sich von etwa 0,8 nm^2 zu 1,25 nm^2, auch das Plateau des Hauptphasenüberganges und der Kollapspunkt wurden ähnlich verschoben. Bei einem Anteil von 4 mol% PEG40S konnte der „lift off" Punkt nicht mehr gemessen werden, da die Isotherme bei der aufgespreiteten Menge Lipid die Nulllinie bereits vor einer Kompression verlassen hatte. Der Hauptphasenübergang war gerade noch an einer Kurve in der Isotherme zu erkennen, das Plateau aber schon nicht mehr deutlich ausgeprägt. 10 mol% PEG40S ließen das Plateau des Hauptphasenüberganges vollständig verschwinden, der Anstieg der flüssig-kondensierten Phase des DPPC war aber noch erkennbar. Eine Zugabe von 20 mol% PEG40S näherten die Kurve weiter der des reinen PEG40S an, der Anstieg der flüssig-kondensierten Phase setzte deutlich später als beim reinen DPPC ein und war auch nicht mehr als deutlicher Wendepunkt in der Kurve zu erkennen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dieses Verhalten für eine Mischbarkeit

beider Substanzen in der flüssig-expandierten Phase spricht, die mit höheren PEG40S-Konzentrationen besser wird.

Die Vermessung des reinen DSPC ergab, wie erwartet, die Isotherme eines flüssig-kondensierten Films (Abb. 5.1 B, Kurve 1). DSPC-Filme sind sehr inkompressibel und kollabieren bei molekularen Flächen von 0,39 nm^2 und einem Druck von 59,8 mN/m. Ein Hauptphasenübergang ist hier nicht sichtbar, da der Film direkt nach dem „lift off" Punkt als flüssig-kondensierter Film vorliegt.

DSPC und PEG40S waren nicht vollständig mischbar, wie die Isothermen in Abb. 5.1 B, Kurven 2-5 anzeigen. 1 mol% PEG40S verschob die Isotherme deutlich zu höheren Flächen pro Molekül, ein Verlauf ähnlich der der Isotherme des reinen DSPC war aber noch zu erkennen. Die Zugabe von 4 mol% PEG40S führt schon zu einer Veränderung der Kurvenform der Isotherme. Der Übergang in den kondensierten Film war nicht mehr scharf abgegrenzt und auch der Anstieg, der den kondensierten Film kennzeichnet, war im Anfangsbereich nicht mehr so steil. Isothermen von Mischungen mit einem Anteil von mehr als 6 mol% PEG40S wiesen zwei Kollapspunkte auf. Am ersten Kollapspunkt, der bei etwa 40 mN/m lag, wurde das PEG40S aus dem Film verdrängt. Nach diesem Punkt entsprach der weitere Verlauf der Isotherme dem des reinen DSPC. Das Auftreten dieses zweiten Kollapspunktes ist ein deutliches Anzeichen für eine nicht vollständige Mischbarkeit der untersuchten Substanzen.

5.1.2 Epifluoreszenzmessungen an Monoschichten

Zusätzlich zu der oben beschriebenen Untersuchung des Kompressionsverhaltens bietet die Epifluoreszenzmessung an Monoschichten die Möglichkeit die Filmmorphologie und die laterale Verteilung von Substanzen im Film zu visualisieren.

Ein flüssig-expandierter Film wirkt dabei gleichmäßig hell, da sich das fluoreszenzmarkierte Lipid im ganzen Film problemlos verteilen kann. Ein Beispiel für ein solches Verhalten

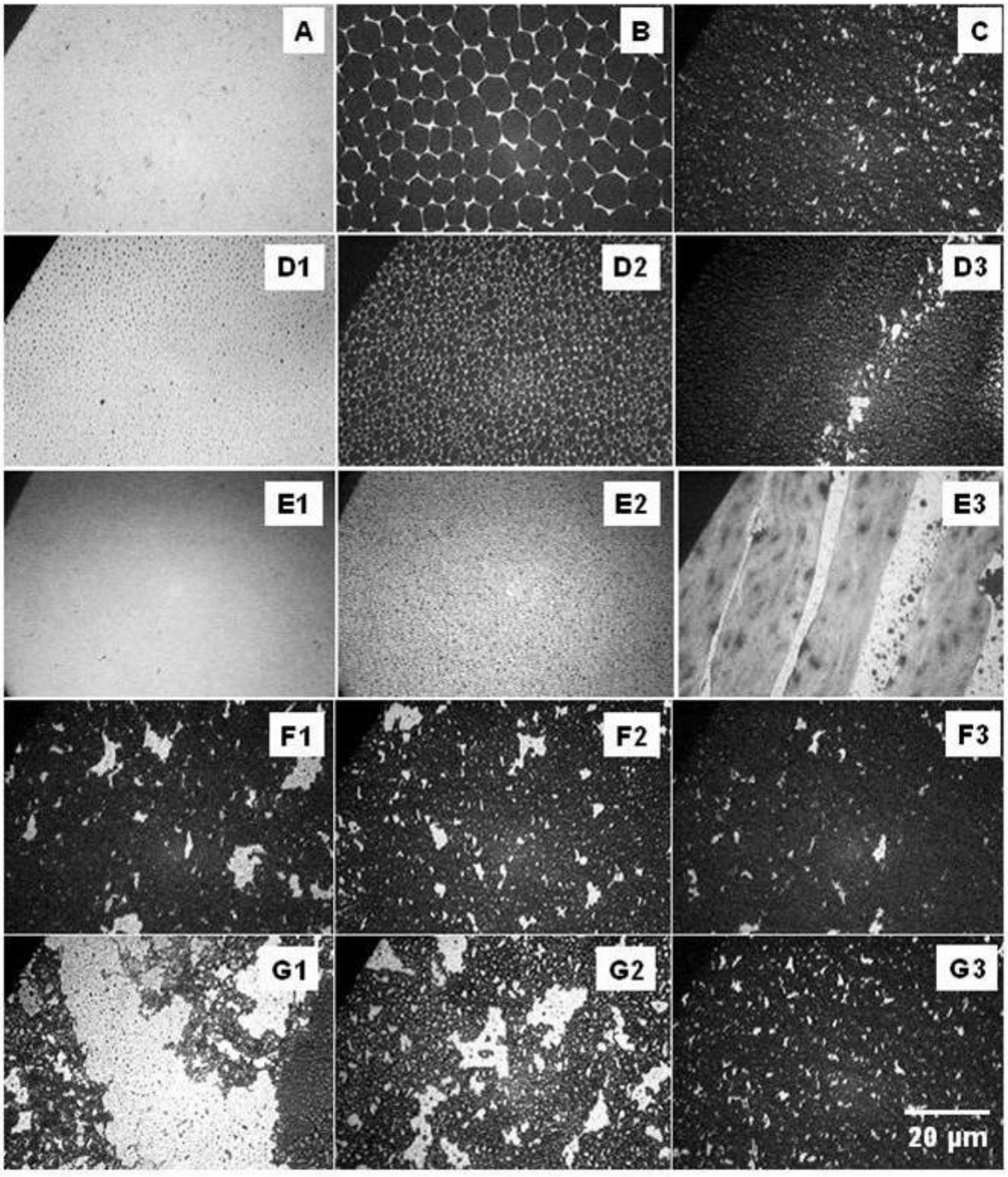

Abb. 5.2: Epifluoreszenzmessungen;

A: reines PEG40S bei 15 mN/m; B: reines DPPC bei 30 mN/m; C: reines DSPC bei 30 mN/m;

D: DPPC/PEG40S 99:1 mol%, D1: 10 mN/m, D2: 20 mN/m, D3: 40 mN/m;

E: DPPC/PEG40S 80:20 mol%, E1: 10 mN/m, E2: 20 mN/m, E3: 40 mN/m;

F: DSPC/PEG40S 99:1 mol%, F1: 10 mN/m, F2: 20 mN/m, F3: 40 mN/m;

G: DSPC/PEG40S 80:20 mol%, G1: 10 mN/m, G2: 20 mN/m, G3: 40 mN/m;

zeigten reines PEG40S (Abb. 5.2 A) und DPPC unterhalb des „lift off“ Punktes (keine Abbildung). Am Beginn des Phasenüberganges bildeten sich beim DPPC runde, dunkle Domänen (Abb. 5.2 B), deren Größe bei zunehmendem Druck bis auf ca. 10 - 15 µm Größe bei Erreichen des Kollapsdruckes anwuchs. DSPC (Abb. 5.2 C) zeigte das typische Bild eines flüssig-kondensierten Filmes. Bei Drücken oberhalb des „lift off“-Punktes zeigten sich große aggregierte, unregelmäßig geformte dunkle Bereiche, aus denen das fluoreszenzmarkierte Lipid ausgeschlossen wurde.

Mischungen von DPPC und PEG40S zeigten bei einem Druck von 10mN/m nur sehr kleine dunkle Bereiche der flüssig-kondensierten Phase des DPPC (Abb.5.2 D1). Mit zunehmendem Druck wurden diese Bereich etwas größer, erreichten aber nie die Größe der dunklen Domänen im reinen DPPC-Film (Abb.5.2 D2). Bei einem Lateraldruck von 40 mN/m wurden Kollapsstrukturen auf dem Film sichtbar (Abb.5.2 D3). Eine Mischung von DPPC und PEG40S mit einem molaren Verhältnis von 80:20 zeigte ein ähnliches Verhalten (Abb.5.2 E1-E3), die dunklen Domänen waren noch etwas kleiner, aber auch hier bildeten sie sich gleichmäßig aus, und bei hohem Druck zeigten sich Kollapsstrukturen.

Das Mischungsverhalten von DSPC und PEG40S stellte sich deutlich anders dar. Abhängig von der Konzentration des fluiden PEG40S waren bei 10 mN/m kleinere oder größere helle Bereiche der flüssig-expandierten PEG40S-Phase zu sehen, die die dunklen Bereiche der flüssig-kondensierten DSPC-Phase voneinander trennten (Abb. 5.2 F1 und G1). Mit Steigerung des Druckes auf 20 mN/m verkleinerten sich die Flächen der hellen Domänen, da der flüssige PEG40S-Film kollabierte (Abb. 5.2 F2 und G2). Bei hohen Drücken (40mN/m) unterschieden sich die resultierenden Filme nur marginal von den Filmen des reinen DSPC (Abb. 5.2 F3 und G3).

5.2 Diskussion

Thromboembolische Erkrankungen zählen zu den häufigsten Ursachen für dauerhafte gesundheitliche Probleme und Todesfälle in den Industrienationen, daher ist die Erforschung neuer Techniken zur Verbesserung der Rekanalisation verschlossener Blutgefäße von großem Interesse in der modernen Forschung. Die sonothrombolytische Therapie hat dabei bisher erfolgsversprechende Ergebnisse gezeigt, da die Kombination von diagnostischem US mit thrombolytischen Arzneistoffen eine Möglichkeit ist den Erfolg der Therapie in Echtzeit zu beobachten. Der Zusatz von UCAs ist dabei sowohl für die Qualität der Bilder als auch für die der Therapie von entscheidender Bedeutung [32-36]. Die Entwicklung eines UCAs, in das die Arzneistoffe eingelagert sind hätte darüber hinaus den Vorteil, dass die Arzneistoffe nur an der benötigten Stelle (dem Thrombus) mit Hilfe des Ultraschalles freigesetzt würden und so die Arzneistoffmenge verringert werden könnte. Die von uns entwickelten NUSCA [49, 50] haben bisher einen vielversprechenden Ultraschallkontrast gezeigt. In den ersten Teilen der Arbeit konnte die Ausbildung von Mizellen und Liposomen und ihr Effekt auf die Ultraschallkontrastverstärkung für die PEG40S-haltigen NUSCA beobachtet werden. Die Liposomen wären dabei in der Lage sowohl lipophile als auch hydrophile Arzneistoffe gut zu verkapseln (Abb. 1.9), während in Mizellen nur lipophile Arzneistoffe eingelagert werden könnten. Zur thrombolytischen Therapie klinisch genutzte Arzneistoffe, wie rt-Pa und UK, sind aber hydrophil. Für eine Kombination der diagnostischen Überwachung des verschlossenen Blutgefäßes und der thrombolytischen Therapie ist aber eine gute Bildqualität, also eine gute Ultraschallkontrastverstärkung, genauso wichtig wie eine hohe Verkapslungseffizienz für Arzneistoffe. Eine Vorhersage der Struktur der von uns verwendeten Mischungen der Phospholipide DPPC oder DSPC mit PEG40S ist schwierig, da es nur wenige Studien auf diesem Gebiet gibt. Das Mischungsverhalten von doppelkettigen PEG-Lipiden mit Phospholipiden wurde eingehend analysiert [74, 88] und für Mischungen von DPPC oder DSPC mit den entsprechenden PEG-Lipiden konnte die

Ausbildung einer Mischung von Liposomen und Mizellen ab bestimmten PEG-Lipidkonzentrationen nachgewiesen werden. Höhere Konzentrationen der PEG-Lipide führten zur Bildung von Mizellen mit abnehmender Größe [88]. Dieses Verhalten lässt sich aber nicht direkt auf das einkettige PEG40S übertragen, wie im Kapitel 3 (Abb. 3.7) diskutiert wurde. Um das Mischungsverhalten und damit auch die Wahrscheinlichkeit der gebildeten Strukturen zu klären wurden Studien an Lipidmonoschichten durchgeführt.

Die Π/A-Isothermen der Monoschichtuntersuchung an einer Langmuir-Filmwaage lassen dabei Aussagen über die Mischbarkeit oberflächenaktiver Substanzen zu. Abbildung 5.1 A zeigt Isothermen verschiedener Mischungen von DPPC und PEG40S. Die Form der Isothermen änderte sich dabei langsam von der Form des reinen DPPC zu der Form des reinen PEG40S. Bei vollständig mischbaren Substanzen müsste sich die Isotherme der Mischung aus dem arithmetischen Mittel der Isothermen der Reinsubstanzen berechnen lassen, wenn die molaren Anteile dieser mit einbezogen werden [70]. Abweichungen von der durch den Mittelwert vorgegebenen Form sprechen für nicht vollständig mischbare Substanzen. Für die Mischungen des DPPC mit dem PEG40S konnte eine vollständige Mischbarkeit in der flüssig-expandierten Phase festgestellt werden.

Für DSPC und PEG40S zeigt sich ein anderes Bild auf den Π/A-Isothermen (Abb. 5.1 B). Ab einer bestimmten Konzentration an PEG40S waren zwei Kollapspunkte sichtbar. Bei einer molaren Konzentration von 6 % trat zum ersten Mal ein Plateau bei etwa 40 mN/m auf, nach dem die Kurve weiter bis zu dem vorher schon gemessenen Kollapsdruck von DSPC (65 mN/M) anstiegt. Cruz und Pérez-Gil [70] benennen solche zusätzlichen Plateaus 2D-3D Phasenübergänge, an denen eine der Substanzen aus dem Film herausgedrückt wird. In unserem Fall wurde das fluide PEG40S aus dem kondensierten Film des DSPC gedrückt. Nach diesem ersten Kollapspunkt entsprach der Verlauf der Isotherme dem des reinen DSPC. Daher konnte geschlossen werden, dass DSPC und PEG40S nicht miteinander mischbar sind.

Auch die Epifluoreszenzmessungen der Monoschichten unterstützten dieses Ergebnis. Die Mischungen von DPPC und PEG40S ergaben gleichmäßige Filme, in denen sich die

kondensierten Domänen des DPPC langsamer ausbildeten und auch nicht so groß wurden. Das sehr fluide PEG40S verhinderte also die Bildung der kondensierten Domänen, indem es sich gleichmäßig im gesamten Film verteilte. Auch am Kollapspunkt konnte keine Entmischung der Substanzen beobachtet werden. Die DSPC/PEG40S-Mischungen ergaben bei den Epifluoreszenzmessungen ein anderes Bild. Hier konnten im kondensierten Film des DSPC mit steigendem PEG40S-Anteil größer werdende helle Domänen beobachtet werden. Das PEG40S konnte sich also nicht mit dem kondensierten DSPC-Film mischen und bildete eigene fluide Domänen, in denen sich das fluoreszenzmarkierte Lipid löste. Nach dem ersten Kollapspunkt unterschied sich der Film nicht mehr vom reinen DSPC-Film, was darauf hindeutete, dass das PEG40S vollständig aus dem Film herausgedrückt wurde.

Vor dem Hintergrund dieser Mischungsstudien der verwendeten Substanzen lässt sich die Echogenizität der DPPC/PEG40S und der DSPC/PEG40S bei den unterschiedlichen Anteilen an PEG40S erklären. Es konnte festgestellt werden, dass Mischungen aus DPPC und PEG40S die beste Ultraschallkontrastverstärkung bei einem molaren Anteil von 8 mol% PEG40S auswiesen, während DSPC und PEG40S schon bei einer Mischung des molaren Verhältnisses 96:4 ihre höchste Echogenizität erreichte. Die erste von uns entwickelte Erklärung, dass das Verhältnis von Mizellen und Liposomen für die Kontrastverstärkung verantwortlich ist, konnte nicht der einzige Grund sein, da der Vergleich der cryo-TEM-Bilder für DSPC/PEG40S einen viel höheren Anteil an Liposomen als für DPPC/PEG40S bei den jeweils besten Kontrastverstärkungen ergab. Die hier gefundene unterschiedliche Mischbarkeit der Phospholipide mit PEG40S ließ uns einen weiteren Aspekt der Erklärung finden. Die Konformation der PEG-Ketten auf der Oberfläche der Membran der Formulierungen scheint entscheidend für deren kontrastverstärkenden Eigenschaften zu sein. PEG-Ketten können geknäult als sogenannte mushroom- Konformation oder gestreckt als brush- Konformation vorliegen [94]. Die mushroom- Konformation ist dabei die energetisch vorteilhaftere, da die PEG-Ketten sich hier frei im Raum bewegen können und nicht miteinander interagieren. Bei Interaktion der Ketten richten diese sich gerade in den freien Raum aus (brush- Konformation), um so den Abstand der einzelnen Ketten zueinander

möglichst groß zu halten. Bei steigendem PEG40S-Anteil in den Formulierungen wird die Interaktion der Ketten immer stärker, sodass sie an einem bestimmten Punkt in die brush-Konformation übergehen. Der Übergang geschieht dabei eher, je dichter gepackt das System ist, in dem sich die PEG-Ketten befinden [82]. Die längeren Kohlenwasserstoffketten des DSPC rufen dabei eine stärkere Interaktion der Lipidketten untereinander hervor, sodass das System enger gepackt ist als das des DPPC [95]. Außerdem konnten wir nichtideales Mischungsverhalten für DSPC und PEG40S nachweisen, dass zu einer Bildung von PEG40S-Domänen innerhalb des DSPC-Filmes führt (Abb. 5.2 F und G). Innerhalb dieser Domänen ist die Interaktion der PEG-Ketten sehr stark, sodass diese in der brush-Konformation vorliegen werden. Im Gegensatz dazu mischen sich DPPC und PEG40S ideal (Abb. 5.2 D und E), das PEG40S verteilt sich gleichmäßig über die gesamte Oberfläche des NUSCA. Der Übergang von der mushroom zur brush-Konformation wird also bei den

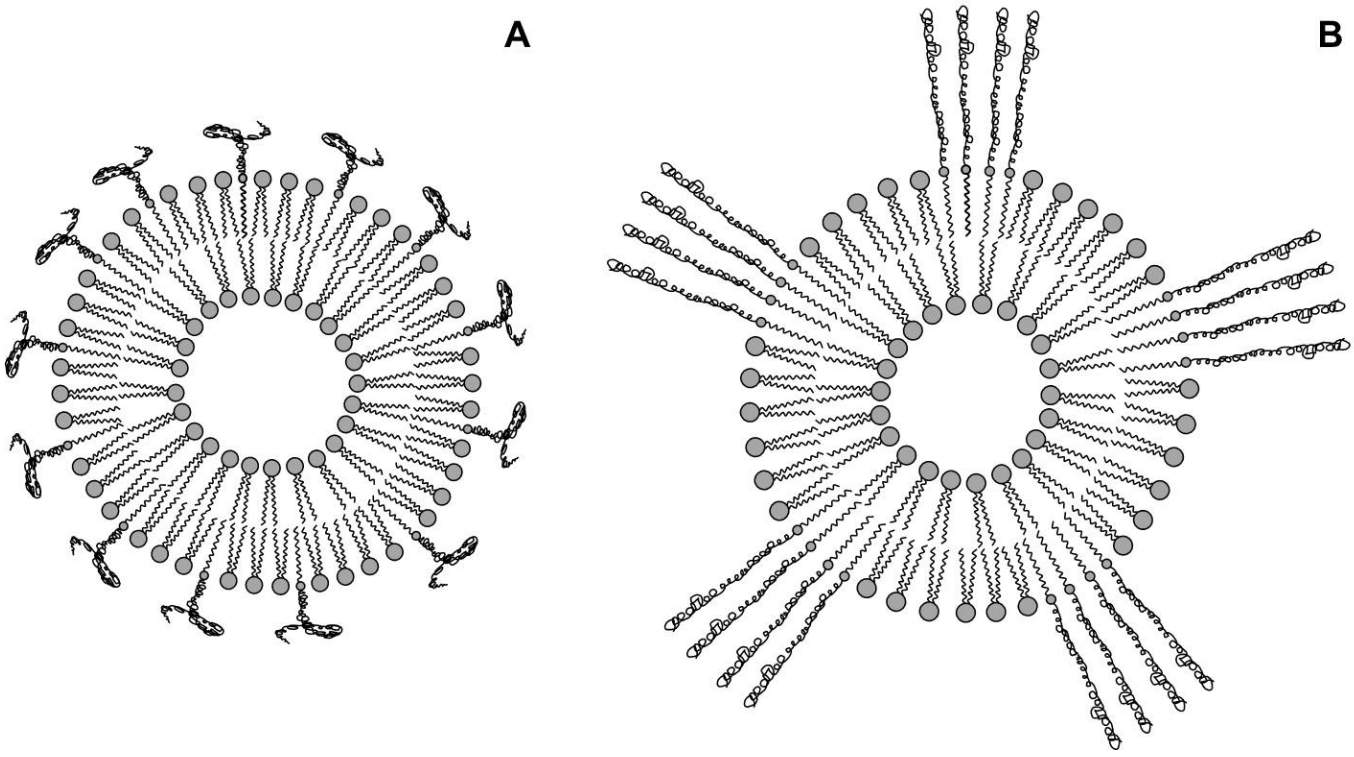

Abb. 5.3: mushroom- und brush-Konformation der PEG-Ketten;

A: DPPC/PEG40S, PEG40S gleichmäßig über den Film verteilt, PEG in mushroom-Konformation

B: DSPC/PEG40S, PEG40S in Domänen, PEG-Ketten in brush-Konformation

Mischungen die DSPC enthalten deutlich früher auftreten, als bei den Mischungen von DPPC und PEG40S. Die Verbesserung der Echogenizität lässt sich mit der Anordnung der PEG-Ketten erklären: bei der brush- Konformation sind die Ketten weniger verknäult als bei der mushroom-Konformation (Abb. 5.3), sie stehen also weiter in das Medium heraus und interagieren daher besser mit dem Ultraschall [94]. Der Verlust der Echogenizität bei höheren Anteilen an PEG40S kann durch eine Entmischung der Substanzen erklärt werden. Es bilden sich kleine sphärische Mizellen aus reinem PEG40S, die auf den cryo-TEM-Bildern beobachtet werden konnten, und die nicht mehr ausreichend mit dem Ultraschall interagieren.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass sich die Mischbarkeit von DPPC mit PEG40S und von DSPC mit PEG40S grundsätzlich unterschiedet. Im ersten Fall sind die Substanzen gut im zweiten nicht miteinander mischbar. Außerdem scheint der Übergang der PEG-Ketten zwischen der mushroom- und der brush- Konformation eine entscheidende Rolle für eine gute Ultraschallkontrastverstärkung zu spielen. PEG-Ketten in der brush- Konformation stehen weiter in das Medium heraus und interagieren dadurch besser mit Ultraschall, was die Echogenizität der Mischungen deutlich erhöht.

6. *in vitro* Untersuchungen nanoskaliger Ultraschallkontrastmittel

In diesem Kapitel sollte das sonothrombolytische Potential des NUSCA mit den besten Eigenschaften der vorangegangenen Studien bestimmt werden. Dafür wurden der Masseverlust und die Änderungen des Fibrinnetzwerkes von Thromben nach der Behandlung mit diagnostischem US, thrombolytischen Arzneistoffen und unserem NUSCA bestimmt.

6.1 Ergebnisse

6.1.1 Bestimmung des Masseverlustes der Thromben

Alle Gewichte der Thromben und die resultierenden Gewichtsverluste sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst, eine graphische Darstellung der Masseverluste gibt Abbildung 6.1. Die Anfangsgewichte aller verwendeten Thromben lagen zwischen 245,2 ± 20,3 mg und 285,6 ± 12,2 mg (Tab.6.1) und waren somit nicht signifikant unterschiedlich. Nach der Behandlung mit diagnostischem US (Frequenz 2,85 MHz, Intensität 1.49 mW/cm²) für 30 min

Gruppe	Behandlung	Anfangsgewicht [mg]	Endgewicht [mg]	Masseverlust [%]
A	**US**	**259.1 ± 23.6**	**190.2 ± 25.9**	**26.6 ± 7.5**
B	**US + NUSCA**	**275.1 ± 24.5**	**187.8 ± 17.3**	**31.3 ± 8.7**
C	**US + UK**	**266.4 ± 29.9**	**142.9 ± 19.8**	**46.5 ± 3.7**
D	**US + UK + NUSCA**	**245.2 ± 20.3**	**103.1 ± 20.4**	**57.7 ± 9.0**
E	**US + rt-Pa**	**267.3 ± 9.3**	**165.7 ± 9.6**	**38.0 ± 2.1**
F	**US + rt-Pa + NUSCA**	**285.6 ± 12.2**	**141.1 ± 17.0**	**50.6 ± 6.0**

Tab. 6.1: Gewichtsverlust der Thromben nach sonothrombolytischer Behandlung

(Gruppe A) konnte ein Masseverlust der Thromben von 26,6 ± 12,2 % bestimmt werden. Ein leichter aber nicht signifikanter Anstieg des Masseverlustes auf 31,3 ± 8,7 % konnte nach Behandlung mit US und unserem NUSCA (DSPC/PEG40S 96:4, Herstellung mit zusätzlicher Beschallung am Ultraschallhomogenisator) festgestellt werden (Gruppe B). Die Behandlung mit UK und US ohne Zugabe des Kontrastmittels (Gruppe C) ergab eine Gewichtsreduktion von 46,5 ± 3,7 %. Wurde zusätzlich noch mit unserem NUSCA behandelt (Gruppe D, US + UK + NUSCA) konnte eine signifikante Steigerung des Masseverlustes auf 57,7 ± 9,0 % erreicht werden. Die Kombination von rt-Pa als thrombolytischem Arzneimittel mit US (Gruppe E) erreichte einen Masseverlust der Thromben von 38,8 ± 2,1 %. Dieser konnte nach zusätzlicher Behandlung mit unserem NUSCA (Gruppe F, US + rt-Pa + NUSCA) signifikant auf 50,6 ± 6,0 % gesteigert werden.

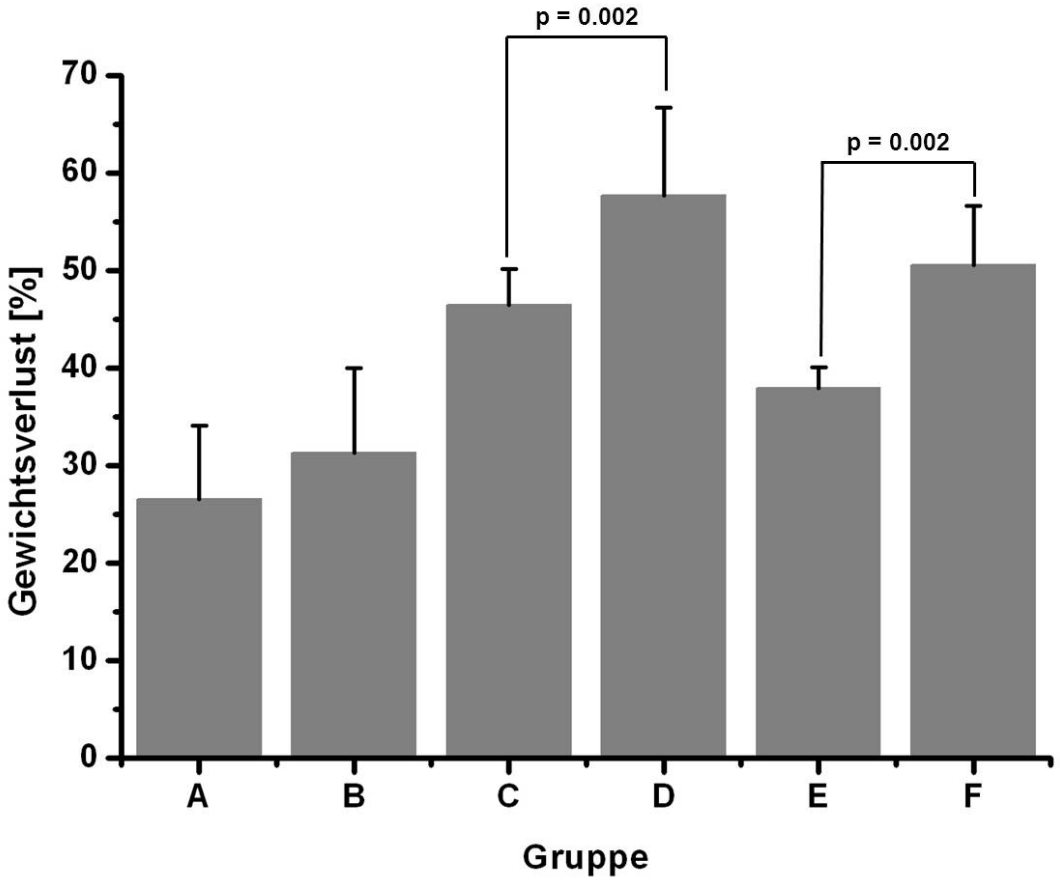

Abb. 6.1: Masseverlust der Thromben nach sonothrombolytischer Behandlung

6.1.2 Abbildung der Thromben

Die Untersuchung der Thrombusoberfläche mit Hilfe der Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM) zeigte Veränderungen der Struktur der Thromben nach den verschiedenen Behandlungen. In Abbildung 6.2 werden REM-Bilder von Thromben der verschiedenen Gruppen jeweils in 2400facher und 4800facher Vergrößerung gezeigt. Für die Gruppe A (Behandlung nur mit US) konnte ein dichtes Fibrinnetz auf der Oberfläche des Thrombus nachgewiesen werden. Eine Behandlung mit unserem NUSCA und US (Gruppe B) führte zu einer Auflockerung des Fibrinnetzes, sodass auf der Oberfläche deutliche Löcher entstanden. Die Behandlung mit UK und US in Gruppe C führt zu einem teilweisen Abbau des Fibrinnetzes. Die Oberfläche ist noch gleichmäßig mit Fibrin überzogen, aber die Anzahl der Fibrinstränge ist geringer geworden. Nach zusätzlicher Behandlung mit unseren NUSCA (Gruppe D) zeigte die Thrombusoberfläche keine deutlichen Fibrinstränge mehr. Die tieferliegenden Zellen waren teilweise mit einem ganz feinen Gespinst überzogen. Die Verwendung von rt-Pa als thrombolytisches Arzneimittel ergab ähnliche Ergebnisse. Für die Kombination von rt-Pa mit US (Gruppe E) waren wieder wenige Fibrinstränge sichtbar. Die Behandlung mit rt-Pa, US und NUSCA (Gruppe F) führte erneut zur Auflösung des deutlich sichtbaren Fibrinnetzes, die im Hintergrund liegenden Zellen sind weiterhin mit einem feinen Gespinst umgeben.

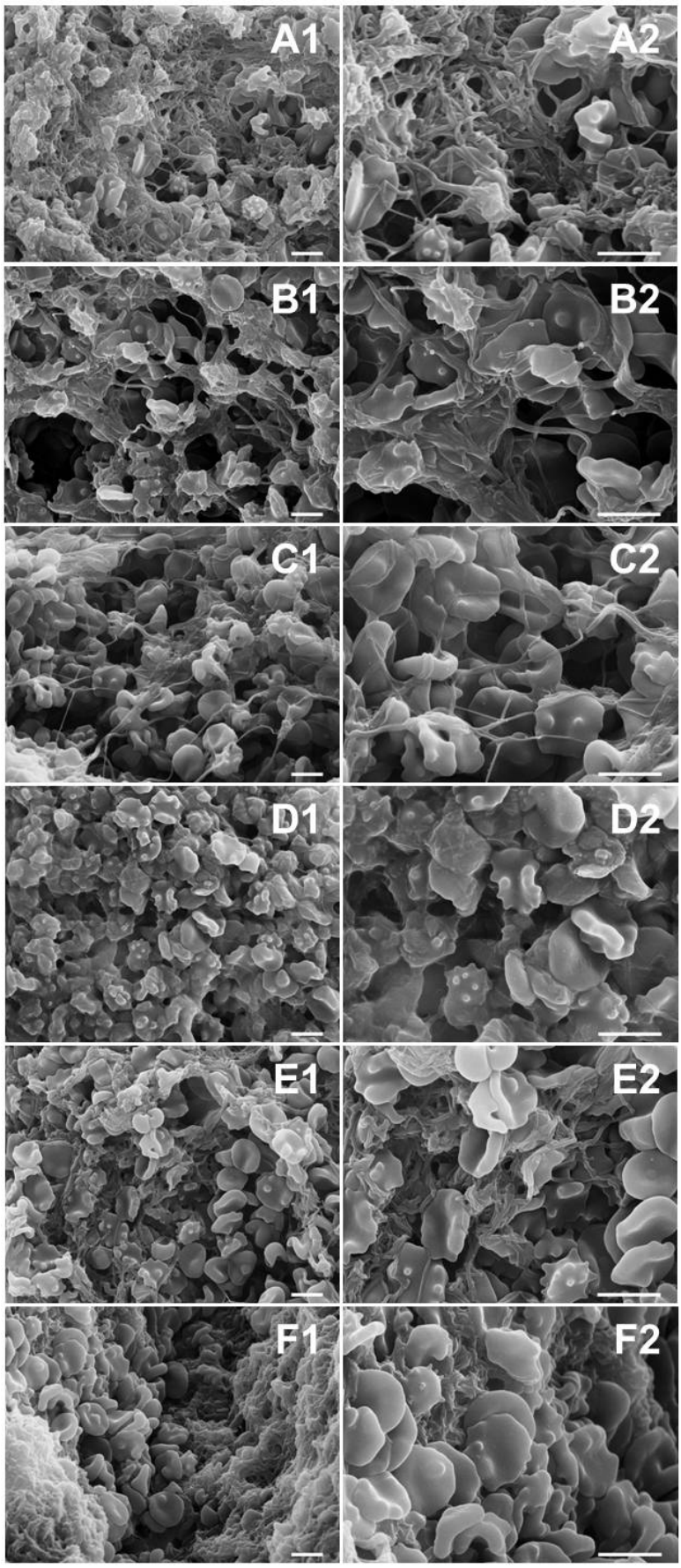

Abb.. 6.2: REM-Bilder der Thrombusoberfläche nach sonothrombolytischer Behandlung, Bar jeweils 5 µm

6.2 Diskussion

In diesen *in vitro* Untersuchungen konnte das sonothrombolytische Potential unseres NUSCA (DSPC/PEG40S 96:4 mit zusätzlicher Beschallung am Ultraschallhomogenisator) in Kombination mit diagnostischem US gezeigt werden. Ein Masseverlust der Thromben von mehr als 50 % konnte mit den thrombolytischen Arzneistoffen rt-Pa oder UK, jeweils in der klinisch üblichen Dosierung, und 2,85 MHz US erreicht werden. Die Verwendung von US kombiniert mit unserem NUSCA, ohne thrombolytischen Arzneistoff, verstärkte die Thrombolyse, eine Signifikanz ($p \leq 0{,}002$) war aber nicht gegeben. Der Kombination von Arzneistoffen, NUSCA und US führte dagegen zu einer signifikanten ($p \leq 0{,}002$) Erhöhung des Masseverlustes der Thromben im Vergleich zu der Verwendung von Arzneistoff und US ohne NUSCA.

Früheren Studien konnten eine verstärkende Wirkung von US, mit oder ohne Zusatz von UCAs, auf die Thrombolyse zeigen [18-21, 32-34]. Viele dieser Studien verwendeten US mit einer niedrigen Frequenz und niedrigen Intensität, da dieser die Thrombolyse besonders gut unterstützt [19, 34]. Cintas *et al.* [33] waren die ersten, die mit Ultraschall in diagnostischer Frequenz (2 MHz) und Intensität (455 mW/cm^2) arbeiteten. Diese höhere Frequenz hat einen engeren Ultraschallstrahl zur Folge und lässt sich damit besser auf das zu beschallende Gebiet fokussieren [14]. Dadurch kann der Anteil mit US beschallten Gewebes minimiert werden, was auch zu einer Minimierung möglicher Nebeneffekte des US führt.

Bisher durchgeführte *in vitro* Studien zur Sonothrombolyse erreichten Massenverluste der Thromben von etwa 30 % bei Kombination von thrombolytischem Arzneistoff, US und UCA. Ren *et al.* [34] positionierten aus menschlichem Vollblut hergestellte Thromben in Polyethylenröhrchen im Fokus eines Ultraschallfeldes und beschallten sie für 30 min bei einer Frequenz von 0,8 MHz und einer Intensität von 2,7866 W/cm^2. UK als thrombolytischer Arzneistoff wurde dabei in Schwefelhexafluorid gefüllte Mikrobläschen aus Phospholipiden, Stearinsäure und PEG4000 verkapselt. Mit der höchsten Konzentration an UK konnten sie

einen Masseverlust der Thromben von 32,56 ± 2,64 % nachweisen. Im Gegensatz zu den Bedingungen einer Thrombolyse im menschlichen Körper ist der Thrombus in diesem Modell keinerlei Flüssigkeitsströmung ausgesetzt. So sammeln sich Abbauprodukte und Blutzellen am oder im Thrombus und können die Thrombolyse dadurch beeinflussen. Eine erhöhte Konzentration partieller Fibrinabbauprodukte mit C-terminalen Lysinresten könnte die Aktivität der UK erhöhen, wie es für das vom Körper produzierte t-Pa in Kapitel 1.1 erläutert wurde. Blutzellen, die nicht vom Thrombus fortgespült werden, verhindern wahrscheinlich eher eine weitere Thrombolyse, da sie wie eine Barriere der Reaktion von UK und Fibrin entgegenwirken. Ein weiteres *in vitro* Modell ohne eine Flüssigkeitsströmung verwendeten Hölscher *et al.* [21], die einen Schallkopf unterhalb der Wasseroberfläche so montierten, dass sein Fokus genau auf der Wasseroberfläche lag. Auf der Wasseroberfläche war eine Petrischale angebracht, in der sich der Thrombus in einem flüssigen Medium (Puffer oder Blutplasma), rt-Pa als Arzneistoff und Definity® als UCA befanden. Die Thromben wurden für 30 min oder 60 min einer Kombination aus 1 MHz B-Mode US und 2 MHz Doppler-US ausgesetzt. Dabei erreichten sie für diese Kombination eine Massenreduktion der Thromben von 26,9 ± 2,9 %. Cintas *et al.* [33] entwickelten das von uns angepasste Flussmodell und verwendeten eine Flussrate von 5 ml/min für Ihre Experimente. Die Thromben wurden in eine Polyethylen-Kammer gelegt und durch eine Cellophanfolie beschallt. Bei der Verwendung von Levovist® als UCA, rt-Pa als thrombolytischem Arzneistoff und einer Beschallung für 30 min mit 2 MHz US erreichten sie eine Gewichtsreduktion der Thromben von 30,7 ± 9,5 %.

In unserer *in vitro* Studie wurde ein Flusssystem mit geschlossenem Kreislauf ähnlich dem von Cintas *et al.* [33] verwendet. Eine Teflon®-Kammer wurde auf 37 °C temperiert und eine Flussrate von 40 ml/min wurde an der Pumpe eingestellt, um der normalen Durchblutung des Gehirns von 40-50 ml pro min und 100 g Hirnmasse zu entsprechen. Thromben, aus menschlichem Vollblut, durch spontane Blutgerinnung gewonnen, wurden für 30 min bei einer Frequenz von 2,85 MHz und Intensität von 1,49 mW/cm^2 beschallt. US dieser Wellenlänge wird routinemäßig in der klinischen Diagnostik eingesetzt und erlaubt daher

eine Beobachtung der Rekanalisation des betroffenen Blutgefäßes, was mit den häufig zur Sonothrombolyse verwendeten niedrigen Frequenzen nicht möglich ist. Die niedrige Intensität des von uns genutzten US wird nur wenige unerwünschte Nebeneffekte, wie Erwärmung des beschallten Gewebes, zur Folge haben. Wir konnten einen Masseverlust der Thromben von 50,6 ± 6,0 % für eine Kombination von rt-Pa, US und NUSCA erreichen. Die Verwendung von UK als thrombolytischem Arzneistoff erhöhte diese Gewichtsreduktion auf 57,7 ± 9,0 %. Somit liegen die von uns erreichten Masseverluste der Thromben über denen früherer Studien, was unser NUSCA zu einem vielversprechenden Mittel für die sonothrombolytischen Therapie macht. Eine Kombination aus Diagnose und Therapie kann bei der von uns verwendeten Frequenz mit einem kommerziellen US-Gerät ohne Austausch des Schallkopfes erreicht werden.

Auch die REM-Bilder der Thrombusoberflächen zeigten einen vielversprechenden Effekt des NUSCA. Nach der von Ren *et al.* [34] vorgestellten Methode wurden die Thromben fixiert und getrocknet um die oberflächliche Struktur des Fibrinnetzes darstellen zu können. Für die nur mit US behandelte Kontrollgruppe konnte ein dichtes Fibrinnetz auf der Thrombusoberfläche nachgewiesen werden, das nur von kleinen Poren durchsetzt war (Abb. 6.1 A). Nach einer Behandlung mit US und NUSCA waren die Poren auf der Oberfläche deutlich vergrößert (Abb. 6.2 B), auch wenn der Masseverlust nicht signifikant angestiegen war, was auf ein Eindringen des NUSCA in die kleinen Poren des Fibrinnetzes hindeutete. Die Beschallung mit US veränderte die Struktur des Fibrinnetzes [96] und führte zur Oszillation des NUSCA innerhalb der Poren, wodurch diese vergrößert werden konnten. Die Vergrößerung der Poren im Fibrinnetz legte mehr Fibrin für die Bindung der Arzneistoffe frei, sodass diese das Fibrin schneller spalten konnten [19]. Nach der Behandlung mit thrombolytischen Arzneistoffen und US konnten nur noch wenige Fibrinstränge dargestellt werden (Abb. 6.2 C und E), da die Arzneistoffe innerhalb der 30 minütigen Behandlungen das Fibrin teilweise abgebaut hatten. Ein Nachweis diese wenigen Fibrinstränge war nach einer kombinierten Behandlung mit Arzneistoff, NUSCA und US nicht mehr möglich. Nur die tieferliegenden Zellen schienen mit einem dünnen Fibrinnetz umgeben zu sein. Die erwähnte

Vergrößerung der Poren des Fibrinnetzes und der Pumpeffekt der Kavitation liefern hierfür die Erklärung. Der Arzneistoff konnte den NUSCA in die Poren folgen und so den Thrombus von innen heraus lysieren [19]. Außerdem sorgte der Pumpeffekt des oszillierenden NUSCA für einen besseren Abtransport der aus dem Thrombus gelösten Blutzellen, sodass wiederum schneller weiteres Fibrin freigelegt wurde. Everbach *et al.* [97] konnten zeigen, dass der thrombolytische Effekt von US in Kombination mit thrombolytischen Arzneistoffen zum Teil von der akustischen Kavitation abhängt. Diese Kavitation kann zu den beiden beschriebenen Phänomenen führen [39].

Zusammenfassend konnte ein guter sonothrombolytischer Effekt unseres NUSCA in Kombination mit diagnostischem Ultraschall (2,85 MHz und 1,49 mW/cm^2) und thrombolytischen Arzneimitteln (rt-Pa und UK) nachgewiesen werden. Die Veränderung der oberflächlichen Fibrinstruktur konnte ein Eindringen des NUSCA in die Poren des Fibrinnetzes durch eine Aufweitung dieser nachweisen. Die daraus folgende Vergrößerung der für die Arzneistoffe zugänglichen Fibrinmenge führte zu einem Masseverlust der Thromben von mehr als 50 %.

7. Zusammenfassung und Ausblick

7.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Entwicklung, Charakterisierung und erste *in vitro* Versuche eines neuen, nanoskaligen Ultraschallkontrastmittels (NUSCA) vorgestellt. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines NUSCA zur Verbesserung der Behandlung thromboembolischer Erkrankungen.

Kapitel 1 enthielt eine allgemeine Einführung in das Thema dieser Arbeit, während in **Kapitel 2** die verwendeten Methoden zusammengefasst wurden.

Kapitel 3 fasst verschiedene Herstellungsmethoden und Lipidmischungen und ihren Einfluss auf physikochemische Eigenschaften der NUSCA zusammen. Die Auswirkungen von Extrusion, Lyophilisation, DPPG-Zusatz und Veränderungen der PEG40S-Konzentration bei zusätzlicher Beschallung mit einem Ultraschallhomogenisator auf Größe, Zetapotential und Struktur der NUSCA wurden mit Hilfe von DLS, LDA, AFM, cryo-TEM und ^{31}P-NMR getestet. Nach allgemeiner Herstellungsmethode produzierte Formulierungen, führten dabei zu liposomalen Strukturen bei DPPC/CH und Mischungen aus Liposomen und Mizellen für DPPC/PEG40S und DSPC/PEG40S. Die Extrusion führte zu einer deutlichen Verringerung der hydrodynamischen Durchmesser aller Formulierungen. Der PDI als Maß für die Verteilung der Partikelgrößen, konnte nur für die DPPC/CH-Liposomen deutlich verbessert werden. Lyophilisation, als Möglichkeit die Lagerstabilität zu verbessern, führte im Gegensatz zur Extrusion zu einer deutlichen Verschlechterung der PDIs. Das negative Lipid DPPG, zugesetzt um eine Aggregation der Partikel zu verhindern, veränderte Größe und PDIs der Formulierungen nicht, senkte aber ab einer Konzentration von 1 mol% das Zetapotential deutlich auf Werte kleiner -20 mV ab. Die zusätzliche Beschallung der PEG40S-haltigen NUSCA am Ultraschallhomogenisator führte zu einer deutlichen Verminderung der Größen auf 50 bis 125 nm. Ein Einfluss der PEG40S-Konzentration

konnte dabei sowohl auf die Struktur als auch auf die Größe festgestellt werden. Die Größe stieg mit zunehmender PEG40S-Konzentration leicht an, während auf den cryo-TEM-Bildern ein immer höherer Anteil an Mizellen gefunden werden konnte.

Die Ultraschallkontrastverstärkung der einzelnen NUSCA wurde in **Kapitel 4** in einem speziellen Durchflussmodell getestet. Das Modell stellte dabei die Ultraschalleigenschaften des menschlichen Gewebes und dessen Blutgefäßen mit Hilfe eines Agar-Gels und eines Silikonschlauches (C-flex®) nach. Eine Peristaltikpumpe diente der Einstellung eines Druckverhältnisses von 120/80 mmHg im Schlauchsystem. Als Medium wurde ein auf 37 °C temperierter Tris-Albumin-Puffer pH 7,4 benutzt. Der Einfluss der verschiedenen Herstellungsmethoden auf die Echogenizität war in den meisten Fällen negativ. Nach der Extrusion verschwand der Kontrast der DPPC/CH-Liposomen vollständig und der Kontrast der PEG40S-haltigen NUSCA wurde deutlich schwächer. Die Lyophilisation, die eigentlich dafür bekannt ist die Echogenizität zu verbessern, schwächte den Kontrast, außer bei Zusatz von PEG4000 zu den DPPC/CH-Liposomen, ab. Eine Konzentrationsabhängigkeit der Echogenizität war für den DPPG-Zusatz zu beobachten, aber auch hier blieb der Kontrast hinter den Werten der Formulierungen ohne DPPG zurück. Die zusätzliche Beschallung am Ultraschallhomogenisator konnte die Echogenizität verbessern, wobei eine Abhängigkeit von der PEG40S-Konzentration deutlich wurde. Das Verhältnis der bei der Charakterisierung gefunden Liposomen und Mizellen zueinander schien einen Einfluss auf die Echogenizität zu haben. Für die DPPC- und DSPC-Formulierungen waren dabei aber unterschiedliche PEG40S-Konzentrationen und damit ein jeweils unterschiedliches Verhältnis von Liposomen zu Mizellen für die beste Ultraschallkontrastverstärkung verantwortlich.

Untersuchungen zur Mischbarkeit von DPPC und DSPC mit PEG40S wurden daher in **Kapitel 5,** zur weiteren Erklärung der Kontrastverstärkungen, durchgeführt. Dabei wurde mit Hilfe von an der Filmwaage aufgenommenen Π/A - Isothermen eine Mischbarkeit für DPPC und PEG40S in der flüssig-expandierten Phase festgestellt. DSPC und PEG40S dagegen

waren nicht miteinander mischbar. Epifluoreszenzmessungen nach Beimischung eines fluoreszenzmarkierten Lipids konnten diese Ergebnisse bestärken. Die Konformation der PEG-Ketten in den Formulierungen wurde als weitere Erklärung für die konzentrationsabhängige Echogenizität aus diesen Ergebnissen abgeleitet. Bei den DPPC/PEG40S-NUSCA war das PEG40S gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt und lag daher länger in der geknäulten mushroom- Konformation vor. Höhere Konzentrationen an PEG40S führten zu einer stärkeren Interaktion der PEG-Ketten und einer Veränderung der Anordnung dieser in die gestreckte brush- Konformation. Bei Formulierungen aus den nicht mischbaren DSPC und PEG40S bildeten sich PEG40S-Domänen, in denen die Ketten sehr früh stark interagierten und daher in der brush- Konformation vorlagen. Die weiter in das Medium herausstehenden Ketten dieser Anordnung konnten stärker mit dem US interagieren und sorgten so für eine bessere Echogenizität.

Eine *in vitro* Studie zur Bestimmung des sonothrombolytischen Potentials des NUSCA mit den besten Eigenschaften wurde in **Kapitel 6** beschrieben. Thromben aus menschlichem Vollblut wurden dabei einer Behandlung mit diagnostischem US und verschiedenen Kombinationen der thrombolytischer Arzneistoffe (UK und rt-Pa) und des NUSCA ausgesetzt. Die ermittelten Gewichtsverluste von 50,6 ± 6,0 % (rt-Pa, US und NUSCA) bzw. 57,7 ± 9,0 % (UK, US und NUSCA) waren deutlich höher als in vergleichbaren *in vitro* Studien [17-20, 31-33]. Die Abbildung der Thrombusoberflächen mit Hilfe des REM konnte Effekte des NUSCA auf das Fibrinnetz zeigen. NUSCA und US alleine führten zu einer deutlichen Zunahme der Porengröße im Fibrinnetz. Nach der Kombination von US, NUSCA und Arzneistoff konnte kein Fibrinnetz mehr auf der Oberfläche der Thromben nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse machen unser NUSCA zu einem vielversprechenden neuen Ansatz in der sonothrombolytischen Therapie.

7.2 Ausblick

Basierend auf den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen könnte ein neues Arzneimittel zur Behandlung thromboembolischer Erkrankungen entwickelt werden.

Eine Verkapselung thrombolytischer Arzneistoffe in die NUSCA und eine gezielte lokale Freisetzung am Thrombus wäre denkbar. Eine hohe Verkapselungseffizienz der Arzneistoffe, sowie ein geringer Austritt der Arzneistoffe aus den NUSCA bei Lagerung oder Zirkulation im Blutkreislauf müssten dafür untersucht werden. Eine schnelle und möglichst vollständige Freisetzung der Arzneistoffe mit diagnostischem Ultraschall und anschließender guter thrombolytische Aktivität muss für eine effiziente Behandlung gewährleistet werden.

Der Einbau eines Schläfenbeines wie bei Pfaffenberger *et al.* [98] in unsere Modelle würde diese noch besser an die Bedingungen klinischer Diagnostik und Therapie anpassen. Die Penetration des US durch den Knochen ist schlechter als durch Gewebe oder Agar-Gel, sodass die US-Intensität nicht mehr für eine adäquate Anregung von UCA ausreichen könnte. Eine Sonothrombolyse bei US-Anwendung durch den intakten Schädelknochen wäre jedoch für die Klinik wünschenswert. Eine Optimierung der Zusammensetzung der NUSCA für eine optimale Echogenizität bei Beschallung durch einen Schädelknochen könnte zusammen mit der oben beschriebenen Verkapselung von Wirkstoffen zu einer Verbesserung der Schlaganfalltherapie dienen.

8. Literaturverzeichnis

1 Gesundheit - Todesursachen in Deutschland 2010. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt, 2011.

2 Perler B. Thrombolytic Therapies: The Current State of Affairs. *Journal of Endovascular Therapy.* 2005; 12: 224-32.

3 Thews G, Mutschler E, Vaupel P. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1999.

4 Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. München: Urban & Fischer Verlag, Elsvier GmbH, 2009.

5 Kemkes-Matthes B, Oehler G, Kujath P, Spannagel U. Blutgerinnung und Thrombose. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2001.

6 Undas A, Ariëns RA. Fibrin clot structure and function: a role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: e88-99.

7 Greene RJ, Harris ND. Pathology and Therapeutics for Pharmacists - A basis for clinical pharmacology practice. London: Pharmaceutical Press, 2008.

8 Rha JH, Saver JL. The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke.* 2007; 38: 967-73.

9 del Zoppo GJ, Higashida RT, Furlan AJ, Pessin MS, Rowley HA, Gent M. PROACT: a phase II randomized trial of recombinant pro-urokinase by direct arterial delivery in acute middle cerebral artery stroke. PROACT Investigators. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. *Stroke.* 1998; 29: 4-11.

10 Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Gent M, Rowley H, Kase C, Pessin M, Ahuja A, Callahan F, Clark WM, Silver F, Rivera F. Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study: a randomized controlled trial. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. *JAMA.* 1999; 282: 2003-11.

11 Mattle HP, Arnold M, Georgiadis D, Baumann C, Nedeltchev K, Benninger D, Remonda L, von Büdingen C, Diana A, Pangalu A, Schroth G, Baumgartner RW.

Comparison of intraarterial and intravenous thrombolysis for ischemic stroke with hyperdense middle cerebral artery sign. *Stroke.* 2008; 39: 379-83.

12 Soldner R, Krause W. [Ultrasonic scanner with increased image sequence in medical diagnosis]. *Biomed Tech* (Berl). 1971; 16: 87-9.

13 Schäberle W. Ultraschall in der Gefäßdiagnostik. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2009.

14 von Reutern G-M, Kaps M, von Büdingen HJ. Ultraschalldiagnostik der hirnversorgenden Arterien. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2000.

15 Mitragotri S. Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4: 255-60.

16 Pitt WG, Husseini GA, Staples BJ. Ultrasonic drug delivery--a general review. *Expert Opin Drug Deliv.* 2004; 1: 37-56.

17 Trübestein G, Engel C, Etzel F, Sobbe A, Cremer H, Stumpff U. Thrombolysis by ultrasound. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 1976; 3: 697s-8s.

18 Daffertshofer M, Hennerici M. Ultrasound in the treatment of ischaemic stroke. *The Lancet Neurology.* 2003; 2: 283-90.

19 Francis CW, Blinc A, Lee S, Cox C. Ultrasound accelerates transport of recombinant tissue plasminogen activator into clots. Ultrasound Med Biol. 1995; 21: 419-24.

20 Francis CW. Ultrasound-enhanced thrombolysis. *Echocardiography.* 2001; 18: 239-46.

21 Holscher T, Raman R, Ernström K, Parrish J, Le DT, Lyden PD, Mattrey RF. In vitro sonothrombolysis with duplex ultrasound: first results using a simplified model. *Cerebrovasc Dis.* 2009; 28: 365-70.

22 Alexandrov AV, Demchuk AM, Felberg RA, Christou I, Barber PA, Burgin WS, Malkoff M, Wojner AW, Grotta JC. High rate of complete recanalization and dramatic clinical recovery during tPA infusion when continuously monitored with 2-MHz transcranial doppler monitoring. *Stroke.* 2000; 31: 610-4.

23 Eggers J, Koch B, Meyer K, König I, Seidel G. Effect of ultrasound on thrombolysis of middle cerebral artery occlusion. *Ann Neurol.* 2003; 53: 797-800.

24 Behrens S, Spengos K, Daffertshofer M, Schroeck H, Dempfle CE, Hennerici M. Transcranial ultrasound-improved thrombolysis: diagnostic vs. therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 2001; 27: 1683-9.

25 Kennedy JE. High-intensity focused ultrasound in the treatment of solid tumours. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5: 321-7.

26 Stride E. Physical principles of microbubbles for ultrasound imaging and therapy. *Cerebrovasc Dis.* 2009; 27 Suppl 2: 1-13.

27 Gramiak R, Shah PM. Echocardiography of the aortic root. *Invest Radiol.* 1968; 3: 356-66.

28 de Jong N, Bouakaz A, Frinking P. Basic acoustic properties of microbubbles. *Echocardiography.* 2002; 19: 229-40.

29 Deng CX, Lizzi FL. A review of physical phenomena associated with ultrasonic contrast agents and illustrative clinical applications. *Ultrasound Med Biol.* 2002; 28: 277-86.

30 Bouakaz A, Frigstad S, Ten Cate FJ, de Jong N. Improved contrast to tissue ratio at higher harmonics. *Ultrasonics.* 2002; 40: 575-8.

31 Bouakaz A, Frigstad S, Ten Cate FJ, de Jong N. Super harmonic imaging: a new imaging technique for improved contrast detection. *Ultrasound Med Biol. 2002*; 28: 59-68.

32 Porter TR, Xie F. Ultrasound, microbubbles, and thrombolysis. *Prog Cardiovasc Dis.* 2001; 44: 101-10.

33 Cintas P, Nguyen F, Boneu B, Larrue V. Enhancement of enzymatic fibrinolysis with 2-MHz ultrasound and microbubbles. *J Thromb Haemost.* 2004; 2: 1163-6.

34 Ren ST, Zhang H, Wang YW, Jing BB, Li YX, Liao YR, Kang XN, Zang WJ, Wang B. The preparation of a new self-made microbubble-loading urokinase and its

thrombolysis combined with low-frequency ultrasound in vitro. *Ultrasound Med Biol.* 2011; 37: 1828-37.

35 Barreto AD, Sharma VK, Lao AY, Schellinger PD, Amarenco P, Sierzenski P, Alexandrov AV, Molina CA. Safety and dose-escalation study design of Transcranial Ultrasound in Clinical SONolysis for acute ischemic stroke: the TUCSON Trial. *Int J Stroke.* 2009; 4: 42-8.

36 Molina CA, Barreto AD, Tsivgoulis G, Sierzenski P, Malkoff MD, Rubiera M, Gonzales N, Mikulik R, Pate G, Ostrem J, Singleton W, Manvelian G, Unger EC, Grotta JC, Schellinger PD, Alexandrov AV. Transcranial ultrasound in clinical sonothrombolysis (TUCSON) trial. *Ann Neurol.* 2009; 66: 28-38.

37 Perren F, Loulidi J, Poglia D, Landis T, Sztajzel R. Microbubble potentiated transcranial duplex ultrasound enhances IV thrombolysis in acute stroke. *J Thromb Thrombolysis.* 2008; 25: 219-23.

38 Birnbaum Y, Luo H, Nagai T, Fishbein MC, Peterson TM, Li S, Kricsfeld D, Porter TR, Siegel RJ. Noninvasive in vivo clot dissolution without a thrombolytic drug: recanalization of thrombosed iliofemoral arteries by transcutaneous ultrasound combined with intravenous infusion of microbubbles. *Circulation.* 1998; 97: 130-4.

39 Datta S, Coussios CC, McAdory LE, Tan J, Porter T, De Courten-Myers G, Holland CK. Correlation of cavitation with ultrasound enhancement of thrombolysis. *Ultrasound Med Biol.* 2006; 32: 1257-67.

40 Prokop AF, Soltani A, Roy RA. Cavitanional mechanisms in ultrasoun-accelerated fibrinolysis. *Ultrasound in Medicine and Biology.* 2007; 33: 924-33.

41 Shaw GJ, Meunier JM, Huang SL, Lindsell CJ, McPherson DD, Holland CK. Ultrasound-enhanced thrombolysis with tPA-loaded echogenic liposomes. *Thromb Res.* 2009; 124: 306-10.

42 Tiukinhoy-Laing SD, Huang S, Klegerman M, Holland CK, McPherson DD. Ultrasound-facilitated thrombolysis using tissue-plasminogen activator-loaded echogenic liposomes. *Thromb Res.* 2007; 119: 777-84.

43 Smith DA, Vaidya SS, Kopechek JA, Huang SL, Klegerman ME, McPherson DD, Holland CK. Ultrasound-triggered release of recombinant tissue-type plasminogen activator from echogenic liposomes. *Ultrasound Med Biol.* 2010; 36: 145-57.

44 Laing ST, Moody M, Smulevitz B, Kim H, Kee P, Huang S, Holland CK, McPherson DD. Ultrasound-enhanced thrombolytic effect of tissue plasminogen activator-loaded echogenic liposomes in an in vivo rabbit aorta thrombus model--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 1357-9.

45 Laing ST, Moody MR, Kim H, Smulevitz B, Huang SL, Holland CK, McPherson DD, Klegerman ME. Thrombolytic efficacy of tissue plasminogen activator-loaded echogenic liposomes in a rabbit thrombus model. *Thromb Res.* 2011.

46 Huang SL. Ultrasound-responsive liposomes. *Methods Mol Biol.* 2010; 605: 113-28.

47 Huang SL, Hamilton AJ, Pozharski E, Nagaraj A, Klegerman ME, McPherson DD, MacDonald RC. Physical correlates of the ultrasonic reflectivity of lipid dispersions suitable as diagnostic contrast agents. *Ultrasound Med Biol.* 2002; 28: 339-48.

48 Xie F, Tsutsui JM, Lof J, Unger EC, Johanning J, Culp WC, Matsunaga T, Porter TR. Effectiveness of lipid microbubbles and ultrasound in declotting thrombosis. *Ultrasound Med Biol.* 2005; 31: 979-85.

49 Marxer EEJ, Brüßler J, Becker A, Schümmelfeder J, Schubert R, Nimsky C, Bakowsky U. Development and characterization of new nanoscaled ultrasound active lipid dispersions as contrast agents. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2011; 77: 430-7.

50 Becker A, Marxer E, Brüßler J, Hoormann AS, Kuhnt D, Bakowsky U, Nimsky C. Ultrasound active nanoscaled lipid formulations for thrombus lysis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2011; 77: 424-9.

51 Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4: 145-60.

52 Lasic, D., D. Liposomes from Physics to Applications. Amsterdam: Elsevier sience publishers B.V., 1993.

53 Unger EC, Porter T, Culp W, Labell R, Matsunaga T, Zutshi R. Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004; 56: 1291-314.

54 Blume G, Cevc G. Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 1990; 1029: 91-7.

55 Blume G, Cevc G, Crommelin MD, Bakker-Woudenberg IA, Kluft C, Storm G. Specific targeting with poly(ethylene glycol)-modified liposomes: coupling of homing devices to the ends of the polymeric chains combines effective target binding with long circulation times. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1149: 180-4.

56 Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.* 1990; 268: 235-7.

57 Klibanov AL, Maruyama K, Beckerleg AM, Torchilin VP, Huang L. Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1062: 142-8.

58 Huang SL, Hamilton AJ, Nagaraj A, Tiukinhoy SD, Klegerman ME, McPherson DD, Macdonald RC. Improving ultrasound reflectivity and stability of echogenic liposomal dispersions for use as targeted ultrasound contrast agents. *J Pharm Sci.* 2001; 90: 1917-26.

59 Zetasier Nano User Manual MAN0317. Worcestershire, UK: Malvern Instruments Ltd., 2008.

60 Bakowsky U. Herstellung, Funktionalisierung und physikochemische Charakterisierung von substratgestützten Oberflächen. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1997.

61 Anabousi S, Laue M, Lehr CM, Bakowsky U, Ehrhardt C. Assessing transferrin modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005; 60: 295-303.

62 Oberle V, Bakowsky U, Zuhorn IS, Hoekstra D. Lipoplex Formation under Equilibrium Conditions Reveals a Three-Step Mechanism. *Biophysical Journal.* 2000; 79: 1447-54.

63 Kaiser N, Kimpfler A, Massing U, Burger AM, Fiebig HH, Brandl M, Schubert R. 5-Fluorouracil in vesicular phospholipid gels for anticancer treatment: entrapment and release properties. *Int J Pharm.* 2003; 256: 123-31.

64 Burnell EE, Cullis PR, de Kruijff B. Effects of tumbling and lateral diffusion on phosphatidylcholine model membrane 31P-NMR lineshapes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1980; 603: 63-9.

65 Schubert R, Beyer K, Wolburg H, Schmidt KH. Structural changes in membranes of large unilamellar vesicles after binding of sodium cholate. *Biochemistry.* 1986; 25: 5263-9.

66 JNM-ECA Series Tutorial Manual INMECA/ECX-TU-3. Tokyo, Japan: JEOL Ltd., 2004.

67 Kollmann C, Bezemer RA, Fredfeldt KE, Schaarschmidt UG, Teirlinck CJ. [A test object for quality control of the instrument for doppler (duplex) ultrasonography, based on the Draft IEC 61685 Standard]. *Ultraschall Med.* 1999; 20: 248-57.

68 Langmuir I. The Shapes of Group Molecules Forming the Surfaces of Liquids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1917; 3: 251-7.

69 Wilhelmy L. Ueber die Abhängigkeit der Capillaritäts-Constanten des Alkohols von Substanz und Gestalt des benetzten festen Körpers.

70 Cruz A, Pérez-Gil J. Langmuir Films to Determine Lateral Surface Pressure on Lipid Segregation. In: Dopico AM, ed. Methods in Molecular Biology. Totowa: Humana Press Inc., 2007, 439-57.

71 Bakowsky U, Schumacher G, Gege C, Schmidt RR, Rothe U, Bendas G. Cooperation between Lateral Ligand Mobility and Accessibility for Receptor Recognition in Selectin-Induced Cell Rolling. *Biochemistry.* 2002; 41: 4704-12.

72 Gersh KC, Nagaswami C, Weisel JW. Fibrin network structure and clot mechanical properties are altered by incorporation of erythrocytes. *Thromb Haemost.* 2009; 102: 1169-75.

73 Wohner N. Role of cellular elements in thrombus formation and dissolution. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2008; 6: 224-8.

74 Leal C, Rögnvaldsson S, Fossheim S, Nilssen EA, Topgaard D. Dynamic and structural aspects of PEGylated liposomes monitored by NMR. *J Colloid Interface Sci.* 2008; 325: 485-93.

75 Cullis PR, De Kruijff B. Polymorphic phase behaviour of lipid mixtures as detected by 31P NMR. Evidence that cholesterol may destabilize bilayer structure in membrane systems containing phosphatidylethanolamine. *Biochim Biophys Acta.* 1978; 507: 207-18.

76 Schneider M, Arditi M, Barrau MB, Brochot J, Broillet A, Ventrone R, Yan F. BR1: a new ultrasonographic contrast agent based on sulfur hexafluoride-filled microbubbles. *Invest Radiol.* 1995; 30: 451-7.

77 Schroeder A, Kost J, Barenholz Y. Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. *Chem Phys Lipids.* 2009; 162: 1-16.

78 Alkan-Onyuksel H, Demos SM, Lanza GM, Vonesh MJ, Klegerman ME, Kane BJ, Kuszak J, McPherson DD. Development of inherently echogenic liposomes as an ultrasonic contrast agent. *J Pharm Sci.* 1996; 85: 486-90.

79 Talu E, Lozano MM, Powell RL, Dayton PA, Longo ML. Long-term stability by lipid coating monodisperse microbubbles formed by a flow-focusing device. *Langmuir.* 2006; 22: 9487-90.

80 Bakowsky H, Richter T, Kneuer C, Hoekstra D, Rothe U, Bendas G, Ehrhardt C, Bakowsky U. Adhesion characteristics and stability assessment of lectin-modified liposomes for site-specific drug delivery. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1778: 242-9.

81 Tabatt K, Kneuer C, Sameti M, Olbrich C, Müller RH, Lehr CM, Bakowsky U. Transfection with different colloidal systems: comparison of solid lipid nanoparticles and liposomes. *J Control Release.* 2004; 97: 321-32.

82 Garbuzenko O, Barenholz Y, Priev A. Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer. *Chemistry and Physics of Lipids.* 2005; 135: 117-29.

83 Ickenstein LM, Arfvidsson MC, Needham D, Mayer LD, Edwards K. Disc formation in cholesterol-free liposomes during phase transition. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1614: 135-8

84 Schroeder A, Avnir Y, Weisman S, Najajreh Y, Gabizon A, Talmon Y, Kost J, Barenholz Y. Controlling liposomal drug release with low frequency ultrasound: mechanism and feasibility. *Langmuir.* 2007; 23: 4019-25.

85 Schroeder A, Sigal A, Turjeman K, Barenholz Y. Using PEGylated nano-liposomes to target tissue invaded by a foreign body. *J Drug Target.* 2008; 16: 591-5.

86 Garbuzenko O, Zalipsky S, Qazen M, Barenholz Y. Electrostatics of PEGylated micelles and liposomes containing charged and neutral lipopolymers. *Langmuir.* 2005; 21: 2560-8.

87 Edwards K, Johnsson M, Karlsson G, Silvander M. Effect of polyethyleneglycol-phospholipids on aggregate structure in preparations of small unilamellar liposomes. *Biophys J.* 1997; 73: 258-66.

88 Johnsson M, Edwards K. Liposomes, disks, and spherical micelles: aggregate structure in mixtures of gel phase phosphatidylcholines and poly(ethylene glycol)-phospholipids. *Biophys J.* 2003; 85: 3839-47.

89 Rupp C, Steckel H, Müller BW. Mixed micelle formation with phosphatidylcholines: The influence of surfactants with different molecule structures. *International Journal of Pharmaceutics.* 2010; 387: 120-8.

90 Schneider M. Characteristics of SonoVuetrade mark. *Echocardiography.* 1999; 16: 743-6.

91 Mizushige K, Kondo I, Ohmori K, Hirao K, Matsuo H. Enhancement of ultrasound-accelerated thrombolysis by echo contrast agents: dependence on microbubble structure. *Ultrasound Med Biol.* 1999; 25: 1431-7.

92 Schumann PA, Christiansen JP, Quigley RM, McCreery TP, Sweitzer RH, Unger EC, Lindner JR, Matsunaga TO. Targeted-microbubble binding selectively to GPIIb IIIa receptors of platelet thrombi. *Invest Radiol.* 2002; 37: 587-93.

93 Spengos K, Behrens S, Daffertshofer M, Dempfle CE, Hennerici M. Acceleration of thrombolysis with ultrasound through the cranium in a flow model. *Ultrasound Med Biol.* 2000; 26: 889-95.

94 Tirosh O, Barenholz Y, Katzhendler J, Priev A. Hydration of Polyethylene Glycol-Grafted Liposomes. *Biophysical Journal.* 1998; 74: 1371-9.

95 Bedu-Addo FK, Tang P, Xu Y, Huang L. Effects of Polyethyleneglycol Chain Length and Phospholipid Acyl Chain Composition on the Interaction of Polyethyleneglycol-phospholipid Conjugates with Phospholipid: Implications in Liposomal Drug Delivery. *Pharmaceutical Research.* 1996; 13: 710-7.

96 Siddiqi F, Odrljin TM, Fay PJ, Cox C, Francis CW. Binding of tissue-plasminogen activator to fibrin: effect of ultrasound. *Blood.* 1998; 91: 2019-25.

97 Everbach EC, Francis CW. Cavitational mechanisms in ultrasound-accelerated thrombolysis at 1 MHz. *Ultrasound Med Biol.* 2000; 26: 1153-60.

98 Pfaffenberger S, Devcic-Kuhar B, Kollmann C, Kastl SP, Kaun C, Speidl WS, Weiss TW, Demyanets S, Ullrich R, Sochor H, Wöber C, Zeitlhofer J, Huber K, Gröschl M, Benes E, Maurer G, Wojta J, Gottsauner-Wolf M. Can a commercial diagnostic ultrasound device accelerate thrombolysis? An in vitro skull model. *Stroke.* 2005; 36: 124-8.

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AFM	atomic force microscopy, Raster-Kraft-Mikroskopie
AMI	acute myocardial infarction, akuter Myokardinfarkt
B-Mode	brightness-mode, Anzeigemodus für Ultraschallbilder
CH	Cholesterol
CK-MB	herzspezifische Kreatininkinase
COX	Cyclooxygenase
CT	Computertomographie
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin
DPPG	1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol
DSPC	1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin
EKG	Elektrokardiogramm
ELIPs	echogenic liposomes, ultraschallaktive Liposomen
f	Frequenz, Oszillationen pro Sekunde
FII	Koagulationsfaktor II, Prothrombin
FIIa	aktivierter Koagulationsfaktor II, Thrombin
FIX(a)	(aktivierter) Koagulationsfaktor IX
FV(a)	(aktivierter) Koagulationsfaktor V
FVII(a)	(aktivierter) Koagulationsfaktor VII
FVIIIa	aktivierter Koagulationskofaktor VIII
FX(a)	(aktivierter) Koagulationsfaktor X
FXI(a)	(aktivierter) Koagulationsfaktor XI
FXII(a)	(aktivierter) Koagulationsfaktor XII
FXIII(a)	(aktivierter) Koagulationsfaktor XIII
GPIb	Glykoprotein Ib

GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
ICH	intracerebrale Hämorrhagien
LDA	Laser-Doppler-Anemometrie
M_A	Ausgangsgewicht der Thromben
M_E	Endgewicht der Thromben
MI	mechanischer Index, Maß für die Wahrscheinlichkeit auftretender Kavitation in einem Ultraschallfeld
MRT	Magentresonanztomographie
$MV_{\%}$	Masseverlust der Thromben
NMR	nuclear magnetic resonance spectroscopy, ^{31}P-Kernspinresonanz-spektroskopie
N-NBD-PE	1, 2- dipalmitoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine-N- (7-nitro-2-1, 3- benzoxadiazol-4- yl, fluoreszenzmarkiertes Lipid
NSTEMI	non ST elevated myocardial infarction, Myokardinfarkt ohne ST-Streckenerhöhung
NUSCA	nanoscaled ultrasound contrast agent, nanoskaliges Ultraschall-kontrastmittel
PBS-Puffer	Phosphatpuffer pH 7,4 mit einer Konzentration von 0,15mol/l
PD	Pulsdauer, Zeit eines US-Pulses
PDI	Polydispersitätsindex
PEG4000	Polyethylenglykol 4000
PEG40S	Polyethylenglykol-40-sterat
PRIND	partiell reversibles ischämisches neurologisches Defizit
Pro-UK	Pro-Urokinase
PRP	Pulsrepetitionsperiode, Zeit die zwischen zwei aufeinanderfolgenden US-Pulsen vergeht
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RIND	reversibles ischämisches neurologisches Defizit

ROI	region of interest
rt-Pa	recombinant tissue plasminogen activator, rekombinanter Gewebe-Plasminogen-Aktivator
SK	Streptokinase
STEMI	ST elevated myocardial infarction, ST-Strecken Erhöhung bei Myokardinfarkt
T	Periode, Zeit einer vollständigen US-Welle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TIA	transient ischämische Attacke
t-Pa	tissue plasminogen activator, Gewebe-Plasminogen-Aktivator
TXA_2	Thromboxan A_2
UCA	ultrasound contrast agents, Ultraschallkontrastmittel
UK	Urokinase
US	Ultraschall
vWF	von-Willebrand-Faktor
Π/A-Isotherme	Lateraldruck/Flächendiagramm der Filmwaagenmessungen

9.2 Publikationsliste

Publikationen:

- E.E.J. Marxer[1], J. Brüßler[1], A. Becker, J. Schümmelfeder, R. Schubert, C. Nimsky, U. Bakowsky
  Development and characterization of new nanoscaled ultrasound active lipid dispersions as contrast agents
  European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 77 (2011) 430-437
  [1]: gleichermaßen am Manuskript beteiligt

- A. Becker, E.E.J. Marxer, J. Brüßler, A.S. Hoormann, D. Kuhnt, U. Bakowsky, C. Nimsky
  Ultrasound active nanoscaled lipid formulations for thrombus lysis
  European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 77 (2011) 424–429

- A. Sommerwerk, J. Brüßler, J. Schäfer, E.L. Baginski, M. Bandulik, U. Bakowsky
  Lipid coated Chitosan microparticles as Protein Carriers
  physica status solidi c, Vol. 8 (2011) 1978-1984

Vorträge:

- J. Brüßler, E.E.J. Marxer, U. Bakowsky
  Development and characterization of ultrasound active liposomes for sonothrombolysis
  20th Mountain/Sea Liposome Workshop
  28.09.-02.10.2009, Ameland, Niederlande

- J. Brüßler, E.E.J. Marxer, A. Becker U. Bakowsky

  Influencing factors on the echogenicity of ultrasound active liposomes

  Controlled Release Society (CRS), Germany Local Chapter

  23.-24.3.2010, Saarbrücken, Deutschland

- J. Brüßler, E.E.J. Marxer, A. Becker, R. Schubert, C. Nimsky, U. Bakowsky

  Determination of the structure of a new nanoscaled ultrasound contrast agent

  8th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology (CESPT), Satellite Symposium: 4th International Graz Congress on Pharmaceutical Engineering

  16.-18.09.2010 Graz, Österreich

- J. Brüßler, C. Quest, S. Padberg, E. Marxer, A. Becker, U. Bakowsky

  Structural dependence of the echogenicity of new nanoscaled ultrasound contrast agents

  21th Mountain/Sea Liposome Workshop

  28.03.-01.04.2011, Oberjoch, Deutschland

Posterpräsentationen:

- J. Brüßler, E.E.J. Marxer, K. Zöllner, A. Becker, U. Bakowsky

  Influencing factors on the echogenicity of ultrasound active liposomes

  Controlled Release Society (CRS), Germany Local Chapter

  23.-24.3.2010, Saarbrücken, Deutschland

- J. Brüßler[1], C. Hobler[1], E.E.J. Marxer, M. Keusgen, U. Bakowsky

  Implementation of semiconductor nanoparticles into lipid double-layer of functional liposomes

  Workshop Engineering of Functional Interfaces (ENFI) 2010

  15.-16.07.2010 Rauischholzhausen, Marburg, Deutschland

  [1]: gleichermaßen am Poster beteiligt

- A. Sommerwerk[1], J. Brüßler[1], J. Schäfer, U. Bakowsky

  Lipid coated Chitosan Nano- and Microparticles as Protein Carriers

  Controlled Release Society (CRS), Germany Local Chapter

  19.-20.3.2009, Halle (Saale), Deutschland

  [1]: gleichermaßen am Poster beteiligt

- A. Becker, C. Kappus, E.E.J. Marxer, J. Brüßler, U. Bakowsky, C. Nimsky

  Contrast Properties of nanoscaled liposomes using phased inversion harmonic Imaging

  Controlled Release Society (CRS), Germany Local Chapter

  23.-24.3.2010, Saarbrücken, Deutschland

- E.E.J. Marxer, J. Brüßler, A. Becker, U. Bakowsky

  Development of new ultrasound active liposomes for sonothrombolysis and their characterization

  Controlled Release Society (CRS), Germany Local Chapter

  23.-24.3.2010, Saarbrücken, Deutschland

- A. Becker, J. Brüßler, D. Kuhnt, E.E.J. Marxer, U. Bakowsky, C. Nimsky

  Homogeneity of new nanoscaled ultrasound contrast agents in medical ultrasound

  Workshop Engineering of Functional Interfaces (ENFI) 2010

  15.-16.07.2010 Rauischholzhausen, Marburg, Deutschland

eingereichte Publikationen:

- J. Brüßler, E.E.J. Marxer, A. Becker, R. Schubert, J. Schümmelfeder, C. Nimsky, U. Bakowsky

  Correlation of structure and echogenicity of nanoscaled ultrasound contrast agents

  eingereicht bei: Langmuir

- J. Brüßler, E.E.J. Marxer, B. Strehlow, A. Becker, J. Schümmelfeder, C. Nimsky, U. Bakowsky

  Enhanced thrombolysis with the use of ultrasound and nanoscaled ultrasound contrast agents

  eingereicht bei: Journal of Thrombosis and Haemostasis

9.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Jana Brüßler
Geburtsdatum:	21.08.1981
Geburtsort:	Lüdenscheid
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung

1987-1991	Grundschule Lösenbach, Lüdenscheid
1991-2000	Bergstadt-Gymnasium Lüdenscheid

Berufsausbildung

01.08.2000-31.01.2003	Ausbildung zur pharmazeutisch-technischen Assistentin an der PTLA Hagen
01.08.2002-31.10.2002	3-monatiges Praktikum im Rahmen der PTA-Ausbildung Schwanen-Apotheke, Lüdenscheid
01.11.2002-31.01.2003	3-monatiges Praktikum im Rahmen der PTA-Ausbildung Zentralapotheke der Krankenhäuser des Märkischen Kreises GmbH Lüdenscheid
13.02.2003	Erteilung der Erlaubnis zur Führung der Berufsbezeichnung PTA

Pharmaziestudium

01.04.2003-31.03.2007	Pharmaziestudium an der Philips-Universität Marburg
01.05.2007-31.10.2007	Pharmaziepraktikum 1. Halbjahr Haupt Pharma Wolfratshausen GmbH

01.11.2007-31.04.2008	Pharmaziepraktikum 2. Halbjahr
	Schwanen-Apotheke, Lüdenscheid
27.06.2008	Erteilung der Approbation zur Apothekerin

Berufstätigkeit

01.05.2008-31.10.2008	Schwanen-Apotheke, Lüdenscheid
seit 01.11.2008	wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Philips-Universität Marburg, Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Udo Bakowsky am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

9.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Udo Bakowsky für die Annahme als Doktorandin, die interessante Themenstellung und die fortwährende Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der Ausarbeitung dieser Dissertation.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Prof. Michael Keusgen für die Erstellung des Zweitgutachtens und die Leitung der Prüfungskommission bei der Disputation bedanken.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Thorsten Steinmetzer und Frau Prof. Meike Petersen, die meine Dissertation als Nebenfachprüfer begutachtet haben.

Meiner Kollegin Elena Marxer danke ich für die gute Zusammenarbeit in der ersten Phase des Projektes und die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft der letzten Jahre.

Herrn Prof. Dr. Christopher Nimsky, Herrn Dr. Andreas Becker, Frau Sabine Motzny, Frau Anne Sophia Hoormann und Herrn Tobias Wintermantel danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung des Durchflussmodells und der Durchführung der Ultraschallkontrastmessungen.

Bei Herrn Dr. Andreas Becker und den anderen Ärzten der Neurologischen Intensivstation des Uniklinikums Marburg bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Blutentnahme zur Herstellung der Thromben.

Für die Aufnahme der cryo-TEM Bilder danke ich Herrn Prof. Dr. Rolf Schubert und Frau Sabine Barnert.

Herrn Boris Strehlow danke ich für die REM-Aufnahmen der Thromben.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. Thomas Kämpchen für die Erstellung der ^{31}P-NMR-Spektren.

Meinen Kollegen und ehemaligen Kollegen Bassam AlMeslmani, Leonie Baginski, Thomas Betz, Dr. Eyas Dayyoub, Jana Fuß, Fabian Hues, Dr. Jarmila Jedelská-Keusgen, Susanne Lüttebrand, Elena Marxer, Dr. Aybike Öczetin, Dr. Olga Samsonova, Eric Sasko, Dr. Jens Schäfer, Maria Solovey, Anett Sommerwerk und Boris Strehlow des Arbeitskreises Bakowsky und Dr. Moritz Beck-Broichsitter, Dr. Nadja Bege, Dr. Markus Benfer, Dr. Heiko

Debus, Thomas Endres, Dr. Tobias Lebhardt, Dr. Olivia Merkel, Dr. Thomas Renette, Dr. Regina Reul, Dr. Susanne Rösler und Dr. Christoph Schweiger des Arbeitskreises Kissel danke ich für das gute Arbeitsklima und die vielen schönen Stunden an der Uni und nach Feierabend. Ohne die vielen Diskussionen über Ergebnisse und die Hilfe bei der Durchführung von Versuchen an verschiedenen Geräten hätte diese Arbeit nicht entstehen können.

Sebastian Neu und meinem Vater danke ich für das Korrekturlesen meiner Dissertation.

Ganz besonderes danke ich meiner Familie für die Unterstützung und Aufmunterung während der letzten Jahre und vor allem für ihre Nachsicht in den letzten Monaten.

9.5 Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich meine Dissertation

„Entwicklung und Charakterisierung nanoskaliger Lipidformulierungen als Ultraschallkontrastmittel zur sonothrombolytischen Therapie“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 03.07.2012

Jana Brüßler