

Dirk-Henning Menz

Berliner Fluorchemie – die Wiege für Produktsicherheit von Perfluorcarbonen

Vortrag am 26. September 2019 anlässlich des 90. Geburtstages von Lothar Kolditz

Veröffentlicht: 6. Dezember 2019

Sehr geehrte Damen und Herren,
es ist schon eine besondere und bewegende Situation, wenn man heute auf 14 Jahre gemeinsame Arbeit zurückschaut und das mit dem Abstand von fast 30 Jahren!

Umso schöner ist es, dass diese Rückschau nicht nur ein Erinnern an das damals Erlebte ist, sondern dass auch darüber berichtet werden kann, wie die damals vom Jubilar initiierten wissenschaftlichen Arbeiten bis heute fortwirken und nichts von ihrer Bedeutung verloren haben. Aber es sind eben nicht nur die harten wissenschaftlichen Fakten, die wir als seine Schüler mitgenommen haben, sondern im besonderen Maße auch die Art des gegenseitigen Umgangs in der Arbeitsgruppe, und die Team-bildenden Maßnahmen, die heute gern als weiche Faktoren bezeichnet werden und schon gelebt wurden, bevor es diese Bezeichnungen überhaupt gab (Abb. 1).



Abb. 1: Arbeitsgruppe Kolditz an der HU Berlin im Jahr 1978.

Respektvoller Umgang miteinander, das unaufgeregte Zuweisen von Aufgaben je nach Vermögen und Leistungsfähigkeit und ganz besonders auch das Einräumen der Möglichkeit, sich frei zu entfalten, sich selbst auszuprobieren und mit großem Freiraum gestalten zu können – all dies hat uns der Jubilar vorgelebt.

Beispielhaft sei da nur verwiesen auf die guten Beziehungen zu den Feinmechanikern, Glasbläsern und Gerätebauern, damals wie heute ein ganz entscheidendes Erfolgsrezept für experimentell arbeitende Naturwissenschaftler.

Ein wichtiger Meilenstein war auch die Etablierung von Weiterbildungen und Vortragsreihen in Steinförde bei Fürstenberg (Havel). Unter den Anorganikern ein Synonym für wissenschaftlichen Austausch in Klausur, fernab vom Tagesgeschäft und in nahezu unberührter Natur, war Steinförde für den Arbeitskreis Kolditz immer noch mehr. Als sich in der Gruppe eine merkbare Unruhe auszubreiten begann, ausgelöst durch zusätzliche Spendenaufrufe, beruhigte der Weidmann Kolditz die Situation durch den Aufruf zu einem gemeinnützigen Waldeinsatz. Diesem ersten Einsatz zum Freiräumen des

Unterholzes von Geäst und Gestrüpp folgten bald die nächsten Wochenendeinsätze im Steinförder Forst, sie wurden zu einer langjährigen Tradition. Sicher war eine beispiellose Pflanzaktion der Höhepunkt: 24.000 Traubeneichen wurden an einem Wochenende gesetzt. Das Resultat dieses Einsatzes wächst noch immer heran. Wir konnten den Eichenwald bei einem Besuch bewundern (Abb. 2).



Abb. 2: Die Traubeneichen nach ca. 25 Jahren.

Die bei diesen Einsätzen geknüpften und vertieften freundschaftlichen Bande im Arbeitskreis hielten über Jahre und Jahrzehnte und so manches gemeinsame Projekt hatte seine Wurzeln in der guten zwischenmenschlichen Chemie, dessen Katalysator der Jubilar war.



Abb. 3: Zusammenfassung der Adlershofer Forschungsergebnisse zu den Perfluorcarbonen

Schon in der Schaffensperiode an der Humboldt Universität war ein Charakteristikum Kolditzscher Forschungsarbeit zu erkennen, das dann im ZIAC eine noch stärkere Ausprägung fand: Die Beschäftigung mit den wissenschaftlichen Grundlagen von industriellen Prozessen, Aufklärung von Problemen mit und Aufzeigen von Möglichkeiten für neue Produkte.

Dazu zählen die Arbeiten rund um die perfluorierten Verbindungen, deren Nutzung als Sauerstoffträger in Blutersatzstoffen in Berlin Adlershof intensiv erforscht wurde. Schlüsselerkenntnis für die medizinische Nutzung dieser Stoffklasse war, dass nur ultra-hochgereinigte Verbindungen eine gefahrlose Anwendung ermöglichen. Solange herstellungsbedingte reaktive Verunreinigungen in den Produkten enthalten waren, wirkten diese zelltoxisch und zogen unerwünschte Nebenreaktionen nach sich. Diese Erfahrung wurde nahezu zeitgleich auch von russischen, französischen und amerikanischen Arbeitsgruppen gemacht.

Das besondere Verdienst der Adlershofer-Gruppe war jedoch, gemeinsam mit den russischen Partnern in diesem Projekt daraus eine praktikable und reproduzierbare Testprozedur zu gestalten (Abb. 3) [1,2].

Das entscheidende Qualitätskriterium für Perfluorcarbonen ist, dass diese tatsächlich in voll fluorierter Form vorliegen müssen. Erst dann erreichen die synthetisierten Produkte ihre außergewöhnlichen Eigenschaften. Erfolgt die Fluorierung nicht vollständig, bleiben restliche Wasserstoffatome im Molekül übrig, die ent-

stehenden Verbindungen können unter alkalischen Bedingungen mit Nukleophilen reagieren unter Bildung von HF und toxischen, fluorierten Nebenprodukten. In Abhängigkeit vom Zielprodukt und dem Syntheseweg kann eine Vielzahl von nicht vollständig fluorierten Verbindungen gebildet werden.

Sind diese reaktiv, können sie toxische Nebenreaktionen verursachen. Der Schweregrad der toxischen Wirkung kann extrem, die auslösende Konzentration äußerst gering sein (ppm-Bereich), was zu einer geringen Entdeckungswahrscheinlichkeit führt.

Die Charakterisierung der Qualität der perfluorierten Verbindungen gelang durch eine zweistufige Analyse. In einem ersten Schritt werden unter harschen Reaktionsbedingungen reaktive Verbindungen umgesetzt. Die Idee dahinter: Alle Verbindungen, die unter diesen Bedingungen nicht reagieren werden als „nicht-reaktiv“ eingeordnet und können bedingt durch ihre Reaktionsträgheit keine toxischen Reaktionen auslösen. Alle anderen Verbindungen sind reaktiv und somit unabhängig von ihrem individuellen toxischen Potential als latenter Risikofaktor einzustufen und in entsprechend darauf abgestimmten Hochreinigungsprozessen zu eliminieren. Der große Vorteil dieses ersten Analysenschrittes ist, dass ein Summenparameter für alle potenziell gefährlichen Verbindungen geschaffen werden konnte und als risikominimierende Maßnahme die vollständige Abtrennung dieser Verunreinigung als Zielvorgabe formuliert werden kann.

Es galt deshalb in einer zweiten Stufe des Analysenverfahrens, einen substanzspezifischen Limit-Test zu etablieren, wobei das Limit „frei von“ durch Unterschreiten der Nachweisgrenze für die Gesamtreaktion definiert werden kann. Aufbauend auf den Berliner Arbeiten wurde Anfang der 1990er Jahre durch Meinert dieses Qualitätskriterium von den Blutersatzstoffen auf die bei Augenoperationen verwendeten Perfluorcarbone übertragen [3].

Perfluorcarbone – insbesondere Perfluordekalin (PFD) und Perfluoroktan (PFO) – haben sich in der Augenheilkunde als sogenannte Endotamponaden durchgesetzt und sind in vitreo-retinalen Operationen heute nicht mehr wegzudenken. Diese Verbindungen helfen wie eine dritte Hand des Operateurs, nach der Entfernung des Glaskörpers die Retina wieder anzulegen.

Die Pharmpur GmbH fertigt diese Endotamponaden nunmehr seit mehr als 25 Jahren. Ein Erfolgsfaktor war die konsequente Nutzung des von Pharmpur aus den Adlershofer Arbeiten abgeleiteten „H-Wertes“.

Zwischen 2015 und 2017 kamen aber von dem Markt alarmierende Nachrichten, die zu einer großen Verunsicherung führten. Trotz der kurzen Verweilzeit im Auge wurden verheerende Nebenwirkungen bis hin zur vollständigen Erblindung beim Einsatz von Perfluorcarbonen berichtet. Die Gruppe um Pastor konnte dies auf die zytotoxische Wirkung der betroffenen Chargen von verschiedenen Herstellern zurückführen [4]. Obwohl unsere Produkte davon in keiner Weise betroffen waren, haben wir uns diesem Problem angenommen und durch umfangreiche Untersuchungen das Verunreinigungsprofil der betroffenen Chargen aufgeklärt (Tabelle 1). Daraus wird auch ersichtlich, wie wichtig für die Produktsicherheit eine mehrstufige Hochreinigung ist, begleitet von sensitiven Inprozess-Kontrollen, wobei sowohl Reinigungsverfahren als auch Analytik auf das tatsächliche Verunreinigungsprofil anzupassen sind.

Gruppe	Bezeichnung	Beispiele
1	Reaktive unvollständig fluorierte Verbindungen und ihre Zersetzungsprodukte inklusive HF	Fluorierte Verbindungen mit Restprotonen in der Kette
2	Nicht reaktive unvollständig fluorierte Verbindungen	1H-PFO und Verbindungen des Typs RF-RH (Blockbildung)
3	Oberflächenaktive Verbindungen	1H-PFO, Perfluoralkansäuren und ihre Derivate
4	Nicht reaktive fluorierte Verbindungen	Perfluorheptan, Perfluorononan
5	Leachables	Dimethylbenzen und Isomere

Tabelle 1: Verunreinigungsprofil toxischer PFO-Chargen.

Es blieb aber die Frage offen, warum in verschiedenen Testlabors das zytotoxische Potential der verunreinigten Chargen nicht entdeckt wurde. Von Shirasava und Pastor wurde die dafür angewandte Variante der Zytotoxizitätsbestimmung verantwortlich gemacht, nämlich die der sogenannten extraktiven Methode. Sie fordern die ausschließliche Verwendung einer von ihnen patentierten Direktmethode (direkte Exposition der Zellen) [4, 5]. Die extraktive Methode wird allerdings von uns seit Jahren mit großem Erfolg verwendet und führte auch bei den nachgewiesenermaßen toxischen Chargen zu identischen Ergebnissen wie bei Verwendung der Direktexposition [6–8]. Es bleibt aber die Frage, warum andere Testlabors und auch die Gruppe um Pastor falsch-negative Werte erhielten.

Um der Ursache dafür auf die Spur zu kommen führten wir einen Ringversuch durch. Eine der dabei zu klärenden Fragen fußte wieder auf den Erkenntnissen der Blutersatzstoffforschung und den von uns darauf aufbauenden Arbeiten zu perfluorcarbonhaltigen Gelen mit Schaumstruktur (Polyaphrongele) [9]. Um die Sauerstoff transportierende PFCL Komponente in Emulsionen in Blutersatzstoffen zu stabilisieren oder aus PFCL und Wasser stabile Gele zu erzeugen, sind stark oberflächenmodifizierende Stoffe erforderlich. Gerade solche Substanzen bildeten eine Verunreinigungsgruppe in den betroffenen, toxischen Chargen. Durch Bildung von Wasser in Öl oder Öl in Wasseremulsionen besteht die Gefahr der Maskierung von toxischen Verbindungen. Tatsächlich konnten wir bei der Extraktion der PFCL Chargen mit wässrigen Medien stabile Emulsionen beobachten und auch aus den Testlabors wurde von dadurch auftretenden Schwierigkeiten berichtet (Abb. 4). Entsprechende Handversuche bestätigten überdies, dass nach Zusatz von PFOA Derivaten in reinen PFO zusammen mit 1-HPFO dieses Verhalten simuliert werden konnte. Alle genannten Verbindungen wurden in den toxischen Chargen nachgewiesen. Die Literaturlauswertung ergab außerdem, dass unterschiedliche Methoden der Vitalitätsbestimmung nach der Exposition der Testzellen in den einzelnen Testlabors Verwendung fanden.

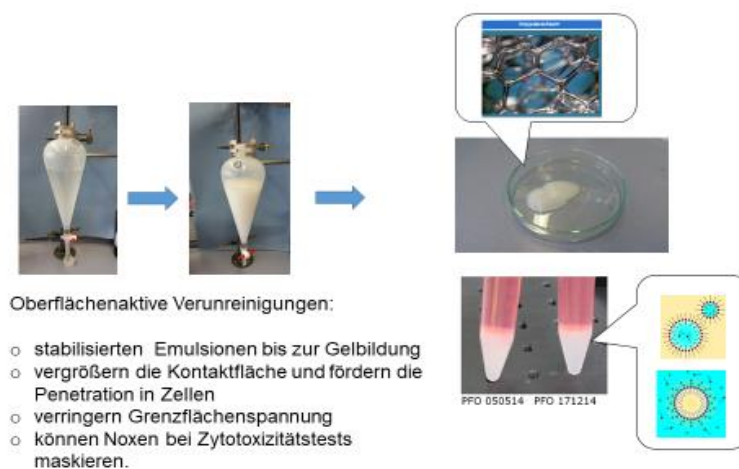


Abb. 4: Gefahr der Bildung von Makro-Emulsionen bei der Probenpräparation.

Der Ringversuch sollte Aufschluss darüber geben, inwieweit diese beiden Faktoren für falsch-negative Ergebnisse verantwortlich waren.

In Tabelle 2 ist das Testprogramm dargestellt. Die Verwendung von Maus-Fibroplasten als Zelllinie wurde dabei bewusst gewählt. Die Ergebnisse belegen, dass sich diese Standardzelllinie als ebenso sensitiv erweist, wie die mehrfach präferierten Zellen der Linie „ARPE19“, die einen engeren Bezug zu den retinalen Geweben bieten sollte [4].

Lfd. Nr.	Aufgabe	Bemerkung zur Durchführung
1	Bereitstellung von 9 Verbindungen pro Packung mit unterschiedlichen toxischen Potential	Verblindung nach einer Random Liste
2	Versand von je 2 Test-Packungen an 4 akkreditierte Testlabors, Durchführung der ersten Testserie	Test der Zellwachstumshemmung der Proben der ersten Packung an L929 Zellen nach dem Standardverfahren der Labore (BCA und XTT Färbemethode)
3	Hinterlegen der Ergebnisse beim Patentanwalt	
4	Training des Protokolls	Hinweis auf Besonderheiten der fluorierten Verbindungen und ihrer Verunreinigungen
5	Durchführung der zweiten Testserie	Standardisiertes Protokoll, erneut BCA und XTT Färbung, Nutzung Zelllinie L929
6	Sammeln aller Ergebnisse beim Patentanwalt	Übergabe der Ergebnisse an den Statistiker
7	Statistische Auswertung	Entblenden der Ergebnisse

Tabelle 2: Testprogramm des Ringversuchs.

Das Ergebnis des Ringversuches war überraschend deutlich. Beide von uns vermuteten Störfaktoren beeinträchtigen tatsächlich die Toxizitätsbestimmung. Durch Einhaltung eines strengen Präparationsprotokolls mit Vermeidung der Bildung von Makro-emulsionen (dies ist sowohl bei direkter Exposition oder bei Exposition der Zellen mit Extrakten auszuschließen) wird die Quote falsch-negativer Ergebnisse verringert. Ein noch größerer Einfluss besitzt aber die angewendete Methode der Vitalitätsbestimmung. Hier war die Färbemethode BCA oder MTT der entsprechenden XTT-Methode eindeutig überlegen. Wir führen das auf die Besonderheiten des vorliegenden Verunreinigungscocktails der Testmuster zurück, da einzig bei der XTT-Methode Verunreinigungskomponenten bis zum Moment der Farbreaktion mitgeführt werden. Liegt nun im Testmuster eine stark oberflächenmodifizierende Substanz vor, kann diese die Farbreaktion im Gegensatz zur Referenz (ohne oberflächenmodifizierende Komponente) verstärken. Die dadurch überproportional erhöhte Farbausbeute spiegelt dann eine überhöhte Vitalitätsrate vor, was zu falsch positiven Ergebnissen führt.

Da bisher in der Literatur aber immer nur die extraktive Methode mit der XTT Färbung mit der Direktmethode unter Nutzung der MTT Färbung verglichen wurde, ist der dabei festgestellte Unterschied bei den erreichten Ergebnissen nicht auf die Methode der Probenvorbereitung (extraktiv versus direkt) sondern auf die genutzte Färbemethode zur Vitalitätsbestimmung zurückzuführen (Abb. 5a und 5b).

Abb. 5: Ausgewählte Ergebnisse des Ringversuchs

Batch No.		041213		070714		080714		200114		171214	
Geprüfte Wachstumshemmung in %		19 %		37		32		40		100	
Prozedur		Inhouse standard	Trainiertes Protokoll	Inhouse standard	Trainiertes Protokoll	Inhouse standard	Trainiertes Protokoll	Inhouse standard	Trainiertes Protokoll	Inhouse standard	Trainiertes Protokoll
Labor	2	8 %	28 %	18	40	17	37	37	39	100	101
	3	24 %	20 %	24	32	45	27	27	34	72	99
	4	17	67	23	13	20	33	21	44	66	79
Mittelwert	Alle Werte	16	35	22	28	27	32	28	39	79	93
	Ausreißer bereinigt	16	24	21	36	31	32	32	37	86	100

5a: Training hat positiven Effekt, Emulsionseffekte beim Extrahieren erklären Abweichungen aber nicht vollständig.

Batch No	200114			070714			08714			041213			171214			
Geprüfte Vitalität %	60			63			66			81			0			
Labor	Methode	XTT	MTT	BCA	XTT	MTT	BCA	XTT	MTT	BCA	XTT	MTT	BCA	XTT	MTT	BCA
	1	69		64	92		71	74		59	91		80	0		0
	2	82		61	89		60	104		68	114		72	1		-1
	3	97	55	66	117	62	68	109	56	75	115	66	80	2	0	1
Mittelwert	88		64	99		66	96		65	107		77	1		0	

■ Starkes zytotoxisches Potential
■ Mittleres Zytotoxisches Potential
■ Niedriges oder kein zytotoxisches Potential

5b: Die XTT Methode kann nur die hochtoxischen Proben richtig identifizieren, die BCA Methode ermöglicht ebenso wie die MTT Methode auch die Charakterisierung mittlerer Toxizitäten.

Die vorgestellten Beispiele sollen verdeutlichen, wie wichtig ein solides Wissen über die Produkte ist, die als Medizinprodukte in den Verkehr gebracht werden sollen. Ein Risikomanagement kann nur dann einen verlässlichen Rahmen bieten, wenn dieses auf dem Fundament naturwissenschaftlich gesicherter Erkenntnisse begründet ist.

In diesem Sinne danke ich zusammen mit meinem gesamten Team dem Jubilar nochmals für seine auf diesem Gebiet geleistete Pionierarbeit und Ihnen für Ihre Aufmerksamkeit!

Literatur:

- [1] U. Groß, S. Rüdiger, L. Kolditz und H. Reichelt, „Blutersatzstoffe auf Fluorcarbonbasis“, in: Mitteilungsblatt der Chemischen Gesellschaft, Bd. 37, Nr. 11, 1461–1465, 1990.
- [2] L. L. Gervits, „Perfluorcarbon-Based Blood Substitutes: Russian Experience“. In: Fluorine in Medicine in the 21st Century: UMIST, Manchester University, 1994.
- [3] H. Meinert, „Perfluorchemicals in ophthalmology: Materials and Basic Principles“, in: Fluorine in Medicine in the 21st Century: UMIST, Manchester University, 1994, 266.
- [4] J. C. Pastor, R. M. Coco, I. Fernandez-Bueno, M. L. Alonso-Alonso, J. Medina, A. Sanz-Arranz, F. Rull, M. J. Gayoso, A. Duenas, M. T. Garcia-Gutierrez, L. Gonzalez-Buendia, S. Delgado-Tirado, E. Abecia, M. Ruiz-Miguel, M. A. Serrano, J. M. Ruiz-Moreno und G. K. Srivastava, „ACUTE RETINAL DAMAGE AFTER USING A TOXIC PERFLUORO-OCTANE FOR VITREO-RETINAL SURGERY“, *Retina* 2017, 37, 1140–1151.
- [5] G. K. Srivastava, M. L. Alonso-Alonso, I. Fernandez-Bueno, M. T. Garcia-Gutierrez, F. Rull, J. Medina, R. M. Coco und J. C. Pastor, „Comparison between direct contact and extract exposure methods for PFO cytotoxicity evaluation“, in: *Nature*, 2018, 8, 1425.
- [6] D.-H. Menz, N. Feltgen, H. Menz et al: „How to ward off retinal toxicity of perfluorooctane and other perfluorocarbon liquids?“, in: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018, 59, 4811–4846.
- [7] D.-H. Menz, N. Feltgen, T. Lechner et al: „Hydrofluoric Acid and Other Impurities in Toxic Perfluorooctane Batches“, *TVST* 2019, 8, 24.
- [8] D.-H. Menz, J. H. Dresp: „Biocompatibility of highly Fluorinated Liquids Used in Ophthalmic Surgery“, in: *Fluorine and Health*, Editors: A. Tressaud & G. Haufe, Elsevier B.V., 2008.
- [9] D.-H. Menz, J. H. Dresp: „Plastical Deformable Implant“, DE-Patent: 19926889; US 7,101,564 B1.