

**Oxidativer Stress und elektrochemische Dekontaminations-
Verfahren in der Dialyse**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften der
Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III

Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften

der Universität des Saarlandes

von

Diplom Chemiker

Torsten Burkholz

Saarbrücken, 2010

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Oktober 2006 bis August 2009 in der Fachrichtung Bioorganische Chemie unter der Leitung von Herrn Jun. Prof. Dr. Claus Jacob durchgeführt.

Tag des Kolloquiums: 18.06.2010, 11:15 Uhr

Dekan: Prof. Dr. Stefan Diebels

Berichtersteller: Jun. Prof. Dr. Claus Jacob
Prof. Dr. Guido Kickelbick
Prof. Dr. Gilbert Kirsch

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Gregor Jung

Akad. Mitarbeiter: Dr. Stefan Böttcher

To my
loving family

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Jun. Prof. Dr. Claus Jacob für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis sowie für die interessante Themenstellung und die Betreuung der Arbeit, die konstruktive Kritik und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung. Auch aus menschlicher Sicht hat Herr Jacob stets versucht, mich bei meiner Dissertation zu unterstützen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Guido Kickelbick für die Übernahme des Koreferates, sowie bei Herrn Prof. Dr. Gregor Jung für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Einen herzlichen Dank möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Gilbert Kirsch von der Universität Metz aussprechen, für die jederzeit sehr angenehme Zusammenarbeit innerhalb unserer gemeinsamer EU-Projekte und für seine freundliche und zuvorkommende Art bei allen Fragen, sowie für die Bereitschaft, die hier vorliegende Arbeit als externer Gutachter zu prüfen.

Des weiteren Danke ich meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen und Freunden im Arbeitskreis Jacob für das meist sehr gute Arbeitsklima und die fachliche Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Hervorheben möchte ich hierbei die besonderen Leistungen von Herrn Awais Anwar, der jederzeit bereit war, sich auf fachliche und private Diskussionen mit mir einzulassen und der immer zur Stelle war, wenn seine Hilfe benötigt wurde. Auch die gemeinsamen Nachtschichten in lockerer Atmosphäre bei chinesischem Essen werden mir immer in guter Erinnerung bleiben.

Bei Frau Dr. Lalla Aicha Ba-Bernardi möchte ich mich für die großartige Unterstützung in fachlichen Fragen und die Hilfeleistung bei Problemen aller Art bedanken. Ihre entspannte und ausgeglichene Art half, während so mancher Krise das Wesentliche im Auge zu behalten. Zusammen mit ihrem Mann, Dan Bernardi, gehört den Beiden auch großer Dank für die angenehmen Stunden außerhalb des Labors.

Frau Mandy Döring gehört besonderer Dank für ihre große Hilfe in allen Lebenslagen, für ihre aufopferungsvolle Mitarbeit an der Planung und der Verwirklichung des Erst-Semester-Praktikums sowie der Bereitschaft, sich immer wieder für mich und ihre Kollegen einzusetzen. Auch für Ihre teils sehr kritischen, jedoch nie ungerechtfertigten Verbesserungsvorschläge für die hier vorliegende Dissertationschrift möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Hamdoon Mohammed danke ich für den freundschaftlichen Umgang mit mir und meinen neugierigen Fragen zum Islam, seiner Heimat Ägypten und seiner Kultur. Es war mir eine echte Freude mit ihm zusammenarbeiten zu dürfen. Auch seiner Frau Shaimma El-salhy gebührt Dank für die regelmäßige Verpflegung mit frischem Falafel.

Herrn Thomas Schneider danke ich für die sehr willkommene Übernahme einiger verwaltungstechnischer Aufgaben, sodass ich den Kopf wieder freibekommen konnte, mich meiner eigentlichen Arbeit zu widmen. Auch die gemeinsame Fahrt nach England, inklusive der Arbeit auf dem Kartoffelacker, zusammen mit Herrn Hamdoon Mohammed, Herrn Awais Anwar und Herrn Mohammed Bader Sarakbi, wird unvergessen bleiben.

Bei Frau Brigitte Czepukojc möchte ich mich ebenfalls für die sehr gute und freundschaftliche Zusammenarbeit, sowie für die Unterstützung beim Korrekturlesen der hier vorliegenden Dissertation danken.

Frau Elena Gurevich möchte ich danken für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit während ihrer Diplomarbeit, die ich mit betreuen durfte. Auch hat sie mir immer wieder bei vielen Messungen unter die Arme gegriffen und mitgeholfen, die SDS-Page-Methoden zu entwickeln.

Frau Dr. Vera Siegmund und Frau Cornelia Köck möchte ich für die sehr große Hilfe und Unterstützung bei der Verwaltung und dem Management unseres EU Projektes „RedCat“, sowie für die sehr lockere und entspannte Arbeitsatmosphäre danken. Macht weiter so, ohne Euch wären die Projekte sicher nicht in dieser Form zustande gekommen!

Bei meinen studentischen Wahlpflichtpraktikanten Marc Bayer, Nicole Sternjacob, Elena Gurevich, Sarah Giepen, Carmen Schon und Maria Gik möchte ich mich für die produktive und freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Einen großen Dank möchte ich auch Herrn Lothar Jager und Herrn Dr. Stefan Böttcher aussprechen, die mich immer dann unterstützt haben, wenn ich mit Problemen aller Art zu ihnen kam.

Weiter möchte ich mich auch bei Herrn Dr. med. Georg Prinz und seiner ganzen Familie bedanken. Herr Dr. Prinz hatte mir durch Mitarbeit in seiner Augenarztpraxis die Möglichkeit gegeben, während meiner Doktorarbeit Einblicke in eine für mich fremde Materie zu erlangen und mein unterdurchschnittliches Grundgehalt aufzustocken. Auch für seine Kritik beim Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich bedanken.

Schließlich möchte ich mich ausdrücklich und von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken, allen voran bei meinen Eltern Hans-Werner und Renate, sowie meinem Bruder Markus und seiner Verlobten Judith, die mich über all die Jahre unterstützt und gefördert haben.

Meiner Verlobten (und baldigen Ehefrau) Nicole, die mich selbstlos unterstützt und mir großes Verständnis entgegen bringt, auch wenn sie des öfteren hinter meiner Arbeit zurückstecken musste, gilt der größte Dank.

Zusammenfassung

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Erforschung und Entwicklung neuer innovativer, ökonomischer und ökologischer Reinigungsmethoden, auf Basis elektrochemischer Verfahren, für Dialyseapparaturen der Firma Fresenius Medical Care. Die Dialyse spielt eine immer größere Rolle bei der Behandlung von Patienten mit Nierenversagen oder chronischen Nierenschäden. Damit nimmt auch die Bedeutung der Entwicklung und Vermarktung von kostengünstigen Reinigungsmethoden für die verwendeten Dialyseapparaturen einen immer höheren Stellenwert ein. Selbst kleinste Einsparungen können hier zu deutlichen Kostensenkungen führen und diese Behandlungsmethode daher auch für Krankenkassen und Patienten erschwinglicher machen.

Die hier vorliegende Arbeit beinhaltet die chemischen und biologischen Grundlagen zur Entwicklung einer Reinigungsmethode auf Basis elektrochemischer Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und deren Anwendung im biologischen System. Des Weiteren werden chemische „Sauerstofflieferanten“ zur Verstärkung der Bildung von ROS vorgestellt und elektrochemisch untersucht.

Ein zweiter Abschnitt dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Erforschung und Entwicklung von neuen Wirkstoffen gegen Oxidativen Stress (OS) auf Basis chinon- und chalkogenhaltiger Derivate und der elektrochemischen Untersuchung von Redoxkatalysatoren gegen oxidativ gestresste Zellen.

Schwefelhaltige Naturstoffderivate auf Grundlage des Allicins wurden auf ihre Verwendung als „grüne“ Pestizide oder als potentielle Krebswirkstoffe hin analysiert und charakterisiert.

Abstract

The objective of this thesis was the research and development of an innovative, economically and environmentally friendly method for cleaning the dialysis equipment of the Fresenius Medical Care Company. Dialysis plays an increasingly important role in the treatment of patients with renal failure or chronic kidney damage. Therefore, the importance of development and commercialisation of new cost-effective cleaning methods in dialysis will also increase. Even the smallest savings can lead to significant cost reductions and this could therefore make this treatment more affordable for patients and for the health insurance funds.

The present work involves the chemical and biological basis for the development of a purification method based on the electrochemical generation of reactive oxygen species (ROS) and their application in the biological system. Also presented and electrochemically investigated are chemical "oxygen suppliers" to strengthen the generation of ROS.

A second section of this paper deals with the research and development of new drugs against oxidative stress (OS) (quinone-based derivatives) and the electrochemical study of redox catalysts against oxidatively stressed cells.

Sulfur-containing natural derivatives based on the allicin were investigated for their use as "green" pesticides or as potential cancer drugs.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AE	<u>A</u> rbeits <u>e</u> lektrode
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
As	Amperesekunde
BSA	Rinderserumalbumin (Albumin bovine, engl. <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin)
C	Coulomb
ca.	circa
Ca(OCl) ₂	Calciumhypochlorid
CAT	Gen-Name, Katalasen
CGME	Quecksilbertropfelektrode mit kontrollierbarer Tropfengröße (engl. <u>C</u> ontrolled <u>G</u> rowth <u>M</u> ercury <u>E</u> lectrode)
CO	Kohlenstoffmonoxid
const	Konstant
CV	Zyklische Voltammetrie (engl. <u>C</u> yclic <u>V</u> oltammetry)
d.h.	das heißt
DME	Quecksilbertropfelektrode (engl. <u>D</u> ropping <u>M</u> ercury <u>E</u> lectrode)
DMF	<i>N,N</i> - <u>D</u> imethylformamid
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNS, DNA	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleinsäure
DPP	Differentiale Puls Polarographie
Dr.	Doktor
elektr.	elektrisch
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fig.	Figur
FMC	Fresenius Medical Care
GE	<u>G</u> egenelektrode
GPx	<u>G</u> lutathion- <u>P</u> eroxidase
GSH	Glutathion (L-γ-Glutamyl-L-Cystein)
GSSG	Glutathiondisulfid
h	Stunde
H ₂ -DCF-DA	Dichlorodihydrofluorescein-diacetat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HIT	<u>H</u> eparin- <u>i</u> nduzierte <u>T</u> hrombozytopenie
HNO ₃	Salpetersäure
HMDE	Hängende Quecksilbertropfelektrode (engl. <i><u>H</u>anging <u>M</u>ercury <u>D</u>rop <u>E</u>lectrode</i>)
IUPAC	<u>I</u> nternational <u>U</u> nion of <u>P</u> ure and <u>A</u> ppplied <u>C</u> hemistry
Jun. Prof.	Junior Professor
M	Molar
mbar	Millibar
μA	Mikroampere
mA	Milliampere
Min	Minute
Milli-Q	Vollentsalztes Wasser
mV/S	Einheit der Potentialvorschubgeschwindigkeit (Millivolt pro Sekunde)
MW	Molmasse (engl. <i><u>M</u>olecular <u>W</u>eight</i>)
nA	Nanoampere
NADP	<u>N</u> icotinsäureamid- <u>A</u> denin- <u>D</u> inukleotid- <u>P</u> hospat (Koenzym)
NaOCl	Natriumhypochlorid (Trivialname Eau de Javel)
nm	Nanometer
NMR	Kern(spin)resonanz (engl. <i><u>N</u>uclear <u>M</u>agnetic <u>R</u>esonance</i>)
Nr.	Nummer
OP-Bestecke	Operations-Bestecke
OS	<u>O</u> xidativer <u>S</u> tress
ppm	Teile pro einer Million Teile (10 ⁶ , engl. <i><u>p</u>arts <u>p</u>er <u>m</u>illion</i>)
ppb	Teile pro einer Milliarde Teile (10 ⁹ , engl. <i><u>p</u>arts <u>p</u>er <u>b</u>illion</i>)
ppt	Teile pro einer Billion Teile (10 ¹² engl. <i><u>p</u>arts <u>p</u>er <u>t</u>rillion</i>)
Prx	<u>P</u> eroxiredoxine
PSE	<u>P</u> eriodensystem der <u>E</u> lemente
RE	<u>R</u> eferenz <u>e</u> lektrode
Rkt.	Reaktion
RNAsen	Ribonukleasen
RNS	Reaktive Stickstoffspezies (engl. <i><u>R</u>eactive <u>N</u>itrogen <u>S</u>pecies</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i><u>R</u>eactive <u>O</u>xygen <u>S</u>pecies</i>)

RSS	Reaktive Schwefelspezies (engl. <u>R</u> eactive <u>S</u> ulfur <u>S</u> pecies)
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate <u>p</u> oly <u>a</u> crylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis)
s.o.	siehe oben
SOD	<u>S</u> uperoxid- <u>D</u> ismutase
sog.	sogenannten
SSE	Standard-Silber-Elektrode (engl. <u>s</u> tandard <u>s</u> ilver <u>e</u> lectrode)
Tab.	Tabelle
TB	Zeitbasierende Voltammetrie Techniken (engl. <u>T</u> ime <u>B</u> ased <u>T</u> echniques)
TEMED	<u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
THF	Tetrahydrofuran
TOC	Gesamter organisch gebundener Kohlenstoff (engl. <u>T</u> otal <u>O</u> rganic <u>C</u> arbon)
usw.	und so weiter
UV-Vis	Ultraviolette (UV) und sichtbare Wellenlängen (engl. <u>V</u> isible)
z. B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung und Zielsetzung	4
1.1 Nierenerkrankungen und Dialyse	5
1.2 Überblick Reinigungsmethoden von Dialysemaschinen	11
1.3 Elektrochemische Methoden	14
1.4 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies.....	17
2. Ergebnisse und Diskussion	25
2.1 Ergebnisse zur Erzeugung von ROS mithilfe der Elektrochemie ..	29
2.1.1 Elektrochemische Voruntersuchungen mit Ferrocen.....	29
2.1.2 Elektrochemische Erzeugung von ROS in Wasser	34
2.1.3 ROS Erzeugung im wässrigen Medium	43
2.1.4 Erzeugung von ROS in Reinigungslösungen für Dialysegeräte	50
2.1.5 Erzeugung von ROS mithilfe von chemischen Sauerstofflieferanten	69
2.2 Biologische Aktivität von ROS	79
2.2.1 Behandlung von Proteinen mit ROS	88
2.2.1.1 Elektrochemische Untersuchung von Hämoglobin.....	88
2.2.1.2 Elektrochemische Untersuchungen von Myoglobin.....	97

2.2.1.3 Elektrochemische Untersuchungen von Cytochrom c.....	104
2.3 UV/Vis-Spektrophotometrische Untersuchungen.....	109
2.3.1 UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung des Hämoglobins.....	110
2.3.2 UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung des Myoglobins.....	116
2.3.3 UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung des Cytochrom c.....	120
2.4 Einfluss von Superoxid-Dismutase und Katalase	122
2.5 Analyse der Proteine mit SDS-PAGE	129
2.6 Einfluss von ROS auf E.Coli	132
2.7 Zyklovoltammetrische Untersuchung chalkogenhaltiger Syntheseprodukte	138
2.7.1 Chalkogenhaltige 1,4-Naphthochinon-Derivate.....	140
2.7.1.1 Verwendete Edukte.....	144
2.7.1.2 Selenhaltige 1,4-Naphthochinon-Derivate.....	152
2.7.1.3 Tellurhaltige 1,4-Naphthochinon-Derivate.....	165
2.7.2 Schwefelhaltige Naturstoffderivate.....	173
2.7.2.1 Diallyl-Analoga des Allicins	176
2.7.2.2 Dipropyl-Analoga des Allicins.....	183
3. Experimenteller Teil	188
3.1 Allgemeiner Aufbau der elektrochemischen Messanordnung	188
3.2 Verwendete elektrochemische Methoden.....	190
3.2.1 Zyklovoltammetrie (Cyclic Voltammetry, CV)	190

3.2.2 Differentielle Pulspolarographie und Pulsvoltammetrie (DPP, Differential-Puls-Polarography)	195
3.2.3 Time Based Techniques (TB).....	197
3.3 UV/Vis-Spektrophotometrie	198
3.4 SDS-PAGE.....	202
3.5 Nematoden-Assay	209
4. Zusammenfassung und Ausblick	212
5. Literaturverzeichnis	215
6. Abbildungsverzeichnis	221
7. Auflistung der verwendeten Geräte und Chemikalien .	234
8. Eigene Publikationen	239
9. Curriculum Vitae	242

1. Einleitung und Zielsetzung

Ein Hauptziel der hier vorliegenden Arbeit war es, eine neue Methode zur Reinigung von Dialysemaschinen auf der Grundlage elektrochemischer Prinzipien zu entwickeln, die die bisherigen Reinigungsmethoden auf Basis von umweltgefährdenden Chemikalien ablösen soll. Als Vorlage hierfür dienten die wissenschaftlichen Forschungsergebnisse, die von Herrn Junior-Professor Dr. Claus Jacob und seinem Team in England bis 2005 durchgeführt worden sind. Herr Prof. Jacob und seine Mitarbeiter hatten bereits zuvor gezeigt, dass es möglich ist, metallische Operationsbestecke aus Krankenhäusern mithilfe schwacher Ströme und unter Verwendung von reaktiven Sauerstoffverbindungen so zu reinigen, dass die Oberfläche nicht angegriffen wird und trotzdem ein vergleichbarer Effekt zu konventionellen Reinigungsmethoden besteht. In Anlehnung an die Forschungsergebnisse von Herrn Prof. Jacob soll in dieser Arbeit aufgezeigt werden, dass auch nichtmetallische Elektroden zur Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) dienen können und dass auch biologische Materialien und Oberflächen aufgereinigt werden können, die in keinerlei Kontakt zu metallischen Oberflächen stehen (biologische Elektrochemie).

Während die elektrochemischen Methoden hierbei vor allem zu synthetischen Zwecken eingesetzt wurden (Erzeugung von ROS), ist im zweiten Teil der Arbeit vor allem der analytische Aspekt der Elektrochemie angewendet worden.

Dieser zweite große Teilbereich der hier vorliegenden Arbeit beschreibt die elektrochemische Analyse und Charakterisierung der von unserer Arbeitsgruppe synthetisierten Produkte. Dabei handelt es sich um schwefelhaltige Verbindungen, die auf Grundlage von Naturprodukten synthetisiert wurden, sowie um Produkte, die ein oder mehrere Redoxzentren, sowie Selen oder Tellur enthalten. Die biologische Verwertbarkeit spielt bei diesen Syntheseprodukten eine sehr wichtige Rolle, da sie im Bereich der Krebsforschung bzw. in dem Bereich der grünen Pestizide eingesetzt werden sollen. Um erste Aussagen zur biologischen Aktivität treffen zu können, wurden die Substanzen zykovoltammetrisch untersucht und ihre Redoxpotentiale ermittelt. Ausgehend von diesen Untersuchungen wurde dann über eine weitere Verwendung in Krebszelllinien und in Nematodenassays entschieden.

1.1 Nierenerkrankungen und Dialyse

Gerade in unserer heutigen Zeit nehmen Krankheiten, wie z. B. Nierenversagen, Bluthochdruck (Hypertonie) und Zuckerkrankheit (Diabetes mellitus), einen immer größeren Stellenwert im Gesundheitswesen ein. Vor allem in den sogenannten Industrieländern können fehlerhafte Ernährung (zu viel Fett, Zucker, aber auch chemische Zusatzstoffe, wie z. B. Geschmacksverstärker, Säuerungsmittel), Bewegungsmangel oder die längerfristige Einnahme bestimmter Medikamente zu starken, lebensbedrohlichen und irreparablen Nierenschäden führen.

Die Nieren tragen essenziell zur Gesunderhaltung und Funktion des menschlichen Organismus bei. Sie bilden Urin, der über die Harnwege ausgeschieden wird, und regulieren den Säure-Base-Haushalt. Dadurch verhindern sie eine zu starke Übersäuerung des Blutes (Azidose, pH-Wert unterhalb von 7,35). Bestandteile des Urins sind neben überschüssigem Körperwasser vor allem auch Schlackengifte aus dem Stoffwechsel, die über die Nieren wie durch einen Filter entsorgt werden. Auch der Blutdruck wird durch die Bildung von Botenstoffen (Hormone) in den Nieren reguliert. Das Hormon Erythropoietin, welches in der Niere gebildet wird, steuert die Produktion von roten Blutkörperchen im Knochenmark. Des Weiteren wird auch der Mineralhaushalt sowie die Bildung von Vitamin D, welches im Körper zur Stärkung und Aufrechterhaltung der Knochenstruktur verwendet wird, durch die Nieren beeinflusst.^[1,2]

Somit zeigt sich, dass die Nieren großen Einfluss auf den gesamten Organismus haben und dass bei Störung oder Ausfall der Nieren massive bis lebensbedrohliche Probleme auftreten können. Dies mag möglicherweise mit ein Grund sein, warum die Natur den Menschen im Laufe der Evolution mit zwei Nieren ausgestattet hat (Risikominimierung bei Ausfall eines der beiden Organe), die paarweise angeordnet sind und bei einem Erwachsenen im Durchschnitt jeweils etwa 160 Gramm wiegen.^[1]

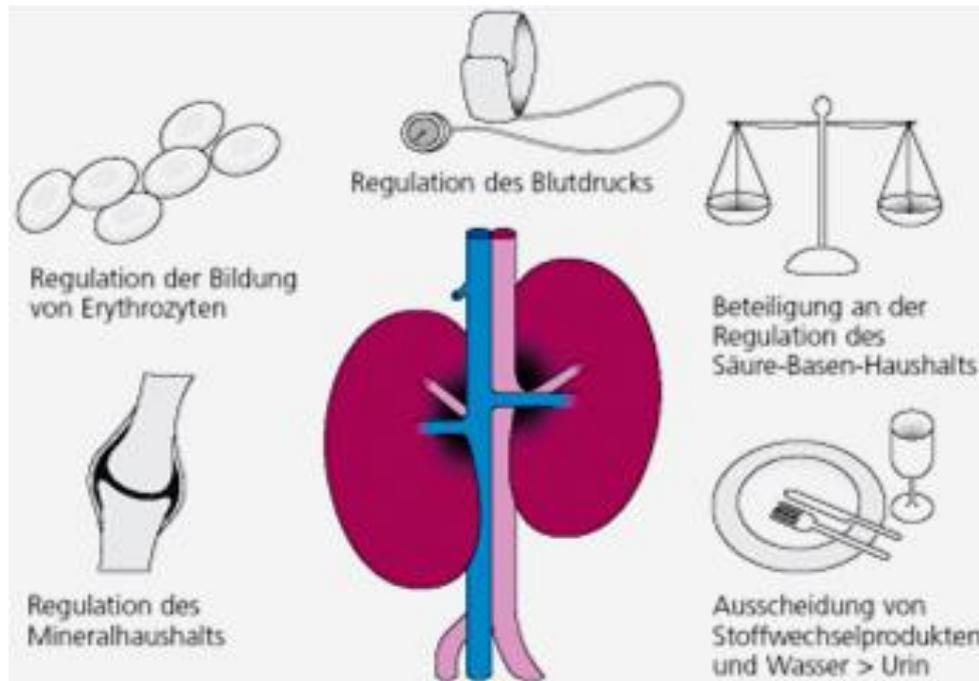


Abbildung 1: Aufgaben der Nieren^[1]

Filtern die Nieren z. B. nicht mehr genügend Schadstoffe aus dem Körper heraus, so können sich diese Stoffe im Blut ansammeln und andere Organe angreifen und vergiften. Dies kann dann zu erheblichen Störungen des Magen-Darm-Traktes, zu Magenblutungen, Herzbeutelentzündungen oder Herzrhythmusstörungen führen. Blutarmut, Entkalkung der Knochen, renale Osteodystrophie (Sammelbezeichnung für alle durch chronische Niereninsuffizienz assoziierten auftretenden Skelettsymptome und Störungen des Mineralstoffwechsels) oder Überwässerung des Körpers durch gestörte Urinausscheidung sind weitere Zeichen eines fortgeschrittenen Nierenversagens.^[2,3]

Sobald eine Schädigung der Nieren vorliegt, können sie ihre Arbeit nicht mehr vollständig verrichten, und somit müssen spezielle Behandlungsmethoden eingesetzt werden, um den Körper vor den o.g. Folgeschäden zu schützen. Die beste Methode, Nierenerkrankungen zu behandeln, ist der Ersatz der funktionsgestörten oder funktionsunfähigen Niere durch eine Spenderniere. Da es weltweit jedoch nicht genügend Spendernieren gibt, bedeutet dies für die Patienten generell sehr lange Wartezeiten, bis sie überhaupt auch nur die Chance haben, ein Spenderorgan zu bekommen.

Durch die fehlenden ausreichenden Mengen an Spendernieren kommt dem Einsatz „künstlicher Nieren“ (Filter zur Blutwäsche) immer größere Bedeutung zu. Das Behandlungsverfahren der „künstlichen Niere“ (engl. *artificial kidney*) nennt man Dialyse. Unterschieden wird zwischen der Hämodialyse (Blutwäsche über einen Filter außerhalb des Körpers) und der Peritonealdialyse (Blutwäsche über das Bauchfell (Peritoneum)).^[1,4,5]

Das Bauchfell, welches die Wände der Bauchhöhle und die inneren Organe überzieht, besitzt ähnliche Eigenschaften und Poren, wie ein externer Filter, der bei der Hämodialyse Verwendung findet. Über einen Katheder in der Bauchdecke wird eine Dialysierlösung in die Bauchhöhle eingebracht. Giftstoffe, die sich in den Blutgefäßen in der Bauchdecke befinden, werden in diese Lösung abgegeben. Durch Einsatz von Traubenzucker kann zusätzlich Körperwasser in die Dialysierlösung „hineingesaugt“ werden. Nach 3-8 Stunden wird dann über den Katheder die verbrauchte Dialysierlösung wieder aus der Bauchhöhle entfernt.^[6,7]

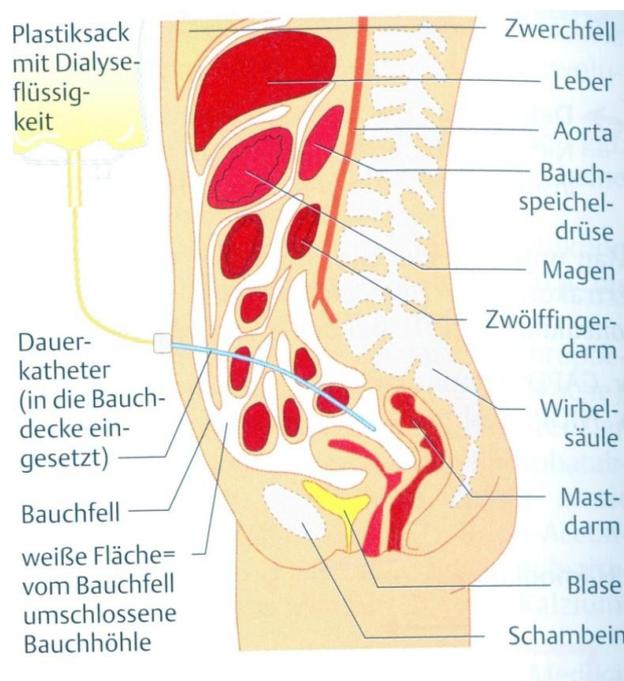


Abbildung 2: Schema Peritonealdialyse^[8]

Die Hämodialyse erfolgt über einen Filter, durch den das Blut des Patienten gepumpt und danach wieder in den Patienten zurückgeführt wird. Der Filter trennt die lebenswichtigen Bestandteile des Blutes, wie z. B. Eiweißstoffe von den Giftstoffen.

Auch überschüssiges Körperwasser kann so über die Poren des Filters von den restlichen Bestandteilen des Blutes getrennt und entsorgt werden. Blutpumpen steuern dabei exakt die Durchflussmengen. Damit das Blut nicht während der Behandlung außerhalb des Körpers gerinnt, werden gerinnungshemmende Medikamente, wie z. B. Heparin, verabreicht. Dadurch können jedoch weitere Probleme für den Patienten auftreten, wie z. B. übermäßige Blutungsneigung, erhöhtes Plasmakalium, Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT, durch Heparin hervorgerufener Blutplättchenmangel) und allergische Reaktionen.^[9]

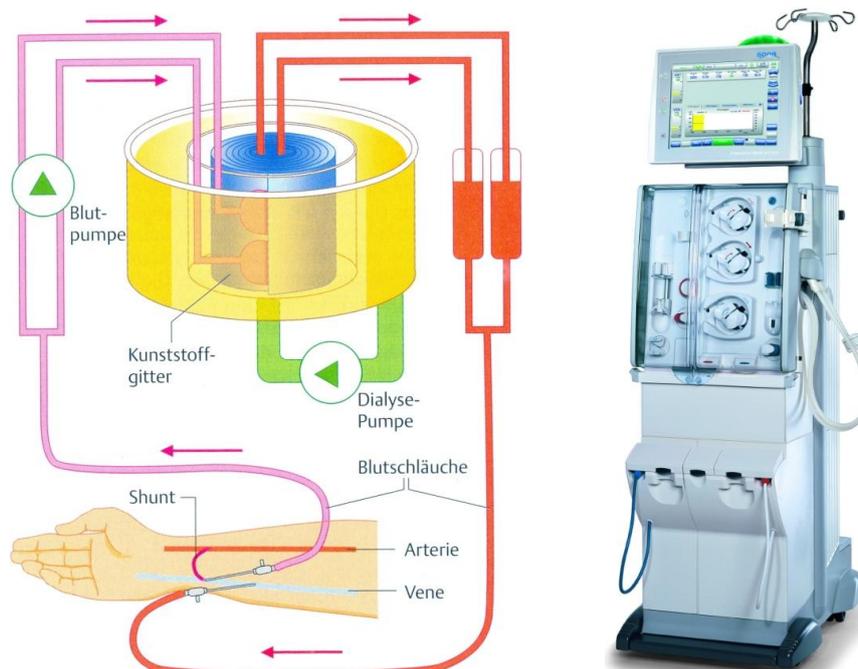


Abbildung 3: Schema Hämodialyse^[8] (links) und Hämodialysegerät 5008 der Fresenius Medical Care (FMC)^[10] (rechts)

Die Dialysebehandlung erfolgt drei- bis fünfmal wöchentlich in einem dafür vorgesehenen Dialysezentrum oder beim Patienten zuhause. Jede Behandlung dauert zwischen vier bis fünf Stunden, welches einen erheblichen Einschnitt in die Lebensqualität und den Tagesablauf eines Patienten bedeutet.^[1]

Der Reinigung der verwendeten Geräte kommt dabei ebenfalls große Bedeutung zu, da diese auch im Hausgebrauch durchgeführt werden soll und damit möglichst einfach und kostenneutral, d.h. ohne Einsatz teurer Chemikalien oder Gerätschaften, ablaufen sollte.

Zusammen mit der Firma Fresenius Medical Care (FMC), dem weltweit führenden Anbieter für Produkte und Dienstleistungen für Dialysepatienten, soll innerhalb meines Projektes die Grundlagenforschung für neue Methoden der Reinigung der Dialysemaschinen, bzw. der Zubehörteile, wie z. B. der Schläuche, Filter oder Ventile, ohne Einsatz aggressiver und umweltschädlicher Chemikalien schnell, effizient und kostengünstig ermöglicht werden.

Momentan ist die Reinigung der Maschinen für einen nicht unerheblichen Teil der laufenden Kosten verantwortlich, die Jahr für Jahr bei der Dialyse anfallen. Bei über 184.000 Patienten der Firma Fresenius im Jahr 2008 (eigene Angaben der Firma Fresenius, veröffentlicht auf der firmeneigenen Homepage)^[10], die mehrmals wöchentlich zur Dialyse müssen, ist es verständlich, dass selbst durch kleinste Einsparungen an Zeit oder Geld bei der Reinigung der Geräte, die nach jeder Anwendung durchgeführt werden muss, ein großer Effekt zur Effizienzsteigerung im Finanz- oder Zeitmanagement erzielt wird. Auch die umweltspezifischen Probleme, die bei dem bisherigen großen Einsatz an Chemikalien, wie z. B. Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder Bakteriozide und Fungizide, bestehen, sollen hier nicht vernachlässigt werden (z. B. Abwasserentsorgung, Lagerung).

Diese Arbeit versucht eine Möglichkeit darzustellen, wie eine neue Reinigungsmethode aussehen könnte, die ohne den Einsatz von aggressiven und umweltgefährdenden Chemikalien auskommt und die auf dem Einsatz von Sauerstoff, einem Leitsalz und Wasser basiert. Mithilfe elektrochemischer Prozesse soll eine Methodik entwickelt werden, die die gleichen Effekte erzielt, wie der Einsatz konventioneller Chemikalien. Nähere Erläuterungen zu dieser Methodik werden in Abschnitt 1.2 Überblick Reinigungsmethoden von Dialyse“, besprochen.

Basierend auf den Forschungsergebnissen von Professor Jacob und seiner Mitarbeiter zeigt diese Arbeit die Anwendung der elektrochemischen Dekontaminationsmethoden auf biologische Materialien, wie z. B. Proteine und auf Oberflächen, die nicht elektrisch leitend sind und nicht aus Metall bestehen. Ein Großteil der Oberflächen, die mit den Dialyselösungen in Kontakt kommen, bestehen aus Kunststoffen (Schläuche), die ganz andere Voraussetzungen und chemische Eigenschaften zeigen als die OP-Bestecke aus Stahl.

Außerdem sind die Materialzusammensetzungen der Dialysemaschinen deutlich komplizierter als bei einfachen Operationsbestecken. Statt Edelstahl und Hartplastik (z. B. für die Griffe der OP-Bestecke) kommen in Dialysemaschinen verschiedene Polymere als Schlauchmaterial, Titanlegierungen und verschiedene Stähle als Materialien für Düsen und Ventile sowie die Filtermaterialien zum Einsatz. Durch diesen Materialmix ist es sehr schwierig, eine geeignete Reinigungsmethode zu finden, die in allen Bereichen die Vorgaben erfüllt und eine gründliche und hygienische Reinigung ermöglicht.

Allerdings liegt gerade in diesen sehr umfangreichen Vorgaben auch ein gewisser Reiz, die vorhandenen Probleme mithilfe interdisziplinärer Methoden und Ideen, sowie durch Findung neuer Wege und Methoden zu umgehen.

1.2 Überblick Reinigungsmethoden von Dialysemaschinen

Die Reinigung von Dialysemaschinen erforderte bisher den massiven Einsatz von Chemikalien und Wasser. Die hier vorliegende Arbeit befasst sich insbesondere mit der Reinigung von Maschinen und Bauteilen zur hämodialytischen Anwendung, da diese auch als Grundlage für meine Arbeit dienen.

Nach jeder Anwendung am Patienten müssen alle verwendeten Teile, die mit dem Blut des Patienten oder der Dialysierlösung in Kontakt gekommen sind, sterilisiert werden, um das Wachstum von Biofilmen, Bakterien, Viren und Pilzen, sowie die Verbreitung von Krankheitserregern auszuschließen.

Unter dem Begriff „Biofilm“ versteht man dabei das Einwirken von Bakterien auf eine Oberfläche, unter Bildung einer „schleimigen“ Schicht, unter der weitere metabolische Prozesse ablaufen können. Dies führt zu einem stetigen Wachstum der Bakterienanzahl und zu einer Ausbreitung des Biofilms. Die Biofilmoberflächen können so stabil sein, dass sie von Chemikalien nur noch teilweise angegriffen und vernichtet werden können. Dadurch resultiert eine sehr große Gefahr, dass die Geräte nicht mehr vollständig dekontaminiert und sterilisiert werden können.^[11-14]

Die Analyse und Kontrolle der Gerätschaften und Materialien, die am Patienten eingesetzt werden, ist daher von essenzieller Bedeutung, da die Bildung von Biofilmen größte Gesundheitsgefahren für den Menschen beinhaltet. Als analytische Methoden kommen hierbei vor allem die Mikroskopie und - zur quantitativen Auswertung - die Züchtung von Bakterienkulturen auf Nährstoffplatten zum Einsatz. Die analytischen Studien belegen dabei, dass vor allem die Silikonschläuche von Biofilmen befallen werden, insbesondere im Bereich des Wasseranschlusses an der Dialysemaschine.^[15,16]

Durch ihre sehr großen Oberflächen sind auch die Wasserfilter sehr stark anfällig für die Ablagerung von Bakterien und die Bildung von Biofilmen. Es ist daher absolut notwendig, nur Wasser und Dialysierlösungen einzusetzen, welche im Vorfeld aufgereinigt wurden (Verwendung von hochreinem Wasser).

Manche Bakterien oder deren Fragmente (z. B. die sog. Endotoxine), die sich im Wasser befinden könnten, sind in der Lage, die Dialysemembranen zu durchdringen und schwere Entzündungen im Patienten hervorzurufen. Gerade solche „Vergiftungen“ mit Bakterien und Biofilmen haben die Sterblichkeitsrate von Dialysepatienten in der Vergangenheit deutlich bestimmt.^[17-21]

Die Reinigung der Dialysegeräte und aller zum Einsatz kommender Materialien ist daher essenziell für eine erfolgreiche Behandlung des Patienten. Verschiedene Reinigungsmethoden und Chemikalien wurden in der Vergangenheit auf ihre Wirksamkeit gegen Bakterien, Biofilme und andere Mikroorganismen hin untersucht.

Ein wichtiger Ansatz für meine eigenen Arbeiten, war die Ermittlung der Reinigungsleistung von Ozon, einem sehr reaktionsfähigen Gas aus drei Sauerstoffatomen (O₃), gegen Biofilme und Bakterien.

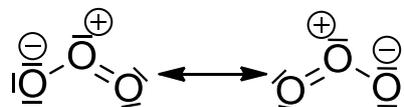


Abbildung 4: Mesomere Grenzstruktur von Ozon

Die Ergebnisse waren zufriedenstellend, jedoch bestand der große Nachteil des Ozons darin, dass es lange Zeit braucht, bis es in der wässrigen Lösung wieder abgebaut wird. Der Patient darf wegen der gesundheitsschädlichen Wirkung des Ozons aber nicht damit in Kontakt kommen. Ein technischer Einsatz von Ozon kommt daher bisher nicht infrage, da die Dialyseanlagen zu lange ruhen müssen, bis sie wieder für den Einsatz am Patienten nutzbar sind.^[22]

Generell zeigen aber die Testergebnisse, dass reaktive Sauerstoffspezies tatsächlich in der Lage sind, Bakterien und Biofilme zu zerstören.

Schläuche außerhalb des Gerätes sind in der Regel Einwegware und können ersetzt werden. Das Geräteinnere ist jedoch zu aufwendig konstruiert und zu vielfältig gestaltet, als dass es möglich wäre, hier in allen Fällen Einwegartikel zum Einsatz zu bringen und diese dann auch nach jeder Anwendung zu entfernen. Als Materialien kommen hier verschiedene Metalle wie z. B. Edelstähle, Kunststoffe für die Schläuche und Gummi für Dichtungen zum Einsatz. Durch diesen Materialmix ist es sehr schwer, geeignete Reinigungsmethoden zu finden, die in der Lage sind, alle Keime und Krankheitserreger sowie Verunreinigungen durch Kalk oder die verwendeten Dialysierlösungen zu entfernen und gleichzeitig die vorhandenen Materialien nicht anzugreifen.

Bisher wurden die Geräte der Fresenius Medical Care in verschiedenen, voneinander unabhängiger Schritten und mit verschiedenen Chemikalien, wie z. B. H_2O_2 und Zitronensäure ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), nach einem genauen Reinigungsplan gesäubert. Einige Reinigungsmittel wurden dabei nach jedem Patienten verwendet, wie z. B. Citrosteril[®] (enthält u.a. Zitronensäure, Milchsäure und Apfelsäure), andere nur einmal pro Woche (Sporotal[®] 100; enthält u.a. Natriumhypochlorid, Kaliumhydroxid und Substanzen zur Verhinderung von Korrosion). Dies erfordert jedoch nicht nur einen erheblichen zeitlichen Aufwand, in dem die Geräte nicht zur Anwendung zur Verfügung stehen, sondern führt auch zu hohen Lagerkosten für die verwendeten Reinigungsmittel. Eine einzige Reinigung einer Hämodialyseeinheit erfordert den Einsatz von ca. 16 Liter Wasser (Angaben der Firma Fresenius) und diverser Chemikalien, wie z. B. Citrosteril[®] zum Entkalken und desinfizieren.^[23]

Ebenso ist der nötige Energieverbrauch erheblich, da viele Reinigungsmittel eine erhöhte Temperatur von ca. 75 °C (z. B. beim Einsatz von Citrosteril[®]) oder sogar bis 84 °C (beim Einsatz von Diasteril[®]) benötigen, um die gewünschten Effekte in möglichst kurzer Zeit zu erzielen.^[24,25] Trotz der erhöhten Temperatur liegen solche Reinigungsschritte jedoch bei einer Zeit von ca. 10 Minuten ab Erreichen der benötigten Temperatur. Da jedoch auch das Aufheizen und das Abkühlen der Geräte einige Zeit in Anspruch nimmt, gehen den Krankenhäusern und Firmen dadurch sehr viele mögliche Anwendungen am Patienten verloren. Dies bedeutet dann vor allem einen finanziellen Verlust für diese Institutionen und längere Wartezeiten für den Patienten.

1.3 Elektrochemische Methoden

Unter dem Begriff „Voltammetrie“ (Wortschöpfung aus den Begriffen Volt und Amperometrie) fasst man eine Anzahl von Analysemethoden zusammen, bei denen in einer Elektrolysezelle eine Strom-Spannungskurve unter bestimmten experimentellen Bedingungen, wie z. B. einer Dreielektrodenanordnung (zur Kompensierung des hohen Ohmschen Zellwiderstandes), ermittelt wird.^[26] Bei der Dreielektrodenanordnung kommen eine Arbeitselektrode (AE), eine Referenzelektrode (RE) und eine Gegenelektrode (GE) zum Einsatz. Dabei wird das Potential der AE linear mit der Zeit verändert, während das Potential der RE konstant gehalten wird. Die GE dient lediglich dazu, den Strom von der Spannungsquelle durch die Lösung zur AE zu leiten.^[27,28]

Die Voltammetrie basiert auf der Messung eines Stromes in einer elektrochemischen Zelle bei vollständiger Konzentrationspolarisation. Um eine möglichst hohe Polarisation der AE zu erzielen, verwendet man in der Regel Elektroden mit nur wenigen Quadratmillimetern oder sogar Quadratmikrometern Oberfläche. Je kleiner die verwendete Oberfläche hierbei ist, desto größer ist die auftretende Polarisation. Es werden Gleichstrom- und Wechselstromverfahren und die sogenannten „Stripping Methoden“ unterschieden.

Mathematische Grundlagen dieser Methoden bilden das ohmsche Gesetz für die Coulombkraft sowie das 1. und 2. Faradaysche Gesetz:

$$K = \frac{q_1 \cdot q_2}{\epsilon \cdot r^2}$$

Abbildung 5: Ohmsches Gesetz (K= elektrostatische Anziehungskraft; r= Abstand der Ladungen q_1 und q_2 ; ϵ = Dielektrizitätskonstante)

Ordnet man den Ionen die jeweilige elektrische Ladung $\pm z \cdot e_0$ zu und beachtet, dass der Elektronenfluss i_e im äußeren Stromkreis gleich dem Ionenfluss i_l positiver und negativer Elektronen ist, so muss die an einer Elektrode umgesetzte Masse m eines Stoffes proportional zur zwischen Ionenleiter und Elektronenleiter ausgetauschten Ladungsmenge $Q = i \cdot t$ sein:

$$Q = I \cdot t \quad [C = A \cdot s], \quad m \sim \text{const} \cdot Q$$

Abbildung 6: 1. Faradaysches Gesetz (Ladungsmenge = Strom · Zeit)

Für das Verhältnis der durch gleiche Elektrizitätsmengen abgeschiedenen Massen unterschiedlicher Stoffe gilt:

$$\frac{m_1}{m_2} = \frac{M_1/z_1}{M_2/z_2}$$

Abbildung 7: 2. Faradaysches Gesetz (m = Masse; M = Molare Masse; z = Ionenladung)

Nach dem 2. Faradayschen Gesetz werden verschiedene Stoffe durch gleiche Elektrizitätsmengen im Verhältnis der molaren Massen ihrer Ionen-Äquivalente abgeschieden.^[28]

Den Begriff „Polarographie“ verwendet man bei der Benutzung von Quecksilbertropf-elektroden (DME) als AE in der Voltammetrie. Es handelt sich dabei also um eine spezielle Form der Voltammetrie. Sie wurde von dem tschechoslowakischen Chemiker Jaroslav Heyrovsky in den frühen 20er Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelt.^[27,29]

Nach der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) ist dieser Begriff immer dann anzuwenden, wenn eine Strom- Spannungs- Kurve mit einer flüssigen Arbeitselektrode aufgenommen wird, deren Oberfläche kontinuierlich oder periodisch erneuert werden kann.^[30]

Voltammetrische Analysemethoden gehören auch heute noch zu empfindlichsten (Nachweisgrenzen bis in den ppt Bereich) Standard-Verfahren vor allem für die Anorganische-, Physikalische- oder die Biochemie.

Nichtanalytische Einsatzmöglichkeiten der Voltammetrie sind vor allem grundlegende Untersuchungen von Redoxreaktionen (z. B. Reversibilität) in unterschiedlichen Medien, Adsorptionsprozesse an Oberflächen sowie von Elektronenübergängen und, in manchen Fällen, auch die Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit.

Auch verwendet man heutzutage die Elektrochemie zur Erzeugung und technischen Herstellung von Wasserstoffperoxid. Elektrochemische Methoden finden ebenfalls Verwendung bei der Bleichung von Abwässern von Industrieanlagen, dem Reinigen von Rohrleitungen und komplexeren Rohrsystemen sowie bei der Reinigung von Schiffsrümpfen von Hochseeschiffen. Die meisten der genannten Anwendungen beruhen dabei auf den Auswirkungen von elektrochemisch erzeugten Redox-Prozessen, wie z. B. der Oxidation von NaCl-Lösungen zu Chlor (Cl_2) zum Bleichen von Abwässern oder der Reinigung des Inneren schwer erreichbarer Rohrleitungen.

Auf die in dieser Arbeit von mir verwendeten voltammetrischen und polarographischen Methoden, sowie der verwendeten Elektrodenmaterialien, wird in den entsprechenden Abschnitten im experimentellen Teil näher eingegangen. Dort befinden sich auch detailliertere Angaben zum Aufbau der verwendeten Geräte und elektrochemischen Zellen.

1.4 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies

Ein weiterer wichtiger Teil meiner Arbeit ist die Analyse und Charakterisierung Redox-aktiver Substanzen, die im Arbeitskreis von Prof. Jacob entwickelt wurden. Diese Substanzen sollen eingesetzt werden, um den Oxidativen Stress (OS) innerhalb von humanen, tierischen und pflanzlichen Zellen zu bekämpfen um so zur Gesunderhaltung der Zellen, bzw. des gesamten Organismus beizutragen.

Entsteht ein Ungleichgewicht von Pro- und Antioxidantien innerhalb der Zelle zugunsten der Prooxidantien, so spricht man von OS. Dabei können reaktive Sauerstoffspezies (ROS), reaktive Stickstoffverbindungen (RNS) und reaktive Schwefelspezies (RSS) entstehen.^[31-35]

ROS entstehen dabei hauptsächlich als gesundheitsschädliche Stoffwechselprodukte innerhalb des aeroben Metabolismus.

Sauerstoff, der zu etwa 21 % in der Atmosphäre enthalten ist, besitzt eine außergewöhnliche elektronische Struktur, die die Grundlage für die hohe Reaktionsfähigkeit des Moleküls bildet. Aus Abbildung 8 geht hervor, dass es sich bei elementarem Sauerstoff (Triplett-Sauerstoff) um ein sehr reaktionsfähiges Diradikal handelt. Durch diese elektronische Besonderheit sind Sauerstoff und seine Verbindungen in der Lage an sehr vielen Prozessen im menschlichen Organismus teilzunehmen. Leider sind damit auch Reaktionen verbunden, die dem Organismus großen, teils irreversiblen Schaden zufügen können. Auch die Fähigkeit von Sauerstoff, zumindest kurzzeitig (recht stabile) angeregte Zustände auszubilden, dem sogenannten Singulett-Sauerstoff mit seinen zwei möglichen Anregungszuständen (s. Abbildung 9), hebt die chemische und biologische Bedeutung von Sauerstoff weiter hervor.

Diese Schäden lassen sich jedoch nicht vermeiden oder bewusst steuern, da aerobe Prozesse im humanen Stoffwechselprozess essentielle Aufgaben innehaben. Ohne diese Prozesse könnte menschliches, tierisches oder pflanzliches Leben nicht existieren.

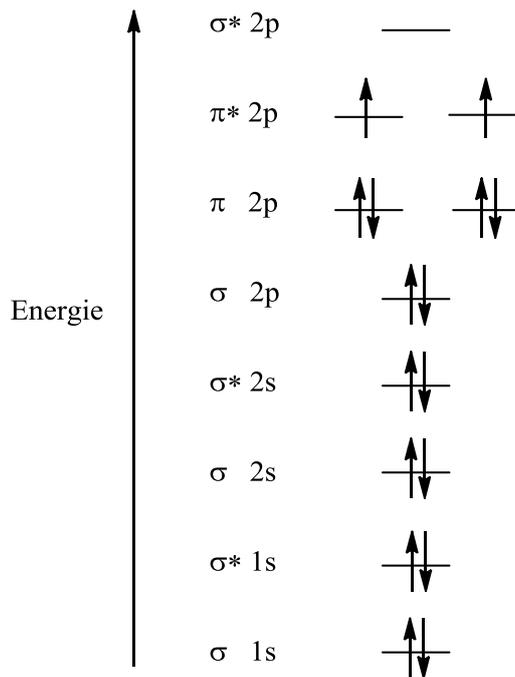


Abbildung 8: Besetzte Orbitale von ${}^3\text{O}_2$ ^[36]

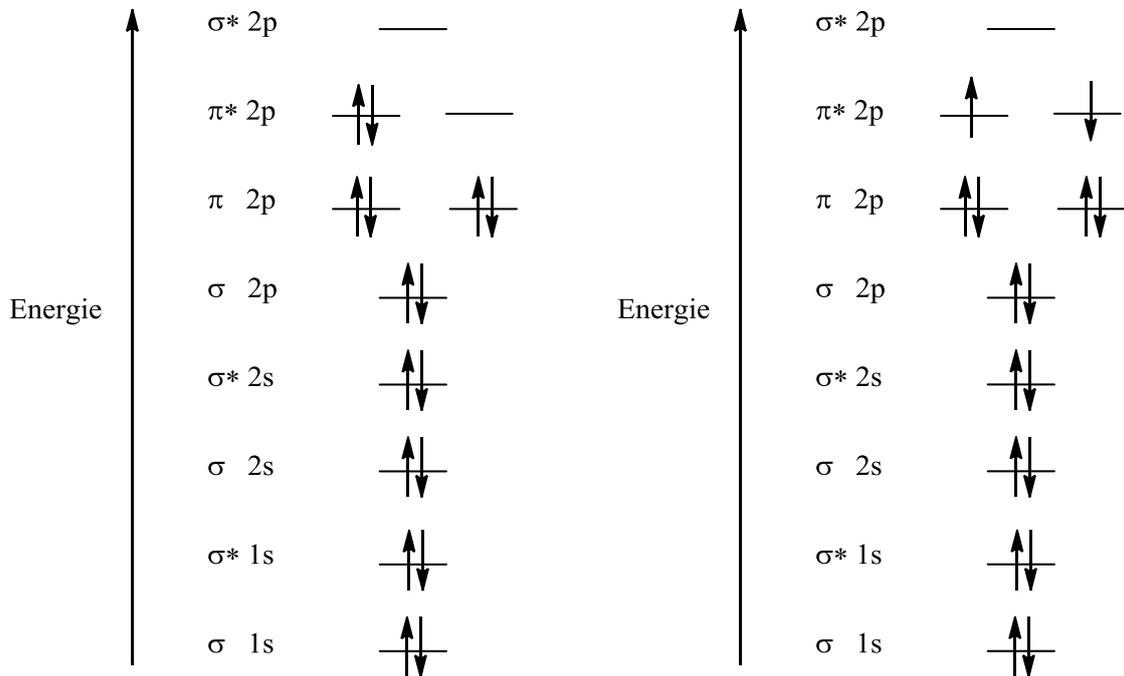


Abbildung 9: Besetzte Orbitale von Singulett-Sauerstoff (angeregte Zustände, sehr kurzlebig, sehr reaktiv)

ROS und das Auftreten von OS in den Zellen und im Gewebe stehen im Verdacht, eine Rolle bei vielen verschiedenen Krankheiten zu spielen, bzw. diese Krankheiten mit auszulösen. Als Beispiele dafür dienen Krebs, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Apoplexie (Schlaganfall) sowie Diabetes mellitus und Rheumatoide Arthritis.^[37-39]

Auch in der modernen Altersforschung, die eine immer größere Rolle in der heutigen Wissenschaft einnimmt (Überalterung der Bevölkerung), spielt OS eine immer größere Rolle. Durch den Rückgang der Antioxidants-Verteidigung auf zellulärer Ebene werden die Effekte von OS mit der Zeit immer deutlicher sichtbar, wie z. B. bei der Hautalterung und der damit verbundenen Erschlaffung der Oberhaut sowie der Bildung von Altersflecken und Falten. Mit dem Alter steigt daher die Konzentration von OS im Gewebe und in den Zellen des Menschen deutlich an.^[40]

Atmet man höhere Sauerstoffkonzentrationen (deutlich über 21 %) über einen längeren Zeitraum ein, so können sich dadurch irreparable Lungenschäden durch vermehrte Entstehung von OS innerhalb der Lungenbläschen bilden.

Dies gilt es bei der Behandlung von Dyspnoe (erschwerete Atemtätigkeit) bzw. Atemnot mit reinem Sauerstoff zu beachten.^[41]

ROS können verstärkt auch durch äußere Umwelteinflüsse gebildet werden. Dabei kommen der Luftverschmutzung, dem Einsatz von Pestiziden, Zigarettenrauch und einigen Medikamenten immer größere Bedeutung zu. Weitere Einflussfaktoren auf die Bildung von ROS sind die Höhenstrahlung, sowie Radioaktivität und UV-Strahlung. Auch erhöhte Konzentrationen von Metallionen innerhalb der Zellen können OS auslösen. Die Bildung von ROS erfolgt nach folgendem einfachen Reaktionsschema^[42]:

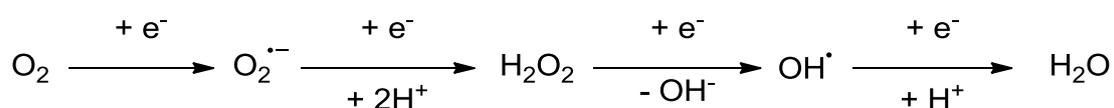


Abbildung 10: Bildung von ROS

Die großtechnische Erzeugung von H_2O_2 , welches oftmals Auslöser von ROS in organischen Zellen ist, kann dabei aber auch direkt über elektrochemische Methoden, wie z. B. durch Elektrolyse, erreicht werden.

Das Hydroxylradikal OH^\cdot kann auch über eine metallionenkatalysierte Reaktion, die sogenannte Fenton-Reaktion (Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt, Ablauf vermutlich über ein Metall- H_2O_2 -Addukt), in der Zelle aus H_2O_2 gebildet werden.

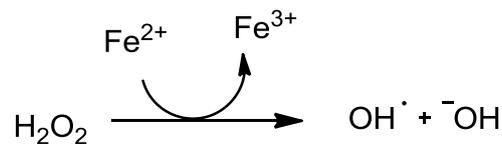


Abbildung 11: Fenton-Reaktion

Das Hydroxylradikal ist das stärkste bekannte reaktive Sauerstoffradikal und kann durch sein sehr positives Reduktionspotential mit allen Molekülen in einer Zelle sehr schnell reagieren.

Die Schädigungen der Zelle sind damit auf den Bildungsort der Radikalbildung beschränkt (der Aktionsradius liegt bei etwa 1 nm, eine durchschnittliche tierische Zelle hat in etwa einen Durchmesser von 30 bis 40 μm). Aufgrund der hohen Reaktivität von OH^\cdot ist seine biologische Lebensdauer (Halbwertszeit) sehr stark begrenzt und liegt bei ca. 1 Nanosekunde. Allerdings können die hohe Reaktivität und die große Reduktionskraft des Hydroxylradikals zu direkten Schäden an der DNS und den Membranproteinen führen.^[43]

Solange sich die Zelle im Gleichgewicht befindet, d. h. die normale Zellabwehr z. B. über NADPH-Oxidase (erzeugt ROS gegen pathogene Bakterien und Pilze) erfolgt wie vorgesehen, spielen ROS eine große und essentielle Rolle im normalen Zellstoffwechsel. Man kann dabei zwei unterschiedliche Gruppen von ROS charakterisieren, nämlich freie Radikale und nicht-radikalische Verbindungen.

Zu den freien Radikalen gehören die Hydroxylradikale (HO^\bullet), Superoxidradikalanionen ($\text{O}_2^{\bullet-}$), Hydroperoxylradikale (HOO^\bullet) sowie die organischen Alkoxyradikale (RO^\bullet) und Peroxylradikale (ROO^\bullet).

Aufgrund der ungepaarten Elektronen besitzen die freien Radikale eine sehr hohe chemische Reaktivität und können so in Reaktionsprozesse eingreifen und diese nachhaltig verändern.

Nicht radikalische ROS Verbindungen mit biologischer Bedeutung sind Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroperoxid (ROOH), Hypochlorit (ClO^-) oder aber auch der sogenannte Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$).^[44,45]

Gesunde Zellen sind in der Lage, sich gegen OS biologisch und chemisch zur Wehr zu setzen. Dabei spielt Glutathion (L- γ -Glutamyl-L-Cystein, GSH), ein Peptid, das aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin gebildet wird, eine wichtige Rolle als potentes Reduktionsmittel und damit als Antioxidant. Durch die Bildung von GSSG (Glutathiondisulfid) aus GSH werden viele ROS neutralisiert (d. h. reduziert) und die Zelle somit geschützt.^[46]

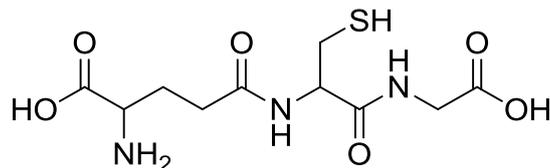


Abbildung 12: Chemische Struktur von GSH

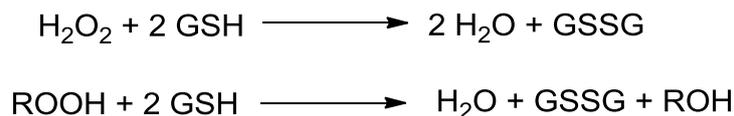


Abbildung 13: Reaktion von H_2O_2 mit GSH

Weitere Abwehrmechanismen der Zelle werden durch katalytisch wirksame Antioxidantien gebildet. Das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD), z. B. katalysiert die Dismutation des Superoxidanions zu H_2O_2 und O_2 . Diese Reaktion wurde bereits 1969 von McCord und Fridovich beschrieben.^[47]

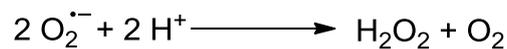


Abbildung 14: Dismutation des $\text{O}_2^{\cdot-}$ Radikals zu H_2O_2 und O_2

Superoxidanionen sind in höheren Konzentrationen in der Lage, Proteine und DNA im Organismus zu schädigen und Krankheiten, wie z. B. Amyotrophe Lateralsklerose (ALS1) (degenerative Erkrankung des motorischen Nervensystems), auszulösen.

Auch Katalasen (CAT) können OS verhindern und bekämpfen, indem sie Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff disproportionieren. Dabei dient das in der Häm-Gruppe der Katalase enthaltene Fe^{3+} als katalytischer Elektronenüberträger. Daher wurden elektrochemische Tests mit Katalase durchgeführt, um mit ihrer Hilfe den Einfluss von ROS auf Proteine zu reduzieren und um einen Nachweis auf die Beteiligung von ROS überhaupt erst zu erhalten.

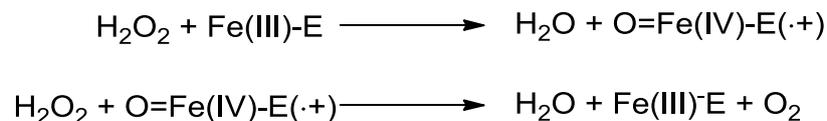


Abbildung 15: Disproportionierung von H_2O_2 zu H_2O und O_2 mithilfe von Katalase (Fe(II)-E: Eisenzentrum der Häm-Gruppe; O=Fe(IV)-E(·+): Eisen ist nicht ganz bis zu Fe(V) oxidiert, ein Elektron wird vom Häm-Liganden bereitgestellt).

Weitere wichtige Enzyme zur Bekämpfung von OS sind Peroxiredoxine (Prx) und Glutathion-Peroxidasen (GPx).^[42]

Ein gutes Beispiel für Peroxiredoxine sind die Thioredoxine in pflanzlichen Organismen, die abhängig vom Redoxzustand Enzyme aktivieren und inaktivieren können. In Pflanzen ist Licht Auslöser für Photosynthese, die wiederum eine sehr dominante Quelle für Reduktionsenergie ist. Die Redoxregulation der Thioredoxine erfolgt durch Oxidation und Reduktion von zwei Thiolresten durch Thioredoxinreduktasen und weitere Zielenzyme.^[48,49]

Selenhaltige Glutathion-Peroxidasen katalysieren die Glutathion-abhängige Reduktion von organischen Peroxiden und Wasserstoffperoxid.

Kommt es zu einem Selenmangel und damit zu einer Verringerung der Glutathion-Peroxidasen-Konzentration in den Zellen, so können Krankheiten wie die Keshan-Krankheit (Erkrankung des Herzmuskels, benannt nach einem Selenmangelgebiet in China) oder Kaschin-Beck-Krankheit (Zwergwuchs oder nutritive Gelenkknorpel-degeneration, benannt nach einem russischen Arzt und einer US-amerikanischen Ärztin), sowie Tumorwachstum und Atherosklerose (Arterienverkalkung) die Folge sein.^[50-52]

Allerdings können auch Krankheiten durch Selenüberschuss (Selenintoxikation oder Selenose) ausgelöst werden. Jedoch kann es durch normale Ernährung nicht zu einem krankhaften oder giftigen Selenüberschuss im menschlichen Organismus kommen. Jedoch kann eine erhöhte Einnahme von selenhaltigen Nahrungsergänzungsmitteln oder das Einatmen von Selenstäuben dazu führen, dass die kritische Dosis im Gewebe, bzw. im Magen-Darm-Trakt überschritten werden kann. Solche Überdosierungen können zu knoblauchartigem Atemgeruch, Müdigkeit, Erbrechen, Durchfällen, Veränderungen der Nägel, Haarausfall oder Fühlstörungen durch Schädigung der Nerven führen und teils irreparable Folgen nach sich tragen. Auch kann ein länger anhaltender Selenüberschuss zu chronischen Leber- (Leberzirrhose) und Herzerkrankungen (Herzinsuffizienz) führen, wodurch diese Organe ihre Funktionsfähigkeit verlieren können und es dadurch zu Todesfällen kommen kann. Größere Mengen Selen, die sich auf der Haut oder den Schleimhäuten ablagern, können zu Verätzungen unter Blasenbildung führen.^[53]

Galten bis in die 1930iger Jahre Selen- und Selenverbindungen nur als stark toxische Verbindungen, so hat sich das Bild der selenhaltigen Verbindungen im menschlichen Organismus zum heutigen Tage grundlegend verändert. In verschiedenen Selenproteinen ist Selenocystein enthalten, welches mittlerweile als 21. Aminosäure angesehen wird und an vielen wichtige Aufgaben im Organismus beteiligt ist.

2. Ergebnisse und Diskussion

Die elektrochemische Erzeugung von ROS basiert auf einfachen chemischen und physikalischen Grundlagen, die schon seit längerer Zeit bekannt sind. Der in Wasser gelöste Sauerstoff kann kathodisch einfach zu seinen reaktiveren Spezies reduziert werden (s. Abbildung 10). Für die hier vorliegende Arbeit war es jedoch wichtig, herauszufinden, wo genau das elektrochemische Potential liegt, mit dem man den Sauerstoff am besten reduzieren kann und mit welchen Elektrodenmaterialien dies ohne Weiteres möglich ist.

Herr Prof. Dr. Jacob und sein Team in England hatten bereits vor einigen Jahren zeigen können, dass metallische Oberflächen, die den elektrischen Strom ohne größeren Widerstand leiten können, mühelos mit schwachen Potentialen (ca. $-0,75\text{ V}$ gemessen gegen die Standard-Silber-Elektrode (SSE), pH 7,0, $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ als Leitsalz) gereinigt werden können (Die Werte wurden dem unveröffentlichten Project Report von Dr. Andrea Holme entnommen). Dabei wurde bereits die Erzeugung von ROS und deren Eigenschaften zur Oberflächenreinigung ausgenutzt.

Das Elektrodenmaterial der AE ist essenziell für die Erforschung elektrochemischer Grundlagen, da das Material direkt (indem es mit der zu untersuchenden Substanz chemisch oder physikalisch reagiert, z. B. Quecksilber mit den getesteten Schwefelverbindungen) oder indirekt an der Reaktion teilnehmen kann. Große Unterschiede bestehen auch in der Verwendung von polarisierbaren oder unpolarisierbaren Materialien.

Die Verwendung einer Quecksilbertropfelektrode macht nur Sinn bei Potentialen, die negativer als $+100\text{ mV}$ liegen, da sonst Quecksilber selbst oxidiert wird. Im negativen Potentialbereich hat Quecksilber jedoch durch seine hohe Wasserstoff-Überspannung zahlreiche Vorteile gegenüber den meisten metallischen Elektroden oder auch gegenüber der Glaskohlenstoffelektrode. Jedoch ist Quecksilber selbst sehr reaktiv und kann mit den zu analysierenden Stoffen reagieren.

Gerade die vermessenen Tri- und Tetrasulfide sind hierfür gute Beispiele, wodurch es schwierig wurde, geeignete Versuchsbedingungen zu schaffen, die es ermöglichen, trotz Adsorption und Reaktion mit einer Quecksilberelektrode gute Analyseergebnisse zu erhalten.

Die Voltammetrie ist eine sehr empfindliche Methode, die auch sehr stark von den äußeren Gegebenheiten abhängig ist. So spielen Temperatur, Luftdruck und äußere elektrische Felder (z. B. von Computermonitoren, Spannungsgeber) eine entscheidende Rolle bei der Analyse. Diese Problematik kann durch Schaffung einer konstanten Umgebung, z. B. durch konstante Temperatur durch Verwendung von Dewargefäßen oder Gefäße mit einem beheizbaren Wassermantel, umgangen werden. Durch Verwendung von einem leichten konstanten Unterdruck innerhalb des Laborraumes mithilfe der Lüftungsanlage konnte der Luftdruck zumindest leicht beeinflusst werden.

Da voltammetrische Messungen auch immer von dem verwendeten Versuchsaufbau und den verwendeten Apparaturen und Elektroden beeinflusst werden, wurden zuerst umfangreiche Messungen mithilfe verschiedener Materialien als AE durchgeführt, um den genauen Potentialpunkt der Sauerstoffreduktion abhängig vom Elektrodenmaterial herauszufinden.

Dabei wurden verschiedene Puffer- und Leitsalzlösungen verwendet, um so den Effekt der verwendeten Mischung auf das Messergebnis dokumentieren zu können.

In der klassischen Elektrochemie verwendet man normalerweise Carbonat- oder Phosphatpuffer und Kaliumchlorid oder Natriumchlorid als Leitsalz. Chloride als Leitsalz haben den Nachteil, dass sie anodisch zu Chlor oxidiert werden können, welches sich *in situ* an der Anode bildet. Auch reaktive Chlorspezies, ähnlich denen des Sauerstoffs, wären denkbar (z. B. Hypochlorige Säure, HOCl).

Da Chlor, wie Sauerstoff, ein sehr starkes Reaktionsvermögen besitzt, kann es die Ergebnisse der Dekontaminationswirkung von Sauerstoff sehr stark beeinträchtigen.

Obwohl die Potentiale zur Bildung von elementarem Chlor und Sauerstoff sehr weit voneinander entfernt liegen, habe ich mich doch dazu entschlossen, als Leitsalz und Puffer Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) und Di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) bei pH 7,4 bzw. 6,0 einzusetzen.

Der Phosphatpuffer hat zudem den Vorteil, dass er mit den meisten der analysierten Naturstoffe, wie z. B. den von unserer Arbeitsgruppe synthetisierten Chinonen oder den von mir eingesetzten Proteinen, nicht reagiert und auch sonst keine unerwünschten Nebenreaktionen verursacht.

Generell war es wichtig, schon in der Anfangsphase dieser Doktorarbeit die Chemikalien zu verwenden, die auch in der täglichen Verwendung mit Dialyseapparaturen stehen. Deshalb wurden viele Messungen zu Beginn des Projektes auch mit einem Bicarbonat-Puffer (bibag, Natriumbicarbonat für die Hämodialyse), den die Firma Fresenius Medical Care zur Verfügung gestellt hat, durchgeführt. Auch wurden die Chemikalien, die von der Firma Fresenius zur Reinigung der Dialyseanlagen eingesetzt werden, wie z. B. Citrosteril[®] oder Diasteril[®], elektrochemisch analysiert und auf ihre Einsatzmöglichkeiten zur elektrochemischen Erzeugung von ROS hin getestet.

Zur Kontrolle der ordnungsgemäßen Funktionalität der verwendeten Apparatur und des verwendeten Potentiostaten wurden Messungen mit Ferrocen als internen Standard durchgeführt. Bei Ferrocen handelt es sich um eine metallorganische Verbindung mit aromatischem Ringsystem, einem sog. „Sandwich-Komplex“ mit einem Eisen(II)-Ion, welches sich in der Mitte zwischen zwei Cyclopentadienyl-Ringen befindet, die jeweils einfach negativ geladen sind. Aus diesem Grund ist der Komplex nach außen hin ungeladen und löst sich dadurch nicht in reinem Wasser, jedoch sehr gut in unpolaren Lösemitteln.^[54]

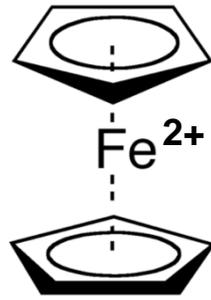


Abbildung 16: Struktur von Ferrocen.

In der zyklischen Voltammetrie verwendet man Ferrocen als internen Standard, da die reversible Oxidation zum Ferrocenium-Ion bei genau +0,4 V gegen die Standard-Wasserstoffelektrode stattfindet. Da das Potential von Ferrocen nahezu unabhängig vom verwendeten Medium ist, kann es auch als eigenes Bezugssystem herangezogen werden. Mithilfe dieser Referenzsubstanz kann ermittelt werden, ob der Potentiostat wirklich die eingestellten Potentiale konstant liefert und ob die Elektroden sowie das restliche elektrische System störungsfrei arbeiten.

Alle elektrochemischen Messungen wurden im Triplikат durchgeführt, um eine möglichst große Reproduzierbarkeit der Werte zu erhalten und um Fehler durch zufällige äußere Effekte, wie z. B. das Wackeln an der Tischplatte oder größere Schwankungen der Temperatur während der einzelnen Messungen zu eliminieren.

2.1 Ergebnisse zur Erzeugung von ROS mithilfe der Elektrochemie

2.1.1 Elektrochemische Voruntersuchungen mit Ferrocen

Grundlage zur Erzeugung von ROS mithilfe elektrochemischer Methoden ist die ordnungsgemäße Funktion der verwendeten Materialien und Geräte. Um diese auf ihre Funktionalität zu überprüfen, werden Zyklovoltammogramme (CVs) von verschiedenen AE-Materialien, wie z. B. Gold, Silber und Glaskohlenstoff, mit Ferrocen aufgenommen.

Aus diesen CVs kann man dann das Potential der reversiblen Oxidation bzw. Reduktion des Ferrocens gegen die eingesetzte Silber-Silberchloridelektrode (Ag/AgCl) ablesen.

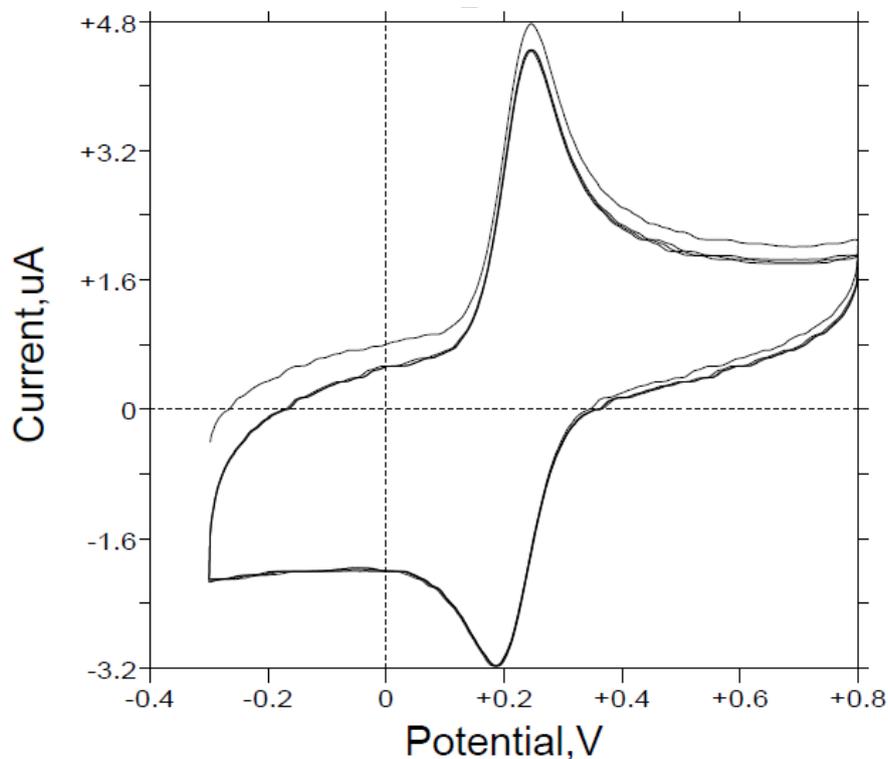


Abbildung 17: CV von Ferrocen mit der Glaskohlenstoffelektrode, 33 % MeOH.

Von reversiblen Reaktionen spricht man, wenn sich die beiden Peaks der Oxidations- und Reduktionsreaktion nicht um mehr als $0,059 \text{ V/n}$ (entspricht 59 mV/n ; n = Anzahl der übertragenen Elektronen) voneinander unterscheiden. Dabei handelt es sich jedoch eher um einen Richtwert als um eine genaue Größe. Weichen die Werte nicht zu stark von den angegebenen 59 mV ab, so kann es sich dabei trotzdem um reversible oder quasi-reversible Reaktionen handeln.

Ein Hinweis auf eine vollständig reversibel ablaufende Reaktion gibt die Größe der beiden Peaks an. Besitzen beide in etwa die gleiche Peakhöhe (entspricht der Stromstärke), so kann man davon ausgehen, dass die Reaktion auch wirklich vollständig reversibel abläuft und dadurch mehrmals wiederholt werden kann, ohne dass sich die Konzentration der Substanz in der Lösung und in der Umgebung der Elektrode merklich ändern würde.

Anders als im Abschnitt 2. „Ergebnisse und Diskussion“ angegeben, befindet sich das Oxidationspotential des Ferrocens hier augenscheinlich nicht bei $+0,4 \text{ V}$. Die Begründung hierfür liegt in der verwendeten Referenzelektrode. Verwendet man die Standard-Wasserstoffelektrode als Referenzelektrode, so findet man den oben angegebenen Wert von $+0,4 \text{ V}$ für den Oxidationspeak von Ferrocen, solange die verwendete Apparatur in einem ordnungsgemäßen Zustand ist. Sobald man jedoch eine andere Referenzelektrode verwendet, so ändert sich dieser Wert oft deutlich. In Abbildung 17 ist das CV von Ferrocen unter Verwendung einer Silber-Silberchlorid-Elektrode (mit 3 M Kaliumchlorid als Elektrolyt, SSE) anstatt einer Standard-Wasserstoffelektrode (NHE) dargestellt (SSE= $+0,24 \text{ V}$ vs. NHE= $+0,4 \text{ V}$).

Auch der Einfluss des Lösemittels ist hier zu berücksichtigen. Während Ferrocen normalerweise in DMSO aufgelöst und dann direkt vermessen wird, wurden die hier gezeigten Messungen in einem Gemisch aus 33% Methanol (MeOH) und 50 mM Phosphatpuffer in Wasser durchgeführt. Die Konzentration des gelösten Ferrocens ist hierbei geringer als in reinem DMSO oder reinem Methanol, jedoch reicht sie immer noch aus, um gute Messungen zu erhalten. Die Vorteile des eingesetzten Gemisches aus MeOH, Puffer und Wasser liegen auf der Hand, da man mit dieser Mischung auch fast alle der synthetisierten Natur- und Chalkogenprodukte, sowie der weiteren synthetisierten Produkte problemlos vermessen kann.

Dabei erhält man auch die Möglichkeit, die erhaltenen Werte der Oxidations- und Reduktionspeaks direkt mit denen des Ferrocens zu vergleichen. Das Methanol (eingesetzt zur besseren Löslichkeit) trägt in diesem Gemisch dazu bei, dass der Oxidationspeak des Ferrocens deutlich nach links, d. h. zu niedrigeren Potentialen hin, verschoben ist.

Weitere Messungen mit verschiedenen Materialien der AE sowie weiteren Lösungsmitteln wurden durchgeführt, um den Einfluss des Elektrodenmaterials und der verwendeten Lösungsmittel besser dokumentieren zu können. Dabei wurde versucht, mit ähnlichen Ferrocenkonzentrationen (etwa 0,01 M) zu arbeiten.

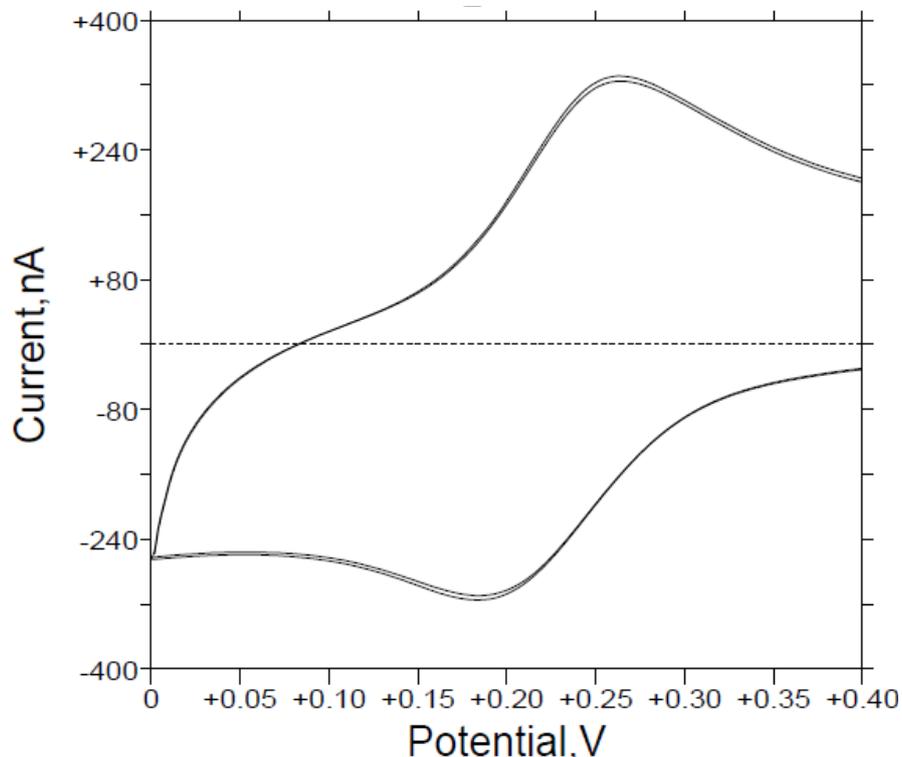


Abbildung 18: CV von Ferrocen in DMF mit Glaskohlenstoffelektrode als AE vs. SSE.

Als weiteres Lösungsmittel, das in der Elektrochemie Anwendung findet, wurde DMF (*N,N*-Dimethylformamid) verwendet. In Abbildung 18 sieht man die deutliche Verschiebung des Oxidations- und Reduktionspeaks zueinander. Auch sind die beiden Peaks wieder deutlich zu negativeren Potentialen verschoben, so wie es bereits bei der Verwendung von Methanol geschehen ist.

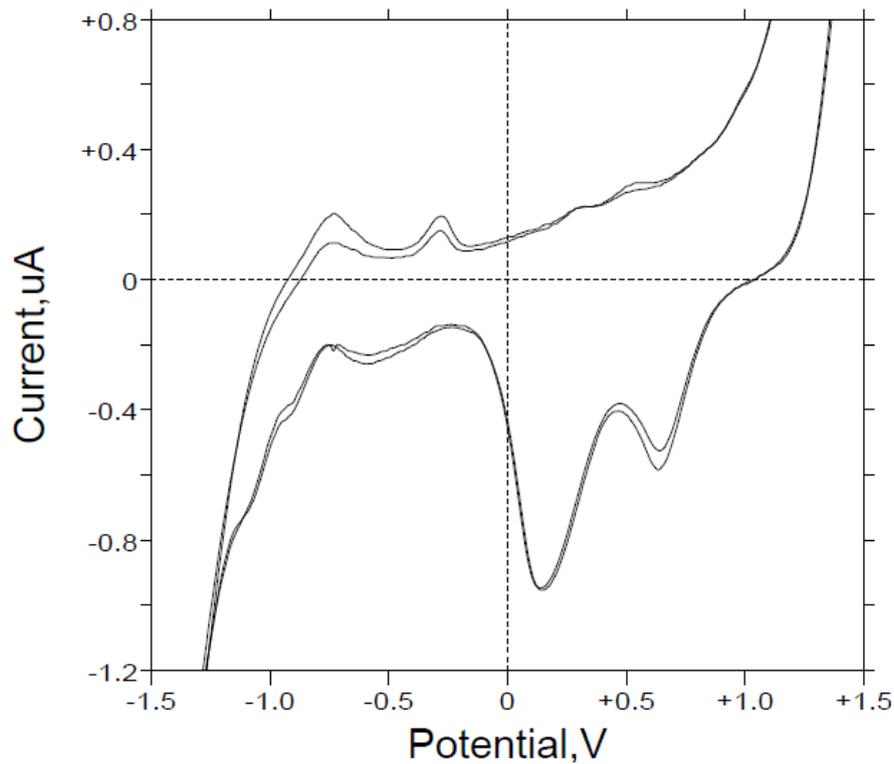


Abbildung 19: CV von Ferrocen in DMF mit Goldelektrode als AE vs. SSE.

Abbildung 19 zeigt die gleiche Lösung an Ferrocen in DMF, vermessen mit einer Goldelektrode als AE. Gold zeigt hierbei deutlich mehr Peaks als Glaskohlenstoff, jedoch sind die sonst sehr charakteristischen reversiblen Peaks des Ferrocens kaum bzw. gar nicht zu erkennen. Vor allem auf der Oxidationsseite lässt sich kein passender Peak ausmachen. Aus diesem Grund, und auch weil Gold als Elektrodenmaterial für die Verwendung in Dialysemaschinen zu teuer wäre, wurden die weiteren Forschungsexperimente zur Anwendung der Oberflächen-dekontamination ohne größeren Einsatz der Goldelektrode fortgeführt. Allerdings liefert die Goldelektrode weiterhin wichtige Daten zur Grundlagenforschung und zur Bildung von ROS in verschiedenen Medien.

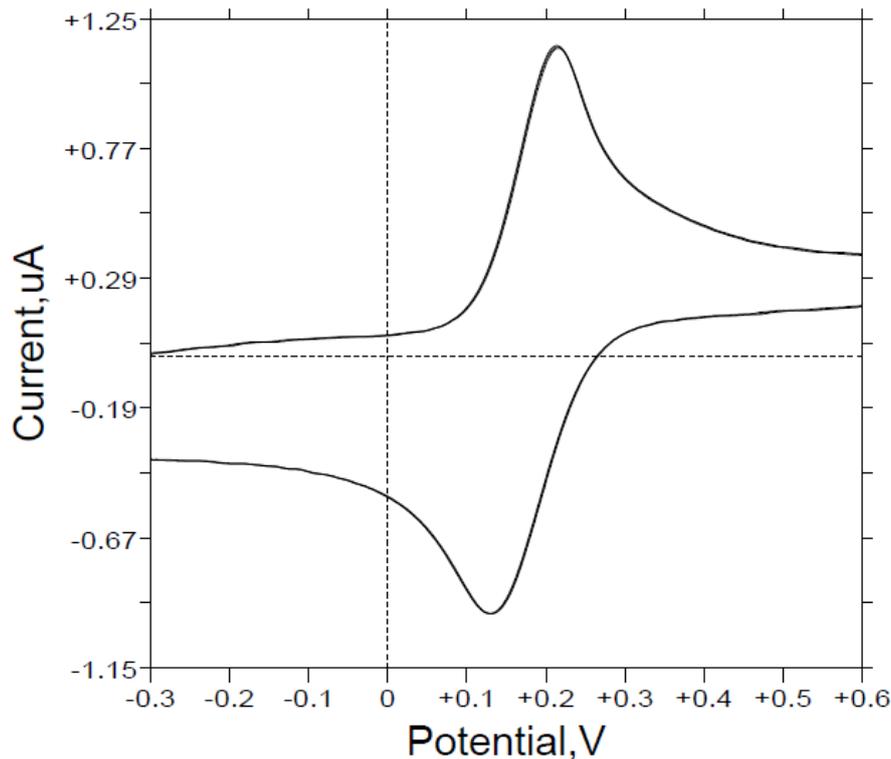


Abbildung 20: CV von Ferrocen in THF mit Glaskohlenstoff als AE vs. SSE.

Abbildung 20 zeigt das CV von Ferrocen in THF (Tetrahydrofuran) aufgenommen an der Glaskohlenstoffelektrode. Die Linksverschiebung der Peaks zu negativeren Potentialen hin zeigt sich hier sogar noch stärker als in den vorhergegangenen Messungen in DMF und Methanol.

In allen Lösungsmitteln wurde deutlich, dass die Elektrochemie-Anlage ordnungsgemäß funktioniert und dass der Potentiostat brauchbare und konstante Spannungen liefert. Auch der Einfluss der verschiedenen Elektrodenmaterialien auf die Darstellung und den verwertbaren Inhalt der Zyklovoltammogramme konnte so dargestellt werden. Nach diesen Ergebnissen wurden erste Grundlagen zur Erzeugung von ROS erarbeitet. Da DMF und THF als Lösungsmittel für die Naturprodukte eher ungeeignet sind und sie auch in der Dialyse keine Bedeutung besitzen, wurden Versuche mit diesen Lösungsmitteln nicht weiter vertieft.

2.1.2 Elektrochemische Erzeugung von ROS in Wasser

Reines Wasser leitet den Strom nicht oder nur in einem wirklich sehr geringem Maße. Zur Stromleitung müssen im Wasser Salze gelöst und freie Ionen vorhanden sein. Das zur Durchführung elektrochemischer Experimente benötigte Reinstwasser des Typs I (Milli-Q Wasser) wird mithilfe eines Direct-Q® 3 UV Reinstwasseraufbereitungssystem hergestellt. Dabei werden dem Wasser alle Salze entzogen, indem es über verschiedene Filter aus unterschiedlichen Materialien geleitet wird. Mithilfe einer UV-Lampe wird der TOC-Gehalt (Gesamter organisch gebundener Kohlenstoff, engl. *Total Organic Carbon*) des Wassers deutlich reduziert, sodass er laut Herstellerangaben unter 5 ppm liegt. Der elektrische Widerstand des so erzeugten Reinstwassers des Typs I liegt bei 18,2 M Ω -cm umgerechnet auf eine Temperatur von 25 °C. Durch den Einsatz eines optionalen Endfilters vor der Wasserentnahmeeinheit, welcher eine Porengröße von 0,22 μ m besitzt, werden die sich gegebenenfalls im Wasser befindenden Bakterien und deren Zerfallsprodukte (die sogenannten Endotoxine) zurückgehalten, sodass das nutzbare Wasser schlussendlich auch als pyrogen- und RNase-frei (laut Herstellerangaben) angesehen werden kann.

Die Verwendung von Milli-Q Wasser, bzw. von Wasser der höchsten Reinheitsstufe, ist essentiell für die Elektrochemie, da nur so störende Effekte aus den in Wasser gelösten Teilchen vermieden werden können. Um dieses Wasser jedoch für elektrochemische Experimente nutzbar zu machen, muss ein Leitsalz zugegeben werden. Da auch der pH-Wert der verwendeten wässrigen Lösung eine wichtige Rolle bei elektrochemischen Experimenten spielt, wurde ein Puffersalz eingesetzt, welches sowohl als Leitsalz als auch als pH-Puffer dienen kann. Der eingesetzte Kaliumphosphatpuffer (s. 2. Ergebnisse und Diskussion“) erfüllt die an ihn gerichteten Anforderungen optimal.

Um den Beweis zu erbringen, dass der Phosphatpuffer die Bildung von ROS nicht negativ beeinflusst, wurden zu Anfang der Forschungsarbeit mehrere Messungen unter verschiedenen Bedingungen allein mit sauerstofffreiem und mit Sauerstoff angereichertem Wasser und dem Phosphatpuffer durchgeführt.

Dabei wurden auch unterschiedliche Elektrodenmaterialien getestet, um nachzuweisen, dass der Potentialbereich und die Menge der gebildeten ROS auch vom verwendeten Elektrodenmaterial abhängig sind.

Alle Messungen wurden hierbei am C3-Zell-Stand der Firma Bioanalytical Systems (BAS Inc., West Lafayette, USA) angefertigt (s. 3.1 Allgemeiner Aufbau der elektrochemischen Messanordnung). Um eine möglichst vergleichbare Basis zu schaffen, wurden alle Messungen bei einer Temperatur der Lösung von ca. 21 °C durchgeführt. Die Konzentration des Puffers wurde dabei mit 50 mM so gewählt, dass der elektrische Widerstand des Wassers hinreichend klein ist, um einen Spannungsabfall innerhalb des Reaktionsgefäßes zw. den Elektroden zu vernachlässigen und um eine exakte Messung zu gewährleisten.

Vor jeder Messung wurden die wässrigen Lösungen mit hochreinem Gas aus Gasflaschen (nicht aus der Hausleitung, da diese Gase oft noch einen Anteil an Wasser oder sogar Ölen oder Fetten enthalten können) gespült. Um den Sauerstoffgehalt der Lösungen zu minimieren, wurde trockener Stickstoff (Qualität 4.6, d. h. 99,996 %) für 5 Minuten durch die Lösung geleitet. Mit diesem sauerstoffarmen Wasser wurden dann zykelvoltammetrische Messungen des Wasser/Puffer-Gemisches durchgeführt und die erhaltenen CVs wurden dann als Grundlage zu den weiteren Messungen herangezogen.

Um das Potential zur Bildung von ROS herausfinden zu können, wurden die wässrigen Pufferlösungen vor jeder Messung 5 Minuten mit hochreinem Sauerstoff (Qualität 2.5, 99,5 %) gespült, um so den Anteil des gelösten Sauerstoffs in der Lösung zu erhöhen und um damit deutlichere Reduktionspeaks zu erzeugen. Die Messungen wurden bei zwei unterschiedlichen pH-Werten (bei pH 6,0 und 7,4) durchgeführt. Diese pH-Werte finden sich auch im menschlichen Organismus und spielen bei der Dialyse eine wichtige Rolle (der pH-Wert des Blutes liegt bei ca. 7,4).

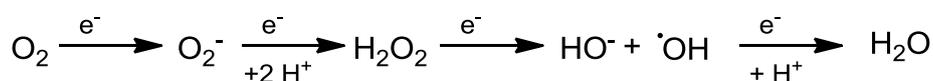


Abbildung 21: Mögliche Reaktionen von O₂

Die verwendete Software verhinderte eine übersichtlichere Darstellung der Zyklovoltammogramme mit mehreren Graphen in einem Voltammogramm, sodass die Messungen einzeln dargestellt werden müssen.

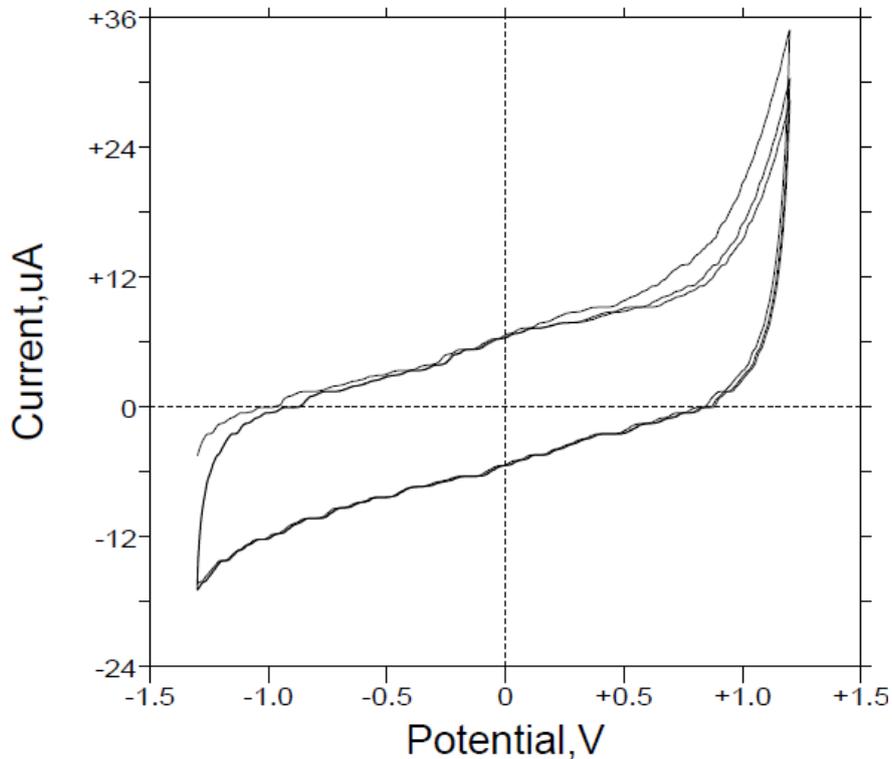


Abbildung 22: CV von Wasser und Phosphatpuffer bei pH 7,4; Glaskohlenstoff als AE, gespült mit N₂.

Abbildung 22 zeigt deutlich, dass in dem interessanten Potentialbereich zw. -1,4 und +1,4 Volt keine störenden Peaks auftauchen. Der starke Anstieg auf der Oxidationsseite jenseits von +1,0 Volt (d. h. zu positiveren Potentialen hin) zeigt bereits die Oxidation des Wassers zu Sauerstoff an. Potentiale negativer als -1,5 Volt führen zur Reduktion des Wassers und damit zur Bildung von Wasserstoff. Die Werte der Wasserzersetzung geben die Grenzen der elektrochemischen Methode an. Allerdings lassen sich diese Werte durch viele unterschiedliche Faktoren, wie z. B. den pH-Wert der verwendeten Lösung, beeinflussen und deutlich verschieben. Für die hier vorliegende Arbeit genügt es jedoch völlig, innerhalb der tatsächlichen Grenzen des Systems zu bleiben, da die ROS-Erzeugung bei möglichst kleinen Potentialen, d. h. nahe bei 0 Volt ablaufen soll. Je näher das Potential beim Nullwert liegt, desto weniger Energie muss aufgebracht werden, um die ROS zu erzeugen.

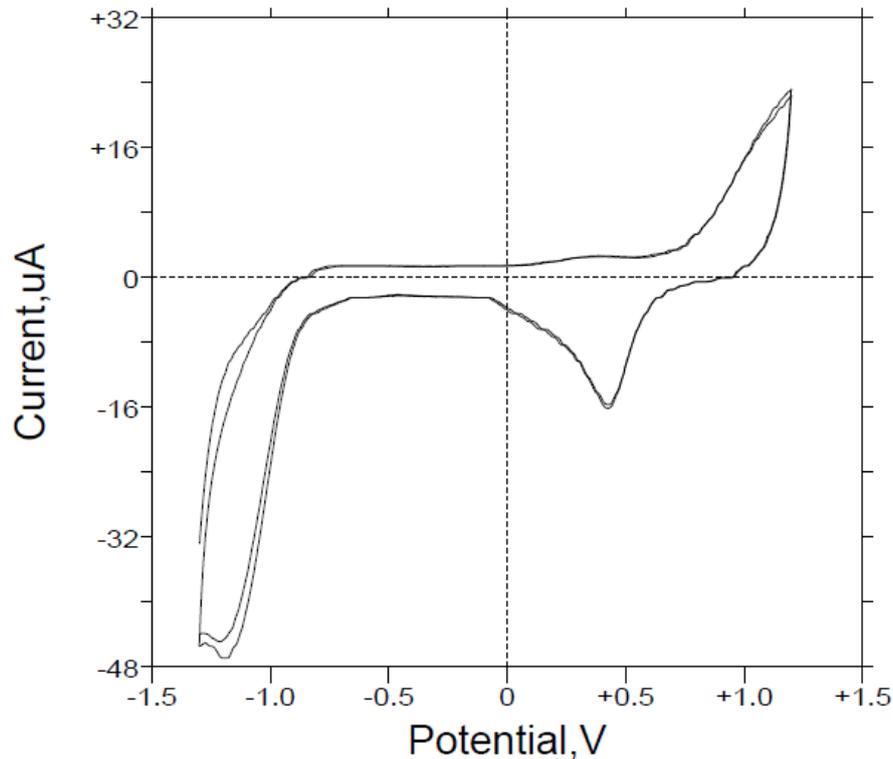


Abbildung 23: CV von Wasser und Phosphatpuffer bei pH 7,4; Gold als AE, gespült mit N₂.

Das in Abbildung 23 dargestellte CV von Wasser und Phosphatpuffer mit einer Gold-elektrode als AE sieht signifikant anders aus, als das vergleichbare CV mit Glas-kohlenstoff als AE. Problematisch an Gold als Elektrodenmaterial ist die deutlich früher einsetzende Reduktion von Wasser zu Wasserstoff, die hier bereits schon bei etwa -1,0 Volt einsetzt. Da die zu erwartende ROS-Entwicklung aber erst zwischen -0,75 und -1,0 Volt einsetzt, kann man davon ausgehen, dass sich die Peaks der Wasserreduktion und der ROS-Entwicklung überlagern könnten. Dies würde zu einem sehr instabilen System führen und die Auswirkungen von ROS auf z. B. biologische Materialien könnten nicht weiter untersucht werden, da auch der gebildete reine Wasserstoff Auswirkungen auf die zu untersuchenden Stoffe haben könnte (Wasserstoff ist ein potentes chemisches Reduktionsmittel).

Den Reduktionspeak bei etwa +0,45 Volt wurde nicht weiter untersucht, da er sehr weit von dem interessanteren ROS-Potential entfernt liegt und Gold in der Dialyse eher nur eine kleine Rolle spielt.

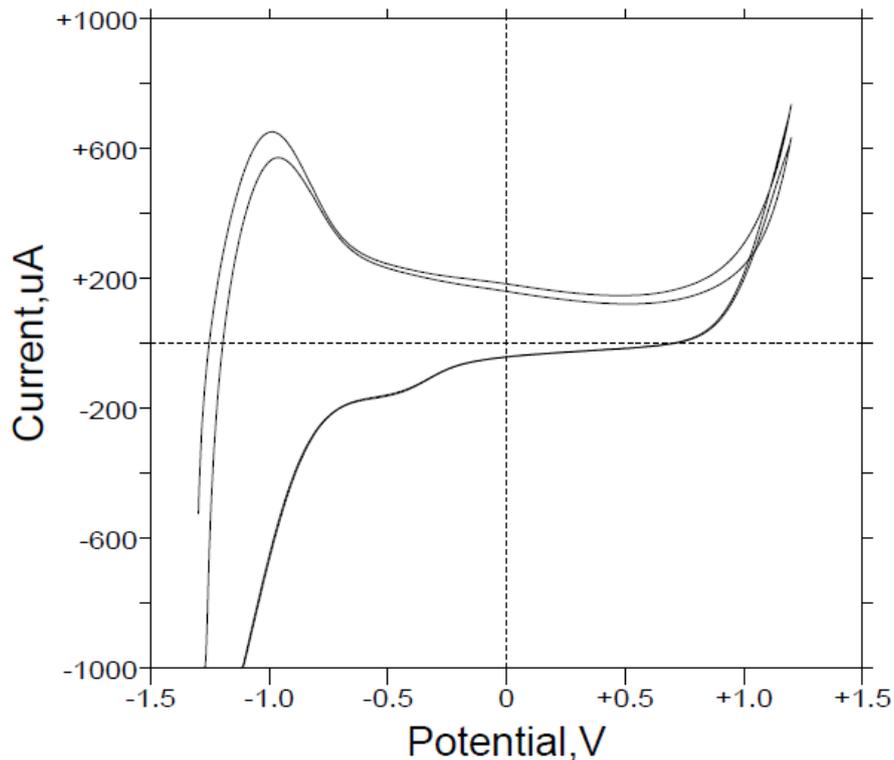


Abbildung 24: CV von Wasser und Phosphatpuffer bei pH 7,4; Titan als AE, gespült mit N_2 .

Titan zeigt als Elektrodenmaterial für die Arbeitselektrode eine ähnliche Problematik wie Gold. Auch hier sieht man, dass die Reduktion des Wassers bereits sehr früh (bei ca. -0,8 Volt) beginnt. Auch lässt sich hier ein kleinerer Reduktionspeak bei etwa -0,5 Volt ausmachen, der jedoch nicht näher untersucht wurde, da er bei der Frage nach der Wirksamkeit und Verwendungsmöglichkeit von ROS keine Rolle spielt. Eine Reaktion mit dem Elektrodenmaterial lässt sich nicht vollständig ausschließen. Allerdings ist diese aufgrund des sehr niedrigen elektrochemischen Potentials des Titans unter den gewählten Versuchsbedingungen eher unwahrscheinlich ($Ti/Ti^{2+} = -1,63V$).

Vergleicht man die CVs der einzelnen Messungen mit verschiedenen Elektrodenmaterialien untereinander, so stellt man fest, dass Titan bereits bei kleinen Potentialen sehr hohe Stromstärken hervorbringt. Dies liegt vor allem an der signifikant größeren Oberfläche der verwendeten Titanelektrode (Stab aus Titan mit einem Durchmesser von ca. 1,2 mm) im Vergleich zu den anderen Elektroden. Eine optische Veränderung der Elektrodenoberfläche durch mögliche Reaktion des Titans

mit dem Phosphatpuffer konnte nicht beobachtet werden. Allerdings ist eine Oxidation der Elektrodenoberfläche nicht vollständig auszuschließen.

Alle drei verwendeten Elektrodenmaterialien sind in der Lage, als Arbeitselektrode eingesetzt zu werden, um die Bildung von ROS erreichen und verfolgen zu können. Jedoch zeigt nur Glaskohlenstoff im zu erwarteten ROS-Potentialbereich keine störenden Einflüsse bzw. Peaks.

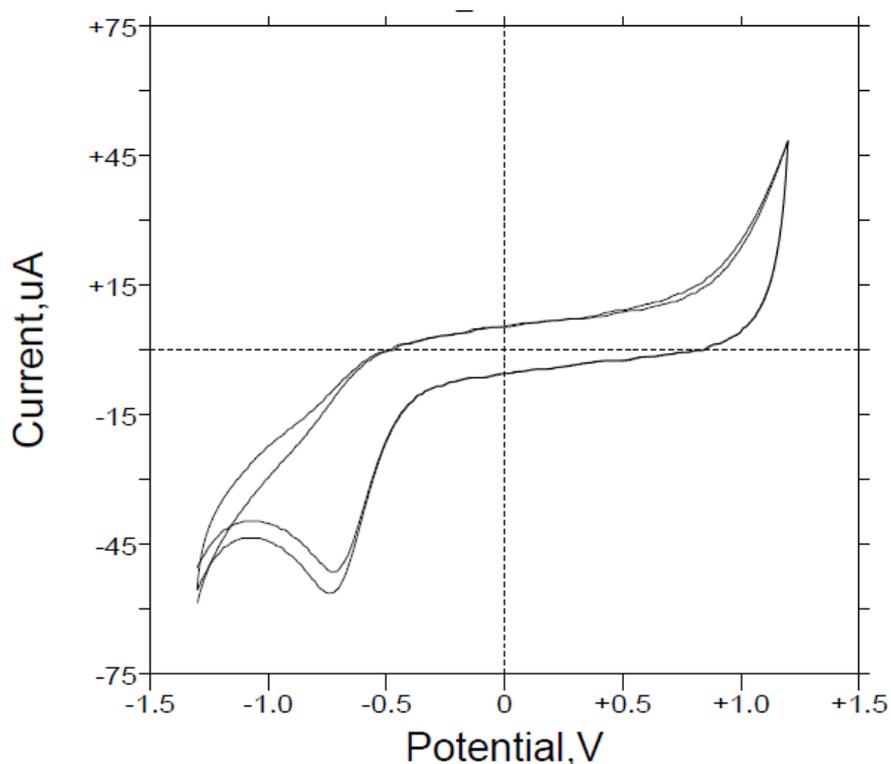


Abbildung 25: CV von Wasser und Phosphatpuffer bei pH 7,4; Glaskohlenstoff als AE, gespült mit O₂.

Nach dem Spülen der wässrigen Lösungen mit Sauerstoff zeigt sich bei der Verwendung von Glaskohlenstoff als AE (Abbildung 25) ein deutlich anderes Bild, als zuvor in Abbildung 22 zu sehen war. Es lässt sich nun ein sehr deutlicher Reduktionspeak bei ca. -0,75 Volt ausmachen. Dieser liegt genau in dem für die ROS-Reduktion zu erwartenden Gebiet und kann nur vom zugesetzten Sauerstoff herrühren, da die sonstigen versuchsrelevanten Parameter konstant gehalten wurden.

Dieser Reduktionspeak liegt deutlich von der Zersetzungsspannung von Wasser entfernt, sodass keine Konkurrenz bzw. Nebenreaktionen durch die Bildung von Wasserstoff zu befürchten sind. Dies sind perfekte Voraussetzungen um die Glaskohlenstoffelektrode in einem Wasser/Puffer-Gemisch zur Erzeugung von ROS einsetzen zu können.

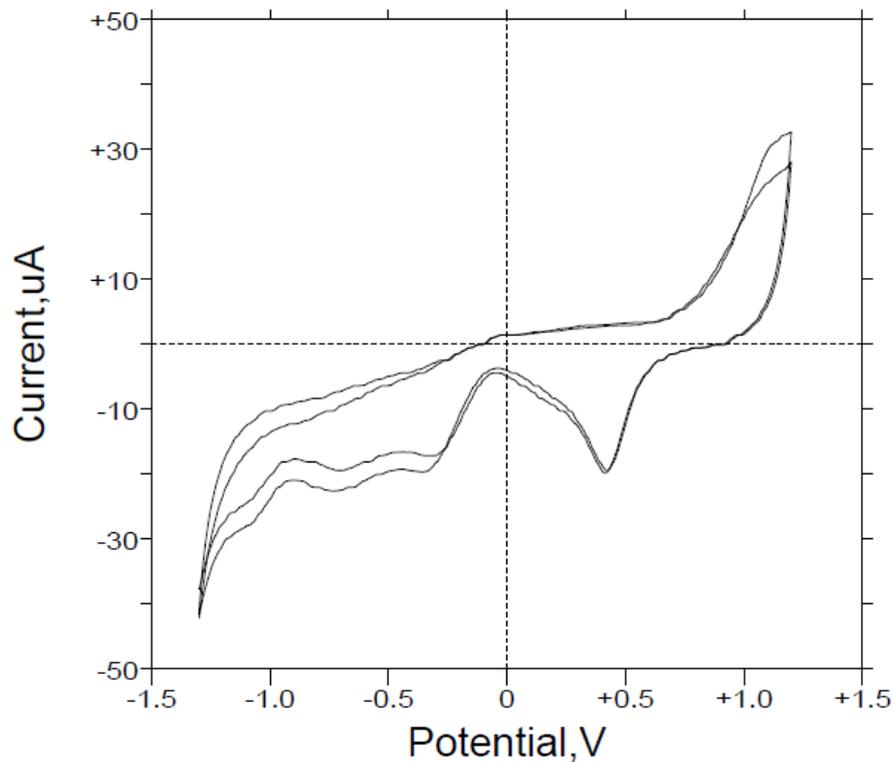


Abbildung 26: CV von Wasser und Phosphatpuffer bei pH 7,4; Gold als AE, gespült mit O₂.

Bei der Betrachtung des CVs aus Abbildung 26 fällt zuallererst der sehr breite Reduktionsverlauf im Bereich von -0,3 bis etwa -1,1 Volt auf. Innerhalb dieses Bereiches lassen sich mehrere kleinere Peaks ausmachen, die ineinander übergehen. Dieser Potentialverlauf ist für meine Forschungsexperimente eher ungünstig und störend, da sich hierbei kein konkretes Potential zur Erzeugung von ROS herausfiltern lässt, wodurch die späteren Messungen mit zeitbasierenden Voltammetrie Techniken deutlich erschwert würden. Da Gold aber aufgrund seines Preises nicht das bevorzugte Material für den Einsatz in Dialysegerätschaften ist, stellt dieses Ergebnis keine größeren Schwierigkeiten für den weiteren Verlauf der Forschungsarbeiten dar. Allerdings liefert die Goldelektrode trotz des weniger scharfen ROS-Reduktionspotentials sehr gute und aufschlussreiche Daten zur Grundlagen-

forschung und zum Verhalten der eingesetzten Materialien und Substanzen in Anwesenheit von ROS bei verschiedenen pH-Werten.

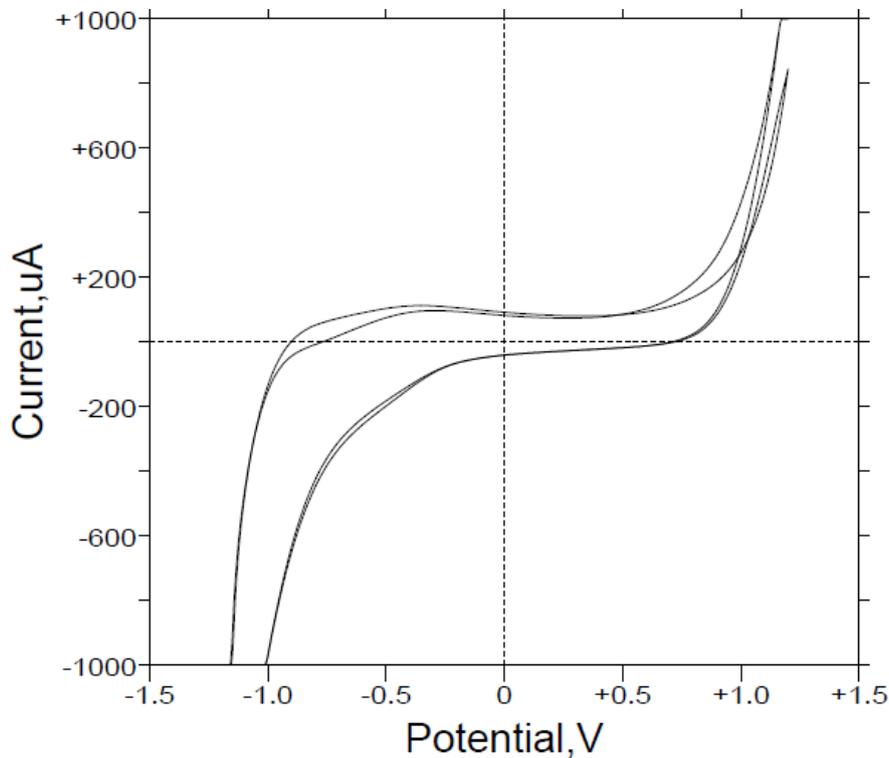


Abbildung 27: CV von Wasser und Phosphatpuffer bei pH 7,4; Titan als AE, gespült mit O₂.

Eine kleine Enttäuschung stellt das in Abbildung 27 dargestellte CV von Titan in der mit Sauerstoff angereicherten Lösung dar. Wie aus der Abbildung 27 hervorgeht, zeigt sich kaum ein Unterschied im für die Reduktion des Sauerstoffs relevanten Bereich (zwischen -0,5 und -1,0 Volt) zu der Messung, in welcher der Sauerstoff zuvor durch das Spülen mit Stickstoff entfernt wurde. Ausgehend von diesem Voltammogramm müsste man annehmen, dass durch die Titanelektrode überhaupt keine ROS-Reduktion stattfinden würde und dass dieses Elektrodenmaterial daher völlig ungeeignet für die Dekontaminationsuntersuchungen sei.

Aus späteren Folgeuntersuchungen mit Proteinen und den Lösungen der Firma Fresenius Medical Care konnte ich jedoch herausfinden, dass unter Verwendung von Titan als Arbeitselektrode tatsächlich ROS in einem nicht unerheblichen Umfang gebildet wird und dass dieses auch in genügender Anzahl und Stärke (lokale Konzentration) vorliegt, ähnlich wie bei der Glaskohlenstoffelektrode.

Daher kann man davon ausgehen, dass die eigentliche Erzeugung von ROS in diesem CV durch die Reduktion des Wassers überlagert wird und somit nicht nachgewiesen werden kann. Ein Nachweis der tatsächlichen Entwicklung von ROS an der Titanelektrode wurde mit Superoxid-Dismutase und Katalase durchgeführt (s. 2.4 Einfluss von Superoxid-Dismutase und Katalase).

2.1.3 ROS Erzeugung im wässrigen Medium

Die Erzeugung von ROS in einem Wasser/Puffer-Gemisch läuft, wie im vorangehenden Abschnitt 2.1.2 gezeigt, sehr unproblematisch ab. Die Frage, die sich bei dieser Versuchsanordnung jedoch stellt, ist, ob sich die ROS-Entwicklung durch die Wahl eines anderen Lösungsmittels oder eines „Zusatzes“ positiv beeinflussen lässt.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden daher eine Vielzahl von laborüblichen Chemikalien auf die elektrochemische Bildung von ROS hin untersucht. Da dies jedoch nicht in einem direkten Zusammenhang mit der Aufgabe der Suche nach einer verbesserten Reinigungsmethode von Dialysemaschinen steht, werden hier nur einige wenige Beispiele aufzeigt und kurz erläutert.

Alle Messungen wurden mit Gold und Glaskohlenstoff durchgeführt. Beide Materialien liefern vergleichbare Ergebnisse, sodass hier nur auf jeweils eines der Materialien eingegangen wird.

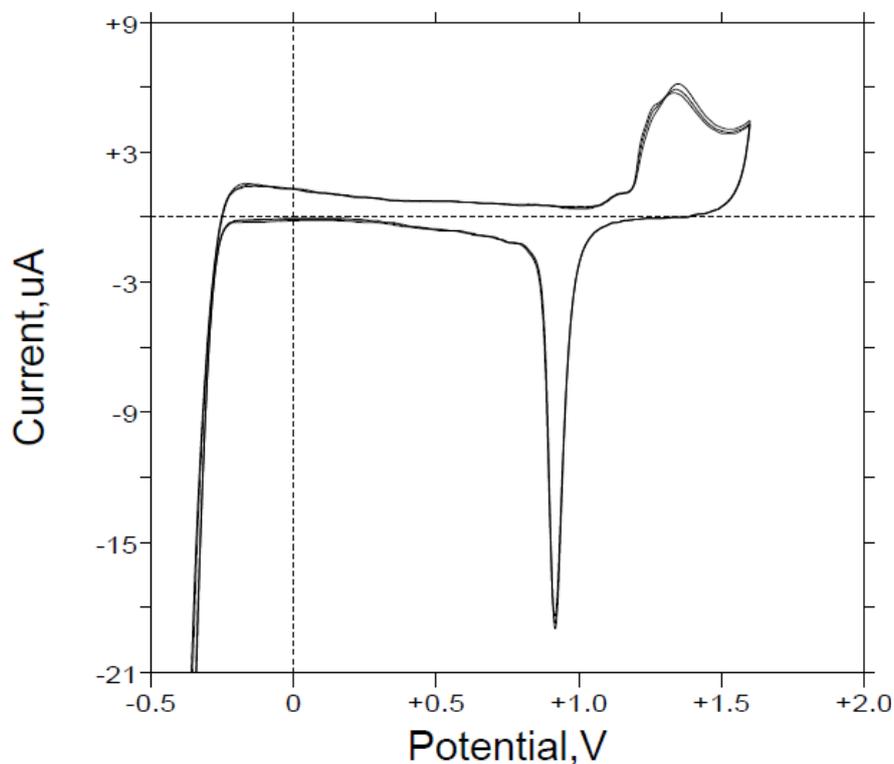


Abbildung 28: CV von 0,5M H₂SO₄; Gold als AE, v= 100 mV/s, mit N₂ gespült.

Ein Vergleich des CV aus Abbildung 28 mit dem CV aus Abbildung 18 lässt deutlich erkennen, dass durch den sehr niedrigen pH Wert der verwendeten 0,5 M Schwefelsäure die Wasserstoffentwicklung in Abbildung 28 deutlich früher (schon bei -0,3 V) einsetzt als bei der Verwendung des Wasser/Puffer-Gemisches bei pH 7,4 (Abbildung 18). Schwefelsäure bzw. auch die anderen verwendeten Säuren, wie z. B. HCl oder auch 2-Hydroxypropan-1,2,3-tricarbonsäure (Zitronensäure), zeigen alle ähnliches Verhalten. Die Bildung des Wasserstoffs erfolgt bei niedrigeren pH Werten bereits bei deutlich positiveren Potentialen als den im Wasser/Puffer-Gemisch ermittelten Werten von ca. -0,75 V.

Neben den Säuren wurden noch weitere Substanzen untersucht, die als möglicher Sauerstofflieferant zumindest theoretisch die Bildung von ROS deutlich verstärken könnten. Im Folgenden wird kurz auf einige dieser Substanzen eingegangen und die Ergebnisse der Messungen dargestellt.

Calciumhypochlorit ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$), das Calciumsalz der Hypochlorigen Säure, zeigt in Wasser nach Spülen mit Stickstoff folgendes CV an der Glaskohlenstoffelektrode:

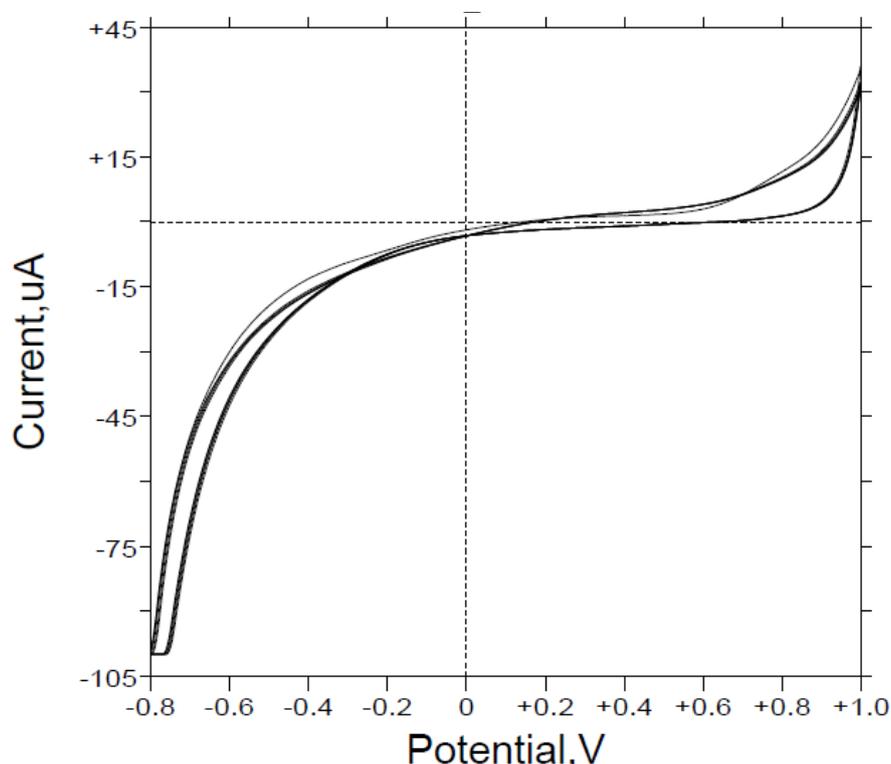


Abbildung 29: CV von $\text{Ca}(\text{OCl})_2$; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4;
 $v = 50 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült

Es sind keinerlei Redoxsignale im für uns relevanten Potentialbereich der ROS-Bildung zwischen 0 und -0,8 V festzustellen. Die Bildung von Wasserstoff erfolgt aber auch in diesem System schon bei schwach negativen Potentialen (ab ca. -0,4 V). Es wären theoretisch durchaus sogar ein oder mehrere Peaks zu erwarten gewesen, die auf die Bildung von Chlor oder reduzierten Chlorspezies hinweisen könnten. Aber auch diese Peaks konnten nicht nachgewiesen werden. Calciumhypochlorit ist somit auch nicht in der Lage, unter diesen Versuchsbedingungen O₂ zur Verfügung zu stellen oder direkt zu ROS zu zerfallen.

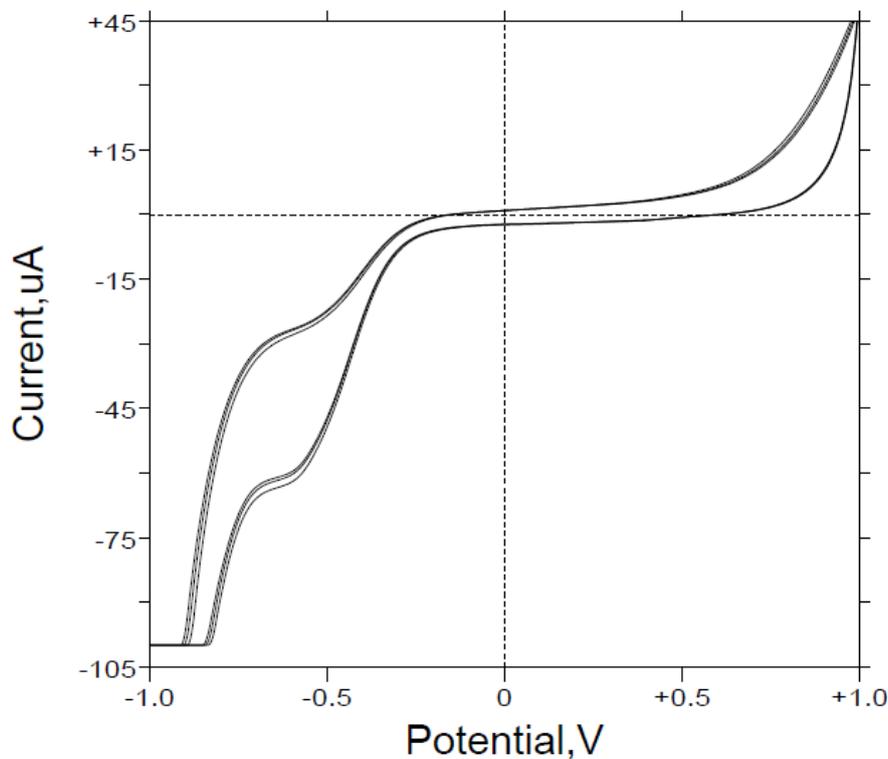


Abbildung 30: CV von Ca(OCl)₂; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 50 mV/s, mit O₂ gespült.

Spült man die gleiche Versuchslösung mit Sauerstoff, zeigt sich das in Abbildung 30 dargestellt Bild. Ein deutlicher Reduktionspeak im Bereich von -0,6 bis -0,75 V deutet auf die Entstehung von ROS hin. Allerdings ist dieser Peak auch nicht explizit ausgeprägter als die Peaks, die man erhält, indem man einfach nur mit Sauerstoff angereichertem Wasser elektrochemisch umsetzt. Calciumhypochlorit scheint damit nicht in der Lage zu sein, die Bildung von ROS zu weiter fördern oder zu erleichtern.

Jedoch wird die Reduktion von O_2 auch nicht verhindert. Anscheinend spielt $Ca(OCl)_2$ unter diesen Bedingungen elektrochemisch nur eine vernachlässigbare Rolle.

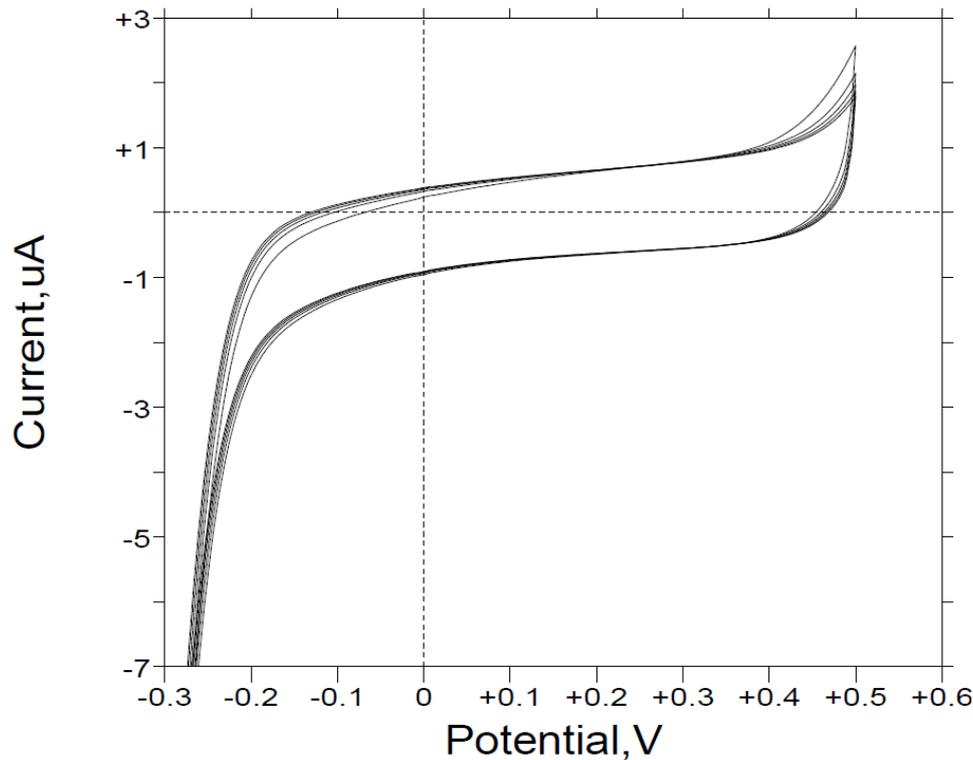


Abbildung 31: CV von NaOCl; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4;
 $v= 50 \text{ mV/s}$, mit O_2 gespült.

Ein deutlich anderes Bild erhält man, wenn man das Natriumanalogon des Calciumhypochlorites, das Natriumhypochlorit ($NaOCl$, Trivialname *Eau de Javel*), an der Glaskohlenstoffelektrode einsetzt. Ein Reduktionssignal ist im entsprechenden CV in Abbildung 31 nicht mehr zu erkennen. Auch ist der Kurvenverlauf deutlich flacher als der des Calciumhypochlorits, die Wasserreduktion startet bereits bei $-0,2 \text{ V}$ und die Oxidation des Wassers beginnt schon bei $+0,4 \text{ V}$ (hier leider schlecht zu erkennen).

Eine wirklich exakte Klärung dieser völlig unterschiedlichen elektrochemischen Verhaltensweisen von $Ca(OCl)_2$ und $NaOCl$ kann nicht eindeutig gegeben werden. Beide Verbindungen sind unter den gegebenen Bedingungen vollständig löslich, wodurch in beiden Versuchsreihen auch vergleichbare Konzentrationen eingesetzt werden

konnten. Auch besitzen beide Verbindungen die identische anionische Gruppe OCl^- , welche, wie alle Hypohalogenide, leicht disproportionieren kann.



Abbildung 32: Disproportionierung von OCl^- zu ClO_3^- und Cl^- .

Die einzige Unterscheidung der beiden Verbindungen liegt, neben den verschiedenen stöchiometrischen Gegebenheiten, im vorhandenen Kation begründet. Allerdings lässt sich das beobachtete Resultat der elektrochemischen Umsetzung beider Verbindungen nicht wirklich durch die Anwesenheit von Natrium- oder Calciumionen bzw. deren Abwesenheit, begründen.

Noch deutlicher ändert sich die Gestalt des CVs beim Einsatz der Goldelektrode. Schon bei der sauerstofffreien Lösung findet sich ein deutlicher Reduktionspeak bei leicht negativem Potential. Dieser Peak ändert auch durch Anreicherung der Lösung mit O_2 nur unwesentlich seine Gestalt oder seine Potentiallage.

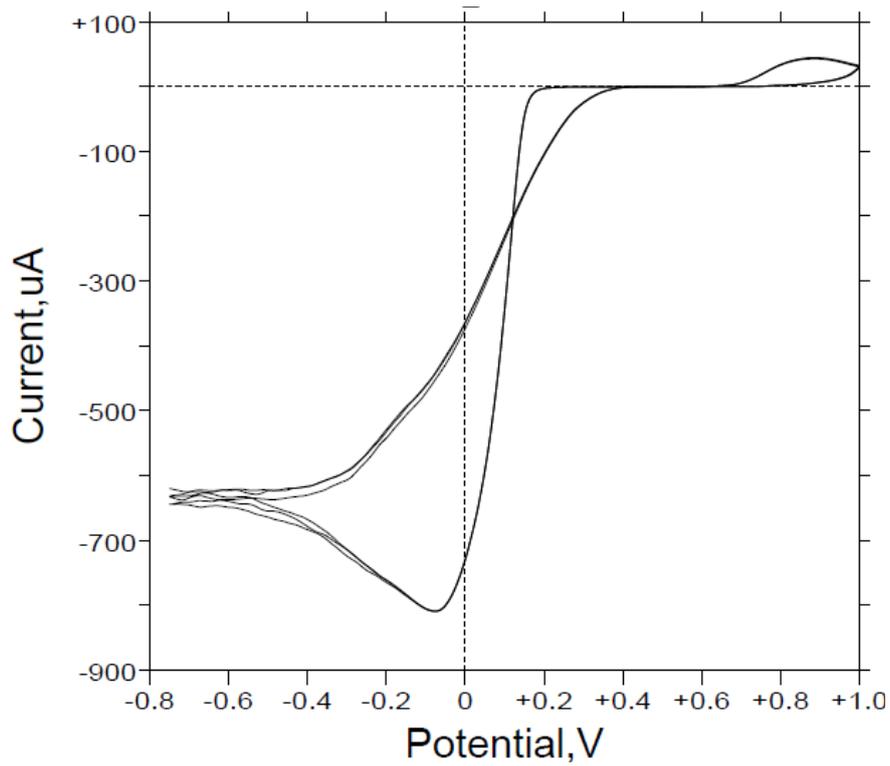


Abbildung 33: CV von NaOCl; Gold als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 10 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült.

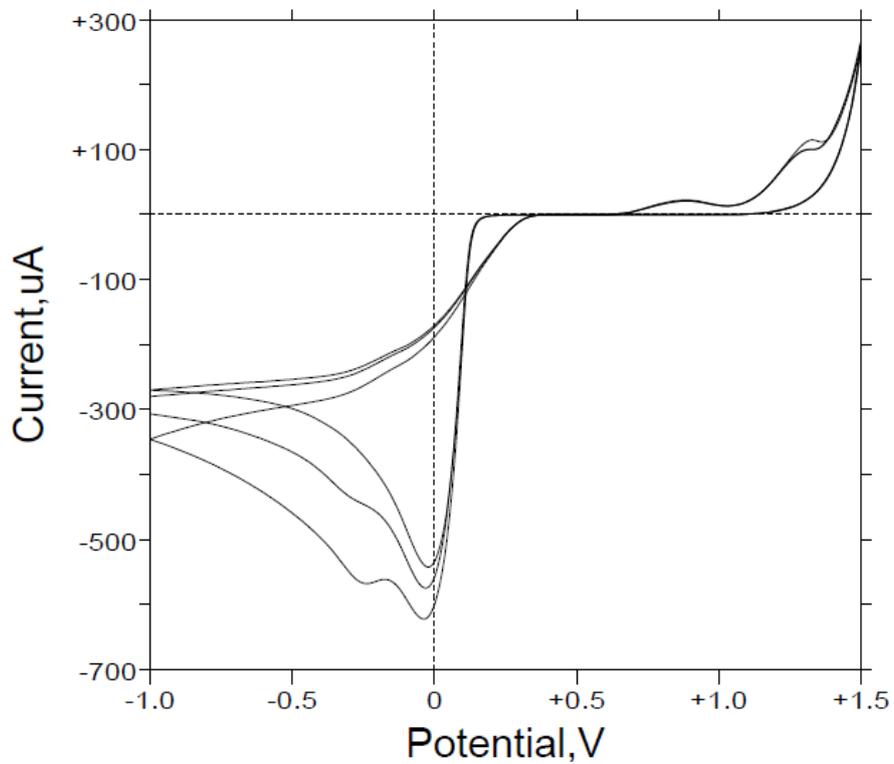


Abbildung 34: CV von NaOCl; Gold als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 10 \text{ mV/s}$, mit O_2 gespült.

Die Signale, die auf der Oxidationsseite nach dem Spülen mit Sauerstoff neu hinzugekommen sind, wurden nicht weiter untersucht. Natriumhypochlorit wurde aufgrund seiner Eigenschaften (zersetzt sich leicht bei Raumtemperatur, ätzend) nicht weiter untersucht, da es für die eigentliche Zielsetzung, dem Einsatz in Dialysemaschinen ungeeignet ist. Jedoch lässt sich festhalten, dass NaOCl, auch in Hinblick auf durchgeführte Experimente mit *E.Coli* und diversen Proteinen, eine hohe Aktivität besitzt und organisches Material mit Unterstützung einer angelegten Spannung tatsächlich zerstören kann.

2.1.4 Erzeugung von ROS in Reinigungslösungen für Dialysegeräte

Wie in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt wurde, lassen sich ROS relativ einfach in einem wässrigen Medium erzeugen. Jedoch spielen der pH-Wert und die Zusammensetzung der Lösung eine große Rolle, bei welchem elektrochemischen Potential die ROS gebildet werden können. So verschiebt ein niedriger pH-Wert das ROS-Signal von -0,75 Volt deutlich hin zu negativeren Werten, eventuell sogar so weit, dass das Signal durch das Reduktionspotential des Wassers gar nicht mehr zu sehen ist.

Da sich solche Verschiebungen je nach Zusammensetzungen der Lösungen sehr stark bemerkbar machen könnten und es in komplexeren Systemen zu ungewünschten Nebenreaktionen durch Redox-aktive Substanzen kommen kann, stellt sich die Frage, ob die von der Firma Fresenius Medical Care innerhalb der Dialyse verwendeten Lösungen geeignet zur Erzeugung von ROS sind, oder nicht.

Die erzeugten Zyklovoltammogramme sollten hierbei nicht die Analyse der Lösung zum Ziel haben und bilden daher nur einen Teil des elektrochemischen Potentialspektrums ab. Eine Auswertung der Redoxsignale der einzelnen Lösungen erfolgt nicht, da die Zielsetzung der elektrochemischen Untersuchungen ganz klar nur auf die Erzeugung von ROS in den untersuchten Lösungsmitteln ausgerichtet war. Dabei sollte vor allem erforscht werden, ob es störende Redoxsignale der Lösemittel im Bereich von 0 bis -1,0 Volt gibt, oder ob diese in dem angegebenen Bereich nicht redoxaktiv sind.

Eine wichtige Komponente innerhalb der Dialyse stellt das verwendete Bicarbonat (Natriumhydrogencarbonat, NaHCO_3) zur Herstellung von flüssigem Bicarbonat-Konzentrat für die Hämodialyse dar.

Das Zyklovoltammogramm aus Abbildung 35 zeigt das erwartete Bild an der Glas-kohlenstoffelektrode. Ein kleiner Oxidationspeak bei ca. 0 Volt ist zu erkennen. Dieses Signal kann von der Oxidation des Bicarbonats zu Peroxodicarbonat, einem starken Oxidationsmittel, welches zur Reinigung von Trinkwasser eingesetzt werden kann, herrühren.^[55]

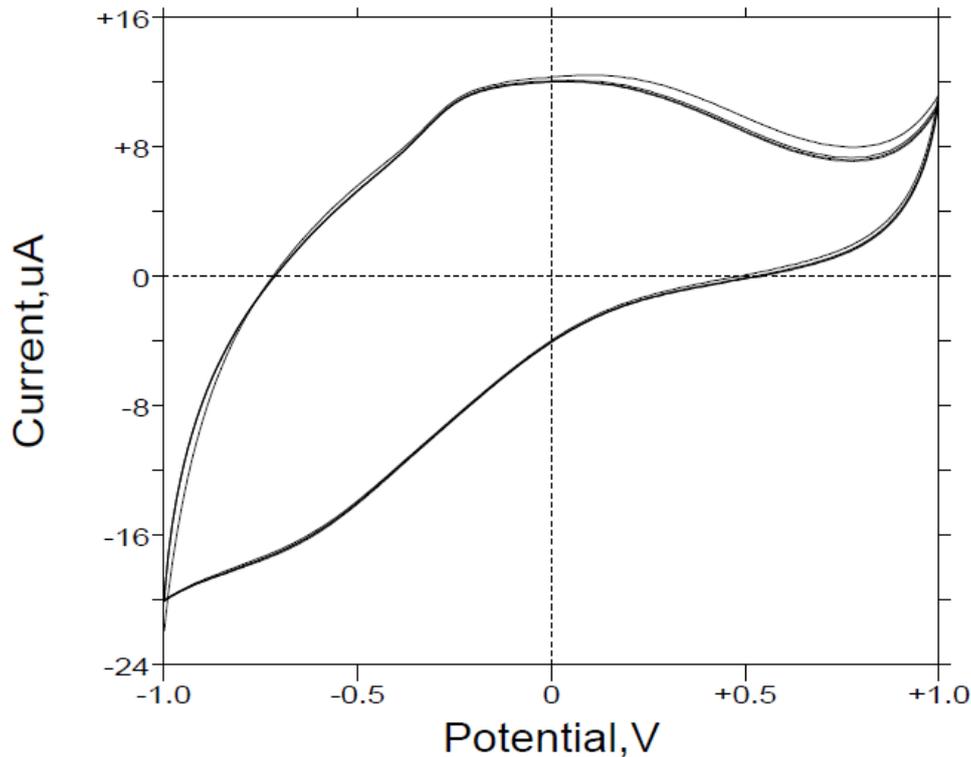


Abbildung 35: CV von NaHCO_3 (bibag) der FMC; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 50 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült.

Störende Signale von Redoxreaktionen im Potentialbereich zwischen 0 und -1 Volt, die die Erzeugung von ROS negativ beeinflussen oder sogar verhindern könnten, lassen sich keine feststellen.

Spült man diese Lösung für 5 Minuten mit reinem Sauerstoff und nimmt dann das CV auf, so erhält man das in Abbildung 36 dargestellte Ergebnis. Die Sauerstoffzugabe führt hier nur zu einem sehr kleinen Reduktionspeak, der deutlich schwächer ausgeprägt ist, als es noch zuvor in den wässrigen Lösungen zu sehen war. Dies ist jedoch nicht weiter störend, da dieses Ergebnis nicht direkt eine quantitative Aussage zur Menge der gebildeten ROS beinhaltet.

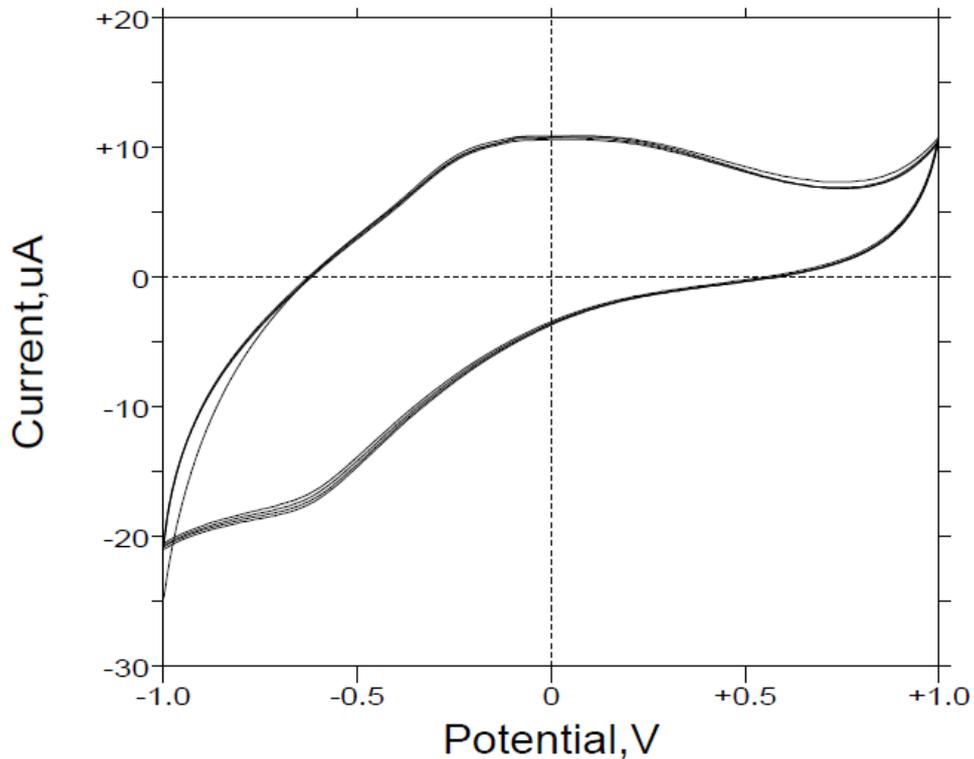


Abbildung 36: CV von NaHCO_3 (bibag) der FMC; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 50 \text{ mV/s}$, mit O_2 gespült.

Die Firma FMC verwendet eine 8,4 %ige Bicarbonat-Lösung unter der Bezeichnung BC-F 8,4 % zum Einsatz in den Dialysemaschinen. Dabei handelt es sich um eine Lösung des festen NaHCO_3 (bibag) mit aufgereinigtem Wasser.

Ein deutlich anderes Resultat wird erhalten, wenn diese Lösung statt mit einer Glaskohlenstoffelektrode mit einer Goldelektrode vermessen wird.

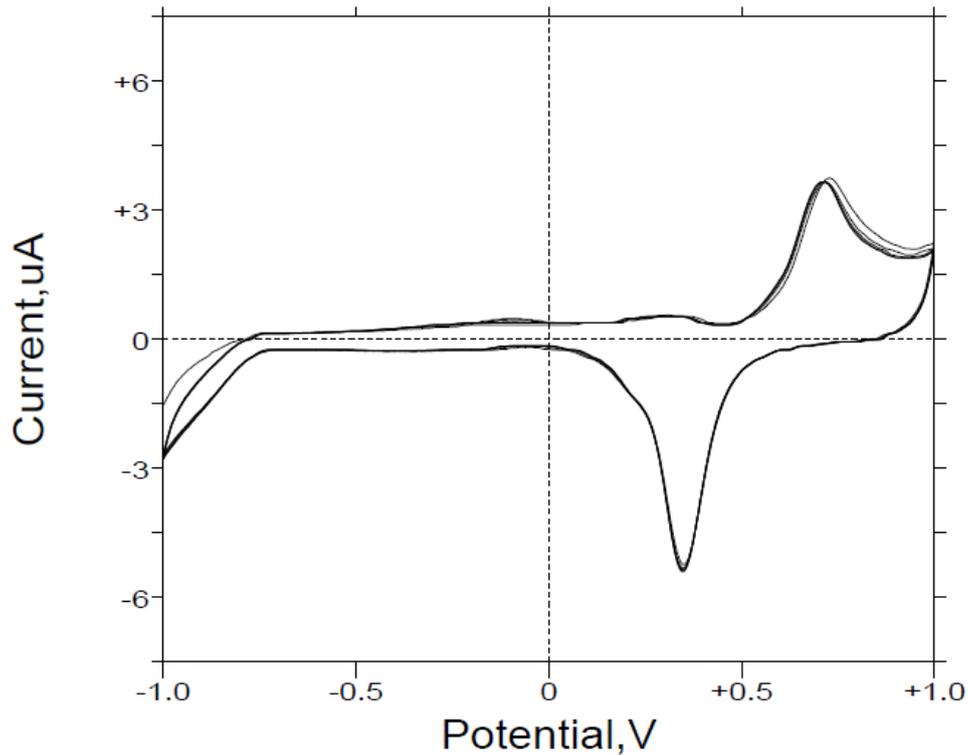


Abbildung 37: CV von BC-F 8,4 % (bibag) der FMC; Gold als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 50$ mV/s, mit N_2 gespült.

Deutlich sind in Abbildung 37 mehrere Redoxsignale zu sehen. Vor allem ein deutliches Reduktionssignal fällt hier ins Auge, welches bei der Verwendung der Glaskohlenstoffelektrode nicht zu erkennen gewesen ist. Dabei stellt sich hier das typische Zyklovoltammogramm einer Goldelektrode mit einem weiten, sehr flachen Bereich zwischen 0 und -0,8 Volt dar. Aber auch hier ist kein störendes Signal im Bereich der ROS-Entwicklung zu sehen.

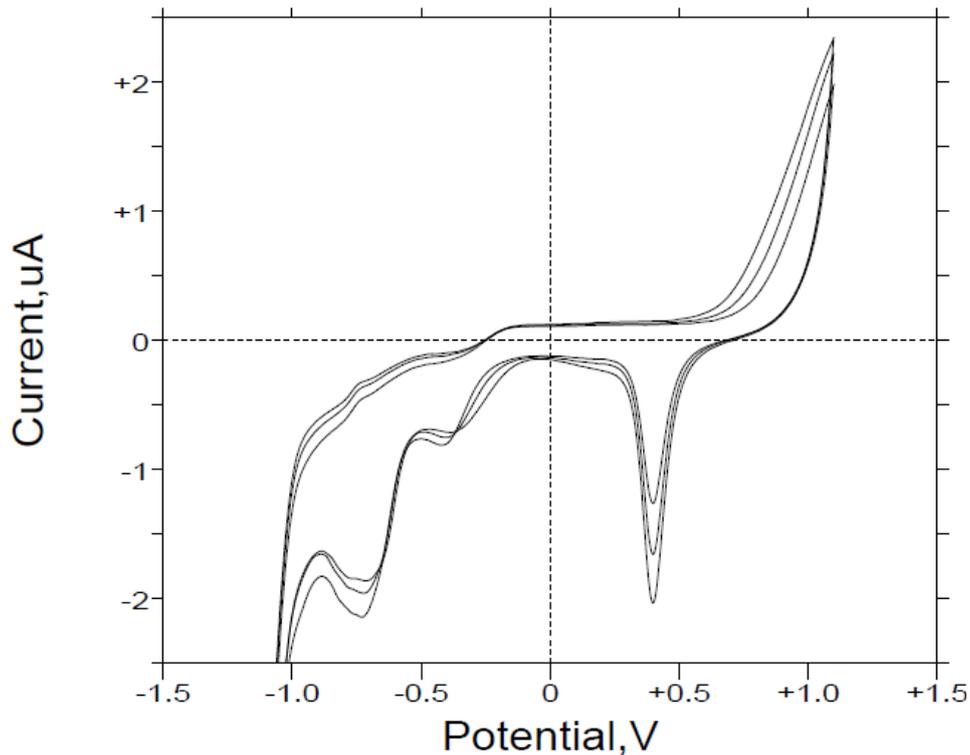


Abbildung 38: CV von BC-F 8,4 % (bibag) der FMC; Gold als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 50 \text{ mV/s}$, mit O_2 gespült.

Ein sehr überraschendes und unerwartetes Ergebnis erhält man, wenn man die Lösung mit Sauerstoff spült. In Abbildung 38 lässt sich nicht nur das ROS-Reduktionssignal bei -0,75 Volt deutlich besser erkennen, als an der Glaskohlenstoffelektrode, sondern ein weiteres Reduktionssignal bei -0,42 Volt ist ebenfalls neu hinzugekommen. Dies lässt sich nur durch eine Reaktion des Sauerstoffs mit Inhaltsstoffen der Lösung erklären.

Da jedoch die benötigten Inhaltsangaben und Analysezertifikate zum jetzigen Zeitpunkt nicht vorliegen, kann keine Aussage zur ablaufenden Reaktion getätigt werden.

Als weitere Lösung, die in der Dialyse zum Einsatz kommt, wurde die saure Konzentratlösung mit der Bezeichnung SK-F 213 (1 + 34) vermessen.

Dieses Konzentrat enthält neben vielen Mineralien und Spurenelementen wie beispielsweise Na^+ , K^+ und Ca^{2+} noch einige andere physiologisch wichtige Inhaltsstoffe, wie z. B. Glukose und Hydrogencarbonat.

Das Zyklovoltammogramm dieser Verbindung an der Goldelektrode ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

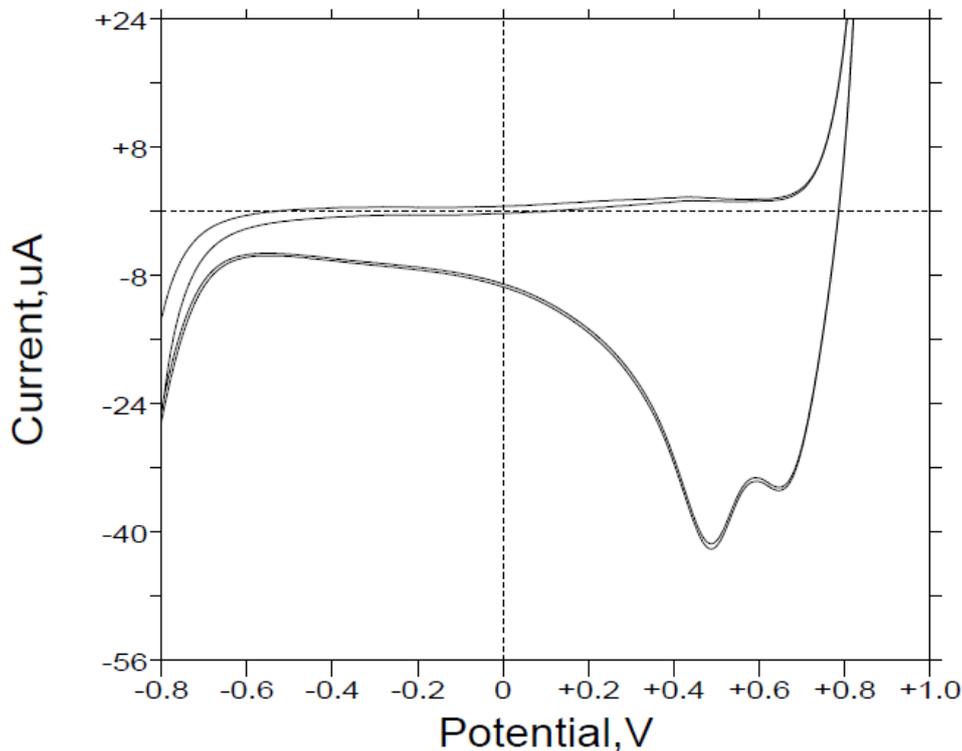


Abbildung 39: CV von SK-F 213 (1 + 34) der FMC; Gold als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 1000 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült.

Die erkennbaren Redoxsignale liegen alle sehr weit von der Stelle der ROS-Bildung entfernt, sodass eine unerwünschte Nebenreaktion eher unwahrscheinlich ist. Jedoch zeigt sich hier, wohl bedingt durch den saueren pH-Wert, dass die Wasserreduktion bereits bei -0,6 Volt einsetzt und damit genau im Bereich der erwarteten ROS-Entwicklung liegt.

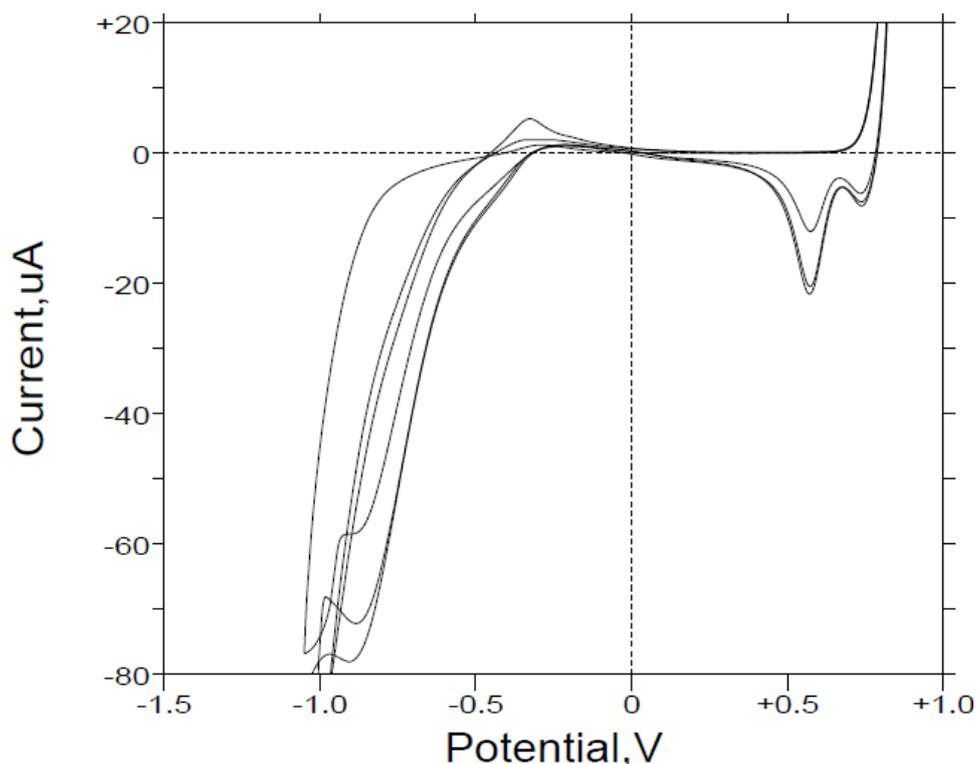


Abbildung 40: CV von SK-F 213 (1 + 34) der FMC; Gold als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 10 \text{ mV/s}$, mit O_2 gespült.

Wie bereits durch die Ergebnisse aus Abbildung 39 zu vermuten war, zeigt das Zyklovoltammogramm in Abbildung 40 eine deutliche Überlappung des Reduktionspeaks der Wasserzerersetzung mit dem Reduktionspeak der ROS-Bildung. Jedoch lässt sich das ROS-Signal immer noch klar erkennen und auswerten.

Eine Besonderheit liegt hier darin, dass der ROS-Peak mit zunehmender Zeit immer kleiner wird, was die Messung bei einer Spannungsvorschubgeschwindigkeit von 10 mV/s deutlich aufgezeigt wird. Dies lässt sich dadurch erklären, dass nach dem Spülen vor Aufnahme des CVs kein zusätzlicher Sauerstoff mehr durch die Lösung geleitet wurde.

Ein kleiner irreversibler Oxidationspeak bei $-0,4 \text{ Volt}$ verschwindet ebenfalls recht schnell.

Neben den beiden bisher gezeigten Dialysierlösungen wurden vor allem auch die Reinigungslösungen, die momentan in Gebrauch sind, elektrochemisch untersucht.

Dabei wurden die Lösungen in der jeweiligen Konzentration eingesetzt, wie sie auch in den Dialysemaschinen zum Einsatz kommen. Allerdings wurde durchgehend bei 20°C gearbeitet, da das elektrochemische Verfahren im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden nicht bei erhöhten Temperaturen angewendet werden soll (s. unten).

Als erstes Reinigungsmittel wurde Citrosteril® elektrochemisch untersucht. Als Hauptkomponenten kommen hierbei Zitronensäure (2-Hydroxypropan-1,2,3-tricarbonsäure) und Milchsäure (auch 2-Hydroxypropionsäure, nach IUPAC soll jedoch 2-Hydroxypropansäure verwendet werden) zur Anwendung. Der pH-Wert der Lösung liegt zwischen 1,7 und 2,0. Citrosteril® dient vor allem zur Entkalkung der Dialysemaschinen und sorgt dafür, dass eventuell vorhandene Blutreste aufgelöst werden. Bei Temperaturen über 60 °C (die Einsatztemperatur beträgt 84 °C) ist Citrosteril® antibakteriell und fungizid und besitzt die Möglichkeit, verschiedene Viren zu inaktivieren, darunter auch HBV, HCV (Hepatitis B und C) und HIV.

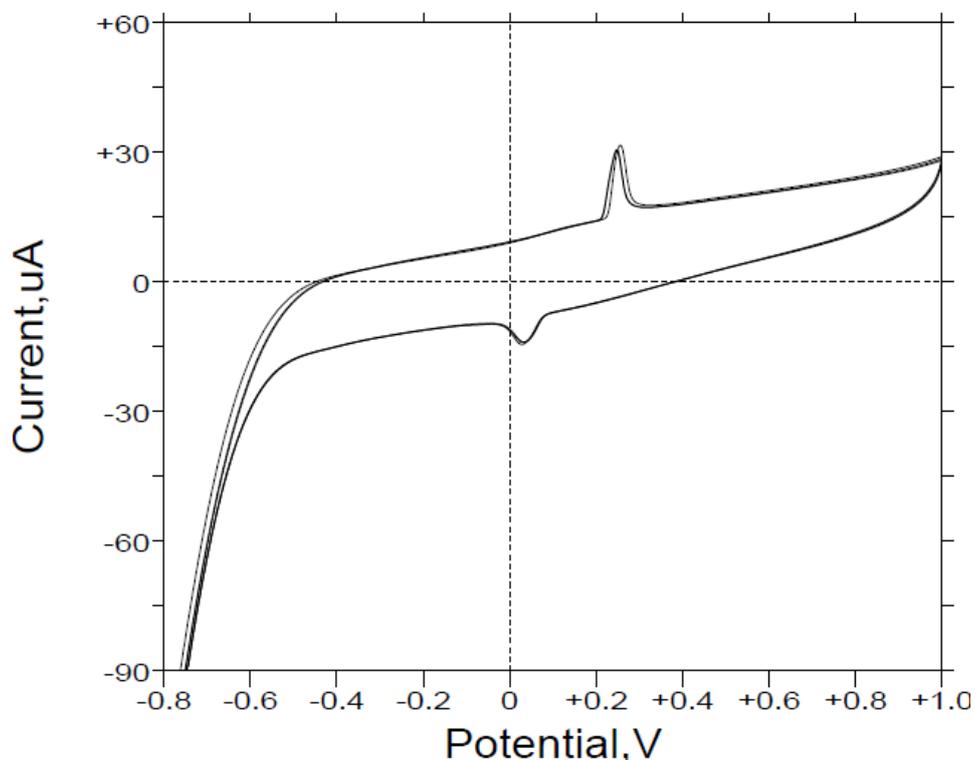


Abbildung 41: CV von 4 % Citrosteril®; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült.

Bis auf zwei kleine Redoxsignale im positiven Potentialbereich sind keine weiteren Signale zu erkennen. Vor allem im Bereich 0 bis -0,6 Volt sind keine störenden Peaks zu sehen. Ab -0,6 Volt setzt dann schon die Wasserzerersetzung ein, was durch den sehr niedrigen pH-Wert der Lösung jedoch auch zu erwarten gewesen ist.

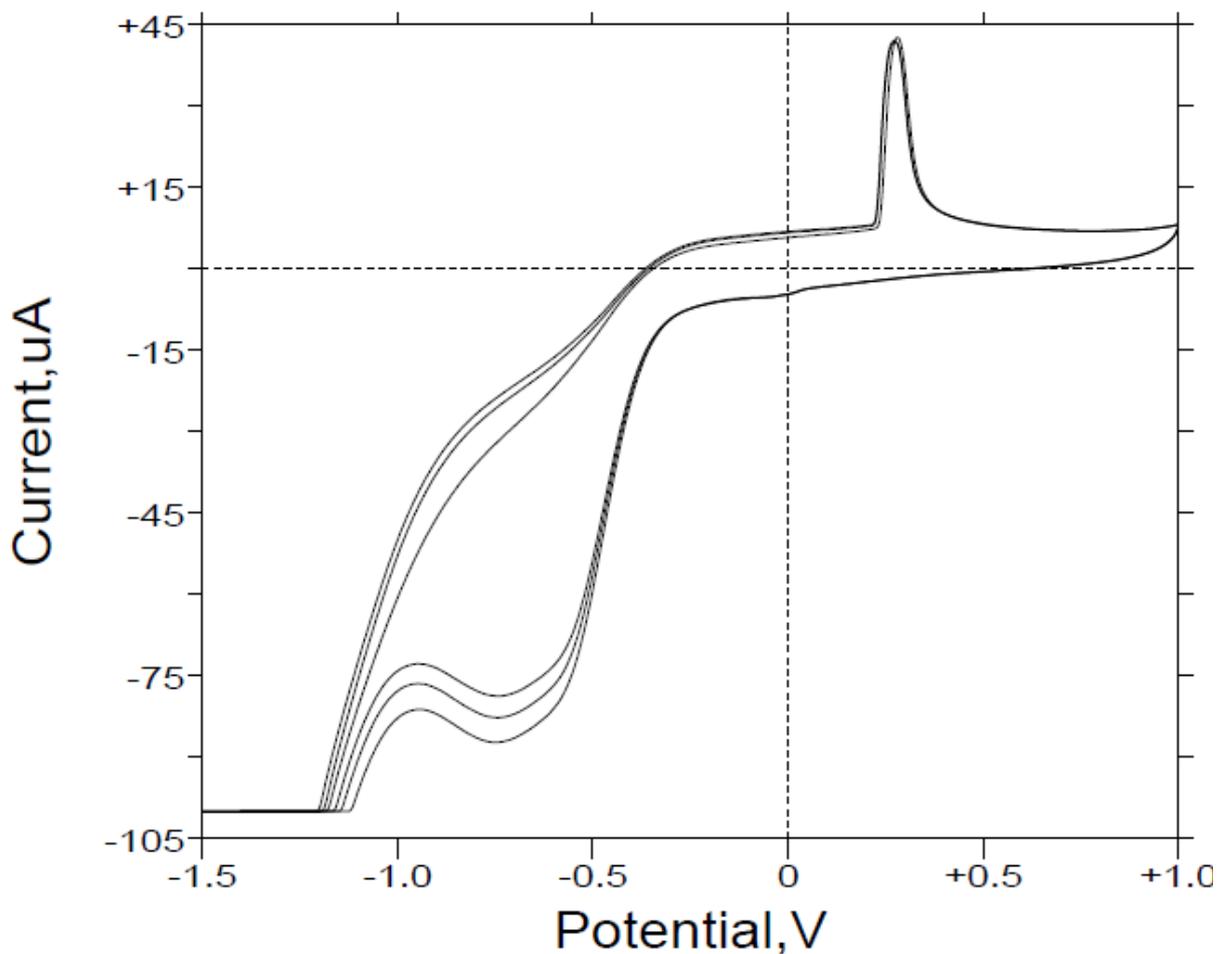


Abbildung 42: CV von 4 % Citrosteril[®]; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 250$ mV/s, mit O₂ gespült.

Abbildung 42 zeigt das CV von Citrosteril[®] nach dem Einleiten von Sauerstoff. Deutliche Unterschiede zu der sauerstofffreien Lösung lassen sich hierbei erkennen. Der deutlich ausgeprägte Reduktionspeak der ROS-Entwicklung ist in dieser Lösung sehr breit und über einen größeren Potentialbereich (von -0,5 bis -0,9 Volt) ausgedehnt. Wirklich interessant ist jedoch das Ergebnis auf der positiven Potentialseite.

Der Oxidationspeak bei +0,3 Volt, der ohne die Zugabe von Sauerstoff sehr klein war, ist nun deutlich angewachsen (von ca. 15 μA auf 30 μA).

Dafür ist der Reduktionspeak zu negativeren Potentialen (von 0,07 Volt auf knapp unter 0 Volt) hin verschoben und fast nicht mehr zu erkennen. Eine Überprüfung dieses Ergebnisses anhand des Analysezertifikates wäre sicher eine gute Möglichkeit, um eine Zuordnung der Peaks gewährleisten zu können.

Als zweite untersuchte Reinigungslösung kam Diasteril[®] zum Einsatz. Diese Lösung wird ähnlich dem Citrosteril[®] zum Entkalken der Dialyseapparatur verwendet (ebenfalls bei einer Temperatur von 84 °C). Hauptbestandteil dieser Lösung ist Glycolsäure (Hydroxyessigsäure), die einfachste α -Hydroxycarbonsäure. Diese Verbindung ist dadurch sehr interessant, da sie eine Hydroxymethylgruppe enthält, die sich wie fast jeder primäre Alkohol zur Carbonsäure oxidieren lassen sollte. Dabei entsteht Oxalsäure (Ethandisäure), die einfachste Dicarbonsäure. Daher sollte im Zyklovoltammogramm auch ein deutlicher Oxidationspeak zu sehen sein.

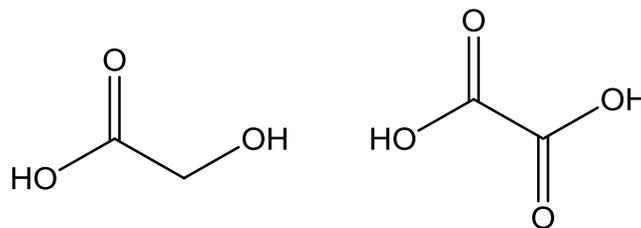


Abbildung 43: Strukturen von Glycolsäure (links) und Oxalsäure (rechts).

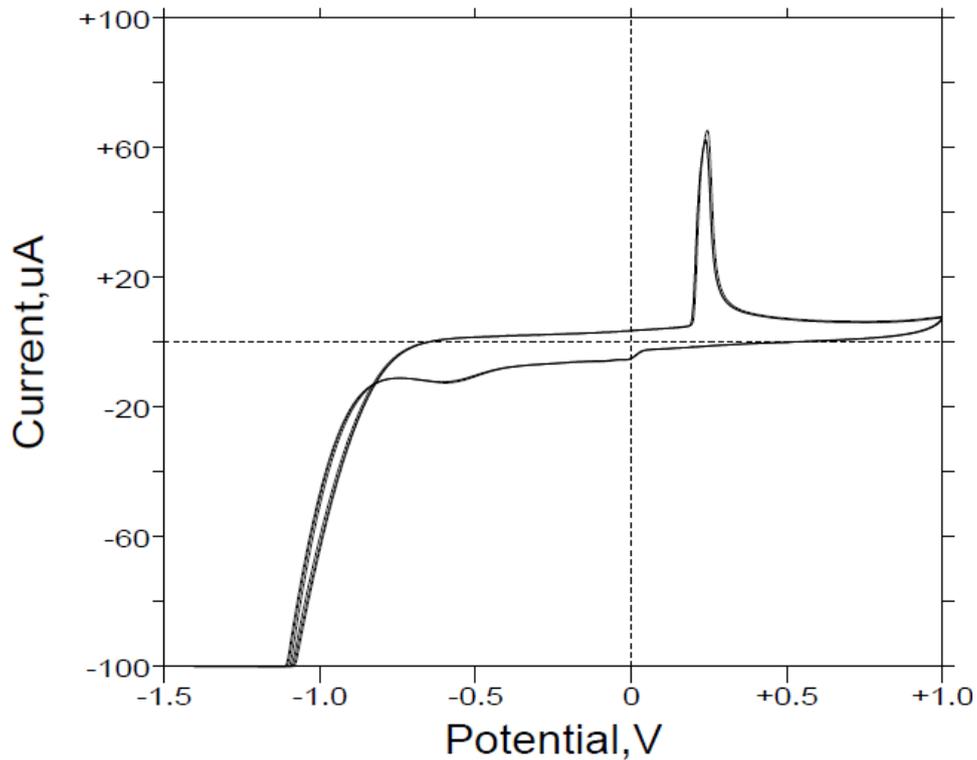


Abbildung 44: CV von 4 % Diasteril[®]; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült.

Wie in Abbildung 44 gut zu erkennen ist, zeigt das CV einen deutlichen Oxidationspeak bei +0,24 Volt. Dieses Oxidationssignal lässt die Vermutung zu, dass hier die Glycolsäure tatsächlich zu Oxalsäure hochoxidiert wird.

Zwei kleinere Reduktionssignale befinden sich im Bereich zwischen 0 und -0,8 Volt, wodurch es nach der Sauerstoffeinleitung zu Konkurrenzreaktionen mit den gebildeten ROS kommen könnte.

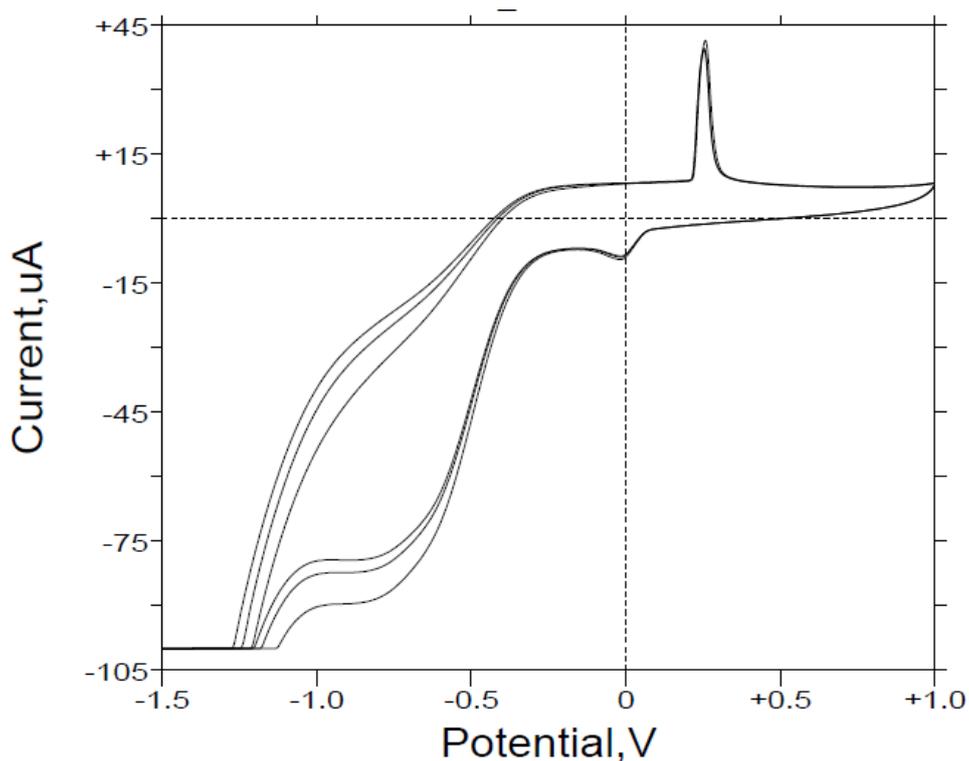


Abbildung 45: CV von 4 % Diasteril[®]; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit O_2 gespült.

Nach dem Spülen mit Sauerstoff erhält man das CV aus Abbildung 45. Der Oxidationspeak ist im Vergleich zur sauerstofffreien Lösung um 0,1 Volt zu positiveren Potentialen hin verschoben und liegt nun zwischen +0,5 und +0,6 Volt. Die Signalstärke nahm dabei jedoch deutlich ab (von ca. $50 \mu\text{A}$ auf $30 \mu\text{A}$).

Der Peak der ROS-Bildung ist sehr gut erkennbar, jedoch vergleichbar mit dem Ergebnis von Citrosteril[®], ist das Signal hier wiederum sehr breit aufgedehnt.

Ein kleiner Reduktionspeak bei 0 Volt, der bei der Messung unter sauerstofffreiem Zustand durchgeführt wurde, ist nun deutlich besser zu erkennen.

Puristeril[®]340 ist die dritte untersuchte Reinigungsflüssigkeit. Anders als in den zuvor untersuchten Reinigungsmitteln sind in dieser Lösung nicht nur eine oder mehrere Säuren enthalten, sondern auch Wasserstoffperoxid. Als Säure wird hierbei Essigsäure (Ethansäure) eingesetzt. Dabei kommt es zur folgenden Reaktion mit Wasserstoffperoxid:



Abbildung 46: Reaktion von Essigsäure mit H₂O₂

Durch die intermediär gebildete Peressigsäure ist Puristeril[®]340 ein potentes, stark antibakteriell und antifungizid wirkendes Reinigungsmittel, welches Blutreste aus der Apparatur herauslösen und sogar Pyrogene (Stoffe, die im menschlichen Körper Entzündungen auslösen können) zerstören kann. Daher muss diese Lösung nicht mehr mit stark erhöhter Temperatur durch die Dialysegeräte gespült werden, sondern 37 °C sind völlig ausreichend für die gewünschte Wirksamkeit.

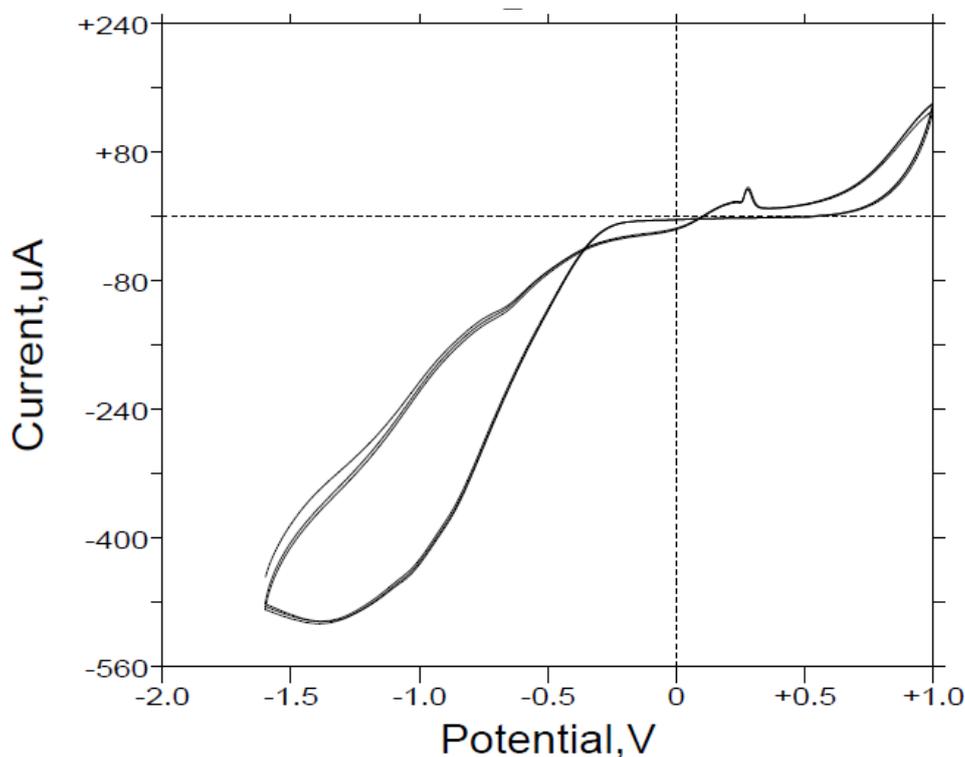


Abbildung 47: CV von 4 % Puristeril[®]340; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit N₂ gespült.

Aufgrund der in Abbildung 46 dargestellten Reaktion ist ein deutliches Reduktionssignal zu erwarten gewesen (Reduktion der Peressigsäure). Dieses Signal lässt sich auch im Bereich von -0,5 bis -1,3 erkennen.

Aufgrund der Breite des dort vorliegenden Reduktionspeaks lassen sich aber mehrere Reduktionen bzw. mehrere Reduktionszwischenstufen vermuten.

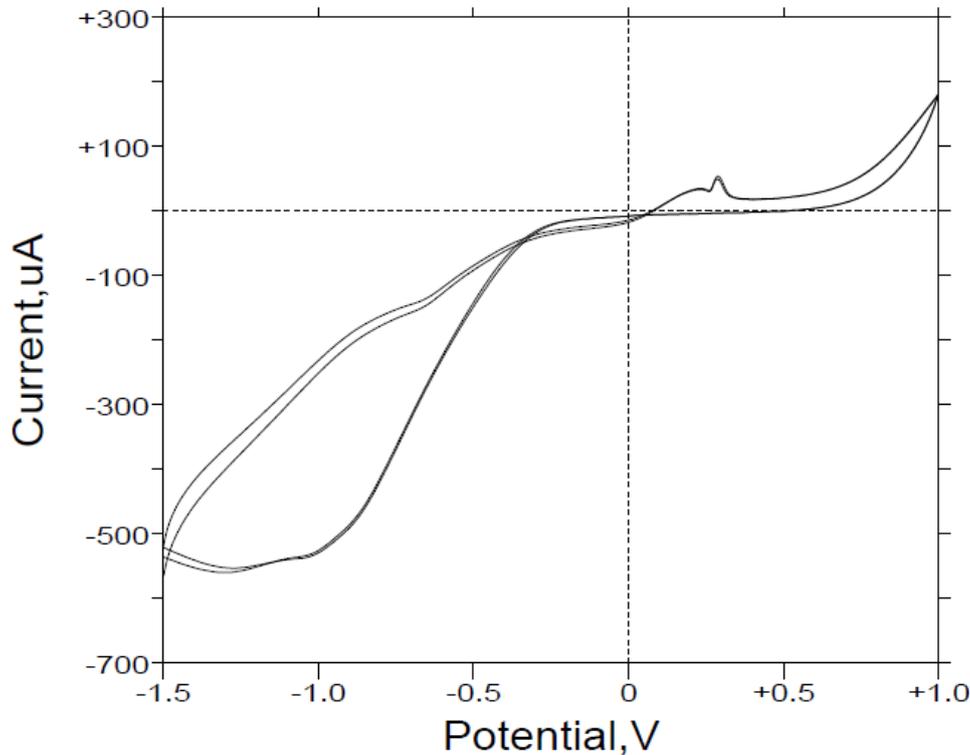


Abbildung 48: CV von 4 % Puristeril[®]340; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250$ mV/s, mit O₂ gespült.

Ausgehend von Abbildung 47 stellt Abbildung 48 eine kleine Überraschung dar. Der ROS-Reduktionspeak ist kaum erkennbar und befindet sich als nur kleine „Ausbeulung“ an dem bereits vorhandenen Reduktionssignal des Puristerils. Jedoch sind in diesem Fall auch die Stromstärken bereit um das 10fache höher, als in den zuvor aufgenommenen CVs der anderen Lösungen.

Eine etwas andere Zusammensetzung (ohne nähere Angaben der FMC) auf Basis von Wasserstoffperoxid und Essigsäure ist in Puristeril[®]plus gegeben.

Auch hier werden durch die Reaktion von Essigsäure mit Wasserstoffperoxid Peressigsäure und Wasser gebildet (die Einsatztemperatur beträgt hierbei ebenfalls 37 °C). Beide Chemikalien zerfallen schon nach kurzer Zeit wieder zu den folgenden unschädlichen Verbindungen.

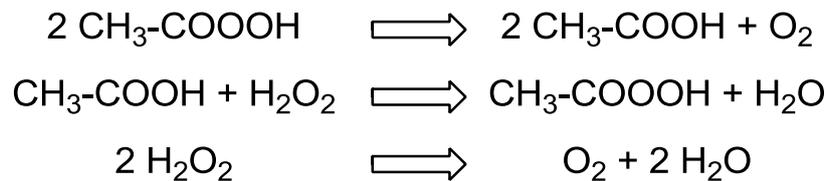


Abbildung 49: Zersetzung von Puristeril[®]plus und Puristeril[®]340

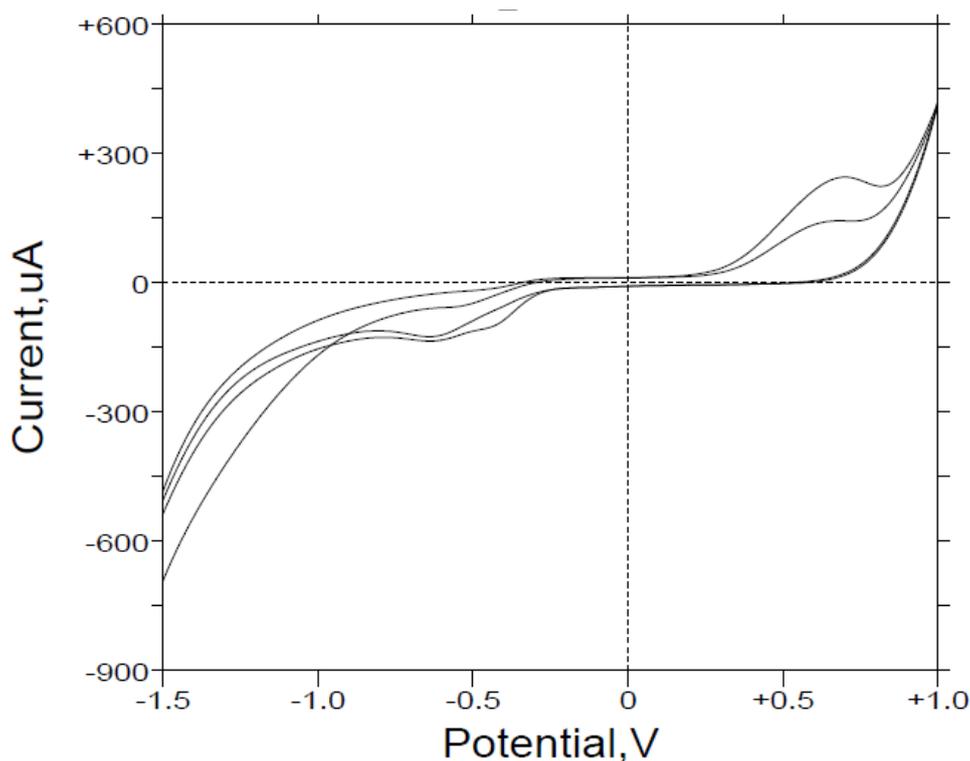


Abbildung 50: CV von 4 % Puristeril[®]plus; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült.

Anders als in Puristeril®340 zeigt sich im CV dieser Lösung kein sehr ausgeprägter Reduktionspeak. Es sind jedoch zwei kleinere Reduktionssignale im Bereich zwischen -0,4 und -0,75 Volt zu erkennen. Auch ein deutlicher Oxidationspeak bei +0,65 Volt war in der zuvor gezeigten Lösung nur sehr schwach vorhanden.

Da die genaue Zusammensetzung der Lösung jedoch unbekannt ist, können diese Redoxsignale nicht auf chemische Gegebenheiten innerhalb des Gemisches angewendet werden.

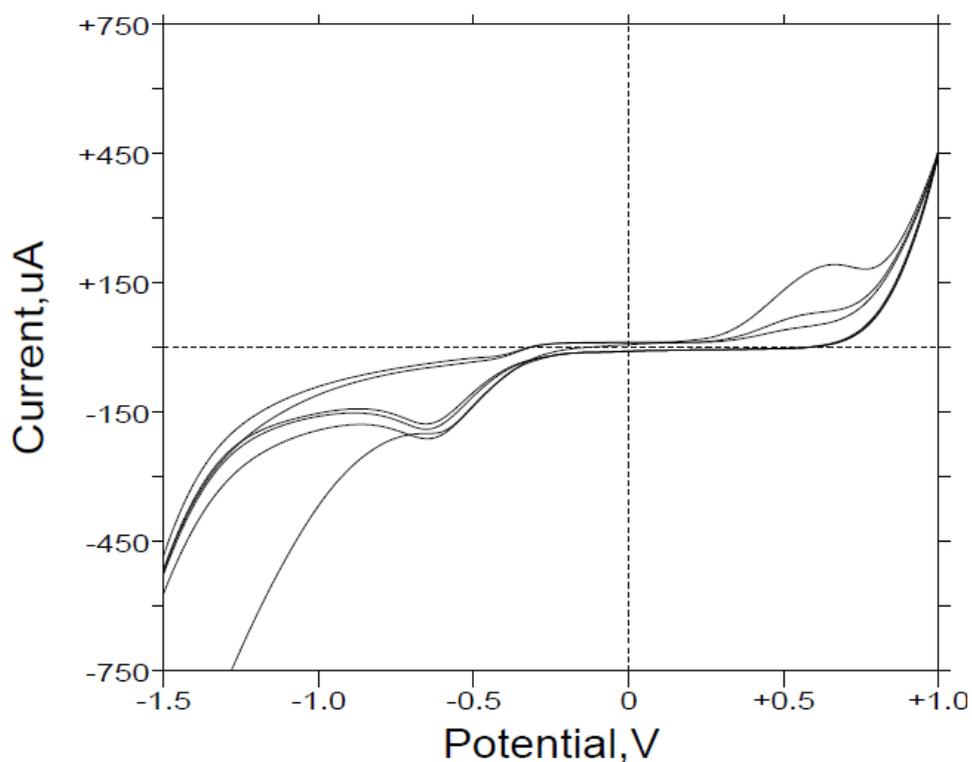


Abbildung 51: CV von 4 % Puristeril®plus; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit O_2 gespült.

Ein deutlicher Reduktionspeak bei -0,6 Volt ist zu erkennen. Auch hier liegt die Stromstärke in etwa im Bereich der Messung des Puristeril®340, jedoch ist hier kein störendes Reduktionssignal vorhanden, dass das Signal der ROS-Bildung überdecken könnte.

Als letztes Reinigungsmittel wurde Sporotal™ 100 untersucht. Dieses Reinigungsgemisch basiert auf Natriumhypochlorid und Kaliumhydroxid. Durch den Reinigungsvorgang wird Chlor freigesetzt, welches dann in der Lage ist, selbst ältere und verwachsene Biofilme aus den Dialyseanlagen zu entfernen.

Dabei kann das gebildete Chlor auch mit den Zellproteinen der Bakterien reagieren, sodass diese Lösung auch antibakterielle Eigenschaften aufweist. Durch die Bildung von hypochloriger Säure und deren Reaktion im Basischen zu Sauerstoff verfügt dieses Gemisch auch über die Möglichkeit, Mikroorganismen durch den Einfluss des starken Oxidationsmittels Sauerstoff abzutöten. Da Sporotal™ 100 jedoch nicht sehr material- und umweltschonend ist und nicht sehr lange gelagert werden kann, wäre dies wohl das erste Chemikaliengemisch, dass bei der Entwicklung einer neuen Reinigungsmethode ersetzt werden würde.

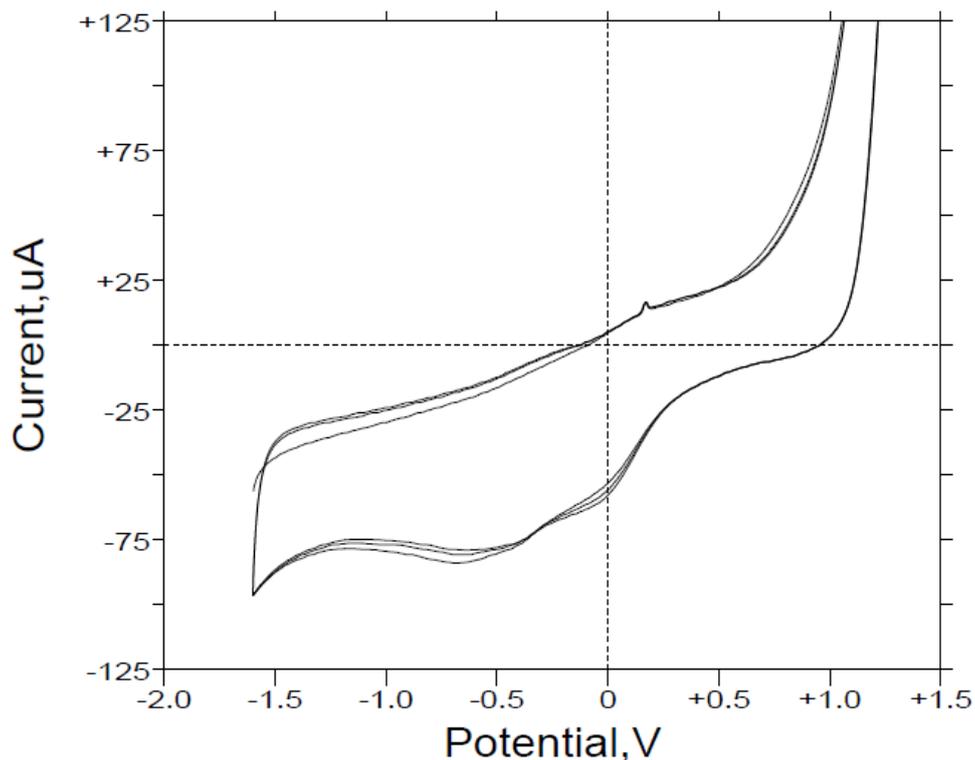


Abbildung 52: CV von 5 % Sporotal™ 100; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült.

Abbildung 52 zeigt einige kleinere Redoxsignale im CV des Sporotal™ 100. Hierbei sind vor allem die beiden Reduktionspeaks im Bereich von +0,1 bis -1,0 Volt interessant, da sie im gleichen Bereich wie ROS liegen und ineinander übergehen.

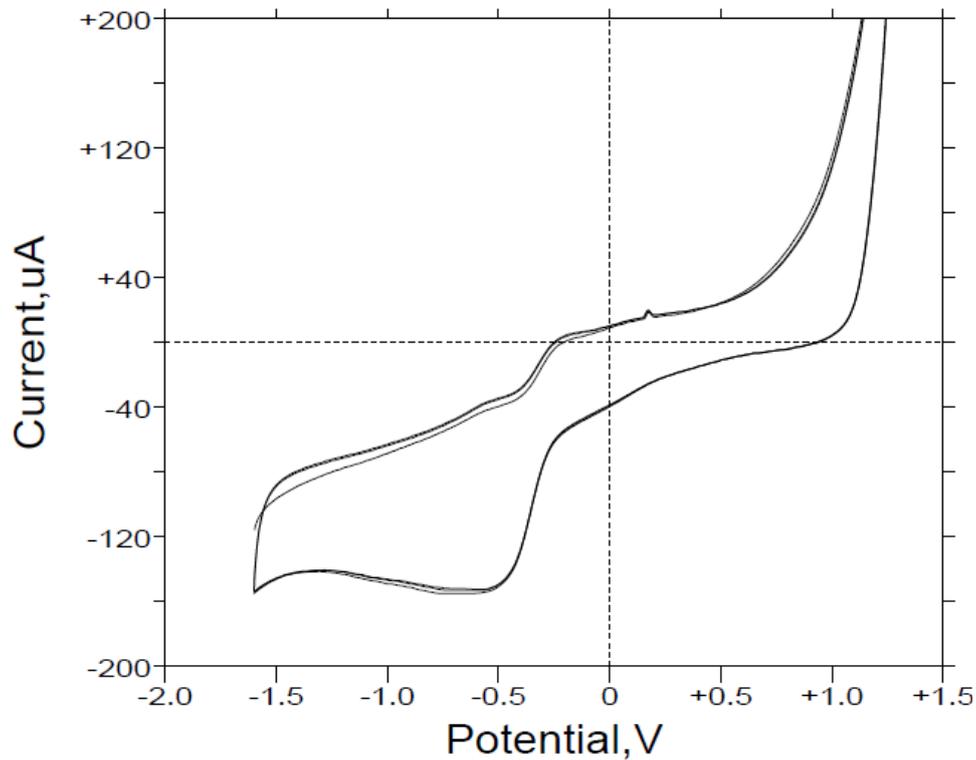


Abbildung 53: CV von 5 % Sporotal™ 100; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 250 \text{ mV/s}$, mit O_2 gespült.

Aus den beiden Reduktionssignalen, die in Abbildung 52 zu sehen waren, wurde unter dem Einfluss von Sauerstoff ein einziges Signal beim -0,5 Volt gebildet. Auch der Kurvenverlauf des CVs hat sich leicht verändert.

Konkurrenzreaktionen oder weitere Redoxreaktionen sind nicht zu erkennen.

Als Fazit dieses Abschnitts lässt sich sagen, dass alle Lösungen, die zur Reinigung der Dialysemaschinen von der Firma Fresenius Medical Care eingesetzt werden, als Basislösungen verwendet werden können, um ROS elektrochemisch zu erzeugen.

Bei keiner der untersuchten Lösungen kam es zu nachweisbaren Konkurrenzreaktionen, noch wurde die ROS-Bildung durch den Einfluss der Lösungen verhindert. Es wäre daher möglich, eine elektrochemische Reinigungsmethode zu entwickeln, die die Eigenschaften von ROS und gleichzeitig die Eigenschaften der Reinigungslösungen ausnutzt.

2.1.5 Erzeugung von ROS mithilfe von chemischen Sauerstofflieferanten

Die in den vorangehenden Abschnitten abgebildeten Ergebnisse haben gezeigt, dass sich die Bildung von ROS nicht ohne Weiteres durch Zugabe von relativ einfachen Sauerstoffverbindungen steigern lässt. Dabei wurden bisher jedoch nur Verbindungen verwendet, in denen der Sauerstoff als Oxid die Oxidationsstufe -2 besitzt. O^{2-} ist ein sehr stabiles Ion mit 8 Valenzelektronen, das durch Erfüllen der Oktettregel kein großes Bestreben mehr aufweist, chemisch weiter zu reagieren.

Es ist daher sicher, dass O^{2-} nicht weiter mithilfe der in den vorangegangenen Abschnitten aufgezeigten Versuchsaufbauten reduziert und nur sehr schwer oxidiert werden kann. Die Frage, die sich nun stellt, ist, ob es für unsere elektrochemische Umwandlungen (Reduktion von O_2 , Bildung von ROS) hilfreiche chemische Verbindungen gibt, die Sauerstoff in einer anderen Oxidationsstufe enthalten, als in der des Oxides.

Diese Frage lässt sich ganz eindeutig bejahen.

Verbindungen, die Sauerstoff in der Oxidationsstufe -1 enthalten, nennt man Peroxide. Als Beispiel hierfür dient das im Laboralltag häufig vorkommende Wasserstoffperoxid H_2O_2 . Befindet sich Sauerstoff in der formalen Oxidationsstufe -1/2, so spricht man von Superoxiden. Als einfache Beispiele für diese Verbindungsklasse sollen hier das Kaliumsuperoxid KO_2 und das Natriumanaloga Natriumsuperoxid NaO_2 dienen. Unter Verwendung dieser Verbindungen wurden weitere Experimente durchgeführt, mit dem Ziel, verstärkt ROS zu bilden. Außerdem wurde versucht, die Erzeugung von ROS bereits bei weniger negativen Spannungen ablaufen zu lassen.

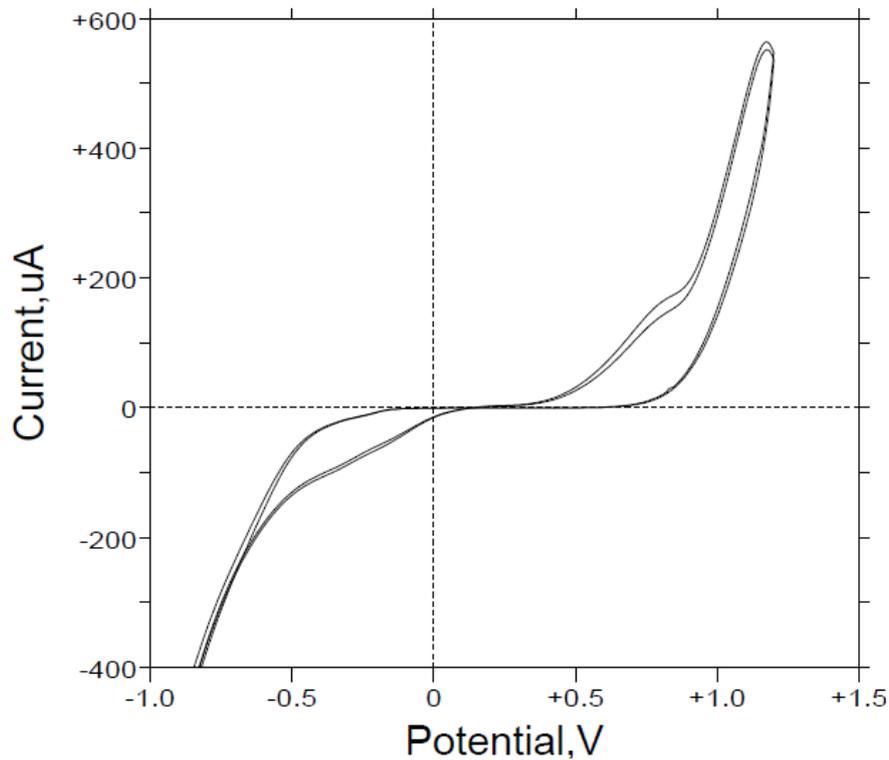


Abbildung 54: CV von 1M H₂O₂; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 50 mV/s, mit N₂ gespült.

Nach 5 Minuten Spülen einer 1 M Lösung von Wasserstoffperoxid mit Phosphatpuffer bei pH 7,4 wurde mithilfe der Glaskohlenstoffelektrode als AE das CV aus Abbildung 54 aufgenommen. Es fällt dabei ein nur sehr kleiner Reduktionspeak im Bereich von etwa 0,0 bis -0,55 V auf, der jedoch nicht eindeutig dem ROS-Reduktionspeak zugeordnet werden kann. Der kleine Oxidationspeak zwischen +0,5 und +1,0 V könnte auf die Oxidation von H₂O₂ zu O₂ hindeuten. Diese These wird dadurch gestärkt, dass in diesem System keine weiteren Reduktions- oder Oxidationsmittel zu finden sind.

Spült man die Lösung von H₂O₂ und Phosphatpuffer vor der elektrochemischen Untersuchung 5 Minuten mit Sauerstoff, so erhält man folgendes Ergebnis:

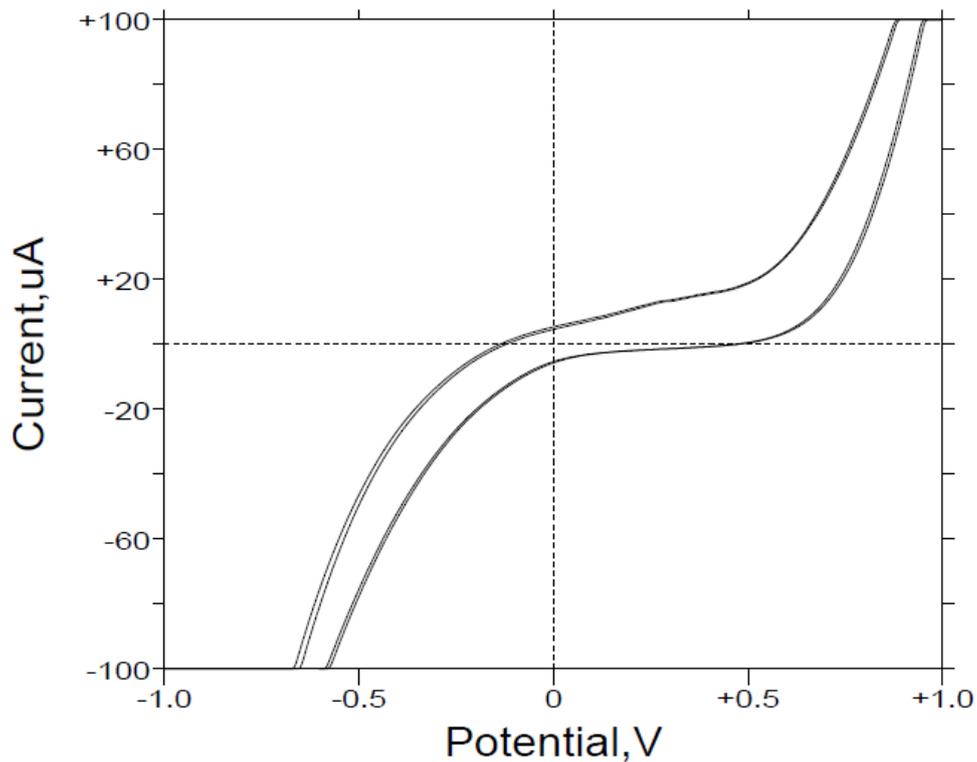


Abbildung 55: CV von 1M H₂O₂; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 100 mV/s, mit O₂ gespült.

Man erkennt einen deutlich veränderten Kurvenverlauf, der vor allem auch durch die signifikant früher abfallende Reduktionskurve auffällt. Vergleicht man diese Kurve mit der Kurve aus Abbildung 54, so erkennt man, dass durch die Anwesenheit von Sauerstoff das Zyklovoltammogramm bereits ab ca. -0,25 Volt zu negativen Strömen hin abzufallen beginnt. Die Reduktion des Sauerstoffes ist hier nicht zu erkennen, da die Zersetzung des Wassers und die Reduktion von H₂O₂ zu H₂O bereits bei der erwarteten Spannung von -0,75 Volt im vollen Gange sind. Trotzdem lassen sich Proteine und *E.Coli* Bakterien durch Zugabe von nur sehr wenig Wasserstoffperoxid (unter 1 %) mithilfe elektrochemischer Methoden deutlich besser angreifen, als nur durch Zugabe von Sauerstoff.

Der Kurvenverlauf in Anwesenheit von Sauerstoff ist deutlich flacher, ohne die bei Zugabe von Stickstoff erkennbaren deutlichen Peaks, nur bei ca. +0,45 Volt ist ein kleiner Oxidationspeak zu erkennen, der jedoch signifikant kleiner ausfällt als noch zuvor nach der Spülung mit Stickstoff. (Anmerkung: Die hier verwendete Methode zur Spülung liefert keine absolut sauerstofffreien Lösungen).

Exkurs:

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt, kann die Erzeugung von H_2O_2 auf elektrochemischem Wege erfolgen. Dabei erfolgt die Bildung von H_2O_2 durch Elektrolyse allerdings nicht durch Reduktion von O_2 . Vielmehr wird Schwefelsäure oxidiert, und über die Zwischenstufe Peroxodischwefelsäure ($H_2S_2O_8$), und anschließende Hydrolyse von $S_2O_8^{2-}$ in Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid umgewandelt.

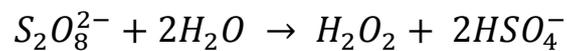
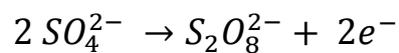


Abbildung 56: Erzeugung von H_2O_2 durch Elektrolyse aus Schwefelsäure.

Heutzutage erfolgt die Bildung von H_2O_2 doch zumeist über das sogenannte Anthrachinon-Verfahren, in welchem Anthrahydrochinon unter Druck mit Luftsauerstoff zu Anthrachinon und Wasserstoffperoxid umgesetzt wird. Die vereinfachte Bruttogleichung lautet hierfür:

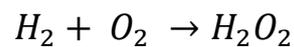


Abbildung 57: Bruttogleichung Anthrachinon-Verfahren.

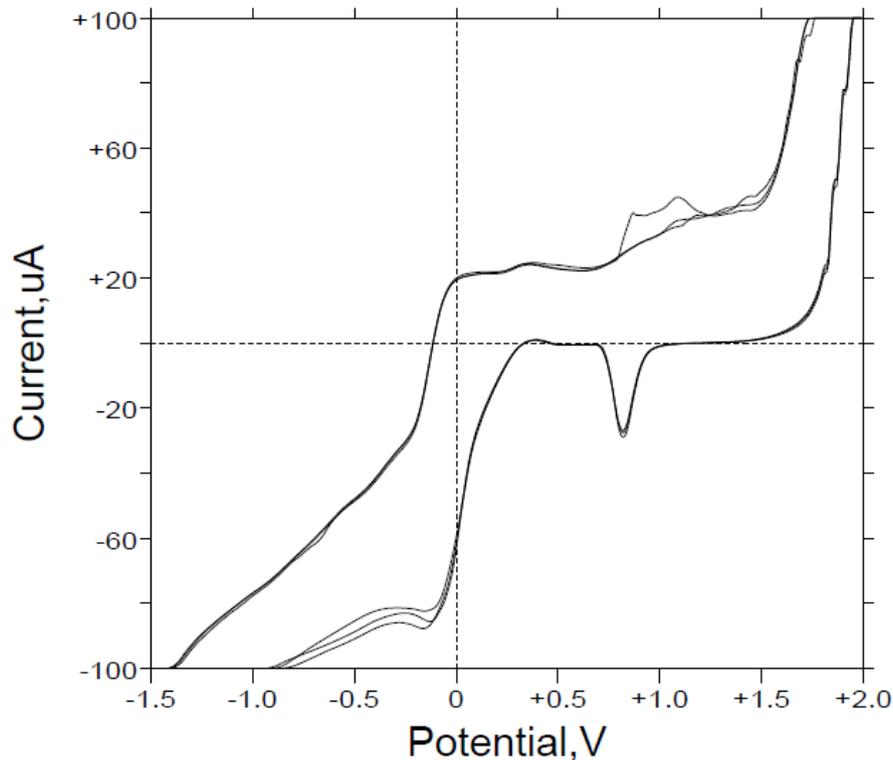


Abbildung 58: CV von Na_2O_2 ; Gold als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 50 \text{ mV/s}$, mit O_2 gespült.

Das Zyklovoltammogramm aus Abbildung 58 von Natriumperoxid an der Gold-elektrode zeigt einen deutlichen Peak bei ca. -0,15 Volt, der auf die Erzeugung von ROS hindeutet. Leider lässt sich der weitere Verlauf der Reduktionskurve nicht weiter verfolgen, da es wegen eines Softwarefehlers nicht immer möglich war, CVs mit Strömen negativer als $100 \mu\text{A}$ aufzunehmen.

Das CV mit Glaskohlenstoff als AE zeigt einen ähnlichen Verlauf. Auch wenn die Wasserzersetzung bei Gold in diesem Falle deutlich später einsetzt als bei Glaskohlenstoff, lässt sich auch hier sehen, dass Gold eher ungeeignet als Elektrodenmaterial ist, wenn das Augenmerk vor allem auf eine bestimmte Reaktion gerichtet werden soll, da Gold doch auch einige andere Nebenreaktionen unterstützen kann.

Superoxide zersetzen sich in der Regel schon beim Lösen in Wasser unter Abgabe von Sauerstoff:



Abbildung 59: Zersetzung von Superoxiden in Wasser

Dies führt nun zu der einfachen Überlegung, dass die Zugabe eines Superoxids zu der wässrigen Lösung den Sauerstoffgehalt des Wassers zumindest leicht nach oben bewegen sollte. Sowohl das Natrium- als auch das Kaliumsuperoxid sind leicht zu handhabende, gelbe Feststoffe, die mit Wasser teils sehr heftig reagieren können. Kleinere Mengen lassen sich jedoch problemlos lösen.

Das Natriumsuperoxid wurde nach dem Öffnen der Originalverpackung unter Stickstoff luftdicht und wasserfrei in einem Schlenkkolben gelagert. Es reagierte nicht heftig mit Wasser, sondern löste sich nur sehr langsam auf. Daher besteht die Möglichkeit, dass das Natriumsuperoxid mit sich selbst reagiert hat:

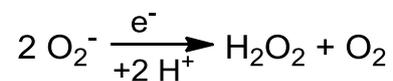


Abbildung 60: Reaktion des Superoxids zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff.

Das Kaliumsuperoxid wurde direkt aus der Originalverpackung entnommen, die vorher noch ungeöffnet war. Dieses Pulver reagierte mit einer sehr heftigen Reaktion mit dem Wasser/Puffergemisch.

Die Zyklovoltammogramme der beiden Verbindungen zeigten allerdings die gleichen Gegebenheiten, sodass hier nur die beiden CVs von KO_2 kurz besprochen werden sollen.

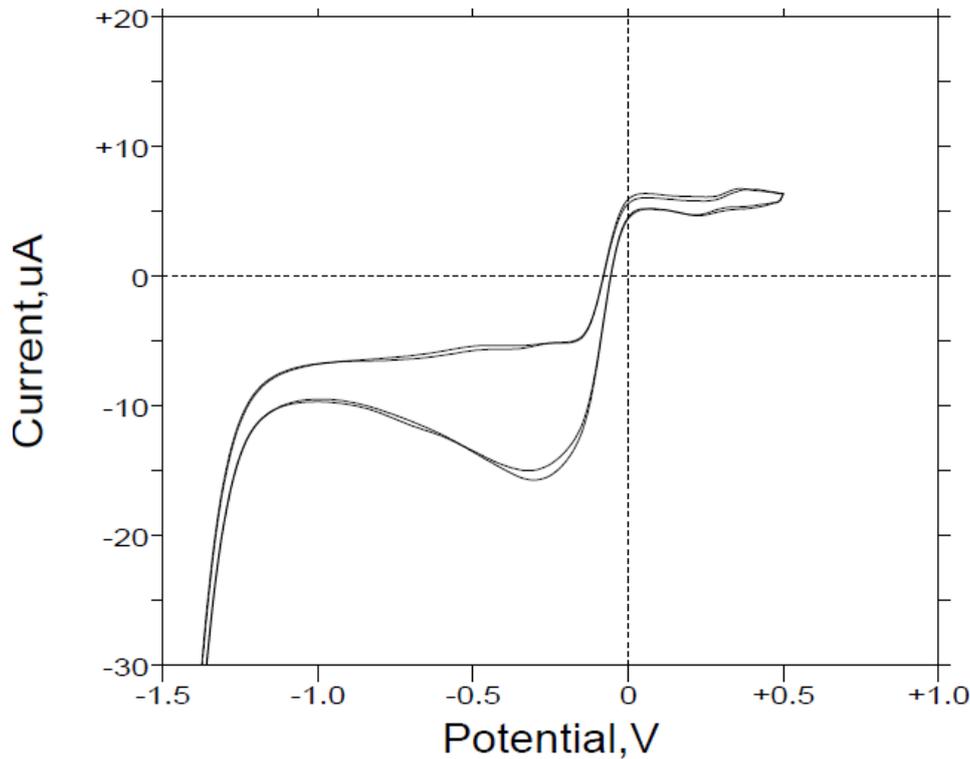


Abbildung 61: CV von KO_2 (0,5 M); Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 10 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült.

Gibt man alleine KO_2 in das Wasser/Puffergemisch und spült diese Lösung danach für fünf Minuten mit Stickstoff, so zeigt sich ein deutlicher Reduktionspeak bei etwa -0,3 Volt. Wirklich bemerkenswert an diesem Peak ist seine Lage bei nur sehr gering negativen Potentialen. Die Reduktion läuft also schon bei sehr milden Bedingungen ab. Bei der Zersetzung von KO_2 entstehen KOH , H_2O_2 und Sauerstoff. Alle diese gebildeten Substanzen sind in der Lage, elektrochemisch ROS zu erzeugen. Die Vermutung liegt daher nahe, dass dieser Peak die Entstehung von ROS aufzeigt, auch wenn das Potential deutlich von demjenigen entfernt liegt, bei welchem durch Reduktion von Sauerstoff ROS in Wasser erzeugt werden.

Spült man die Lösung von KO_2 mit Sauerstoff, so zeigt sich wieder ein ähnliches Ergebnis, wie es auch schon in Abbildung 61 zu sehen war. Auch hier ist ein deutlicher Reduktionspeak zusehen, der sich ebenfalls im gleichen Potentialbereich befindet. Ein neuer Peak durch die Zugabe von Sauerstoff lässt sich nicht ausmachen, sodass man nun davon ausgehen kann, dass die Erzeugung von ROS in diesem System wirklich schon bei etwa -0,3 Volt stattfindet.

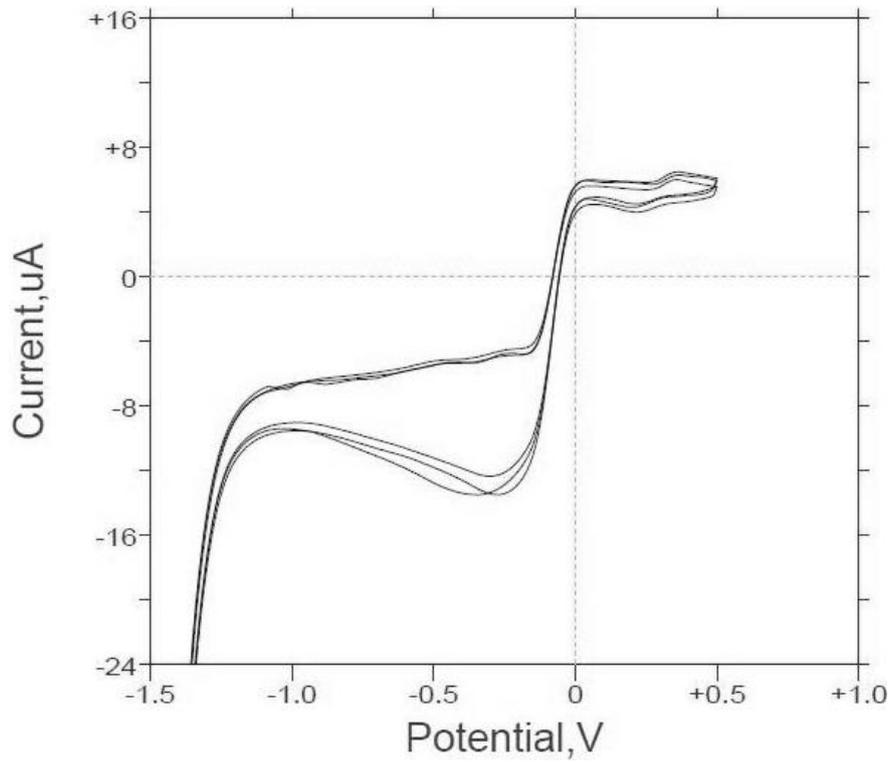


Abbildung 62: CV von KO_2 (0,5 M); Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 10 \text{ mV/s}$, mit O_2 gespült.

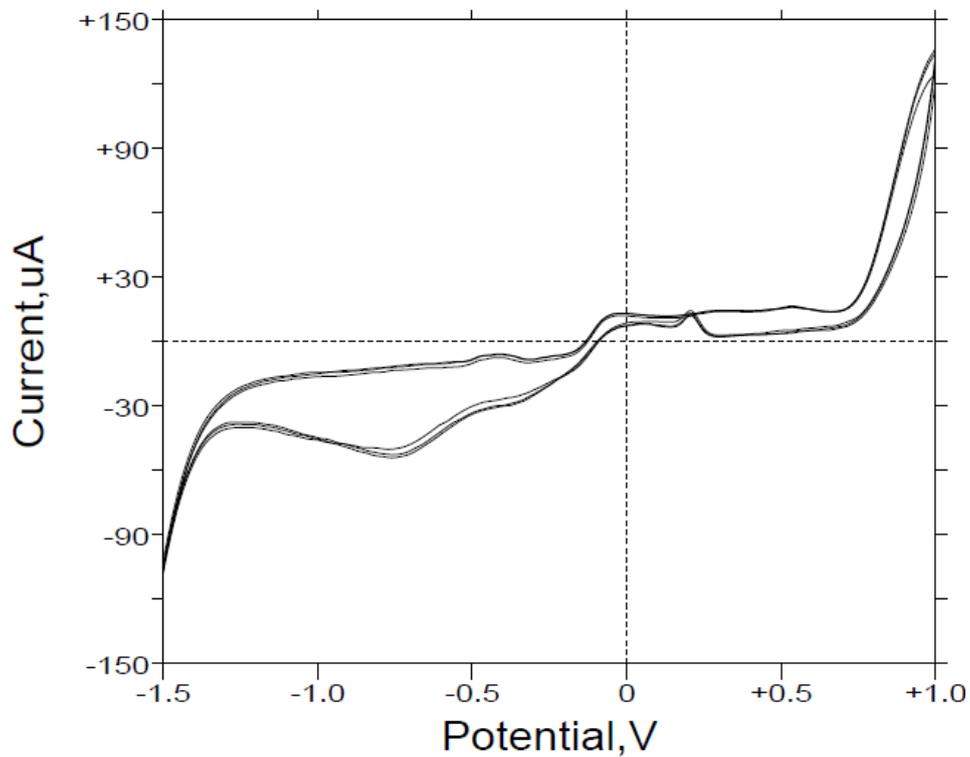


Abbildung 63: CV von KO_2 (0,5 M); H_2O_2 (0,5 M), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 50 \text{ mV/s}$, mit O_2 gespült.

Gibt man Wasserstoffperoxid hinzu, so erhält man das CV aus Abbildung 63. Die Grundform des CVs entspricht in etwa demjenigen des KO_2 . Allerdings lassen sich nun zwei unterschiedliche Reduktionspeaks erkennen, die beide deutlich voneinander getrennt auftauchen. Der erste Reduktionspeak liegt wieder bei ca. -0,3 Volt, der Zweite jedoch bei etwa -0,75 Volt. Auch lässt sich jetzt ein kleiner Oxidationspeak ebenfalls bei -0,3 Volt erkennen.

Eine genaue Auswertung der CVs kann nur erfolgen, wenn die Art der vorliegenden Teilchen und ihre Reaktionen innerhalb der elektrochemischen Messung genau bekannt sind. Dann lassen sich auch die Peaks einzelnen Substanzen bzw. Substanzgruppen direkt zuordnen. Da eine solche multifraktionelle und zeitabhängige Analytik jedoch einen großen instrumentellen Aufwand erfordert (z. B. stopped flow Analyse) konnte die Zusammensetzung dieser Lösung nicht weiter verfolgt werden.

In dem folgenden Kapitel 2.2 Biologische Aktivität von ROS wird die Wirkung der erzeugten ROS auf biologische Substanzen dargestellt und auch ein chemischer Nachweis über das tatsächliche Vorliegen von ROS in den elektrochemischen Zellen beschrieben.

Einzelnachweise der verschiedenen ROS wie z. B. O_2^- , H_2O_2 , HO^\cdot , etc. gestalten sich jedoch als außerordentlich schwierig, da:

- nur sehr geringe Mengen (nahe der Elektroden) erzeugt werden
- die meisten ROS instabil sind und unter den herrschenden Bedingungen sehr schnell zerfallen (Lebensdauer von nur wenigen ns bis ms)
- für die meisten ROS keine eindeutigen elektrochemischen Signaturen und Potentiale vorliegen
- für die meisten ROS keine spezifische chemische Nachweismethoden vorliegen (ein Beispiel wäre 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat ($\text{H}_2\text{-DCF-DA}$)).

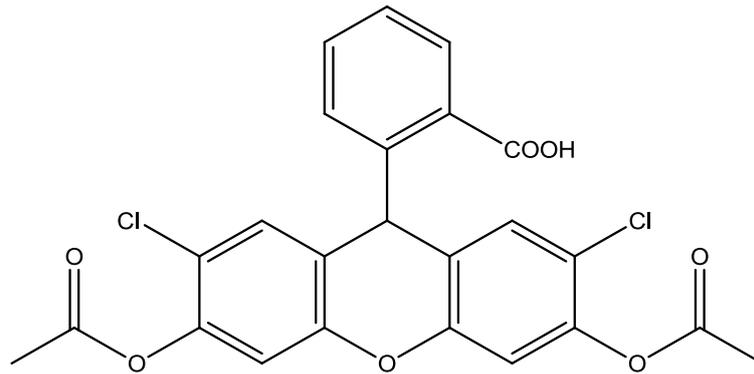


Abbildung 64: Struktur von 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat

- ein Einsatz ROS-spezifischer Proben in situ (in der elektrochemischen Zelle) nicht möglich ist, da solche Redox-empfindlichen Moleküle selbst relativ rasch anodisch oxidiert werden.

2.2 Biologische Aktivität von ROS

Im vorangegangenen Kapitel konnte bereits gezeigt werden, dass es verhältnismäßig simpel ist, mit einer primitiven elektrochemischen Apparatur ROS in Wasser zu erzeugen. Inhalt dieses Kapitels soll nun der (biologische) Nachweis auf die Wirkungsweise und die Reaktivität der erzeugten ROS darstellen. Dabei gilt ein besonderes Augenmerk der Reaktivität von ROS gegenüber biologischen Materialien, z. B. Proteine, Enzyme, aber auch Bakterien und anderen Organismen.

Leider war es während meiner Forschungsarbeit nicht möglich, auf Biofilme, klar definierte Blutproben oder biologischen Abfall, wie sie in der Dialyse normalerweise vorkommen, zuzugreifen.

Der Hauptgrund dafür liegt in der fehlenden sicherheitstechnischen und apparativen Ausstattung der zur Verfügung stehenden Labore (nur ein S2-Labor verfügbar, keine Laboratorien der Einstufung S3 oder S3^{**}).

Aus diesem Grunde wurde auf im Handel erhältliche biologische Reagenzien zurückgegriffen, die ohne Weiteres in einem normalen Chemielabor zu handhaben sind und die eine gewisse Relevanz zur Dialyse bzw. zum menschlichen Organismus aufweisen. Um die Wirkung von ROS aufzuzeigen, wurden Proteine, die im menschlichen Blut, bzw. im humanen Gewebe vorkommen, wie z. B. Hämoglobin oder Cytochrom c, elektrochemisch behandelt. Nach mehreren Zeitabschnitten wurden dabei die Veränderungen der Proteine mithilfe von UV/Vis-Spektrophotometrie und SDS-PAGE nachgewiesen. Um auszuschließen, dass die Proteine durch den Einfluss der angelegten Spannung selbst verändert werden, wurden Blindproben angefertigt, die zuerst zykovoltammetrisch vermessen und danach über Zeitbasierende Voltammetrie Techniken (engl. Time Based Techniques) analysiert wurden.

In einem nächsten Schritt wurde dann die Auswahl der humanen Proteine noch auf Hämocyanin erweitert (ein Kupferprotein), welches den Sauerstofftransport in vielen Insekten und Weichtieren gewährleistet. Im Gegensatz zum roten Hämoglobin wird der Sauerstoff beim blauen Hämocyanin jedoch nicht über Eisen, sondern über zwei Kupferatome gebunden.

Des Weiteren besitzt Hämocyanin keine Porphyrinstruktur, wie sie im Häm zu finden ist. Die Kupferionen sind über Aminosäurereste (Histidin) an das Protein gebunden.^[56,57]

Durch Verwendung des Hemocyanins wird eine spezifische Wirkung der untersuchten Methode auf (eisenhaltiges) Hämoglobin ausgeschlossen.

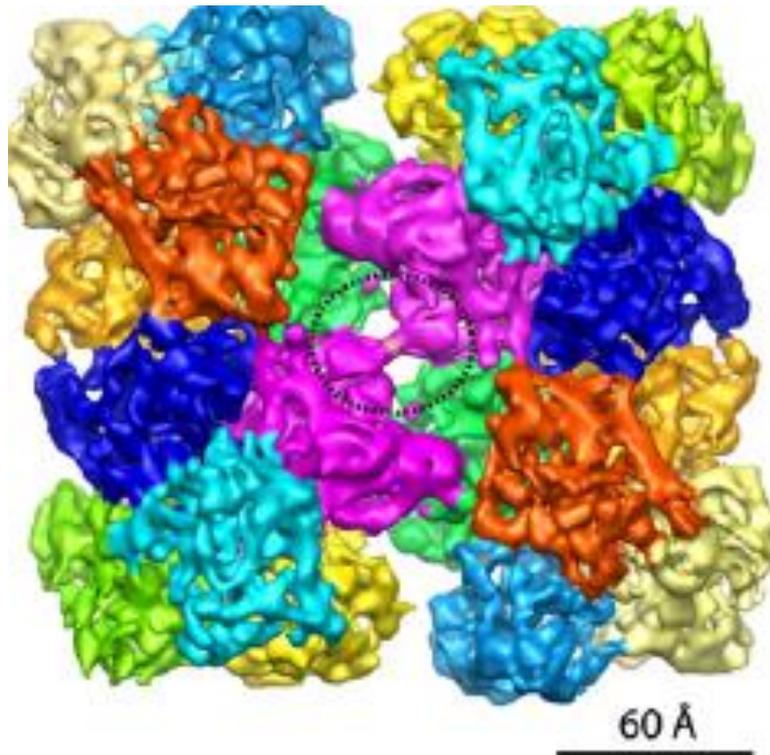


Abbildung 65: Struktur von Hämocyanin aus *Androctonus australis* (Skorpion) aufgenommen mithilfe der Elektronen-Cryomikroskopie^[58]

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Hämocyanin decken sich jedoch mit denen des Hämoglobins und des Myoglobins, dadurch wird dieses Protein nicht gesondert diskutiert, sondern die Ergebnisse der Diskussion von Hämoglobin können auch auf Hämocyanin angewandt werden. Dadurch lässt sich auch zeigen, dass die beobachteten Effekte nicht Häm spezifisch sind.

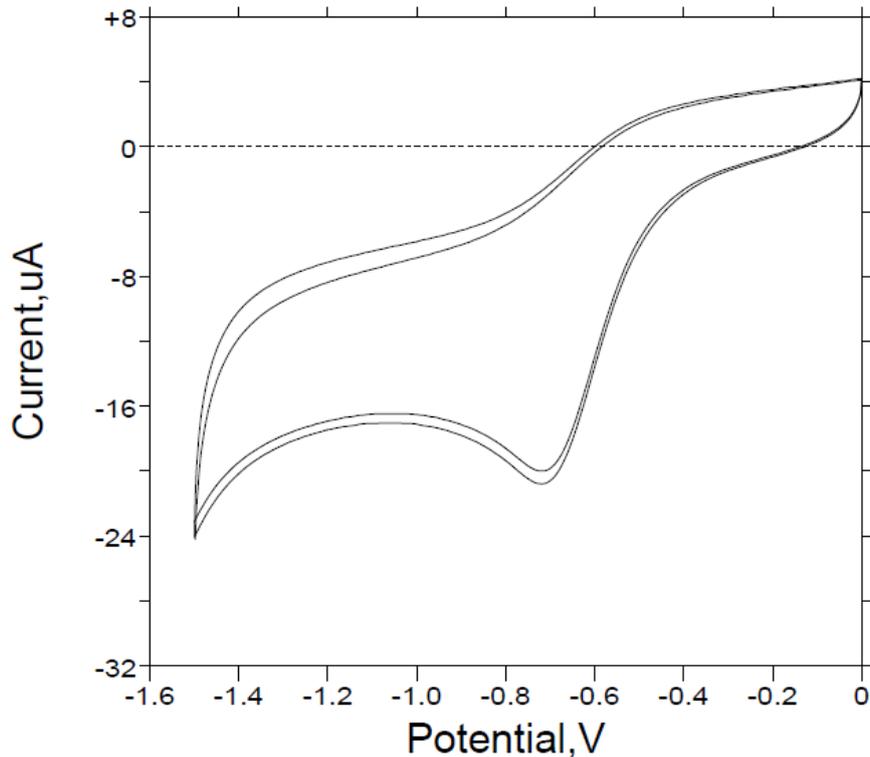


Abbildung 66: CV von Albumin bovine (Rinderserumalbumin, BSA) (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 100$ mV/s, mit O_2 gespült

Als ein weiteres Protein kam Albumin bovine (aus Rinderserum) zum Einsatz, welches den Bereich der verwendeten Proteine erweitern und einen universellen Effekt der ROS auf Proteine aufzeigen sollte. Dabei wurde festgestellt, dass sich alle eingesetzten Proteine innerhalb der zykl voltammometrischen Messungen nahezu gleich verhalten. Die Zykl voltammogramme aller verwendeten Proteine zeigen ähnliche Resultate (d.h. bei den eingesetzten Konzentrationen keine Proteinspezifischen Signale, Reduktion von Sauerstoff ist nicht beeinträchtigt), welche auch in Abbildung 66 zu sehen sind, weshalb in den späteren Abschnitten nur die experimentellen Ergebnisse von Hämoglobin, Myoglobin, Cytochrom c sowie Hämocyanin näher dargestellt werden.

Um einen deutlich größeren Umsatz an Protein gewährleisten zu können und um die Bedingungen an die tatsächlichen Gegebenheiten innerhalb einer Dialysemaschine anpassen zu können, wurde ein neuer Versuchsaufbau etabliert, der sich in Volumen

und Elektrodengröße vom bisher verwendeten Aufbau zur Aufnahme der CVs deutlich unterscheidet.

Als Reaktionsgefäß kam hier eine modifizierte Ein-Liter Glasflasche zum Einsatz, die speziell dazu mit Schlauchanschlüssen und einem zur Teflonabdeckung des BAS-Gerätes passenden Hals versehen wurde. Wie in den Messungen zuvor wurden auch in diesem System die Elektroden durch die Bohrungen des Teflondeckels in die Lösung eingeführt und befestigt. Bei diesen Experimenten ging es jedoch nicht darum, den Stromverlauf zu verfolgen, sondern es wurde lediglich eine konstante Spannung benötigt, um die vorgegebenen Proteine umzusetzen. Daher wurde nicht der Potentiostat von BAS verwendet, sondern ein kleiner Spannungsgeber aus dem Elektronikladen (EA-4003) angeschlossen, der über einen Spannungsmesser überwacht wurde. Anschließend wurde eine Blutpumpe der Firma Fresenius Medical Care, die auch in den aktuellen Dialyseanlagen Verwendung findet, mit dem Glasgefäß über Einweg-Dialyseschläuche angeschlossen.

Der Spannungsgeber EA-4003 hat den großen Vorteil, dass er weniger als 100 Euro kostet und trotzdem eine hohe Konstanz der bereitgestellten Spannungen aufweist. Ein solcher Preis wäre mit speziell für elektrochemische Zwecke oder physikalische Labore entwickelte Netzgeräte bzw. Spannungsgeber nicht möglich. Die Preisspanne für solche Geräte liegt meist sehr viel höher und gute Geräte kosten deutlich über 1000 €. Außerdem liegt die Grenze der einsetzbaren Spannung des EA-4003 Netzgerätes bei ca. 15 Volt über einen Zeitraum von mehreren Tagen, ohne dass das Gerät überhitzt oder zu großen Spannungsschwankungen zeigt. Die maximal nutzbare Spannung beträgt 30 Volt. Der Potentiostat von BAS ist unter diesen Bedingungen nicht mehr einsetzbar.

Die Durchführung der Versuche zur Kontrolle der Proteinkonzentration über einen Zeitraum von 48 Stunden wurde erst durch die Verwendung des Netzgerätes EA-4003 ermöglicht, so dass darin auch eine der Innovationen der Arbeit liegt.

Durch den oben beschriebenen Aufbau wurde es möglich, ein sehr primitives hydraulisches System zu simulieren, welches zudem unterschiedlichste Materialien beinhaltet. Die Durchflussrate des Systems konnte über die Blutpumpe exakt eingestellt werden, sodass auch Messungen mit unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten durchgeführt werden konnten.

Nach genau festgelegten Zeitintervallen wurden dann Proben von 1 ml Volumen entnommen, und UV/Vis-spektroskopisch untersucht.

Der Versuchsaufbau wurde in einem weiteren Schritt um ein Wasserbad erweitert. Dadurch war es möglich, die Temperatur der Lösung innerhalb des Reaktionsgefäßes konstant zu halten und eine Temperaturerhöhung bis auf 60 °C durchzuführen. Durch die Temperaturerhöhung wurde versucht, den Umsatz an Proteinen oder Bakterien an den Elektroden zu erhöhen. Allerdings konnte ein Einfluss der Temperatur auf den Reaktionsablauf nicht quantifiziert werden.

Es konnte aber eine leichte Änderung der Umsetzung festgestellt werden. Allerdings wurde der Umsatz durch die Temperaturerhöhung nicht gesteigert, sondern er ging noch deutlich zurück. Vermutlich sind die gebildeten ROS unter diesen Bedingungen weniger stabil und zerfallen sofort zu ihren stabileren aber unreaktiven Endprodukten.

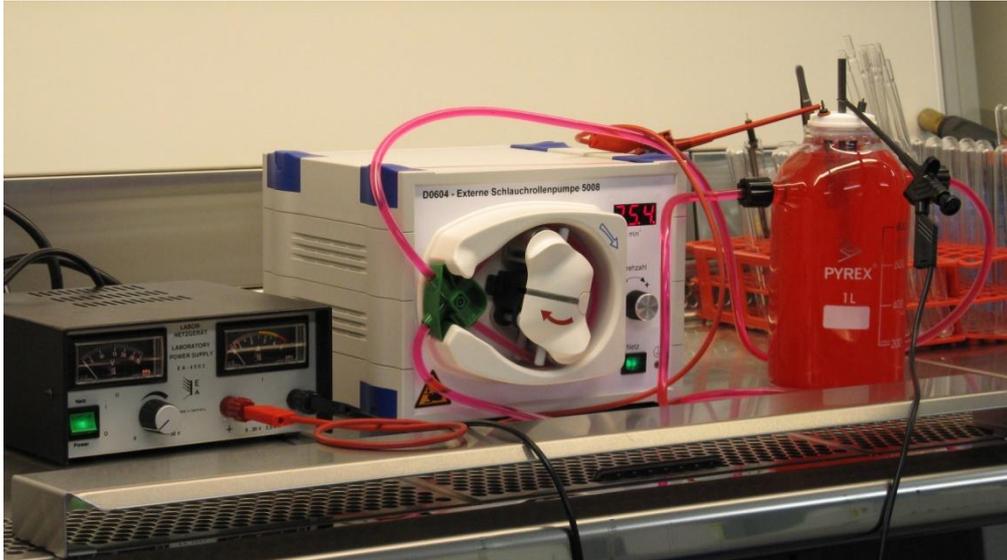


Abbildung 67: Modell eines einfachen, hydraulischen Systems; zu sehen (von links): Spannungsgeber EA-4003, Blutpumpe, Flasche mit Elektroden und Teflondeckel. Als Farbstoff der Lösung diente Rose Bengal (zu Demonstrationszwecken)

Um die Wirkung von ROS auch auf lebende Organismen darstellen zu können, wurden einfache Bakterienkulturen (*E.Coli*) gezüchtet und danach elektrochemisch behandelt.

Da *E.Coli* in größerer Konzentration unangenehme und teils gefährliche Auswirkungen auf den menschlichen Organismus haben können, wurden alle Messungen in einer Laminar Flow Bench (biologische Sicherheitswerkbank) im S2 Labor durchgeführt.

E.Coli (*Escherichia coli*, benannt nach seinem Entdecker Theodor Escherich), ein gramnegatives, Säure bildendes und stäbchenförmiges Bakterium, findet sich normalerweise im menschlichen Darm und ist dort Teil der Darmflora (*Enterobacteriaceae*; enteron, gr. Darm). Außerhalb des Darms jedoch kann *E.Coli* starke Infekte hervorrufen (fakultativ pathogen), wie z. B. Harnwegsinfekte und Bauchfellentzündungen. Allerdings gibt es auch obligat pathogene *E.Coli*- Stämme, d. h. diese Keime verursachen dabei in jedem Fall Krankheitssymptome, sie gehören

nicht zur normalen Körperflora. Als fakultativ anaerobes Bakterium kann *E.Coli* Energie sowohl durch Atmung als auch durch „gemischte Säuregärung“ gewinnen. Durch die Gärprozesse entstehen unter anderem Wasserstoff, Alkohol und Kohlenstoffdioxid.^[59,60]

Wie alle Enterobakterien ist auch *E.Coli* besonders widerstandsfähig gegen oberflächenaktive Substanzen, wodurch es sich sehr gut als Modellorganismus für die elektrochemischen Versuche mit ROS eignet. Sollten die *E.Coli* durch ROS vernichtet werden, würde dies ein sehr wichtiger Schritt für die weitere Erforschung einer Reinigungsmethode auf Basis von ROS darstellen.

Als Hauptgründe für die Verwendung von *E.Coli* als Modellsubstanz sind neben der Widerstandsfähigkeit auch noch folgende zu nennen:

- Leichte Verfügbarkeit
- Handling im S2 Labor
- Modell für viele („unterschiedliche“) Bakterien
- Sehr gut untersucht
- Robust

Damit unterscheidet sich ein System mit *E.Coli* Bakterien deutlich von einem System, in dem nur Proteine als einziges biologisches Produkt gelöst vorliegen.

Zusammen mit Frau Elena Schumann wurden innerhalb des Rahmens ihrer Diplomarbeit *E.Coli* Kulturen in einem speziellen Agar-Nährmedium gezüchtet. Diese Bakterien wurden dann elektrochemisch erzeugten ROS ausgesetzt.

Nähere Angaben und die Ergebnisse zu diesen Versuchen sind in Abschnitt 2.6 dargestellt.



Abbildung 68: *E.Coli* Bakterien in einer Petrischale mit Agar-Nährmedium (links: Verdünnung 1:10⁶, rechts: Verdünnung 1:10⁷)

Parallel zu den Versuchen mit *E.Coli* Kulturen wurden auch zwei Arten von Nematoden (Fadenwürmer) elektrochemisch erzeugten ROS ausgesetzt. Es handelte sich dabei um die Arten *Phasmarhabditis hermaphrodita*, welche gegen Ackernetzschnecken (*Deroceras Reticulatum*) und spanische Wegschnecken im Gartenbereich eingesetzt werden, und *Steinernema feltiae*, die gegen Trauerfliegenlarven zum Einsatz kommen. Beide Nematodenarten sind als Gartennützlinge frei im Handel erhältlich und unterliegen keinen besonderen Gefahrstoffverordnungen. Damit eignen sie sich ideal als Target für Screeningversuche zur Ermittlung der biologischen Aktivität.

Die im Abschnitt 2.7 „Zyklovoltammetrische Untersuchung chalkogehaltiger Syntheseprodukte“ vermessen Substanzen wurden ebenfalls an diesen Nematoden getestet, um eine mögliche Verwendung als „grüne Pestizide“ untersuchen zu können. Diese Versuche erlauben auch den Vergleich zwischen der elektrochemischen „Dekontamination“ und dem Einsatz chemischer Stoffe, d. h. potentieller Pestizide.

Da es sich bei den Nematoden, im Vergleich zu den *E.Coli*, bereits um eine augenscheinlich höher entwickelte Spezies handelt, die deutlich bessere Abwehrmöglichkeiten gegen Einflüsse von außen aufweist (z. B. eine schützende Hautschicht), kann man anhand dieser Tiere nachweisen, ob das elektrochemische ROS in genügend hoher Konzentration vorliegt, um solche Lebewesen auch effektiv schädigen zu können.



Abbildung 69: *Steinernema feltiae* (links) und *Phasmarhabditis hermaphrodita* (rechts), Vergrößerung ca. 40 bis 45-fach, Details s. Homepage des Lieferanten^[61]

2.2.1 Behandlung von Proteinen mit ROS

2.2.1.1 Elektrochemische Untersuchung von Hämoglobin

Das menschliche Hämoglobin, wie auch das der anderen Säugetiere, besteht aus vier Untereinheiten, wobei jede dieser Untereinheiten aus einem Proteinanteil, einem Protoporphyrin als prosthetische Gruppe (Nichtproteinanteil) und einer eisenhaltigen Häm-Einheit besteht. Die charakteristische rote Farbe des Hämoglobins wird dabei von der Häm-Gruppe verursacht.

Beim Menschen finden sich vier leicht unterschiedliche Varianten des Hämoglobins, die sich vor allem in den Proteinuntereinheiten voneinander unterscheiden. Es handelt sich dabei um HbA1, HbA2, HbF und Gower-2 (Vorkommen: HbA1 (98%), HbA2 (2%), HbF, Methämoglobin (Ferrihämoglobin) ca. 1%). HbF und Gower-2 nennt man auch „fetale Hämoglobine“, da sie ab der 9. Woche der Schwangerschaft bis zur Geburt bevorzugt gebildet werden.^[62]

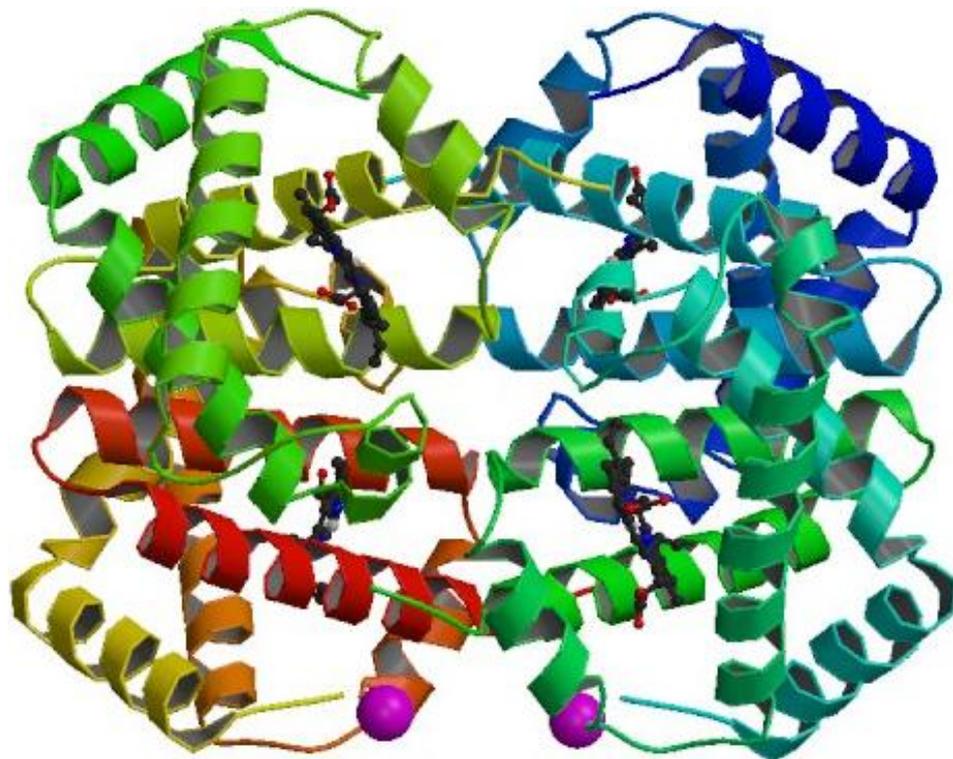


Abbildung 70: Kristallstruktur von Hämoglobin (human)^[63]

Abbildung 70 zeigt die dreidimensionale Struktur des Hämoglobins inklusive der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen. Dieser hochkomplexe Aufbau unterscheidet sich grundlegend im Vergleich zu „normalen“ Chemikalien. Aufgrund dieser Struktur besitzen Hämoglobin und verwandte Proteine sehr spezielle und spezifische Eigenschaften, wie z. B. spezifische Bindung zu O₂, um den Sauerstofftransport im Blut gewährleisten zu können.

Im Zentrum der Häm-Gruppe befindet sich ein Fe²⁺-Ion welches sechs Koordinationsstellen besitzt (Fe-Protoporphyrin IX), wovon vier über koordinative Bindungen an die Stickstoffe des Protoporphyrins gebunden sind (s. Abbildung 71). Eine weitere Bindung erfolgt zum Histidinrest, die sechste Koordinationsstelle dient der Bindung zum Sauerstoff. Durch dieses Bindungsverhältnis ist der Eisen-Protoporphyrinring annähernd planar. Hämoglobin besitzt eine gute Affinität zu Sauerstoff, jedoch bindet Kohlenstoffmonoxid (CO) noch ca. 200-fach stärker. Dadurch entsteht akute Gesundheitsgefahr beim Einatmen von CO-Gas (Störung des Sauerstofftransportes im Blut).

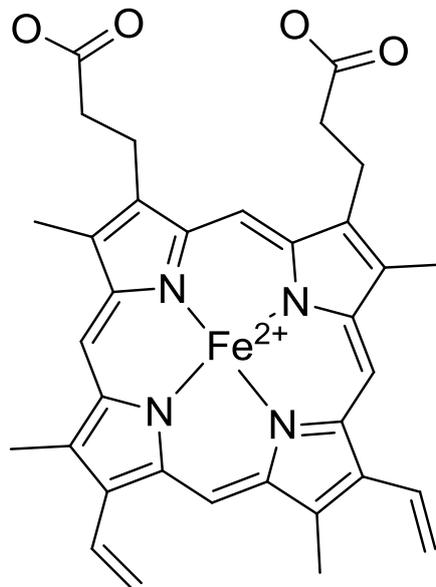


Abbildung 71: Häm-Gruppe des Hämoglobins (Fe-Protoporphyrin IX)

Hämoglobin besitzt, ähnlich wie Chlorophyll (enthält Mg²⁺ anstelle von Fe²⁺), ein Porphyringerüst, welches vor allem Substituenten an den β-Positionen aufweist

(Porphyrinklasse 1). Als weiteres wichtiges Metalloporphyrin ist das Vitamin B12 (Cobalamin) zu nennen, welches ein Cobalt-Ion anstelle des Eisens besitzt.

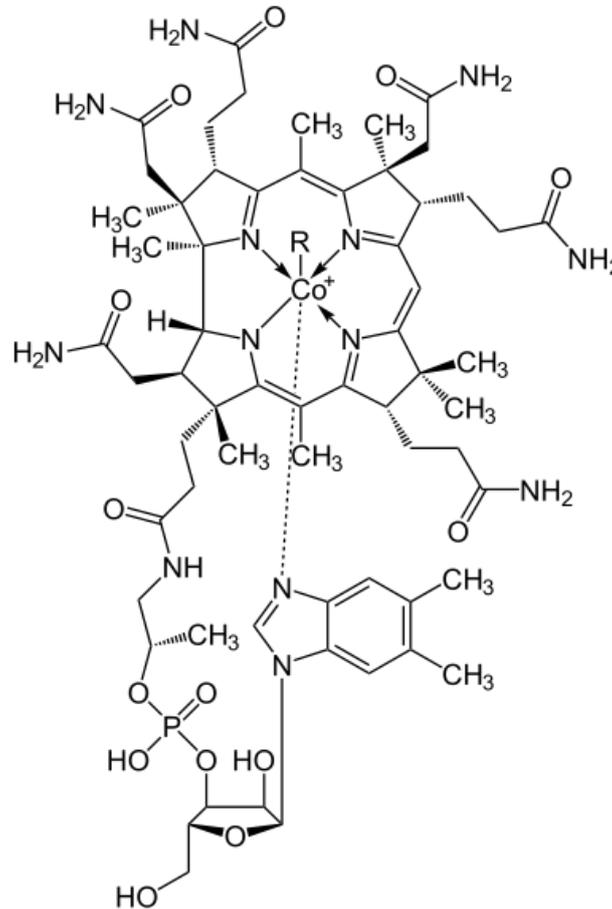


Abbildung 72: Struktur von Vitamin B12 mit Co⁺ im Porphyringerüst

Cobalamin dient im menschlichen Körper zum Aufbau von Zellkernsubstanz und der Bildung von roten Blutkörperchen. In der Medizin wird Vitamin B12 bei vorliegenden Nervenschäden und Leberschädigungen, sowie bei Haut- und Schleimhauterkrankungen verabreicht.

Mangelercheinungen sind nervöse Störungen und Blutarmut. Außerdem kann es zu Veränderungen an den Lungen und am Rückenmark kommen, wenn die Mangelercheinungen über einen längeren Zeitraum hin anhalten.



Abbildung 73: Aufnahme der Messzelle mit Proteinlösung (BSA) beim Spülen mit N_2 .

Aufgrund der hohen Oberflächenaktivität des Hämoglobins und auch, in geringerem Maße, der weiteren verwendeten Proteine ließen sich die Proben nicht ohne Weiteres mit den benötigten Gasen durchspülen. Abbildung 73 zeigt eindrucksvoll das Ergebnis nach Spülen einer BSA-Lösung mit zu hohem Stickstoffdruck.

Eine Zugabe des Proteins nach dem Spülen der Lösung mit N_2 erwies sich als unvorteilhaft, da dabei wieder O_2 an die Lösung gelangen kann.

Aus diesem Grunde wurden die weiteren Lösungen für längere Zeit (ca. 10-20 Minuten) mit geringerem Gasdruck gespült. Dadurch wurde die Schaumbildung deutlich verringert. Auch wurde bei den weiteren Versuchen darauf geachtet, dass bei Schaumbildung der Schaum nicht mehr aus den Öffnungen der Messzelle herausquillen konnte (Verlust von Analysesubstanz).

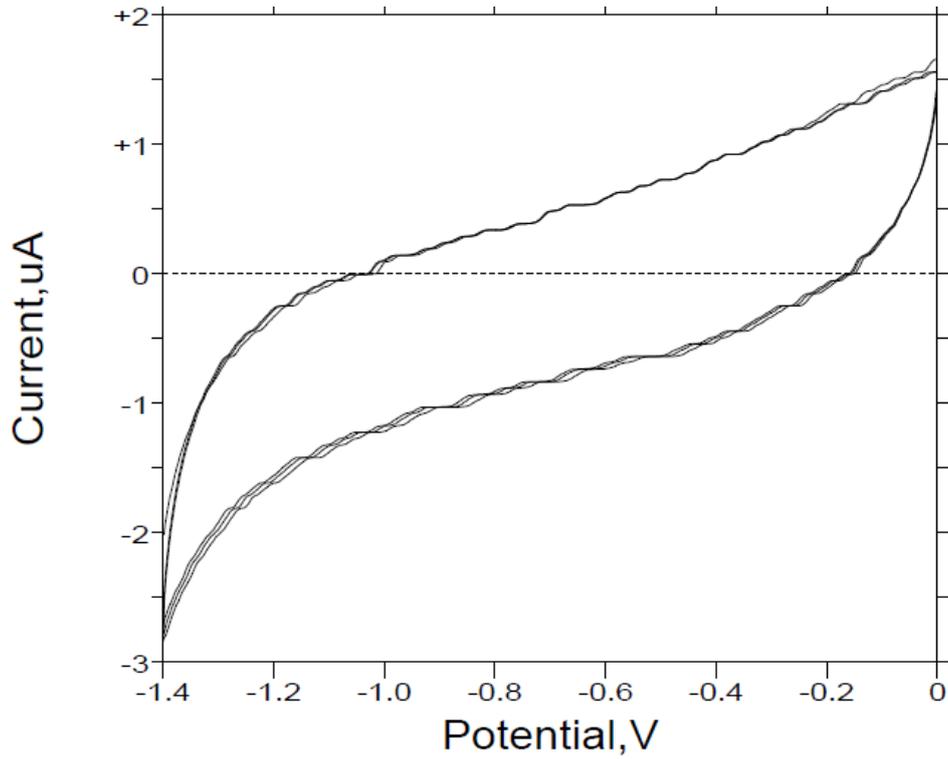


Abbildung 74: CV von Hämoglobin (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 100$ mV/s, mit N_2 gespült.

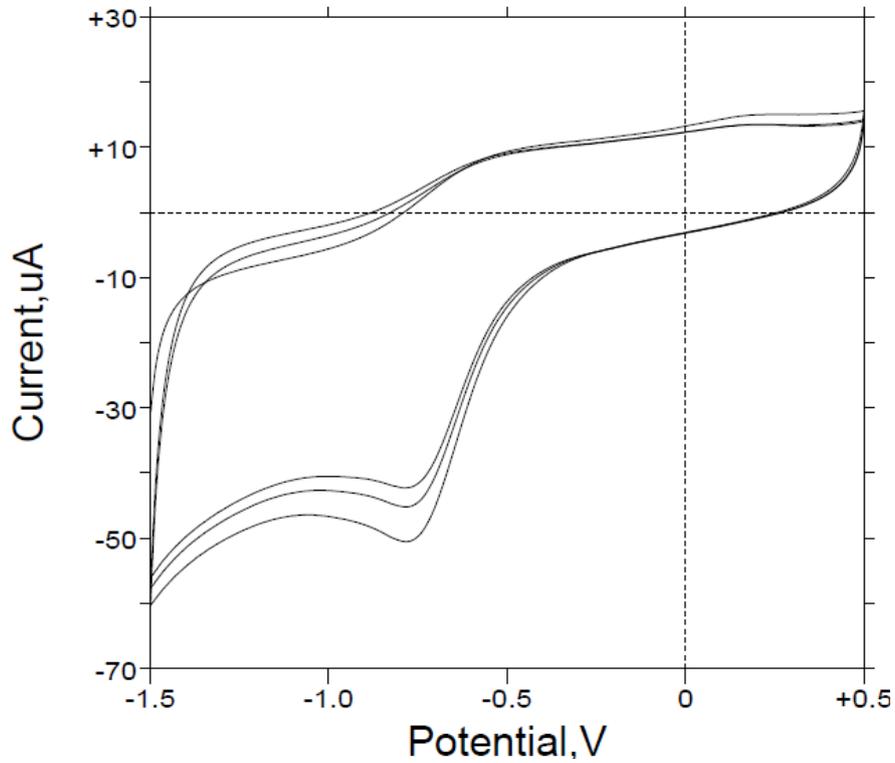


Abbildung 75: CV von Hämoglobin (2 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 50$ mV/s, mit O_2 gespült.

Anders als im CV von Hämoglobin, welches nach dem Spülen mit Stickstoff aufgenommen wurde, sieht man im abgebildeten CV von Abbildung 75 nach Spülen mit Sauerstoff einen deutlichen Reduktionspeak im Bereich der ROS-Erzeugung. Dadurch lässt sich zeigen, dass die Anwesenheit von Hämoglobin die Bildung von ROS nicht verhindert und dass durch die Anwesenheit von Sauerstoff Hämoglobin keinerlei weiteren Reaktionen zeigt.

Auch zeigt sich sehr schön, dass Hämoglobin in diesem Potentialbereich selbst keine (sichtbaren) Signale verursacht. Allerdings ist das Häm selbst redoxaktiv und kann auch bereits um die 0 Volt herum oxidiert (und zurück reduziert) werden.

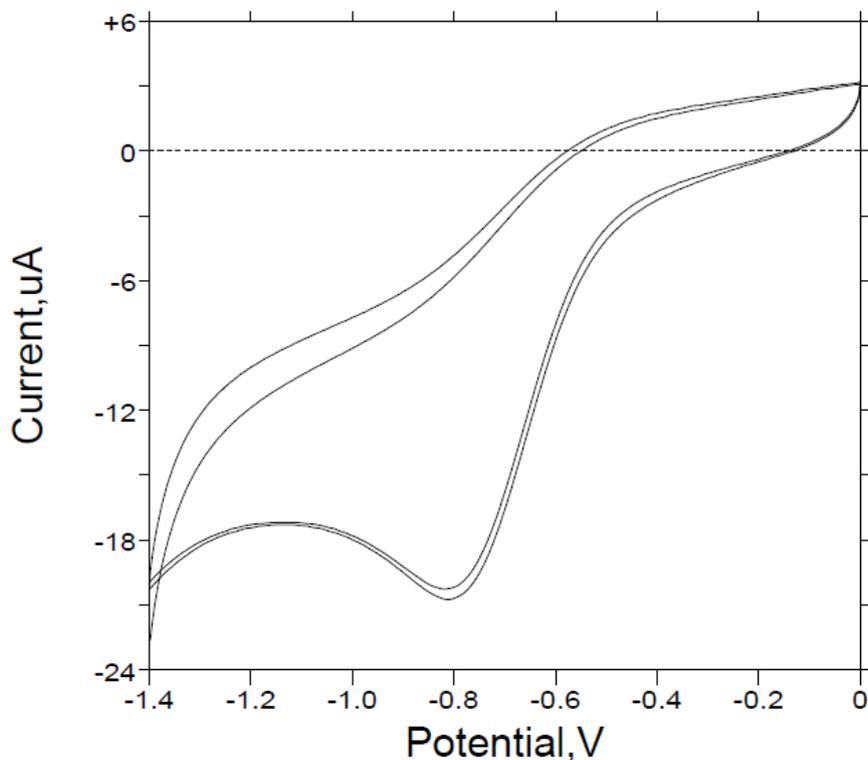


Abbildung 76: CV von Hämoglobin (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 6,0; $v= 50$ mV/s, mit O_2 gespült.

Ändert man den pH-Wert der Lösung durch Änderung der Pufferzusammensetzung, so erhält man nach Messung des CVs das in Abbildung 76 dargestellte Resultat, welches die gleichen Charakteristika aufweist, die bereits in Abbildung 75 zu sehen sind.

Eine Änderung des pH-Wertes in dem von mir untersuchten Rahmen zwischen pH 6,0 und pH 7,4 zeigt keinen Einfluss auf das elektrochemische Verhalten der Proteine. Aus diesem Grund habe ich mich daher bei weiteren Messungen auf eine Pufferzusammensetzung mit dem pH-Wert von 7,4 beschränkt.

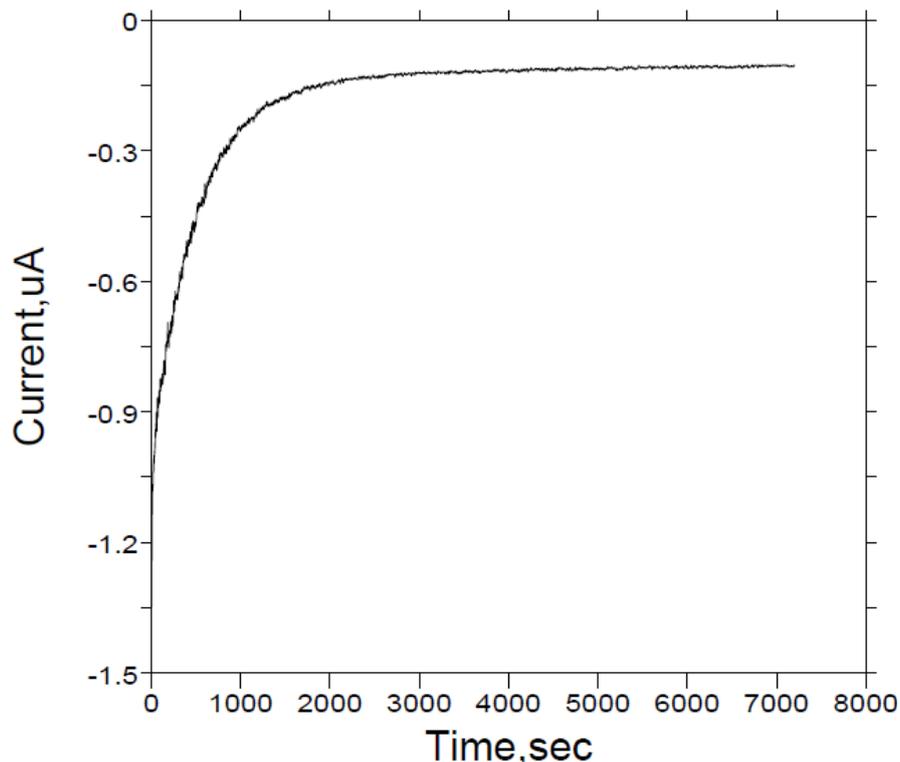


Abbildung 77: TB-Voltammogramm von Hämoglobin (2 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $t = 7200$ s, mit N_2 gespült.

Abbildung 77 zeigt ein Voltammogramm von Hämoglobin, welches über zeitbasierende Voltametertechniken (engl. Time Based Techniques) aufgenommen wurde. Dabei wird über einen genau definierten Zeitraum eine konstante Spannung zwischen den Elektroden angelegt und der Stromverlauf über den gesamten Zeitraum im Intervall von 1 bis 5 Sekunden gemessen. Durch diese spezielle Art des Versuchsaufbaus konnte ich eine Erzeugung von ROS über einen längeren Zeitraum erreichen und somit die Auswirkungen von ROS auf die Proteine genauer untersuchen.

Die Versuchsanordnung ist die gleiche, die auch für die Aufnahme der CVs verwendet wird. Jedoch wird die Proteinlösung während des gesamten Zeitraumes der Messung konstant gerührt und von dem jeweiligen Gas (N_2 oder O_2) durchspült.

Dadurch wird gewährleistet, dass sich die direkt an der Elektrode gebildeten ROS von der Elektrode entfernen können und dass immer wieder frisches Protein an die Elektrode herangeführt wird. Ebenfalls werden die Zersetzungsprodukte der Proteine aus der direkten Umgebung der Elektrode entfernt.

Die Durchmischung der Lösung ist absolut essentiell, da nur so gewährleistet ist, dass sich eine größere Menge an Protein durch die gebildeten ROS umsetzt.

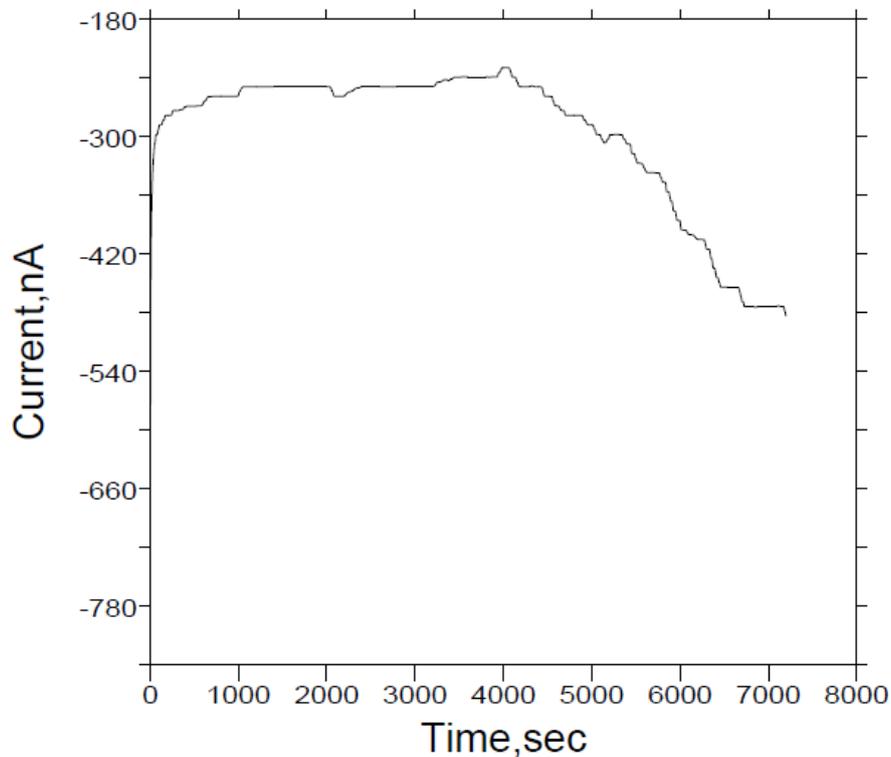


Abbildung 78: TB-Voltammogramm von Hämoglobin (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $t = 7200$ s, mit O_2 gespült.

Trotz des Rührens der Lösung (bei 800 Umdrehungen/Min) sieht man jedoch anhand der Abbildung 77, dass sich die Stromstärke über den gesamten Verlauf der Messung erst abnimmt und dann annähernd konstant bleibt, solange kein gelöster Sauerstoff vorhanden ist.

In Abbildung 78 ist ein anderes Ergebnis zu sehen, welches sich nur durch die Anwesenheit von Sauerstoff in der Lösung erklären lässt. Deutlich ist zu erkennen, dass die Stromstärke über den Messzeitraum erst abnimmt, dann allerdings wieder zunimmt. Es findet also eine Reaktion innerhalb der Messzelle statt.

Dieses Ergebnis lässt sich reproduzieren, allerdings sind die Ergebnisse immer leicht verschieden, da es sich nicht um ein stationäres System, sondern um ein gerührtes (und mit Gas durchspültes) System handelt. Dieses System lässt sich *per se* nicht konstant halten, da es immer wieder Änderungen im Gasfluss oder durch den Rührer kommen kann.

Durch den Einfluss des O₂ ändert sich die Proteinlösung auch optisch mit der Zeit. Zu Anfang ist die Lösung rostbraun gefärbt und die Elektroden lassen sich kaum erkennen. Mit der Zeit (nach ca. einer Stunde) kann man jedoch eine leichte Entfärbung der Lösung beobachten. In den weiteren Kapiteln werden Messungen vorgestellt, die über einen deutliche längeren Zeitrahmen (bis zu 48 Stunden) verlaufen sind und die die hier aufgeführten Beobachtungen deutlich belegen. Die Lösung ist nach 1-2 Stunden deutlich entfärbt und wird nach 3-5 Stunden fast wasserklar. Dadurch lässt sich eine Abnahme der Proteinkonzentration bzw. die Zersetzung des Hämoglobins vermuten.

Über UV/Vis-spektrophotometrische Messungen lässt sich die Abnahme der Proteinkonzentration innerhalb der Messzelle nachweisen. Auf die konkreten Ergebnisse und die Spektrogramme wird im Kapitel 2.3 UV/Vis-Spektrophotometrische Untersuchungen noch genauer eingegangen.

2.2.1.2 Elektrochemische Untersuchungen von Myoglobin

Myoglobin dient als Sauerstoffspeicher in den Muskelzellen. Es ist ein Monomer, das strukturell eine sehr nahe Verwandtschaft zum Hämoglobin zeigt. Myoglobin ist deutlich besser in der Lage, den Sauerstoff zu binden als Hämoglobin. Außerdem ist die Affinität zu Sauerstoff beim Myoglobin, im Gegensatz zu Hämoglobin, nicht pH-abhängig.

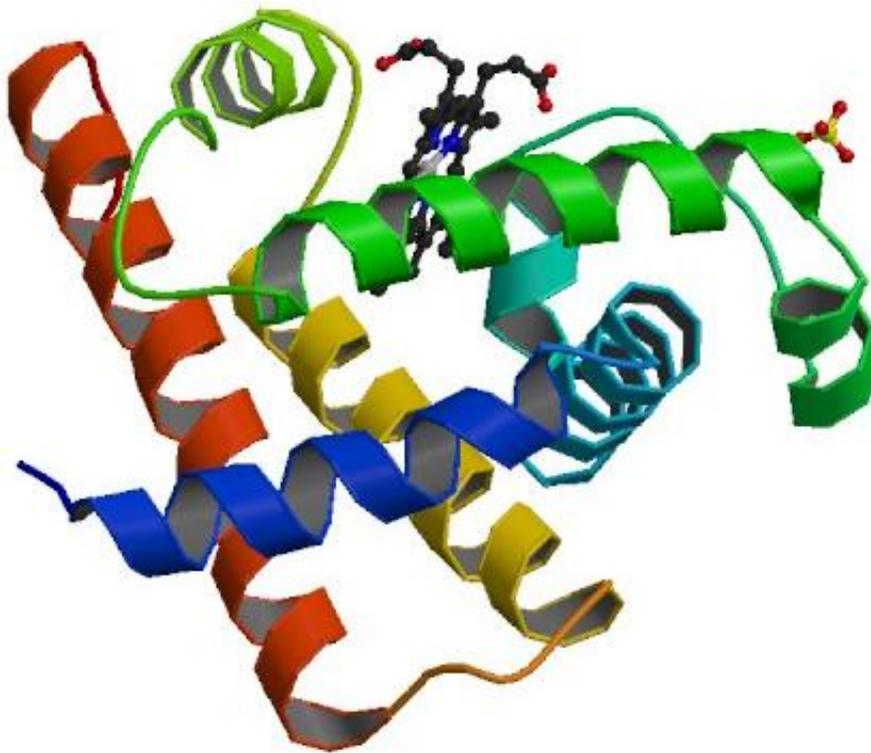


Abbildung 79: Kristallstruktur von Myoglobin aus Wal-Sperma^[64]

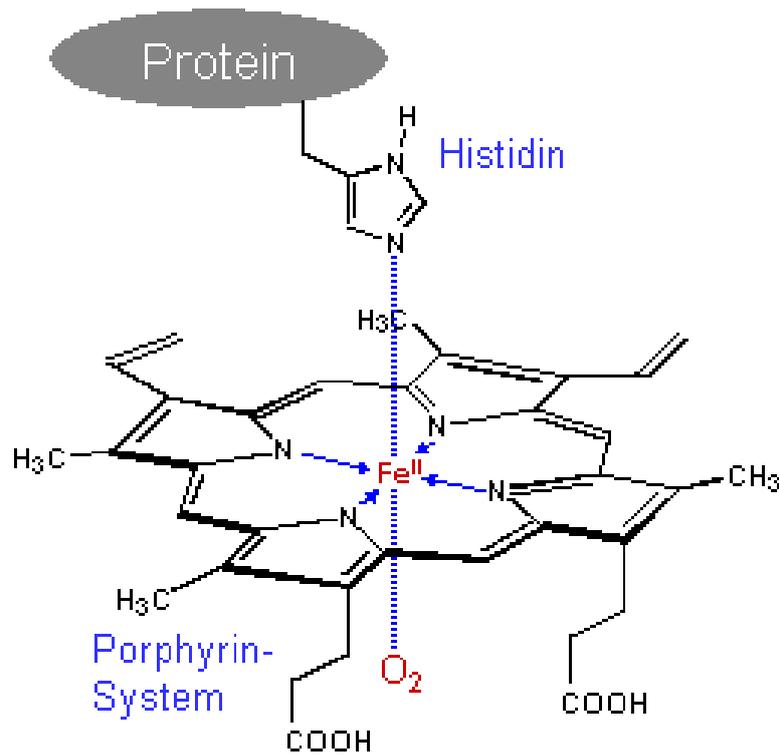


Abbildung 80: Struktur der Hämgruppe im Hämoglobin und Myoglobin^[65]

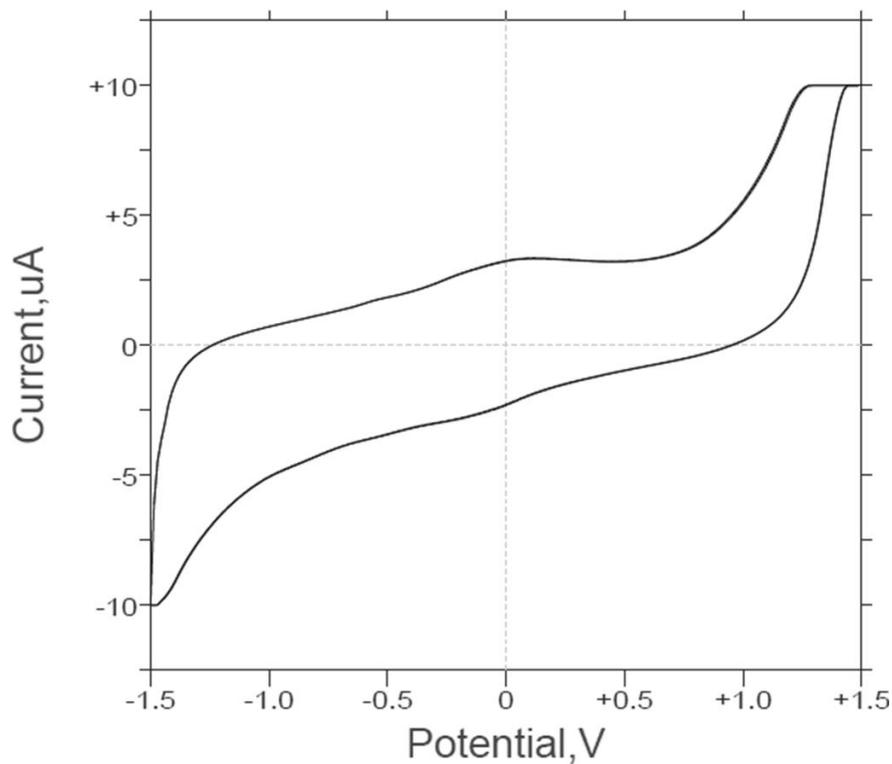


Abbildung 81: CV von Myoglobin (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 100 \text{ mV/s}$, mit N₂ gespült.

Das CV von Myoglobin aus Abbildung 81 zeigt ähnliche Gegebenheiten wie das CV von Hämoglobin. Auch hier ist kein Reduktionspeak im für die ROS-Bildung interessanten Bereich von -0,75 Volt bis -1,25 Volt zu sehen. Auch Myoglobin ist in diesem Bereich nicht durch die Glaskohlenstoffelektrode reduzierbar und veränderbar. Durch Messungen an einem UV/Vis-Spektrophotometer konnte gezeigt werden, dass sowohl die Elektroden als auch das Anlegen einer Spannung keine Auswirkungen auf das Protein haben: Diese Erkenntnis ist wichtig, um den Einfluss von Sauerstoff, bzw. ROS, auf das Protein deutlich nachvollziehen zu können.

Die schwachen Stromspitzen um die 0 Volt herum könnten auf eine reversible Redoxreaktion unter Beteiligung des Eisens hindeuten.

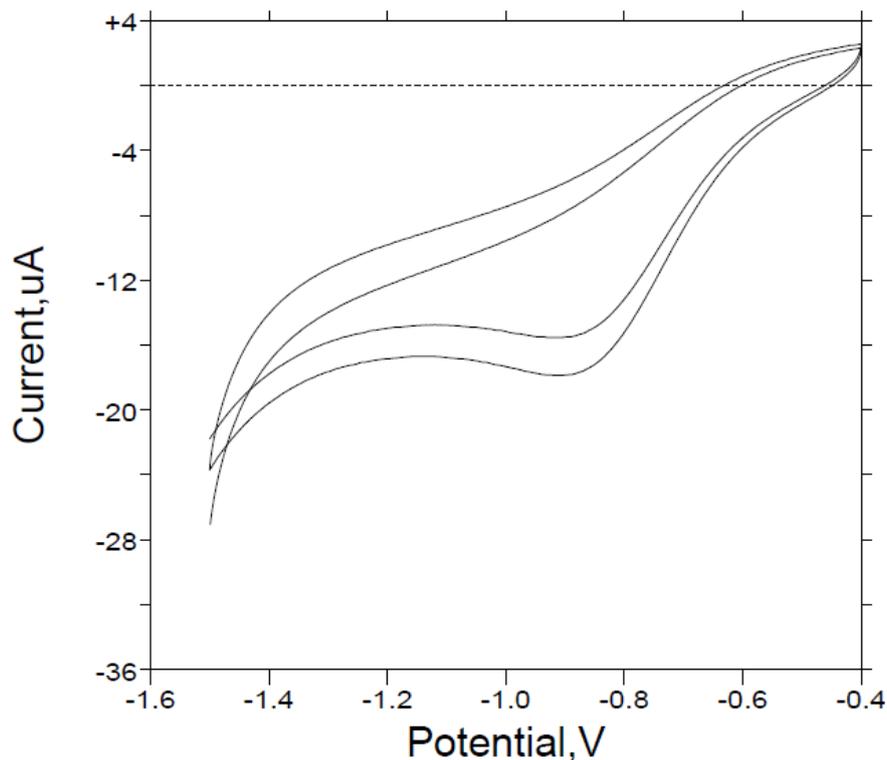


Abbildung 82: CV von Myoglobin (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 100$ mV/s, mit O_2 gespült.

Auch das CV aus Abbildung 82 mit Sauerstoff zeigt, wie bereits beim Hämoglobin gesehen, keine größeren Redoxpotentiale außerhalb des Bereiches der Bildung von ROS, sodass davon auszugehen ist, dass sich Myoglobin durch einfache zykovoltammetrische Messungen nicht in Form und Funktion verändern lässt. Auch diese Aussage lässt sich mithilfe von UV-spektrophotometrischen Messungen belegen (s. 2.3 UV/Vis-Spektrophotometrische Untersuchungen). Myoglobin lässt sich dementsprechend, ähnlich wie Hämoglobin, zur Betrachtung der Auswirkungen von ROS auf biologische Materialien verwenden.

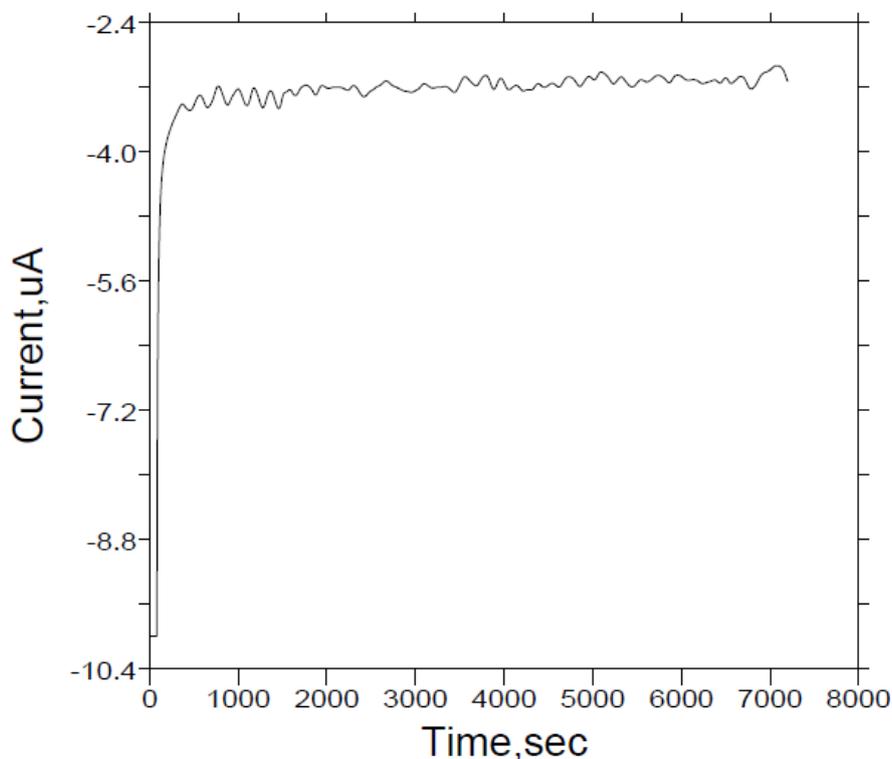


Abbildung 83: TB-Voltammogramm von Myoglobin (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $t = 7200$ s, mit N_2 gespült (Messung erfolgte alle 2s).

Abbildung 83 zeigt ein Voltammogramm von Myoglobin, welches, wie zuvor das von Hämoglobin, über TB-Techniken aufgenommen wurde. Auch beim Myoglobin sieht man die gleichen Resultate wie bei der Umsetzung von Hämoglobin. Solange kein Sauerstoff in der Proteinlösung vorhanden ist, ändert sich die Stromstärke, nach starkem Abfall am Anfang, über den Messzeitraum hinweg fast nicht mehr. Ist Sauerstoff anwesend, so fällt die Stromstärke zu Anfang sehr stark ab, um danach wieder langsam anzusteigen. (Abbildung 84).

Es muss also auch hier eine Veränderung mit dem Myoglobin über den beobachteten Zeitrahmen vorstattengehen. Der stark schwankende Kurvenverlauf ist hierbei auf das Durchspülen und das Rühren der Lösung zurückzuführen (Rührer bei 400 Umdrehungen pro Minute).

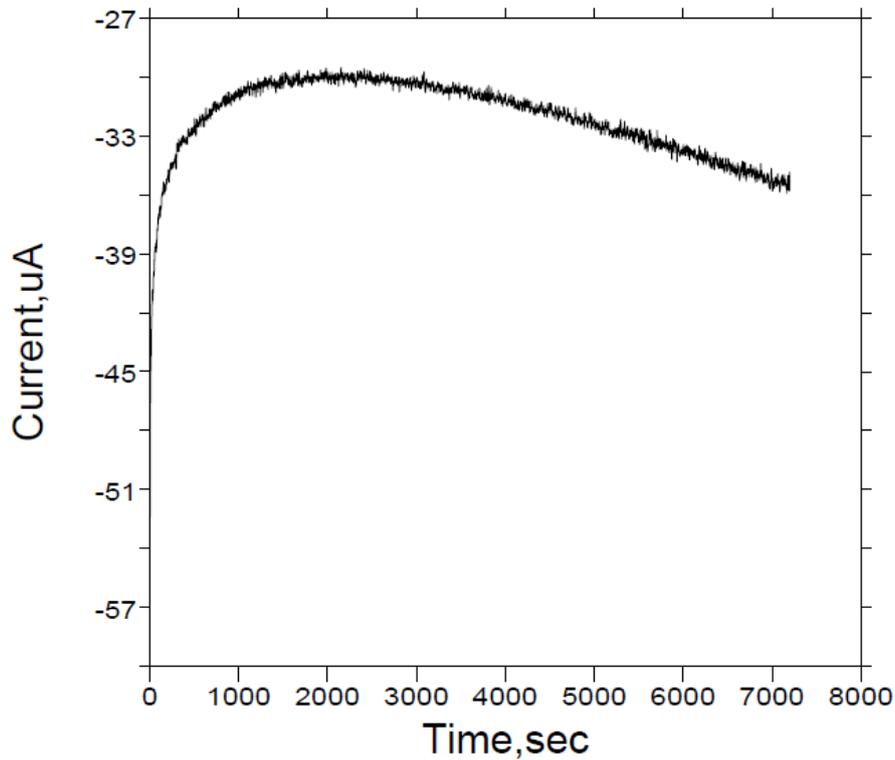


Abbildung 84: TB-Voltammogramm von Myoglobin (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $t = 7200$ s, mit O_2 gespült (Messung nach jeder s).

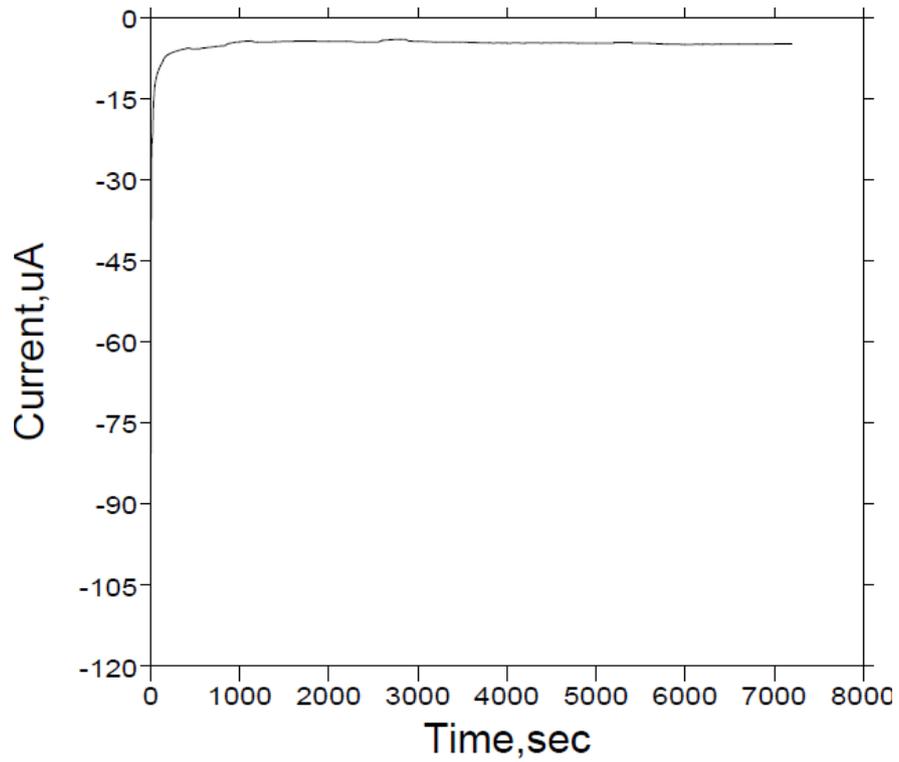


Abbildung 85: TB-Voltammogramm von Myoglobin (1 mg/ml), Titan als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $t = 7200$ s, mit N_2 gespült (Messung nach jeder s).

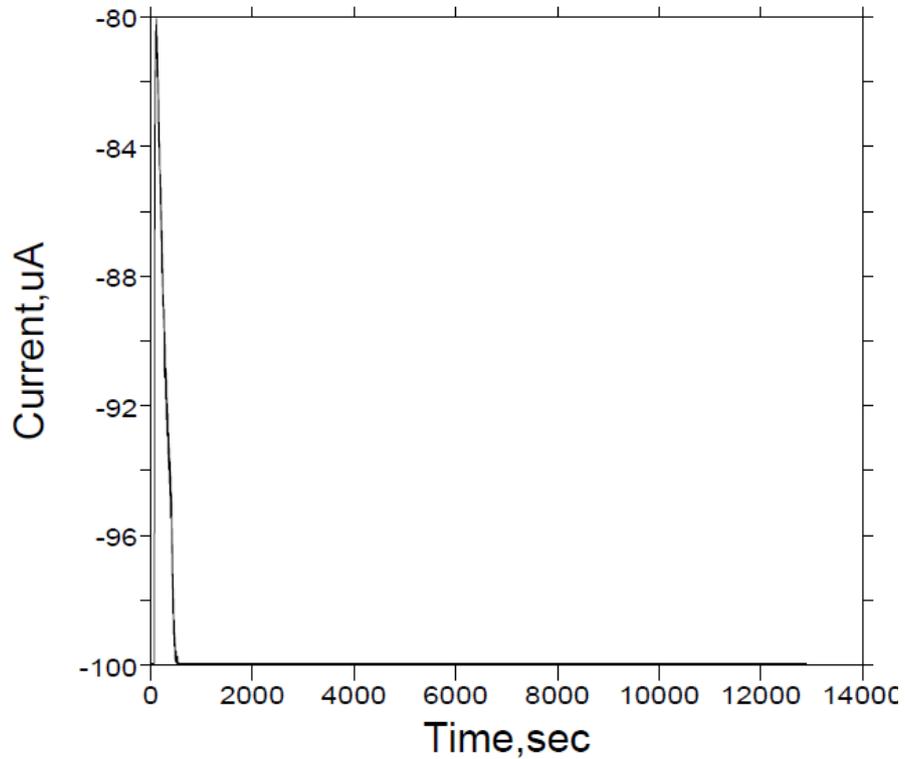


Abbildung 86: TB-Voltammogramm von Myoglobin (1 mg/ml), Titan als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $t = 7200$ s, mit O_2 gespült (Messung nach jeder s).

Die beiden voranstehenden Voltammogramme (Abbildung 85 und Abbildung 86) zeigen, dass die bisher aufgezeigten Ergebnisse nicht alleine von dem Material der AE abhängig sind, sondern sich auch mit anderen Materialien darstellen lassen. Die deutlich höheren Stromstärken der in Abbildung 86 aufgezeigten Messung lassen sich durch die signifikant größere Oberfläche der Titanelektrode im Vergleich zur Glaskohlenstoffelektrode erklären.

Auffallend ist aber der Kurvenverlauf unter Verwendung der Titanelektrode, wenn O_2 in der Lösung vorliegt. Die Stromstärke fällt zu Beginn der Messung stark ab und bleibt dann konstant bei ca. -100 mV. Die Skala konnte aufgrund eines Softwarefehlers nicht auf Werte unter -100 mV eingestellt werden.

Alle anderen Messungen der verschiedenen Proteine mit Titan oder Gold als AE erzielten vergleichbare Ergebnisse und zeigten die gleichen Verläufe wie bei der Verwendung von Glaskohlenstoff als AE. Daher wird im weiteren nur Bezug auf die Messungen mit Glaskohlenstoff genommen.

2.2.1.3 Elektrochemische Untersuchungen von Cytochrom *c*

Cytochrom *c* ist als sogenanntes Elektronenüberträgerprotein an der Atmungskette (in den Mitochondrien) direkt beteiligt. Es sorgt mit Unterstützung der Cytochromoxidase für die Bildung von ATP aus NADPH und H⁺.^[66]

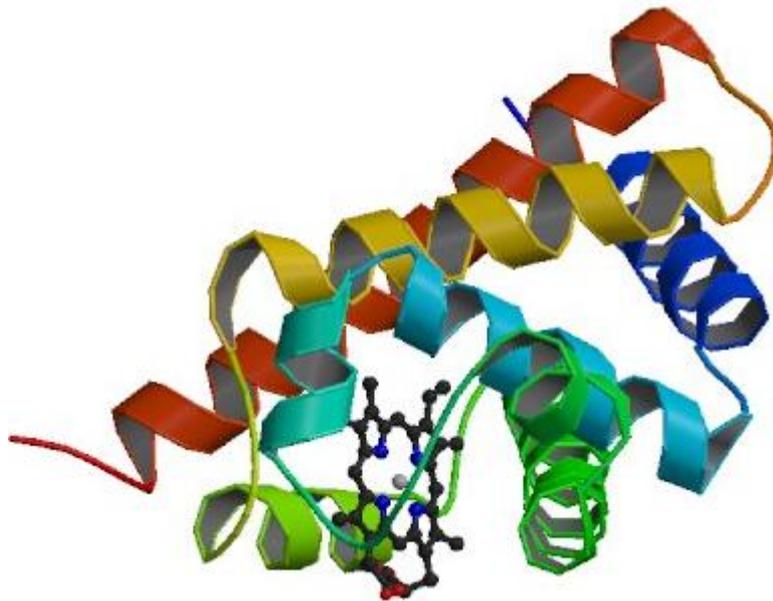


Abbildung 87: Kristallstruktur von Seehund Cytochrom *c*^[67]

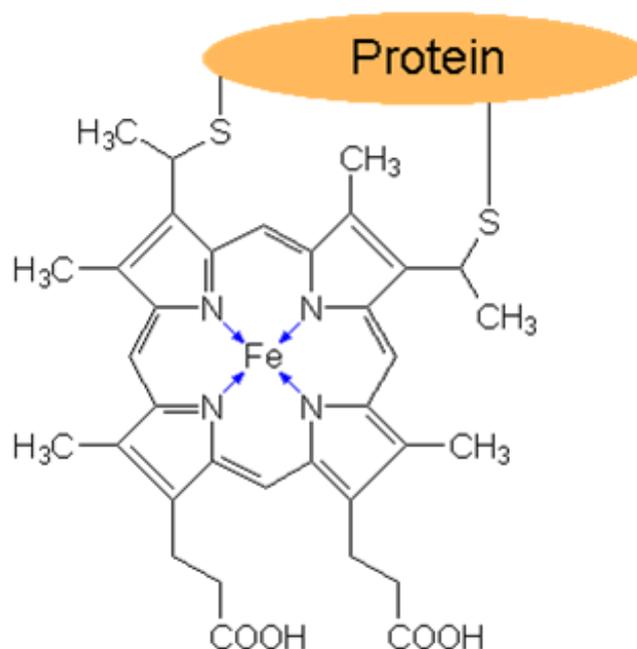


Abbildung 88: Struktur der Hämgruppe in Cytochrom *c*^[65]

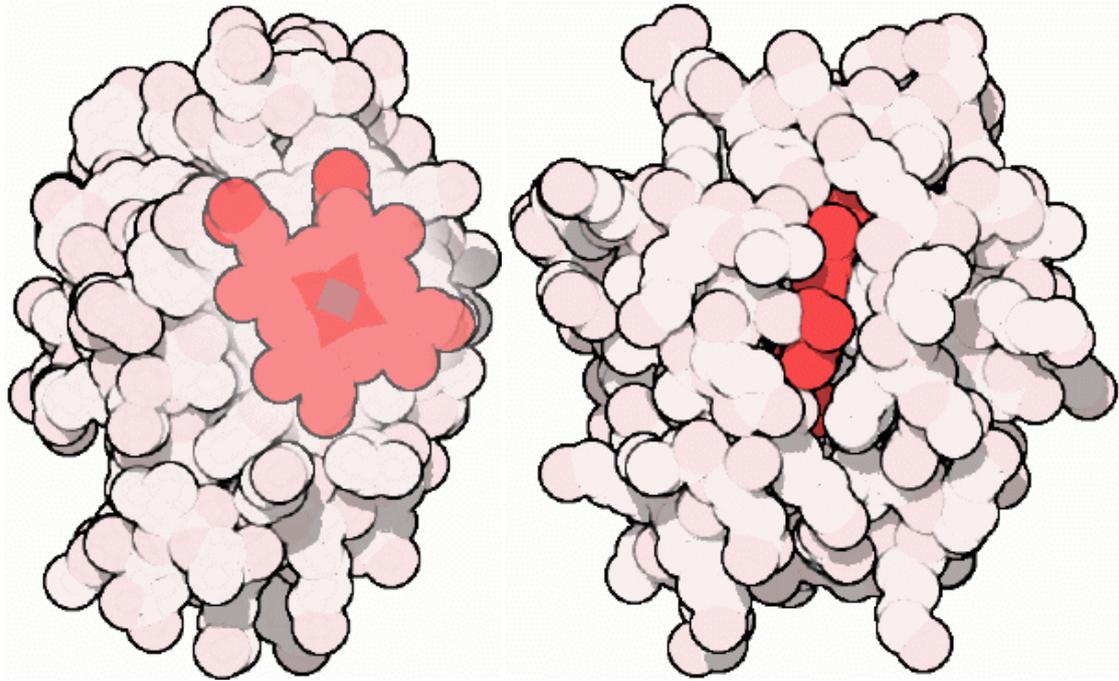


Abbildung 89: Kalottenmodell des Cytochrom c mit Häm-Gruppe (rot) und Eisen-Ion (grau)^[68]

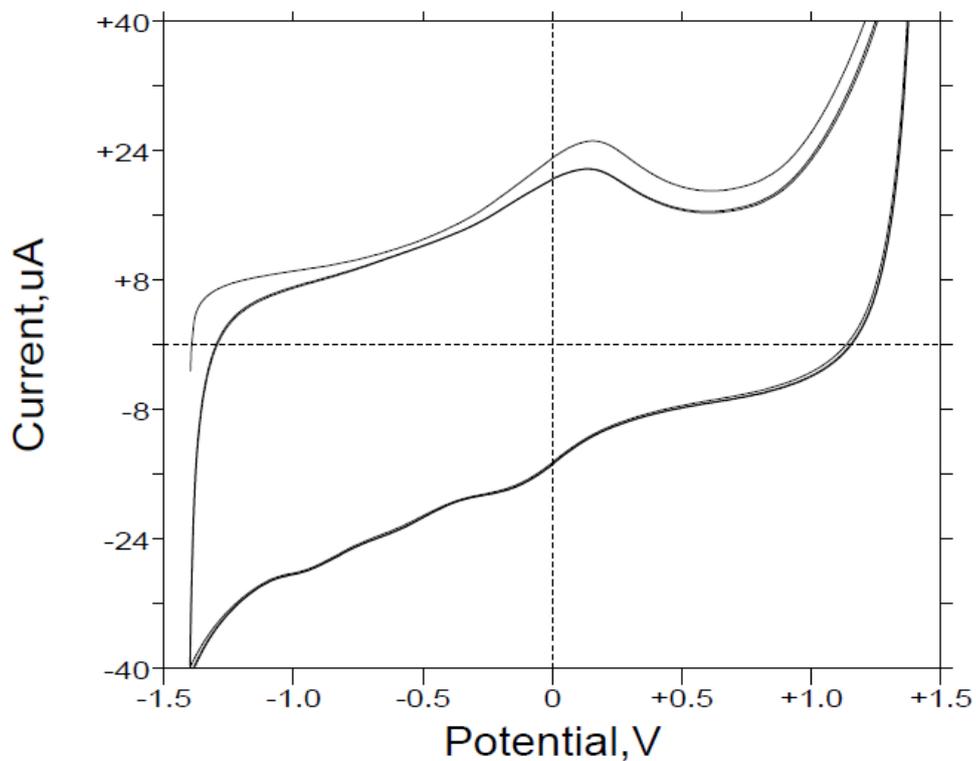


Abbildung 90: CV von Cytochrom c (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 500$ mV/s, mit N_2 gespült.

Cytochrom *c* war das erste Protein, bei welchem Elektronentransfer hin zur Elektrode nachgewiesen werden konnte. Daher ist es nicht verwunderlich, dass das CV in Abbildung 90 mehrere Redoxsignale aufweist. Vor allem die reversible Reaktion, dargestellt durch den Oxidationspeak bei +0,1 Volt und dem Reduktionspeak bei -0,2 Volt, deuten auf einen einfachen Elektronentransfer hin. Da die Zielsetzung dieser Arbeit jedoch nicht auf die elektrochemischen Hintergründe der einzelnen Verbindungen abzielt, sondern einzig der Frage nach der möglichen Erzeugung von ROS nachgeht, wurden diese Signale nicht weiter analysiert.

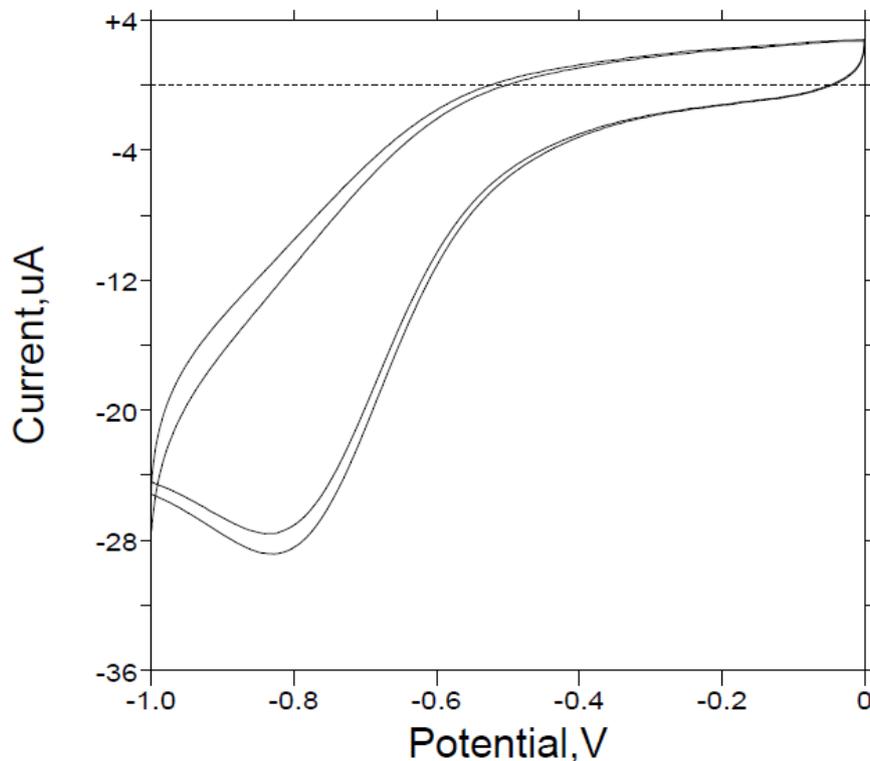


Abbildung 91: CV von Cytochrom *c* (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 100$ mV/s, mit O_2 gespült.

Ähnlich dem CV von Hämoglobin zeigt auch das CV von Cytochrom *c* (Abbildung 91) nach Spülen der Proteinlösung mit Sauerstoff einen deutlichen Reduktionspeak im Bereich von ca. -0,8 Volt. Ansonsten sind in diesem Potentialbereich keine weiteren Redoxpotentiale zu erkennen. Cytochrom *c* lässt sich daher ebenfalls dazu verwenden, die Auswirkungen von ROS sichtbar zu machen.

Auch die TB Messungen zeigen vergleichbare Ergebnisse wie bei den zuvor dargestellten Proteinen. Ist die Lösung mit N_2 gespült, so nimmt die Stromstärke erst ab, um dann annähernd konstant zu bleiben.

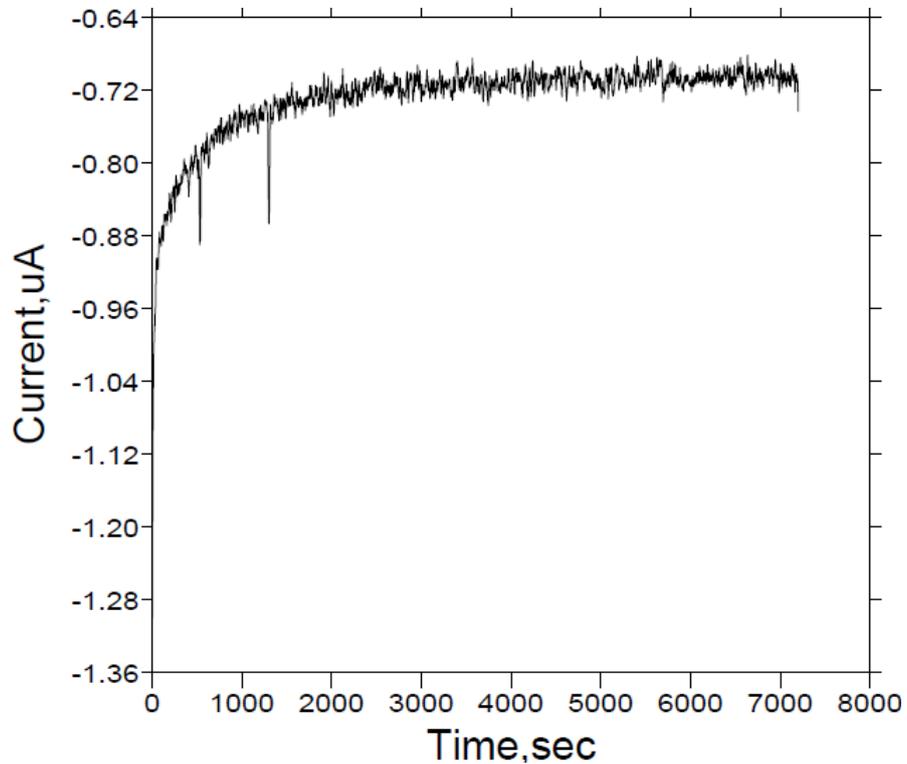


Abbildung 92: TB-Voltammogramm von Cytochrom *c* (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $t = 7200$ s, mit N_2 gespült (Messung nach jeder s).

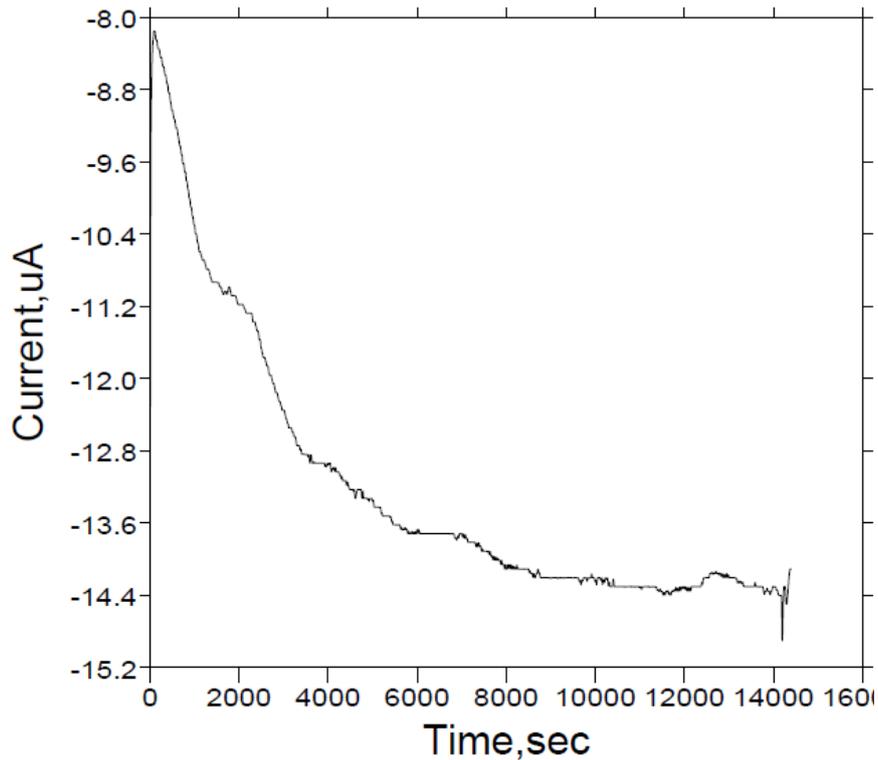


Abbildung 93: TB-Voltammogramm von Cytochrom c (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $t = 14400$ s, mit O_2 gespült (Messung nach 2s).

Die UV/Vis-Spektrophotometrischen Daten der Proteine, sowie die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analysen werden in den folgenden Kapiteln besprochen. Der Einfluss von ROS auf E.Coli wird im Abschnitt 2.6 Einfluss von ROS auf E.Coli behandelt.

2.3 UV/Vis-Spektrophotometrische Untersuchungen

Wie bereits in den Kapiteln unter Punkt 2.2 Biologische Aktivität von ROS gezeigt, lässt sich eine deutliche Aktivität der erzeugten ROS auf die Proteine nachweisen. Vor allem Hämoglobin und Myoglobin lassen sich mithilfe der elektrochemisch erzeugten ROS so modifizieren, dass die zu Anfang braun gefärbten Proteinlösungen schon nach wenigen Stunden völlig farblos werden. Die visuell erkennbare Entfärbung sagt aber noch nichts über den Verlauf der Reaktionen aus, die in der elektrochemischen Zelle stattfinden. Durch die qualitative Farbänderung ist aber sicher, dass die Proteine verändert werden.

Um mehr Informationen über den Reaktionsverlauf zu erhalten, wurden UV/Vis-spektrophotometrische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden von den Proteinlösungen, die während der elektrochemischen TB-Messungen ROS ausgesetzt waren, bzw. die während der Messung mit Stickstoff gespült wurden, nach mehreren Zeitabschnitten Proben von jeweils 0,25 ml genommen, mit 1 ml Wasser verdünnt und in eine Quarzküvette überführt. Die Verdünnung der Probe erfolgte, damit die Absorption des größten Peaks der Blindprobe im UV/Vis-Spektrum möglichst nicht zu weit über eine Absorption von 1 (linearer Bereich nach Lambert-Beer) hinausging.

Alle Proben wurden direkt nach Einfüllen in die Küvette und unter den gleichen Temperaturbedingungen vermessen. Nach den einzelnen Messungen wurde die Küvette mit Wasser und Ethanol gereinigt, getrocknet und anschließend für die weiteren Messungen wiederverwendet, um den Fehler, der durch die unterschiedliche Beschaffenheit verschiedener Küvetten auftreten kann, zu umgehen. Alle Messungen wurden im Triplikat aufgenommen, um reproduzierbare Werte zu erhalten.

2.3.1 UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung des Hämoglobins

Vor der Aufnahme der UV/Vis-Spektren wurden Lösungen des Hämoglobins mit einer Konzentration von 1 mg/ml elektrochemisch behandelt.

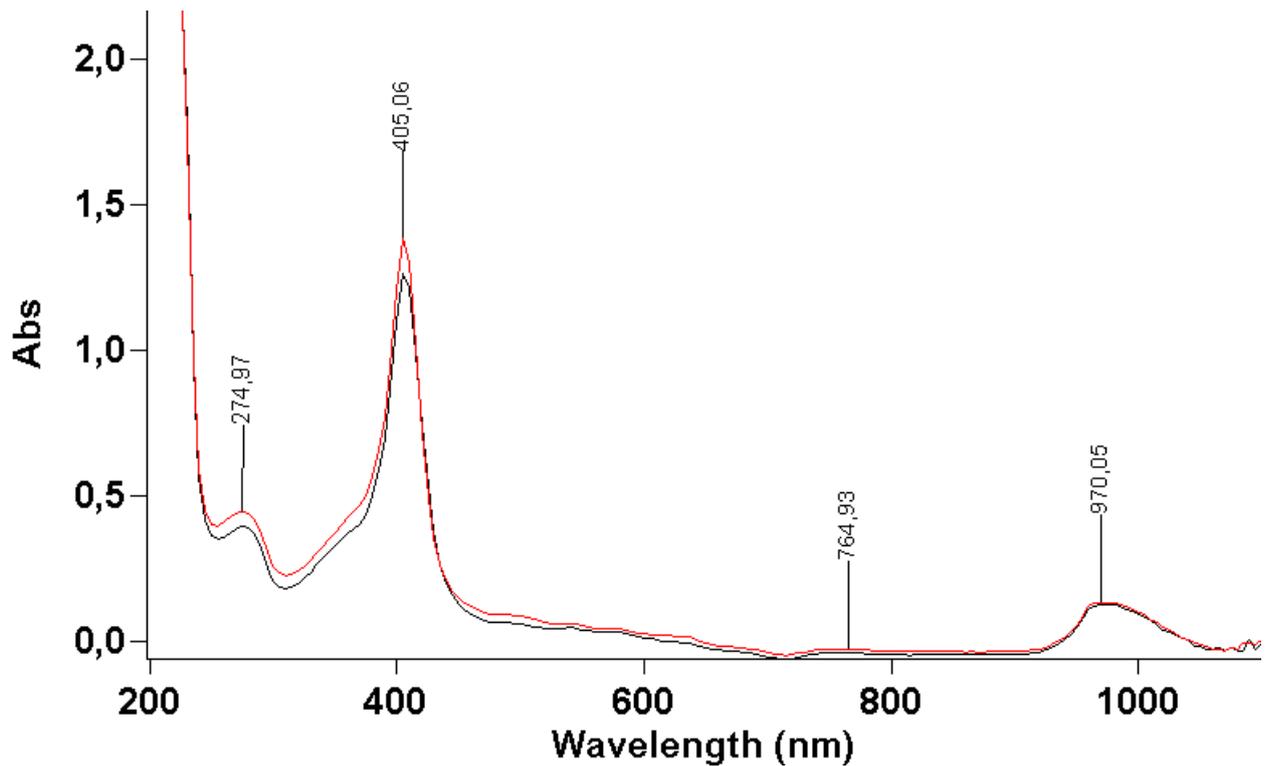


Abbildung 94: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Hämoglobinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, mit N₂ gespült. (Rot: Blindprobe, Schwarz: nach 48 h)

Abbildung 94 zeigt ein klassisches UV/Vis-Spektrogramm von Hämoglobin. Die Aufnahme erfolgte in einer mit Stickstoff gespülten und unter Spannung gesetzte Probe von Hämoglobin in einer Phosphatpufferlösung bei pH 7,4. Eine deutliche Absorption bei 405,06 nm, die sogenannte Soret-Bande, zeigt die Anwesenheit des Porphyringerüsts inklusive Eisenanteil an. Diese Bande kommt vor allem dadurch zustande, dass das π -Elektronensystem des Porphyringerüsts die größte Absorption bei rund 400 nm aufweist. In der Literatur findet man als Werte für die Soret-Bande einen Bereich von 400 nm \pm 10 nm.^[69]

Auch nach 48 Stunden tritt keine nennenswerte Änderung des Spektrums auf. Eine kleine Verschiebung der einzelnen Signale liegt im Rahmen der Messgenauigkeit, d. h. ist experimentell nicht signifikant. Beispielsweise können gewisse Schwankungen und Verschiebungen durch Adsorption von Hämoglobin an der Glaswand des Reaktionsgefäßes erklärt werden. Trotz Rührens der Probelösung lässt sich eine Adsorption des Proteins an der Glaswand nicht vollständig vermeiden.

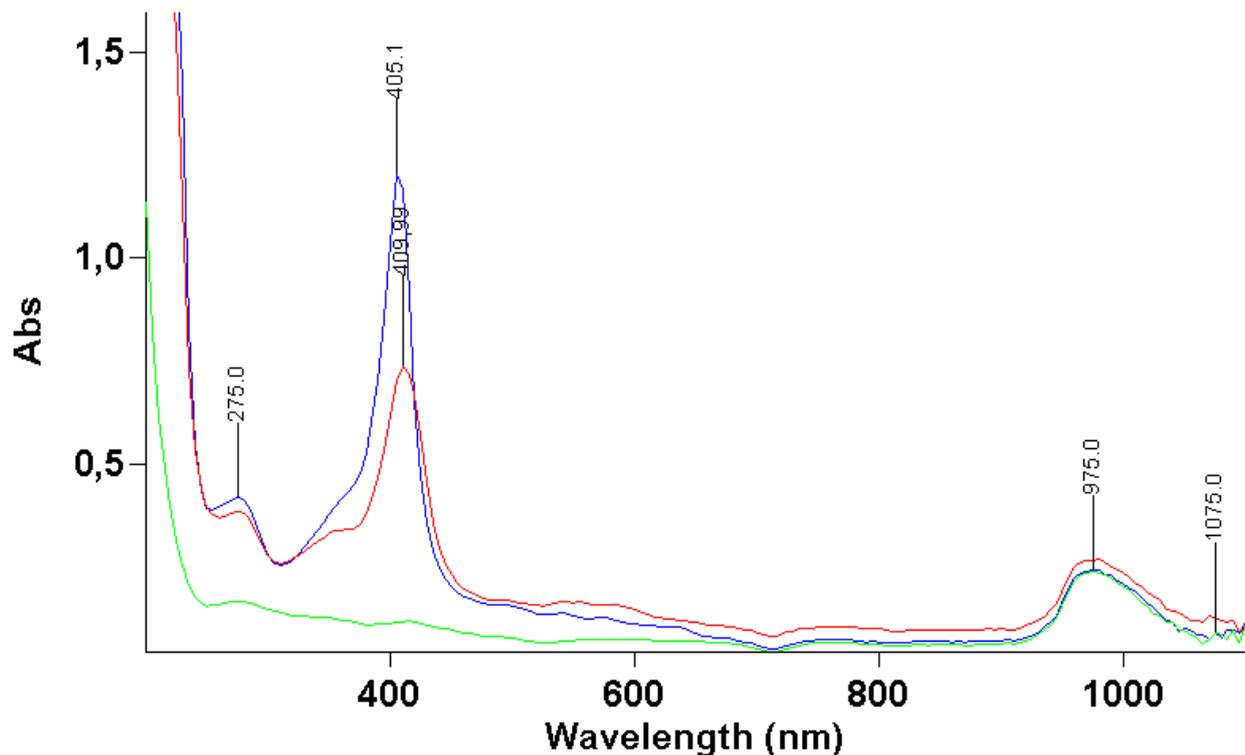


Abbildung 95: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Hämoglobinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, mit O₂ gespült. (Blau: Blindprobe, Rot: nach 1h, Grün: nach 18 h)

Vergleicht man die zuvor gezeigte Abbildung 94 mit der hier zu sehenden Abbildung 95, so sieht man direkt die signifikanten Unterschiede im Kurvenverlauf, die bereits schon nach einer Stunde deutlich zutage treten. Diese Spektren wurden in einer Lösung von Hämoglobin gemessen, welche zuvor mit Sauerstoff durchspült wurde und danach unter Spannung bei -0,75 Volt (Potentiostat von BAS) bzw. -1,5 Volt (Spannungsgeber EA-4003) gesetzt wurde.

Man erkennt hier deutlich, dass die Absorption bei 405 nm nicht nur deutlich mit der Zeit abnimmt, sondern dass auch eine leichte Verschiebung des Peaks zu höheren Wellenlängen erfolgt (von 405 zu 410 nm), bevor nach 18 Stunden die Soret-Bande überhaupt nicht mehr nachzuweisen ist. Dadurch lässt sich schließen, dass eine Veränderung der Koordinationssphäre stattfindet und das anschließend das Chromophor langsam zerstört wird.

Dieses Verhalten konnte in einer Kontrolle mit einer Hämoglobinlösung, die 4 Stunden unter Sauerstoffzufuhr gerührt wurde, jedoch nicht unter Spannung gesetzt wurde, nicht festgestellt werden.

Bemerkenswert ist auch, dass sich die Absorptionen bei 975 nm nicht voneinander unterscheiden, egal wie lange die Proteinlösung unter Spannung gehalten wird.

Dadurch lässt sich vermuten, dass hier eine Reaktion stattfindet, die dafür sorgt, dass das Protoporphyringerüst aufgespalten bzw. verändert wird. Leider war es nicht möglich eine genauere Untersuchung der Veränderungen im Protein durchzuführen. Wichtig wäre hierbei auch die Klärung, ob durch die elektrochemischen Prozesse das Fe^{2+} -Ion im Protoporphyrin verändert wird, oder nicht. Vorstellbar wäre eine Oxidation zu Fe^{3+} , wodurch es zu einer Instabilisierung des Porphyrinringes kommen würde.

Während die Hämoglobinlösung, die vor und während der elektrochemischen Behandlung mit Stickstoff gespült wurde, auch noch nach 48 Stunden ihre dunkelbraune Färbung behalten hat und auch im UV/Vis-Spektrum nur sehr wenig Änderung erfahren hat, zeigt sich beim Spülen der Probe mit Sauerstoff und dem Einfluss der Spannung schon bereits nach wenigen Minuten eine deutliche Entfärbung der Probenlösung. Nach ca. 3-5 Stunden ist die Lösung dann wasserklar, jedoch befindet sich meistens noch eine leicht bräunliche, sehr stabile Schaumschicht auf der Oberfläche der Lösung, die durch das Durchspülen der Lösung mit Gas hervorgerufen wurde.

Als Messzelle wurde der gleiche Aufbau verwendet, der schon zur Erzeugung von ROS in Wasser zum Einsatz kam. Da die Elektroden von BAS (Glaskohlenstoff als Kathode, Platinspirale als Anode) jedoch eine sehr kleine Oberfläche aufweisen, wurden anschließend Untersuchungen mit einem Graphitstab als Kathode durchgeführt. Durch die signifikant größere Elektrodenoberfläche lassen sich weitaus größere Mengen an ROS erzeugen, die dann die Proteine angreifen können.

Bei den zuvor gezeigten Abbildungen wurde Hämoglobin eingesetzt, das direkt aus der Vorratsflasche entnommen wurde. Um jedoch einen Einfluss von eventuell zugesetzten Salzen und anderen Additiven auszuschließen, die das Ergebnis und die Abnahme der Proteinkonzentration beeinflussen könnten, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, nachdem das Hämoglobin über eine Sephadex G25-Säule gereinigt wurde. Die Ergebnisse zu dieser Messung sind in Abbildung 96 aufgeführt.

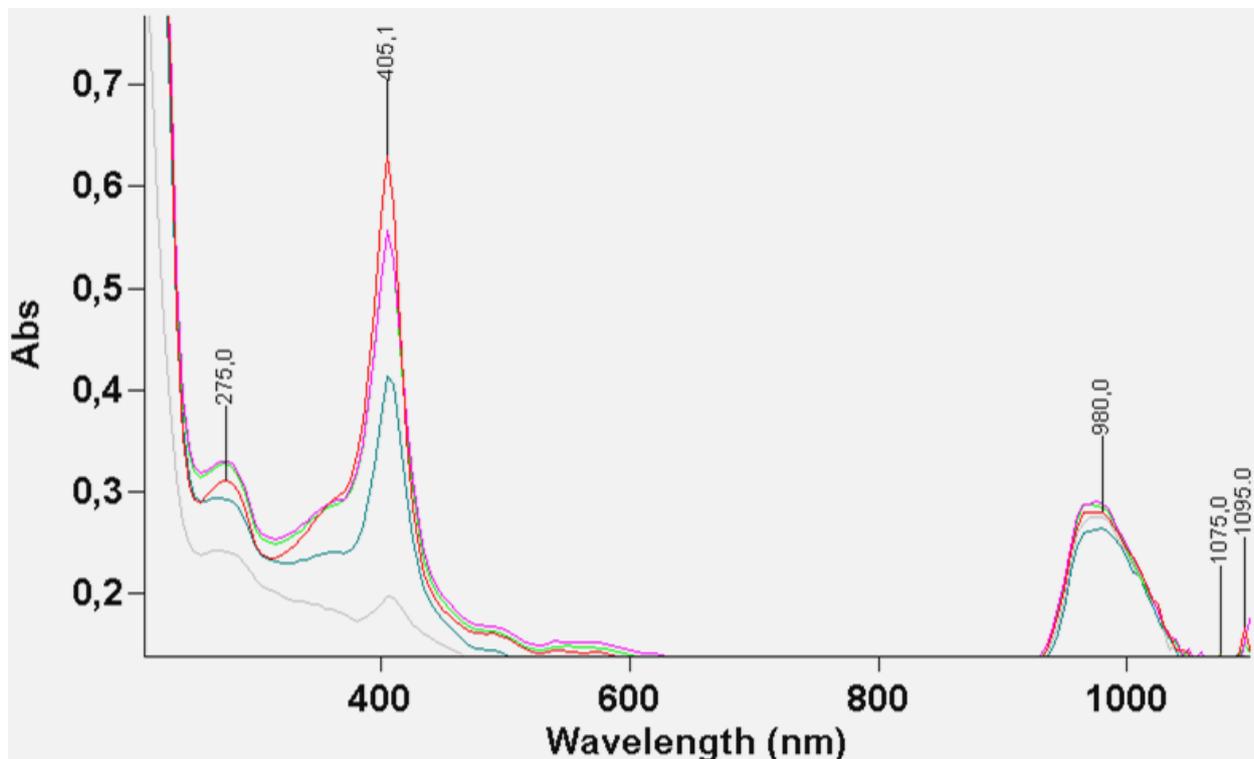


Abbildung 96: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Hämoglobinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, mit O₂ gespült. (Rot: Blindprobe, Violett: nach 1,5 h, Grün: nach 2,5 h, Blau nach 15 h, Grau nach 24 h)

Auffallend an diesen Ergebnissen ist, dass sich die Soret-Banden nun nicht mehr verschieben und dass die Absorption bei ca. 275 nm nun leicht mit den einzelnen Probennahmen schwankt. Da nur die beigefügten Additive aus der Hämoglobinursubstanz entfernt wurden, kann man davon ausgehen, dass diese Additive mit einer Rolle bei der elektrochemischen Umsetzung der Proteinlösung spielen (z. B. anodische Oxidation von Cl^- aus NaCl zu Cl_2).

Daher wurde bei allen folgenden Messungen nur eine vorher aufgereinigte Proteinlösung verwendet.

Um aufzuzeigen, dass diese Ergebnisse unabhängig vom verwendeten Elektrodenmaterial sind, wurden weitere Messungen mit Gold-, Titan- und Platin-Elektroden durchgeführt, die alle zu ähnlichen Ergebnissen führten. Einzig durch die unterschiedlichen Elektrodenoberflächen wurden andere Reaktionszeiten gemessen, nach denen das Hämoglobin vollständig zerstört war. Als Beleg hierfür soll Abbildung 97 dienen, die die UV/Vis-spektrophotometrische Aufnahmen einer Hämoglobinlösung zeigt, die mithilfe einer Platinkathode (Platinspirale MW-1033 von BAS) unter Spannung gesetzt wurde. Als GE kam eine weitere Platinelektrode von BAS (MW-1032) zum Einsatz.

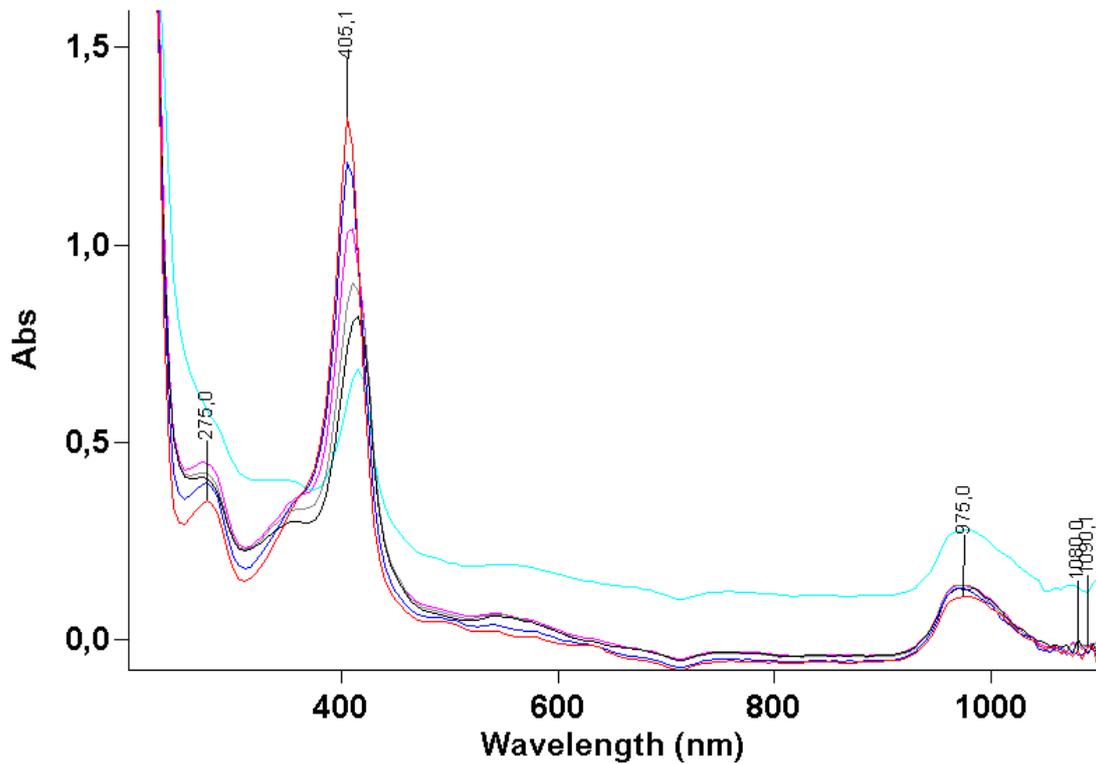


Abbildung 97: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Hämoglobinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, mit O₂ gespült. (Rot: Blindprobe, Schwarz: 1 h, Violett: 3 h, Grau: 5 h, Dunkelgrau: 7 h, Türkis: 24 h)

Die türkisfarbene Kurve, welche nach 24 Stunden aufgenommen wurde, ist aufgrund einer neu gemessenen Nullkurve bzw. Nullabgleich verrutscht. Auch in dieser Abbildung lässt sich die deutliche Verringerung des Absorptionssignals bei 405 nm sehr gut erkennen.

2.3.2 UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung des Myoglobins

Der Nachweis, dass Hämoglobin tatsächlich durch die elektrochemisch erzeugten ROS verändert, bzw. zerstört werden kann, wurde bereits in Punkt 2.3.1 UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung des Hämoglobins erbracht (wenn auch indirekt).

Um jedoch die eigentliche Reaktivität von ROS aufzeigen zu können, reicht es nicht aus, die Auswirkungen davon auf nur ein Protein nachzuweisen. Deshalb wurden weitere Untersuchungen mit Myoglobin durchgeführt.

Der Versuchsaufbau ist für beide Proteine identisch. Myoglobin wurde ebenfalls vor Einsatz in der elektrochemischen Zelle über eine Sephadex G25-Säule gereinigt und von eventuell beigefügten Salzen entfernt. Als Grundkonzentration wurde 1 mg Myoglobin pro ml Lösung eingewogen.

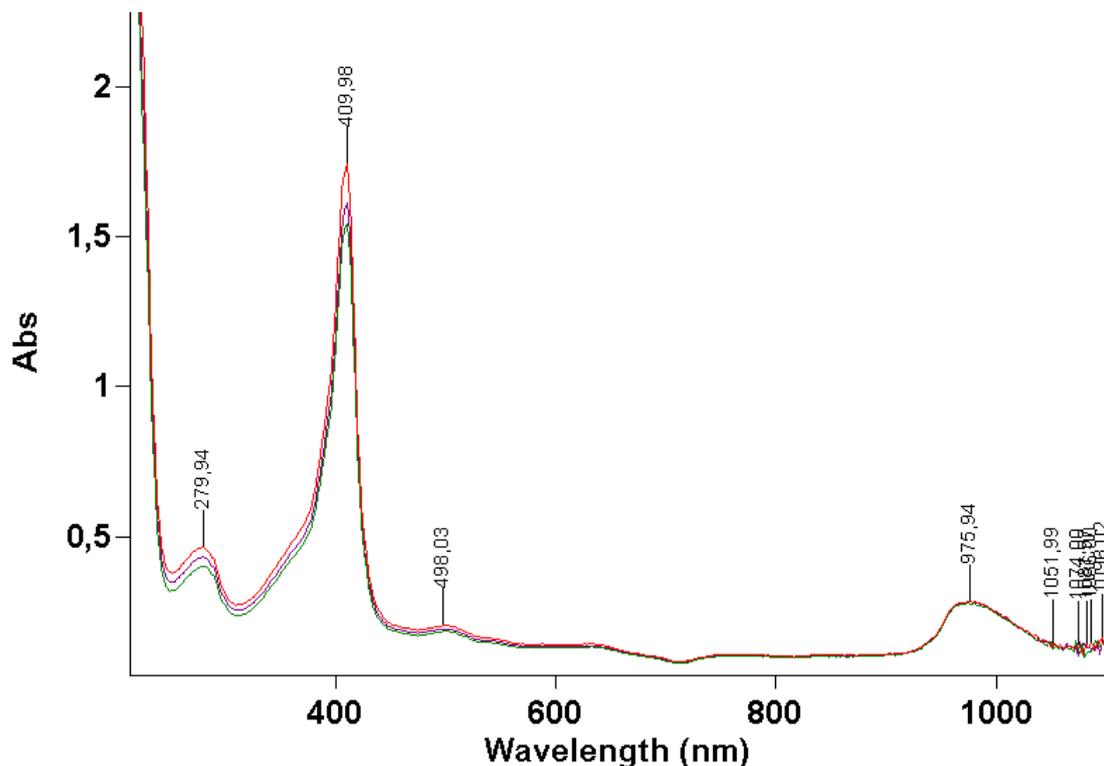


Abbildung 98: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Myoglobin-Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit, gespült mit N₂. (Rot: Blindprobe, Violett: 7 h, Grün: 24 h)

Nach Spülen der Proteinlösung mit Stickstoff erhält man bei Überprüfung der Proteinkonzentration mithilfe der UV/Vis-Spektrophotometrie die in Abbildung 98 gezeigten Ergebnisse. Ähnlich wie zuvor bei der Untersuchung von Hämoglobin, ändert sich die Myoglobinkonzentration nach Entfernen des Sauerstoffs aus der Lösung trotz Anlegung einer Spannung von -0,8 Volt nur unwesentlich über die beobachtete Zeit.

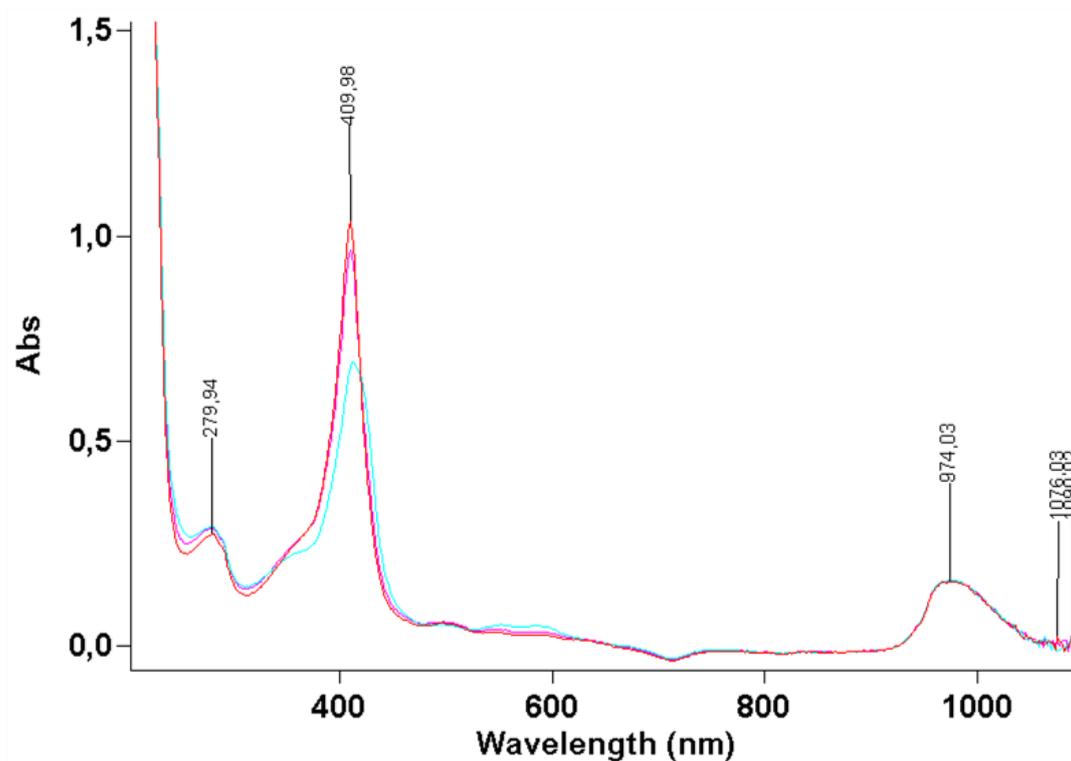


Abbildung 99: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Myoglobinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, mit O₂ gespült. (Rot: Blindprobe, Violett: 1 h, Türkis: 3 h)

Setzt man nun Sauerstoff zu und betrachtet man nun die Ergebnisse aus Abbildung 99, so fällt die deutliche Abnahme der Soret-Bande bereits nach 3 Stunden auf. Dabei treten die gleichen Änderungen auf, die zuvor auch bei den Messungen von Hämoglobin zu sehen waren. Auch hierfür wurde die original Glaskohlenstoffelektrode von BAS als Kathode verwendet.

Ebenfalls vergleichbar mit Hämoglobin ist die Tatsache, dass sich auch hier die Absorptionen in der Gegend von 280 nm und 974 nm nicht verändern.

Auch beim Myoglobin scheint sich der elektrochemisch erzeugte Effekt nur auf die Soret-Bande auszuwirken und somit zu allererst eine Änderung des Protoporphyringerüsts zu bewirken. Auch hier scheint die einfachste Erklärung eine Reaktion mithilfe des Eisenions zu sein.

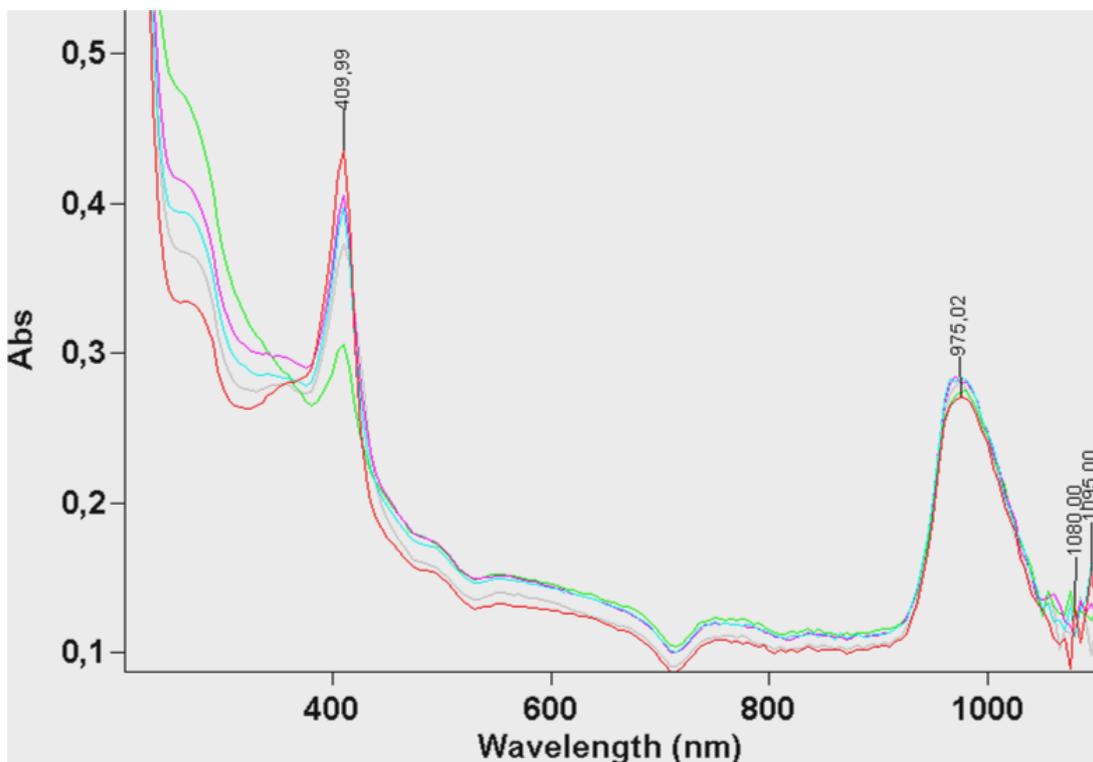


Abbildung 100: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Myoglobinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, mit O₂ gespült. (Rot: Blindprobe, Violett: 1 h, Türkis: 2 h, Grau: 5 h, Grün: 30 h)

Verwendet man anstatt der Glaskohlstoffelektrode von BAS einen Graphitstab für die elektrochemische Erzeugung der ROS, so erhält man nach Aufnahme der UV/Vis-Spektren das in Abbildung 100 dargestellte Bild. Trotz der deutlich größeren Oberfläche des Graphitstabes erhält man keine höhere Umsetzungsrate des Myoglobins.

Auch hier dauert es deutlich länger als 4 Stunden, bis die Myoglobinkonzentration signifikant reduziert ist. Die Kontrolllösung, die unter Sauerstoffzugabe, aber ohne Spannung über einen Zeitraum von 5 Stunden beobachtet wurde, zeigt auch hier keinen signifikanten Abfall der Soret-Bande.

2.3.3 UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung des Cytochrom c

Ähnlich wie bei den zuvor aufgenommenen Spektren von Hämoglobin und Myoglobin wurden auch die Lösungen von Cytochrom c zuerst elektrochemisch behandelt und dann UV/Vis-spektrometrisch vermessen.

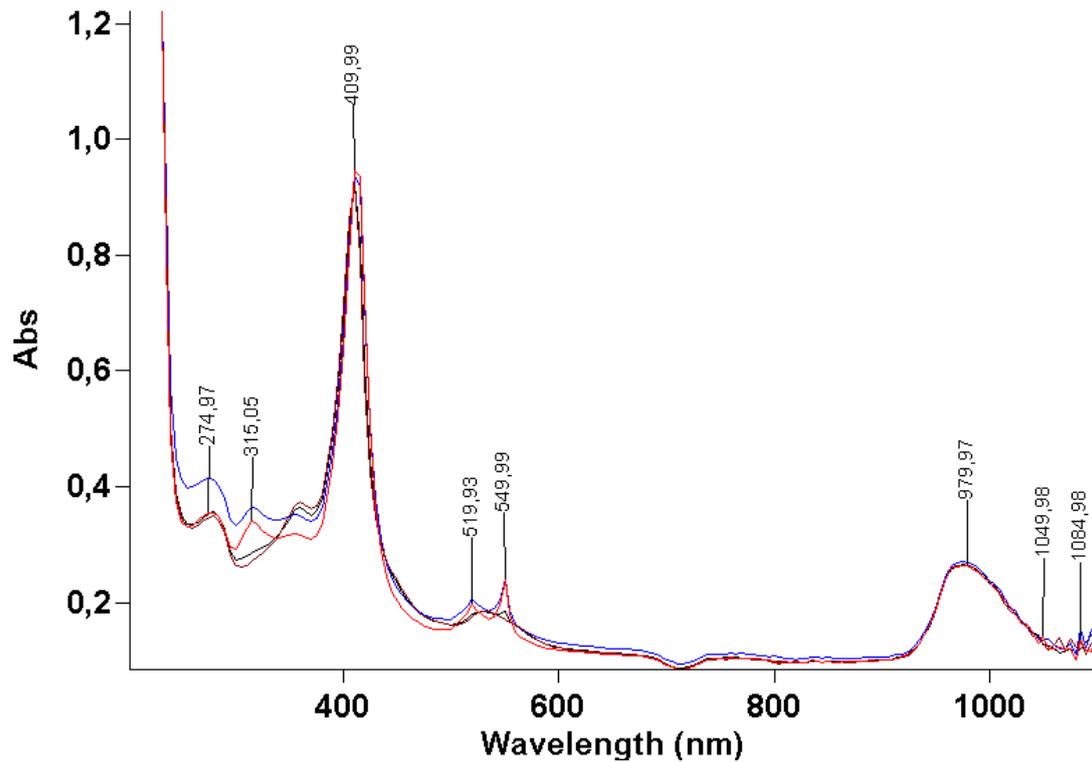


Abbildung 101: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Cytochromkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, mit N₂ gespült. (Rot: Blindprobe, Blau: 1 h, Braun: 3 h, Schwarz: 23 h)

Nach dem Spülen der Cytochrom c Lösung mit Stickstoff und der Anlage von -0,8 Volt Spannung zeigt sich hier (Abbildung 101) ein Spektrum, das den Spektren von Hämoglobin (Abbildung 94) und Myoglobin (Abbildung 98) ähnlich sieht.

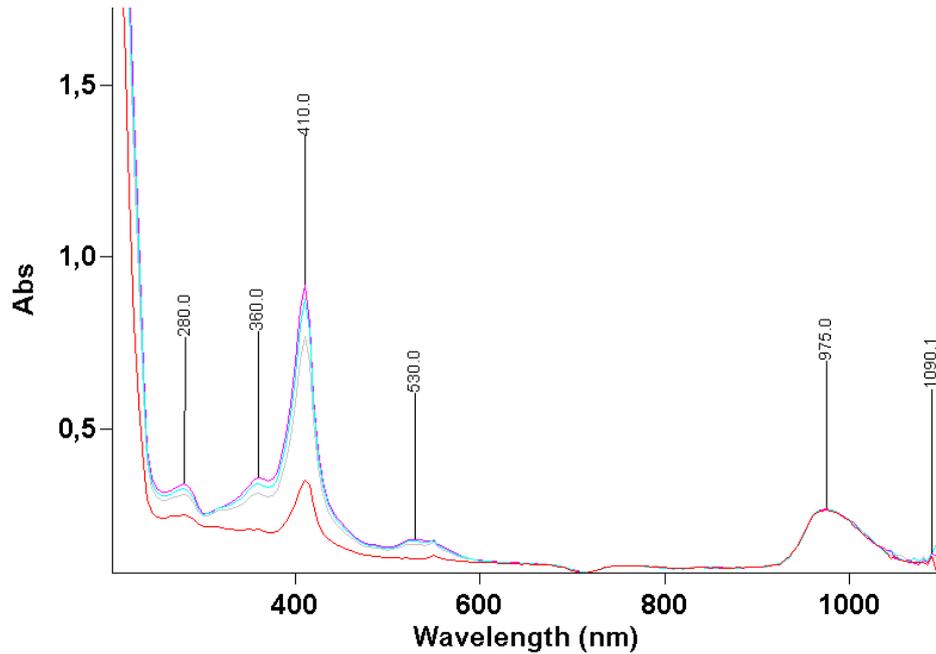


Abbildung 102: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Cytochromkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, mit O₂ gespült. (Violett: Blindprobe, Türkis: 1 h, Rot: 24 h)

Auch nach dem Spülen mit Sauerstoff lassen sich Gemeinsamkeiten zwischen den einzelnen Proteinen erkennen. Abbildung 102 zeigt, dass der zugesetzte Sauerstoff, bzw. die daraus entstehenden ROS auch beim Cytochrom c in der Lage ist, die Intensität der Soret-Bande deutlich zu verringern. Allerdings wird nicht nur die Soret-Bande signifikant verkleinert, auch ein für das Cytochrom c charakteristischer Absorptionspeak bei 530 nm (Q-Bande), der zuerst deutlich zu erkennen ist, ist nach 23 Stunden völlig verschwunden. Das Signal bei 530 nm ist ein Indikator für Fe²⁺/Fe³⁺. Dieses Signal sollte sich verstärken, wenn Cytochrom c reduziert wird, und es sollte verschwinden, wenn es oxidiert wird.

2.4 Einfluss von Superoxid-Dismutase und Katalase

In den vorangegangenen Kapiteln wurde der Effekt von ROS auf Proteine eingehend beschrieben. Das ROS durch den elektrochemischen Versuchsaufbau erzeugt wurden, wurde durch die Tatsache belegt, dass ein Reduktionspeak für ROS im zu erwarteten Bereich des Zyklovoltammogrammes auftaucht, wenn Sauerstoff in der Lösung vorhanden ist. Dies mag als einziger Beleg für das Vorhandensein von ROS etwas zu schwach sein.

Aus diesem Grunde wurden weitere Messungen durchgeführt, die das Vorhandensein von ROS aufzeigen sollten. Da die meisten analytischen Methoden zur Kontrolle von ROS in dem verwendeten elektrochemischen System versagen (wie bereits zuvor erwähnt, s. Seite 56), musste eine andere Nachweismethode gefunden werden.

Um die ROS-Erzeugung nachweisen zu können, kann man sich die Auswirkungen von Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase (Cat) (auch in einer elektrochemischen Zelle) zu Nutze machen.

Superoxid-Dismutase erzeugt Wasserstoffperoxid aus Superoxid-Anionen und hilft dadurch in der Zelle bei der Inaktivierung dieser hochreaktiven Sauerstoffspezies.

Die Katalase baut danach das gebildete Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff ab (vgl. Abbildung 15) und schützt so die Zelle vor OS. Dabei arbeiten diese beiden Stoffe „Hand-in-Hand“. Eine Störung dieses Prozesses führt meist zu OS.

Beide Verbindungen sind in der elektrochemischen Zelle stabil und werden durch zykvoltametrische Messungen nicht dauerhaft oxidiert oder reduziert.

Ziel dieser Versuchsreihe ist es nachzuweisen, ob durch die Zugabe von Katalase die Proteine weiterhin abgebaut werden, wenn eine Spannung angelegt und Sauerstoff zugeführt wird. Wenn die Zerstörung der Proteine auf Einwirkungen von ROS zurückgeht, sollte die Zugabe von Katalase diesen Prozess ganz verhindern oder zumindest signifikant verlangsamen. Andererseits sollte die Zugabe von SOD durch die Bildung von H₂O₂ diesen Prozess eher noch beschleunigen, als ihn aufzuhalten.

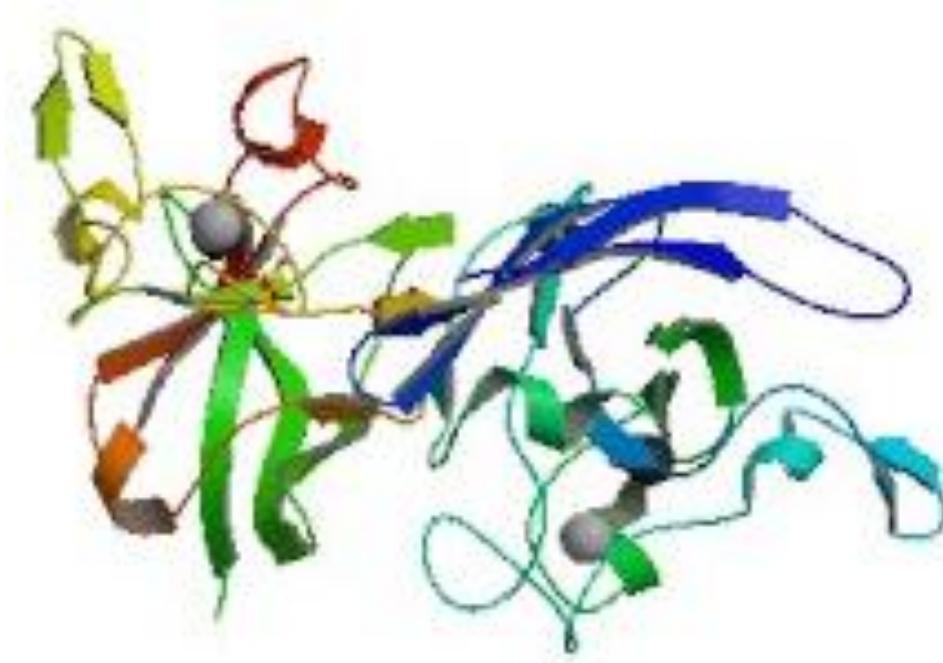


Abbildung 103: Kristallstruktur von SOD (Cu/Zn) aus *neisseria meningitidis* (Bakterium, Erreger der eitrigen Hirnhautentzündung; K91E mutant)^[70]

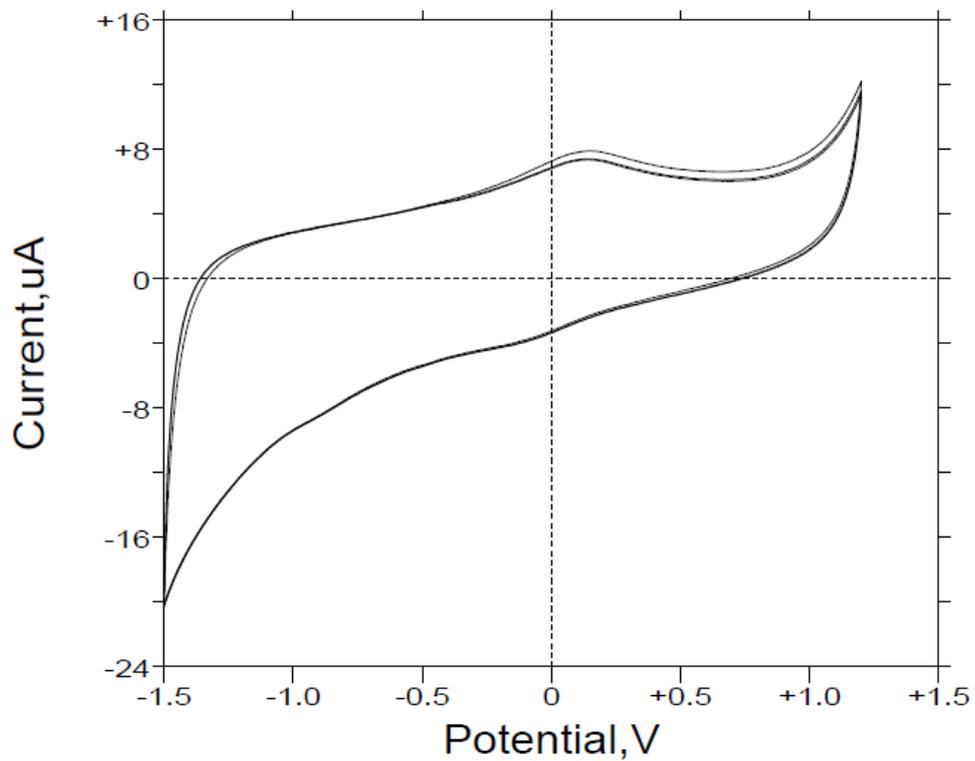


Abbildung 104: CV von SOD (5 mg/ 15 ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült.

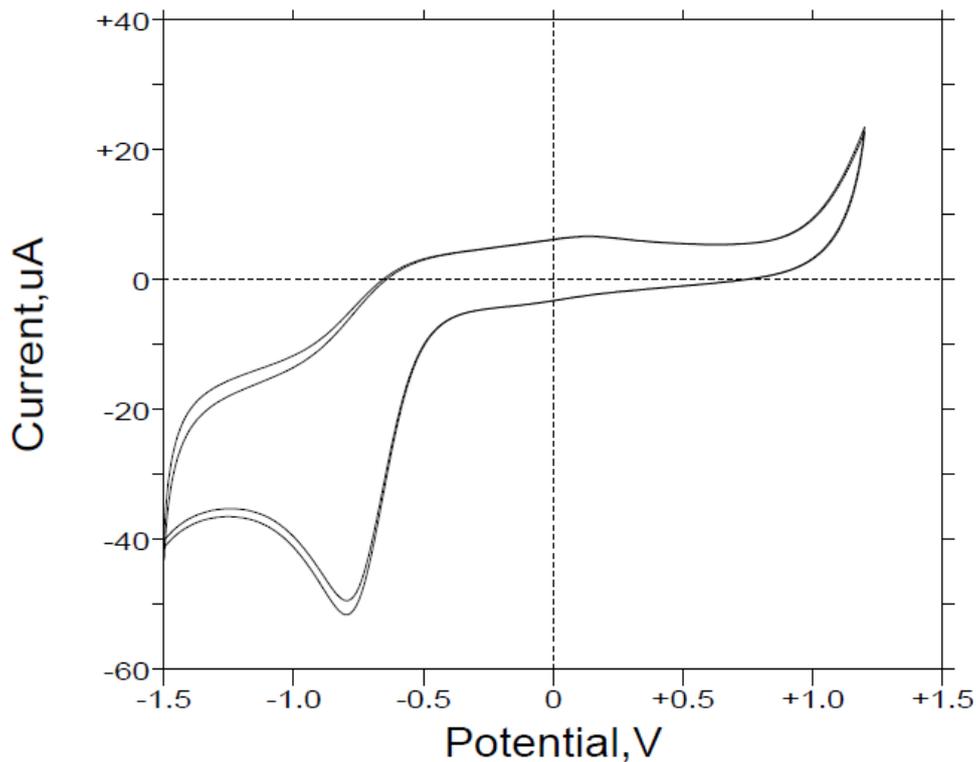


Abbildung 105: CV von SOD (5 mg/ 15 ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 250$ mV/s, mit O₂ gespült.

Wie in den beiden CVs aus Abbildung 104 und Abbildung 105 zu erkennen ist, zeigt die Superoxid-Dismutase keine ausgeprägten Peaks im interessanten Potentialbereich. Jeweils ein kleiner Oxidations- und ein kleiner Reduktionspeak lassen sich nahe von 0 Volt beobachten. Die sauerstofffreie Lösung von SOD zeigt im Potentialbereich von -0,5 bis -1,0 Volt keine störenden Peaks und sollte daher problemlos innerhalb der Proteinmessungen über einen Zeitraum von 24 Stunden eingesetzt werden können.

Enthält die Lösung Sauerstoff, so zeigt sich bei etwa -0,79 Volt ein deutlicher Reduktionspeak, wie er auch schon bei den vorangegangenen Messungen zu sehen gewesen war. SOD scheint daher keinen negativen Einfluss auf die Erzeugung von ROS zu besitzen.

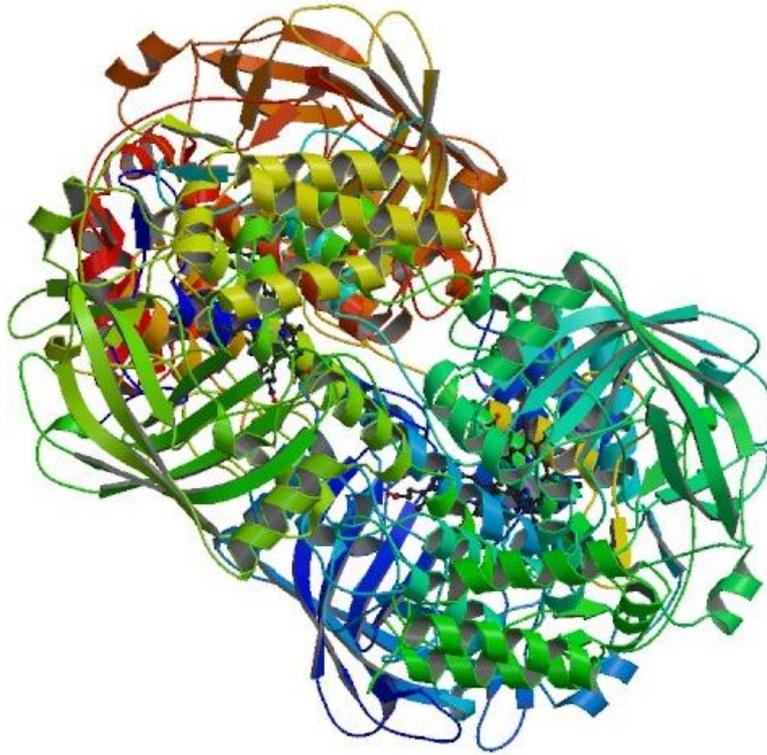


Abbildung 106: Kristallstruktur von Cat (tetragonal aus menschlicher Erythrocyt-Katalase)^[71]

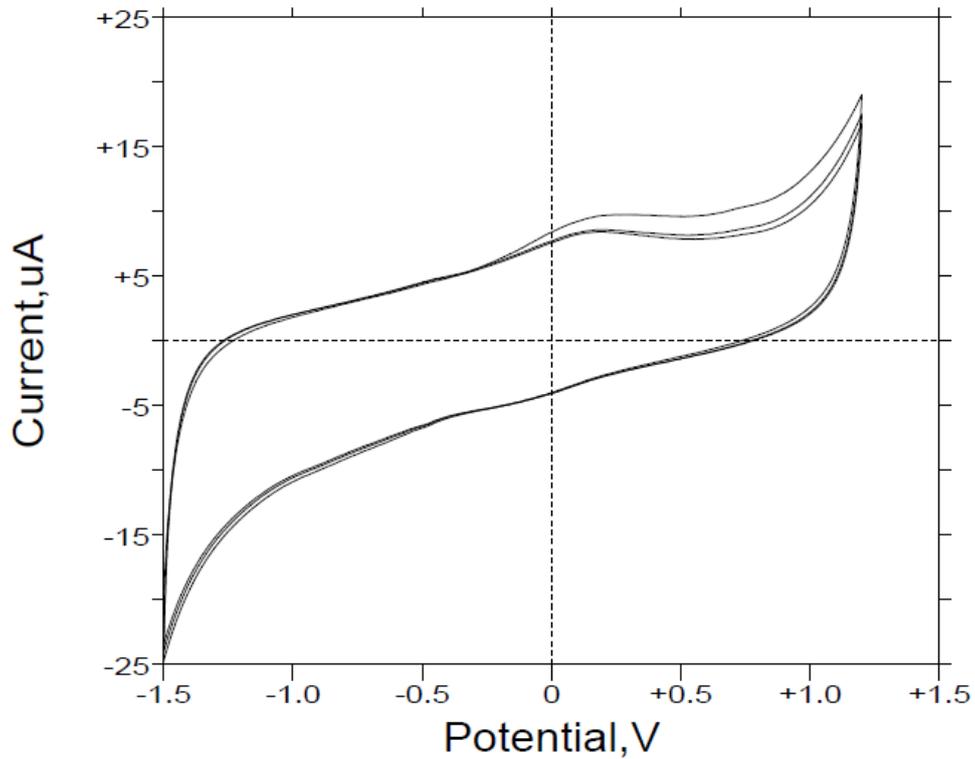


Abbildung 107: CV von Cat (25 mg/ 15 ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 250$ mV/s, mit N_2 gespült.

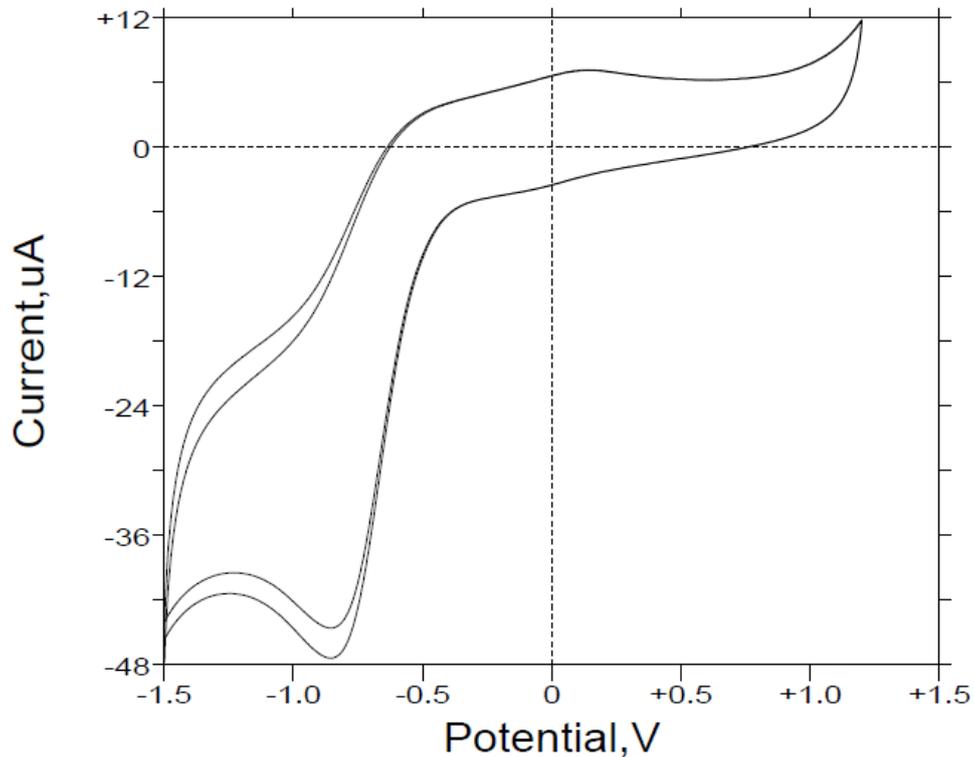


Abbildung 108: CV von Cat (25 mg/ 15 ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit O_2 gespült.

Ähnlich wie die CVs von SOD zeigen die CVs von Katalase im untersuchten Potentialverlauf keine störenden Redoxpotentiale. Zwei kleine Signale nahe 0 Volt sind erkennbar, vergleichbar den Signalen des SODs.

Abbildung 106 einen deutlichen Reduktionspeak bei etwa -0,85 Volt, der erst nach dem Spülen der Lösung mit Sauerstoff auftritt. Auch wenn die Katalase in der Lage sein sollte, OS zu vermindern und ROS, vor allem Wasserstoffperoxid, abzubauen, so kann sie die Erzeugung von ROS an den Elektroden augenscheinlich nicht verhindern.

Ob die Katalase trotzdem in der Lage ist, die Proteine vor ROS zu schützen, wie es in der Theorie der Fall sein sollte, wurde experimentell überprüft. Dazu wurden erst Blindproben mit Proteinen, SOD und/oder Katalase hergestellt und mehrere Stunden mit Sauerstoff begast. Dabei konnten keine sehr deutliche, optische Unterschiede der einzelnen Proteinlösungen festgestellt werden.

Aufgrund dieser Vorversuche lässt sich sagen, dass weder die SOD noch die Katalase mit den Proteinen reagieren und dass die Proteine auch nicht alleine durch Einfluss von Sauerstoff verändert werden.

Wird eine Hämoglobinlösung mit 5 mg SOD (Menge sollte ausreichend sein, da eine katalytische Reaktion angenommen wird) versetzt und elektrochemisch behandelt, so tritt bereits nach einer Stunde eine leichte Entfärbung der Lösung auf. In Abbildung 109 erkennt man, dass bereits nach einer Stunde die Soret-Bande deutlich reduziert wurde. Nach 5 Stunden ist die Soret-Bande signifikant reduziert worden und man erkennt die gleichen Gegebenheiten, wie in der Proteinlösung ohne SOD, die elektrochemisch behandelt und mit Sauerstoff begast wurde.

Eine wirkliche Verstärkung dieses Effektes durch den Einfluss von SOD konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

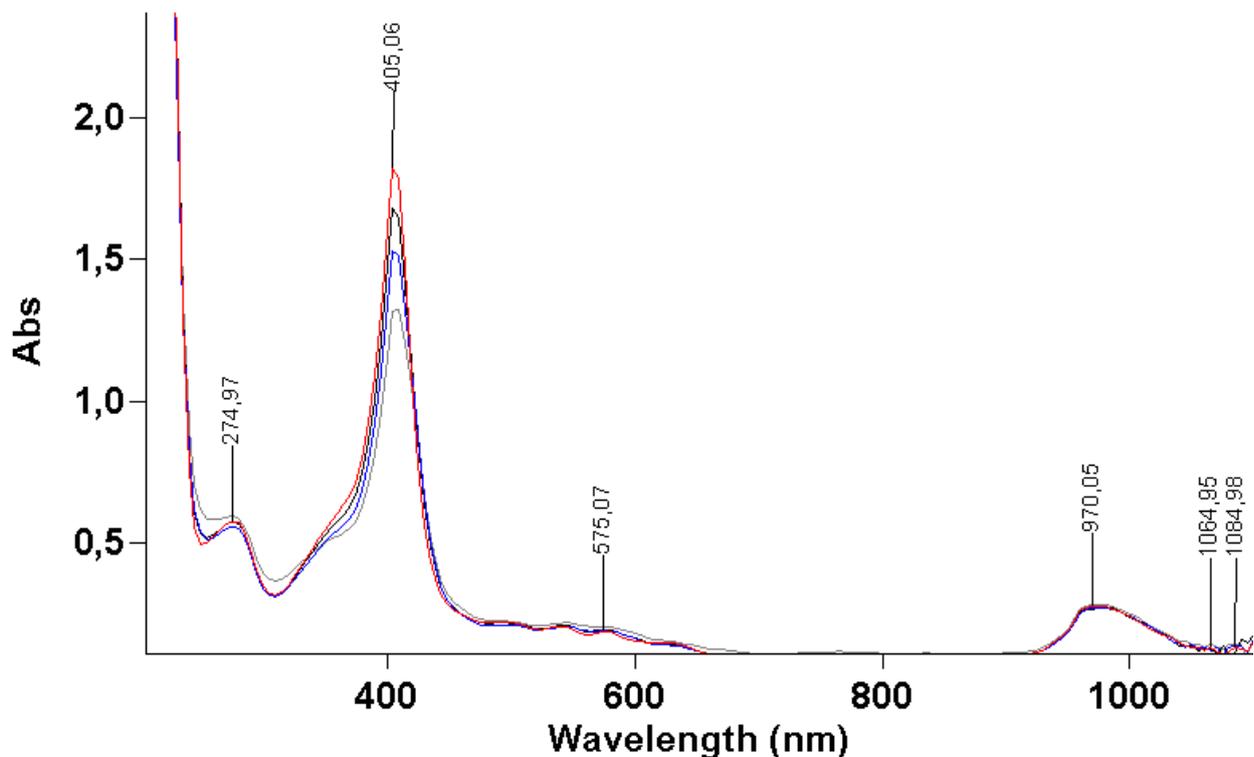


Abbildung 109: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Hämoglobin-konzentration in Abhängigkeit von der Zeit, 5 mg SOD; mit O₂ gespült. (Rot: Blindprobe, Grün: 1 h, Blau: 2 h; Grau: 5 h)

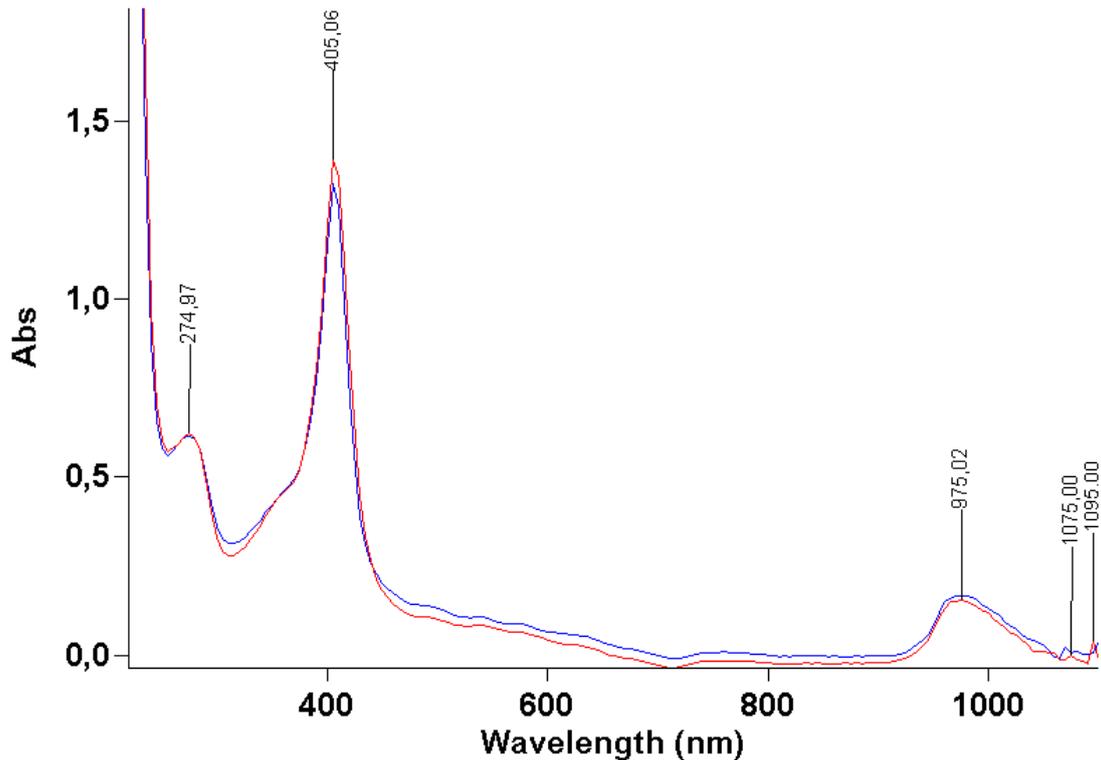


Abbildung 110: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Hämoglobinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, 5 mg SOD; 25 mg Cat; mit O₂ gespült.
(Rot: Blindprobe, Blau: 17 h)

Ganz anders stellen sich die Tatsachen dar, wenn man zu der Lösung des Proteins Katalase hinzufügt. Abbildung 110 zeigt sehr deutlich, dass selbst nach 17 Stunden sich die Soret-Bande kaum verändert hat. Auch sah die Lösung selbst noch genauso aus, wie zu Beginn der Messung. Eine Änderung der Farbe oder der Farbintensität konnte nicht beobachtet werden.

Dieser Versuch zeigt eindrucksvoll die erhofften Ergebnisse. Die Katalase „schützt“ die Proteine und verhindert deren Umwandlung. Dabei hat die Katalase aber nur Einfluss auf ROS, wodurch es nun als gesichert gelten darf, dass durch den verwendeten Versuchsaufbau tatsächlich ROS erzeugt wurden, die für die Veränderungen an den Proteinen verantwortlich sind.

2.5 Analyse der Proteine mit SDS-PAGE

Wie die UV/Vis-Spektrophotometrischen Daten im Abschnitt 2.3 "UV/Vis-Spektrophotometrische Untersuchungen" belegen, nimmt die Konzentration des Hämoglobins, des Myoglobins und des Cytochrom *c* innerhalb von 24 Stunden elektrochemischer Behandlung stark ab. Vor allem die Soret-Banden der Proteine verschwinden während der Behandlung vollständig.

Die UV/Vis-Spektrophotometrie macht jedoch keine Aussage über die Abbauprodukte der Proteine. Was bleibt nach der elektrochemischen Behandlung übrig? Wie sehen die Reduktionsprodukte der Proteine aus?

Es wurde versucht, mithilfe der SDS-Gelelektrophorese weitere Daten zur Beantwortung des Reaktionsablauf und der Abbauprodukte zu finden (ein Protein-MS oder weitere Analyseapparaturen standen nicht zur Verfügung).

Als Gele wurden Acrylamidgele mit einem Packungsgrad von 12,5 % bis 18 % eingesetzt. Alle Proteine wurden zuerst über die Sephadex G25-Säule gereinigt, dann elektrochemisch über einen Zeitraum von ca. 24 Stunden behandelt und danach auf das Gel aufgetragen. Als Indikator für den reibungslosen Ablauf des Versuchs und als Vergleichssubstanz wurde ein Multi-Protein-Marker (SigmaMarker™, Wide Range) mit auf das Gel aufgetragen.

Abbildung 111 zeigt ein SDS-Gel mit vier elektrochemisch unbehandelten Proteinen. Deutlich sind dabei die jeweiligen Spots der Proteine zu sehen. Dabei wurden alle Proteine mit der gleichen Konzentration (1 mg/ml) und dem gleichen Volumen (5 µL) aufgetragen. Die tatsächlich vorliegende Stoffmenge an Protein ist dabei jedoch immer unterschiedlich, da sich die Proteine untereinander deutlich in ihren Massen unterscheiden (Hämoglobin M= 64,5 kD; Myoglobin M= 17 kD, Cytochrom *c* M= 14,5 kD; Hämocyanin M= 50 kD bis 80 kD).

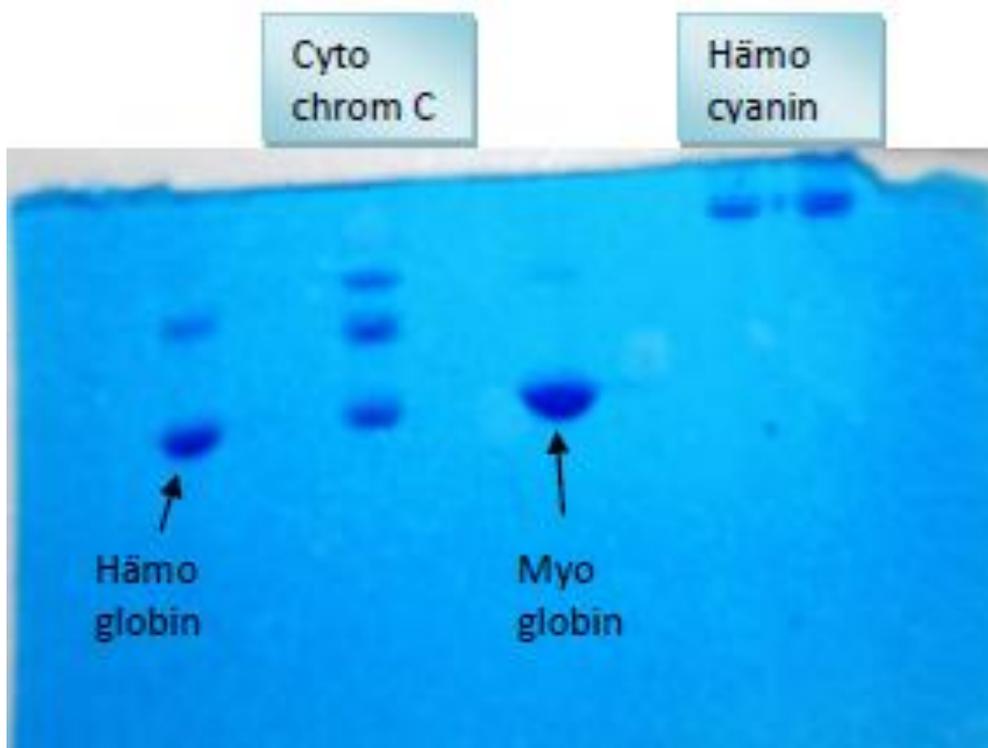


Abbildung 111: SDS-Gel mit vier unbehandelten Proteinen; 15 %; 220 Volt Laufspannung.

Abbildung 112 zeigt ein Gel mit Hämoglobin und mit Cytochrom *c* vor und nach der elektrochemischen Behandlung. In Bahn 1 befindet sich das unbehandelte und aufgereinigte Hämoglobin. Ein starker Spot ist deutlich zu erkennen. Auf der Bahn 2 rechts daneben wurde Hämoglobin aufgetragen, das zuvor 24 Stunden elektrochemisch behandelt wurde. Es sind hier keinerlei Färbungen mehr zu erkennen. Dies entspricht auch dem Ergebnis der UV/Vis-Untersuchungen (Abnahme der Soret-Bande) und der optischen Beobachtung (Entfärbung der Lösungen). Bahn 3 zeigt die Spots von unbehandeltem und aufgereinigtem Cytochrom *c*. Drei Spots lassen sich dabei klar und deutlich erkennen. Auf Bahn 4 wurde Cytochrom *c* nach vorheriger elektrochemischer Behandlung aufgetragen. Selbst nach 24 Stunden unter Spannung lassen sich auch hier noch die drei Spots gut erkennen, auch wenn sie etwas blasser sind, als die des unbehandelten Cytochrom *c*. Dies widerspricht etwas den zuvor ermittelten UV/Vis-Spektren, da diese, ähnlich denen des Hämoglobins, keine Soret-Bande mehr aufweisen.

Es wäre daher zu erwarten gewesen, dass auch auf dem SDS-Gel keine, oder zumindest weniger, Banden zu sehen sind. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Protein nicht zerstört, bzw. abgebaut wurde, sondern lediglich eine Modifikation an der Häm-Gruppe stattgefunden hat.

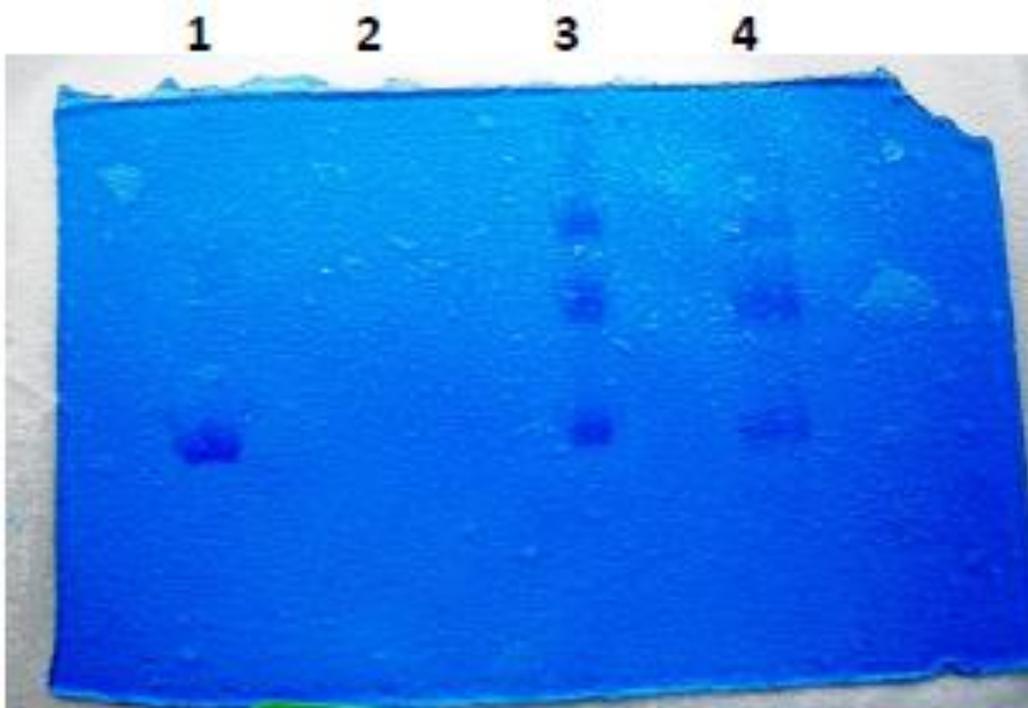


Abbildung 112: SDS-Gel mit Proteinen; 15 %; 220 Volt Laufspannung.

Auch unter Verwendung der SDS-PAGE Analyse können noch keine genaueren Aussagen über die Proteinabbauprodukte getätigt werden. Da beim Hämoglobin nach 24 Stunden unter Spannungseinfluss überhaupt keine Spots mehr zu sehen sind, stellt sich die Frage, in welcher Form das Hämoglobin nun vorliegt. Ist das Hämoglobin vielleicht direkt in einzelne Peptid-Fragmente abgebaut worden?

Um eine wirkliche Aussage über die Abbauprodukte abgeben zu können, müsste man die Proteinproben umfassend analysieren (z. B. Protein-MS, Sequenzierung, Röntgenstrukturanalyse, etc.). Denkbar ist z. B. jedoch die Zerstörung der Häm-Gruppe durch Änderung der Oxidationsstufe des Eisenions.

2.6 Einfluss von ROS auf *E.Coli*

Durch den Nachweis der Auswirkungen von ROS auf Proteine wie z. B. Hämoglobin und Myoglobin, stellt sich nun die Frage, wie sich höhere Konzentrationen von ROS auf lebende Organismen auswirken und ob es vielleicht möglich wäre, Organismen nur mithilfe von elektrochemisch erzeugten ROS zu inaktivieren bzw. abzutöten. Alle genauen Daten zu diesem Abschnitt befinden sich in der Diplomarbeit von Frau Elena Schumann, die die Messungen an den Bakterienkulturen durchgeführt hat.

Um die Einflüsse von ROS auf *E.Coli* aufzeigen zu können, wurden *E.Coli* K12 Stämme unter genau definierten und immer gleichbleibenden Bedingungen gezüchtet und präpariert. Generell ist es jedoch sehr schwer, bakterielle Stämme mit ganz exakten Populationszahlen und Eigenschaften zu erhalten, da sich biologische Systeme nicht immer so verhalten, wie man es z. B. von chemischen Systemen erwarten würde. Selbst winzigste Änderungen im Nährstoffhaushalt auf den Agarplatten oder Schwankungen der Temperatur oder im Sauerstoffgehalt der Luft in den Petrischalen können zu anderen Wachstumsraten und Reproduktionsgeschwindigkeiten der *E.Coli* Bakterien führen.

Um eine Aussage über den Einfluss von ROS auf *E.Coli* treffen zu können, wurden die Bakterienstämme so gezüchtet, dass sich nach 24 Stunden Inkubationszeit zählbare Kolonien gebildet haben. Aufgrund der vorher erwähnten hohen Fehlertoleranz von biologischen Systemen wurde eine Verdünnung der Stammkultur mit dem Faktor $1:10^6$ gewählt, woraus sich nach 24 Stunden 360 ± 30 Kolonien entwickeln konnten.

Die Bakterienkulturen wurden auf Agarplatten gezüchtet und danach durch Waschen und Zentrifugieren von dem Nährstoffmedium getrennt. Die gereinigten Bakterien wurden daraufhin in eine Pufferlösung aus Kaliumdihydrogenphosphat und Di-Kaliumhydrogenphosphat bei pH 7,4 überführt, welche bereits für die elektrochemischen Versuche mit Proteinen und den chemischen Sauerstoffträgern zum Einsatz kam.

Durch mehrere Blindversuche nur mit den Elektrodenmaterialien und dem verwendeten Kaliumphosphatpuffer wurde ausgeschlossen, dass die Bakterien bereits von den Elektroden selbst oder durch das Aufreinigen abgetötet wurden. Durch diese Versuche konnte so auch eine leicht toxische Wirkung von Platin auf *E.Coli* nachgewiesen werden. Daher wurden für die Erzeugung von ROS Glaskohlenstoffelektroden als Gegenelektrode eingesetzt, sobald der Versuch länger als 24 Stunden dauerte. Ein Graphitstab mit sehr großer und leicht poröser Oberfläche diente als AE. Der genaue Versuchsaufbau zu allen Versuchen findet sich in der Diplomarbeit von Frau Schumann.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit zeigte sich weder durch den Einsatz des Puffers noch durch den Kontakt mit der Graphit- oder der Silber/Silberchlorid-Elektrode ein merklicher Einfluss auf die Bakterien. Ag^+ Ionen, wie sie in der Silber/Silberchlorid-Elektrode vorkommen, sind toxisch für diese Organismen, jedoch kommen diese Ionen hier nicht in direkten Kontakt mit der Nährlösung bzw. den *E.Coli*. Auch nach 48 Stunden konnte kein negativer oder inhibitorischer Effekt auf die Bakterien beobachtet werden. Erst nach drei Tagen wurden erste toxische Effekte des Silbers aus der Silber/Silberchlorid-Elektrode spürbar. Anschließend wurde ein äquivalenter Versuchsaufbau hergestellt, wie er schon für die Erzeugung von ROS mit Proteinen verwendet wurde.

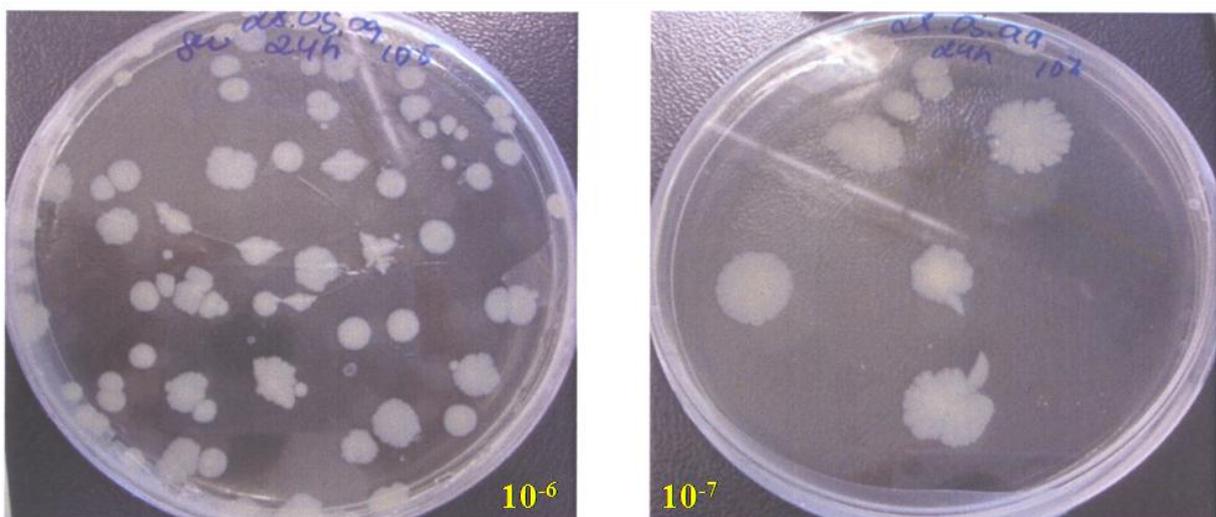


Abbildung 113: Bakterienkolonien vor der elektrochemischen Behandlung

Als Spannungsquelle diente dafür jedoch nicht mehr der Potentiostat von BAS, sondern der bereits im hydraulischen System verwendete Spannungsgeber EA-4003. 15 ml der gewaschenen Bakterienlösung in der Verdünnung 1:10 wurden in das Reaktionsgefäß überführt und mithilfe der Graphit-AE und der Platin-GE unter Spannung gesetzt (die Pt-GE besitzt nur einen kleinen toxischen Effekt, der bei dieser Verdünnung vernachlässigbar ist). Die Potentialdifferenz zwischen den beiden Elektroden betrug dabei im ersten Versuch 1,7 Volt und bei einer zweiten Versuchsreihe 3,2 Volt. Neben der Verdünnung von 1:10 wurde auch eine Verdünnungsreihe bis 1:10⁸ hergestellt und untersucht.

Direkt zum Beginn des Versuchs wurden zwei Proben entnommen. Weitere Probenahmen fanden nach 2, 4 und 24 Stunden statt.

Die Auswertung der Proben erfolgte dann mit zwei unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Methoden. Als Erstes wurde die optische Dichte der Proben mithilfe eines UV/Vis-Spektrophotometers geprüft und mithilfe eines McFarland-Standards verglichen, um so die Bakterienanzahl ermitteln zu können. Als zweite Methode wurden Agarplatten mit den Proben geimpft, um so direkt das Koloniewachstum beobachten zu können. Beide Methoden wurden bei allen Verdünnungsstufen angewandt.

Nach mehrmaligem Wiederholen dieser Versuchsreihen zeigte sich, dass das Bakterienwachstum nach 24 Stunden bei angelegter Spannung immer noch gleich dem Wachstum der unbehandelten Probe war. Einzig das Wachstum der Bakterien im unbehandelten LB-Medium war deutlich größer. Dies liegt jedoch daran, dass die Bakterienkulturen, die für die elektrochemischen Versuche eingesetzt wurden, vorher von allen Resten des Nährmediums befreit wurden und ohne weitere Zugabe von Nährstoffen in Phosphatpuffer aufgenommen wurden. Dadurch entstand ein Mangel an verfügbaren Nährstoffen, sodass der Wachstums- und Replikationsprozess der Bakterien gestört wurde.

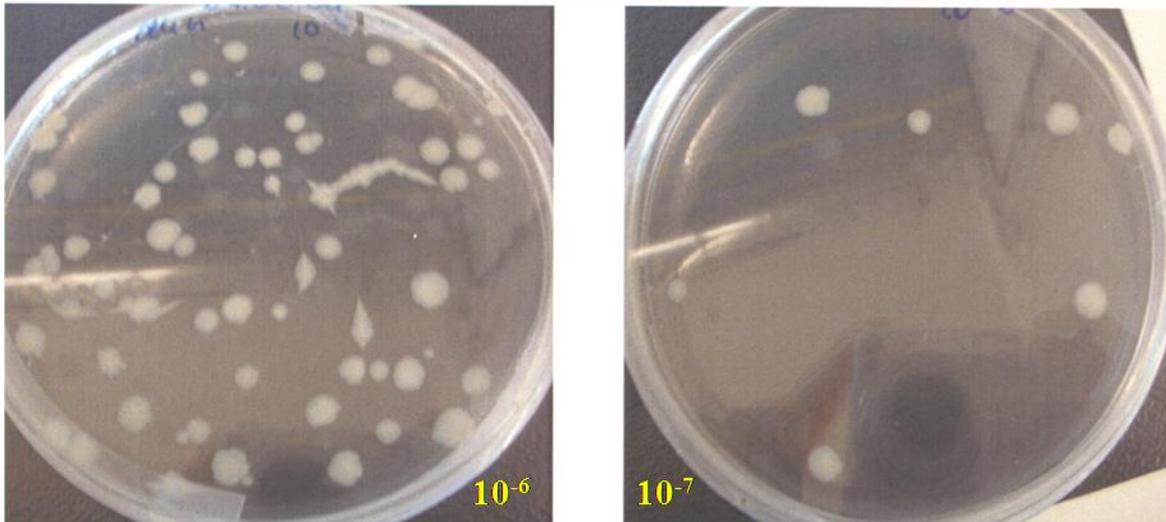


Abbildung 114: Bakterienkolonien in der Verdünnung $1:10^6$ (links) und $1:10^7$ (rechts) nach 24 Stunden elektrochemischer Behandlung. Eine deutliche Koloniebildung ist erkennbar.

Generell lässt sich feststellen, dass die angelegte Spannung keinerlei Einfluss auf das Wachstum und die Vermehrung der Bakterienkulturen in dieser Art von Lösung besitzt.

Da das Begasen der Bakterienkulturen mit reinem Sauerstoff wenig sinnvoll ist und technische Probleme verursacht (kein Zugang der Gasleitung zur Sicherheitswerkbank), wurde versucht, den Sauerstoffanteil der Bakteriensuspensionen auf chemischem Wege zu erhöhen.

Die Wahl des chemischen Sauerstofflieferanten fiel dabei auf Superoxide, welche in den Vorversuchen zur Erzeugung von ROS gut abgeschnitten hatten und leicht Sauerstoff abgeben (s. Abbildung 59). Wasserstoffperoxid wurde ebenfalls eingesetzt, dieses erwies sich jedoch schon ab einer Konzentration von 1 % als extrem toxisch gegen *E.Coli*.

Neue Verdünnungsreihen von *E.Coli* mit KO_2 und NaO_2 als Superoxide wurden hergestellt und unter den gleichen Bedingungen inkubiert, wie es auch bei den Versuchen zuvor der Fall war.

Die Konzentrationen wurden dabei zwischen 50 und 200 μM gewählt. Dabei wurden zwei völlig unterschiedliche Ergebnisse für die beiden Superoxide festgestellt, die sich anfangs nur schlecht haben erklären lassen.

Bei der Zugabe von NaO_2 zeigte sich ein stark toxischer Effekt auf die Bakterien, der bei der Verwendung von KO_2 jedoch ausblieb. Sowohl Kalium- als auch Natriumionen besitzen keinen nennenswerten toxischen Effekt, wenn man sie den *E.Coli*-Kulturen als KCl und NaCl zuführt. Auch ist in beiden Fällen das Anion (O_2^-) identisch.

Reaktion von KO_2 mit Wasser:

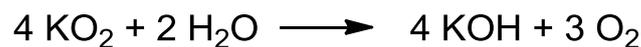


Abbildung 115: Reaktion von KO_2 mit Wasser.

Die dabei entstehende Kalilauge KOH kann mit dem im Wasser gelösten CO_2 zu Kaliumhydrogencarbonat weiterreagieren.

Reaktion von NaO_2 mit Wasser:

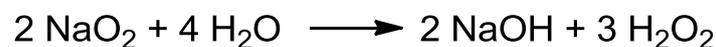


Abbildung 116: Reaktion von NaO_2 mit Wasser.

Die Reaktionsgleichungen der beiden Verbindungen mit Wasser unterscheiden sich nicht. Wodurch kann nun der signifikante Unterschied in der biologischen Aktivität der beiden Verbindungen erklärt werden?

Anscheinend bildet sich beim Lösen von NaO_2 lokal deutlich mehr H_2O_2 , als es beim KO_2 der Fall ist. Dieses gebildete H_2O_2 überschreitet die toxische Konzentration und die Bakterien sterben ab. Ein Nachweis der erhöhten H_2O_2 -Konzentration dazu könnte in Zukunft beispielsweise mit geeigneten ionensensitiven Elektroden geführt werden.

Es wurden dadurch nur die Proben und Verdünnungsreihen unter Spannung gesetzt, die KO_2 enthielten. Die Auswertung dieser Messreihen erfolgte dann genau wie die bei den vorherigen Proben. Auch hier konnte kein Effekt der Spannung auf die Bakterien beobachtet werden. Es war aber auch nicht möglich, mehr als $200 \mu\text{M}$ an KO_2 einzusetzen, da sonst ein toxikologischer Effekt ähnlich dem das NaO_2 zu beobachten war. Diese Konzentration ist jedoch noch so gering, dass ein spürbarer Anstieg der Sauerstoffkonzentration wohl nicht möglich war.

Spätere Untersuchungen mit erhöhtem Sauerstoffgehalt müssen zeigen, ob die ROS wirklich keinen Effekt auf die Bakterien ausüben können, oder ob die *E.Coli* doch zugrunde gehen, wenn eine bestimmte ROS-Konzentration überschritten wird.

Es muss allerdings angemerkt werden, dass ROS wie z. B. H_2O_2 zwar in die Bakterien eindringen können, dort aber nicht immer auch toxisch wirken. In den letzten Jahren ist deutlich geworden, dass ROS nicht generell toxisch, sondern auch als Signalmoleküle in Zellen wirken können.

Während sehr hohe Konzentrationen an ROS (insbesondere HO^\cdot) in der Tat Zellen abtöten (z. B. Nekrose) oder Apoptose einleiten können, besitzen geringere Konzentrationen an ROS ein differenzierteres biologisches Wirkungsspektrum. Geringe Konzentrationen an H_2O_2 können sogar das Zellwachstum anregen, z. B. über redoxabhängige Signaltransduktionswege.^[35]

2.7 Zyklovoltammetrische Untersuchung chalkogenhaltiger Syntheseprodukte

Ein weiterer wichtiger Teil dieser Dissertationsschrift befasst sich mit elektrochemischen Untersuchungen von chalkogenhaltigen Naturstoffmimetika, die vor allem im Zeitraum von Ende 2006 bis Anfang 2008 in der Gruppe von Jun. Prof. Dr. Jacob entwickelt und synthetisiert wurden. Dabei wurden hauptsächlich die Syntheseprodukte von Herrn Dr. Muhammad Abbas, Herrn Saad Shaaban, sowie von Herrn Awais Anwar elektrochemisch analysiert und, als Vorversuch, auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. Während die Produkte von Herrn Dr. Abbas und Herrn Shaaban vor allem daraus ausgerichtet waren, möglichst viele Redoxzentren auf Basis von 1,4-Naphthochinon, sowie Selen oder Tellur zu enthalten, hatte sich Herr Anwar vor allem auf die Synthese von Schwefelverbindungen mit unterschiedlichen Anteilen an Schwefelatomen spezialisiert.

Um eine möglichst schnelle und einfache Antwort auf das Redoxverhalten der zu untersuchenden Stoffe zu erhalten, wurde ein Testsystem entwickelt, in dem alle erzeugten Substanzen zykvoltammetrisch vermessen werden konnten. Dabei handelt es sich um den identischen Versuchsaufbau, der auch schon verwendet wurde, um ROS in Wasser zu erzeugen. Allerdings wurde die Zusammensetzung der Lösung an die notwendigen Bedingungen, wie z. B. Löslichkeit der Produkte angepasst.

Nach vielen Versuchen mit unterschiedlichen organischen Lösemitteln, wie z. B. THF, Dichlormethan, Chloroform, DMSO, Aceton, Toluol oder auch Benzol, hatte sich am Ende gezeigt, dass eine Mischung aus Wasser, 33 % Methanol, zusammen mit dem bereits für die ROS-Erzeugung verwendeten Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4, am besten geeignet war, alle vorliegenden Produkte zu lösen und elektrochemisch analysieren zu können. Die „wässrige“ Lösung hat dabei den Vorteil, dass sie die *in vivo* Bedingungen besser wiedergibt als z. B. THF oder Chloroform.

Zu allen Verbindungen wurden Scan-Speed-Messungen durchgeführt, d. h., die Zyklovoltammogramme wurden bei unterschiedlichen Spannungs-Vorschub-Geschwindigkeiten aufgenommen, um so Aussagen zum Redox- und Reaktionsverhalten zu erhalten. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigten jedoch kein einheitliches Bild und werden daher im weiteren Verlauf dieser Dissertationsschrift nicht näher verfolgt. Diese Studien dienen der Hauptsache zur Analyse kinetischer Vorgänge, z. B. auch dem Adsorptionsverhalten an den Elektroden.

Die zykl voltammetrischen Messungen der Verbindungen von Herrn Dr. Abbas und Herrn Shaaban erfolgten an der Glaskohlenstoffelektrode unter Verwendung des C3-Zell Standes von BAS. Die von Herrn Anwar erzeugten Schwefelverbindungen konnten jedoch nicht mithilfe der Glaskohlenstoffelektrode elektrochemisch charakterisiert werden. Deshalb wurde für diese Verbindungen der CGME-Cell-Stand der Firma BAS eingesetzt, über den eine Quecksilbertropfelektrode gesteuert wurde.

Obwohl die schwefelhaltigen Moleküle mit dem Quecksilber (Adsorption an der Quecksilber-Oberfläche) reagieren, konnten mit diesem Versuchsaufbau sehr gute Ergebnisse erzielt werden, die auch den wenigen, bereits in der Literatur bekannten elektrochemischen Potentialen entsprechen.

In den nachfolgenden Abschnitten werden die einzelnen Messungen zu diesen Produkten dargestellt und kurz erläutert. Auf eine komplette elektrochemische Deutung der Ergebnisse, z. B. Berechnung der übertragenen Elektronen, wurde verzichtet, da diese Messungen nur dazu dienen sollten, die Redoxpotentiale der einzelnen Produkte aufzuzeigen und deren Lage dann in Zusammenhang mit einer möglichen biologischen Aktivität zu bringen.

Eine Vorhersage zur eventuell vorliegenden biologischen Aktivität lässt sich anhand der Lage der Redoxpotentiale aufstellen. Je näher die Redoxpotentiale bei 0 Volt liegen, desto wahrscheinlicher ist eine biologische Verwendbarkeit des Moleküls.

2.7.1 Chalkogehaltige 1,4-Naphthochinon-Derivate

In den nun folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse zur elektrochemischen Analyse der von Herrn Dr. Abbas synthetisierten Produkte dargestellt. Diese Verbindungen wurden so entworfen, dass sie über mehrere Redoxzentren in einem Molekül verfügen, und dabei besonders effektiv und selektiv auf die „biologische Signatur“ des OS (Bekämpfung von OS in der Krebszelle) reagieren können.

Ein wichtiges Kriterium bei der Erforschung von neuen Krebswirkstoffen ist die Kombination von hoher Effizienz einer Substanz mit hoher Selektivität dieser Substanz für die Krebszelle bei gleichzeitiger Indifferenz gesunden Zellen gegenüber. Da alle Krebswirkstoffe in ihrer aktiven Form toxisch sind, lassen sich nur durch hohe Selektivität effektiv Nebenwirkungen vermeiden. Die Fähigkeit von Molekülen (oder Transportern), zwischen Krebszellen und gesunden Zellen zu unterscheiden, ist dabei von besonderer Bedeutung. Nicht umsonst besteht auch die natürliche Abwehr (z. B. humanes Immunsystem) gegen Krebszellen aus Zellen, die diese Unterscheidung vornehmen können (z. B. Phagozyten, T-Zellen). Solche Zellen sind allerdings hochkomplexe biochemische Gebilde, und einzelne Moleküle mit ähnlicher „Intelligenz“ sind nur schwer zu finden.

In der Praxis werden oft biochemische Unterschiede zwischen krankhaften und gesunden Zellen ausgenutzt, um neue Medikamente zu „designen“. Intrazelluläre Veränderungen des Redoxgleichgewichtes (OS) spielen dabei eine entscheidende Rolle. Die daraus folgende „biochemische Signatur“ ermöglicht es, Krebszellen von gesunden Zellen zu unterscheiden.

Hervorzuheben sind dabei bioreduktive Wirkstoffe, die in den letzten Jahren große Beachtung gefunden haben. Diese an sich inaktiven Stoffe werden in Krebszellen durch Enzyme, die in diesen Zellen eine erhöhte Aktivität haben (DT-Diaphorase, NADPH: Cytochrom c-Reduktase), aktiviert und töten dann diese Zellen bevorzugt ab. Mitomycin C wird als bioreduktiver Wirkstoff bereits bei der Behandlung von verschiedenen hypoxischen Krebsarten (z. B. Lungenkarzinom) verwendet.^[72]

Diese bioreduktiven Wirkstoffe besitzen jedoch eine Reihe von Nachteilen, darunter der Einsatz hoher Konzentrationen, nicht vernachlässigbare Aktivität auch gegenüber von gesunden Zellen und prinzipielle Beschränkung auf hypoxische Tumore.

Aus diesen Gründen wird eine Erforschung von neuartigen Wirkstoffen notwendig, die Krebsarten selektiv besser erkennen und noch besser abtöten sollen. Ein besonderes Augenmerk richtet sich dabei auf katalytische Wirkstoffe, die zum einen bedeutend aktiver sind als „Einweg-Wirkstoffe“, zum anderen aber auch wieder inaktivieren, wenn sie in Regionen mit anderen biochemischen Signaturen diffundieren. Ein wichtiger Punkt hierbei ist, dass katalytische Substanzen nicht selbst toxisch sind, sondern die Toxizität von Substraten erhöhen, die bereits in Krebszellen als Teil ihrer biochemischen Signatur (z. B. H_2O_2) vorliegen.

OS konnte bereits in mehreren Krebsarten, wie Prostata-, Lungen- und Nierenkrebs festgestellt werden.^[73] Zellen dieser Krebsarten sind im Inneren stark oxidierend und besitzen hohe Konzentrationen an Sauerstoffradikalen, Peroxiden und aus Proteinen oxidativ freigesetzte Metallionen. Auch andere Krankheiten, wie z. B. Rheumatoide Arthritis zeigen solche hohen Konzentrationen von OS, wodurch die Erforschung von Wirkstoffen mit selektiver Zytotoxizität immer größere Bedeutung erlangt.^[74-77]

Prinzipiell lässt sich die veränderte biochemische Signatur der unter OS stehenden Zellen auf drei Arten ausnutzen: Hemmung der anti-oxidativen Abwehr; Erzeugung oxidativer Stressoren; Erhöhung der Reaktivität von Stressoren, die bereits in der Zelle vorhanden sind. So werden beispielsweise 2-Methoxyestradiol gegen Superoxid-Dismutase (SOD) und Mercaptobernsteinsäure gegen Glutathion-Peroxidase (GPx) eingesetzt.^[74] Daneben sind Chinonverbindungen, wie sie im Zusammenhang mit bioreduktiven Ansätzen verwendet werden, Radikalerzeuger (Superoxid), die durch oxidative Schädigung von DNA, Membranen und Proteinen die Krebszelle abtöten können (z. B. Daunorubicin und Doxorubicin).

Redoxkatalysatoren mit sogenannten Sensor/Effektor-Eigenschaften bilden einen relativ neuen Ansatz zur Selektivität von Wirkstoffen. Die Gruppen um Kawakami in Japan und Batteux in Frankreich haben unabhängig voneinander gezeigt, dass gewisse Eisen-, Kupfer- und Mangankomplexe Krebszellen spezifisch abtöten können.^[75,77-79]

Dabei scheint eine katalytische Umwandlung von Superoxid in Peroxid und die hochaggressiven Hydroxylradikale stattzufinden. Während normale Zellen sich gegen solche Stressoren wehren können, versagt die antioxidative Abwehr bei gewissen Krebszellen, wodurch selektiv der Zelltod eingeleitet wird. Dabei ist hervorzuheben, dass solche Übergangsmetallkomplexe nicht nur in Zellkulturen, sondern auch bereits in bei Mäusen implantierten CT-26 und Hepa-1-6-Tumoren - in Anwesenheit von Oxaliplatin - erfolgreich getestet worden sind. ^[75,77]

Neben metallhaltigen SOD-Mimetika sind auch Verbindungen mit GPx-ähnlicher Aktivität von Interesse. So haben Studien von Hartwig und Kollegen in Berlin eine hemmende Wirkung von Selenverbindungen auf Zink-Finger-Proteine und die DNA-Reparatur in Krebszellen nachgewiesen.^[80]

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden von Herrn Dr. Abbas und Herrn Shabaan neue Verbindungen synthetisiert, die Selen oder Tellur mit einer oder mehreren Chinongruppen enthalten.

Als Edukte für die Synthese der Naphthochinon-basierenden Verbindungen kamen generell drei verschiedene 1,4-Naphthochinone zum Einsatz: 1,4-Naphthochinon, 2-Brom-3-Methyl-1,4-Naphthochinon und 2,3-Dibrom-1,4-Naphthochinon. Diese Edukte wurden im Vorfeld der Messungen ebenfalls zykelvoltammetrisch untersucht und die Resultate dazu werden als Referenzwerte in dem entsprechenden Abschnitt kurz beschrieben.

Alle Syntheseprodukte wurden von Herrn Dr. Abbas in Chloroform gelöst aufbewahrt und bei ca. 8 °C im Kühlschrank gelagert. Um die gelösten Feststoffe in eine Form zu bringen, die in der Elektrochemie eingesetzt werden kann, wurde das Chloroform mit einem Strom von getrocknetem Stickstoff so lange begast, bis das komplette sichtbare Chloroform verdunstet war. Die erhaltenen Feststoffe wurden dann in Methanol aufgenommen und in das Puffer-Wasser-Gemisch überführt.

Bei allen Messungen wurde eine Konzentration zwischen 150 und 200 μM verwendet. Bei diesen Konzentrationen war die Löslichkeit der recht lipophilen Stoffe erreicht. Zugleich waren diese Konzentrationen ausreichend, reproduzierbare CVs aufzunehmen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Messungen kurz aufgeführt.

Voranehend zur jeder Auflistung der Zyklovoltammogramme wird die Struktur des betreffenden Produktes aufgezeigt und die wichtigen strukturellen Gruppen hervorgehoben. Die Auflistung erfolgt nach Anzahl und Art der enthaltenen Chalkogene.

2.7.1.1 Verwendete Edukte

Um eine bessere Zuordnung der für die Produkte gemessenen zykovoltammetrischen Ergebnisse gewährleisten zu können, (z. B. um herausfinden zu können, welcher Peak im Zykovoltammogramm zu welchem Redoxzentrum gehört) wurden im ersten Schritt die Edukte der Verbindungen zykovoltammetrisch vermessen.

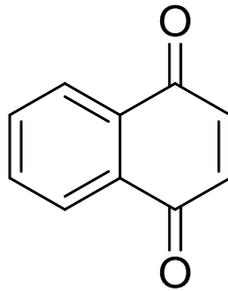


Abbildung 117: Strukturformel von 1,4-Naphthochinon

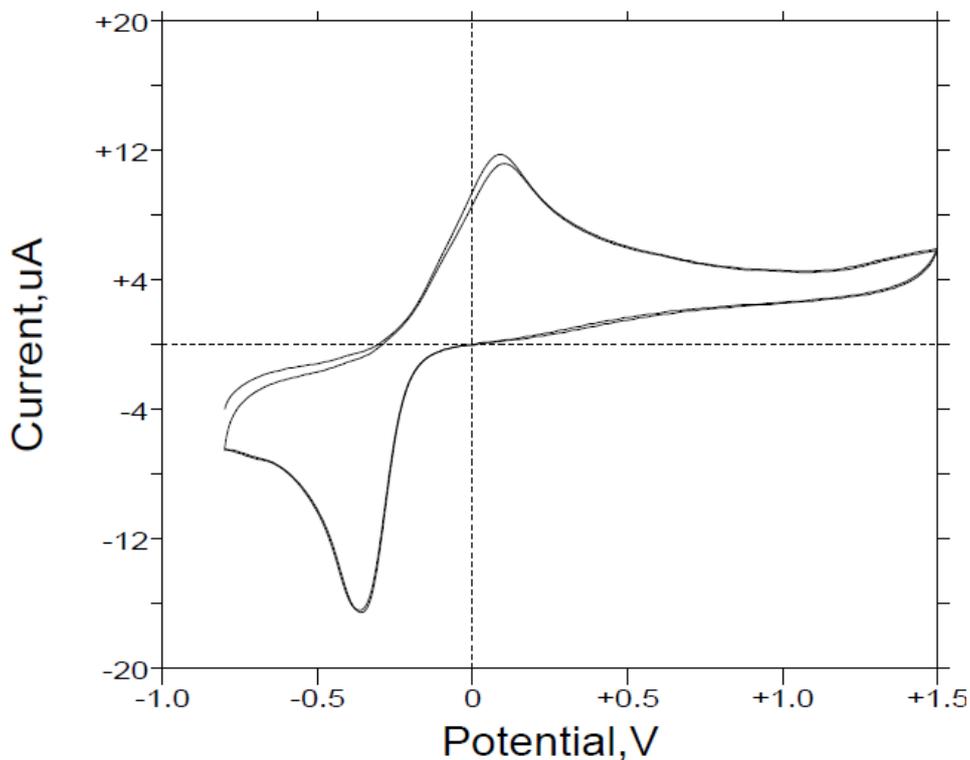


Abbildung 118: CV von 1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 50 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -366 \text{ mV}$; $E_a = +94 \text{ mV}$; $\Delta E = 460 \text{ mV}$).

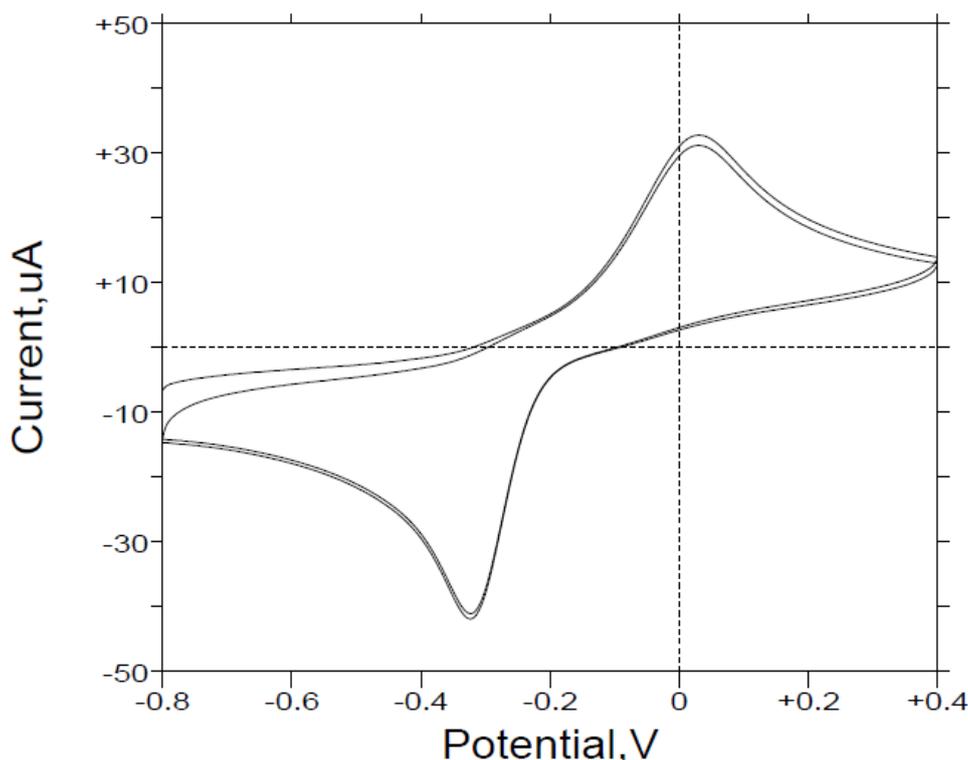


Abbildung 119: CV von 1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -321 \text{ mV}$; $E_a = +21 \text{ mV}$; $\Delta E = 342 \text{ mV}$).

Die beiden CVs aus Abbildung 118 und Abbildung 119 zeigen jeweils die Redoxpotentiale des aromatischen Ringsystems auf. Nimmt man das Zyklovoltammogramm nur in den Grenzen des eigentlichen Redoxbereiches des Chinons auf, wie es in Abbildung 119 dargestellt ist, so sieht man eine kleine Linksverschiebung der Peaks im Vergleich zur Messung, die in Abbildung 118 zu sehen ist und die den kompletten interessierenden Potentialbereich abdeckt. Aufgrund dieser Verschiebung wurden alle folgenden Verbindungen so vermessen, dass sowohl der Bereich des 1,4-Naphthochinons als auch der komplette Bereich dargestellt wird. So lassen sich die einzelnen Verbindungen genauer miteinander vergleichen und die Aussagen zu den eventuellen biologischen Aktivitäten lassen sich so fundierter untermauern.

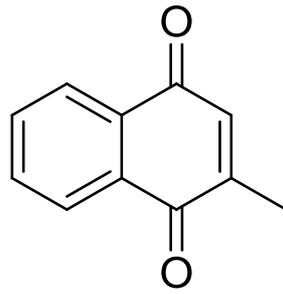


Abbildung 120: Strukturformel von 2-Methyl-1,4-Naphthochinon

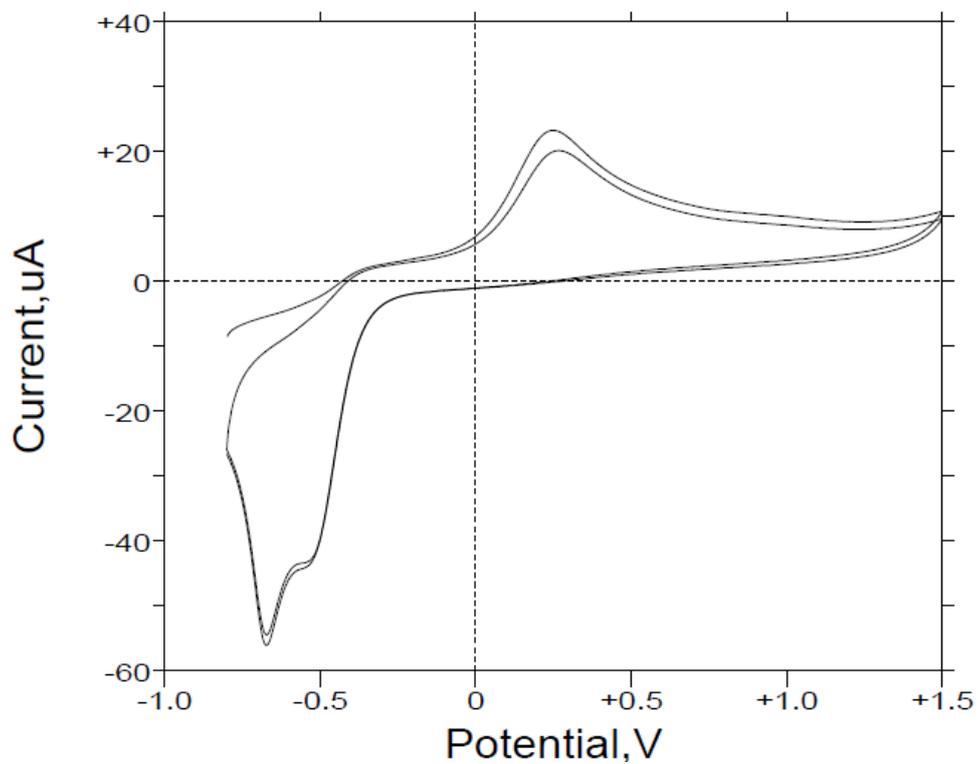


Abbildung 121: CV von 2-Methyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -670 \text{ mV}$; $E_a = +238 \text{ mV}$; $\Delta E = 908 \text{ mV}$).

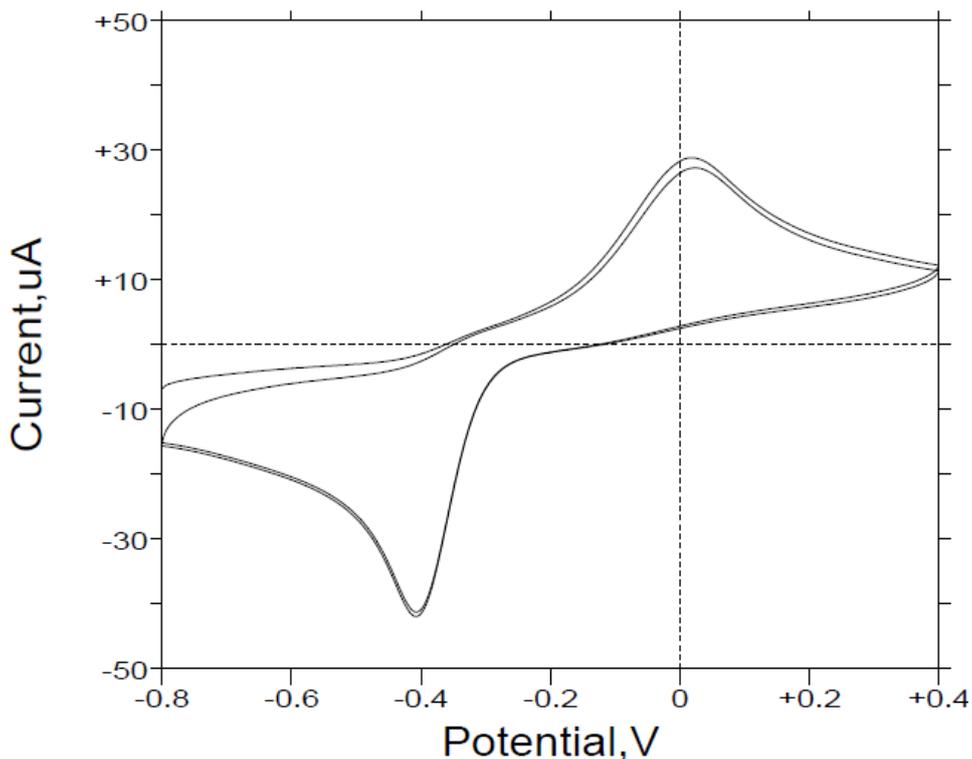


Abbildung 122: CV von 2-Methyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -406 \text{ mV}$; $E_a = +7 \text{ mV}$; $\Delta E = 413 \text{ mV}$).

Durch den Einbau einer Methylgruppe in das Ringsystem des Naphthochinons ändert sich das Zykelvoltammogramm nur unwesentlich. In Abbildung 121 lässt sich ein etwas anderer Peakverlauf im Reduktionsbereich links von -0,5 Volt ausmachen. Die Form des Peaks weist auf zwei Reduktionspeaks hin, die jedoch ineinander übergehen und nicht als eigenständige Peaks dargestellt werden. Scannt man jedoch nur den Bereich des chinoiden Systems, so zeigt sich das gleiche Bild, das schon in Abbildung 119 zu sehen war. Allerdings ist hierbei der Reduktionspeak deutlich zu negativeren Werten verschoben. Der Oxidationspeak bleibt unverändert im gleichen Potentialbereich. Auffallend ist auch, dass im Scan über den kompletten Potentialbereich sich Oxidations- und Reduktionspeak deutlich weiter voneinander entfernt befinden, als im Scan, der nur den Redoxbereich des Chinons abdeckt. Zu erwarten wäre eine reversible Redoxreaktion des Chinons, d. h. der Potentialbereich zw. dem Oxidations- und dem Reduktionspeak müsste kleiner als 59 mV sein. Dies lässt sich jedoch nur im Falle der Abbildung 122 nachweisen.

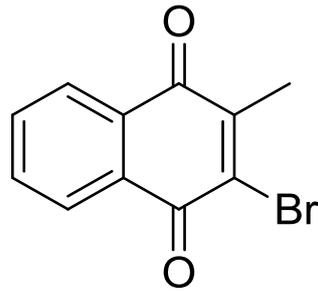


Abbildung 123: Strukturformel von 2-Brom-3-Methyl-1,4-Naphthochinon

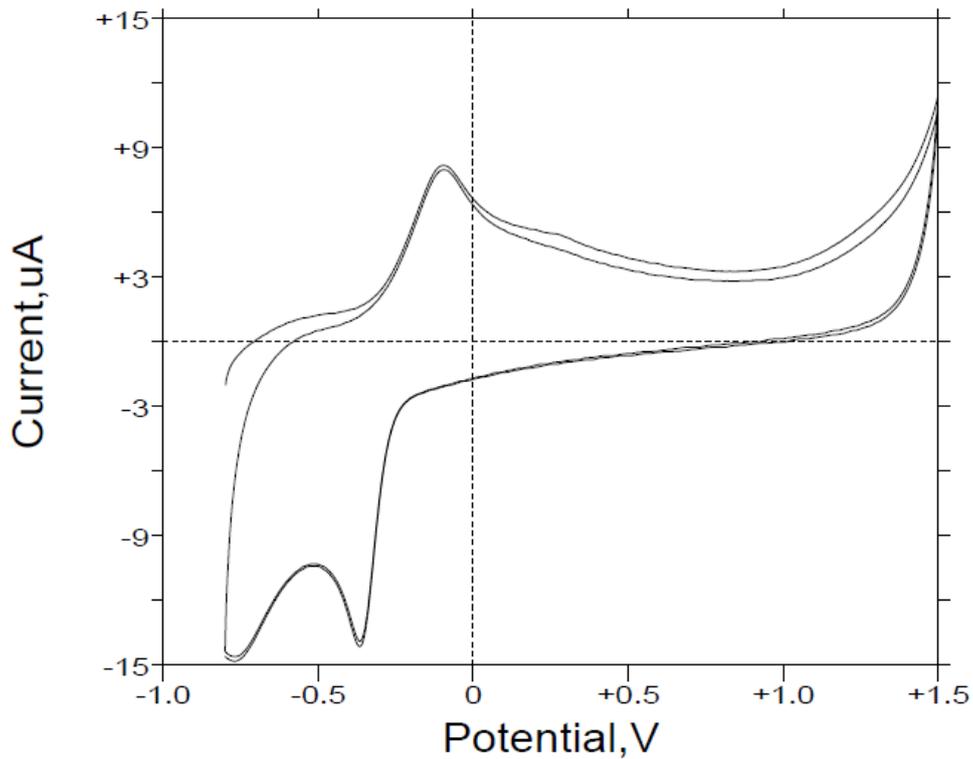


Abbildung 124: CV von 2-Brom-3-Methyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 250$ mV/s, mit N_2 gespült ($E_{p1}= -364$ mV, $E_{p2}= -766$ mV; $E_a= -98$ mV; $\Delta E_1= 266$ mV, $\Delta E_2= 668$ mV).

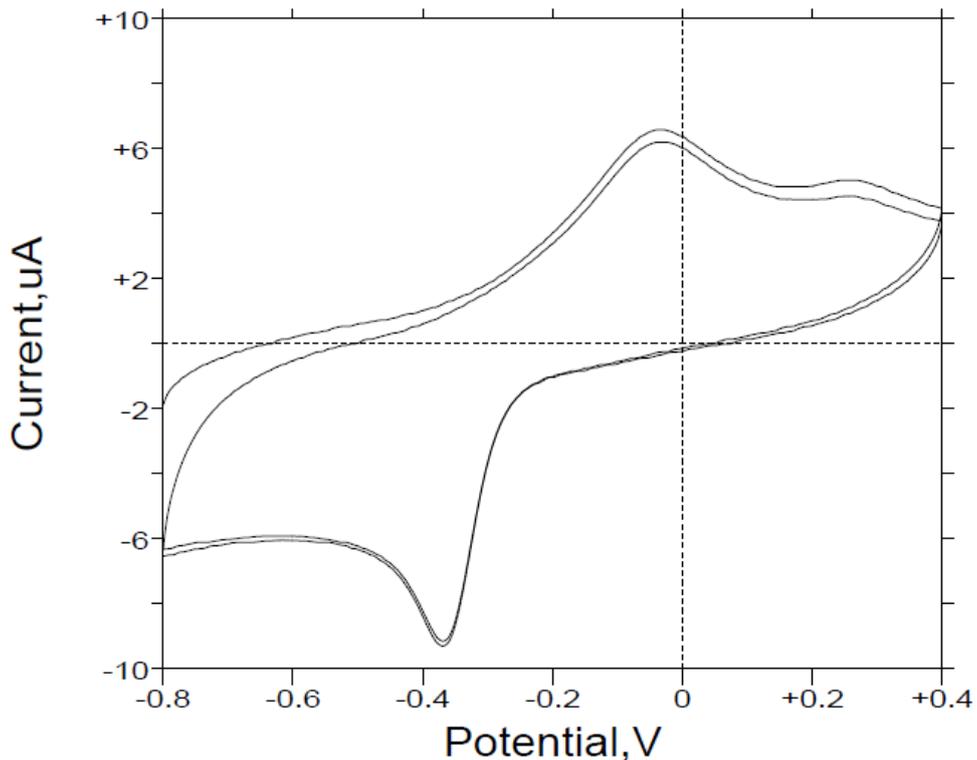


Abbildung 125: CV von 2-Brom-3-Methyl-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glas-kohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -368 \text{ mV}$; $E_a = -57 \text{ mV}$; $\Delta E = 312 \text{ mV}$).

Das Zyklovoltammogramm des Naphthochinons zeigt nach Angliederung einer Methylgruppe und eines Broms den Verlauf, der in Abbildung 124 dargestellt ist. Der Reduktionspeak mit „Schulter“, der in Abbildung 121 zu sehen war, ist nun hier deutlich getrennt in 2 Signale, wobei der erste Reduktionspeak, der als „Schulter“ zu erkennen war, nun deutlich nach rechts zu positiveren Signalen hin verschoben ist.

Auch der Oxidationspeak ist verschoben, jedoch hin zu deutlich negativeren Potentialen und zwar soweit, dass er nun tatsächlich im negativen Potentialbereich liegt (-98 mV). Das Brom hat einen sehr starken Einfluss auf das π -Elektronensystem des aromatischen Rings ($-I$ und $+M$ Effekt), wodurch sich die starke Verschiebung der Signale erklären lässt. Das Bromderivat ist aufgrund der Gegenwart des Bromatoms schwerer zu reduzieren und leichter zu oxidieren, was auf die elektronischen Effekte des Broms zurückzuführen ist.

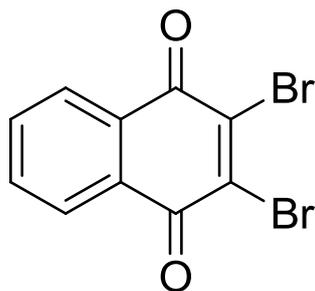


Abbildung 126: Strukturformel von 2,3-Dibrom-1,4-Naphthochinon

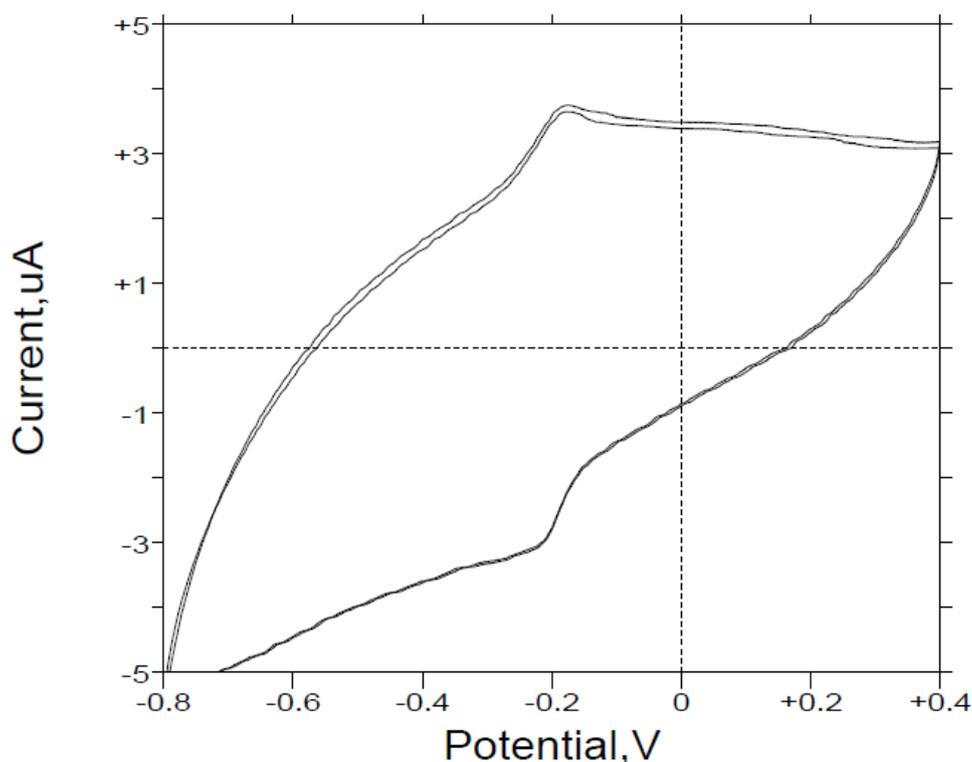


Abbildung 127: CV von 2,3-Dibrom-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 25 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -201 \text{ mV}$; $E_a = -185 \text{ mV}$; $\Delta E = 16 \text{ mV}$).

Die Messung dieses Eduktes an der Glaskohlenstoffelektrode verursachte aufgrund der sehr geringen Löslichkeit in der vorhandenen Matrix einige Probleme, sodass nur der Chinonbereich gescannt wurde. Ein reversibles Redoxverhalten ist hier klar zu erkennen. Betrachtet man Abbildung 127 genauer, so fällt als Erstes das deutlich veränderte Redoxverhalten des Naphthochinons auf.

Durch Einfluss des zweiten Bromatoms liegen nun plötzlich der Oxidations- sowie der Reduktionspeak sehr dicht beieinander und beide im negativen Potentialbereich.

Diese deutliche Verschiebung der Redoxsignale kann nur auf eine starke Änderung des elektronischen Systems zurückgeführt werden, die nur durch den -I und +M-Effekt der beiden Brom-Atome und die dadurch hervorgerufene Änderung der Elektronendichte im Ringsystem erklärt werden kann.

2.7.1.2 Selenhaltige 1,4-Naphthochinon-Derivate

Verändert man das chinoide Grundgerüst durch das Einbringen eines weiteren Redoxzentrums, so sollten mehrere Redox-Signale erkennbar sein. Mehrere Redoxpeaks in einer Verbindung, die alle bei unterschiedlichen Potentialen liegen, können im biologischen System eine oder mehrere wichtige Rollen spielen, wenn es z. B. darum geht, OS in der Zelle zu erkennen und zu verarbeiten. Unterschiedliche Potentialbereiche bedeuten in der biologischen Wirkweise oft unterschiedliche Reaktionen und Aktivitäten. Eine Kombination verschiedener Redoxzentren erlaubt es daher, zugleich verschiedene Faktoren innerhalb des biologischen Systems zu beeinflussen. Die Synthese eines Moleküls mit mehreren Redoxzentren, die deutlich voneinander abgegrenzt sind, könnte also zu einem potentiellen Wirkstoff führen, der in der Lage wäre, verschiedene Aufgaben und Funktionen im biologischen System zu übernehmen (GPx-Mimetika). Ein Übersichtsartikel über GPx-Mimetika von Mugesh und du Mont zeigt die Vielfalt bisher synthetisierter GPx-Mimetika auf.^[81]

Selen, als Spurenelement im menschlichen und tierischen Organismus enthalten, kann als Redoxzentrum fungieren. Die Nähe eines Phenylringes, und damit Verbunden eines π -Elektronensystems, zu einem Selenatom kann die elektronischen Gegebenheiten des Selens stabilisieren. Dadurch wird die Se-C-Bindung stabilisiert, das Molekül wird daher im Körper nicht abgebaut.

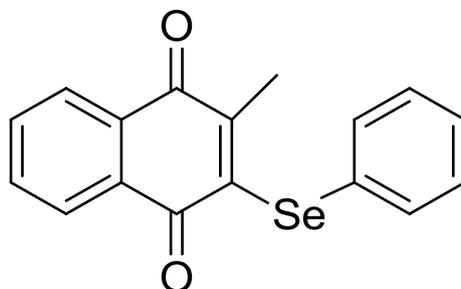


Abbildung 128: Strukturformel von 2-Methyl-3-phenylselenyl-1,4-Naphthochinon

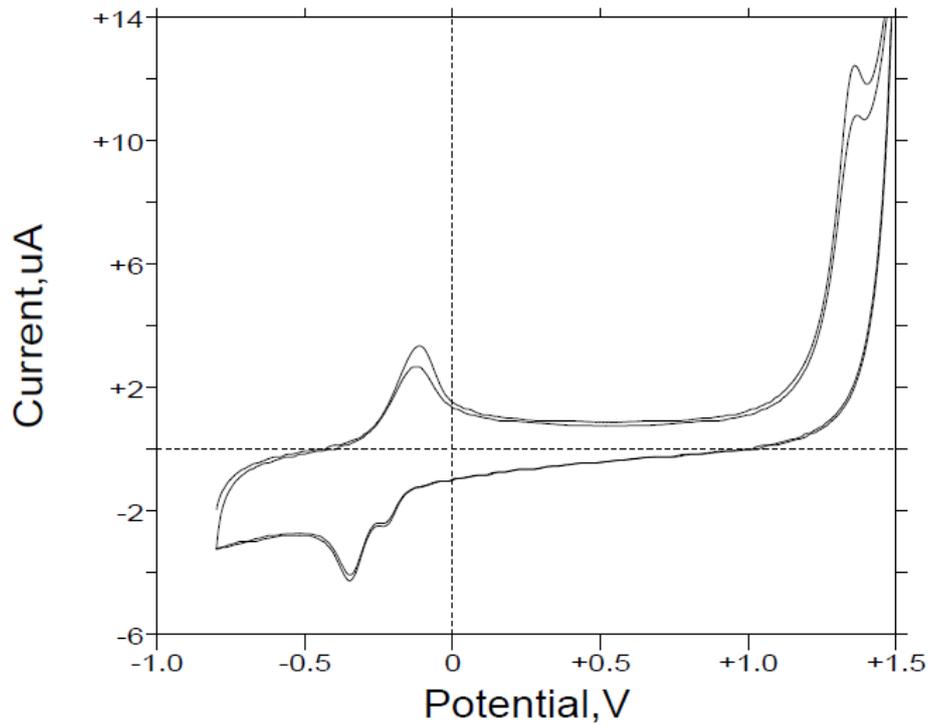


Abbildung 129: CV von 2-Methyl-3-phenylselenenyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -348 \text{ mV}$; $E_{a1} = -116 \text{ mV}$, $E_{a2} = +1360 \text{ mV}$; $\Delta E_1 = 232 \text{ mV}$, $\Delta E_2 = 1708 \text{ mV}$).

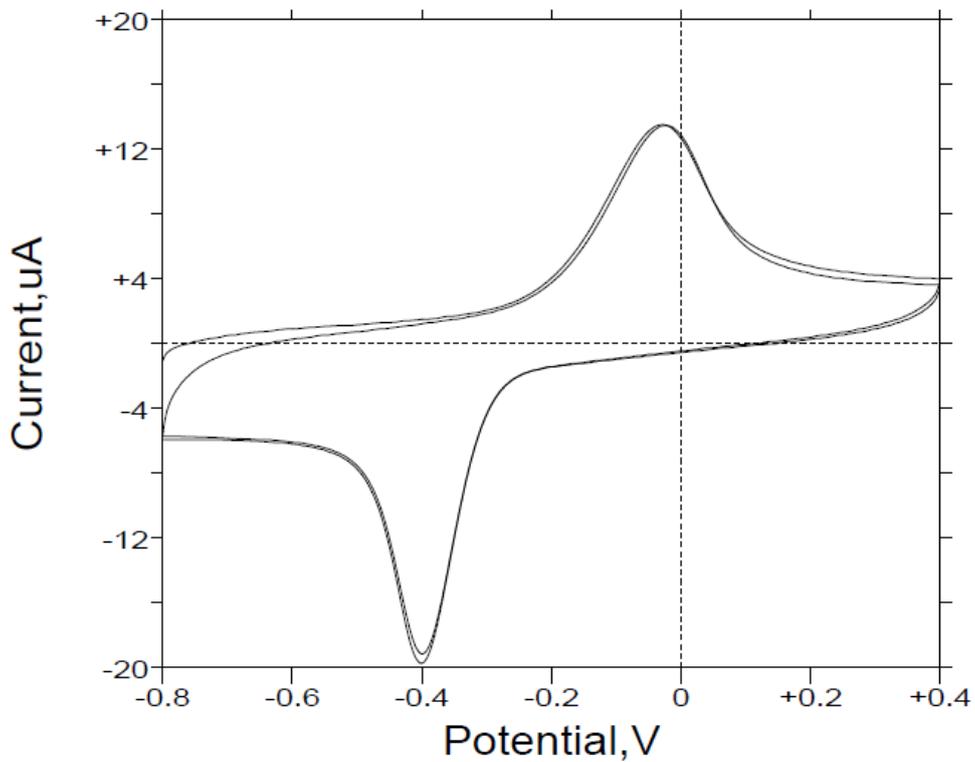


Abbildung 130: CV von 2-Methyl-3-phenylselenenyl-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -400 \text{ mV}$; $E_a = -32 \text{ mV}$; $\Delta E = 432 \text{ mV}$).

Die vorstehenden Abbildungen zeigen im chinoiden Bereich in etwa den gleichen Verlauf, der schon bei den Edukten zu sehen war. Auffallend hier ist nur, dass der Oxidationspeak des Ringsystems etwas zu negativeren Potentialen hin verschoben ist.

Betrachtet man aber den Potentialbereich rechts von +1,0 Volt in Abbildung 129 genauer, so zeigt sich ein deutlich verändertes Bild gegenüber den Chinon-Edukten. In diesem Bereich ist ein ausgeprägter Oxidationspeak bei ca. +1,3 Volt zu erkennen, der dem Se-Redox-Zentrum zugeordnet werden kann. Der Oxidationspeak des Selens ist erfahrungsgemäß in diesem Bereich zu finden, wenngleich der gemessene Wert deutlich positiver ist als bei vielen anderen Se-Verbindungen.^[82-85] Bei der Oxidation des Selens bildet sich ein Se-Radikal-Kation, dass in wässriger Lösung weiter reagiert. Daher ist eine Elektronenübertragung irreversibel, was auch im CV sichtbar ist (Fehlen eines entsprechenden Reduktionspeaks).

Interessanterweise zeigt diese Verbindung in verschiedenen Krebszelllinien (beispielsweise in Caco-2 Zellen) eine biologische Aktivität (z. B.: Apoptose), die durch Anwesenheit von Selen verstärkt wird. Da sich die Zellversuche noch in einem frühen Stadium befinden, kann eine abschließende Diskussion über die biologische Verwendung dieser Substanz nicht Teil dieser Arbeit sein.

Ob das 2-Methyl-3-phenylselenyl-1,4-Naphthochinon jedoch wirklich im menschlichen Körper eine Rolle spielen kann, lässt sich Anhand der vorliegenden Daten noch nicht bestimmen. Verschiedene Variablen, wie zum Beispiel die „Lipinski Rule of Five“ (5er-Regel) spielen für die biologische Aktivität des potentiellen Wirkstoffes eine große Rolle.

Diese Regeln für oral applizierbare Substanzen sind:

- Die Molekülmasse ist nicht größer als 500 g/mol (genauer zw. 160 und 480 g/mol)
- Im Molekül sind nicht mehr als 10 Akzeptoren von Wasserstoffbindungen vorhanden
- Im Molekül sind nicht mehr als 5 Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen vorhanden
- Der Verteilungskoeffizient ($\log P$) zwischen Oktanol und Wasser liegt bei maximal 5 (Erweiterung von Ghose: $\log P$ zwischen -0,4 bis +5,6)^[86]

Der Name „Rule of Five“ leitet sich dabei von der Tatsache ab, dass alle Zahlenwerte gleich oder ein Vielfaches von fünf sind.

Basierend auf diesen Regeln muss eine genauere Analyse der Moleküleigenschaften vorgenommen werden.

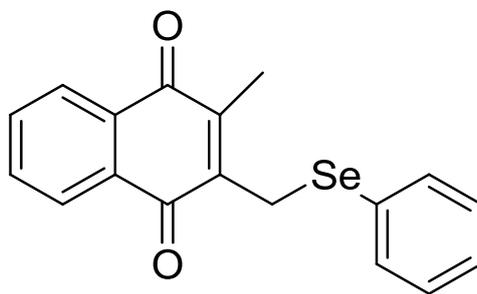


Abbildung 131: Strukturformel von 2-Methyl-3-methyl-phenylselenyl-1,4-Naphthochinon

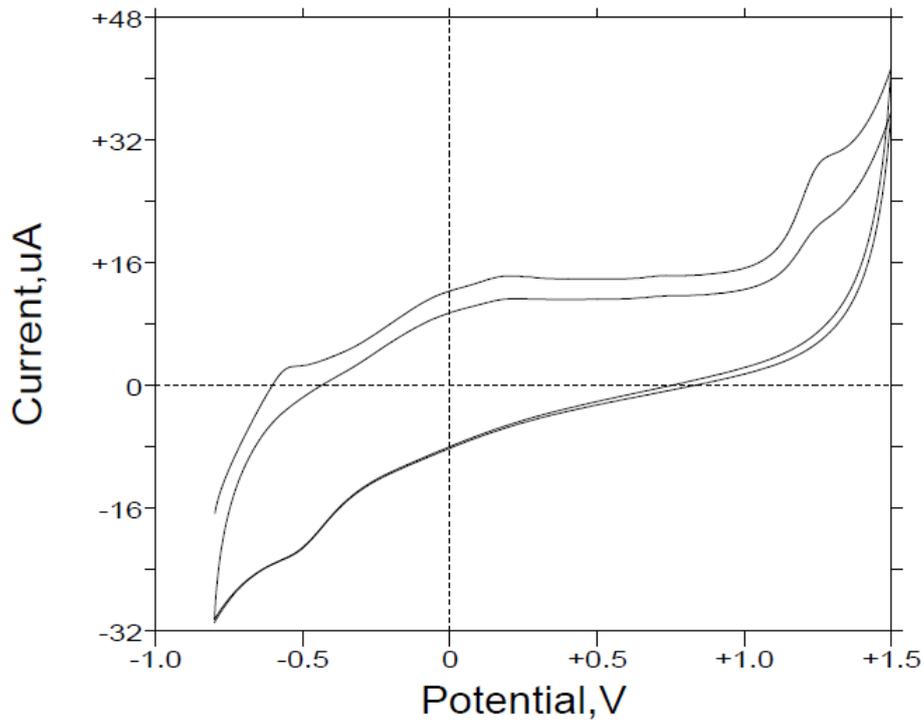


Abbildung 132: CV von 2-Methyl-3-methyl-phenylselenenyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -520 \text{ mV}$; $E_a = +1271 \text{ mV}$; $\Delta E = 1791 \text{ mV}$).

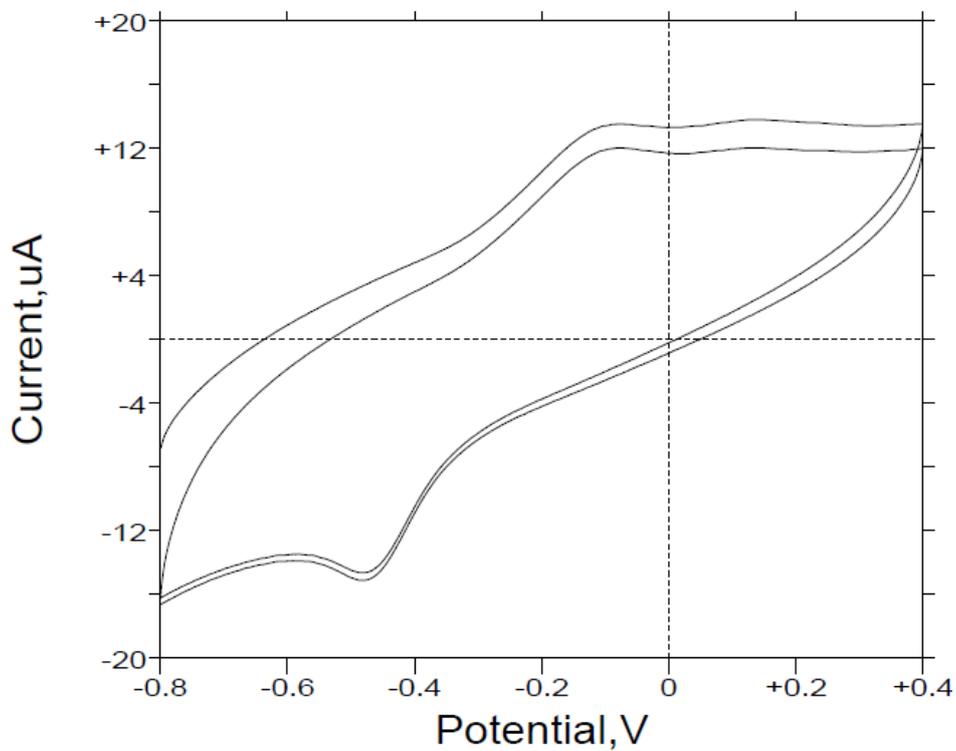


Abbildung 133: CV von 2-Methyl-3-methyl-phenylselenenyl-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -469 \text{ mV}$; $E_a = -120 \text{ mV}$; $\Delta E = 349 \text{ mV}$).

Die Einbindung einer CH₂-Gruppe zwischen Selen und Naphthochinon sorgt für eine leichte Verschiebung des Selen-Oxidationspeaks zu negativeren Potentialen. Diese Verschiebung ist jedoch nicht sehr groß (von +1,3 Volt auf etwa +1,25 Volt), sodass eine signifikante Änderung der biologischen Aktivität der Se-Gruppe im Molekül nicht zu erwarten wäre. Aber auch hier gilt, dass die elektrochemische Charakterisierung nur erste grobe Anhaltspunkte auf das Verhalten der Substanz im biologischen Medium geben kann. Das tatsächliche Verhalten kann daher nur durch *in vitro* Zellkulturstudien und anschließend durch umfangreiche *in vivo* Versuche bestimmt werden.

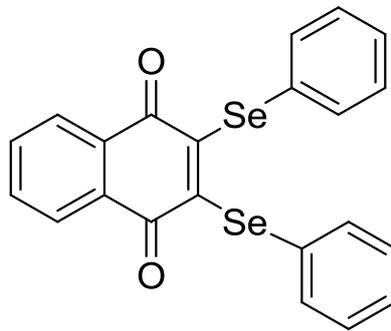


Abbildung 134: Strukturformel von 2,3-Bisphenylselenyl-1,4-Naphthochinon

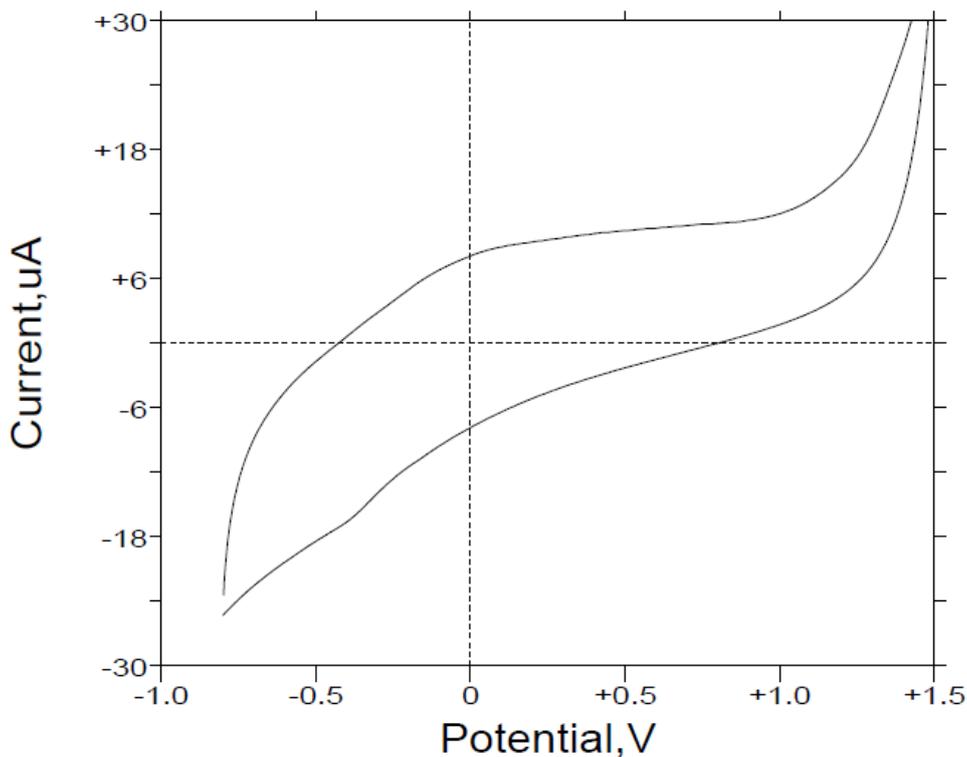


Abbildung 135: CV von 2,3-Bisphenylselenyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250$ mV/s, mit N₂ gespült.

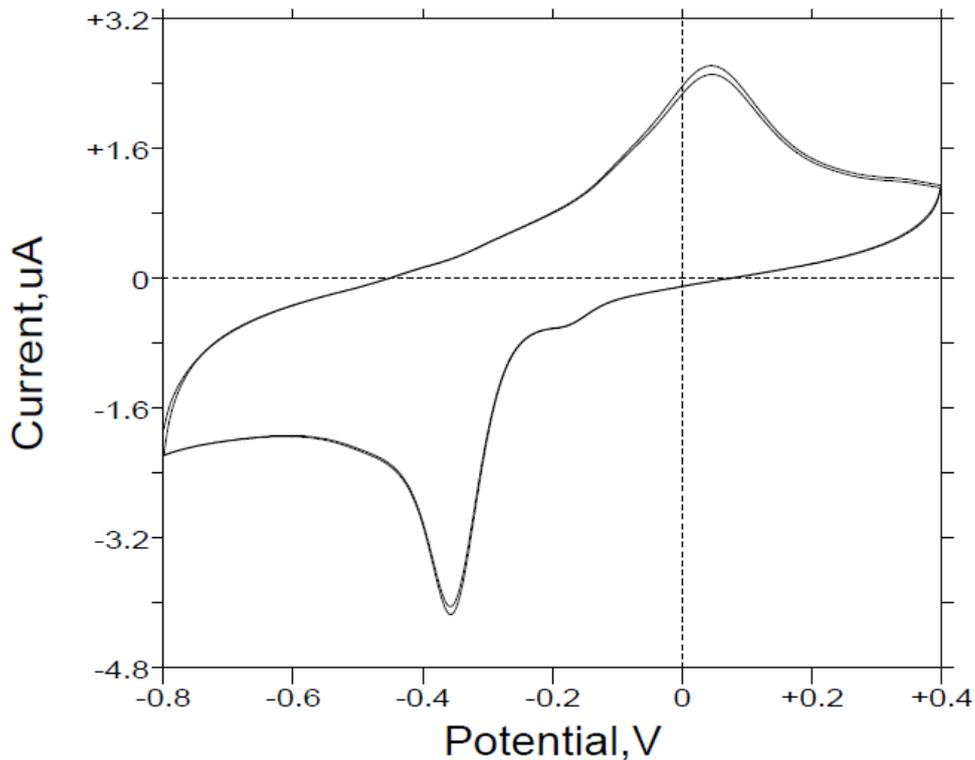


Abbildung 136: CV von 2,3-Bisphenylselenenyl-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült
 $E_p = -356 \text{ mV}$; $E_a = +36 \text{ mV}$; $\Delta E = 392 \text{ mV}$.

Anders als bei den beiden vorhergegangenen Verbindungen zeigt die Analyse von 2,3-Bisphenylselenenyl-1,4-Naphthochinon keinen Oxidationspeak des Selen, der vom Zersetzungspeak des Wassers getrennt betrachtet werden kann. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Gegenwart von zwei Se-Substituenten am Chinon zu einer starken Verschiebung der entsprechenden Se-spezifischen Signale hin zu negativen Potentialen führen (s. auch S. 161ff).

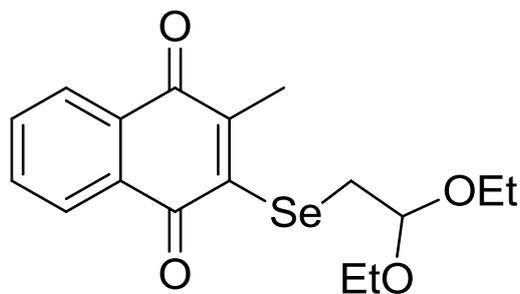


Abbildung 137: Strukturformel von 2-(2,2-Diethoxyethylselenenyl)-3-methyl-1,4-Naphthochinon

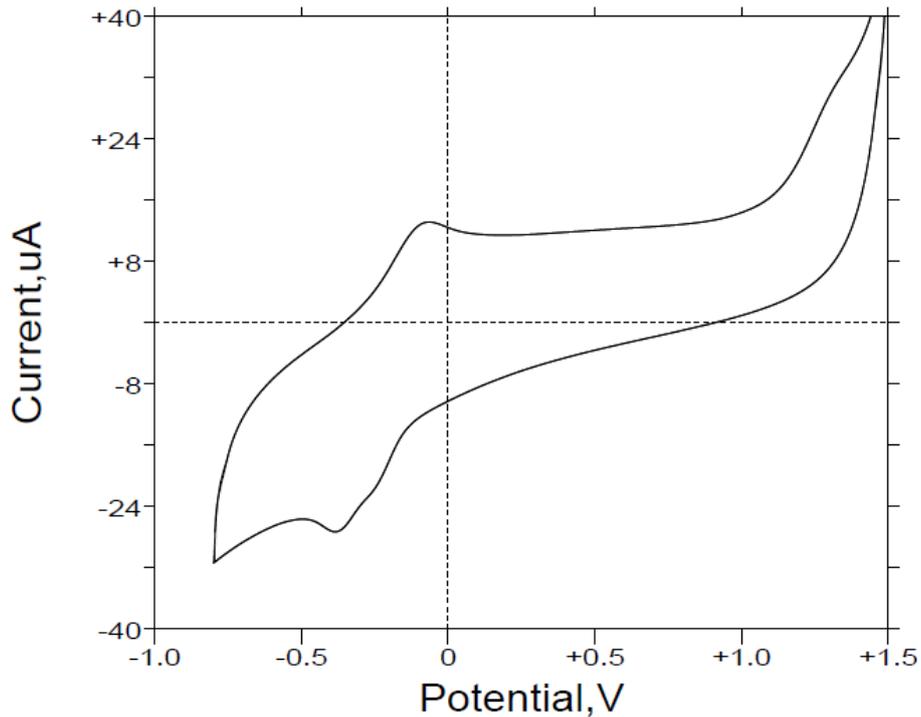


Abbildung 138: CV von 2-(2,2-Diethoxyethylselenenyl)-3-methyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -372 \text{ mV}$; $E_{a1} = -108 \text{ mV}$, $E_{a1} = +1295 \text{ mV}$; $\Delta E_1 = 264 \text{ mV}$, $\Delta E_2 = 1667 \text{ mV}$).

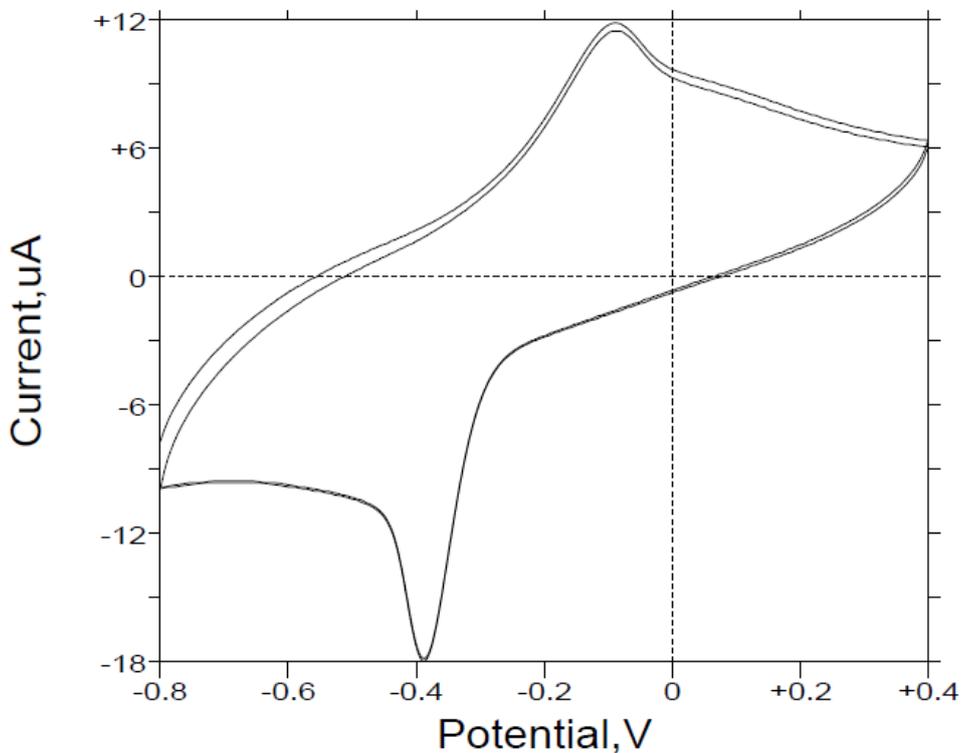


Abbildung 139: CV von 2-(2,2-Diethoxyethylselenenyl)-3-methyl-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -386 \text{ mV}$; $E_a = -95 \text{ mV}$; $\Delta E = 291 \text{ mV}$).

Tauscht man den Phenylring am Selen durch zwei Ethanolatgruppen (OEt) aus, so zeigt sich eine minimale Verschiebung des Selen-Oxidationspeaks hin zu leicht negativeren Potentialen (etwa bei +1,25 Volt). Auch hier lässt sich keine Aussage alleine anhand des Zyklovoltammogramme tätigen, ob diese Verbindung nun biologisch aktiver ist, als die anderen. Elektrochemisch interessant ist jedoch, dass die zwei Ethanolat-Gruppen ähnliche Auswirkungen auf das Redoxverhalten des Selen besitzen wie ein Phenylring. Allerdings ist die chemische und biologische Stabilität OEt Verbindungen deutlich geringer als die der aromatischen Verbindungen.^[87]

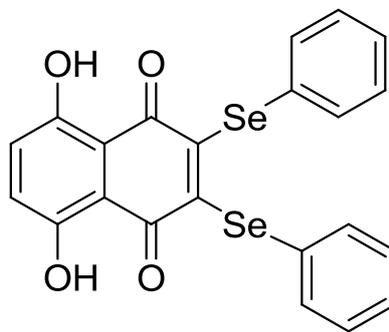


Abbildung 140: Strukturformel von 5,8-Dihydroxy-2,3-bisphenylselenyl-1,4-Naphthochinon

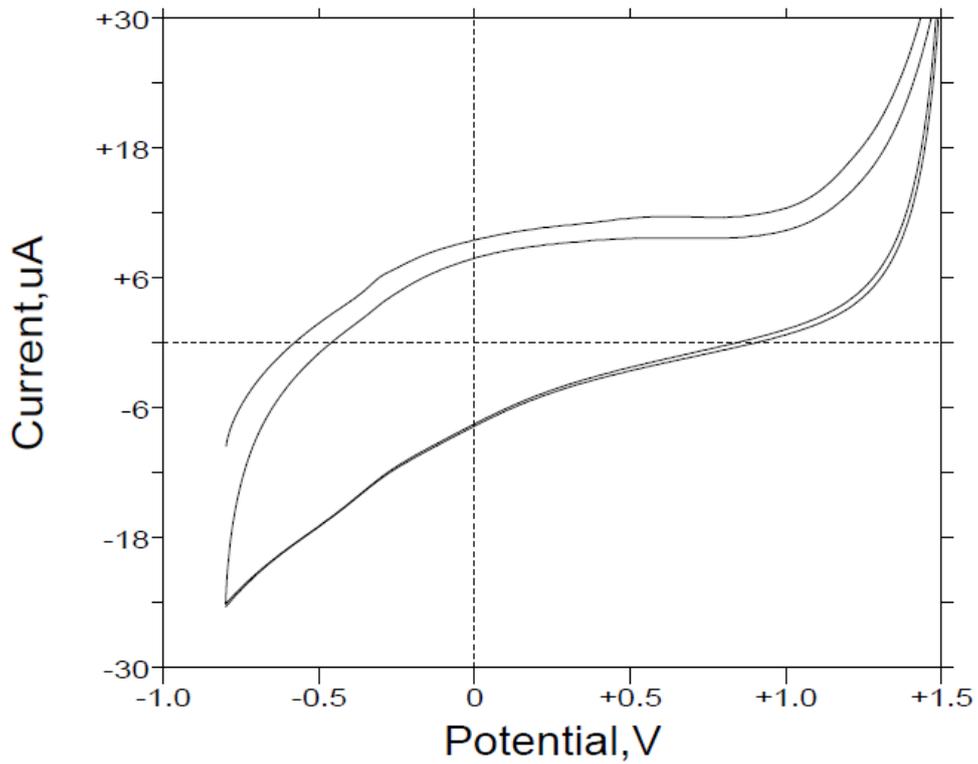


Abbildung 141: CV von 5,8-Dihydroxy-2,3-bisphenylselenyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250$ mV/s, mit N_2 gespült.

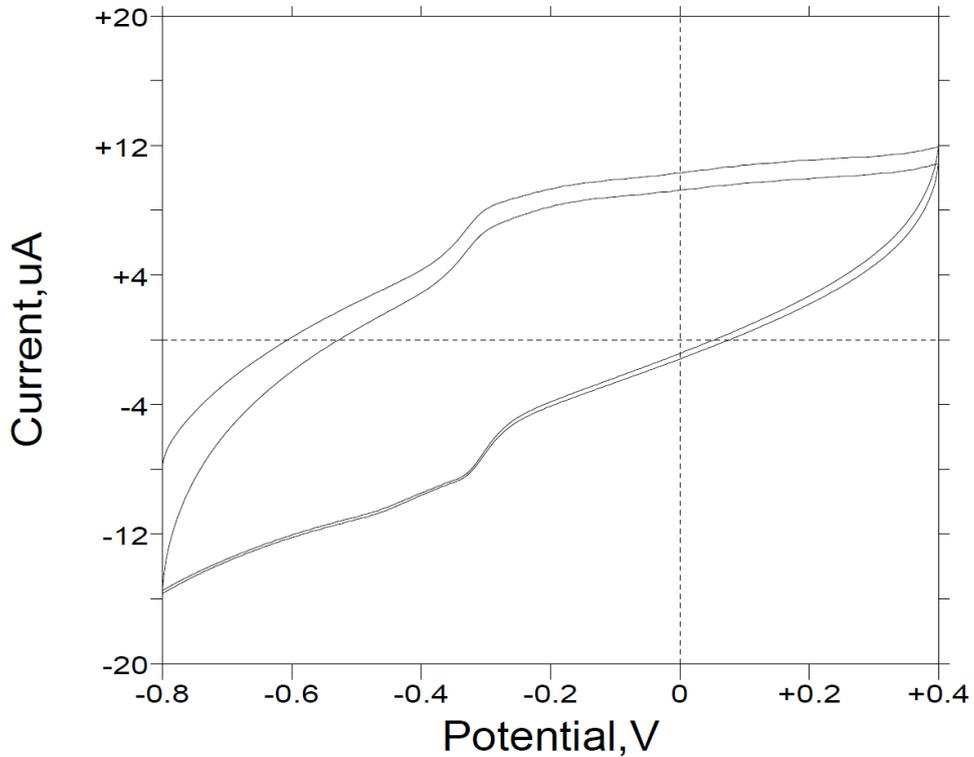


Abbildung 142: CV von 5,8-Dihydroxy-2,3-bisphenylselenyl-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250$ mV/s, mit N_2 gespült.

Eine Änderung des Grundgerüsts unter Einbindung zweier Hydroxylgruppen am Naphthochinon, wie in Abbildung 140 gezeigt, führt zu einer deutlichen Änderung des Redoxverhaltens des chinoiden Ringsystems. Sowohl der Oxidations- als auch der Reduktionspeak sind nun nicht mehr so deutlich ausgeprägt, wie im nicht-substituierten Naphthochinon.

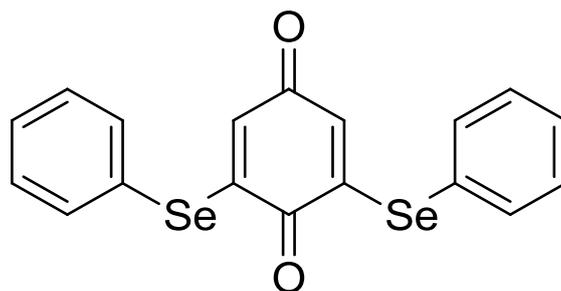


Abbildung 143: Strukturformel von 2,6-Bis(phenylselenyl)cyclohexa-2,5-dien-1,4-dion

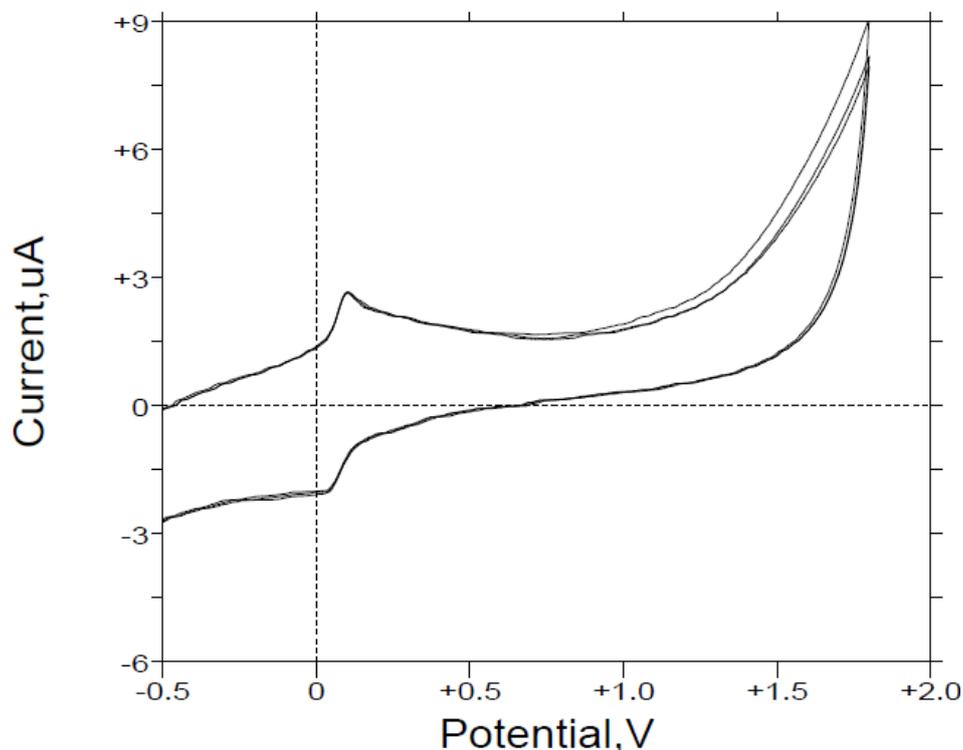


Abbildung 144: CV von 2,6-Bis(phenylselenyl)cyclohexa-2,5-dien-1,4-dion, Glas-kohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 10 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = +38 \text{ mV}$; $E_a = +100 \text{ mV}$; $\Delta E = 138 \text{ mV}$).

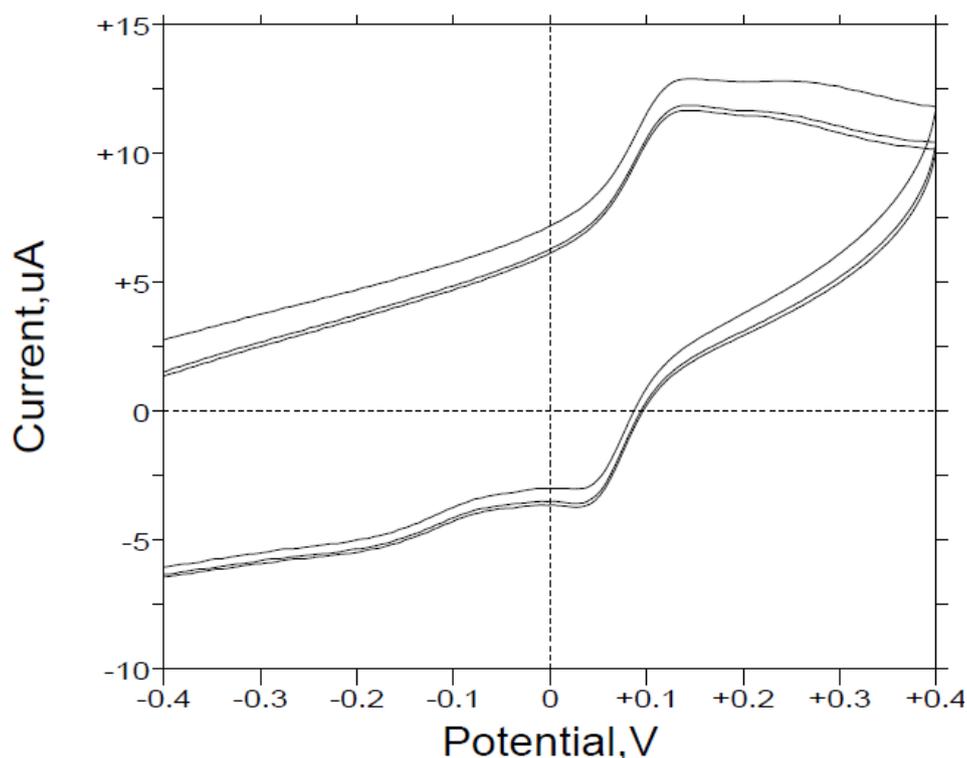


Abbildung 145: CV von 2,6-Bis(phenylselenyl)cyclohexa-2,5-dien-1,4-dion (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = +42 \text{ mV}$; $E_a = +133 \text{ mV}$; $\Delta E = 175 \text{ mV}$).

Eine deutlich weitergehende Veränderung des Grundgerüsts wird in Abbildung 143 aufgezeigt. Das Ringsystem des Naphthochinons wurde durch ein Benzochinon ersetzt. Diese Änderung führt zu einem massiven Eingriff in das elektronische und chemische System und man erhält somit eine deutliche Änderung des Zyklovoltammogramms.

Abbildung 144 zeigt im Vergleich zu den Naphthochinonen deutlich andere Redoxpotentiale des chinoiden Systems. Sowohl der Oxidations- als auch der Reduktionspeak sind bei positiveren Potentialen zu finden (Potentiale s. Abbildungslegende). Ausgehend davon kann man schließen, dass das Benzochinon eine deutlich oxidierende Wirkung aufweist.

Auch der Oxidationspeak des Selens ist in Richtung positiverer Potentiale verschoben und liegt nun im Bereich der Wasserzersetzung, wodurch unter diesen Bedingungen kein genauer Wert ermittelt werden konnte.

Elektrochemisch unterscheidet sich diese Verbindung deutlich von den zuvor untersuchten Naphthochinon-Derivaten. Eine andere biologischen Aktivität ist daher wahrscheinlich. Ob das 2,6-Bis(phenylselenyl)cyclohexa-2,5-dien-1,4-dion jedoch wirklich im menschlichen Körper eine Rolle spielen kann oder ob es überhaupt in die Zellen hineinkommen kann, lässt sich Anhand der vorliegenden Daten noch nicht bestimmen. Verschiedene Variablen, wie zum Beispiel in den „Lipinski Rule of Five“ zusammengefasst, spielen für die biologische Aktivität des potentiellen Wirkstoffes eine große Rolle. Anhand dieser Regeln muss dann die Verbindung noch mal genauer charakterisiert und ausgewertet werden.

Aufgrund der höheren oxidativen Wirkung ist eine toxische Wirkung des Benzoquinons sehr wahrscheinlich, wenn es im Körper als bioverfügbares Molekül vorliegen sollte.

2.7.1.3 Tellurhaltige 1,4-Naphthochinon-Derivate

Anders als Selen ist Tellur für den menschlichen Organismus kein essenzielles Element. Tellur zeigt, im Gegensatz zu Selen, ausgeprägte (halb-)metallische Eigenschaften, vor allem in seinen intermetallischen Verbindungen. Kristallines Tellur besitzt eine silbrigweiße, metallische Oberfläche und ähnelt Zinn und Antimon (gleiche Periode im PSE, jedoch unterschiedliche Gruppen). Tellur zeigt in nichtmetallischen Verbindungen ähnliche Eigenschaften wie Selen und Schwefel, was seine Stellung in der Gruppe der Chalkogene (Gruppe 16 im PSE) widerspiegelt.

Generell besitzt Tellur, insbesondere in seinen anorganischen Verbindungen (Telluride (Salze des Tellurwasserstoffs), Tellurite, Tellurate (Salze der Tellursäure)), allerdings eine deutlich höhere Toxizität als Schwefel oder Selen. Seine Verwendung in potentiellen biologischen Wirkstoffen ist daher in der Vergangenheit weniger von Interesse in der Forschung gewesen. Mittlerweile kennt man allerdings auch einige biologisch aktive und medizinisch relevante Verbindungen des Tellurs, die ein differenzierteres Spektrum an biologischer Aktivität (und auch Toxizität) aufweisen. Solche Verbindungen sind oftmals auch katalytisch und Redox-aktiv. Sie sind in den letzten Jahren vermehrt erforscht worden, z. B. auch von der Arbeitsgruppe von Prof. Jacob.

Ein Austausch von Selen gegen Tellur erhöht generell die Reaktivität der Verbindung (insbesondere der katalytischen Eigenschaften).

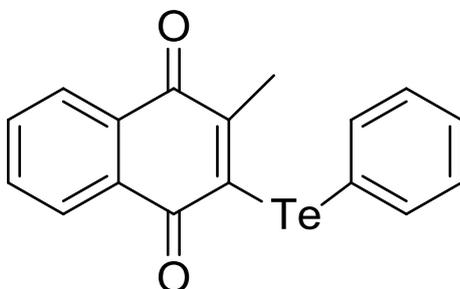


Abbildung 146: Strukturformel von 2-Methyl-3-phenyltelenyl-1,4-Naphthochinon

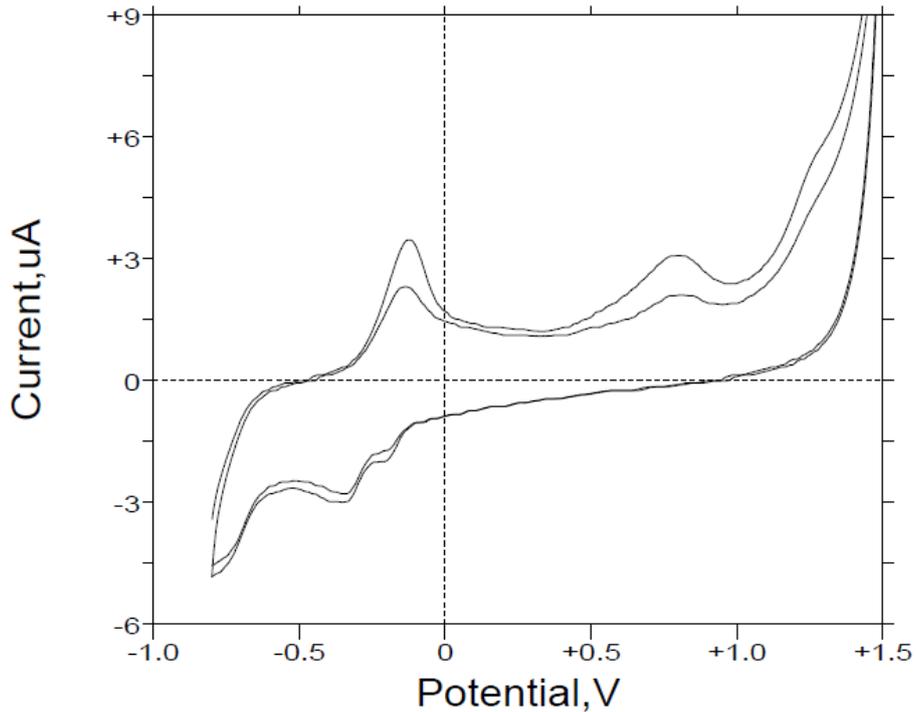


Abbildung 147: CV von 2-Methyl-3-phenyltelenyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 50 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -336 \text{ mV}$; $E_{a1} = -128 \text{ mV}$, $E_{a2} = -801 \text{ mV}$; $\Delta E_1 = 208 \text{ mV}$, $\Delta E_2 = 1137 \text{ mV}$).

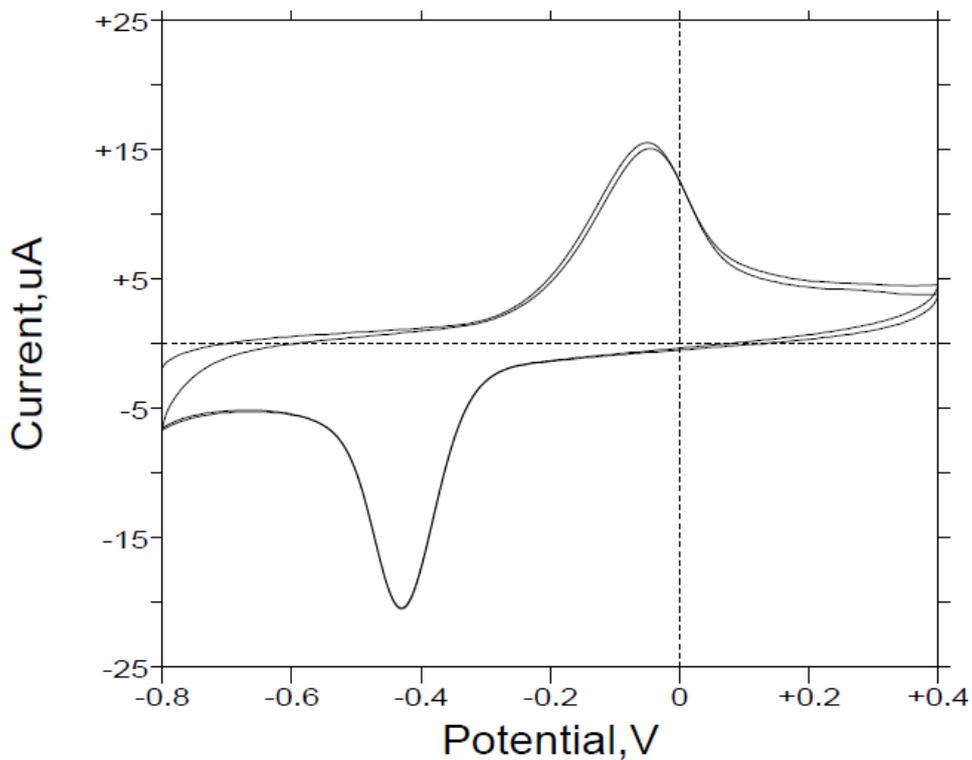


Abbildung 148: CV von 2-Methyl-3-phenyltelenyl-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 50 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -421 \text{ mV}$; $E_a = -51 \text{ mV}$; $\Delta E = 370 \text{ mV}$).

Es ist daher nicht verwunderlich, dass signifikante Änderungen im elektrochemischen Verhalten nach dem Austausch des Selens gegen Tellur auftreten. Dabei zeigt sich jedoch keine wesentliche Änderung des Redoxverhaltens des chinoiden Systems. In Abbildung 147 lässt sich ein zweiter kleiner Reduktionspeak bei ca. -0,25 Volt erkennen, der jedoch verschwindet, wenn man nur den Potentialbereich des chinoiden Systems scannt. Eine wesentliche Änderung erkennt man im weiteren Verlauf des Zyklovoltammogrammes in positiver Potentialrichtung. Ein Oxidationspeak, der nur vom Tellur herrühren kann, wird bereits bei einem Potential deutlich unter +1,0 Volt, nämlich bei ca. +0,8 Volt, erkannt. Damit befindet sich dieses Oxidationspotential im Bereich der bisher veröffentlichten Potentiale von Tellur und seiner Verbindungen und ist etwa 300 mV negativer im Vergleich zu den untersuchten, strukturell verwandten Se-Verbindungen.

Eine verbindliche Aussage über die biologische Aktivität dieser Verbindung allein auf Grundlage des elektrochemisch ermittelten Ergebnis lässt sich auch hier nicht treffen. Allerdings kann man vermuten, dass durch die deutliche Verschiebung des Oxidationspeaks hin zum Nullpunkt eine leichtere Oxidation dieser Verbindung erfolgt. Dadurch erhöht sich Erfahrungsgemäß auch die katalytische Aktivität, was wiederum auf eine erhöhte biologische Aktivität (im Vergleich zu den Se-Analoga) schließen lässt. Diesen Zusammenhang zwischen elektrochemischem Oxidationspotential des Chalkogens, katalytischer (GPx-ähnlicher) Eigenschaften und biologische Aktivität ist von unserer Gruppe in der Vergangenheit häufig beobachtet worden.^[35,87-90]

An dieser Stelle ist es nun angebracht, näher auf den Glutathion-Redoxzyklus einzugehen, um die bisher dargestellten Ergebnisse in einen verständlicheren Kontext zu rücken. Der Glutathion-Redoxzyklus dient vor allem der Abwehr von intrazellulären Peroxiden und Wasserstoffperoxid. Zentrale Enzyme dieses Zyklus sind die Glutathion-Peroxidase (GPx) und Glutathion-Reduktase (GR). GPx ist ein tetrameres Protein, welches 4 Selen-Atome enthält und im katalytischen Zentrum L-Selenocystein trägt.

Für die Reduktion von Peroxiden benötigt GPx reduziertes Glutathion (L- γ -Glutamyl-L-Cystein, GSH), um seine katalytische Aktivität zur Reduktion von Peroxiden (ROOH) aufrecht erhalten zu können.



Abbildung 149: Reduktion von Peroxiden durch GPx und GSH

Die Glutathion-Reduktase (ein dimeres Protein), sorgt dafür, dass das anfallende oxidierte Glutathion (GSSG) wieder reduziert wird und stellt sicher, dass ein hoher GSH/GSSG Quotient innerhalb der Zelle aufrecht erhalten wird. Dieser Quotient bezieht sich dabei nicht nur auf den Glutathion-Redoxzyklus, sondern verschiedene andere GSH-abhängige Reaktionen profitieren diesbezüglich ebenfalls von der Aktivität der GR. Für die Reduktion von GSSG und anderen Disulfiden (RSSR) benötigt die GR Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat als Wasserstoffdonator in seiner reduzierten Form (NADPH)



Abbildung 150: Reduktion von RSSR durch Glutathion-Reduktase mithilfe von NADPH

Der Glutathion-Redoxzyklus ist vom GSH/GSSG Quotienten abhängig und ist daher von der Aktivität der GR limitiert. Nur die GPx kann jedoch durch eine reduzierende Reaktion die Zelle von Peroxiden befreien und so OS entgegenwirken.^[91]

GPx und GR sind vor allem im Zytosol lokalisiert, jedoch besitzen sie auch eine gewisse Aktivität in den Mitochondrien. Vor allem Erythrozyten und Leberzellen zeigen eine hohe GSH-Redox-Aktivität, in der Lunge dagegen wurde eine deutlich geringere Aktivität festgestellt.^[92]

Eine Überschneidung tritt hinsichtlich der Substratspezifität bei der Katalase und dem Glutathion-Redoxzyklus auf.

Für Säugetier- und menschliche Zellen spielt der Katalasezyklus jedoch eine untergeordnete Rolle bei der Abwehr von OS (GPx ist in der Lage auch höhermolekulare Peroxide zu reduzieren, z. B. Peroxide von Lipiden).^[93]

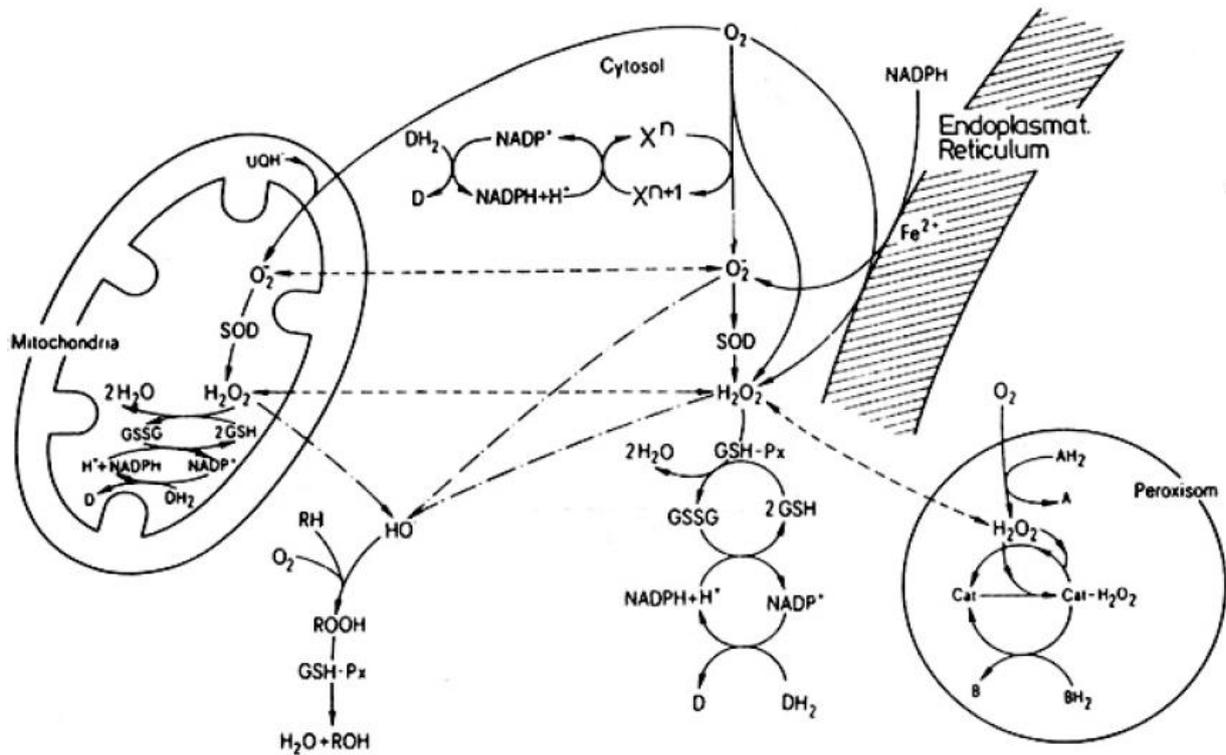


Abbildung 151: Ausschnitt aus dem komplexen Zusammenspiel der antioxidativen Enzyme Katalase, GPx und Superoxid-Dismutase bei der intrazellulären Abwehr von OS.^[94]

Aufgrund der bereits oben angegebenen Ergebnisse wurden weitere Tellur-Verbindungen mit potentiellen katalytischen und Redoxaktiven Eigenschaften entwickelt.

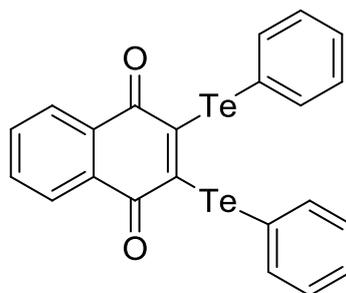


Abbildung 152: Strukturformel von 2,3-Bisphenyltelenyl-1,4-Naphthochinon

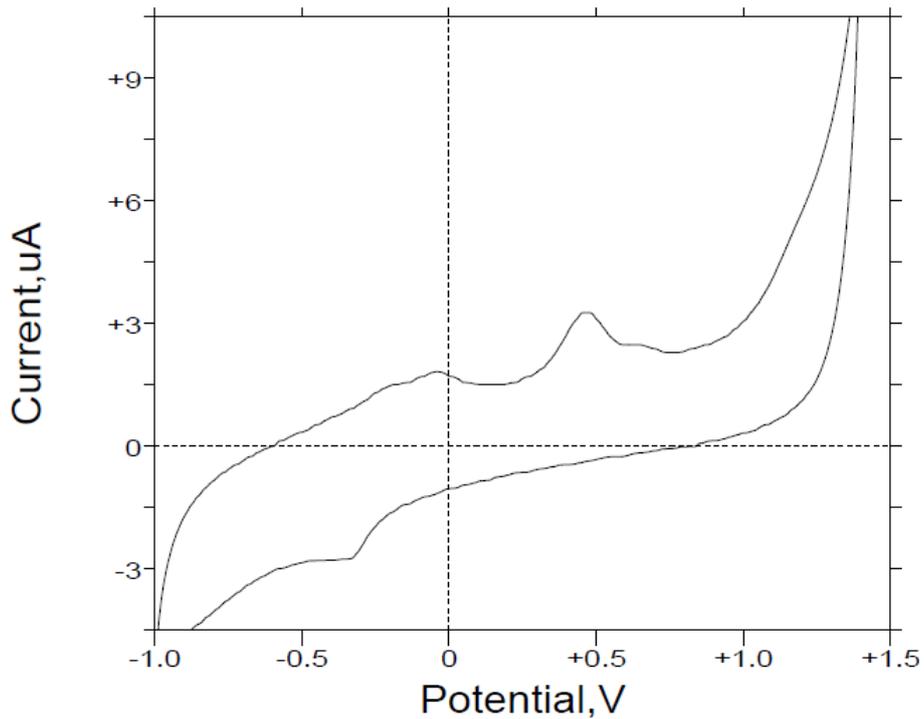


Abbildung 153: CV von 2,3-Bisphenylteleryl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 100 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p= -320 \text{ mV}$; $E_{a1}= -46 \text{ mV}$, $E_{a2}= +464 \text{ mV}$; $\Delta E_1= 274 \text{ mV}$, $\Delta E_2= 784 \text{ mV}$).

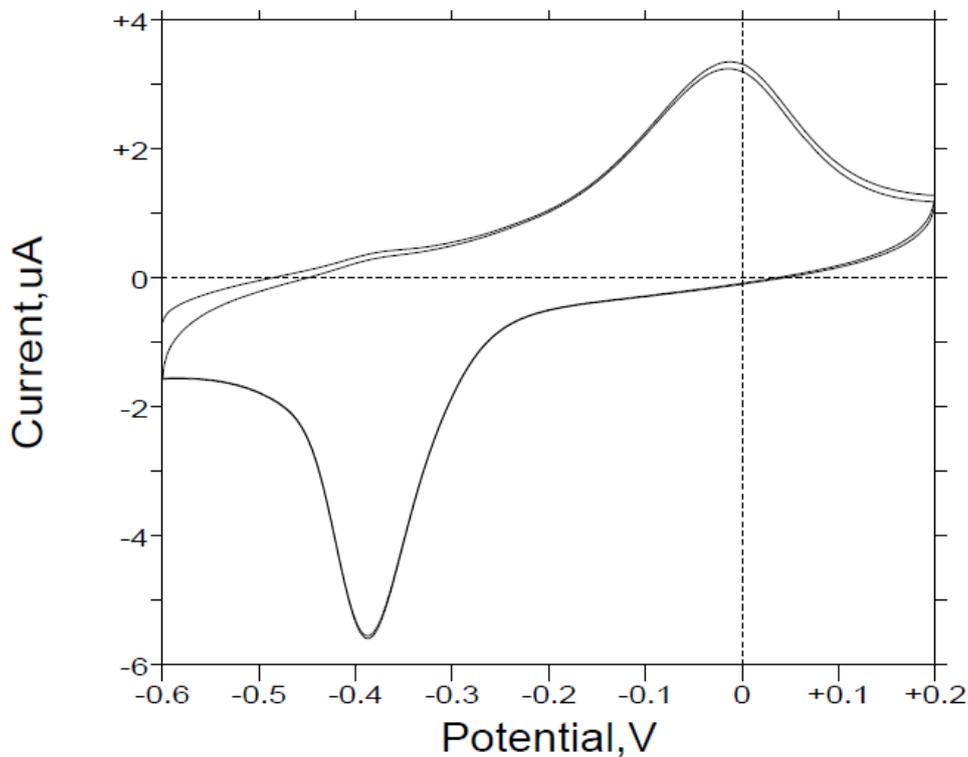


Abbildung 154: CV von 2,3-Bisphenylteleryl-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 100 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p= -386 \text{ mV}$; $E_a= -16 \text{ mV}$; $\Delta E= 370 \text{ mV}$).

Ein noch geringeres Oxidationspotential zeigt sich bei 2-((Hydroxyphenyl)tellenyl)-3-methyl-1,4-Naphthochinon. Bei dieser Verbindung befinden sich zwei gleichwertige Tellur-Phenyl-Gruppen am Naphthochinon-Grundgerüst. Anders als bei der vergleichbaren Selen-Verbindung führt das Einbringen des zweiten Tellurs zu einer Verschiebung des Tellur-Oxidationssignals hin zu negativeren Potentialen. Auch für diese Verbindung gilt, dass eine biologische Aktivität dadurch verbessert sein kann.

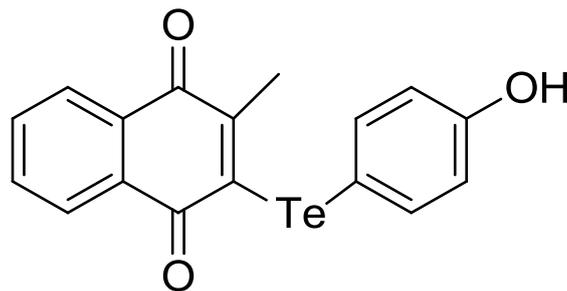


Abbildung 155: Strukturformel von 2-((Hydroxyphenyl)tellenyl)-3-methyl-1,4-Naphthochinon

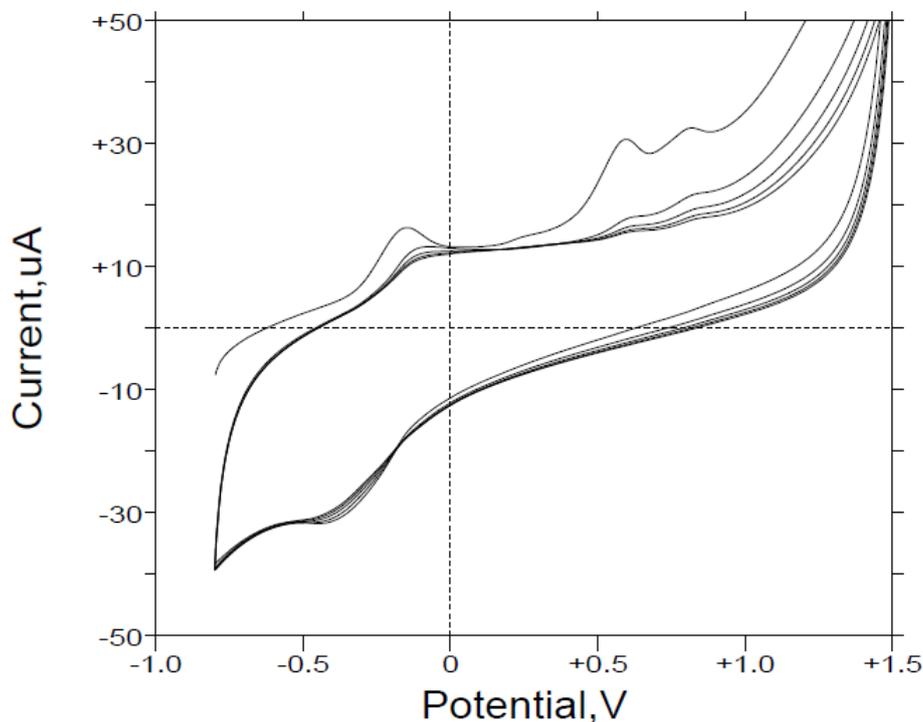


Abbildung 156: CV von 2-((Hydroxyphenyl)tellenyl)-3-methyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 5.00 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -353 \text{ mV}$; $E_{a1} = -158 \text{ mV}$, $E_{a2} = +592 \text{ mV}$, $E_{a3} = +820 \text{ mV}$; $\Delta E_1 = 195 \text{ mV}$, $\Delta E_2 = 945 \text{ mV}$, $\Delta E_3 = 1173 \text{ mV}$).

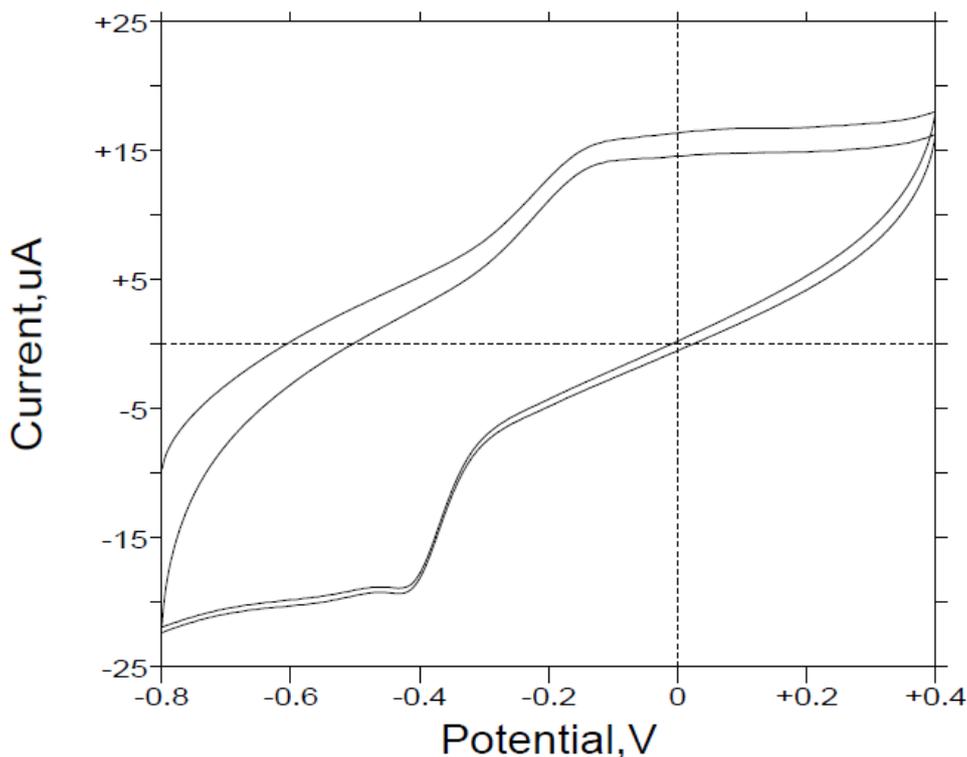


Abbildung 157: CV von 2-((Hydroxyphenyl)tellenyl)-3-methyl-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v=100$ mV/s, mit N_2 gespült ($E_p= -419$ mV; $E_a= -138$ mV; $\Delta E= 281$ mV).

2-((Hydroxyphenyl)tellenyl)-3-methyl-1,4-Naphthochinon zeigt im Vergleich zu den vorangegangenen Tellurverbindungen ein etwas anderes Zyklovoltammogramm. Durch die Substituierung von Wasserstoff gegen eine Hydroxylgruppe in para-Position an der Phenylgruppe, die an das Tellur gebunden ist, ändert sich das elektronische System: Neben dem Tellur Signal und den Signalen des Naphthochinon-Grundgerüst tritt ein (irreversibles) Oxidationspotential des Phenols auf (ca. +500 mV).

Dabei konnte jedoch keine direkte Beeinflussung der drei vorhandenen Redoxzentren (Chinon (reversibel), Tellur (irreversibel), Phenol (irreversibel)) untereinander festgestellt werden.

2.7.2 Schwefelhaltige Naturstoffderivate

Im vorherigen Abschnitt wurden Se- und Te-haltige Verbindungen besprochen, die entwickelt wurden, um möglichst viele Redoxzentren in einem Molekül zu vereinen. Dadurch war es möglich, verschiedene Redoxreaktionen in der Zelle zu beeinflussen, insbesondere auch mit Hinblick auf OS (in Krebszellen).

Ausgehend von Naturstoffverbindungen, die aus Alliumpflanzen extrahiert worden sind (wie z. B. dem Alliin, Allicin, diverse Polysulfide), wurden weitere Verbindungen synthetisiert, die im Rahmen der Krebsforschung bzw. auch als grüne Pestizide Verwendung finden könnten. Herr Awais Anwar hatte sich während seiner Doktorarbeit an der Universität des Saarlandes hinlänglich mit diesen Substanzen beschäftigt. Hauptaugenmerk von Herrn Anwar war dabei die Synthese von Diallyl- und Dipropyl-Polysulfiden¹, den Abbauprodukten des Allicins. Diese Polysulfide sind im Gegensatz zu Allicin chemisch vergleichsweise stabil und haben zudem in der Vergangenheit sehr interessante biologische Aktivitäten gezeigt.^[95,96]

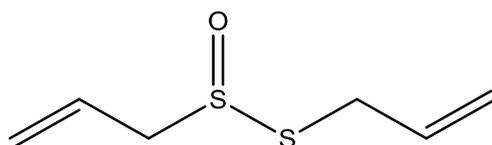


Abbildung 158: Strukturformel des Allicins

Da die einzelnen Verbindungen deutliche Unterschiede in ihrem Löslichkeitsverhalten zeigen, wurden von Herrn Thomas Schneider die *logP*-Werte experimentell bestimmt. Diese Werte decken sich gut mit den theoretisch errechneten Werten für diese Verbindungen. Beide Werte, experimentelle wie auch theoretische, werden daher hier mit angegeben.

¹ Der Begriff bezeichnet nach IUPAC Verbindungen $R_1S_xR_2$ ($R_1, R_2 \neq H, x \geq 3$) als „Polysulfane“. Da in der Biochemie allerdings die (chemisch nicht ganz korrekte) Bezeichnung „Polysulfide“ auch für organische RS_xR Moleküle weit verbreitet ist, wird hier von Polysulfiden gesprochen. Im strengen Sinn sind Polysulfide Schwefelverbindungen mit R_1 und/oder $R_2 = H$.

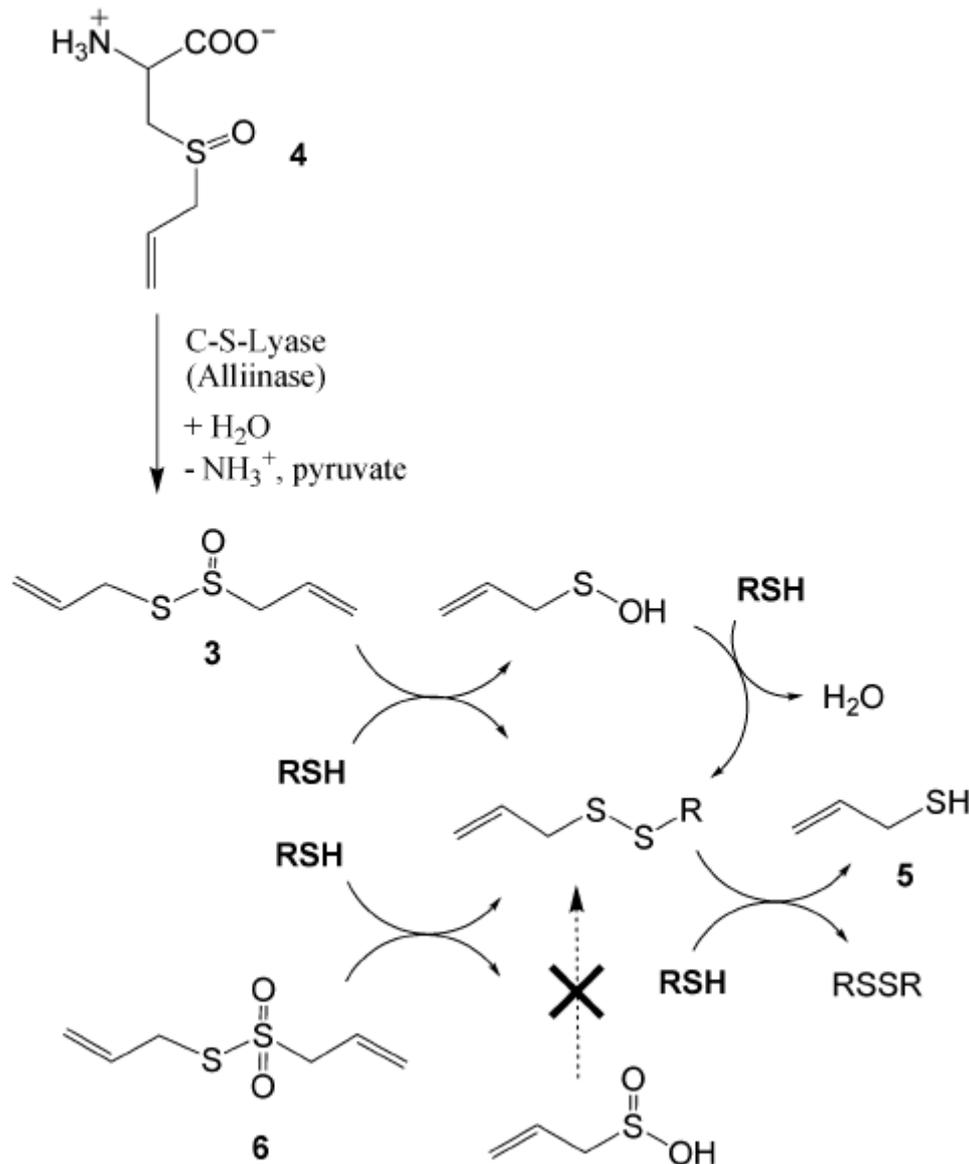


Abbildung 159: Biosynthese von Allicin, Zerfall zu Polysulfide (Alliin (4); Allicin (3); Allylmercaptan (5); Pseudoallicin (6))^[95]

Interessanterweise besteht bei den Polysulfiden ein ausgeprägter Trend, nach dem mit zunehmender Schwefel-Kettenlänge im Molekül auch die biologische Aktivität zunimmt. Eine elektrochemische Untersuchung der Redoxpotentiale dieser Verbindungen sollte nun helfen, die sehr unterschiedlichen Aktivitäten der einzelnen Polysulfide besser erklären zu können.

Alle Messungen der verschiedenen Schwefelverbindungen wurden aufgrund der geringen Löslichkeit in Wasser in einem Medium aus 33 % Methanol und 50 mM Phosphatpuffer durchgeführt.

Die Konzentration der Verbindungen betrug dabei 100 μM . Als AE diente eine Hängende Quecksilbertropfelektrode (HMDE, Hanging Mercury Drop Electrode), deren Quecksilbertropfen nach jeder Messung erneuert wurde. Im Gegensatz zu den Se- und Te-Verbindungen (Oxidation zum Radikal) ist es nicht möglich, das Thiol/Disulfid Redox-Paar mit einer Glaskohlenstoffelektrode zu vermessen. Neben Quecksilber eignet sich nur noch Gold als Elektrode, in beiden Fällen kommt es jedoch zu starken Adsorptionsphänomenen.

Alle Messungen wurden bei verschiedenen pH-Werten (pH 5 bis pH 8) im Triplikat durchgeführt, um eine pH-Abhängigkeit der Redoxpotentiale aufzeigen zu können. Außerdem wurden alle Messungen mit mehreren Spannungsvorschubgeschwindigkeiten, zwischen 10 mV/s und 500 mV/s, aufgenommen um eine Abhängigkeit der Redoxpotentiale von der Spannungsvorschubgeschwindigkeit nachweisen zu können (z. B. zur Analyse des Adsorptionsverhaltens).

Im Folgenden werden die einzelnen Verbindungen besprochen. Dabei liegt der Schwerpunkt der Diskussion auf elektrochemischen Eigenschaften. Biologische Daten, die zum Verständnis der Diskussion erforderlich sind, werden entsprechend erwähnt.

2.7.2.1 Diallyl-Analoga des Allicins

Diallylmonosulfid (DAS) zeigte kaum Aktivität gegen die eingesetzten Krebszellen und es konnten auch keine nennenswerten Einflüsse auf die Nematoden beobachtet werden. Interessanterweise zeigte die elektrochemische Untersuchung dieser Verbindung auch keinerlei Signale im relevanten Potentialbereich zwischen -0,9 und 0 Volt.

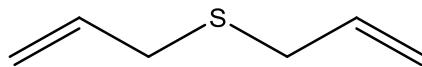


Abbildung 160: Strukturformel von DAS

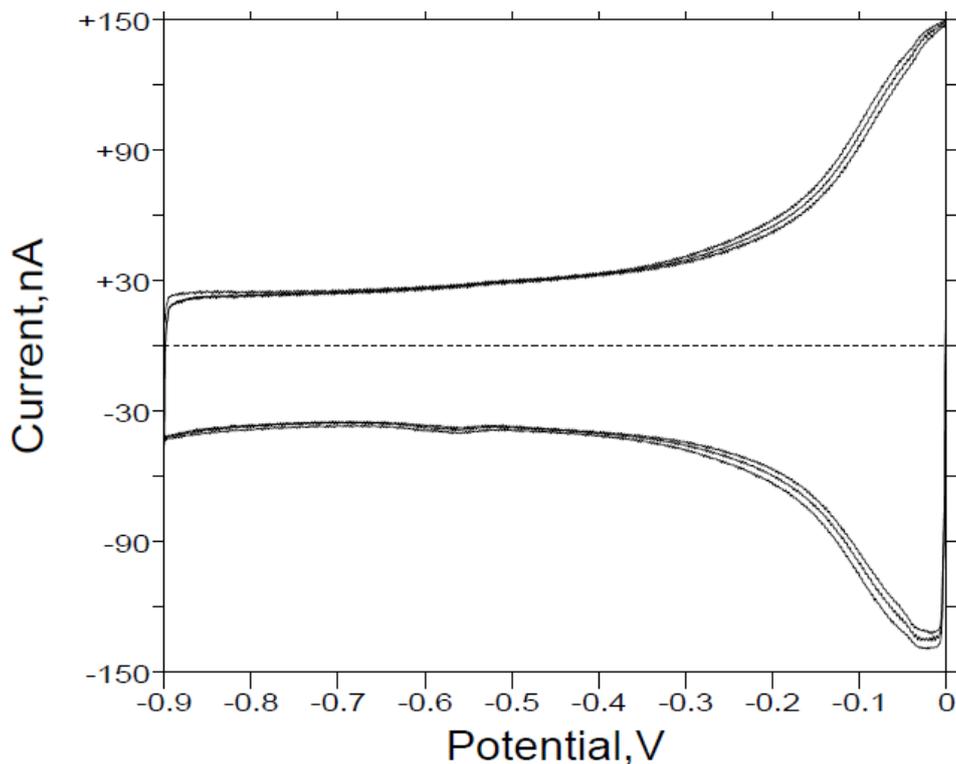


Abbildung 161: CV von DAS, HMDE als AE, 33 % MeOH, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 200$ mV/s, mit N_2 gespült

Der Schwefel in dieser Verbindung kann zwar oxidiert werden (Sulfoxid, Sulfon) aber diese Elektrochemie spielt in dem untersuchten Potentialbereich keine Rolle.

Der Anstieg des Stromes in der Nähe von 0 Volt deutet bereits auf die Oxidation des Quecksilbers hin. Der $\log P$ -Wert dieser Verbindung beträgt 2,41 (theoretisch berechnet: $2,23 \pm 0,21$).

Ganz anders gestaltet sich die Situation, wenn ein zweites Schwefelatom in Nachbarschaft zum Ersten eingebaut wird. Das so erhaltene Diallyldisulfid (DADS) mit seiner Schwefel-Schwefel-Bindung zeigt bereits deutliche Reduktions- und Oxidationsreflexe im Zyklovoltammogramm, mit einem Oxidationssignal bei -0,46 Volt und zwei Reduktionssignalen bei -0,51 und -0,59 Volt. Ein zweites Oxidationssignal bei -0,46 Volt ist ebenfalls erkennbar. Der $\log P$ -Wert dieser Verbindung liegt bei 2,72 (theoretischer Wert: $2,52 \pm 0,91$)

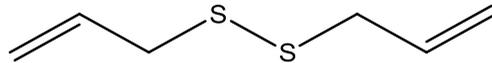


Abbildung 162: Strukturformel von DADS

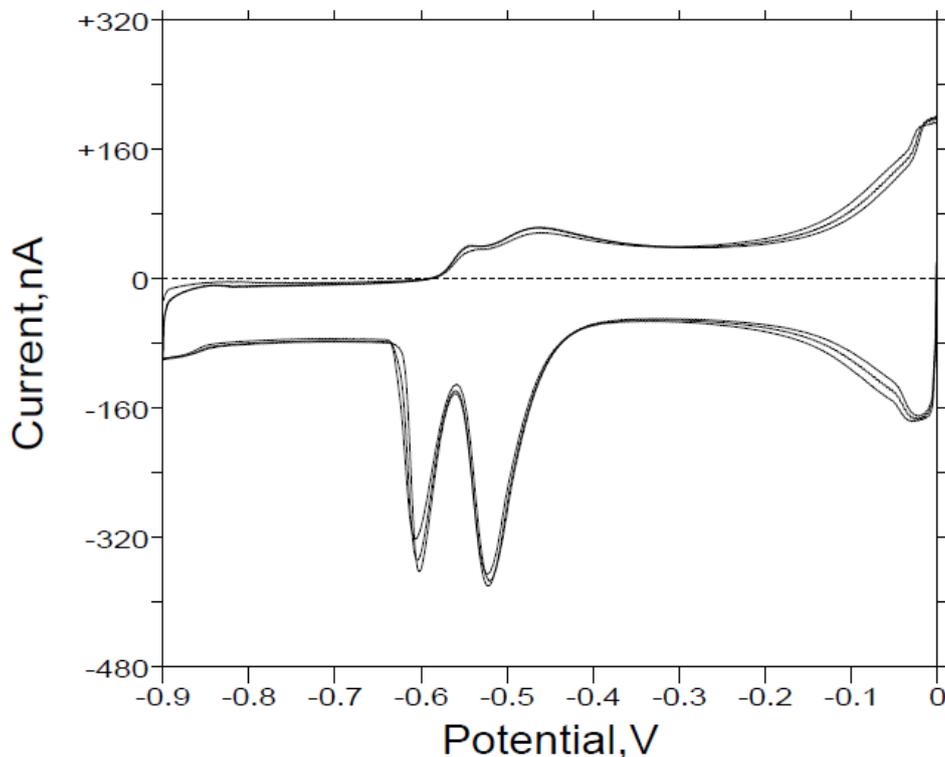


Abbildung 163: CV von DADS, HMDE als AE, 33 % MeOH, Phosphatpuffer pH 7,4;
 $v = 200 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült

Der beobachtete Elektronentransfer findet zwischen
 $2 \text{ RSH} \rightleftharpoons \text{RSSR} + 2 \text{ e}^- + 2 \text{ H}^+$ statt.

Eine mögliche Erklärung der Unterschiede im Redoxverhalten dieser beiden Verbindungen könnte in der Entstehung von stabilen Reduktionsprodukten, wie z. B. RSSH liegen. Interessanterweise besitzt das DADS, im Vergleich zum DAS, eine deutlich höhere biologische Aktivität. Beispielsweise wirkt DADS toxisch gegenüber verschiedenen Bakterien und Pilzen. Diese Aktivität ist wahrscheinlich auf das oxidative Verhalten des DADS (Disulfid!) zurückzuführen, obwohl andere Effekte, wie z. B. eine Metallbindung (Enzym-Inhibierung) des RSH nicht ausgeschlossen werden kann.^[96]

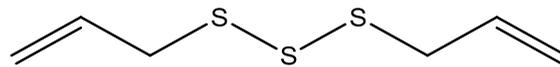


Abbildung 164: Strukturformel von Diallyltrisulfid

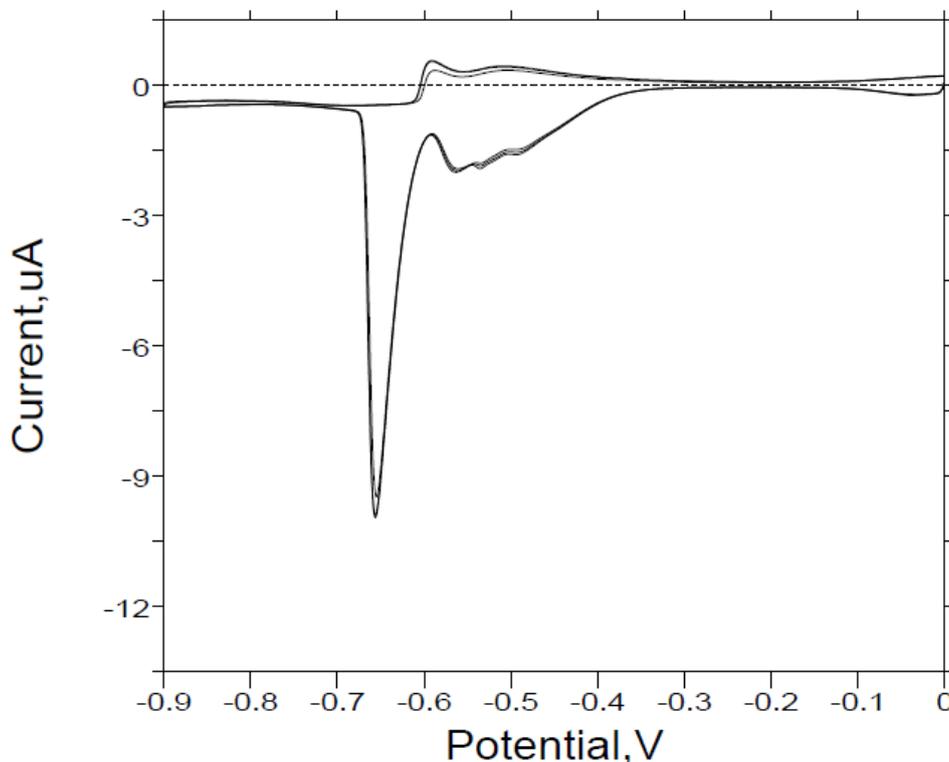


Abbildung 165: CV von Diallyltrisulfid, HMDE als AE, 33 % MeOH, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 200 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült

Der Einbau eines weiteren Schwefelatoms führt wiederum zu einem deutlich veränderten Redoxverhalten der Verbindung (Diallyltrisulfid, DATS).



Abbildung 166: Redoxverhalten von DATS

Abbildung 165 zeigt im Vergleich zu Disulfid beim Trisulfid eine signifikante Verschiebung der Reduktionspeaks hin zu negativeren Potentialen. Auch ist der Reduktionspeak bei -657 mV deutlich größer als bei den vorhergehenden Messungen, obwohl die gleiche Konzentration an Substanz vorliegt. Dieses ausgeprägte Signal könnte durch die schlechte Löslichkeit und die daher erfolgte starke Adsorption an der Elektrode hervorgerufen werden (s. auch DATTS). Bei dieser Verbindung konnte auch eine Reaktion mit der Quecksilberelektrode optisch verfolgt werden. Der Quecksilbertropfen verfärbte sich während der Messung schwarz. Auch Unterschiede in der Löslichkeit wurden gefunden. Während sich Diallyldisulfid noch sehr gut in dem verwendeten Medium lösen lässt, musste das Diallyltrisulfid bereits kurzzeitig im Ultraschallbad behandelt werden, um eine vollständige Verteilung dieser öligen Flüssigkeit im Elektrolyten zu gewährleisten. Der $\log P$ -Wert liegt hier bereits deutlich höher und beträgt 2,98 (theoretischer Wert: $2,64 \pm 0,86$)

Das Diallyltetrasulfid (DTTS) blieb auch nach Behandlung im Ultraschallbad schlecht löslich ($\log P$ von 3,12; theoretischer Wert: $2,88 \pm 1,00$). Statt einer klaren Lösung erhielt man hier eine leicht milchige Suspension, die sich auch durch Zugabe von weiterem Methanol nur sehr wenig verändert hat. Die Aufnahme des CV erfolgte trotz schlechter Löslichkeit ebenfalls unter Verwendung von 33 % Methanol, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den anderen Verbindungen erhalten zu können.

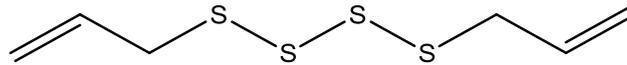


Abbildung 167: Strukturformel von DATTS

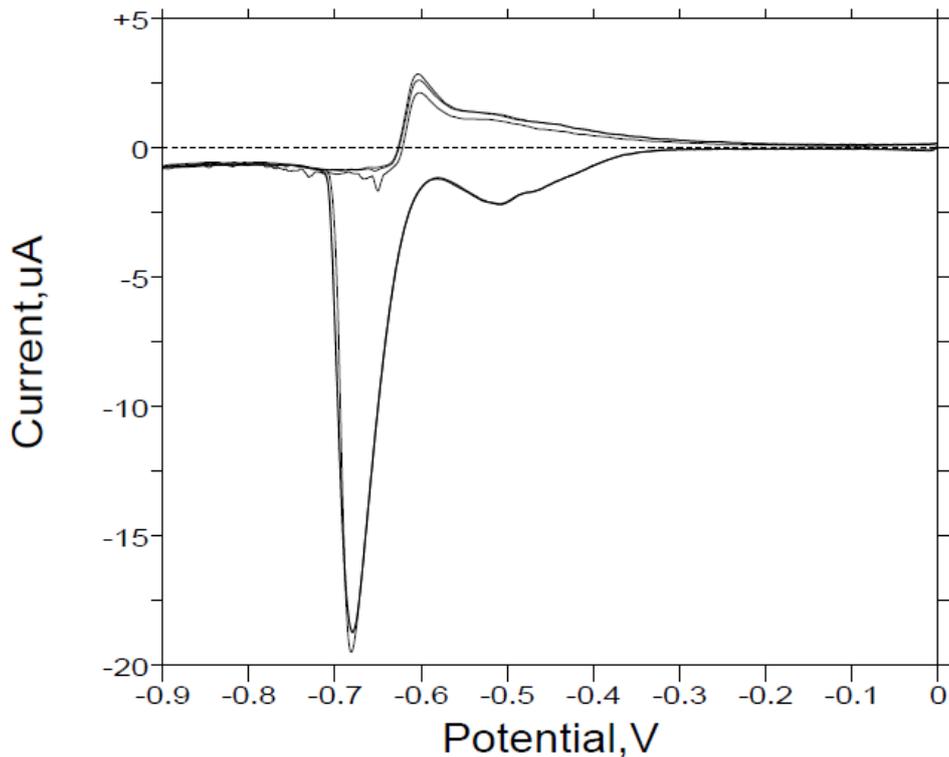


Abbildung 168: CV von DATTS, HMDE als AE, 33 % MeOH, Phosphatpuffer pH 7,4;
 $v = 200 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült

Abbildung 168 zeigt, dass sich die zuvor festgestellten Unterschiede zw. den Schwefelanaloga auch beim Tetrasulfid fortsetzen. Allerdings ist das CV des DATTS recht ähnlich. Auch hier ist ein Oxidationspeak bei -0,60 Volt und ein ausgeprägter Reduktionspeak bei -0,68 zu erkennen. Der Reduktionspeak ist im Vergleich zum Trisulfid nur geringfügig zum negativeren Potential hin verschoben (-0,680 Volt gegenüber -0,657 Volt), was auf eine ähnliche Redox-Chemie der beiden Schwefelverbindungen hindeutet.



Abbildung 169: Redoxverhalten von DATTS

Compound	Cell survival (in %)	E_{pc} (mV)	E_{pa} (mV)	PhSH (10^{-9} ms^{-1})	4-MP (10^{-9} ms^{-1})	NBT (10^{-9} ms^{-1})	
						Without SOD	With SOD
Diallylsulfide (1)	92	–	–	0	0	0.37	0
Diallyldisulfide (2)	80	–590	–463	0	0	1.75	0
Diallyltrisulfide (3)	57	–657	–591	0	0.84	19.74	8.62
Diallyltetrasulfide (4)	36	–680	–603	0	2.81	39.77	11.32
Allicin (5)	34			10.58	17.40	n.d.	n.d.
Mustard oil (6)	35			3.68	5.61	n.d.	n.d.
1,9-decadiene (7)	81	–	–	–	–	–	–

n.d. = not determined.

Abbildung 170: Übersichtstabelle Diallylsulfide, biologische Aktivität wurde an Caco-2-Zellen und im NBT-Assay bestimmt.^[97]

Die in Abbildung 170 aufgeführten Werte zeigen die ganz signifikanten Unterschiede der einzelnen Sulfide (RS_xR , $x=1-4$) auf. Während das Diallylmonosulfid kaum Aktivität in den gewählten Assay besitzt, zeigen die anderen Verbindungen deutliche Unterschiede in ihren Aktivitäten. Je mehr Schwefelatome in der Struktur vorhanden sind, desto höhere Aktivität hat diese. Diese Aussage lässt sich anhand der elektrochemischen Resultate auch sinnvoll erklären.

Generell gilt:

- DAS inaktiv
- DADS redoxaktiv (Disulfid); RSH; Metallbindung (Proteine)
- DATS redoxaktiv, kein Oxidationsmittel, Metallbindung (Proteine)
- DATTS redoxaktiv, kein Oxidationsmittel, Metallbindung (Proteine)

DATS und DATTS können S^{2-} und S_2^{2-} freisetzen.

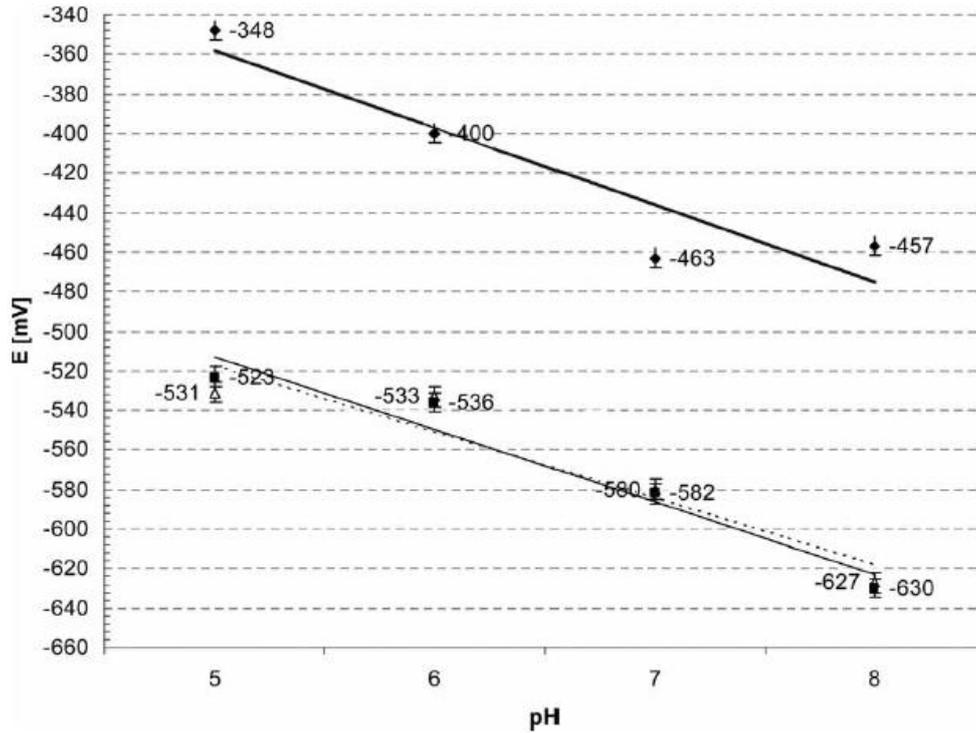


Abbildung 171: Verschiebung der E_{pa} und E_{pc} -Werte der einzelnen Sulfide durch unterschiedliche pH-Werte.^[97]

Die Aufnahme der Redoxpotentiale der verschiedenen Sulfide bei mehreren pH-Werten zwischen pH 5,0 und pH 8,0 ergab eine deutliche Verschiebung der Potentiale unter Einfluss des pH-Wertes. Abbildung 171 gibt dieses Verhalten der einzelnen Redoxpotentiale grafisch wieder.

2.7.2.2 Dipropyl-Analoga des Allicins

Um Nachweisen zu können, ob die verschiedenen biologischen Aktivitäten der Diallyl-Sulfide in unseren Testsystemen auch wirklich nur von der Länge der im Molekül enthaltenen Schwefelkette abhängig sind, und nicht massiv durch die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung beeinflusst werden (wie das in der Literatur sporadisch behauptet wird), wurden von Herrn Anwar Dipropyl-Analoga dieser Verbindungen synthetisiert, die keine endständigen Doppelbindungen enthalten. Eine kurze Diskussion zu den elektrochemischen Resultaten befindet sich am Ende dieses Abschnitts.

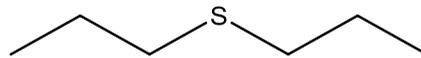


Abbildung 172: Strukturformel von Dipropylmonosulfid

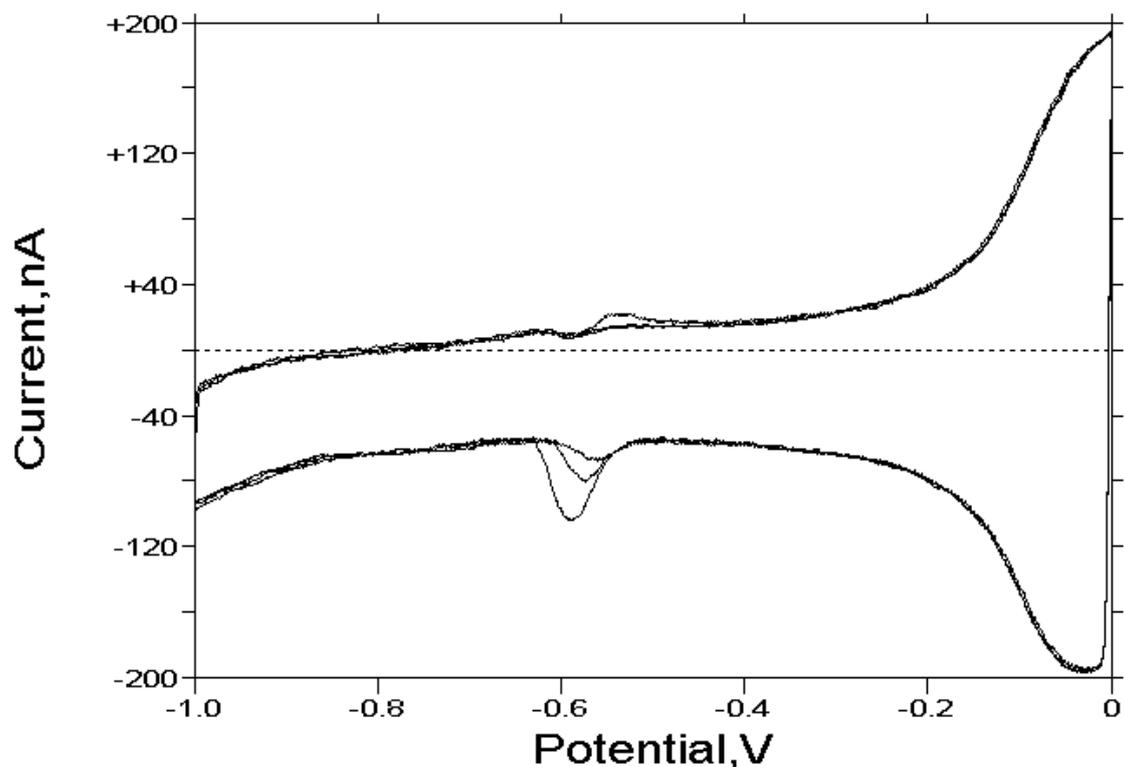


Abbildung 173: CV von Dipropylmonosulfid, HMDE als AE, 33 % MeOH, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 200 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült

Die in Abbildung 173 zu sehenden Redoxsignale sind etwas irreführend. Die Stromskala beträgt in diesem Fall als Einheit Nanoampere, nicht wie zuvor Milliampere. Die Signale besitzen somit eine maximale Höhe von weniger als 40 nA, wodurch sie als vernachlässigbar klein angesehen werden können.

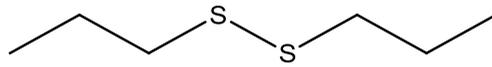


Abbildung 174: Strukturformel von Dipropyldisulfid

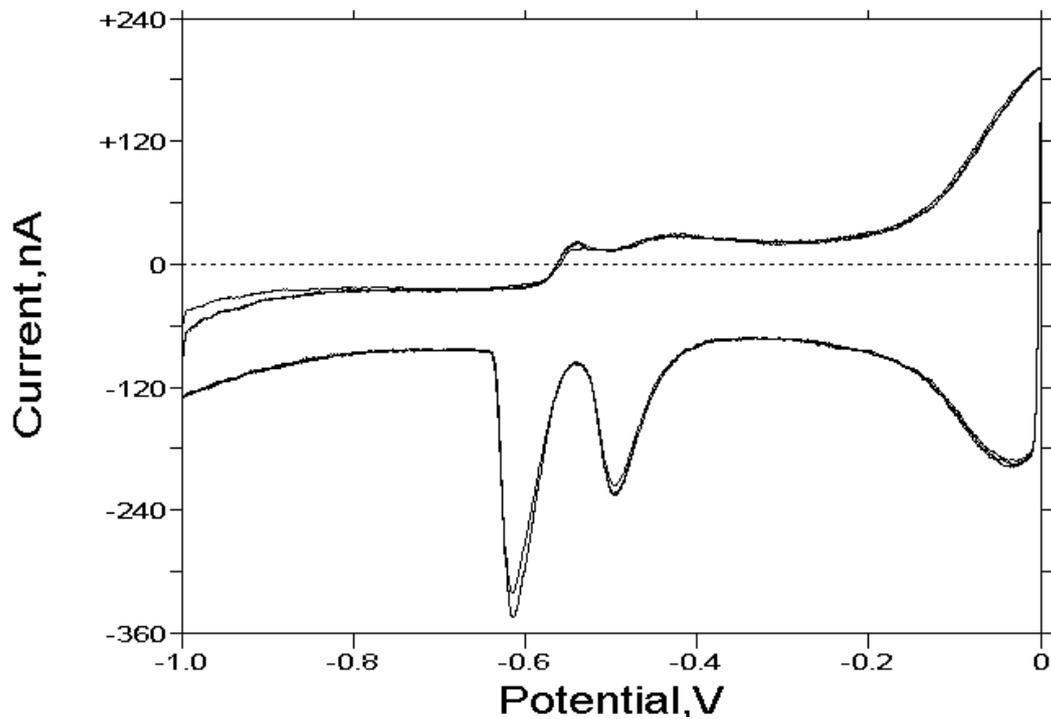


Abbildung 175: CV von Dipropyldisulfid, HMDE als AE, 33 % MeOH, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 200$ mV/s, mit N_2 gespült

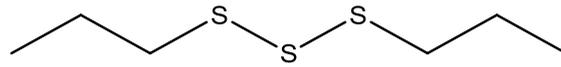


Abbildung 176: Strukturformel von Dipropyltrisulfid

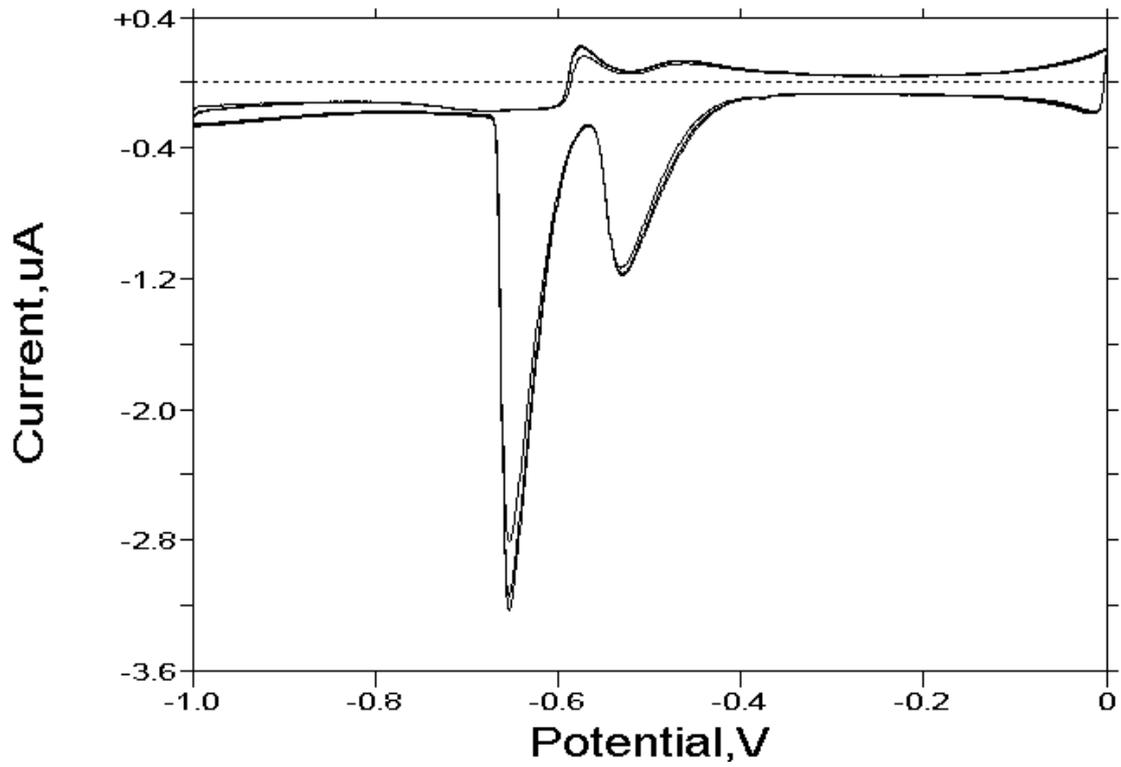


Abbildung 177: CV von Dipropyltrisulfid, HMDE als AE, 33 % MeOH, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 200 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült

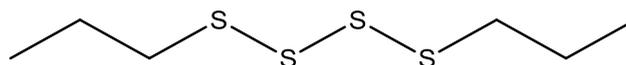


Abbildung 178: Strukturformel von Dipropyltetrasulfid

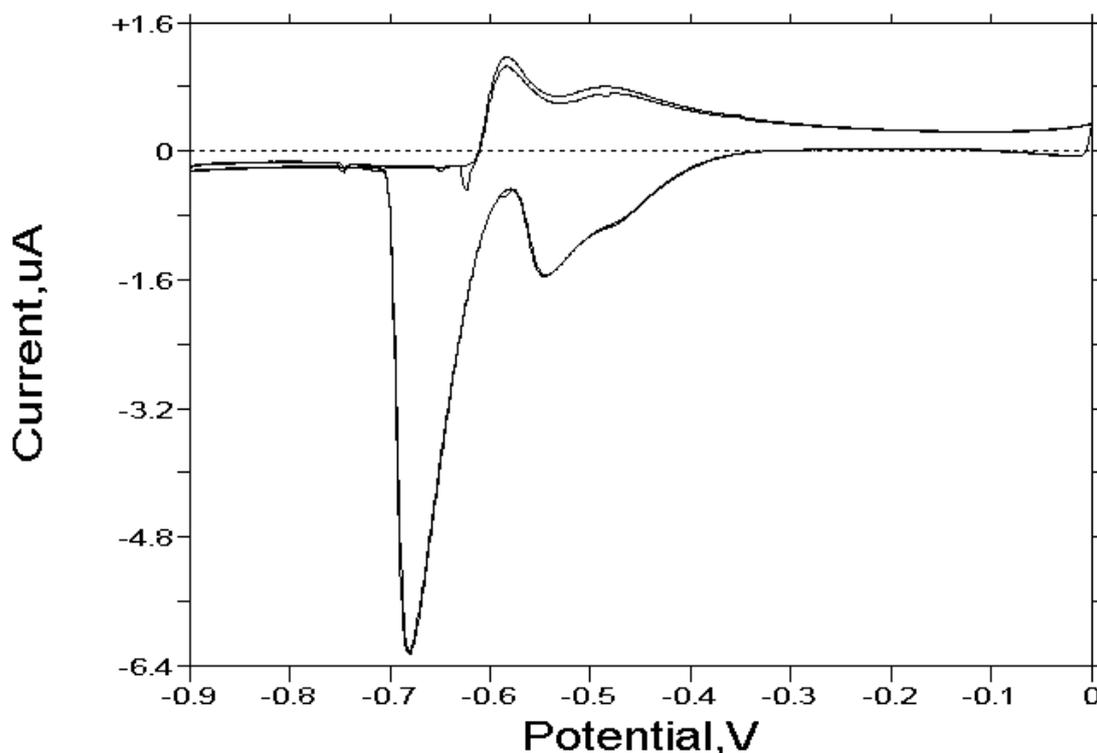


Abbildung 179: CV von Dipropyltetrasulfid, HMDE als AE, 33 % MeOH, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 200 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült

Die Propylanaloga zeigen ähnliche Ergebnisse und wie die Allylanaloga. DAS und Dipropylsulfid besitzen keine nennenswerten Redoxpotentiale. DADS und Dipropyldisulfid zeigen im Voltammogramm jeweils 2 vergleichbare Reduktionssignale und Oxidationssignale. Vergleichbare Signale findet man auch, wenn man die Voltammogramme von DATS und Dipropyltrisulfid miteinander vergleicht. Die starken Reduktionssignale kommen vermutlich durch Adsorptionseffekte an der Quecksilbertropfelektrode zustande. Gleiches lässt sich auch feststellen, wenn man DATTS mit Dipropyltetrasulfid vergleicht. Die Verschiebung der Reduktionspotentiale hin zu negativeren Potentialen fällt hier im Vergleich zu den Allyl-Verbindungen allerdings weniger stark aus. Wie bei den elektrochemischen Potentialen konnte auch bei der biologischen Aktivität eine Abhängigkeit von den beiden endständigen

Doppelbindungen nicht nachgewiesen werden. Die biologische Aktivität lässt sich somit, genau wie die elektrochemischen Resultate, auf das Vorhandensein der Schwefelatome und deren Kettenlänge zurückführen. Je länger die S-S-Kette ist, desto höher ist die biologische Aktivität, wobei es zwischen Monosulfid und Disulfid, sowie zwischen Disulfid und Tetrasulfid zu einer qualitativen Änderung im chemischen Reaktionsvermögen kommt.

Leider lagen zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch keine Daten über die Penta- und Hexasulfide vor, sodass diese hier nicht aufgeführt worden sind. Eine Untersuchung dieser Verbindungen sollte aber zeigen, ob diese eine noch höhere Aktivität besitzen, als es etwa beim Tetrasulfid der Fall ist, oder ob die Aktivität ein Plateau erreicht oder sogar wieder zurückgeht.

Anscheinend sind die längerkettigen Polysulfide (Penta-, Hexasulfid) in wässriger Lösung nicht sonderlich stabil, sodass aufgrund der *chemischen Stabilität* (und nicht der Reaktivität) beim Tetrasulfid ein Aktivitätsmaximum erreicht zu sein scheint.

Name	Formula	Sulfur oxidation state (R = + 1)	Occurrence (in Nature)	Reactivity	Hydrogen sulfide release
Monosulfide	RSR	-2	dialkyl sulfides, diallyl sulfides, cystathionine, SAC	form sulfoxides, sulfones, cleaved by C-S lyases	postulated for SAC, possibly catalyzed by C-S lyases
Disulfide	RSSR	-1	Dialkyl disulfides, DADS, cystine	thiol/disulfide exchange, cleavage at α - and/or olefinic carbon	possible when attacked by nucleophile at α - and/or olefinic carbon
Trisulfide	RSSSR	-1, 0, -1	DATS, calicheamicin γ 1	exchange reactions, C-S bond cleavage	via RSSH and possibly via RSSSH
Tetrasulfide	RSSSSR	-1, 0, 0, -1	DATTS	exchange reactions, C-S-bond cleavage	via RSSH and possibly via S_2^{2-} , RSSSH, RSSSSH
Pentasulfide	RSSSSSR	-1, 0, 0, 0, -1	varacin	mostly exchange reactions, release of RS_xH , S_x , S_x^{2-}	via full reduction of sulfur-sulfur chain
Polysulfide	RS_xR ($x \geq 3$)	$-1, 0_{(x-2)}, -1$	In aged/heated garlic, onions	mostly exchange reactions, release of RS_xH , S_x , S_x^{2-}	via full reduction of sulfur-sulfur chain
Thiol	RSH	-2	allyl mercaptan, cysteine, GSH	reducing, metal binding	possibly via C-S bond cleavage, indirectly via RSSH or RSSR
Perthiol	RSSH	-1	allyl perthiol, thiocysteine	formed by reduction of RS_xR , reaction of RSH with sulfur	release of S^{2-} in presence of GSH, strongly reducing, forms O_2^{*-} (In presence of dioxygen, metal ions)
Hydro-poly-sulfide	RS_xH ($x \geq 3$)	$-1, 0_{(x-2)}, -1$	allyl hydrosulfides	formed by reduction of RS_xR , reaction of RSH with sulfur	release of S^{2-} , S_x^{2-} in presence of GSH, strongly reducing, forms O_2^{*-} (In presence of dioxygen, metal ions)
Sulfide anion	S^{2-}	-2	metal/sulfur clusters, H_2S , HS^-	release from metal/sulfur clusters at low pH, various chemical, enzymatic formation pathways	protonation to HS^- and H_2S
Polysulfide anion	S_x^{2-} ($x \geq 2$)	$-1, 0_{(x-2)}, -1$	possibly released from polysulfides	released from RS_xR by reduction, e. g., in presence of GSH	releases S^{2-} when reduced, e. g., by GSH

Abbildung 180: Überblick über natürlich vorkommende Reaktive-Schwefel-Spezies (RSS), ihre Oxidationszahlen, ihr Vorkommen, und ihre Reaktivität.^[97]

3. Experimenteller Teil

3.1 Allgemeiner Aufbau der elektrochemischen Messanordnung

Die Hauptbestandteile für die von mir verwendeten voltammetrischen und polarographischen Messanordnungen bilden die beiden Zell-Stände C3 (Voltammetrie) und CGME (Controlled Growth Mercury Electrode, Polarographie) der Firma BAS (Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, IN, USA). Beide Geräte zeichnen sich durch ihren einfachen und daher wartungsarmen und wenig stör anfälligen Aufbau aus. Neben den Anschlüssen für die Elektroden besitzen beide Geräte einen kleinen Magnetprüher, auf den die ProbengefäÙe platziert werden können, sowie eine kleine Abdeckung um die Reaktionsräume gegen Störungen von Außen abzuschirmen. Gerührt wird die Probelösung mithilfe eines kleinen, handelsüblichen Magnetprührstübchens und einer am Gerät befestigten Magnetprührplatte, die über einen Regler direkt über das Gerät bedient wird.

Als Potentiostat wird am C3-Stand ein BAS 100B/W Electrochemical Analyzer verwendet. Der CGME-Stand ist mit einem Potentiostaten des Typs CV-50W Voltammetric Analyzer ausgerüstet. Beides Geräte stammen ebenfalls von der Firma BAS.

Die Messzelle besteht aus einem GlasgefäÙ, welches ein Volumen von ca. 25 ml besitzt. Als Abdeckung fungiert eine Teflonplatte mit unterschiedlich großen Bohrungen, durch die die drei Elektroden sowie zwei Gaseinleitungsschläuche (zum Spülen der Reaktionslösung mit Gasen, Verdrängung der Luft) geschoben werden können. Die Abdeckung schließt das ReaktionsgefäÙ am Rande luftdicht ab.

Ein zu großer Überdruck, der durch die eingeleiteten Gase entstehen könnte, wird durch die mit den Elektroden versehenen, nicht ganz dicht verschlossenen Bohrungen, verhindert. Die Elektroden sitzen in den dafür vorgesehenen Bohrungen und werden mit kleinen Gummiringen auf der Oberfläche des Teflondeckels in der gewünschten Eintauchtiefe zur Probelösung innerhalb des Glasgefäßes gehalten. Beide Zell-Stände sind mit Gaseinleitungsschläuchen versehen, mit deren Hilfe die Probelösungen mit hochreinem Gas (z. B. Stickstoff (4.6, entspricht 99,996%) oder Sauerstoff (2.5, entspricht 99,5 %) gespült werden können. Dies ist notwendig, um z. B. störende Sauerstoffsignale in den CVs zu vermeiden oder die Probelösung mit Sauerstoff anzureichern.

Diese Anordnung ermöglicht ferner einen stets gleichbleibenden Abstand zwischen den Elektroden, wodurch eine hohe Reproduzierbarkeit der Messungen gewährleistet wird.

Als Arbeitselektrode kommen am C3-Zellstand Elektroden von BAS, sowie Graphitstäbe und Metallstücke aus der Dialyseapparatur zum Einsatz. Bei den Elektroden des Herstellers handelt es sich um die Glaskohlenstoffelektrode und den Edelmetall-Elektroden aus Gold, Silber und Platin (Art. Nr. s. Abschnitt 7). Der CGME-Cell-Stand besitzt bereits eine integrierte Quecksilberelektrode als AE. Während der Experimente zur Erzeugung der ROS und der Zerstörung der Proteine kamen Silber/Silberchlorid Elektroden, gefüllt mit 3 M KCl Lösung, als Referenzelektrode zum Einsatz. Die Aufnahme der CVs mit unterschiedlichen AE-Materialien erfolgte wahlweise mit einer Silber/Silberchlorid oder einer Kalomelelektrode (Hg/Hg₂Cl₂-Elektrode). Als Gegenelektrode wurde standardmäßig eine Platinspirale oder eine gerade Platindrahtelektrode eingesetzt. Nur in wenigen Ausnahmefällen wurde Glaskohlenstoff als GE verwendet.

Als Steuer- und Analysesoftware wurde die dem jeweiligen Potentiostaten beiliegende Standardsoftware BAS 100W oder BAS 50W (Version 2.3) verwendet.

Nähere Angaben und die Artikelnummern zu den Elektroden und den weiteren Gerätschaften finden sich unter Abschnitt 7. Auflistung der verwendeten Geräte und Chemikalien“.

3.2 Verwendete elektrochemische Methoden

3.2.1 Zyklovoltammetrie (Cyclic Voltammetry, CV)

Ein wesentlicher Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit dem Einsatz der Zyklovoltammetrie. Diese elektrochemische Methode wurde zur Analyse von Redoxpotentialen, zur Erzeugung von Sauerstoffradikalen und der Ermittlung der idealen Spannung zur Herstellung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verwendet. Normalerweise versucht man, bei Einsatz von voltammetrischen Methoden die Bildung von ROS auszuschließen, in dem man die Probelösung erst mehrere Minuten mit trockenem Stickstoff spült und dadurch den in Wasser gelösten Sauerstoff aus der Probe entfernt. Ziel dieser Arbeit ist es jedoch, mithilfe der intermediär gebildeten ROS (verstärkt durch Zugabe von Sauerstoff zur wässrigen Probelösung) die in der Dialyse vorkommenden Verunreinigungen (wie z. B. Blutreste, Biofilme, Proteine) zu beseitigen.

Die CV wird auch als Dreieckspannungsmethode bezeichnet, welches sich auf die Vorgabe eines dreieckförmigen Potential-Zeit-Verlaufs an der AE und der Registrierung des resultierenden Strom-Potential-Diagramms („Dreieckspannungsdiagramm“) bezieht.^[28]

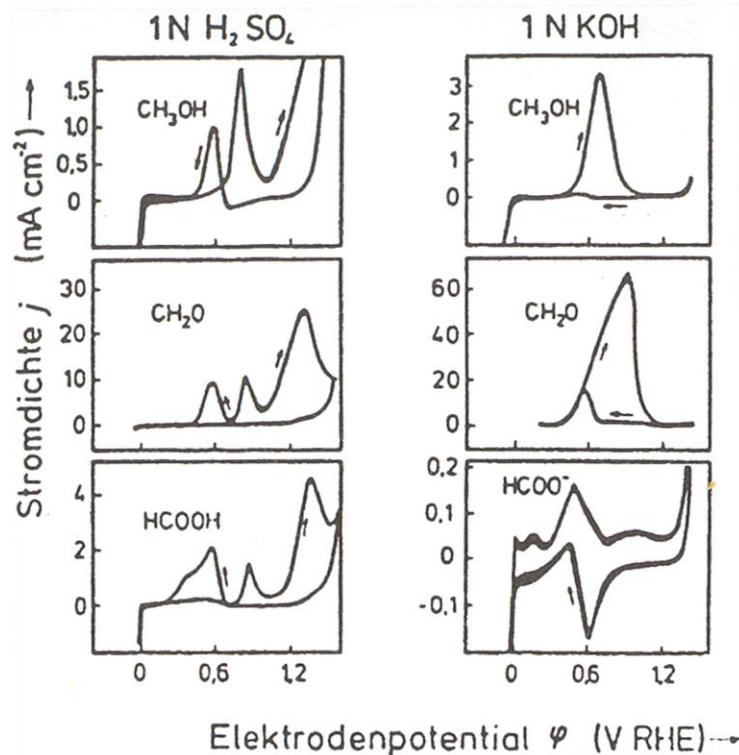


Abbildung 181: Dreieckspannungsdiagramme von MeOH, Formaldehyd und Ameisensäure (alle 1 M) an Platin in 1 N H₂SO₄ bzw. 1 N KOH, 20 °C, entlüftete Lösung, $v = 50$ mV/s.^[28]

In wässrigen Systemen lässt man vor der Aufnahme von CVs das Potential der AE in der Regel zwischen dem Potential der Wasserstoffentwicklung und dem Potential der Sauerstoffentwicklung hin und her laufen. Dadurch wird die AE von adsorbierten Verunreinigungen aus der Lösung gereinigt (durch Blasenbildung direkt an der Elektrodenoberfläche). Als Leitsalz zur Verminderung des elektrischen Widerstands von Wasser wird häufig NaCl oder KCl verwendet.

Die hier vorliegende Versuchsanordnung basiert aber hauptsächlich auf der Verwendung von Natriumbicarbonat (NaHCO₃), welches von der Firma Fresenius zu Dialysezwecken eingesetzt wird, oder einer Pufferlösung aus Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) und Di-Kaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄) bei pH 6,0 bzw. 7,4, um die Entstehung von reaktiven Chlorverbindungen (aus NaCl oder KCl) während der CV zu vermeiden ($E^0(\text{Cl}^-/\text{Cl}_2) = 1,36$ Volt; $E^0(\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2) = 1,24$ Volt; pH=0).

Wichtige Parameter in der CV sind neben den Anfangs- und Endpunkten (z. B. Zersetzungspunkte des Wassers) auch die anodischen und kathodischen Peakpotentiale (Stellen, an denen Stromspitzen auftauchen) sowie der anodische bzw. kathodische Maximalstrom. Reversible Systeme zeichnen sich dadurch aus, dass bei ihnen die kathodischen und anodischen Peakströme annähernd gleich groß sind und dass die Differenz der Peakpotentiale nicht größer ist als $0,0592 \text{ V}/n$ ($59 \text{ mV}/n$), wobei n die Anzahl der übertragenen Elektronen ist.^[27]

Irreversible Reaktionen zeigen oft nur ein Oxidations- oder Reduktionssignal. Dabei wird die vorliegende Substanz oxidiert oder reduziert, ohne dass das dadurch gebildete Reaktionsprodukt zurück oxidiert, bzw. reduziert werden kann. Als gutes Beispiel dient hierfür das Signal des Selen aus Abbildung 129. Selen wird hier oxidiert, jedoch erfolgt keine erneute Reduktion der oxidierten Form.

Zur Aufnahme von CVs kommen hauptsächlich AEs aus reinem Edelmetall (wie z. B. Gold, Silber oder Platin) oder aus Glaskohlenstoff (glassy carbon) zum Einsatz. Dabei wird das Elektrodenmaterial von einem Plastikmantel umschlossen, um eine möglichst kleine und definierte Elektrodenoberfläche zu gewährleisten und den Rest der Elektrode elektrisch zu isolieren. Die GE sollte normalerweise aus dem gleichen Material bestehen, wie die AE, damit Wechselwirkungen zwischen den beiden Elektroden, wie z. B. Abscheidung von Gold aus der Gold-AE auf einer Platin-GE (auch Ag^+ an der Au-Elektrode), ausgeschlossen werden können.

Als RE verwendet man häufig eine Kalomelelektrode ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}$) oder eine Silber-Silberchloridelektrode (Ag/AgCl). Die Standardwasserstoffelektrode (elementarer Wasserstoff auf einer platinieren Platinelektrode) findet heutzutage kaum noch Anwendung, da der experimentelle Aufwand dafür viel zu groß ist und sich die Elektrode schlecht handhaben lässt.

Die Wahl der AE ist entscheidend für den gesamten Versuchsaufbau, da verschiedene Elektroden-Materialien in der elektrochemischen Zelle unterschiedlich mit den zu untersuchenden Substanzen oder dem verwendeten Medium reagieren können.

Beispielsweise findet die Wasserstoff- bzw. Sauerstoffentwicklung im wässrigen Medium an verschiedenen Elektroden bei unterschiedlichen Potentialen statt. Auch der Aufbau einer elektrolytischen Doppelschicht wird maßgeblich durch das Elektrodenmaterial beeinflusst. Vor allem aber bestimmt die Wahl der Elektrode auch die Adsorptionsprozesse und erlaubt den Zugang zu gewissen Redox-Reaktionen (RSH/RSSR an Hg).

Die Vorteile von Glaskohlenstoff sind, dass es glasartige keramische Eigenschaften (z. B. Biokompatibilität, sehr gute Korrosionsbeständigkeit, Gas- und Flüssigkeitsdichtigkeit, hohe Oberflächengüte, hohe Härte) mit denen des Graphits (z. B. gute elektrische Leitfähigkeit) vereint. Damit lässt sich Glaskohlenstoff auch im medizinischen Bereich, z. B. als Material innerhalb einer Dialyseapparatur, ohne größere Probleme verwenden.

Die Vorteile der Quecksilberelektrode liegen vor allem in der hohen Überspannung des Quecksilbers gegenüber Wasserstoff, die die Abscheidung von z. B. Cadmium oder Zink aus saurer Lösung an der Quecksilberelektrode ermöglicht, der permanenten Neubildung der Elektrodenoberfläche, und der augenblicklichen Ausbildung reproduzierbarer Durchschnittsströme bei jeder angelegten Spannung, gleich ob man sich dieser Spannung von höheren oder tieferen Werten nähert. Ein großer Nachteil besteht in der sehr leichten Oxidierbarkeit des Quecksilbers, die ihre Verwendung als Anode stark einschränkt. Bereits bei Spannungen ab +0,4 Volt bildet sich Hg(I). Das dadurch erzeugte Signal im Polarogramm überdeckt die Signale der vorhandenen anderen oxidierbaren Substanzen. Ein weiterer Nachteil der Quecksilberelektrode ist der nichtfaradayische Ladestrom, durch den die Empfindlichkeit auf etwa 10^{-5} M begrenzt wird. Auch lässt sich eine Quecksilbertropfelektrode deutlich schlechter handhaben (Verstopfung der Kapillare; Reproduzierbarkeit der Tropfengröße, erhöhte Unfall- und Vergiftungsgefahr, etc.), als eine Feststoffelektrode.

Vor jeder neuen Messreihe müssen die Elektroden gereinigt werden. Auch hier zeigt sich der Vorteil von Glaskohlenstoff gegenüber den Edelmetallelektroden. Die Reinigung erfolgt durch vorsichtiges Reiben der Glaskohlenstoff-Oberfläche auf einem angefeuchteten weichen Tuch, das mit Aluminiumoxid-Pulver mit definierter Porengröße (zw. 5 und 10 μm) versehen ist. Danach wird die Elektrode mit Milli-Q-Wasser abgespült und im Ultraschallbad von den überschüssigen Aluminiumoxid-Partikeln, die sich an der Elektrodenoberfläche bzw. zwischen Elektrodenmaterial und Plastikmantel ansammeln können, befreit. Die Reinigung von Edelmetallelektroden erfolgt normalerweise in mehreren Arbeitsschritten durch die Verwendung von Diamantpartikeln mit unterschiedlichen Korngrößen (1 bis 10 μm). Diese Partikel sind deutlich teurer als das für die Glaskohlenstoffelektrode verwendete Aluminiumpulver.

3.2.2 Differentielle Pulspolarographie und Pulsvoltammetrie (DPP, Differential-Puls-Polarography)

Die Differential-Puls-Polarographie (DPP) ist eine Kombination aus Gleichstrompolarographie und Pulspolarographie. Hierbei wird ein periodischer Impuls von ca. 50 bis 80 mV Stärke am Ende der Lebensdauer eines Quecksilbertropfens zusätzlich zu einer Treppenspannung angelegt. Die Stromstärkemessung wird einmal kurz vor dem Impuls (I_1) und einmal kurz nach dem Impuls (I_2) gemessen. Die Stromstärkedifferenz pro Impuls ($I_2 - I_1$) wird dann als Funktion der linear ansteigenden Spannung aufgetragen.

Daraus resultiert eine differentielle Kurve, deren Stromspitzen (Peaks) proportional zur Konzentration der untersuchten Substanzen sind.

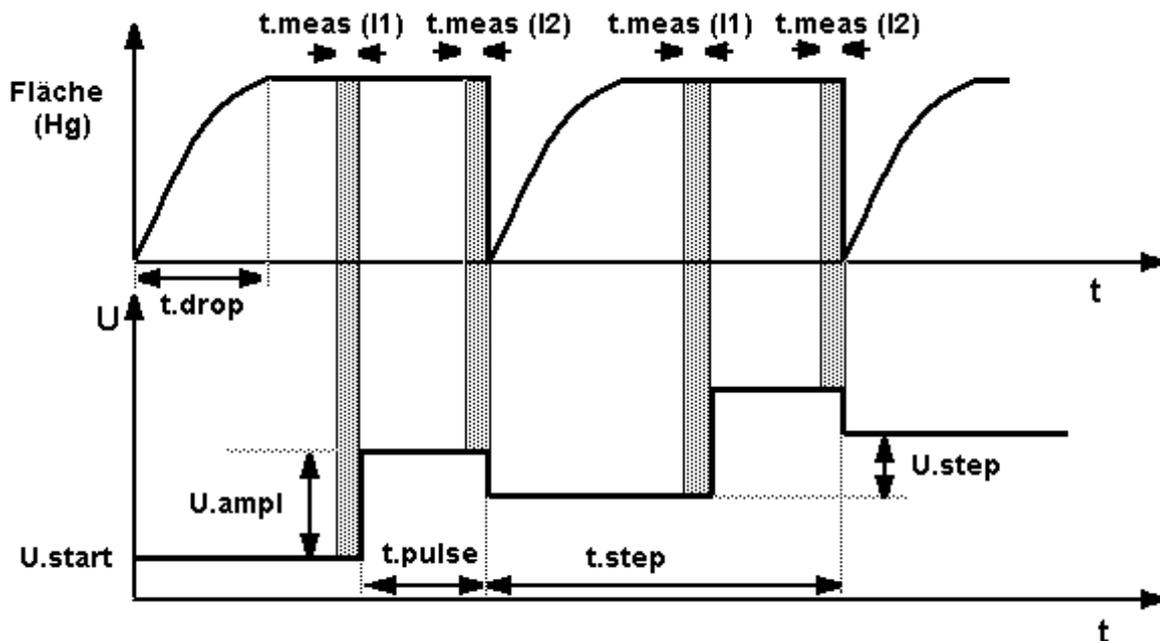


Abbildung 182: Diagramm DPP; Anlage einer Treppenspannung und Aufnahme der Stromstärke

Vorteile dieser Technik sind die deutlich geringeren Nachweisgrenzen (um zwei bis drei Größenordnungen größer als bei der klassischen Polarographie) und die höhere Auflösung der einzelnen Peaks, die bei dieser Methode bei ca. 0,04 bis 0,05 V liegt, in der klassischen Polarographie sind es ca. 0,2 V beträgt. Außerdem lassen sich mit dieser Methode gleichermaßen reversible und irreversible Systeme bestimmen.

Mithilfe dieser Methode wurden Naturprodukte analysiert, die in unserer Arbeitsgruppe von Herrn Hamdoon Mohammed und Herrn Saad Shaaban synthetisiert worden sind. Dadurch die einzelnen Signale (elektrochemischen Potentiale) der Naturprodukte deutlich voneinander getrennt dargestellt werden, was durch die Verwendung der CV nicht möglich war.

Detaillierte Ergebnisse zu diesen Messungen und Versuchsreihen sind in der Dissertationsschrift von Herrn Hamdoon Mohammed und in der Diplomschrift von Frau Elena Schumann zu finden.

3.2.3 Time Based Techniques (TB)

Unter dem Begriff „Time Based Techniques“ versteht man das Konstanthalten der Spannung über einen definierten Zeitraum. Dabei wird der Stromverlauf gegen die Zeit aufgetragen. Diese Technik wurde vor allem für die elektrochemische Zerstörung von Proteinlösungen verwendet. Dabei wurde das Potential so gewählt, dass die Erzeugung von ROS dabei maximal wird, aber zugleich das Wasser (noch) nicht zersetzt wird. Die Ermittlung dieses Potentials erfolgte durch experimentelle Bestimmung mithilfe der CV anhand von mit Sauerstoff angereichertem Wasser (durch Spülen mit reinem Sauerstoff).

Die Durchführung erfolgt ebenfalls mithilfe der Dreielektroden-Schaltung unter Verwendung eines Graphitstabes (größere Oberfläche als die Glaskohlenstoffelektrode) und einer kontinuierlichen Sauerstoffzufuhr unter ständigem Rühren der Probe-lösung. Als Leitsalze wurden hierbei sowohl Natriumbicarbonat als auch NaCl und der in den vorherigen Abschnitten verwendete Phosphatpuffer eingesetzt, um die Zerstörung des Proteins unabhängig zum verwendeten Elektrolyten aufzeigen zu können.

Je nach Dauer der Experimente bzw. der Höhe der angelegten Spannung wurden für die einzelnen Versuchsreihen entweder mit dem BAS-Potentiostaten oder dem Netzgerät EA-4003 durchgeführt.

3.3 UV/Vis-Spektrophotometrie

Historisch gesehen entspringt der Begriff der Spektrophotometrie einem Zweig der Naturwissenschaften, der sich vor allem mit Licht, bzw. mit sichtbarer elektromagnetischer Strahlung befasste. Wird Licht in seine einzelnen Wellenlängenkomponenten zerlegt, so erhält man Bereiche unterschiedlicher Energie, die sich zu unterschiedlichen Zwecken einsetzen lassen.

Wurde zu Anfang der Begriff Spektrophotometrie nur bei der Anwendung von sichtbarem Licht gebraucht, so fand er doch auch schon bald Verwendung bei Untersuchungen mit anderen Arten von elektromagnetischer Strahlung, wie z. B. Röntgenstrahlen.

Heutzutage wird der Ausdruck Spektrometrie auch auf die Untersuchung von Strahlungsarten anderen Typs angewandt, so z. B. auch auf Ionen (Massenspektrometrie), Elektronen (Elektronenspektrometrie) und Schallwellen (akustische Spektrometrie).

Die UV/Vis-Spektrophotometrie macht sich die speziellen Eigenschaften elektromagnetischer Strahlung im Bereich des ultravioletten und sichtbaren Lichtes (180 - 780 nm) zunutze. Am einfachsten lässt sich die elektromagnetische Strahlung in Form von elektrischen und magnetischen Feldern darstellen, welche in Phase Sinusschwingungen im rechten Winkel zueinander und relativ zur Ausbreitungsrichtung durchführen. Elektromagnetische Strahlung wird in optischen Geräten nur linear polarisiert eingesetzt, d. h. alle Schwingungen des elektrischen und magnetischen Feldes liegen in einer Ebene (s. Abbildung 183). Für die meisten Anwendungen reicht es aus, sich auf die elektrische Komponente zu konzentrieren, da das elektrische Feld für die meisten Phänomene verantwortlich ist, die in der Spektrometrie untersucht werden, wie etwa Transmission, Reflexion, Brechung und Absorption.

Die Kernresonanzspektrometrie (NMR-Spektrometrie) macht sich jedoch die magnetische Komponente der elektromagnetischen Strahlung zunutze, um die Absorption von Hochfrequenzwellen (4 MHz bis ca. 600 MHz) zu ermöglichen.^[27]

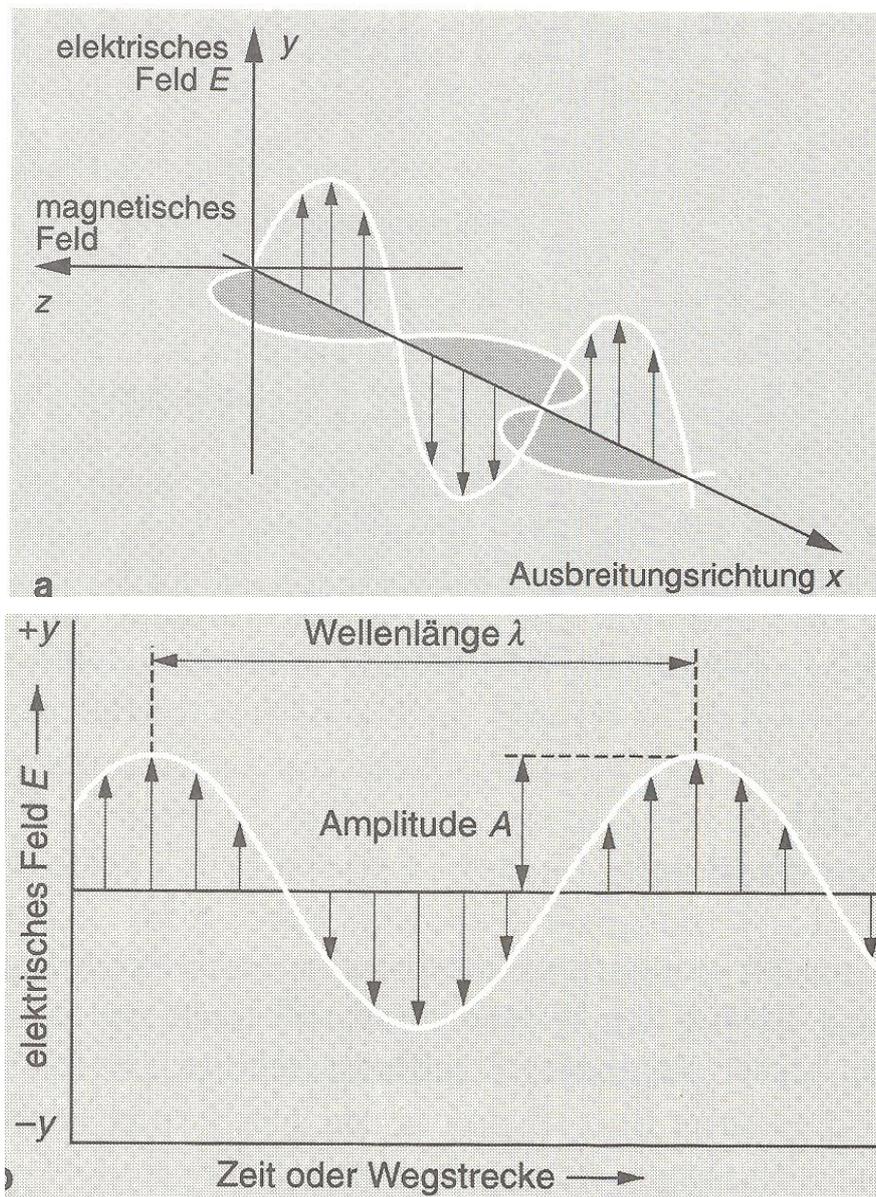


Abbildung 183: Darstellung eines monofrequenten, linear polarisierten Strahls^[27]

Durchdringt elektromagnetische Strahlung eine Festkörper-, Flüssigkeits- oder Gas-schicht, so können bestimmte Frequenzen selektiv durch Absorption herausgefiltert werden, wodurch dann die Energie der elektromagnetischen Strahlung auf die Atome, Ionen oder Moleküle der Probe übergeht. Dadurch werden die Probeteilchen von ihrem Grundzustand in einen angeregten Zustand versetzt. Damit dies jedoch geschehen kann, muss die Energie der anregenden Photonen nach der Quanten-theorie exakt der Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand der absorbierenden Spezies entsprechen.

Da diese Energieunterschiede für jede chemische Spezies (Atom, Molekül) eindeutige Werte besitzen, ermöglicht die Untersuchung der Frequenzen (und damit des Energiegehaltes) der absorbierten elektromagnetischen Strahlung eine eindeutige Charakterisierung der Komponenten einer Materialprobe.

Die in der UV/Vis-Spektrophotometrie verwendeten Wellenlängen zw. 180 und 780 nm (bzw. in dieser Arbeit verwendete Wellenlängen von 190 bis 1100 nm) besitzen gerade noch genügend Energie, um Übergänge der Valenzelektronen (Bindungselektronen) zu ermöglichen. Dies führt dazu, dass Atomabsorptionsspektren oft aus einer Reihe scharfer, gut definierter Linien bestehen. Absorptionsspektren von Molekülen sind, besonders im kondensierten Zustand, wesentlich komplexer als atomare Spektren. Dies lässt sich vor allem damit erklären, dass die Zahl der Energiezustände im Molekül deutlich höher liegt, als in einzelnen Atomen. In Molekülen spielen nicht nur die Elektronenenergien, sondern auch die Schwingungsenergien und Rotationsenergien der Moleküle eine bedeutende Rolle, sodass Molekülabsorptionsspektren im Bereich des ultravioletten und sichtbaren Lichtes durch Absorptionsregionen charakterisiert sind, die oft einen größeren Wellenlängenbereich umfassen (Absorptionsbanden).

UV/Vis-spektrophotometrische Untersuchungen basieren auf dem Lambert-Beerschen Gesetz, welches die Schwächung der elektromagnetischen Strahlung beim Durchgang durch absorbierende Materie in Abhängigkeit von Schichtdicke und Konzentration des absorbierenden Stoffes beschreibt.

$$E_{\lambda} = -\lg\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

Hierbei beschreibt E_{λ} die Extinktion (optische Dichte) der Lösung, I_1 die Intensität des transmittierten Lichtes, I_0 die Intensität des eingestrahlteten Lichtes, ϵ_{λ} den dekadischen molaren Extinktionskoeffizienten, c die Konzentration der absorbierten Substanz und d die Schichtdicke des durchstrahlten Körpers.

Das Lambert-Beersche Gesetz gilt nur für monochromatische Strahlung und verdünnte Lösungen.

Alle in dieser Arbeit vorgestellten UV/Vis-Messungen wurden an dem Gerät Cary UV 50 Bio von der Firma Varian Inc. aufgenommen. Abbildung 184 zeigt ein solches Spektrometer. Die Aufnahme und Auswertung der Spektren erfolgte über die Software WinUV 3, die bereits mit dem Gerät installiert war.



Abbildung 184: Varian Cary 50 UV-Vis^[98]

Alle Messungen wurden in einer hochwertigen Quarzküvette (Hellma Typ 104-QS) durchgeführt, um ein optimales Ergebnis zu erhalten. Alle messrelevanten Bedingungen, wie z. B. das Volumen und die Temperatur der Lösungen, wurden möglichst konstant gehalten. Um eine fehlerhafte Messung durch das Absetzen der gelösten Proteine an der Glaswand der Quarzküvette so gut wie möglich zu vermeiden, wurden die Proben direkt nach Einfüllen in die Küvette vermessen. Alle weiteren Vergleichsmessungen wurden mit speziell hierfür frisch hergestellten Proben durchgeführt.

Die Reinigung der Quarzküvetten erfolgte nach jeder durchgeführten Messung mit Milli-Q Wasser und reinem Ethanol. Zusätzlich wurde vor jeder Messung auch eine Blindmessung nur mit Wasser durchgeführt, um die Küvette zu überprüfen.

3.4 SDS-PAGE

Der Begriff SDS-PAGE leitet sich aus dem Englischen von „sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis“ ab. Es handelt sich dabei um ein physikalisches Analyseverfahren, der sogenannten Elektrophorese, welches sich die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld zunutze macht. Die Teilchen können dabei in gelöster (molekulardisperser) oder kolloiddisperser Form vorliegen. Aufgrund der Art und Anzahl der vorhandenen Ladungen sowie der Größe bzw. der Masse der Teilchen werden diese mithilfe einer Trennmatrix aufgetrennt.

Auf die Teilchen wirken während der Elektrophorese verschiedene Kräfte ein: eine beschleunigte Kraft F_e , die auf die Ladung q des Teilchens wirkt, und eine Reibungskraft F_r , die bremsend wirkt:

$$F_e = q \cdot \vec{E} \text{ mit } q = z \cdot e$$

$$F_r = f_c \cdot v$$

Wobei \vec{E} die elektrische Feldstärke, v die Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens, z die Anzahl der Ladungen, e die Elementarladung ($e = 1,602\,176\,48710^{-19}$ C) und f_c der Reibungskoeffizient ist. Der Reibungskoeffizient ist abhängig von der Viskosität des Trägermaterials und von dessen Porengröße. Beides lässt sich durch die chemische Zusammensetzung der Trennmatrix (des Gels) variieren.

Dadurch, dass beide Kräfte im Gleichgewicht liegen, bewegt sich das Teilchen mit einer konstanten Geschwindigkeit im elektrischen Feld:

$$F_e = F_r$$

$$q \cdot \vec{E} = f_c \cdot v$$

$$\Rightarrow v = \frac{q \cdot \vec{E}}{f_c} = u \cdot \vec{E}$$

Der Proportionalitätsfaktor zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Feldstärke ist die substanzspezifische Größe u , die Mobilität.

Diese Größe bestimmt die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld und ist damit entscheidend für die Trennleistung des Trägermaterials. Sie wird durch die Größe des Teilchens, seiner Ladung, der Feldstärke und der Viskosität des Gels beeinflusst.^[99]

Als Trägermaterial wird ein Gel verwendet, welches sich aus Acrylamid und *N,N'*-Methylenbisacrylamid zusammensetzt. Die Vorteile dieser Zusammensetzung liegen in der chemischen Stabilität (inert) und der leichten Herstellung bzw. Handhabung der Gele.

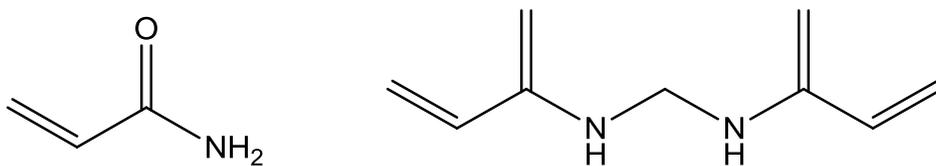


Abbildung 185: Struktur von Acrylamid (links) und *N,N'*-Methylenbisacrylamid (rechts)

Durch Variation der Mischungsverhältnisse kann man unterschiedlich dichte Gele herstellen und dadurch unterschiedliche Trennleistungen erhalten. Je nach Bedarf kann so ein speziell zusammengesetztes Gel für jede Aufgabenstellung generiert werden. Diese Eigenschaften werden auch verwendet, in dem man zwei verschieden dichte Gele auf einer Platte erzeugt. Es handelt sich dabei um ein Sammelgel, das weniger dicht ist und dazu dient, die Probe aufzunehmen und in einem kleinen Abschnitt des Geles, einer sogenannten Tasche, zu sammeln. Das sich anschließende Trenngel ist deutlich dichter als das Sammelgel und soll die einzelnen Inhaltsstoffe der Probe auftrennen und so die Analytik der einzelnen Probenbestandteile ermöglichen.

Die Struktur des Geles wird durch die Vernetzung des Acrylamides zu Polyacrylamid und durch die weitere Quervernetzung mit *N,N'*-Methylenbisacrylamid gebildet. Die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid wird durch Ammoniumpersulfat (APS), einem Radikalbildner und *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (TEMED), eingeleitet:

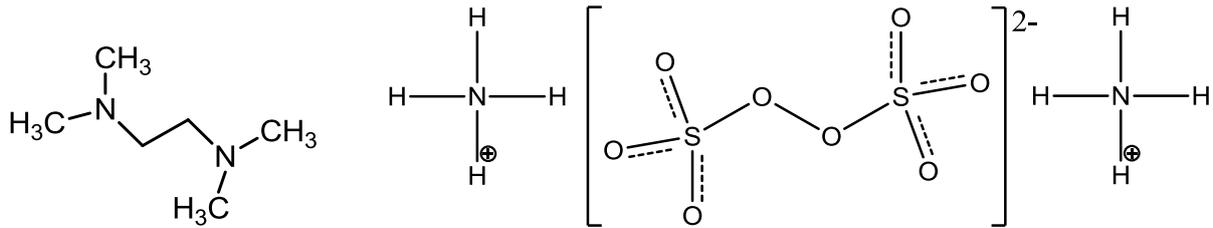


Abbildung 186: Strukturen von TEMED (links) und APS (rechts)



Abbildung 187: Radikalbildung von APS

Schon nach wenigen Sekunden setzt die Polymerisation ein, erkennbar an der schlagartig zunehmenden Viskosität der Mischung. Die noch flüssige Mischung wird nun schnellstmöglich zwischen zwei Glasplatten, die mit einem Spacer auf einen definierten Abstand gehalten werden, eingegossen, damit die Gele gleichmäßig auspolymerisieren können und sich reproduzierbare Gele entwickeln.

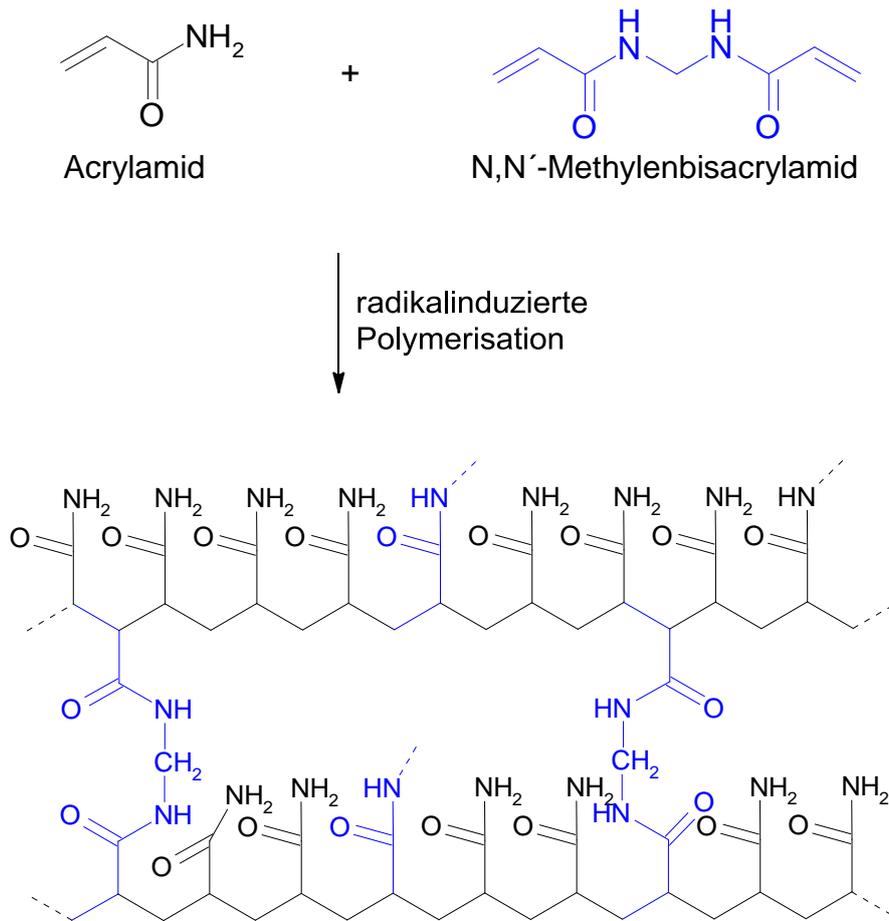


Abbildung 188: Bildung des Polyacrylamid-Gels

Nach der beendeten Polymerisation werden die Gele zusammen mit den Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingespannt. Es gibt zwei Arten von Kammern, je nachdem ob die Elektrophorese waagrecht oder senkrecht durchgeführt werden soll.

Alle von mir durchgeführten Arbeiten erfolgten an einer senkrechten Elektrophoresekammer der Firma Bio-Rad (Bio-RAD mini-PROTEAN[®] 3 cell), die mit einem Spannungsgeber Bio-RAD Power Pac 300 versehen ist. Der Spacer besaß eine Dicke von 0,75 mm (Bio-RAD 0,75 mm).



Abbildung 189: Bio-Rad Elektrophoreskammer und Zubehör

Mithilfe der grünen Plastikkämme (Spacer) (s. Abbildung 189) werden kleine Taschen mit einem Volumen von ca. 15 μL in dem Sammelgel erzeugt. Die mit Bromphenolblau eingefärbten Proben werden, nachdem sie denaturiert worden sind (5 Min. bei 90 °C im Heizblock), mit einer Pasteurpipette in die vorbereiteten Taschen eingebracht. Die blaue Farbe dient lediglich dazu, die Wanderung der Proben im elektrischen Feld beobachten zu können und so den Endpunkt der Auftrennung zu bestimmen (sichtbare „Farbfront“). Als Farbstoff wurde Bromphenolblau (3',3'',5',5'' Tetrabromphenolsulfonephthalein) verwendet, da es nur wenig von dem Trenngel aufgehalten wird und dadurch sehr schnell durch das Gel wandern kann.

Den Gelen wurde weiterhin 2-Mercaptoethanol hinzugefügt, damit die aufgetragenen Proteine reduziert werden konnten (Disulfidbrücken werden reaktiv aufgebrochen). Dies ist notwendig, da Proteine Oligomere (Dimere, Trimere) bilden können, und diese dann unterschiedlich und unerwartet auf dem Gel laufen können.

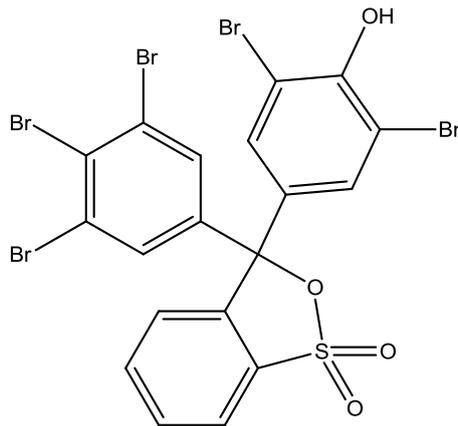


Abbildung 190: Struktur von Bromphenolblau

Die Auswertung nach erfolgreicher Trennung der Probe erfolgt nach Anfärben des Gels durch Coomassie-Brillant-Blau R-250. Dabei handelt es sich um einen sehr intensiven, blauen Farbstoff, der das Acrylamidgel kaum färbt, die einzelnen Probenbestandteile jedoch sehr stark. Der Zusatz „R“ im Namen Coomassie-Brillant-Blau R-250 ist die Abkürzung des englischen Begriffs „reddish“, zu Deutsch „rötlich“. Die Zahl 250 im Namen beschreibt die Farbstärke, mit der der ursprüngliche Hersteller, Imperial Chemical Industries (ICI), das Färbevermögen quantitativ beschrieben hat.

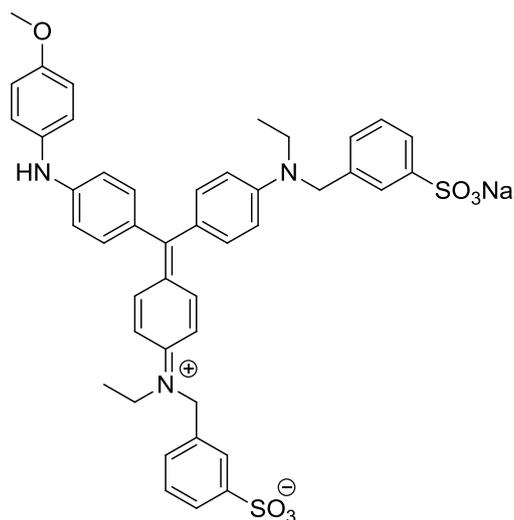


Abbildung 191: Coomassie-Blau

Das mit Coomassie-Blau gefärbte Gel wird mit Essigsäure in Ethanol wieder entfärbt, bis nur noch die Probenbanden auf dem nur noch leicht gefärbten Gel zu erkennen sind. Die Proteinbanden sind dabei stark blau gefärbt und über die Intensität der Farbe auch quantitativ auswertbar.

Der Name Coomassie-Blau stammt von einem afrikanischen Wollfarbstoff und wurde ursprünglich vom Namen der afrikanischen Stadt Kumasi in Ghana abgeleitet (zur Erinnerung an die britische Besatzung der damaligen Ashanti-Hauptstadt Coomassie).

3.5 Nematoden-Assay

Das Nematoden-Assay verwendete zwei Arten von Fadenwürmern, *Steinernema feltiae* (SM) und *Phasmarhabditis hermaphrodita* (PH). Wie bereits im Abschnitt 2.2 „Biologische Aktivität von ROS“ erwähnt, werden beide Arten als Gartennützlinge eingesetzt und sind damit kommerziell frei erhältlich (z. B. auf www.schneckenprofi.de).

Die Sicherheitsvorschriften zur Haltung und Erforschung dieser Nematoden sind äußerst gering. Diese Würmer kosten Cent-Beträge (etwa 20 Millionen Nematoden für ca. 10€), und eignen sich als sicheres und schnelles Testsystem für toxikologische Studien.

Sinnvoll ist dieses Testsystem auch dadurch, da viele schädliche Nematoden-Arten existieren, die ganze Ernten von z. B. Kartoffelpflanzen (Stängelälchen) befallen und vernichten können. Diese Schädlinge sind morphologisch identisch zu den Nützlingen aufgebaut. Wird also eine Substanz gefunden, die gegen die Nützlinge wirkt, so besteht auch eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit, dass sie ebenfalls wirksam gegen die Schädlinge ist. Da die Schädlinge jedoch aus sicherheitstechnischen Gründen umständlicher zu handhaben sind, spielen sie als Versuchstiere in toxikologischen Vorversuchen kaum eine Rolle.

Die Durchführung des Assays erfolgt in wenigen, sehr einfachen Schritten. Die Nematoden werden als Teil eines Pulvers geliefert, welches aus einem Keramik-Material besteht, in dem die inaktivierten Würmer, deren symbiotisch lebenden Bakterien, sowie ein Futtermittel eingeschlossen sind. Man gibt 2 große Spatelspitzen dieses Materials in ein 250 ml Becherglas und fügt 100 ml Wasser hinzu. Dadurch werden die Würmer aus ihrem Keramikmaterial herausgelöst und „aktiviert“, d.h. sie fangen an, sich wieder zu bewegen. 100 µL dieser Suspension enthalten etwa 50 Würmer, diese Anzahl ist ausreichend, um erste Aussagen über toxische Effekte einer Substanz tätigen zu können.

Um die toxischen Eigenschaften einer Substanz genau feststellen zu können, wurden verschiedene Versuchsreihen durchgeführt.

Die Studien erfolgten:

- a) bei verschiedenen Konzentrationen der zugesetzten Verbindungen
- b) nach verschiedenen Zeiträumen, üblicherweise nach 2, 4 und 6 Stunden
- c) im Tetraplikat, um einen Mittelwert bilden zu können
- d) in Gegenwart einer Positiv Kontrolle (1%ige H₂O₂-Lösung)
- e) in Gegenwart einer negativ Kontrolle: eine 1%ige Lösung des Lösemittels, das zum Lösen der Verbindungen benutzt wurde (zumeist DMSO)

Negativkontrolle:

Diese besteht aus einer 1%igen Lösung des Lösemittels, in dem die zu testende Verbindungen gelöst wurden. Sie dient als Kontrolle dafür, dass beobachtete Effekte auf die Nematoden nur durch Zugabe der Verbindung entstehen, und nicht etwa durch das verwendete Lösemittel. Es gilt hierbei zu beachten, dass viele der getesteten Verbindungen nur sehr schlecht in Wasser löslich sind.

Diese Kontrolle stellt ferner sicher, dass die Nematoden in Zeiten von bis zu 6 Stunden nicht anderweitig absterben, z. B. Verhungern oder durch chemische Effekte getötet werden.

Positivkontrolle:

Diese besteht aus einer 1%igen H₂O₂-Lösung. Diese ist sehr toxisch für die Nematoden und dient als Beleg dafür, dass alle Nematoden nach Verabreichung der H₂O₂-Lösung absterben. Die Sterberate sollte nach 6 Stunden bei 100 % liegen.

Von jeder Substanz (unterschiedlicher Konzentration) werden 900 µL mit 100 µL der Nematodenlösung vermischt und auf einer Schüttelplatte während der Dauer des Versuchs kontinuierlich leicht geschüttelt. Nach den vorgegebenen Zeiträumen werden je 100 µL der Reaktionsmischung entnommen und unter ein Lichtmikroskop gebracht. Die Auszählung der toten und noch lebendigen Würmer erfolgt dann bei vierzigfacher Vergrößerung unter dem Mikroskop oder per Videobildübertragung am Monitor des angeschlossenen PCs.

Mittels Berechnung der Mittelwerte der gezählten lebenden und toten Nematoden, sowie der Standardabweichungen und der Standardfehler, lässt sich dann erkennen, wie sich die Überlebensrate der Nematoden mit der Zeit ändert. Dadurch lassen sich die IC_{50} -Werte der Substanzen bestimmen.



Abbildung 192: Lichtmikroskopische Aufnahme von SF; Größe etwa 0,8 mm; Vergrößerung 40-fach.

Die genaue Auswertung der Nematoden-Versuche ist mit Bestandteil der Promotionsarbeiten von Herrn Awais Anwar und Herrn Hamdoon Mohammed die ebenfalls im Arbeitskreis von Jun. Prof. Jacob angefertigt wurden.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Hält man sich die aktuellen Zahlen von Patienten mit Nierenerkrankungen oder Nierenversagen vor Augen, so erkennt man sehr schnell, dass diese Erkrankungen sich immer mehr zu einer Volkskrankheit ausweiten.

Der ungesunde Lebensstil des modernen Menschen in einer Umwelt mit zu viel Stress und ungesunder, sogar krankhafter Ernährung führt dazu, dass die Nieren bis über ihre Belastbarkeitsgrenzen hinaus strapaziert werden.

Eine Behandlung dieser Krankheiten ist sehr teuer, zeitintensiv und bedeutet einen tiefen Einschnitt in die Lebensqualität des Patienten. Trotz der vielen Nachteile haben sich Behandlungen mit künstlichen Nieren bewährt. Wissenschaft und Technik haben sich in den letzten Jahren soweit verbessert, dass diese Behandlungsmethoden auch in näherer Zukunft einen hohen Stellenwert in der Medizin behalten werden.

Vor diesem Hintergrund ist die Erforschung einer effektiven, zeitsparenden und günstigen Reinigungsmethode für Dialysegeräte und deren Zubehör sicher eine sinnvolle und sehr angebrachte Idee.

Der in dieser Promotionsarbeit behandelte Ansatz der Reinigung von Dialysegeräten mithilfe elektrochemischer Methoden führt zu einigen sehr interessanten Aussagen. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass es mithilfe von ROS durchaus möglich ist, biologische Substanzen schonend zu reinigen, ohne dass die umgebenden Materialien Schaden nehmen. Auch zeigt sich, dass diese Methode gerade in der Nähe eines elektrischen Leiters sehr gut funktioniert.

Aufgrund finanzieller und ausstattungstechnischer Mängel konnte diese Methode leider nicht zu einem fertigen Produkt weiterentwickelt werden, sodass nur deren Grundlagen erforscht werden konnten.

Ein nächster Schritt in der Erforschung und Entwicklung dieser Methode müsste das Austesten neuer Elektrodenmaterialien, z. B. leitfähiger Plastikmaterialien oder metallhaltiger Folien sein, die ohne Weiteres in das Innere eines Dialyseschlauches integriert werden könnten. Dadurch würde sich die Oberfläche des elektrischen Leiters exorbitant vergrößern, wodurch eine signifikante Steigerung der ROS-Konzentration in der Lösung zu erwarten wäre. Eine höhere Konzentration der reaktiven Sauerstoffradikale könnte dann auch ausreichend sein, um in Zukunft z. B. die *E.Coli* Bakterien oder andere Krankheitserreger abzutöten.

Dieser Ansatz hätte ferner auch den Vorteil, dass dort auch die Anreicherung von Krankheitserregern auf Oberflächen (z.B. in Form von Biofilmen) effektiv verhindert werden könnten (gerade an diesen Oberflächen findet ja die ROS-Entwicklung statt).

Zum Verständnis der eigentlichen Reaktionsabläufe innerhalb der elektrochemischen Zelle müssen spezielle analytische Proben, Färbemethoden und analytische Geräte, wie z. B. Protein-MS oder sauerstoffspezifische Elektroden zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration und der vorliegenden ROS, zum Einsatz kommen. Nur mit diesen Methoden und Geräten kann definitiv aufgeklärt werden, wodurch und wie z. B. die Proteine zerstört werden oder warum die Bakterien den Angriff der ROS überstehen können.

Generell ist der vorliegende Ansatz eine sinnvolle, erfolgsversprechende und innovative Idee, was durch die guten Ergebnisse in dieser Arbeit auch belegt wird. Es muss aber weiterhin viel Zeit und vor allem auch Geld investiert werden, damit dieser vielversprechende Ansatz auch zu einer technisch ausgefeilten (Dekontaminations-) Methode weiterentwickelt werden kann.

Diese Arbeit zeigt, dass eine Zusammenarbeit zwischen Industrie und Universität durchaus Früchte tragen kann, von denen beide Partner profitieren. Sie zeigt aber auch, dass die Ergebnisse von Grundlagenforschung und fundierten Basisuntersuchungen nicht gerade einfach und kostengünstig umzusetzen sind und das beide Partner daher auch einiges investieren müssen, um für sich die erhofften Ergebnisse

und Mehrwerte zu erhalten. Dennoch ist eine Weiterentwicklung durch Ingenieure sicherlich sinnvoll.

Die verwendeten elektrochemischen Methoden dienen nicht nur dazu, ein Dekontaminationsverfahren zu entwickeln, sondern sie sind auch dazu verwendet worden, analytische Daten der synthetisierten Redox-aktiven Verbindungen zu erhalten.

Die verwendeten elektrochemischen Methoden haben einen großen Nutzen in der Analytik von Adsorptionsprozessen und der Vorhersage von biologischen Aktivitäten und biochemischer Prozesse. Auch eignen sich diese Methoden dazu, schnell und einfach, sowie kostengünstig, Aussagen zur Redox-aktivität und möglichen Zwischenprodukten von Verbindungen zu erhalten.

5. Literaturverzeichnis

- [1] Fresenius Medical Care AG & Co. KGaA, *Dialyse Kompakt: Über Funktion, Krankheit und Therapie der menschlichen Niere*.
- [2] P.A. McCullough, M. Agarwal, V. Agrawal, *Nephrology (Carlton)* **2009**, 14, 428-436.
- [3] D. S. Lirenman, J. D. Price, R. W. Lauener, H. S. Miller, *Can. Med. Assoc. J.* **1968**, 99, 668-674.
- [4] A.L. de Francisco, Piñera C., *Hemodial. Int.* **2006**, Suppl 1, 19-23.
- [5] C. Jacobs, *Nephrol. Ther.* **2009**, 5, 306-312.
- [6] J. Chanard, S. Lavaud, *Nephrology* **1995**, 16, 33-36.
- [7] R. Kazancioglu, *Perit. Dial. Int.* **2009**, Suppl 2, 198-201.
- [8] U. Gerlach, H. Wagner, W. Wirth, *Innere Medizin für Pflegeberufe*, 5. Auflage ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2000**.
- [9] N. Hidalgo, P. Hynes-Gay, S. Hill, L. Burry, *Dynamics* **2001**, 12, 13-17.
- [10] Fresenius Medical Care AG & Co. KGaA, <http://www.fmc-ag.de/internet/fmc/fmcag/neu/de/fmcpub-de.nsf/Content/Geschaeftsentwicklung>, **2000-2009**.
- [11] W. W. Nichols, M. J. Evans, M. P. Slack, H. L. Walmsley, *J. Gen. Microbiol.* **1989**, 135, 1291-1303.
- [12] K.C. Marshall, *ASM News* **1992**, 58, 202-207.
- [13] G. Cappelli, M. Ballestri, S. Perrone, A. Ciuffreda, P. Inguaggiato, A. Albertazzi, *Blood Purif.* **2000**, 18, 224-230.
- [14] R. Nystrand, *Edtna Erca J.* **2003**, 29, 127-130.
- [15] E. Bonnie-Schorn, A. Grassmann, I. Uhlenbusch-Korwer, C. Weber, J. Vienken, *Water Quality in Hemodialysis, Vol. 1*, Pabst, **1998**.

- [16] K. Marion-Ferey, F. Enkiri, M. Pasmore, G. P. Husson, R. Vilagines, *Artif. Organs* **2003**, 27, 658-664.
- [17] N. A. Hoenich, R. Levin, *Semin. Dial.* **2003**, 16, 492-497.
- [18] G. Lonnemann, *Blood Purif.* **2004**, 22, 124-129.
- [19] N. A. Hoenich, C. Ronco, R. Levin, *Blood Purif* **2006**, 24, 11-18.
- [20] N. S. Kanagasundaram, I. Moore, N. A. Hoenich, *Kidney Int.* **2009**, 76, 682.
- [21] I. Moore, R. Bhat, N. A. Hoenich, A. J. Kilner, M. Prabhu, K. E. Orr, N. S. Kanagasundaram, *Crit. Care. Med.* **2009**, 37, 496-500.
- [22] R. L. Amato, J. Curtis, *Nephrol. News Is.* **2002**, 16, 27-30.
- [23] Z.J. Twardowski, *Adv. Ren. Replace Ther.* **1996**, 3, 124-132.
- [24] C. J. Holmes, A. Degremont, W. Kubey, P. Straka, N. K. Man, *Blood Purif.* **2004**, 22, 461-468.
- [25] K. Marion, M. Pasmore, J. Freney, E. Delawari, F. Renaud, J. W. Costerton, J. Traeger, *Blood Purif* **2005**, 23, 339-348.
- [26] M. Otto, *Analytische Chemie 2* Revised ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [27] D.A. Skoog, J.J. Leary, *Instrumentelle Analytik*, Springer Verlag, Berlin, **1996**.
- [28] C.H. Hamann, W. Vielstich, *Elektrochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [29] J. Heyrovsky, *Science* **1960**, 132, 123-130.
- [30] G. Henze, *Polarographie und Voltammetrie*, Springer Verlag, Berlin, **2001**.
- [31] H. Sies, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 1058-1071.
- [32] H. Sies, *Europ. J. of Pharmacol.* **1990**, 183, 49-50.
- [33] H. Sies, *Exp. Phys.* **1997**, 82, 291-295.
- [34] H. Sies, *Free Radic Biol Med* **2004**, 36, S2-S2.
- [35] C. Jacob, P. G. Winyard, *Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine, Vol. 1. Auflage*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2009**.
- [36] D. T. Sawyer, *Oxygen Chemistry*, Oxford University Press, New York, **1991**.
- [37] P. Dandona, K. Thusu, S. Cook, B. Snyder, J. Makowski, D. Armstrong, T. Nicotera, *Lancet* **1996**, 347, 444-445.

- [38] T. Grune, O. Ullrich, *Pharmazeutische Zeitung* **2001**, *48*, 10-15.
- [39] P. G. Winyard, C. J. Moody, C. Jacob, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 453-461.
- [40] T. Finkel, N. J. Holbrook, *Nature* **2000**, *408*, 239-247.
- [41] J. M. Clark, R. M. Jackson, C. J. Lambertsen, R. Gelfand, W. D. B. Hiller, M. Unger, *J. of App. Phys.* **1991**, *71*, 878-885.
- [42] C.A. Collins, PhD thesis thesis, University of Exeter (Exeter), **2006**.
- [43] A. Gomes, E. Fernandes, J. L. Lima, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2005**, *65*, 45-80.
- [44] W. A. Pryor, *Annu. Rev. Physiol.* **1986**, *48*, 657-667.
- [45] P. Brenneisen, H. Sies, K. Scharffetter-Kochanek, *Cell Signaling, Transcription, and Translation as Therapeutic Targets* **2002**, *973*, 31-43.
- [46] A. Meister, M. E. Anderson, *Ann. Rev. of Biochem.* **1983**, *52*, 711-760.
- [47] J. M. McCord, Fridovic.I, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6049-&.
- [48] J. P. Jacquot, H. Eklund, N. Rouhier, P. Schurmann, *Trends Plant Sci.* **2009**, *14*, 336-343.
- [49] B. N. Tripathi, I. Bhatt, K. J. Dietz, *Protoplasma* **2009**, *235*, 3-15.
- [50] C. C. Reddy, E. J. Massaro, *Fundam. Appl. Toxicol.* **1983**, *3*, 431-436.
- [51] M. Bjornstedt, S. Kumar, L. Bjorkhem, G. Spyrou, A. Holmgren, *Biomed. Environ. Sci.* **1997**, *10*, 271-279.
- [52] D. G. Barceloux, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **1999**, *37*, 145-172.
- [53] D. L. Holness, I. G. Taraschuk, J. R. Nethercott, *Arch. Environ. Health* **1989**, *44*, 291-297.
- [54] T. J. Kealy, P. L. Pauson, *Nature* **1951**, *168*, 1039-1040.
- [55] C. A. Martinez-Huitle, E. Brillas, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 1998-2005.
- [56] E. Frieden, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1974**, *48*, 1-29.
- [57] D. M. Kurtz, Jr., *Essays Biochem.* **1999**, *34*, 85-100.
- [58] Y. Cong, Q. Zhang, D. Woolford, T. Schweikardt, H. Khant, M. Dougherty, S. J. Ludtke, W. Chiu, H. Decker, *Structure* **2009**, *17*, 749-758.
- [59] D. P. Clark, *FEMS Microbiol. Rev.* **1989**, *5*, 223-234.

- [60] A. Steinbuechel, F. B. Oppermann-Sanio, *Mikrobiologisches Praktikum*, Springer, **2003**.
- [61] Prime Factory,
http://www.schneckenprofi.de/nuetzlinge.html?id=GUu2gaRY&mv_pc=1667, **2009**.
- [62] S. N. Vinogradov, D. A. Walz, B. Pohajdak, L. Moens, O. H. Kapp, T. Suzuki, C. N. Trotman, *Comp. Biochem. Physiol. B.* **1993**, 106, 1-26.
- [63] G. Fermi, M. F. Perutz, B. Shaanan, R. Fourme, *J. Mol. Biol.* **1984**, 175, 159-174.
- [64] F. Yang, G. N. Phillips, Jr., *J. Mol. Biol.* **1996**, 256, 762-774.
- [65] J. Gasteiger, A. Schunk, <http://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects/vsc/chemie-mediziner-neu/komplexe/haemoglobin.html>, **2001**.
- [66] T. Brandenburger, T. Bajorat, *Fallbuch Biochemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2006**.
- [67] H. Scouloudi, E. N. Baker, *J. Mol. Biol.* **1978**, 126, 637-660.
- [68] David S. Goodsell,
http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb36_1.html, **2002**.
- [69] J. Linnanto, J. Korppi-Tommola, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8, 663-687.
- [70] M. DiDonato, C.J. Kassmann, C.K. Bruns, D.E. Cabelli, Z. Cao, L.B. Tabatabai, J.S. Kroll, E.D. Getzoff, *10.2210/pdb2aqq/pdb* **in press**.
- [71] M. K. Safo, F. N. Musayev, S. H. Wu, D. J. Abraham, T. P. Ko, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2001**, 57, 1-7.
- [72] A. M. Rauth, T. Melo, V. Misra, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1998**, 42, 755-762.
- [73] T. D. Oberley, L. W. Oberley, *Histol. Histopathol.* **1997**, 12, 525-535.
- [74] H. Pelicano, D. Carney, P. Huang, *Drug Resist. Updat.* **2004**, 7, 97-110.
- [75] A. Laurent, C. Nicco, C. Chereau, C. Goulvestre, J. Alexandre, A. Alves, E. Levy, F. Goldwasser, Y. Panis, O. Soubrane, B. Weill, F. Batteux, *Cancer. Res.* **2005**, 65, 948-956.

- [76] E. O. Hileman, J. Liu, M. Albitar, M. J. Keating, P. Huang, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2004**, *53*, 209-219.
- [77] J. Alexandre, C. Nicco, C. Chereau, A. Laurent, B. Weill, F. Goldwasser, F. Batteux, *J. Natl. Cancer. Inst.* **2006**, *98*, 236-244.
- [78] T. Ohse, S. Nagaoka, Y. Arakawa, H. Kawakami, K. Nakamura, *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *85*, 201-208.
- [79] N. Kasugai, T. Murase, T. Ohse, S. Nagaoka, H. Kawakami, S. Kubota, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 349-355.
- [80] H. Blessing, S. Kraus, P. Heindl, W. Bal, A. Hartwig, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 3190-3199.
- [81] G. Mugesh, W. W. du Mont, *Chemistry* **2001**, *7*, 1365-1370.
- [82] G. I. Giles, K. M. Tasker, R. J. Johnson, C. Jacob, C. Peers, K. N. Green, *Chem Commun (Camb)* **2001**, 2490-2491.
- [83] G. I. Giles, N. M. Giles, C. A. Collins, K. Holt, F. H. Fry, P. A. Lowden, N. J. Gutowski, C. Jacob, *Chem Commun (Camb)* **2003**, 2030-2031.
- [84] G. I. Giles, F. H. Fry, K. M. Tasker, A. L. Holme, C. Peers, K. N. Green, L. O. Klotz, H. Sies, C. Jacob, *Org Biomol Chem* **2003**, *1*, 4317-4322.
- [85] F. H. Fry, A. L. Holme, N. M. Giles, G. I. Giles, C. Collins, K. Holt, S. Pariagh, T. Gelbrich, M. B. Hursthouse, N. J. Gutowski, C. Jacob, *Org Biomol Chem* **2005**, *3*, 2579-2587.
- [86] A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski, *J Comb Chem* **1999**, *1*, 55-68.
- [87] C. Jacob, G. E. Arteel, T. Kanda, L. Engman, H. Sies, *Chem. Res. in Toxicol.* **2000**, *13*, 3-9.
- [88] N. M. Giles, N. J. Gutowski, G. I. Giles, C. Jacob, *Febs Letters* **2003**, *535*, 179-182.
- [89] N. Giles, G. Giles, C. Collins, K. Tasker, C. Jacob, *22nd Meeting of the European Society for Microcirculation: Microcirculation and Vascular Biology* **2002**, 253-256, 339.

- [90] S. Shabaan, L. A. Ba, M. Abbas, T. Burkholz, A. Denkert, A. Gohr, L. A. Wessjohann, F. Sasse, W. Weber, C. Jacob, *Chem. Comm.* **2009**, 4702-4704.
- [91] J. E. Heffner, J. E. Repine, *Am. Rev. of Resp. Dis.* **1989**, 140, 531-554.
- [92] K. R. Maddipati, C. Gasparski, L. J. Marnett, *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, 254, 9-17.
- [93] G. D. Leikauf, L. G. Simpson, J. Santrock, Q. Y. Zhao, J. Abbinantenissen, S. Y. Zhou, K. E. Driscoll, *Env.Health Per.* **1995**, 103, 91-95.
- [94] T. Quinlan, S. Spivack, B. T. Mossman, *Env.Health Per.* **1994**, 102, 79-87.
- [95] C. Jacob, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23, 851-863.
- [96] U. Münchberg, A. Anwar, S. Mecklenburg, C. Jacob, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 1505-1518.
- [97] A. Anwar, T. Burkholz, C. Scherer, M. Abbas, C. M. Lehr, M. Diederich, C. Jacob, *J. Sulfur Chem.* **2008**, 29, 251-268.
- [98] Inc. Varian, *UV Advantage Note Number 6* **2006**,
http://www.varianinc.com/image/vimage/docs/applications/apps/uv_an6.pdf.
- [99] F. Lottspeich, J.W. Engels, A. Simeon, *Bioanalytik*, 2 ed., Spektrum Akademischer Verlag, **2006**.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufgaben der Nieren ^[1]	6
Abbildung 2: Schema Peritonealdialyse ^[8]	7
Abbildung 3: Schema Hämodialyse ^[8] (links) und Hämodialysegerät 5008 der Fresenius Medical Care (FMC) ^[10] (rechts).....	8
Abbildung 4: Mesomere Grenzstruktur von Ozon	12
Abbildung 5: Ohmsches Gesetz (K = elektrostatische Anziehungskraft; r = Abstand der Ladungen q_1 und q_2 ; ϵ = Dielektrizitätskonstante)	14
Abbildung 6: 1. Faradaysches Gesetz (Ladungsmenge= Strom·Zeit)	15
Abbildung 7: 2. Faradaysches Gesetz (m = Masse; M = Molare Masse; z = Ionenladung)	15
Abbildung 8: Besetzte Orbitale von 3O_2 ^[36]	18
Abbildung 9: Besetzte Orbitale von Singulett-Sauerstoff (angeregte Zustände, sehr kurzlebig, sehr reaktiv)	18
Abbildung 10: Bildung von ROS	19
Abbildung 11: Fenton-Reaktion	20
Abbildung 12: Chemische Struktur von GSH	21
Abbildung 13: Reaktion von H_2O_2 mit GSH.....	21
Abbildung 14: Dismutation des $O_2 \cdot -$ Radikals zu H_2O_2 und O_2	22
Abbildung 15: Disproportionierung von H_2O_2 zu H_2O und O_2 mithilfe von Katalase (Fe(II)-E: Eisenzentrum der Häm-Gruppe; $O=Fe(IV)-E(\cdot+)$: Eisen ist nicht ganz bis zu Fe(V) oxidiert, ein Elektron wird vom Häm-Liganden bereitgestellt).	22
Abbildung 16: Struktur von Ferrocen.	28
Abbildung 17: CV von Ferrocen mit der Glaskohlenstoffelektrode, 33 % MeOH.	29
Abbildung 18: CV von Ferrocen in DMF mit Glaskohlenstoffelektrode als AE vs. SSE.	31

Abbildung 19: CV von Ferrocen in DMF mit Goldelektrode als AE vs. SSE.	32
Abbildung 20: CV von Ferrocen in THF mit Glaskohlenstoff als AE vs. SSE.	33
Abbildung 21: Mögliche Reaktionen von O ₂	35
Abbildung 22: CV von Wasser und Phosphatpuffer bei pH 7,4; Glaskohlenstoff als AE, gespült mit N ₂	36
Abbildung 23: CV von Wasser und Phosphatpuffer bei pH 7,4; Gold als AE, gespült mit N ₂ .	37
Abbildung 24: CV von Wasser und Phosphatpuffer bei pH 7,4; Titan als AE, gespült mit N ₂	38
Abbildung 25: CV von Wasser und Phosphatpuffer bei pH 7,4; Glaskohlenstoff als AE, gespült mit O ₂	39
Abbildung 26: CV von Wasser und Phosphatpuffer bei pH 7,4; Gold als AE, gespült mit O ₂ .	40
Abbildung 27: CV von Wasser und Phosphatpuffer bei pH 7,4; Titan als AE, gespült mit O ₂	41
Abbildung 28: CV von 0,5M H ₂ SO ₄ ; Gold als AE, v= 100 mV/s, mit N ₂ gespült.....	43
Abbildung 29: CV von Ca(OCl) ₂ ; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 50 mV/s, mit N ₂ gespült.....	44
Abbildung 30: CV von Ca(OCl) ₂ ; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4;.....	45
Abbildung 31: CV von NaOCl; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4;.....	46
Abbildung 32: Disproportionierung von OCl ⁻ zu ClO ₃ ⁻ – und Cl ⁻	47
Abbildung 33: CV von NaOCl; Gold als AE, Phosphatpuffer pH 7,4;v= 10 mV/s, mit N ₂ gespült.	48
Abbildung 34: CV von NaOCl; Gold als AE, Phosphatpuffer pH 7,4;	48
Abbildung 35: CV von NaHCO ₃ (bibag) der FMC; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 50 mV/s, mit N ₂ gespült.	51
Abbildung 36: CV von NaHCO ₃ (bibag) der FMC; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 50 mV/s, mit O ₂ gespült.....	52
Abbildung 37: CV von BC-F 8,4 % (bibag) der FMC; Gold als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 50 mV/s, mit N ₂ gespült.....	53

Abbildung 38: CV von BC-F 8,4 % (bibag) der FMC; Gold als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 50 mV/s, mit O ₂ gespült.	54
Abbildung 39: CV von SK-F 213 (1 + 34) der FMC; Gold als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 1000 mV/s, mit N ₂ gespült.....	55
Abbildung 40: CV von SK-F 213 (1 + 34) der FMC; Gold als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 10 mV/s, mit O ₂ gespült.	56
Abbildung 41: CV von 4 % Citrosteril®; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit N ₂ gespült.....	57
Abbildung 42: CV von 4 % Citrosteril®; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit O ₂ gespült.....	58
Abbildung 43: Strukturen von Glycolsäure (links) und Oxalsäure (rechts).....	59
Abbildung 44: CV von 4 % Diasteril®; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit N ₂ gespült.....	60
Abbildung 45: CV von 4 % Diasteril®; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit O ₂ gespült.....	61
Abbildung 46: Reaktion von Essigsäure mit H ₂ O ₂	62
Abbildung 47: CV von 4 % Puristeril®340; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit N ₂ gespült.....	62
Abbildung 48: CV von 4 % Puristeril®340; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit O ₂ gespült.....	63
Abbildung 49: Zersetzung von Puristeril®plus und Puristeril®340	64
Abbildung 50: CV von 4 % Puristeril®plus; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit N ₂ gespült.....	64
Abbildung 51: CV von 4 % Puristeril®plus; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit O ₂ gespült.....	65
Abbildung 52: CV von 5 % Sporotal™ 100; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit N ₂ gespült.....	66

Abbildung 53: CV von 5 % Sporotal™ 100; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit O ₂ gespült.....	67
Abbildung 54: CV von 1M H ₂ O ₂ ; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4;	70
Abbildung 55: CV von 1M H ₂ O ₂ ; Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4;	71
Abbildung 56: Erzeugung von H ₂ O ₂ durch Elektrolyse aus Schwefelsäure.	72
Abbildung 57: Bruttogleichung Anthrachinon-Verfahren.	72
Abbildung 58: CV von Na ₂ O ₂ ; Gold als AE, Phosphatpuffer pH 7,4;	73
Abbildung 59: Zersetzung von Superoxiden in Wasser.....	73
Abbildung 60: Reaktion des Superoxids zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff.	74
Abbildung 61: CV von KO ₂ (0,5 M); Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 10 mV/s, mit N ₂ gespült.....	75
Abbildung 62: CV von KO ₂ (0,5 M); Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4;	76
Abbildung 63: CV von KO ₂ (0,5 M); H ₂ O ₂ (0,5 M), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 50 mV/s, mit O ₂ gespült.....	76
Abbildung 64: Struktur von 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat.....	78
Abbildung 65: Struktur von Hämocyanin aus <i>Androctonus australis</i> (Skorpion) aufgenommen mithilfe der Elektronen-Cryomikroskopie ^[58]	80
Abbildung 66: CV von Albumin bovine (Rinderserumalbumin, BSA) (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 100 mV/s, mit O ₂ gespült ..	81
Abbildung 67: Modell eines einfachen, hydraulischen Systems; zu sehen (von links): Spannungsgeber EA-4003, Blutpumpe, Flasche mit Elektroden und Teflondeckel. Als Farbstoff der Lösung diente Rose Bengal (zu Demonstrationszwecken).....	84
Abbildung 68: <i>E.Coli</i> Bakterien in einer Petrischale mit Agar-Nährmedium (links: Verdünnung 1:10 ⁶ , rechts: Verdünnung 1:10 ⁷)	86
Abbildung 69: <i>Steinernema feltiae</i> (links) und <i>Phasmarhabditis hermaphrodita</i> (rechts), Vergrößerung ca. 40 bis 45-fach, Details s. Homepage des Lieferanten ^[61]	87
Abbildung 70: Kristallstruktur von Hämoglobin (human) ^[63]	88

Abbildung 71: Häm-Gruppe des Hämoglobins (Fe-Protoporphyrin IX).....	89
Abbildung 72: Struktur von Vitamin B12 mit Co ⁺ im Porphyringerüst	90
Abbildung 73: Aufnahme der Messzelle mit Proteinlösung (BSA) beim Spülen mit N ₂	91
Abbildung 74: CV von Hämoglobin (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 100 mV/s, mit N ₂ gespült.	92
Abbildung 75: CV von Hämoglobin (2 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 50 mV/s, mit O ₂ gespült.	92
Abbildung 76: CV von Hämoglobin (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 6,0; v= 50 mV/s, mit O ₂ gespült.	93
Abbildung 77: TB-Voltammogramm von Hämoglobin (2 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; t= 7200 s, mit N ₂ gespült.	94
Abbildung 78: TB-Voltammogramm von Hämoglobin (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; t= 7200 s, mit O ₂ gespült.	95
Abbildung 79: Kristallstruktur von Myoglobin aus Wal-Sperma ^[64]	97
Abbildung 80: Struktur der Hämgruppe im Hämoglobin und Myoglobin ^[65]	98
Abbildung 81: CV von Myoglobin (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 100 mV/s, mit N ₂ gespült.	98
Abbildung 82: CV von Myoglobin (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 100 mV/s, mit O ₂ gespült.	99
Abbildung 83: TB-Voltammogramm von Myoglobin (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; t= 7200 s, mit N ₂ gespült (Messung erfolgte alle 2s). 100	
Abbildung 84: TB-Voltammogramm von Myoglobin (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; t= 7200 s, mit O ₂ gespült (Messung nach jeder s).....	101
Abbildung 85: TB-Voltammogramm von Myoglobin (1 mg/ml), Titan als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; t= 7200 s, mit N ₂ gespült (Messung nach jeder s).....	102
Abbildung 86: TB-Voltammogramm von Myoglobin (1 mg/ml), Titan als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; t= 7200 s, mit O ₂ gespült (Messung nach jeder s).....	102
Abbildung 87: Kristallstruktur von Seehund Cytochrom c ^[67]	104

Abbildung 88: Struktur der Hämgruppe in Cytochrom $c^{[65]}$	104
Abbildung 89: Kalottenmodell des Cytochrom c mit Häm-Gruppe (rot) und Eisen-Ion (grau) ^[68]	105
Abbildung 90: CV von Cytochrom c (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 500$ mV/s, mit N_2 gespült.	105
Abbildung 91: CV von Cytochrom c (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 100$ mV/s, mit O_2 gespült.	106
Abbildung 92: TB-Voltammogramm von Cytochrom c (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $t= 7200$ s, mit N_2 gespült (Messung nach jeder s).	107
Abbildung 93: TB-Voltammogramm von Cytochrom c (1 mg/ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; $t= 14400$ s, mit O_2 gespült (Messung nach 2s).....	108
Abbildung 94: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Hämoglobinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, mit N_2 gespült. (Rot: Blindprobe, Schwarz: nach 48 h)	110
Abbildung 95: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Hämoglobinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, mit O_2 gespült. (Blau: Blindprobe, Rot: nach 1h, Grün: nach 18 h).....	111
Abbildung 96: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Hämoglobinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, mit O_2 gespült. (Rot: Blindprobe, Violett: nach 1,5 h, Grün: nach 2,5 h, Blau nach 15 h, Grau nach 24 h)	113
Abbildung 97: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Hämoglobinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, mit O_2 gespült. (Rot: Blindprobe, Schwarz: 1 h, Violett: 3 h, Grau: 5 h, Dunkelgrau: 7 h, Türkis: 24 h).....	115
Abbildung 98: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Myoglobinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, gespült mit N_2 . (Rot: Blindprobe, Violett: 7 h, Grün: 24 h)	116

Abbildung 99: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Myoglobinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, mit O₂ gespült. (Rot: Blindprobe, Violett: 1 h, Türkis: 3 h) 117

Abbildung 100: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Myoglobinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, mit O₂ gespült. (Rot: Blindprobe, Violett: 1 h, Türkis: 2 h, Grau: 5 h, Grün: 30 h) 118

Abbildung 101: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Cytochromkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, mit N₂ gespült. (Rot: Blindprobe, Blau: 1 h, Braun: 3 h, Schwarz: 23 h) 120

Abbildung 102: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Cytochromkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, mit O₂ gespült. (Violett: Blindprobe, Türkis: 1 h, Rot: 24 h) 121

Abbildung 103: Kristallstruktur von SOD (Cu/Zn) aus *neisseria meningitidis* (Bakterium, Erreger der eitrigen Hirnhautentzündung; K91E mutant)^[70] 123

Abbildung 104: CV von SOD (5 mg/ 15 ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit N₂ gespült..... 123

Abbildung 105: CV von SOD (5 mg/ 15 ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit O₂ gespült..... 124

Abbildung 106: Kristallstruktur von Cat (tetragonal aus menschlicher Erythrocyt- Katalase)^[71] 125

Abbildung 107: CV von Cat (25 mg/ 15 ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit N₂ gespült..... 125

Abbildung 108: CV von Cat (25 mg/ 15 ml), Glaskohlenstoff als AE, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit O₂ gespült..... 126

Abbildung 109: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Hämoglobinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, 5 mg SOD; mit O₂ gespült. (Rot: Blindprobe, Grün: 1 h, Blau: 2 h; Grau: 5 h) 127

Abbildung 110: UV/Vis-Spektrophotometrische Überprüfung der Hämoglobinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit, 5 mg SOD; 25 mg Cat; mit O ₂ gespült. (Rot: Blindprobe, Blau: 17 h)	128
Abbildung 111: SDS-Gel mit vier unbehandelten Proteinen; 15 %; 220 Volt Laufspannung.	130
Abbildung 112: SDS-Gel mit Proteinen; 15 %; 220 Volt Laufspannung.	131
Abbildung 113: Bakterienkolonien vor der elektrochemischen Behandlung	133
Abbildung 114: Bakterienkolonien in der Verdünnung 1:10 ⁶ (links) und 1:10 ⁷ (rechts) nach 24 Stunden elektrochemischer Behandlung. Eine deutliche Koloniebildung ist erkennbar.....	135
Abbildung 115: Reaktion von KO ₂ mit Wasser.....	136
Abbildung 116: Reaktion von NaO ₂ mit Wasser.....	136
Abbildung 117: Strukturformel von 1,4-Naphthochinon.....	144
Abbildung 118: CV von 1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; v= 50 mV/s, mit N ₂ gespült (E _p = -366 mV; E _a = +94 mV; ΔE= 460 mV).	144
Abbildung 119: CV von 1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit N ₂ gespült (E _p = -321 mV; E _a = +21 mV; ΔE= 342 mV).	145
Abbildung 120: Strukturformel von 2-Methyl-1,4-Naphthochinon	146
Abbildung 121: CV von 2-Methyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit N ₂ gespült (E _p = -670 mV; E _a = +238 mV; ΔE= 908 mV).	146
Abbildung 122: CV von 2-Methyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; v= 250 mV/s, mit N ₂ gespült (E _p = -406 mV; E _a = +7 mV; ΔE= 413 mV).	147
Abbildung 123: Strukturformel von 2-Brom-3-Methyl-1,4-Naphthochinon	148

Abbildung 124: CV von 2-Brom-3-Methyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_{p1} = -364 \text{ mV}$, $E_{p2} = -766 \text{ mV}$; $E_a = -98 \text{ mV}$; $\Delta E_1 = 266 \text{ mV}$, $\Delta E_2 = 668 \text{ mV}$)..... 148

Abbildung 125: CV von 2-Brom-3-Methyl-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -368 \text{ mV}$; $E_a = -57 \text{ mV}$; $\Delta E = 312 \text{ mV}$). 149

Abbildung 126: Strukturformel von 2,3-Dibrom-1,4-Naphthochinon 150

Abbildung 127: CV von 2,3-Dibrom-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 25 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -201 \text{ mV}$; $E_a = -185 \text{ mV}$; $\Delta E = 16 \text{ mV}$). 150

Abbildung 128: Strukturformel von 2-Methyl-3-phenylselenyl-1,4-Naphthochinon 152

Abbildung 129: CV von 2-Methyl-3-phenylselenyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -348 \text{ mV}$; $E_{a1} = -116 \text{ mV}$, $E_{a2} = +1360 \text{ mV}$; $\Delta E_1 = 232 \text{ mV}$, $\Delta E_2 = 1708 \text{ mV}$)..... 153

Abbildung 130: CV von 2-Methyl-3-phenylselenyl-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -400 \text{ mV}$; $E_a = -32 \text{ mV}$; $\Delta E = 432 \text{ mV}$)..... 153

Abbildung 131: Strukturformel von 2-Methyl-3-methyl-phenylselenyl-1,4-Naphthochinon... 155

Abbildung 132: CV von 2-Methyl-3-methyl-phenylselenyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -520 \text{ mV}$; $E_a = +1271 \text{ mV}$; $\Delta E = 1791 \text{ mV}$). 156

Abbildung 133: CV von 2-Methyl-3-methyl-phenylselenyl-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült ($E_p = -469 \text{ mV}$; $E_a = -120 \text{ mV}$; $\Delta E = 349 \text{ mV}$). 156

Abbildung 134: Strukturformel von 2,3-Bisphenylselenyl-1,4-Naphthochinon 157

Abbildung 135: CV von 2,3-Bisphenylselenyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 250 \text{ mV/s}$, mit N_2 gespült..... 157

Abbildung 136: CV von 2,3-Bisphenylselenyl-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich),
Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 250$ mV/s, mit N_2
gespült ($E_p= -356$ mV; $E_a= +36$ mV; $\Delta E= 392$ mV). 158

Abbildung 137: Strukturformel von 2-(2,2-Diethoxyethylselenyl)-3-methyl-1,4-Naphthochinon
..... 158

Abbildung 138: CV von 2-(2,2-Diethoxyethylselenyl)-3-methyl-1,4-Naphthochinon,
Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 250$ mV/s, mit N_2
gespült ($E_p= -372$ mV; $E_{a1}= -108$ mV, $E_{a1}= +1295$ mV; $\Delta E_1= 264$ mV, $\Delta E_2=$
 1667 mV). 159

Abbildung 139: CV von 2-(2,2-Diethoxyethylselenyl)-3-methyl-1,4-Naphthochinon (Chinon-
Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 250$ mV/s,
mit N_2 gespült ($E_p= -386$ mV; $E_a= -95$ mV; $\Delta E= 291$ mV). 159

Abbildung 140: Strukturformel von 5,8-Dihydroxy-2,3-bisphenylselenyl-1,4-Naphthochinon
..... 160

Abbildung 141: CV von 5,8-Dihydroxy-2,3-bisphenylselenyl-1,4-Naphthochinon,
Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 250$ mV/s, mit N_2
gespült. 161

Abbildung 142: CV von 5,8-Dihydroxy-2,3-bisphenylselenyl-1,4-Naphthochinon (Chinon-
Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 250$ mV/s,
mit N_2 gespült..... 161

Abbildung 143: Strukturformel von 2,6-Bis(phenylselenyl)cyclohexa-2,5-dien-1,4-dion 162

Abbildung 144: CV von 2,6-Bis(phenylselenyl)cyclohexa-2,5-dien-1,4-dion, Glaskohlenstoff
als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 10$ mV/s, mit N_2 gespült ($E_p=$
 $+38$ mV; $E_a= +100$ mV; $\Delta E= 138$ mV). 162

Abbildung 145: CV von 2,6-Bis(phenylselenyl)cyclohexa-2,5-dien-1,4-dion (Chinon-Bereich),
Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 250$ mV/s, mit N_2
gespült ($E_p= +42$ mV; $E_a= +133$ mV; $\Delta E= 175$ mV). 163

Abbildung 146: Strukturformel von 2-Methyl-3-phenylselenyl-1,4-Naphthochinon 165

Abbildung 147: CV von 2-Methyl-3-phenyltelenyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 50$ mV/s, mit N_2 gespült ($E_p= -336$ mV; $E_{a1}= -128$ mV, $E_{a2}= -801$ mV; $\Delta E_1= 208$ mV, $\Delta E_2= 1137$ mV).....	166
Abbildung 148: CV von 2-Methyl-3-phenyltelenyl-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 50$ mV/s, mit N_2 gespült ($E_p= -421$ mV; $E_a= -51$ mV; $\Delta E= 370$ mV).....	166
Abbildung 149: Reduktion von Peroxiden durch GPx und GSH.....	168
Abbildung 150: Reduktion von RSSR durch Glutathion-Reduktase mithilfe von NADPH	168
Abbildung 151: Ausschnitt aus dem komplexen Zusammenspiel.....	169
Abbildung 152: Strukturformel von 2,3-Bisphenyltelenyl-1,4-Naphthochinon	169
Abbildung 153: CV von 2,3-Bisphenyltelenyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 100$ mV/s, mit N_2 gespült ($E_p= -320$ mV; $E_{a1}= -46$ mV, $E_{a2}= +464$ mV; $\Delta E_1= 274$ mV, $\Delta E_2= 784$ mV).....	170
Abbildung 154: CV von 2,3-Bisphenyltelenyl-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 100$ mV/s, mit N_2 gespült ($E_p= -386$ mV; $E_a= -16$ mV; $\Delta E= 370$ mV).....	170
Abbildung 155: Strukturformel von 2-((Hydroxyphenyl)telenyl)-3-methyl-1,4-Naphthochinon	171
Abbildung 156: CV von 2-((Hydroxyphenyl)telenyl)-3-methyl-1,4-Naphthochinon, Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 500$ mV/s, mit N_2 gespült ($E_p= -353$ mV; $E_{a1}= -158$ mV, $E_{a2}= +592$ mV, $E_{a3}= +820$ mV; $\Delta E_1= 195$ mV, $\Delta E_2= 945$ mV, $\Delta E_3= 1173$ mV).....	171
Abbildung 157: CV von 2-((Hydroxyphenyl)telenyl)-3-methyl-1,4-Naphthochinon (Chinon-Bereich), Glaskohlenstoff als AE, MeOH; Phosphatpuffer pH 7,4; $v= 100$ mV/s, mit N_2 gespült ($E_p= -419$ mV; $E_a= -138$ mV; $\Delta E= 281$ mV).	172
Abbildung 158: Strukturformel des Allicins.....	173
Abbildung 159: Biosynthese von Allicin, Zerfall zu Polysulfide (Alliin (4); Allicin (3); Allylmercaptan (5); Pseudoallicin (6)) ^[95]	174

Abbildung 160: Strukturformel von DAS	176
Abbildung 161: CV von DAS, HMDE als AE, 33 % MeOH, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 200 mV/s, mit N ₂ gespült.....	176
Abbildung 162: Strukturformel von DADS.....	177
Abbildung 163: CV von DADS, HMDE als AE, 33 % MeOH, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 200 mV/s, mit N ₂ gespült.....	177
Abbildung 164: Strukturformel von Diallyltrisulfid	178
Abbildung 165: CV von Diallyltrisulfid, HMDE als AE, 33 % MeOH, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 200 mV/s, mit N ₂ gespült.....	178
Abbildung 166: Redoxverhalten von DATS.....	179
Abbildung 167: Strukturformel von DATTS	180
Abbildung 168: CV von DATTS, HMDE als AE, 33 % MeOH, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 200 mV/s, mit N ₂ gespült.....	180
Abbildung 169: Redoxverhalten von DATTS	181
Abbildung 170: Übersichtstabelle Diallylsulfide, biologische Aktivität wurde an Caco-2-Zellen und im NBT-Assay bestimmt. ^[97]	181
Abbildung 171: Verschiebung der E _{pa} und E _{pc} -Werte der einzelnen Sulfide durch unterschiedliche pH-Werte. ^[97]	182
Abbildung 172: Strukturformel von Dipropylmonosulfid.....	183
Abbildung 173: CV von Dipropylmonosulfid, HMDE als AE, 33 % MeOH, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 200 mV/s, mit N ₂ gespült	183
Abbildung 174: Strukturformel von Dipropyldisulfid.....	184
Abbildung 175: CV von Dipropyldisulfid, HMDE als AE, 33 % MeOH, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 200 mV/s, mit N ₂ gespült	184
Abbildung 176: Strukturformel von Dipropytrisulfid	185
Abbildung 177: CV von Dipropytrisulfid, HMDE als AE, 33 % MeOH, Phosphatpuffer pH 7,4; v= 200 mV/s, mit N ₂ gespült.....	185
Abbildung 178: Strukturformel von Dipropyltetrasulfid	186

Abbildung 179: CV von Dipropyltetrasulfid, HMDE als AE, 33 % MeOH, Phosphatpuffer pH 7,4; $v = 200$ mV/s, mit N_2 gespült	186
Abbildung 180: Überblick über natürlich vorkommende Reaktive-Schwefel-Spezies (RSS), ihre Oxidationszahlen, ihr Vorkommen, und ihre Reaktivität. ^[97]	187
Abbildung 181: Dreieckspannungsdiagramme von MeOH, Formaldehyd und Ameisensäure (alle 1 M) an Platin in 1 N H_2SO_4 bzw. 1 N KOH, 20 °C, entlüftete Lösung, $v = 50$ mV/s. ^[28]	191
Abbildung 182: Diagramm DPP; Anlage einer Treppenspannung und Aufnahme der Stromstärke	195
Abbildung 183: Darstellung eines monofrequenten, linear polarisierten Strahls ^[27]	199
Abbildung 184: Varian Cary 50 UV-Vis ^[98]	201
Abbildung 185: Struktur von Acrylamid (links) und <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid (rechts)	203
Abbildung 186: Strukturen von TEMED (links) und APS (rechts)	204
Abbildung 187: Radikalbildung von APS	204
Abbildung 188: Bildung des Polyacrylamid-Gels	205
Abbildung 189: Bio-Rad Elektrophoreskammer und Zubehör	206
Abbildung 190: Struktur von Bromphenolblau	207
Abbildung 191: Coomassie-Blau	207
Abbildung 192: Lichtmikroskopische Aufnahme von SF; Größe etwa 0,8 mm; Vergrößerung 40-fach	211

7. Auflistung der verwendeten Geräte und Chemikalien

Allgemeine Chemikalien:

Agar-Agar Pulver	Art.Nr: 4508.1; Carl Roth GmbH & Co.KG
Albumin Bovine	CAS Nr: 9048-46-8, Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ammoniumpersulfat	CAS Nr: 7727-54-0; Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ampicillin Natriumsalz 99 %	CAS Nr: 69-52-3; Carl Roth GmbH & Co.KG
Bromphenolblau	CAS Nr: 62625-28-9; Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Chelex 100	Art. Nr: C7901-25G; Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Collagen (Kalbshaut)	CAS Nr: 9007-34-5; Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Cytochrom c (Rinderherz)	CAS Nr: 108021-98-3; Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dibenzoylperoxid	CAS Nr: 94-36-0; ZChL der UdS
Dikaliumhydrogenphosphat	CAS Nr: 16788-57-1; Merck KGaA
<i>N,N</i> -Dimethylformamide	CAS Nr: 68-12-2; Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dimethylsulfoxid 99,8 %	CAS Nr: 67-88-5, Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Essigsäure	Art. Nr: 702543; ZChL der UdS
Ethanol absolut, puriss p.a.	CAS Nr: 64-17-5; VWR International GmbH
Ferrocen 98%	Art. Nr.; Acros Organics
Glycerol (Glycerin) 87%	CAS Nr: 56-81-5; Riedel-de Haën

Kapitel 7. Auflistung der verwendeten Geräte und Chemikalien

Glycin ≥99%	Art. Nr: 3908.2; Carl Roth GmbH & Co.KG
Graphitstab (Elektrode)	CAS Nr: 7782-42-5; Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hämocyanin (<i>Limulus polyphemus</i>)	CAS Nr: 9013-72-3; Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hämoglobin (Human)	Art. Nr: H7379-1G; Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hefeextrakt	Art.Nr: 70161; Fluka Analytical
Isopropanol	CAS Nr: 67-63-0; ZChL der UdS
Kaliumdihydrogenphosphat	CAS Nr: 7778-77-0; Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kaliumchlorid	CAS: 7447-40-7; Grüssing GmbH
Kaliumsuperoxid 96,5 %	CAS Nr: 12030-88-5; Alfa Aesar
2-Mercaptoethanol	CAS Nr: 60-24-2; ZChL der UdS
Methanol >99,8 %	CAS Nr: 67-56-1; VWR International GmbH
Myoglobin (Pferdeherz)	CAS Nr: 100684-32-0; Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumchlorid	Art.Nr: 1.06404.1000; VWR International GmbH
Natriumsuperoxid	CAS Nr: 12034-12-7; ZChL der UdS
Peptonpulver	Ref.: 211677; BD Bacto™ Pepton
(-)-Riboflavin	CAS Nr: 83-88-5; Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Rose Bengal	CAS Nr: 632-69-9; Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Rotiphorese®Gel 30(37,5:1)	Art. Nr: 3029.1; Carl Roth GmbH & Co.KG
Salpetersäure Normapur	CAS Nr: 7697-37-2; VWR International GmbH
Schwefelsäure Normapur	CAS Nr: 7664-93-9; VWR International GmbH

Kapitel 7. Auflistung der verwendeten Geräte und Chemikalien

SDS (ultra pure)	Art. Nr: 2326.2; Carl Roth GmbH & Co.KG
SigmaMarker™, Wide Range	Art. Nr.: S8445-1VL; Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Superoxid Dismutase	Art. Nr. 86200; Sigma-Aldrich Chemie GmbH
TEMED 99%	CAS NR: 110-18-9; Acros Organics
Tris(Hydroxymethyl)aminomethan	CAS Nr: 77-86-1; Acros Organics
Wasserstoffperoxid 35%	CAS Nr: 7722-84-1; Acros Organics

Allgemeine Gerätschaften:

Abdeckung Reaktionsgefäß (CV)	Art. Nr: MR-3839; BAS
Autoklav	Varioklav H+P 75 S; Thermo Fisher Scientific
C3-Zell-Stand	Art. Nr: EF-1085; BAS
CGME Zell-Stand	Art. Nr: EF-1400; BAS
Drigalsky Spatel (Einweg)	Art.Nr: 391-3019; VWR International GmbH
Elektrophoresekammer	mini-Protean®; Bio-Rad Laboratories, Inc.
Glaskohlenstoffelektrode für CV	Art. Nr: MF-2012; BAS
Glasplatten mit Spacer	BioRad 0,75 mm; Bio-Rad Laboratories, Inc.
Goldelektrode für CV	Art. Nr: MF-2014; BAS
Heizblock	Grant Boekel BBA2
Impfösen (Einweg)	Art.Nr: DIFC220217; VWR International GmbH
Inkubator	Forma Direct Heat CO ₂ ; Thermo Fisher Scientific
Labor Netzgerät EA-4003	Elektro Automatik Viersen; Art. Nr: 02100108
Milli-Q-Anlage	Millipore Direct-Q® 3UV
Milli-Q-Filter	Millipore SmartPak® DQ3
Petrischalen	Art.Nr: 7-1016; neoLab Laborbedarf-Vertriebs GmbH
Pipetten	Pipetman; Gilson, Inc.
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co.
pH-Meter	HI 8424; Hanna Instruments

Kapitel 7. Auflistung der verwendeten Geräte und Chemikalien

pH-Meter Elektrode	Art. Nr: 662-1788; VWR International GmbH
Platindrahtelektrode für CV	Art. Nr: MW-1032; BAS
Platinspiralelektrode für CV	Art. Nr: MW-1033; BAS
Potentiostat C3 Cell Stand	BAS 100B/W; BAS
Potentiostat CGME Stand	BAS 50W; BAS
Quarzküvette QS 10 mm	Hellma, Typ 104-QS
Reaktionsgefäß für CV	Art. Nr: MR-1208; BAS
Rüttelplatte	Titramax 1000; Heidolph Instruments
Schüttelinkubator ES-20	Art. Nr: GRANES-20; VWR International GmbH
Sephadex™ G25 Säulen, PD-10	Art Nr: 17-0851-01; Amersham Biosciences
Sicherheitswerkbank	Holton Safe 2010; Thermo Fisher Scientific
Silberelektrode für CV	Art. Nr: MF-2011; BAS
Silber/Silberchloridelektrode (CV)	Art.Nr: MF-2052; BAS
Spannungsgeber SDS-PAGE	peqPOWER 300V; PEQLAB Biotechnologie GmbH
Trockenschrank Binder ED 53	Art. Nr: 466-3269; VWR International GmbH
UV/Vis-Spektrophotometer	Cary 50 Bio, C10809; Varian Inc.
Vortex	WhirliMixer™; Fisherbrand
Waage (Fein)	Sartorius C11077
Waage (ab 1Gramm)	Kern PLJ 360-3M

8. Eigene Publikationen

Während des Zeitraumes zur Durchführung dieser hier vorliegenden Dissertationsschrift wurden mehrere Publikationen unter meiner Mitwirkung angefertigt.

2010

- [1] C. Busch, C. Jacob, A. Anwar, T. Burkholz, L.A. Ba, C. Cerella, M. Diederich, W. Brandt, L. Wessjohann and M. Montenarh, Diallylpolysulfides induce growth arrest and apoptosis, *International Journal of Oncology* (2010).

2009

- [2] H. A. Mohammed, L.A. Ba, **T. Burkholz**, E. Schumann, B. Diesel, J. Zapp, A.K. Kiemer, C. Ries, R.W. Hartmann, M. Hosny and C. Jacob, From Chrysin to tricyclic chromene-flavones: Synthesis of aromatase inhibitors with cytotoxicity against HL-60 cells, eingereicht bei Nat. Prod. Comm. (2009).
- [3] S. Mecklenburg, S. Shaaban, L.A. Ba, **T. Burkholz**, T. Schneider, B. Diesel, A.K. Kiemer, A. Röseler, K. Becker, J. Reichrath, A. Stark, W. Tilgen, M. Abbas, L.A. Wessjohann and C. Jacob, Exploring synthetic avenues for the effective synthesis of tellurium containing multifunctional redox agents, *Organic and Biomolecular Chemistry* (2009).
- [4] S. Shabaan, M. Abbas, L.A. Ba, **T. Burkholz**, A. Denkert, A. Gohr, L.A. Wessjohann, F. Sasse, W. Weber and C. Jacob, Multicomponent reactions for the synthesis of multifunctional redox agents with biological activity against cancer cells, *Chemical Communications* (2009).
- [5] L.A. Ba, M. Döring, **T. Burkholz** and C. Jacob, Metal trafficking: From maintaining the metal homeostasis to future drug design, *Metallomics* (2009).

- [6] C. Jacob, M. Döring and **T. Burkholz**, The chemical BASs of biological redox-control, in C. Jacob, P.G. Winyard, *Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine*, Weinheim: Wiley-VCH, (2009).

2008

- [7] S. Mecklenburg, C.A. Collins, M. Döring, **T. Burkholz**, M. Abbas, F.H. Fry, C. Pourzand and C. Jacob, The Design of Multifunctional Antioxidants Against the Damaging Ingredients of Oxidative Stress, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the related elements* **183**, 863-888 (2008).
- [8] A. Anwar, **T. Burkholz**, C. Scherer, M. Abbas, C. M. Lehr, M. Diederich and C. Jacob Naturally Occurring Reactive Sulfur Species, their Implications for Cancer Therapy and Possible Modes of Biochemical Action, *Journal of Sulfur Chemistry* **29**, 251-268 (2008).
- [9] C. Jacob, A. Anwar and **T. Burkholz**, Perspective on recent developments on sulfur containing agents and hydrogen sulfide signalling, *Planta Medica*, **74**, 1580-1592 (2008).

Des Weiteren erfolgte eine aktive Teilnahme (oral communication) an den folgenden internationalen Konferenzen:

- [1] **T. Burkholz**, C. Jacob, Natural Products and their Mimics: Biocatalysts as BASs for the Development of Innovative Sensor/Effector Molecules, Smart Antioxidants and Green Pesticides, 2. EuCheMS Chemistry Congress – The Global Science, Turin (2008).
- [2] **T. Burkholz**, C. Jacob, Sensor/Effektor Wirkstoffe mit selektiver Wirkung gegen Krebszellen, Jahrestagung der DPhG, Universität Erlangen (2007).

Innerhalb des Rahmens meiner Doktorarbeit wurden unter meiner Mitwirkung/Beteiligung folgende EU-Projekte erfolgreich beantragt und gestartet:

1. "RedCat" - Marie Curie ITN in the FP7 People Programme (01.12.2008 - 30.11.2012), Grant Agreement No 215009

2. "CORENA" - Coopération territoriale européenne 2007 - 2013 Programme opérationnel de coopération transfrontalière INTERREG IVA « Grande Région »(01.04.2009 - 31.03.2012)

9. Curriculum Vitae

Torsten Burkholz

Schulstr. 25 - D-66640 Namborn - Tel. +49160 93870746 - E-Mail: t.burkholz@mx.uni-saarland.de

Personal Data

Date/Place of birth: 13.02.1979 in Saarlouis, Germany
Marital status: Married
Nationality: German



University Education

- 01.10.2006 to date PhD student at the Division of Pharmacy, Bioorganic Chemistry, University of Saarland
thesis entitled: 'Oxidative stress and electrochemical procedure for surface decontamination in dialysis'
- 27.07.2006 Diplom in chemistry, University of Saarland
- 30.01.06 – 30.07.06 Diplom thesis (equivalent of a Master degree 5-year) at the 'Institut für Anorganische und Analytische Chemie und Radiochemie (IAARC)' at the School of chemistry, University of Saarland
- Topic: 'Electrochemical procedure in online analytics of heavy metals in surface water'
- 2005 – 2006 Research project in inorganic solid state chemistry (synthesis of apatite mimics)
- 2003 Medicinal Chemistry studied as an optional subject at the School of Pharmacy, University of Saarland

Language skills

- German native language
- English Excellent communication, reading and writing skills
English is used working language within the research laboratory
- French basic knowledge

Skills/ Expertise

- Synthetic Chemistry Research project in inorganic solid state chemistry; Excellent skills in organic synthesis (Ugi, Passerini), working under air and water free conditions
- Analytical Chemistry ICP-MS, ICP-OES, AAS, HPLC, LC-MS, NMR, GC, UV-Vis, FT-IR, SDS-PAGE
- Electrochemistry Familiar with a rich range of techniques, e.g. Cyclic Voltammetry (CV), Time Based Technics (TB), Differential Pulse Polarography (DPP), Differential Pulse Adsorptive Stripping Voltammetry (DPAdSV)
- IT Excellent knowledge in different Operating Systems (Windows XP, Vista, 7, Linux), MS Office, Open Office, End Note
Regular use of Chemical Software, including ChemDraw, Isis Draw, Bruker Topspin, MathType, SciFinder
- Supervisory skills Supervisor of undergraduate diploma projects.
Supervisor of 5 students during their research internship

Principal tutor in Inorganic and Analytical Chemistry for 1st year students in Pharmacy

Officer in charge of the Inorganic and Analytical laboratory in Pharmacy
- Project Management Project Officer and Coordinator of two EU-Projects
1. "RedCat" - Marie Curie ITN in the FP7 People Programme (01.12.2008 - 30.11.2012), Grant Agreement No 215009

2. "CORENA" - Coopération territoriale européenne 2007-2013
Programme opérationnel de coopération transfrontalière
INTERREG IVA « Grande Région »(01.04.2009 - 31.03.2012)

Social activity

Membership of Professional Societies: German Chemical Society (GDCh), Royal Society of Chemistry (MRSC), Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), British Inflammation Research Association (BIRAs)