

**Untersuchungen der strukturellen und funktionellen
Interaktionen zwischen *trans*-Resveratrol und der
Albuminhülle eines künstlichen Sauerstoffträgers auf
Perfluordecalinbasis**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

Vorgelegt von

Ozan Karaman

geboren in Duisburg

Institut für Physiologische Chemie
Universität Duisburg-Essen

2023

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juni 2019 bis Februar 2023 am Institut für Physiologische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 17.07.2023

Vorsitzender: Prof. Dr. Eckhard Spohr

Erstgutachter: Prof. Dr. Katja Bettina Ferenz

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Kirsch

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
D U I S B U R G
E S S E N

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/78772

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20230726-072210-7

Alle Rechte vorbehalten.

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Sozioökonomische Bedeutung artifizierter Sauerstoffträger.....	1
1.2 Perfluorcarbon als Sauerstoffträger.....	2
1.3 Emulsionen	4
1.4 Prinzip der Hochdruckhomogenisierung.....	6
1.5 Bovines Serumalbumin	8
1.6 Resveratrol	9
1.7 Interaktion zwischen BSA und <i>trans</i> -Resveratrol.....	12
1.8 Ischämie-Reperfusionsschaden	13
1.8.1 Ischämie-Reperfusionsschäden in der Organtransplantation.....	14
1.9 Zielsetzung	16
2. Material und Methoden.....	17
2.1 Chemikalien	17
2.2 Geräte.....	19
2.3 Verbrauchsmaterialien	21
2.4 Medien und Puffer.....	22
2.5 Kits.....	25
2.6 Antikörper	25
Primärantikörper.....	25
Sekundärantikörper	25
2.7 Software	26
2.8 Allgemeine Partikel- und Syntheseanalysen	26
2.8.1 Synthese des artifizierten Sauerstoffträgers (A-AOC)	26
2.8.2 Aufreinigung der Partikelsynthese	27
2.8.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)	28
2.8.4 Sauerstoffkapazitätsbestimmung mithilfe eines Oxygraphen	29
2.8.5 Rheologische Bestimmung von Viskosität und Schubspannung	30
2.8.6 UV/Vis Photometrie	30
2.8.7 Bromkresolgrün-Färbung (BKG).....	30

2.9 Methoden zur Analyse der Proteinhülle.....	31
2.9.1 CD-Spektroskopie	31
2.9.2 Analyse des Tryptophanquenenchings	31
2.9.3 Ermittlung des Zeta-Potentials.....	31
2.9.4 Quantifizierung von Sulfhydryl-/Thiolgruppen	32
2.9.5 Blockierung von Sulfhydryl-/Thiolgruppen.....	33
2.9.6 Untersuchung hydrophober Regionen des Albumins	33
2.10 Untersuchungen der A-AOC-tRES-Interaktion	34
2.10.1 Bestimmung der maximalen tRES-Löslichkeit	34
2.10.2 Beladung des artifiziellen Sauerstoffträgers mit <i>trans</i> -Resveratrol	34
2.10.3 Freisetzungskinetik von <i>trans</i> -Resveratrol	35
2.10.4 ABTS-Decolorisierungsassay	35
2.10.5 SIN-1-Chemilumineszenz-Assay	36
2.11 Zellkulturelle Methoden	37
2.11.1 Auftauen, Kultivierung und Passage der HL-1 Zelllinie	37
2.11.2 Durchführung einer <i>in vitro</i> Ischämie-Reperfusion-Simulation.....	38
2.11.3 Oxygenierung von Partikeln.....	39
2.11.4 Ermittlung des Sauerstofftransports im Insertsystem	39
2.11.5 Untersuchung der HIF-1 α -Stabilisierung in HL-1-Zellen.....	40
2.11.6 Einfluss oxygenierter Partikel auf HIF-1 α -Akkumulation	40
2.11.7 Gewinnung von Proteinlysaten	40
2.11.8 Bestimmung der Proteinkonzentration	41
2.11.9 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page).....	41
2.11.10 Western Blot-Analyse	42
2.11.11 Quantifizierung von intrazellulärem oxidativem Stress	43
2.11.12 Cytotoxizitätsmessungen.....	43
2.11.13 Exposition von HL-1-Zellen gegenüber der Glucoseoxidase.....	44
3. Resultate	46
3.1 Vorversuche.....	46
3.1.1 Interaktion zwischen Standardsynthese und <i>trans</i> -Resveratrol.....	46

3.1.2 Antioxidative Eigenschaften der Standardsynthese	47
3.2 Etablierung und Wechsel zur modifizierten Kaltsynthese	49
3.2.1 Aufreinigung der MOK-Synthese und Beladung mit tRES.....	50
3.2.2 Freisetzungskinetik von gebundenem <i>trans</i> -Resveratrol.....	54
3.2.3 Charakterisierung der Partikel	55
3.3 Funktionelle Untersuchungen der antioxidativen Eigenschaften.....	59
3.3.1 ABTS-Decolorisationsassay der MOK-Synthese	59
3.3.2 Chemilumineszenzassay zur Evaluierung der antioxidativen Kapazität	61
3.3.3 Untersuchungen der Proteinhülle des künstlichen Sauerstoffträgers	62
3.3.4 <i>Quenching</i> der Tryptophanfluoreszenz	64
3.3.5 Untersuchungen der hydrophoben Domänen und Zustand der Disulfidbrücken ...	65
3.4 Zellkultur	67
3.4.1 Evaluierung antioxidativer Effekte in Zellkultur	68
3.4.2 <i>In vitro</i> Ischämie-Reperusionsmodell	69
4. Diskussion.....	76
4.1 Einfluss der Syntheseart auf die Partikelgröße.....	76
4.2 Zusammenspiel von Viskosität und Zeta-Potential.....	79
4.3 Untersuchung der funktionellen Interaktion der Albuminhülle der A-AOC und tRES hinsichtlich antioxidativer Kapazität.....	81
4.3.1 ABTS-Decolorisationsassay	81
4.3.2 Chemilumineszenzassay	87
4.3.3 GOx-Exposition der HL-1-Kardiomyozyten	90
4.4 <i>In vitro</i> Ischämie-Reperusionsmodell	92
4.4.1 Sauerstoffversorgung der HL-1-Kardiomyozyten im Insertmodell	92
4.4.2 Evaluierung der I/R-Schäden der HL-1-Zellen	93
4.4.3 Einsatz oxygenierter A-AOC in der <i>in vitro</i> I/R-Simulation.....	94
5. Fazit	96
6. Ausblick.....	97
7. Zusammenfassung.....	98
8. Referenzen.....	100

9. Anhang.....	120
9.1 Danksagung.....	122
9.2 Lebenslauf	123
9.3 Publikationen	125
9.4 Posterpräsentationen	125
9.5 Erklärung	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sauerstofftransport durch Blut und PFC:.....	3
Abbildung 2 Y-Interaktionskammer:.....	8
Abbildung 3 Graphische Gegenüberstellung des trans- und cis-Resveratrols.....	10
Abbildung 4: Photometrische Untersuchung der tRES-A-AOC-Interaktion.....	47
Abbildung 5: ABTS-Decolorisierungsassay unter Verwendung einer Enzymkaskade.....	48
Abbildung 6: ABTS-Decolorisationsassay mit Standardsynthese.....	49
Abbildung 7: Visueller Vergleich der Standard- (links) und MOK-Synthese (rechts).....	49
Abbildung 8: Effizienz des neuen Aufreinigungsprotokolls.....	50
Abbildung 9: tRES-Freisetzung in Abhängigkeit der Zentrifugationskräfte.....	51
Abbildung 10: Als Proteinhülle vorliegende Albuminkonzentration.....	52
Abbildung 11 oxygraphische Untersuchung potenziellen Partikelverlusts:.....	53
Abbildung 12 tRES-Freisetzungskinetik:.....	54
Abbildung 13 Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser verwendeter Synthesen:.....	56
Abbildung 14 Polydispersitätsindex genutzter Synthesewege:.....	57
Abbildung 15 Scherviskosität verschiedener Partikelsynthese und -präparationen.....	58
Abbildung 16 Zeta-Potenzial der MOK-Synthese:.....	59
Abbildung 17 ABTS-Decolorisationsassay mit der MOK-Synthese:.....	60
Abbildung 18 Lumineszenzassay zur Beurteilung antioxidativer Kapazitäten:.....	61
Abbildung 19 Graphische Darstellung der Elliptizität:.....	62
Abbildung 20 Emissionsspektrum des freien BSA.....	64
Abbildung 21 Emissionsspektrum der MOK-Partikeln.....	65
Abbildung 22 Auswertung des ANS-Assays.....	66
Abbildung 23 Auswertung der mBBR-Behandlung.....	67
Abbildung 24 Graphische Zusammenfassung des verwendeten Zellkulturmodells.....	68
Abbildung 25 CTCF der GOx exponierten HL-1-Zellen.....	69
Abbildung 26 HIF-1 α -Akkumulation in HL-1-Zellen.....	70
Abbildung 27 Sauerstofftransport durch Insertmembran.....	71
Abbildung 28 Western-Blot Analyse der HIF-1 α -Destabilisierung.....	72
Abbildung 29 Evaluierung des zellulären I/R-Schadens.....	73
Abbildung 30 LDH-Freisetzung und clCaspase 3-Akkumulation in Anwesenheit von A-AOC.....	75
Abbildung 31 Idealer Kurvenverlauf verschiedener rheologischer Eigenschaften.....	80
Abbildung 32 Gesonderte Darstellung des MHD und PDI der Standardsynthese.....	120
Abbildung 33 Gesonderte Darstellung des MHD und PDI der MOK-Synthese.....	120
Abbildung 34 Western Blot-Analyse der GOx-Exposition.....	121

Abkürzungen (alphabetisch geordnet)

A	Amper
A-AOC	<i>albumin derived artificial oxygen carrier</i>
ABTS	2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz
ABTS ⁺	ABTS-Radikalkation
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
ANS	8-Anilino-1-naphthalin-sulfonsäure- Ammoniumsalz
AOC	<i>artificial oxygen carrier</i> , künstliche Sauerstoffträger
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CD	<i>circular dichroism</i> , zirkulärer Dichroismus
clCasp 3	<i>cleaved Caspase 3</i> (proteolytisch prozessierte Caspase 3)
CTCF	<i>corrected total cell fluorescence</i> ,
Cys	Cystein
Da	Dalton
DLS	<i>dynamic light scattering</i> , dynamische Lichtstreuung´
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Erythrozytenkonzentrat
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fetales Kälberserum
GOx	Glucose-Oxidase
HAT	<i>hydrogen atom transfer</i>
HBOC	<i>hemoglobin-based oxygen carrier</i>
HOX	Hypoxie
hPA	Hektopascal
HPH	<i>high-pressure homogenization</i> , Hochdruckhomogenisierung
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
I/R	Ischämie/Reperfusion
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphospat
mBBr	Monobromobiman
MOK	modifizierte Kaltsynthese
mV	Millivolt
NEM	N-Ethylmaleimid
NOX	Normoxie
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte saline Lösung

PDI	Polydispersitätsindex
PFC	Perfluorcarbon
PFD	Perfluordecalin
PI	Proteaseinhibitor
Psi	<i>pounds per square inch</i> (1 psi \triangleq 6894,76 Pascal)
RCF	<i>relative centrifuge force</i> , relative Zentrifugationskraft
RESLOC	<i>resveratrol loaded oxygen carrier</i> , Resveratrol beladene künstliche Sauerstoffträger
RLU	<i>relative light unit</i> , relative Lichteinheit
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	<i>rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SAXS	<i>small-angle X-ray scattering</i> , Kleinwinkel-Röntgenstreuung
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SPLET	<i>sequential proton loss electron transfer</i>
SS	Standardsynthese
TBS	Tris gepufferte Salinlösung
tRES	<i>trans</i> -Resveratrol
Trp	Tryptophan
U	Units (Maßeinheit der Enzymaktivität)
V	Volt
WB	Western Blot

Die Verwendung kursiver Schrift dient der Darstellung fremdsprachiger Begriffe und chemischen Konfigurationsdeskriptoren im Text

1. Einleitung

1.1 Sozioökonomische Bedeutung artifizierlicher Sauerstoffträger

Aus Blutspenden gewonnene Erythrozytenkonzentrate (EK), die in operativen Eingriffen und medizinischen Notfällen die Aufrechterhaltung von vitalen Körperfunktionen gewährleisten sollen, stellen in unterschiedlichsten klinischen Szenarien eine unverzichtbare Ressource dar. Statistische Analysen prognostizieren jedoch einen Rückgang in der Zahl und Qualität von Blutspenden und somit verfügbaren EKs, während der Bedarf weiterhin zunimmt^{1,2}. Dieser Umstand resultiert aus verschiedenen Faktoren:

Im Zuge der letzten Dekaden ereignete sich ein demographischer Wandel, der eine Zunahme der älteren Bevölkerungsschichten der Gesellschaft zur Folge hatte. Diese repräsentieren die primäre Empfängergruppe von Blutspenden. So erhielten Patienten über 65 Jahren mehr als 50% der Bluttransfusionen. Aufgrund des sich abzeichnenden demographischen Trends wird in den nächsten 30 Jahren eine Verdopplung dieser Gruppe stattfinden. Gleichzeitig verringert sich der Anteil spendefähiger, jüngerer Menschen an der Gesellschaft und somit die primäre Spendergruppe. Daraus ergibt sich eine starke Verknappung verfügbarer EKs, vor allem in Krisenzuständen wie Krieg und Naturkatastrophen, und zusätzlich ökonomische Probleme, wie der Preisanstieg für EK-Einheiten. Im Jahre 2030 wird ein Defizit von 40 Mio. EK-Einheiten prognostiziert¹⁻⁴.

Zusätzlich zu den oben erwähnten sozioökonomischen Schwierigkeiten, weisen Blutspenden und EKs Eigenschaften auf, die unerwünschte Nebenwirkungen mit sich ziehen und ihre klinische Verwendung somit einschränken. Komplikationen, die auf eine Bluttransfusion folgen reichen von immunologischen Reaktionen, pulmonalen Läsionen, akuten Transfusionsreaktionen bis zu hämolytischen Reaktionen und Volumenüberlast^{1,2}. Auch die Übertragung von bakteriellen und viralen Infektionen sowie Kontaminationen allgemeiner Natur stellen noch ein Problem dar^{1,2}. Neu auftretende Erkrankungen, die humoral übertragen werden können, treiben den Preis eines EKs weiter in die Höhe, da zusätzliche Analysen entwickelt und vor Gebrauch durchgeführt werden müssen³. Auch die langfristige Lagerung von EKs stellt eine Herausforderung dar, da diese mit dem sogenannten *storage lesion effect* einhergeht^{5,6}: Während der Lagerungsperiode nimmt die Flexibilität und Integrität der Erythrozytenmembranen ab. Die Erythrozyten verlieren Calcium und werden zunehmend anfälliger für Hämolysen^{5,6}. Bereits nach 42 Tagen fällt die Menge an 2,3-Bisphosphoglycerat unter die detektierbare Grenze und die Kapazität der Erythrozyten zur Sauerstoffabgabe reduziert sich drastisch⁴.

All die oben genannten Faktoren und Limitationen einer herkömmlichen Bluttransfusion führen vor Augen, mit welcher Dringlichkeit gleichwertige, therapeutische Alternativen benötigt werden. Das Forschungsfeld der artifizierlicher Sauerstoffträger verschrieb sich der Entwicklung

derartiger Alternativen, um die Abhängigkeit von herkömmlichen Bluttransfusionen zu reduzieren. Folgende Kriterien müssen durch ein Produkt erfüllt werden, um als idealer künstlicher Sauerstoffträger betrachtet zu werden:

Eine hinreichende Versorgung von Gewebe unter physiologischen Gasdrücken muss gewährleistet werden. Das Aufnahme- und Abgabeverhalten von physiologisch relevanten Gasen sollte idealerweise möglichst dem von Hämoglobin nachempfunden werden. Gleichzeitig sollte die Viskosität des Produktes der von Vollblut entsprechen oder niedriger als diese sein, um Beeinträchtigungen des Blutflusses (z.B. turbulente Strömung) zu vermeiden. Weiterhin muss ein Gleichgewicht zwischen Metabolisierung und Halbwertszeit gefunden werden. Der Abbau und die Eliminierung der Komponenten sollte vorzugsweise durch körpereigene, metabolische Prozesse erfolgen können. Erwünscht wäre ebenfalls eine kurze Retentionszeit. Jedoch sollte auch eine intravaskuläre Halbwertszeit vorliegen, die dem Produkt erlaubt, ausschlaggebende physiologische Effekte zu entfalten. Abschließend, sollten künstliche Sauerstoffträger längere Lagerungsperioden ohne Qualitätsverfall überstehen können. Eine komfortable Anwendung im Klinikalltag sollte vorliegen, die eine Stabilität bei Raumtemperatur (RT) und sofortige Verfügbarkeit in größeren Mengen einschließt^{4,7,8}.

Im Allgemeinen können künstliche Sauerstoffträger anhand ihrer sauerstofftransportierende Komponente unterschieden werden. Es erfolgt demnach eine Unterteilung in Sauerstoffträger auf Hämoglobinbasis (HBOC) und auf Pefluorcarbonbasis (PFCOCs). In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf den PFCOCs. Daher werden die Eigenschaften der Perfluorcarbone im folgenden Abschnitt detailliert beschrieben.

1.2 Perfluorcarbon als Sauerstoffträger

Perfluorcarbone (PFCs) stellen Kohlenstoffverbindungen dar, deren Wasserstoffe durch Halogenatome, hauptsächlich Fluor ersetzt wurden. PFCs sind nahezu metabolisch und chemisch inert, was bei einer *in vivo* Applikation die Formation von toxischen Metaboliten vorbeugt^{9,10}. Die Grundlage dieser Eigenschaft bilden die Kohlenstoff-Fluor-Bindungen, die mit einer Bindungsenergie 484 kJ/mol eine besonders hohe Stabilität und Polarität aufweist^{11,12}. Die innere Symmetrie des Moleküls führt zu einer Annullierung der Polarität der Kohlenstoff-Fluor-Bindungen, weswegen trotz hoher Polarität der einzelnen Bindungen das Gesamtkonstrukt nicht wasserlöslich ist¹¹. Zusätzlich nimmt auch die schiere Größe eines PFC-Moleküls Einfluss auf die Hydrophobizität und erhöht diese im Vergleich zum entsprechenden Ausgangsmolekül (Kohlenwasserstoff): durch ihre hohen molekularen Durchmesser nehmen sie mehr Raum im Wasser ein, wodurch das Netzwerk an

Wasserstoffbrückenbindungen gezwungen wäre, energetisch aufwändige und ungünstige Kavitäten um die sperrigen PFC-Moleküle zu bilden. Dies hätte eine massive Steigerung der

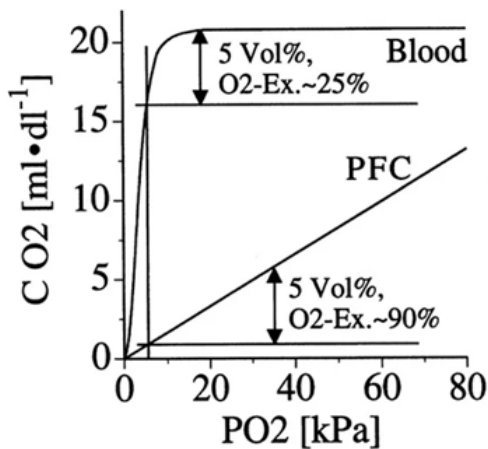


Abbildung 1: Sauerstofftransport durch Blut und PFC:

Graphische Gegenüberstellung der Sauerstoffdissoziation und -extraktion von Blut und einer PFC-Emulsion. Grafik entnommen aus Spahn et al.¹⁶

Hydratisierungsenergie für PFCs zur Folge. Der Mangel an alternativen, energetisch günstigen Interaktionen zwischen PFC-Oberfläche und Wasser können die thermodynamisch aufwändige Hydratisierung des PFCs nicht ausgleichen. Weiterhin, sorgt die sich zwischen Kohlenstoff- und Halogenatom ergebende extreme Polarität dafür, dass Solvenzien nicht imstande sind, Dipole zu induzieren. Dadurch ergibt sich eine drastische Reduktion der van der Waals Kräfte zwischen PFC und Solvent, welche vor allem für die Löslichkeit in unpolaren Lösungsmitteln von Bedeutung sind¹²⁻¹⁴. Somit zeichnen sich PFC dank ihrer strukturellen und chemischen Besonderheiten sowohl durch eine Lipo- als auch eine Hydrophobizität aus¹¹.

Dieselben Eigenschaften, welche in minimalen PFC-Solvent-Interaktionen resultieren, gewähren PFCs eine hohe Löslichkeit physiologisch relevanter Gase, die in linearer Korrelation zu den Partialdrücken des vorliegenden Gases steht (Abbildung 1). Als mathematisches Modell kann hierfür das Henry-Dalton-Gesetz verwendet werden^{11,12}:

$$[A] = K \cdot p_A$$

[A] = Konzentration des Gases im Lösungsmittel in mol/L; K = Verteilungskoeffizient; p_A = Partialdruck in bar

Im Kontrast zu Hämoglobin ereignet sich keine chemische Bindung des zu transportierenden Gases. PFCs sind imstande Gase physikalisch zu lösen, wodurch eine Sättigung des Systems nicht auftritt. Ermöglicht wird das durch die niedrige molekulare Dichte von PFCs, die auf geringe Polarisierbarkeit der Fluoratome basiert. Diese geringe Polarisierbarkeit translatiert in schwache van der Waals-Interaktionen zwischen PFC-Molekülen, da diese in direkter Abhängigkeit mit Fluktuationen in der Polarität der Elektronenwolken stehen. Da van der Waals-Interaktionen die einzigen intermolekularen Kräfte sind, die eine Kohäsion bei unpolaren Molekülen ermöglichen, stehen die intermolekulare Interaktionen der PFCs in einem starken Gegensatz zu ihren starken intramolekularen Bindungen. Dadurch verhalten sich PFCs wie nahezu ideale, gasähnliche Flüssigkeiten, die mit Leichtigkeit Kavitäten und tunnelartige Strukturen im intermolekularen Raum formen können. Dieser Effekt wird von der bereits erwähnten Größe der einzelnen Moleküle verstärkt. Die Hohlräume zwischen der PFC-Molekülen werden von Gasmolekülen besiedelt, die eine ähnliche Kohäsion wie das PFC-Fluid aufweisen und sich dort ungehindert bewegen können^{12,15,16}.

Da sich zwischen PFC- und Gasmolekülen nur schwache Wechselwirkungen ausbilden, ergibt sich eine hohe Extraktionsrate von 90%, was der dreifachen Menge der physiologischen Extraktionsrate von Hämoglobin entspricht. Die Aufnahme und Abgabe von Sauerstoff durch PFC erfolgt im Vergleich zu Hämoglobin doppelt so schnell und steht zusätzlich nicht unter dem Einfluss von pH-Wert und Temperatur, was eine konstante O₂-Versorgung unabhängig der vorliegenden Umstände ermöglicht¹⁷⁻¹⁹. PFCs eignen sich nicht nur für Sauerstofftransport, sondern sind auch imstande CO und N₂ zu lösen, womit sie im Falle der Dekompressionskrankheit oder CO-Intoxikationen eingesetzt werden können^{19,20}.

Die oben aufgeführten Punkte verdeutlichen, dass PFCs die ideale Basis für die Entwicklung artifizierlicher Sauerstoffträger darstellen. Jedoch muss PFC aufgrund seiner chemischen Eigenschaften in eine wasserlösliche Form überführt werden. Das gelingt durch das Prinzip der Emulsifikation, bei der Perfluorcarbone von einem Emulgator umschlossen und somit in dem wässrigen Milieu des Blutplasmas eingesetzt werden können. In dieser Arbeit kommen künstliche Sauerstoffträger zum Einsatz, deren Kern aus Perfluordecalin (PFD) besteht. Als Emulgator dient dabei das bovine Serumalbumin (BSA), weswegen die künstlichen Sauerstoffträger auch als *albumin derived artificial oxygen carriers* (A-AOC) bezeichnet werden.

1.3 Emulsionen

Emulsionen werden definiert als ein fluides kolloidales System, in welchem flüssige Tröpfchen oder Kristalle in einer weiteren Flüssigkeit dispergiert vorliegen. In dieser Arbeit gilt vor allem den Nanoemulsionen ein besonderes Interesse. Für die Begriffe der Mikro- und Nanoemulsion werden von der IUPAC keine klaren Definitionen vorgegeben. Im Allgemeinen kann jedoch anhand der jeweiligen Herstellungsprozesse eine Unterscheidung zwischen Mikro- und Nanoemulsionen vorgenommen werden. Um Nanoemulsionen zu erzeugen, ist der Einsatz von mechanischem Stress erforderlich, während eine spontane, lediglich von Thermodynamik getriebene Entstehung von Mikroemulsionen möglich ist. Diesem Umstand verdanken Mikroemulsionen eine höhere thermodynamische Stabilität²¹⁻²⁴. Zu den Charakteristika, die alle Definitionen einer Nanoemulsion teilen, gehören eine Partikelgröße von 10-100 nm, thermodynamische Instabilität bei gleichzeitiger kinetischer Stabilität und eine optische Transparenz^{23,25,26}.

Der Prozess zur Erzeugung einer Emulsion unterliegt thermodynamischen Gesetzen, die mathematisch mit einer Variante der Gibbs-Helmholtz-Gleichung dargestellt werden kann:

$$\Delta G = (\gamma A) - (\Delta S \cdot T)$$

ΔG = Gibbs-Enthalpie, γ = Oberflächenspannungsdifferenz an der Phasengrenze, A = Fläche der Phasengrenze,
 ΔS = Änderung der Entropie, T = Energie

Der Parameter der Gibbs-Enthalpie stellt ein Maß für die energetischen Kosten einer ablaufenden Reaktion dar. Ein negativer Wert der Gibbs-Enthalpie gibt an, dass eine Reaktion spontan ablaufen kann.

Während der Synthese einer Emulsion werden riesige Grenzflächen erzeugt, die beim Emulgierungsprozess das größte energetische Hindernis darstellen (s. Gibbs-Helmholtz-Gleichung). An den Grenzflächen liegt außerdem aufgrund der Abwesenheit von Wasserstoffbrücken-Akzeptoren eine hohe Oberflächenspannungsdifferenz vor, was die innere Energie des Systems erhöht. Im Falle der Perfluorcarbone wird die Oberflächenspannung der Tröpfchen sowohl von dem Molekulargewicht als auch von der Struktur des Moleküls determiniert²⁷. Durch den Einsatz von Emulgatoren kann dem Anstieg der inneren Energie während des Herstellungsprozesses entgegengewirkt werden. Denn Emulgatoren sind imstande, an die Grenzfläche zu adsorbieren und dort als Akzeptoren für Wasserstoffbrückenbindungen dienen, was wiederum die Oberflächendifferenz herabsenkt²⁸. Das Lösen von emulgierenden Substanzen führt zunächst zu einer Herabsenkung der Entropie eines Systems, da sich um die Emulgatoren Hydrathüllen formieren. Bei der Verwendung von Proteinen als Emulgatoren (z.B. BSA) treten während des Adsorptionsprozesses strukturelle Veränderungen der Proteine auf, bei denen eine partielle Entfaltung und eine Exposition der hydrophoben Bereiche zur Grenzfläche stattfindet. Die auftretenden Konformationsänderungen und die gleichzeitig stattfindende Dehydrierung der Bereiche, die nun zur Grenzfläche hinweisen, resultieren in einer Steigerung der intramolekularen Entropie der Proteinmoleküle und des gesamten Anlagerungsprozesses. Somit sind die Effekte von Emulgatoren primär entropisch getrieben, was eine Erklärung dafür liefert, warum die Adsorption von Molekülen an hydrophoben Grenzflächen im Vergleich zur Luft/Wasser-Grenzfläche schneller abläuft^{25,29,30}.

Die Destabilisierung und der Zerfall einer Emulsion werden von mehreren Mechanismen vorangetrieben. Der erste Mechanismus beschreibt die Annäherung und Vereinigung zweier Emulsionströpfchen und wird auch als Koaleszenz bezeichnet. Die Grundlage hierfür bildet die Brown'sche Molekularbewegung, der die Partikel unterworfen sind. Eine Koaleszenz kann dann beobachtet werden, wenn bei unzureichender Oberflächenladung zwei Tröpfchen kollidieren und die Emulgatorschicht instantan ausgedünnt wird³¹. Im zweiten Prozess ereignet sich ein Zerfall kleinerer Partikel. Deren Bestandteile gehen in Lösung über und werden von größeren Partikeln aufgenommen. Es findet also ein Materietransfer von kleineren zu größeren Strukturen statt. Dieses Phänomen wird als Ostwald-Reifung bezeichnet. Emulsionströpfchen sind bei der Unterschreitung eines kritischen Radius thermodynamisch ungünstig (Laplace-Druck im Inneren kleinerer Tropfen höher als bei größeren Gegenständen). Nach der Gibbs-Helmholtz-Gleichung muss ein thermodynamischer Ausgleich durch die Minimierung der Grenzfläche stattfinden, was als treibende Kraft der Ostwald-Reifung betrachtet wird³².

Zwei weitere Effekte können zum Zerfall von Emulsionen beitragen: das sogenannte *Creaming* und eine Sedimentation. Während es bei einer Sedimentation zu einer Absenkung der Partikel kommt, führt das *Creaming* zum Auftreiben von Tröpfchen. Diese Prozesse stehen in Abhängigkeit zur Partikelgrößenverteilung und der Dichte der emulgierten Substanz. Je breiter die Verteilung und je dichter die Substanz, desto höher die Anfälligkeit. Beide Phänomene erhöhen die Tröpfchendichte auf einem engen Raum drastisch, was in Flokkulation und final in einer Koaleszenz resultiert^{24,33}.

Wie oben bereits angeführt, zeichnen sich Nanoemulsionen durch eine thermodynamische Instabilität aus, liegen jedoch kinetisch stabilisiert vor. Die Stabilität einer Nanoemulsion kann durch die Wahl des Emulgators beeinflusst werden. Im Allgemeinen beruht die Stabilität einer Emulsion auf einem Quotienten aus Schichtdicke δ und Partikelradius R . Erreichen zwei Partikel eine kritische Distanz zueinander, welche weniger als die doppelte Schichtdicke des Emulgators beträgt, so treten interpartikuläre, repulsive Kräfte sterischer Natur auf. Dieser Effekt korreliert positiv mit dem steigendem Quotienten δ/R . Emulgatoren, die im imstande sind dichte, interaktionsarme Hüllen mit hoher Schichtdicke zu bilden, heben demnach die Stabilität einer Emulsion erheblich an^{25,34}. Da jedoch ab einem gewissen Punkt anziehend wirkende van der Waals-Kräfte die repulsive Wirkung der Emulgatoren annullieren könnten, kann die effektive Schichtdicke durch Oberflächenladungen erhöht werden³⁵. Eine derartige elektrostatische Stabilisierung einer Emulsion kann durch die Verwendung anionischer Emulgatoren (z.B. Proteine) erreicht werden. Die sich dadurch ergebenden Ladungen an der Partikeloberfläche tragen zu den repulsiven Kräften und somit zu der Stabilität der Emulsion bei. Die Nettoladung eines Partikels wird als Zeta-Potential bezeichnet^{36,37}.

1.4 Prinzip der Hochdruckhomogenisierung

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten A-AOC wurden mithilfe des Hochdruckhomogenisierungsverfahrens (HPH) synthetisiert. In der industriellen Herstellung von Lebens- und Arzneimitteln sowie Kosmetika findet die HPH Verwendung in der Erzeugung stabiler Nanoemulsionen und -partikeln³⁸. Dabei stellt die HPH ein rein physikalisches Verfahren dar, welches auf der starken Beschleunigung von Suspensionen durch Druckaufbau und dem sich anschließenden Fluss der Probe durch Kanäle im Mikrometerbereich (sog. Mikrokanäle) beruht.

Die durch den Druck verursachte Beschleunigung der Suspension führt initial zu einem laminaren Fluss. Beim Auftreffen der Probe auf die Mikrokanäle ereignet sich eine drastische Reduktion im Durchmesser des Strömungskanals. Dieser Umstand setzt mehrere Prozesse in Gang:

Beim Eintritt der Probe in die Mikrokanäle wird die Flussgeschwindigkeit rapide gesteigert, was starke Verwirbelungen innerhalb der Flüssigkeit zur Folge hat. Gleichzeitig wandelt sich die

laminare zu einer turbulenten Strömung um. Mathematisch kann die Flussart durch die dimensionslose Reynoldszahl beschrieben werden³⁹:

$$Re = \frac{vl\rho}{\eta}$$

Re = Reynolds-Zahl; v = Flussgeschwindigkeit; l = Länge des Kanals; ρ = Dichte; η = Viskosität

Laminare Strömungen liegen bei Werten von $Re \leq 1000$ vor. Turbulente Strömungen hingegen treten bei einer Reynolds-Zahl von ≥ 2000 auf⁴⁰.

Die nun turbulente Suspension fließt mit hoher Geschwindigkeit, Form und Verlauf der Mikrokanäle folgend. Dies führt zu einem erheblichen Anstieg der Scherkräfte, die auf Partikel der Suspension wirken. Es ereignet sich eine Deformation der Partikel, bis ein kritisches Maß erreicht wird, bei dem die Formation kleinerer Tropfen energetisch günstiger ist. Gleichzeitig kollidieren Partikel untereinander und mit der Kanalwand, was zu einer weiteren Verkleinerung der suspendierten Partikel führt. Die Vielzahl von Kollisionen wirkt sich auf den Flüssigkeitsstrom aus und senkt die Fließgeschwindigkeit. Aus den Kollisionen hervorgehende kinetische Energie wird in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben und steigert die Suspensionstemperatur. Nach vollständiger Passage der Mikrokanäle kommt es zu einer massiven Abnahme in Druck- und Strömungsgeschwindigkeit. Die Folge des rasanten Druckabfalls sind instabile Kavitäten, die sich innerhalb der Suspension bilden und nach wenigen Augenblicken kollabieren.

Das Zusammenspiel aller oben angeführter Phänomene (Druckabfall, turbulente Strömungen und Kollaps von Kavitäten) resultiert letztendlich in einer Verkleinerung der Partikelgröße^{39,41,42}.

Die Mikrokanäle des Hochdruckhomogenisators, der im Zuge dieser Arbeit verwendet wird, werden von einer Zwei-Komponenten-Einheit beherbergt. Die Mikrokanäle liegen dabei in einer Y-Interaktionskammer vor, wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt wird. Die erste Komponente ist mit Kanälen eines Durchmessers von 75 μm ausgestattet, während die nachgeschaltete Kammer Kanäle mit 125 μm Durchmesser enthält.

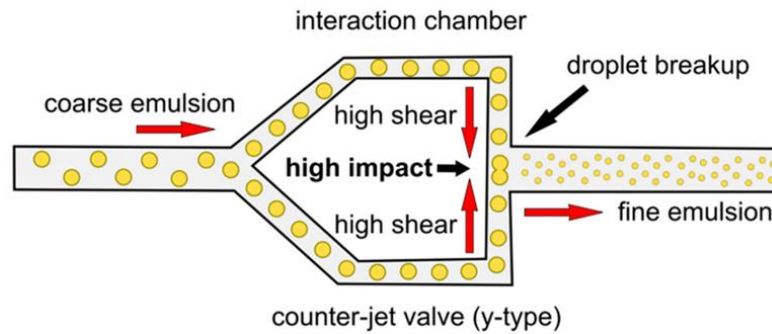


Abbildung 2 Y-Interaktionskammer:

Schematische Veranschaulichung einer Y-Interaktionskammer und graphische Darstellung der in den Mikrokanälen stattfindenden Homogenisierungsprozesse. Grafik entnommen aus Grumbach et al.⁴³.

1.5 Bovines Serumalbumin

Bovines Serumalbumin (BSA) ist ein globuläres Protein, das sich aus 583 Aminosäuren⁴⁴ zusammensetzt und aufgrund seines hohen α -helikalen Anteils einen hohen Ordnungsgrad aufweist (73% α -Helix, 2% β -Faltblatt, 8% β -Schleifen und 17% *random coil*-Strukturen)⁴⁵. BSA lässt sich in drei homologe Domänen (I-III) mit jeweils zwei Subdomänen (A und B) unterteilen und neigt zu Dimerformation in Lösung. Die Sequenzhomologie von BSA zu seinem humanen Analogon beträgt 75%. Beide Proteine, so wie Serumalbumine anderer Säugetierarten, sind somit strukturell und funktionell nahezu identisch⁴⁶.

Serumalbumine bilden den Großteil der Proteinfraction des Blutserums (70 mM)⁴⁶ und fungieren im Blutkreislauf als Transportvehikel für eine Vielzahl von endogenen und exogenen Verbindungen und Stoffen⁴⁷. Bisher wurden 21 verschiedene Bindestellen im BSA-Konstrukt beschrieben, weswegen Albumin auch als „Schwamm“ der Blutzirkulation bezeichnet wird⁴⁸. Darunter befinden sich sechs Bindestellen mit hoher Affinität für langkettige Fettsäuren und die Bindestellen Sudlow I (große heterozyklische Verbindungen) und Sudlow II (aromatische Carbonsäuren)⁴⁹. Zusätzlich zählen Aminosäuren, Medikamente und anorganische Ionen zum Transportgut des Serumalbumins⁴⁷. Neben seiner Transportfunktion spielt Serumalbumin eine Schlüsselrolle in der Regulation des osmotischen Drucks und der Flüssigkeitsverteilung zwischen Kompartimenten⁵⁰.

Ein BSA-Monomer enthält 35 Cysteine in seiner Aminosäuresequenz⁴⁵. Dabei liegt lediglich das Cystein (Cys) 34 in freier Form vor, während die restlichen Thiolgruppen an der Ausbildung von 17 intramolekularen Disulfidbrücken beteiligt sind. Trotz dieser hohen Anzahl an Disulfidbrücken verfügt das BSA-Protein über eine hohe Flexibilität und ist zu massiven Konformationsänderungen befähigt, was BSA hervorragende emulgierende Eigenschaften verleiht. Die fehlende Rigidität des Proteinskeletts wird durch die spatiale Nähe der einzelnen Disulfidpaare-bildenden Cysteine hervorgerufen, die entweder benachbart oder durch wenige Aminosäuren getrennt vorliegen⁴⁵. Zusätzlich zu seinen strukturellen Besonderheiten trägt ein hoher Gehalt an negativ geladenen Seitenketten zu der Eignung des BSA als Emulgator bei.

Das Protein ist imstande in nanoskaligen Emulsionen eine stark negativ geladene Hülle zu bilden, die durch eine Steigerung des Zeta-Potenzials die Stabilität der Emulsion erhöht⁵¹⁻⁵³. In der Lebensmittelindustrie wird BSA aufgrund seines hohen Emulgations-Aktivitäts-Index in der Generierung von Öl-in-Wasser-Emulsionen eingesetzt⁵⁴. Durch seine amphiphilen Eigenschaften wendet das Protein nach partieller Entfaltung an der Grenzphase seine hydrophoben Bereiche der Ölphase zu und stabilisiert diese^{36,55}.

Die oben angeführten strukturellen Besonderheiten des Serumalbumins ermöglichen es dem Protein eine tragende Rolle in der antioxidativen Abwehr des Blutserums einzunehmen. Dabei bedient sich Albumin verschiedener Mechanismen, um seine antioxidativen Effekte zu entfalten. Ein Mechanismus basiert auf der Ligand-Bindungs Kapazität des Albumins. Durch die Chelatierung der kationischen Liganden Kupfer und Eisen hemmt Albumin die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies durch die Fentonreaktion⁵⁰. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren tragen im erheblichen Maße zum Pool der oxidierbaren Verbindungen des Blutplasmas bei. Die Bindung an Albumin bewahrt die Fettsäuren vor oxidativen Angriffen und senkt die Zahl an reaktiven Verbindungen und Radikalen im Blutkreislauf^{56,57}. Eine indirekte antioxidative Wirkung des Albumins folgt aus der Bindung und dem Transport Bilirubins. An Albumin gebundenes Bilirubin wirkt als Inhibitor von Lipidperoxidation und als sekundäres Antioxidans in Verbindung mit α -Tocopherol^{58,59}.

Der zweite antioxidative Mechanismus beruht auf der direkten Interaktion mit reaktiven Spezies und der Fähigkeit des Proteins, als Radikalfänger zu agieren. Eine große Rolle spielt hierbei das Cys-34, welches bei 70-80% der Albuminmoleküle mit einer reduzierten Thiolgruppe vorliegt. Die reduzierte Seitenkette des Cys-34 ermöglicht es Albumin, Hydroxylradikale und Peroxynitrit zu reduzieren^{60,61}. Die aus diesen Reaktionen hervorgehende Sulfensäure (BSA-SOH) kann über Disulfidbrückenbildung zu Mercapto-Albumin (BSA-SH) konvertiert werden⁵⁷.

Eine weitere Aminosäure des Albumins, welche an oxidativen Prozessen beteiligt ist, ist Methionin⁶². Methionin stellt ein leicht zu oxidierendes Ziel dar, welches jedoch auch mit geringem Aufwand regeneriert werden kann. Es wird vermutet, dass ein Oxidation-Reduktion-Kreislauf von Methionin von Proteinen als Radikalfänger-System genutzt wird^{63,64}. Weiterhin bewahrt es Proteine vor strukturellen und funktionellen Schäden durch oxidativen Stress, da oxidierte Methionin-Seitenketten nur geringe Einschränkungen der biologischen Funktion des Proteins mit sich ziehen⁶⁴.

1.6 Resveratrol

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilben) ist ein Polyphenol pflanzlichen Ursprungs, welches in mehr als 70 Pflanzenarten in unterschiedlichen Konzentrationen anzutreffen ist⁶⁵. Darunter fallen auch gängige Nahrungspflanzen, wie Erdnüsse (*Arachis hypogaea*), Maulbeeren (*Morus sp.*)⁶⁶ und Weintrauben (*Vitis vinifera*, einschließlich Wein und Traubensaft)⁶⁷. Die primäre

Quelle an Resveratrol wird in einer mediterranen Diät von Rotwein gebildet⁶⁵. Resveratrol gehört zudem der Familie der Phytoalexine an. Die Synthese und Akkumulation von Phytoalexinen ereignet sich, wenn Pflanzen mit Stressfaktoren konfrontiert werden, zu denen unter anderem Parasitenbefall, Pilzinfektionen, UV-Bestrahlung und mechanische Schäden zählen⁶⁸⁻⁷⁰. Somit scheint Resveratrol eine protektive Rolle in multiplen schädlichen Szenarien einzunehmen.

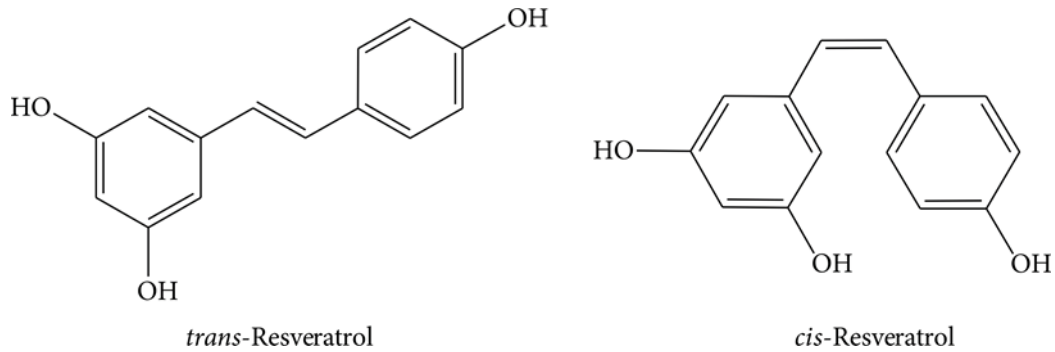


Abbildung 3 Graphische Gegenüberstellung des *trans*- und *cis*-Resveratrols.
Darstellung entnommen aus Gambini et al.⁶⁵.

Aus struktureller Sicht handelt es sich bei Resveratrol um ein Stilben. Es setzt sich demnach aus zwei aromatischen Ringen zusammen, welche über eine Methylenbrücke in Verbindung stehen. Die Methylenbrücke ermöglicht eine Isomerie, durch die Resveratrol in zwei Konfigurationsisomeren, *cis*- und *trans*-Resveratrol, vorliegen kann (Abbildung 3). Eine Überführung von der *trans*- in die *cis*-Form erfolgt, wenn *trans*-Resveratrol (tRES) direktem Sonnenlicht⁷¹, artifiziellem⁷² und UV-Licht der Wellenlängen 254⁷³ und 366 nm⁷⁴ exponiert wird. In der Natur ist Resveratrol sowohl in seiner *trans*- als auch seiner *cis*-Form anzutreffen. Hierbei scheint es jedoch so, dass tRES die vorherrschende Isoform darstellt⁷⁵. Auch die Wissenschaft widmet sich mit deutlich größerem Interesse der Untersuchung des tRES. Die Ursache hierfür liegt in der höheren sterischen und chemischen Stabilität^{65,67} sowie Bioaktivität^{70,75} des *trans*-Isomers. Die Unterschiede zwischen beiden Isomeren werden durch ihre dreidimensionale Molekularstruktur verursacht⁷⁶. Die stereochemische Abweichungen zum *cis*-Isomer ermöglichen tRES eine deutliche effizientere Interaktion mit Zielstrukturen^{77,78}.

Das Interesse der klinischen und biomedizinischen Forschung an tRES wurde ursprünglich durch ein epidemiologisches Phänomen geweckt, welches als *French Paradox* bekannt ist und mit dem Phytoalexin in Verbindung gebracht wurde. Hinter dem *French Paradox* verbirgt sich eine Studie, aus der hervorging, dass die Bewohner Nordfrankreichs trotz eines hohen Konsums gesättigter Fettsäuren im Vergleich zu anderen Bevölkerungsgruppen mit ähnlicher Ernährung eine geringe Mortalität durch kardiovaskuläre Erkrankungen aufweisen. Diese Gegebenheit wurde dem Konsum von Rotwein zugeschrieben, welcher in hoher Konzentration Resveratrol (0.1-14.3 mg/L)⁷⁹enthält⁸⁰. So konnte in einer, auf diese Vermutung folgende

Studie demonstriert werden, dass tRES imstande war die mit einer kalorienreichen Ernährung einhergehenden Folgen und damit die Mortalitätsrate in einem murinen Adipositas-Modell zu reduzieren⁸¹. Die in den darauffolgenden Jahren durchgeführten Experimente offenbarten eine antiinflammatorische⁸², anticarcinogene⁸² und antioxidative Wirkung des tRES⁸³.

Als Hauptmediator für das breite Wirkungsspektrum von Resveratrol wird ein Vertreter der Sirtuine (SIRTs, NAD⁺-abhängige Histondeacetylasen) betrachtet: SIRT1. Eine Aktivierung von SIRT1 kann auf direktem oder indirektem Wege über verschiedenen Signalwege (z.B über die FOXO- Transkriptionsfaktoren) geschehen⁸⁴.

Zwei Aspekte des Resveratrols schränken jedoch sein therapeutisches Potential und eine effizientere Nutzung ein: Zum einen handelt es sich bei Resveratrol um eine hydrophobe Verbindung. Ihre Löslichkeit in Wasser und wässrigen Lösungen beträgt $\leq 0,05$ mg/mL, was die Verteilung im Körper beeinträchtigen könnte. Zusätzlich erschwert es die Entwicklung von Formulierungen für Behandlungen, die eine therapeutisch relevante tRES-Konzentration lösen können. Zum anderen ist Resveratrol *in vivo* einer raschen Metabolisierung unterworfen, die zu niedrigen Plasmakonzentrationen führt. Dabei ist die Metabolisierungsrate der *cis*-Isoform um den Faktor 5-10 höher, was in einer drastisch reduzierten Bioverfügbarkeit und schnelleren Eliminierung über den Urin resultiert. Dieser Umstand bedeutet eine starke Einschränkung der Resveratrol-Bioaktivität^{65,85}. Die oben erwähnten positiven Effekte des Resveratrols wurden zum Großteil in *in vitro*-Versuchen beobachtet, in denen die Wirkung von Resveratrol nicht durch die Metabolisierungsrate limitiert wird und somit deutlich höhere Konzentrationen erreicht werden können. Doch auch in zahlreichen *in vivo*-Ansätzen konnten signifikante Effekte nach tRES-Behandlung erzielt werden, die im scharfen Kontrast zu der geringen Bioverfügbarkeit stehen⁶⁵. Eine Erklärung für dieses Phänomen bietet das sogenannte Resveratrol-Paradox: Glucuronid- und Sulfatmetabolite des *trans*-Resveratrols weisen eine deutlich höhere Plasmahalbwertszeit auf als die Ausgangssubstanz und können in der Leber erneut zu tRES umgesetzt werden. *Trans*-Resveratrol kann ebenfalls durch eine enterohepatische Rezyklisierung seiner Metabolite mit einer folgenden Dekonjugation im Dünndarm regeneriert werden. Darüber hinaus zeigen die Metabolite ähnliche, zum Teil sogar stärkere biologische Effekte wie Resveratrol selbst und führen somit zu einer Steigerung der Bioaktivität^{65,85}. Jedoch sind diese Prozesse noch Gegenstand kontroverser Diskussionen⁸⁶.

Im Rahmen dieses Projektes lag der Fokus auf den Eigenschaften und Kapazitäten des tRES als antioxidatives Agens. Die antioxidative Wirkung des tRES wird primär durch die Hydroxylgruppen vermittelt. Aus zahlreichen Versuchen und theoretischen Kalkulationen geht dabei hervor, dass die 4'-OH-Gruppe ausschlaggebend für die antioxidative Aktivität des Resveratrols ist und im Vergleich zu den Hydroxylgruppen an 3' und 5'-Position deutlich effizienter als Radikalfänger fungiert^{79,87}. Die Ursache hierfür ist struktureller und thermodynamischer Natur. Die Deprotonierung an der 4'-Position liefert das stabilste Phenolat

und ist exothermer als eine Protonenextraktion am 3'- und 5'-OH^{79,87,88}. Das Fundament hierfür bilden die aromatischen Systeme, die über eine Stilben-Doppelbindung in Verbindung stehen. Während im Falle von 3'- und 5'-Phenoxy Spezies die Delokalisierung freier Elektronen sich auf einen aromatischen Ring beschränken muss, ergibt sich für die 4'-Hydroxylgruppe über die Stilben-Doppelbindung ein Elektronenfluss auch zum benachbarten Ringsystem. Demnach stehen einem 4'-Phenoxy beide Ringsysteme zur Verfügung, was in einer höheren Resonanz-Stabilisierungsenergie resultiert⁸⁸. Das treibt die Azidität des 4'-OH und die Bereitschaft zur Protonenabgabe in die Höhe^{76,79,88}. Auch die Koplanarität beider π -Systeme begünstigt diesen Mechanismus, wodurch tRES strukturell bedingt Resonanzen effizienter stabilisieren kann als sein *cis*-Analogon und somit eine höhere antioxidative Aktivität aufweist⁸⁸.

Resveratrol bedient sich bei der Neutralisierung von radikalischen Spezies zwei verschiedener Mechanismen: sowohl der *hydrogen transfer*- (HAT) als auch der *sequential proton loss electron transfer*- (SPLET) Mechanismus werden von tRES bei seinen antioxidativen Aktivitäten genutzt. Während beim HAT-Mechanismus der Übertrag eines Wasserstoff-Atoms von den Hydroxylgruppen des Resveratrols auf das zu reduzierende Radikal in einem Schritt erfolgt, formiert sich beim SPLET-Mechanismus zunächst ein Phenoxid-Anion und der Elektronentransfer folgt nach^{79,89}. Der Anteil beider Mechanismen wird durch das umgebende Milieu und den Reaktionscharakter des vorliegenden Radikals bestimmt⁷⁹.

1.7 Interaktion zwischen BSA und *trans*-Resveratrol

Die limitierende Löslichkeit des tRES kann durch die Verwendung geeigneter Interaktionspartner artifiziell gesteigert werden, indem tRES durch Komplexbildung aus der wässrigen Phase eliminiert wird⁹⁰. Mit seinen vielfältigen Bindungstaschen stellt BSA einen idealen Bindungspartner dar. Zahlreiche Publikationen widmeten sich bereits der Untersuchung der BSA-tRES-Interaktion. Dabei offenbarten thermodynamische Daten, dass sich der Komplex aus Protein und Polyphenol unter exothermen Umständen und demnach spontan ausbildet⁹¹. Die Komplexbildung wird hauptsächlich durch elektrostatische, hydrophobe Interaktionen vermittelt. Zusätzlich findet eine Wechselwirkung mit hydrophilen Domänen des Proteins und Wasserstoffbrückenbildung zwischen beiden Komponenten statt^{91,92}. Der geringe Bindungsabstand erlaubt einen Energietransfer nach Förster zwischen beiden Partnern^{91,93}. Jedes Monomer des BSA-Tetramers weist zwei Bindungsstellen für tRES unterschiedlicher Affinität auf ($K_A = 25 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ und $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$)⁹³.

Die hochaffine Interaktionstätte ist in einer hydrophoben Bindetasche lokalisiert, während die Bindungsstelle mit der niedrigeren Affinität sich an der Oberfläche und somit in einem hydrophileren Milieu des Proteins befindet^{92,93}. BSA-Moleküle, welche mit Fettsäuren assoziiert vorliegen, besitzen eine zweifach erhöhte Affinität zu tRES. Die Fettsäuren

erschaffen ein lipophileres Milieu, was die Bindung hydrophober Verbindungen, wie tRES, fördert⁹⁴.

Neben erhöhter Löslichkeit und Dispergierbarkeit geht die Interaktion mit BSA mit weiteren Vorteilen für tRES einher. Die Bindung an hydrophoben Kavitäten trägt zur Stabilität des tRES bei. An BSA gebundenes tRES weist eine signifikante Reduktion der Isomerisierungsrate (höhere Fotostabilität) und Oxidationsschäden durch UV-Bestrahlung auf. Resveratrol liegt in wässriger Lösung somit stabilisiert und für einen längeren Zeitraum in seiner bioaktiveren und antioxidativ potenteren Isoform vor⁹⁰. Tatsächlich konnte durch die Bindung an BSA-Nanopartikel eine höhere Bioverfügbarkeit für tRES *in vivo* erreicht werden⁹⁵.

1.8 Ischämie-Reperfusionsschaden

Die Ischämie-Reperfusion (I/R) ist ein komplexes pathophysiologisches Phänomen. Eine Beeinträchtigung oder gar vollständige Unterbrechung der Sauerstoffversorgung eines Gewebes resultiert in einer Hypoxie und leitet eine ischämische Periode in den betroffenen Zellen ein. Durch die Hypoxie treten in der mitochondrialen Atmungskette funktionelle Störungen auf, wodurch die ATP-Produktion eingeschränkt wird. Die Abnahme des ATP-Gehaltes beeinträchtigt die Aktivität der Na⁺-K⁺-ATPase und der Ca²⁺-ATPase. Der Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration wirkt sich inhibierend auf die Na⁺-H⁺-Austauscher aus. Es kommt zu einer H⁺-Retention, was gemeinsam mit einer Umstellung des Zellmetabolismus zu einer Herabsenkung des pH-Wertes führt⁹⁶. Während einer Ischämie wird ein Wechsel zu anaerobem Stoffwechsel vollzogen. So findet bei der anaeroben Glycolyse eine ATP-Gewinnung unter Umsetzung von Glucose zu Laktat statt, welches zur Bildung eines sauren Milieus beiträgt. Das unter Hypoxie stabilisierte HIF (Hypoxie-induzierter Faktor)-Protein fördert die Expression der benötigten glykolytischen Enzyme⁹⁶⁻⁹⁸.

Die Aktivierung zweier Systeme setzt prooxidative Prozesse in Gang, die den zellulären Schaden während der Ischämie vorantreiben. Eines der betroffenen Systeme ist die Enzymgruppe der Xanthinoxidase, welche für die Oxidation von Hypoxanthin zu Harnsäure verantwortlich ist. Unter normoxischen Bedingungen wird diese Funktion von der Xanthindehydrogenase übernommen, die als Reduktionsäquivalent NAD⁺ verwendet. In einem ischämischen Umfeld steigt die cytoplasmatische Ca²⁺-Konzentration. Das führt zu einer vermehrten Aktivierung Ca²⁺-abhängiger Proteasen, die Xanthindehydrogenasen proteolytisch zu Xanthinoxidasen konvertieren. Die Xanthinoxidase katalysiert die Reaktion der Harnsäurebildung unter Verwendung von molekularem Sauerstoff und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS; Superoxidanionen und H₂O₂). Ein Anstieg des Sauerstoffangebots durch Reperfusion löst einen drastischen Anstieg der ROS-Produktion aus^{99,100}.

Das zweite System wird von der Enzymfamilie der NADPH-Oxidasen (NOX) gebildet. Physiologisch stellen NOX eine enzymatische Quelle für ROS dar und sind wichtige Regulatoren der Redox-Homöostase. Sie katalysieren die Elektronenübertragung von NADPH

auf molekularen Sauerstoff unter Bildung von Superoxiden, welche zu Wasserstoffperoxid dismutiert werden können^{101–103}. Bei vorherrschender Ischämie ereignet sich jedoch eine Überexpression und gesteigerte Aktivität der NOX, womit sie entscheidend zum oxidativen Stress beitragen^{104–106}. Das gesteigerte Niveau des oxidativen Stresses fördert die HIF-1 α -Synthese. Das HIF-1 α wiederum wirkt sich aktivitätssteigernd auf NOX aus, wodurch sich eine positive Rückkopplung ergibt⁹⁶. Eine Reperfusion schafft ein Überangebot an Sauerstoff und führt aufgrund der gesteigerten Zahl und Aktivität der NOX zu einer massiven Steigerung der ROS-Synthese. Wegen ihrer Membranpermeabilität gelangen ROS ins Cytosol, wo sie oxidative Schäden an Organellen und Proteinstrukturen, sowie Peroxynitritbildung herbeiführen¹⁰⁷. Die durch die Reperfusion initiierten noxischen Prozesse lösen lokale inflammatorische Herde aus. Diese wirken sich chemotaktisch auf Immunzellen aus, welche proinflammatorischer Faktoren, wie TNF- α , IL-1- β und IFN- γ freisetzen. Die inflammatorischen Faktoren wirken dabei fördernd auf die Expression der NADPH-Oxidasen^{108,109}.

Die von Ischämie-Reperfusion verursachten Zellschäden resultieren im Untergang von Geweben durch unterschiedliche Formen des Zelltods^{110,111}.

1.8.1 Ischämie-Reperfusionsschäden in der Organtransplantation

Im klinischen Alltag spielt das Phänomen der I/R vor allem in Organtransplantationen eine bedeutende Rolle. Der Prozess der Organtransplantation ist unweigerlich mit dem Auftreten von I/R-Prozessen verbunden. Während die Entnahme des Organs zu einer Unterbrechung der Blut- und somit auch Sauerstoffversorgung (Ischämie) führt, tritt die Reperfusion mit dem Einsetzen des Organs in den Empfänger ein. Die dabei auftretenden I/R-Schäden senken die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Transplantation erheblich¹¹². Die *ex vivo* Konservierung eines Organs ist dabei von entscheidender Bedeutung, um die I/R-Schäden zu minimieren und die Zahl verfügbarer Organe zu erhöhen¹¹³.

Seit den 1960igern stellt die statische Kaltlagerung den Goldstandard für die *ex vivo* Konservierung dar. Die Organe werden mit einer Konservierungslösung gespült und in dieser bei einer Temperatur von 0-4 °C gelagert¹¹². Die induzierte Hypothermie soll die metabolische Aktivitäten des Gewebes herabsenken, um ATP-Reserven während der ischämischen Lagerperiode zu schonen und die ROS-Formation zu minimieren^{114,115}. Die geringen Temperaturen fördern jedoch die Bildung von mitochondrialen ROS, endothelialen Schäden und Ödemen durch eine Beeinträchtigung der Na⁺-K⁺-ATPase^{116–118}. Die niedrigen Temperaturen können metabolische Vorgänge nicht vollständig unterbinden. Daher steigt mit zunehmender Lagerungsdauer die Wahrscheinlichkeit für eine verzögerte Organfunktion (*delayed graft function*, DGF) oder gar einer terminalen Organabstoßung (*graftloss*, GL)^{119,120}. Um eine längere ischämische Periode zu vermeiden, wurden *ex vivo* Perfusionssysteme entwickelt, bei denen das Transplantat in ein Flüssigkeitsbett überführt und an einen Perfusionskreislauf angeschlossen wird. Dieses Vorgehen ermöglicht die Aufrechterhaltung

der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, sowie die Eliminierung schädlicher Metabolite¹¹². Nährstoffhaltige, isotonische Perfusionslösungen werden dabei mit EKs oder Vollblut versetzt, um längere Lagerungsperioden und eine adäquate Sauerstoffversorgung des Gewebes zu garantieren. Dies ist vor allem bei normothermen Lagerungen (35-38 °C) von Bedeutung, da hier der Metabolismus ungebremst ablaufen kann^{121,122}. Die Anreicherung der Perfusionslösungen mit EKs ist jedoch mit zahlreichen Bedenken verbunden, zu denen u.a. unerwünschte immunologische Reaktionen, Hämolyse, Thrombusbildung und die Übertragung von Infektionen gehören¹²³. Zusätzlich sind sozioökonomische Probleme mit der Verfügbarkeit von Blut assoziiert (s. 1.1).

Die Konservierung von Organtransplantaten stellt ein ideales Einsatzgebiet für künstliche Sauerstoffträger dar. Vor allem Sauerstoffträger auf Basis von Pefluorcarbonen bilden eine sterile Alternative, frei von Nebenwirkungen von Blut und Hämoglobin. So gewährleisten die A-AOC der AG Ferenz durch ihre Komponenten (von Albumin ummanteltes Perfluordecalin) ein geringes Maß an Komplikationen bei gleichzeitiger adäquater O₂-Versorgung der Transplantate. Bereits in Modellen von isoliert perfundierten Organsystemen konnte gezeigt werden, dass A-AOC das Potenzial besitzen, physiologische Organfunktionen aufrechtzuerhalten und Schäden während einer Explantation zu minimieren^{124,125}. Aufgrund ihrer artifiziellen Natur bieten sie zusätzlich den Vorteil, Modifikationen vornehmen zu können, um ihre Eigenschaften und Effekte zu ergänzen. Ein Beispiel stellt dabei das in dieser Arbeit verwendete tRES dar. *Trans*-Resveratrol entfaltet sowohl in der Ischämie als auch Reperfusion direkte und indirekte antioxidative Effekte und würde so die Wirkung der A-AOC komplementieren^{126,127}.

1.9 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der intensiven Untersuchung der zwischen tRES und A-AOC stattfindenden Interaktion und die Auswirkungen dieser Interaktionen auf die Eigenschaften der einzelnen Komponenten. Zu Beginn wird eine grundlegende Charakterisierung der genutzten A-AOC in An- und Abwesenheit von tRES durchgeführt, was eine Ermittlung der Partikelgröße und -verteilung, der Viskosität und des Zeta-Potentials einschließt. Im selben Zuge soll der Einfluss der Proteinhülle auf die Löslichkeit des hydrophoben tRES und die Freisetzungskinetik von der Partikelhülle und des freien BSA bei zwei unterschiedlichen Temperaturen gegenübergestellt werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit widmet sich den funktionellen Aspekten der Interaktion zwischen tRES und BSA. Bei tRES handelt es sich um ein Molekül mit zahlreichen Facetten. Der Fokus dieser Arbeit liegt darauf, die Veränderungen in der antioxidativen Eigenschaften des tRES in Anwesenheit der A-AOC zu ermitteln. Dazu werden drei unterschiedliche Assays mit verschiedenen prooxidativen Agenzien eingesetzt, um ein möglichst vollständiges Bild der Mechaniken und des antioxidativen Zusammenspiels des A-AOC-tRES-Komplex zu erhalten. Um den Einfluss der A-AOC-Hülle auf die antioxidativen Eigenschaften des tRES besser nachvollziehen zu können, wird ergänzend zu den funktionellen Assays die Sekundärstruktur, der Zustand der hydrophoben Bindetasche als tRES-Interaktionsstätte und die Sulfhydrylgruppen des Albumins an der Partikelhülle analysiert.

Ein potenzielles Einsatzgebiet für künstliche Sauerstoffträger stellt die Konservierung von Organtransplantaten nach Explantation dar. Der Prozess der Organtransplantation ist unweigerlich mit Ischämie/Reperfusionsschäden assoziiert. Im Zuge dieser Arbeit wird als finale Versuchsplattform eine *in vitro* Ischämie/Reperfusion (I/R) -Simulation etabliert. Da primär oxidative Prozesse während eines I/R-Szenarios zelluläre Schäden vermitteln, kann anhand des Modells nicht nur die Sauerstoffversorgung der A-AOC während der Ischämie, sondern die antioxidative Aktivität des A-AOC-tRES-Systems in diesem komplexen Szenario beurteilt werden. Zur Evaluierung der Zellschäden dienen die Parameter Cytotoxizität, Apoptose und intrazellulärer oxidativer Stress. Als Zellkulturmodell werden HL-1-Kardiomyozyten verwendet. Aufgrund seiner hohen Sauerstoffsensitivität stellt das Herz das optimale Versuchsobjekt für funktionelle Untersuchung der A-AOC dar. Die aus dem *in vitro* Versuch gewonnenen Erkenntnisse sollen das Fundament für *ex vivo* Perfusionssysteme bilden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Stoff	Hersteller
(+)-Norepinephrine-(+)-bitartratsalz	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
2', 7'-Dichlorofluorescein-Diacetat	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz (ABTS)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
5-Amino-3-(4-morpholinyl)-1,2,3-oxadiazolium chlorid	Cayman Chemical, Michigan, USA
6-Hydroxy-2,5,7,8-teramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox)	Merck, Darmstadt, Deutschland
8-Anilino-1-naphthalin-sulfonsäure-Ammoniumsalz (ANS)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Acetonitril; geeignet für HPLC-Analysen	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin, Fraktion V	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Bromkresolgrün	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Calciumchlorid-dihydrat	VWR, Pennsylvania, USA
CellROX™ Green	Invitrogen, Massachusetts, USA
Claycomb-Medium	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Diethylentriamintaessigsäure (DTPA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Entrahmtes Milchpulver	Apotheke Universitätsklinikum Essen, Deutschland
Essigsäure > 99%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 100%, rein	Apotheke Universitätsklinikum Essen, Deutschland
Ethanol 70%, vergällt	Apotheke Universitätsklinikum Essen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Fibronectin (1mg/mL)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Gelatine aus boviner Haut	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Glucose	Merck, Darmstadt, Deutschland

2. Material und Methoden

Glycin	PanReac AppliChem and ITW Reagents, S.R.L.
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Igepal CA-630	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Isopropanol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumcyanid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumperoxodisulfat > 99%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L(+)-Ascorbinsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L(+)-Ascorbinsäure-Natriumsalz, für Zellkultur	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
L-Glutamin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Luminol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Natriumdodecylsulfat in Pelletform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (Natron)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck Millipore, Massachusetts, USA
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Natriumtetraborat (Borax)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Perfluordecalin HP	F2 Chemicals, Preston, Vereinigtes Königreich
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Proteaseinhibitor cOmplete Mini, EDTA frei	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Proteinmarker <i>Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Sauerstoff medicAL 100%	AirLiquide, Düsseldorf, Deutschland
Tetramethylethyldiamine (TEMED)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
THIOLYTE® Monobromobimanreagenz	Merck Millipore, Massachusetts, USA
<i>trans</i> -Resveratrol, <i>USP reference standard</i>	United States Pharmacopeial Convention, Rockville, USA
Tris-HCl	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Trockenhefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA (0,05% Trypsin in 0,02% EDTA-Natrium)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
----------	-----------------------------------

2.2 Geräte

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte tabellarisch aufgeführt:

Gerät	Bezeichnung/Modell	Hersteller
Absaughilfe	VACUBOY Handoperator	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Automatische Zellzählhilfe	Cellometer Auto T4	Nexcelom Bioscience, Massachusetts, USA
Blutgasanalysegerät	ABL 800 flex	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
CD-Spektropolarimeter	J-715	JASCO GmbH, Pfungstadt, Deutschland
Chemilumineszenz-Dokumentationssystem	FUSION FX700	Vilber, Eberhardzell, Deutschland
CO ₂ -Inkubator	MCO-18AIC	Sanyo, Osaka, Japan
Dispergierwerkzeug	S 25 N - 25 F	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
DLS	NANO-flex®	Microtrac Europe, Haan, Deutschland
Elektrische Pipettierhilfe	RF3000	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Feinwaage	SBC 21	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	Zeiss, Jena, Deutschland
Fluoreszenzspektrometer	Jasco FP-8300 mit PCT-818 Temperaturkontrollelement	JASCO GmbH, Pfungstadt, Deutschland
Gelkammer	Mini-Protean Tetra, vertikale Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Hochdruckhomogenisator	LM20 Microfluidizer	Microfluidics International Corporation, Massachusetts, USA
Hochleistungs-Dispergiergerät	Ultra-Turrax T25 basic	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Hypoxiekammer	Whitley H35	Don Whitley Scientific, Yorkshire, United Kingdom
Kühlzentrifuge 1	Universal 320R	Hettich, Bäch, Schweiz
Küvetenschleuder	KS 8 CE	JASCO GmbH, Pfungstadt, Deutschland

2. Material und Methoden

Lichtmikroskop	CK 40	Olympus, Tokyo, Japan
Magnetrührer	C-MAG-HS7	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Mikrotiterplatten-Fluoreszenzlesegerät	FLx 800	Biotek, Vermont, USA
Netzteil	PowerPac™ Basis	Bio-Rad Labor
Objektiv 10x (Fluoreszenzmikroskop)	A-Plan	Zeiss, Jena, Deutschland
Optischer O ₂ Sensor	SDR SensorDish® Reader	PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland
pH-Meter	pH 900	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz
Präzisionswaage	Kern 573	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Respirometer	Oroboros O2K	Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich
Rheometer	MCR 92	Anton Paar. Graz, Österreich
Röhrchen-Luminometer	Junior LB 9509	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
Sterilbank	HERA safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge	MiniSpin	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
UV/Vis-Spektralphotometer	Specord S 600	Analytik Jena, Jena, Deutschland
UV-Transilluminator	BioDoc-LT™-Imaging System	UVP, Upland, USA
Vakuumpumpe	Membran-Vakuumpumpe N811	KNF Neuberger GmbH, Freiburg im Breisgau, Deutschland
Vibrationsmischer	VF Z	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	MilliQ® Advantage A 10	Merck Millipore, Massachusetts, USA
Wasserbad	WB 10mT	P-D Industriegesellschaft, Dresden, Deutschland
Western-Blot-Transfersystem	Trans- Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Zellzählkammer	Typ Neubauer	Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen
Zeta-Potential	Stabino®	Microtrac Europe, Haan, Deutschland

2.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Modell	Hersteller
Ansaugspritze	PICO 50	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Bottletop-Filter mit 250 mL Fassungsvermögen	Rapid-Filtermax	TPP (Techno Plastic Products), Trasadingen, Schweiz
Dialyseschläuche	<i>High retention seamless cellulose tubing</i> ; Ausschlussgrenze 12400 Da	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Lumineszenzröhrchen	5 mL	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
Nitrilhandschuhe	Dermagrip Ultra Long	WRP, Hønefoss, Norwegen
Pergaminpapier	100 x 100 mm	Whatman, Dassel, Deutschland
Pipettenspitze	20, 100 und 1000 µL	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Quarzglasküvette	1 mm Schichtdicke und ein Fassungsvermögen von 350 µL	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland
Reaktionsgefäß	0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Serologische Pipetten	2, 5, 10, 25 mL	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Spektralphotometer-Küvette	Acryl-Halbmikroküvette	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Spritze	Original Perfusor ® 50 mL	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	Minisart®; Porengröße 0,2 µM	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Sputumröhrchen	15 mL; 50 mL	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Transwell-Inserts	6-Well <i>Tissue Culture</i> Inserts mit transparenter Membran	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Ultramikro-Küvetten	Fluoreszenz-Küvette	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland
Wiegeschälchen	7 mL	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Zellkulturflasche	T25; T75	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Zellkulturplatte	6-Well-Platte; 96-Well-Platte	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Zellkulturplatte mit integriertem Sauerstoffsensoren	OxoDish® OD24	PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland
Zellschaber	2-Positionen-Klinge, Größe M	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

2.4 Medien und Puffer

Bezeichnung	Hersteller/Zusammensetzung
ABTS-Stammlösung	3,8 mg/mL (7 mM) ABTS 0,662 mg/mL (2,45 mM) Kaliumperoxodisulfat Aufgenommen in PBS Lichtgeschützte Inkubation über Nacht bei RT
Acetat-Tween-Puffer 100 µmol/L	100 µmol/L Essigsäure 0,17% (v/v) Tween 20 pH 4,0 (pH-Anpassung mit Natriumhydroxid-Lösung 1 mol/L)
Blockierlösung	5% w/v entrahmtes Milchpulver in 1x TBST-T Bei 4°C gelagert
Boratpuffer-Stammösung	620 mg Borsäure werden in 50 mL Aqua bidest. aufgenommen. 201 mg Borax wird zur Lösung zur Lösung gegeben und unter Rühren bei 80°C gelöst. Mit Aqua bidest. auf 80 mL auffüllen. pH 7,95 (pH-Anpassung erfolgte mit 1 mol/L Salzsäure)
Bromkresolgrün-Lösung	Zusammensetzung der Stammlösung: 16,76 mg Bromkresolgrün in 400 µL Natriumhydroxid-Lösung aufnehmen (1mol/L), mit Aqua bidest. auf 20 mL auffüllen. Zusammensetzung der Gebrauchslösung: Stammösung wird 1:12 mit Acetat-Tween-Puffer (pH 4,0) Endkonzentration des Bromkresolgrüns lag bei 70 µg/mL
Chemilumineszenz-Gemisch	100 µM DTPA 400 µM Luminol 25 mM Natriumhydrogencarbonat Gelöst in Boratpuffer-Stammlösung pH 8,2 (pH-Anpassung erfolgte mit 1 mL 1 mol/L Salzsäure)
Gelatine/Fibronectin-Lösung	0,1g Gelatine gelöst in Aqua bidest. Steril filtriert und autoklaviert. 50 mL der Gelatinestammlösung wird mit 250 µL Fibronectin versetzt.

2. Material und Methoden

	6 mL Aliquots wurden bei -20 °C gelagert
GOx-HRP-Stammlösung	5 nM GOx 10 nM HRP 2 mM ABTS 1 mM D-Glucose
Laufpuffer; 10x	25 mM Tris-HCL 0,1 gew-% SDS 192 mM Glycin Gelöst in 1 L Aqua dest.
Luminol-Stammlösung	8,5 mg Luminol werden in 1,63 mL 1 mol/L Natriumhydroxid aufgenommen. Anschließend erfolgt die Zugabe von 3,225 mL Aqua bidest. Das Behältnis der Stammlösung wird lichtgeschützt bei 4°C gelagert und maximal 48 h nach Herstellung verwendet. Endkonzentration des Luminols: 10 mM
Medium zur Kryokonservierung	Fetales Kälberserum versetzt mit 5% DMSO
Minimalmedium	Claycomb-Medium 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % L-Glutamin
Norepinephrine-Stammlösung	80 mg Norepinephrine in 25 mL einer wässrigen 30 mM L-Ascorbinsäure. Gemisch wurde steril filtriert, in 3 mL Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C gelagert. Stabil für einen Monat
Perfusionsmedium/ modifizierter Krebs-Henseleit- Puffer (mKHP)	118 mM NaCl 4,7 mM KCl 0,8 mM MgSO ₄ 25 mM NaHCO ₃ 1,2 mM KH ₂ PO ₄ 5 mM D-Glucose 2 mM Na-Pyruvat 2,5 mM CaCl ₂
Phosphatgepufferte Saline Lösung (PBS)	1,37 mol/L 27 mmol/L 100 mmol/L Natriumhydrogenphosphat 20 mmol/L Kaliumdihydrogenphosphat

2. Material und Methoden

	pH 7,4
Salinlösung zur Simulierung ischämischer Umstände (Hypoxiemedium)	137 mM NaCl 12 mM KCl 0.5 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O 0.9 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O 4 mM HEPES, 20 mM Na Lactate pH 6.2
Sammelpuffer, 4x	251 mM Tris-HCl 6,9 mM SDS pH 6,8; gelagert bei 4 °C
SDS-Puffer; 4x	200 mM Tris, pH 6.8 8 % SDS 10 % β-Mercaptoethanol 0.02 % Bromphenolblau 4 % Glycin
SIN-1-Stammlösung	1 mg SIN-1 Chlorid gelöst in 500 µL 50 mmol/L KH ₂ PO ₄ -Puffer. Finale Konzentration beträgt 10 mmol/L
Supplementiertes Claycomb-Medium	Claycomb-Medium 10 % Fetales Kälberserum 1 % Penicillin/Streptomycin 10 mM Norepinephrin in 30 mM L-Ascorbinsäure 1 % L-Glutamin
TBS-T	1x TBS 0,2 vol-% Tween 20
Trennpuffer; 4x	1,5 M Tris-HCl 13,9 mM SDS pH 8,8
Tris gepufferte Salinlösung (TBS); 10x	137 mM NaCl 20 mM Tris-HCl pH 7.6
Waschmedium	DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) 10% FBS 1% Penicillin/Streptomycin
Whole Cell-Lysepuffer	500 µL 10% Igepal CA-630 30 µL 0,5 M NaCl 500 µL 1 M Tris-Puffer (pH 7,9)

2. Material und Methoden

	100 µL 0,5 M EDTA Mit 1 x PBS auf 20 mL auffüllen Proteaseinhibitor in Tablettenform wird in 1 mL Aqua bidest. aufgelöst und 1:10 mit dem oben aufgeführten Puffer verdünnt.
--	--

Eine Modifikation der Standardformulierung des Krebs-Henseleit-Puffers war vonnöten, da die Anwesenheit von BSA zu einer Reduktion der freien Calcium- und Glucosekonzentration führt. Die pH-Werte der salinen Lösungen (Hypoxiemedium, mKHP) wurde unter Verwendung eines pH-Meters angepasst. Für Anpassung und Quantifizierung der Elektrolyte (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-) und Glucose erfolgte mit dem Blutgasanalysegerät ABL 825 FLEX.

2.5 Kits

Bezeichnung	Hersteller
DC (<i>Detergent Compatible</i>)-Proteinassay	Bio-Rad Laboratories Inc., Kalifornien, USA
DCFDA/H ₂ DCFDA Cellular ROS Assay Kit	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
<i>SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit	Bio-Rad Laboratories Inc., Kalifornien, USA

2.6 Antikörper

Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-Actin, N-terminal	Hase	Sigma-Aldrich	1:2000
Caspase 3/p17/P19 polyklonaler Antikörper	Hase	Proteintech	1:1000
HIF-1α (C-Terminal) polyklonaler Antikörper	Hase	Cayman	1:1000

Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-Hase- Zweitantikörper; Meerrettichperoxidase- linked	Ziege	Sigma-Aldrich	1:10000

2.7 Software

Software	Version
DatLab	7.4.0.4
Evolution-Capt Edge	18.08f
FIJI ImageJ	1.53c
Gen 5	1.11
Microsoft PowerPoint	2016
Microtrax FLEX Software	11.0.0.5
PreSens SDR	4.0.0
Spectramanager™	2.0
Stabino Control	2.00.27.02
WinASPECT	2.5
ZEN blue	3.0

2.8 Allgemeine Partikel- und Syntheseanalysen

2.8.1 Synthese des artifiziellen Sauerstoffträgers (A-AOC)

Für die Synthese der artifiziellen Sauerstoffträger bediente man sich der Methode der Hochdruckhomogenisierung. Ein Syntheseansatz setzte sich aus 4 mL reinem Perfluordecalin und 20 mL einer steril filtrierten, 5% w/v BSA-Lösung zusammen. Beide Lösungen wiesen eine Temperatur von 4 °C auf. Dabei wurde die Proteinlösung vorgelegt und das PFD hinzugegeben. Durch die hohe Dichte des PFDs lief dieses durch die Proteinphase und lagerte sich als makroskopische Perlen am Grund des Reaktionsgefäßes an. Mithilfe eines Hochleistungs-Dispergiergeräts (Ultra-Turrax®, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) wurde bei 13.400 rpm eine Präemulsion erzeugt, welche anschließend dem Hochdruckhomogenisator (Microfluidizer® LM 20) zugeführt wurde. Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Arten des A-AOC-Synthese verwendet:

1. Die erste Form der Synthese wurde gruppenintern als Standardsynthese bezeichnet. Hierbei wurde die Präemulsion unter Einsatz eines Betriebsdrucks von 20.000 psi vollständig prozessiert und mit einem 50 mL Sputumröhrchen aufgefangen.
2. Die zweite Syntheseart stellt eine Weiterentwicklung der Standardsynthese dar und wird als modifizierte Kaltsynthese (MOK) bezeichnet. Mithilfe eines Perfusionsschlauchs wurde am Hochdruckhomogenisator ein geschlossener Kreislauf erzeugt, der eine Rezyklisierung des Syntheseansatzes ermöglichte. Die Nanoemulsion wurde in zwei Stufen mit einem Druckgradienten erzeugt: Zunächst

wurde der Ansatz einem Druck von 20.000 psi für 15 Stöße ausgesetzt, der dann für weitere 15 Stöße auf 30.000 psi erhöht wurde. Bei 30.000 psi wurde die Probe auch final ausgeworfen und ebenfalls mit einem 50 mL Sputumröhrchen aufgefangen.

Um während der Synthesen Einfluss auf die Temperatur nehmen zu können, verfügt das System über eine ausgelagerte Kühlspirale. Diese würde 20 Minuten vor Beginn der Synthesen mit Eis überdeckt, so dass die Partikel bei einer Temperatur knapp über dem Gefrierpunkt hergestellt wurden. Beide Synthesen lieferten eine Emulsion mit einer theoretischen Volumenfraktion von etwa 16,67 vol%.

2.8.2 Aufreinigung der Partikelsynthese

Bei der Synthese der Sauerstoffträger wird nur ein geringer Teil des Albumins für die Formation der Partikelhülle benötigt. Die Analyse der Partikel erforderte im Falle einiger Methode die Eliminierung des überschüssigen Proteins. Die Aufreinigung der Suspension erfolgte in einem dreischrittigen Programm, das sich aus wiederholtem Zentrifugieren und Resuspendieren zusammensetzte:

1. Zentrifugation der Synthese bei 1500 x g / 4 °C für 120 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Partikel in autoklaviertem Aqua bidest. aufgenommen.
2. Erneute Zentrifugation bei 1000 x g / 4 °C. Anschließende Resuspension des Pellets wie oben beschrieben.
3. Wiederholung des zweiten Schritts.

Nach Beendigung der Aufreinigung wurde das Volumen der Ausgangsmenge angepasst. Bei Bedarf erfolgte die Aufnahme des Pellets nach finaler Zentrifugation in einem abweichenden Medium, was an gegebener Stelle angemerkt wird. Mithilfe eines Bromkresolgrünassays wurde die Proteinmenge im Überstand ermittelt. Weiterhin nutzte man einen Oxygraphen, um einen potenziellen Verlust an PFD und somit A-AOC bestimmen zu können.

Die Aufreinigung der Standardsynthese folgte einem ähnlichen Protokoll, welches der folgenden Tabelle festgehalten wird und auf gruppeninternen Arbeiten von Fabian Nocke und Johannes Jägers basiert.

	Standardsynthese (Syntheseweg A)	MOK-Synthese (Syntheseweg B)
Tag 1	<ul style="list-style-type: none"> • 20 mL 5% BSA + 4 mL PFD • Voremulsion 13.400 rpm • Hochdruckhomogenisierung → 1 Zyklus; 20.000 psi) • Zentrifugation → 10 Stunden, 1000 x g 	<ul style="list-style-type: none"> • 20 mL 5% BSA + 4 mL PFD • Voremulsion 13.400 rpm • Hochdruckhomogenisierung → 15 Zyklen; 20.000 psi → 15 Zyklen; 30.000 psi
Tag 2	<ul style="list-style-type: none"> • Überstand wird verworfen; Aufnahme des Pellets in Aqua bidest. 	<ul style="list-style-type: none"> • Zentrifugation → 2 Stunden, 1.500 x g

	<ul style="list-style-type: none"> • Zentrifugation → 3 Stunden, 1000 x g • Überstand wird verworfen; Aufnahme des Pellets in Aqua bidest. • Erneute Zentrifugation → 2 Stunden, 1000 x g • Verwerfen des Überstande und Aufnahme des Pellets in Aqua bidest. 	<ul style="list-style-type: none"> • Überstand wird verworfen; Aufnahme des Pellets in Aqua bidest. • Zentrifugation → 1 Stunde, 1.000 x g • Überstand wird verworfen; Aufnahme des Pellets in Aqua bidest. • Zentrifugation → 1 Stunde, 1000 x g • Überstand wird verworfen; Resuspension (Trägermedium wird an gegebener Stelle angegeben
Tag 3	<ul style="list-style-type: none"> • Abschließende Zentrifugation (30 min, 2000 x g) • Überstand verwerfen und Beladung nach Protokoll 	<ul style="list-style-type: none"> • Beladung mit tRES nach Protokoll

Mit Ausnahme der Ischämie-Reperfusionversuche wurden alle Analysen funktioneller und struktureller Natur mit aufgereinigten A-AOC-Ansätzen durchgeführt, um eine isolierte Untersuchung der A-AOC und des A-AOC-tRES-Systems zu ermöglichen.

2.8.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Methode der dynamischen Lichtstreuung (DLS) liefert Informationen über die Dynamik und damit ebenfalls über die Größenverteilung von Kolloiden in Dispersionen. Die Analyse erfolgt durch die Bestrahlung der Partikel mit einem monochromatischen Laserlicht, welches eine Wellenlänge von 780 nm und eine Leistung vom 3 mW aufweist. Dabei werden die streuenden Eigenschaften des Kolloids zur Gewinnung von Daten zunutze gemacht. Bei Kollision mit einem in Lösung befindlichen Partikel wird das Laserlicht in alle Richtungen gestreut. Die Brown'sche Molekularbewegung der Partikel verursacht eine Frequenzverschiebung zwischen einstrahlenden und gestreutem Licht, die anhand der daraus resultierende optische Interferenz der beiden Strahlengänge ermittelt werden kann. Die Frequenzverschiebung wiederum kann zur Bestimmung der Diffusionsgeschwindigkeit der Partikel genutzt werden. Anschließend kann mithilfe der Stokes-Einstein-Beziehung der hydrodynamische Radius bei bekannter Temperatur und Viskosität berechnet werden:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$

D: Diffusionsgeschwindigkeit, k_B : Boltzmann-Konstante, T: Temperatur, η : Viskosität der Suspensionslösung und r = hydrodynamischer Radius der Partikel.

Im Gegensatz dazu wird die Partikelgrößenverteilung einer heterogenen Emulsion über das logarithmisch transformierte Leistungsspektrum des gestreuten Lichts kalkuliert.

Partikelgrößenverteilungen der Sauerstoffträger wurden mit der NANO-flex[®]-System von Microtrac (Haa, Deutschland) aufgezeichnet, welches imstande ist, im 180°-Winkel zum Einstrahlwinkel gestreutes Laserlicht zu detektieren. Für die Messung wurden 0,5 mL der A-AOC-Emulsion in eine 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Die am Gerät angebrachte Lasersonde wurde bis zu einer an der Sonde befindlichen Markierung in die Probe getaucht. Messungen wurden bei 21°C Umgebungstemperatur und unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Brechungsindex: 1,345; $\eta_{20^\circ\text{C}}$: 2,232 mPa*s; $\eta_{25^\circ\text{C}}$: 1,974 mPa*s. Resultate wurden als Mittel aus drei Messungen (jeweils fünf Minuten) gebildet. Die Auswertung erfolgte mit der Herstellersoftware Microtrac Flex (Version 11.0.05).

2.8.4 Sauerstoffkapazitätsbestimmung mithilfe eines Oxygraphen

Sauerstoffkapazitäten unterschiedlicher Ansätze wurden mittels Oxygraphie ermittelt. Die Messungen erfolgen in zwei auf 37 °C temperierten Kammern, die sich durch Stopfen gasdicht verschließen lassen und eine gleichzeitige Messung von Duplikaten ermöglichen. Eine dünne Kapillare im Stopfen gestattet die Zugabe von Reagenzien mit einer ebenfalls gasdichten Hamilton-Spritze. Die für die Bestimmung der Sauerstoffmenge verantwortliche Elektrode befindet sich am Boden der Messkammer und ist durch eine Teflonmembran von dem Inhalt der Messkammer getrennt. Der sich im Ansatz gelöste Sauerstoff diffundiert über die Teflonmembran und erfährt eine Reduktion an der Kathode. Es wird ein zur Sauerstoffkonzentration proportionaler Strom zwischen Kathode und Anode erzeugt.

Proben wurden vor der Messung für 30 min in einem Wasserbad auf 37 °C äquilibriert und mit einem konstanten Sauerstofffluss von 0,5 L/min unter Rühren oxygeniert. Die Oxygenierung erfolgte in einem gasdichten Braunglas-Gefäß mit Septum. Zusätzlich wurde vor Beginn der Messung ein Nullpunkt als Ausgangswert etabliert. Dazu wurden die Messkammern mit 2 mL einer Hefesuspension gefüllt (2,9 mg/mL Trockenhefe in Natriumphosphatpuffer). Sobald der sich in der Kammer befindliche Sauerstoff durch die respiratorische Aktivität der Hefe verbraucht und der Nullwert erreicht wurde, wurden 50 µL einer 100 mM Kaliumcyanid-Lösung (Endkonzentration 2,5 mM) zugegeben. Dadurch erfolgt die Hemmung der Hefeaktivität und eine Stabilisierung des Nullwerts als Ausgangspunkt. Für die Messung wurden 50 µL der oxygenierten Probe zugegeben. Proportional zu der in der Probe gelösten Menge wird eine Veränderung der O₂-Konzentration in der Messkammer detektiert. Jede Probe wurde pro Messkammer dreimal gemessen (insgesamt sechs technische Replikate). Die Auswertung der generierten Daten wurde mithilfe der Herstellersoftware DatLab, Version 7.4.0.4, durchgeführt.

2.8.5 Rheologische Bestimmung von Viskosität und Schubspannung

Viskositätsmessungen von künstlichen Sauerstoffträgern wurde mithilfe eines modularen Kompaktrheometers (MCR 92, Anton Paar, Graz, Austria). Dabei wurden 1,1 mL Probe auf ein Kegel/Platte-basiertes Messsystem aufgetragen (CP60-1, Anton Paar, Graz, Austria), welches Scherraten von 1 bis 5000 s⁻¹ während den Messungen erzeugt. Aus dem dafür benötigten Drehmoment erfolgte die Berechnung der Schubspannung τ

$$\tau = F/A_S$$

Und daraus wurde die Scherviskosität η nach Newtons Viskositätsgesetz abgeleitet:

$$\eta = \tau/\dot{\gamma}$$

Dabei sind F: Scherkraft (aus dem benötigten Drehmoment), A: Fläche des Messsystems (Scherfläche) und $\dot{\gamma}$: Scherrate. Die Proben wurden vor Durchführung der Messung für zwei Minuten bei 37 °C äquilibriert. Die Aufrechterhaltung der Messtemperatur wurde von einer mit einem Peltierelement versehenen Kammer gewährleistet. Die Berechnung und Auswertung der erfassten Datenpunkte wurde mit der Herstellersoftware RheoCompass 1.26 durchgeführt.

2.8.6 UV/Vis Photometrie

Für Untersuchungen mittels UV/Vis-Spektroskopie wurde stets 1 mL der zu analysierenden Probe in eine Acryl-Kunststoff-Küvette überführt. Die Küvette wurde in den Strahlengang des UV/Vis-Spektrometers platziert und ein Spektrum des gesamten möglichen Spektralbereichs aufgezeichnet (200 – 800 nm). Für die Messung verwendete Dilutionen werden an betroffenen Stellen erwähnt.

2.8.7 Bromkresolgrün-Färbung (BKG)

Quantifizierungen von Albuminkonzentrationen erfolgten mithilfe einer Bromkresolgrün-Färbung. Das hier verwendete Protokoll basiert dabei auf einer von Schirardin et al. vorgestellten Vorgehensweise¹²⁸. 1 mL der BKG-Gebrauchslösung wurde in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß und mit 5 μ L der zu untersuchende BSA-Lösung versetzt. Durch die Verwendung eines Vortex wurde der Ansatz gründlich gemischt. Die Interaktion von Bromkresolgrün und Serumalbumin resultiert in einer Farbänderung der Gebrauchslösung von grün nach blau. Die Verwendung von BKG zur Determinierung von Serumalbuminkonzentrationen wird als Standardmethode betrachtet, dennoch verbleiben die molekularen Mechanismen der Protein-Farbstoff-Wechselwirkung und der Farbänderung größtenteils im Dunkeln. Eine reversible Bindung von Bromkresolgrün an die Sudlow-1-Bindetasche des Proteins ist jedoch bereits bekannt¹²⁹. Die Farbverschiebung des BKG kann photometrisch bei 625 nm quantifiziert werden. Mithilfe einer Standardkonzentrationsreihe

(0.25 %, 0.5 %, 1 %, 2.5 %, 4% und 5 % BSA) wurde anhand der Absorptionswerte, die in der jeweiligen Probe vorliegende BSA-Konzentration bestimmt.

Diese Methode kam, unter anderem, zur Bestimmung der BSA-Menge zum Einsatz, welche bei der Partikelsynthese verbraucht wurde. Hierfür wurden die Partikel nach erfolgter Synthese pelletiert und eine Volumenfraktion des Überstandes abgenommen. Diese Probe wurde mithilfe der BKG-Färbung auf den Proteingehalt untersucht. Die ermittelte Proteinkonzentration wurde von der Ausgangsmenge von 5 w/v % subtrahiert, um als Partikelhülle vorliegende Proteinmenge zu bestimmen.

2.9 Methoden zur Analyse der Proteinhülle

2.9.1 CD-Spektroskopie

CD-Spektren zur Untersuchung der Sekundärstrukturen von BSA und A-AOC in An- und Abwesenheit von tRES wurden mithilfe des CD-Spektropolarimeter J-175 von Jasco aufgezeichnet. Die Messungen wurden in 1 mm Quartzglasküvetten in einem Bereich von 190-260 nm durchgeführt. Für jede Probe wurden drei konsekutive Scans durchgeführt, deren Mittel das finale Spektrum und Resultat bildete. Die Absorption sowie Elliptizität der Probe wurden von dem Gerät in Milligrad aufgezeichnet. Eine Konvertierung der Daten in *mean residual ellipticity* (MRE) war erforderlich, um anhand der Werte die Zusammensetzung der sekundären Struktur bestimmen zu können. Die Umwandlung der Werte wurde mithilfe von DichroWeb unter Verwendung eines CDSSTR-Algorithmuses durchgeführt^{130,131}. Als Trägermedium der Proben diente steriles Aqua bidest. und die Messtemperatur lag bei 25 °C.

2.9.2 Analyse des Tryptophanquenchings

Die proteininterne Tryptophanfluoreszenz des Albumins wurde in An- und Abwesenheit von tRES untersucht. Die Erfassung der Fluoreszenzsignale erfolgte mit dem Spektrofluorometer Jasco FP-8300. 60 µL der Probe wurden in eine Ultramikroküvette überführt und diese in den Strahlengang des Anregungslasers platziert. Die Anregung erfolgte bei 280 nm, wobei die Frequenz des Anregungslasers auf 350 V und die Spaltbreite für Anregung und Emission auf 5 nm fixiert wurde. Die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Ein Kontrollelement (PCT-818) gewährleistete eine Aufrechterhaltung der gewünschten Temperatur. Die Emission in einem Spektrum von 285-450 nm wurde aufgezeichnet. Die Erfassung der Daten erfolgte mit der Herstellersoftware *Spectramanager*TM. Als Trägermedium aller Proben diente steriles Aqua bidest.

2.9.3 Ermittlung des Zeta-Potentials

Treten Partikel mit einem flüssigen Trägermedium in Kontakt, so formiert sich um das Partikel eine Ionenhülle als elektrische Doppelschicht, bestehend aus freien Ionen, die in der flüssigen Phase dissoziiert vorliegen. Dieses Phänomen beruht auf der Oberflächenladung der Partikel,

die anziehend auf Ionen des umliegenden Mediums wirkt. Während ihrer Bewegungen durch die Flüssigkeit werden die Partikel stetig von der Ionen-Doppelschicht begleitet, die sich entlang ihrer Grenzfläche bewegt. Diese wird auch als Scherebene bezeichnet. Das elektrische Potential an dieser Scherebene ist das zu detektierende Zeta-Potential ζ , welches als Indikator für die Stabilität der Partikel gegen Agglomeration dient und die Einheit Millivolt (mV) trägt.

Die Bestimmung des Zeta-Potentials der A-AOCs erfolgte mit dem Stabino[®] von Microtrac (Haa, Deutschland). 1 mL der zu untersuchenden Probe wird in einen Teflon-Messbecher überführt. Ein Stößel wird in das Probengefäß vorsichtig eingeführt und die gesamten Konstruktionen an eine Halterung des Messgeräts angebracht. Die Partikel liegen nun elektrostatisch immobilisiert an den Becherwänden vor. Durch oszillierende Bewegungen des Stößels wird ein Flüssigkeitsstrom erzeugt, wodurch eine Deformation der Ionenwolke und eine Ladungstrennung erreicht wird. Das Ausmaß der Ladungstrennung stellt das Zeta-Potential dar und wird über zwei Elektroden erfasst, die mit dem Messbecher in Kontakt stehen. Für jede Probe wurden 10 Messpunkte ermittelt, deren Mittelwert das finale Zeta-Potential darstellte. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Erfassung und Berechnung der Daten wurden von der gerätinternen Software Stabino[®] Control (Version 2.00.27.02) durchgeführt. Messungen wurden bei einem physiologischen pH von 7,4 durchgeführt.

2.9.4 Quantifizierung von Sulfhydryl-/Thiolgruppen

Die Quantifizierung von Sulfhydrylgruppen sowohl am nativen BSA als auch an der Proteinhülle der Partikel konnte durch die Verwendung des Fluorophors Thiolyte[®] realisiert werden. Hinter dem Produktnamen verbirgt sich ein Monobromobiman-Reagenz, welches mit einem Allylbromid als funktionelle Gruppe ausgestattet ist. Das Allylbromid ist imstande innerhalb kürzester Zeit unter physiologischen Bedingungen und Ablauf einer Alkylierungsreaktion (hohe Reaktionskinetik) mit Sulfhydrylgruppen ein kovalentes Addukt auszubilden. Dabei besitzen Monobromobimane die Besonderheit, erst nach erfolgreicher Interaktion mit reduzierten Thiolgruppen zu fluoreszieren.

Bei der Bestimmung des Sulfhydrylgehaltes kamen aufgereinigte Partikel zum Einsatz. Als Trägermedium für BSA und Partikel diente dabei autoklaviertes Aqua bidest. und der pH in den physiologischen Bereich von 7,4 angehoben. Das Monobromobiman-Reagenz wurde in einem leichten molaren Überschuss zum Protein eingesetzt, um eine vollständige Erfassung aller vorliegenden Sulfhydrylgruppen zu gewährleisten. So wurden BSA und Partikel in einem molaren Verhältnis von 1:5 mit der Monobromobiman-Stammlösung (10 mM in Acetonitril gelöst) behandelt. Die behandelten Proben wurden unter Ausschluss von Licht und bei RT für 10 min inkubiert.

Monobromobimane, die ein Addukt mit einer Sulfhydrylgruppe ausgebildet haben, besitzen ein Absorptionsmaximum bei 370-385 nm und emittieren Licht mit Wellenlängen von 477-485 nm. Daher konnten bereits erste Eindrücke mithilfe eines UV-Transilluminators gewonnen. Eine Quantifizierung des Fluoreszenzsignals wurde anschließend mit einem Mikrotiter-Fluoreszenzlesegerät durchgeführt.

2.9.5 Blockierung von Sulfhydryl-/Thiolgruppen

Verfügbare Sulfhydrylgruppen des freien BSA und der Proteinhülle der A-AOC wurde mithilfe des alkylierenden Reagenz N-Ethylmaleimid (NEM) blockiert. Die erforderliche Maleimid-Reaktion mit Sulfhydrylgruppen findet zwischen einem pH-Wert von 6,5-7,5 statt, weswegen der pH-Wert der zu untersuchenden Ansätze an den benötigten Bereich angepasst wurde. Aus der Reaktion geht eine irreversible Thioethergruppe hervor und endet in einer Ethylgruppe, welche das Sulfhydryl erfolgreich blockiert.

Für die Durchführung der Blockade bediente man sich eines angepassten Protokolls, welches von Marley et al.¹³² abgeleitet und angepasst wurde. Aufgereinigte A-AOC-Ansätze der MOK-Synthese wurden mit einer finalen Konzentration von 1 und 2 mM NEM versetzt. Behandelte Proben wurden unter ständiger Invertierung unter Ausschluss von Licht und bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde mit den Proben so verfahren, wie in 2.9.4 beschrieben.

2.9.6 Untersuchung hydrophober Regionen des Albumins

Um weitere Erkenntnisse über strukturelle Veränderungen des Albumins und somit über die Protein-tRES-Interaktionen zu gewinnen, würden die hydrophoben Bindetaschen des Proteins untersucht, Hierfür bediente man sich der amphiphilen Fluoreszenzsonde 8-Anilino-1-naphthalin-sulfonsäure (ANS). Der ungebundene Farbstoff besitzt eine geringe Fluoreszenzemission, da in einem polaren, wässrigen Umfeld ein Quenching-Effekt auftritt¹³³. Die Interaktion zwischen Protein und Farbstoff werden hauptsächlich von elektrostatischen Wechselwirkungen vermittelt. Die nicht-kovalente Anlagerung an ein Protein wird dabei primär von kationischen Seitenkette ermöglicht¹³⁴. Die Anlagerung des ANS an eine hydrophobe Domäne/Tasche eines Proteins resultiert in einer massiven Steigerung der Quantenausbeute und des Fluoreszenzsignals. Der sich dahinter verbergende Mechanismus beruht auf zwei Umständen: Zum einen auf der Verlagerung des Fluorophors in eine unpolare Umgebung und damit der Reduktion des Quenching-Effekts durch wässrige Lösungen. Zum anderen durch die Restriktion der intramolekularen Mobilität, die sich aus der Interaktion des Moleküls mit der hydrophoben Tasche ergeben¹³⁵.

Um den Zustand der hydrophoben Bindetaschen des freien BSA und des Albumins an der A-AOC-Proteinhülle zu untersuchen, wurde wie folgt vorgegangen: das ANS wurde in einem molaren Überschuss zum Protein (1:10) gegeben, um eine Interaktion mit allen potenziellen

Bindestellen des Proteins zu gewährleisten¹³⁶. Die Inkubation des Gemischs erfolgte unter Ausschluss von Licht und bei RT für zwei Stunden. Die gebundene Fluoreszenzsonde absorbiert im UV-Bereich (355-380 nm) und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 460-480 nm. Auch hier konnten erste Eindrücke mit dem UV-Transilluminator gewonnen werden. Die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals erfolgte an einem Mikrotiter-Fluoreszenzlesegerät.

2.10 Untersuchungen der A-AOC-tRES-Interaktion

2.10.1 Bestimmung der maximalen tRES-Löslichkeit

Um die maximale Löslichkeit von *trans*-Resveratrol an der BSA-Hülle der MOK-Partikel zu bestimmen, musste zunächst mithilfe der BKG-Färbung die an der Partikeloberfläche gebundene Proteinmenge bestimmt werden. Ausgehend von den Angaben von Tabibiazar et al.⁹⁰ ist BSA imstande, tRES in einem molaren Verhältnis von 1:2,3 zu lösen. Ausgehend von dieser Erkenntnis wurde eine BSA-Stocklösung mit einer Konzentration von 167 μM angesetzt und tRES wurde in einem molaren Überschuss von 2,35 der Proteinlösung zugeführt. Es folgte eine Inkubation der beiden Komponenten für 1 h unter stetigem Rühren bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Ansatz bei 3000 x g für 30 min bei 4°C zentrifugiert, um potenziell überschüssiges tRES zu pelletieren. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in unvergälltem EtOH (100%) resuspendiert. Das gelöste tRES wurde photometrisch bei 308 nm und $\epsilon_{308} = 30000$ quantifiziert¹³⁷. Die Differenz zwischen Einwaage und Pellet wurde als gelöste Menge ermittelt.

2.10.2 Beladung des artifiziellen Sauerstoffträgers mit *trans*-Resveratrol

Eine Untersuchung der Interaktion zwischen Partikeloberfläche und tRES erforderte die Verwendung von Syntheseansätzen, aus denen das überschüssige Protein durch die Aufreinigungsprotokolle (s. 2.8.2) eliminiert wurde. A-AOC der MOK-Synthese mit einem Volumen von 22 mL und einer Proteinkonzentration 92,8 μM wurden mit 194,8 μM tRES versetzt. Es folgte eine Inkubationsphase von 1 h bei RT. Durch Verwendung eines Magnetrührers wurde eine gleichmäßige Durchmischung des Ansatzes gewährleistet. Um die durch UV-Licht induzierbare Isomerisierung von *trans*- zu *cis*-Resveratrol zu unterbinden, wurde der Ansatz während der Inkubation vor Lichtexposition geschützt.

Im Falle der Standardsynthese wurde zunächst ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt durchgeführt. Eine Volumenfraktion von 1 mL der Partikel wurden bei 2000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in einer tRES-Lösung mit einer Konzentration von 65,7 μM resuspendiert. Die Probe wurde unter Ausschluss von Licht und unter ständigem Invertieren 1h bei RT inkubiert. Darauf folgte eine zusätzliche Pelletierung der Probe, um potenziell ungebundenes tRES zu eliminieren. Der Überstand wurde abgenommen und diente zur photometrischen Ermittlung der gebundenen tRES-Menge. Unter Verwendung

des Lambert-Beer'schen Gesetzes wurde die Konzentration an Resveratrol mithilfe der Absorptionwerte bei 304 nm bestimmt ($\epsilon_{304\text{nm}} = 30335 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}^{72}$). Das Pellet wurde in 1 mL PBS oder Aqua bidest. aufgenommen. Um eine potentielle Freisetzung des tRES zu untersuchen, wurden die beladene Standardsynthese erneut eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde, wie oben beschrieben, photometrisch analysiert.

2.10.3 Freisetzungskinetik von *trans*-Resveratrol

Zur Bestimmung, ob und in welchem Umfang tRES nach einer Assoziation mit BSA und AOC der MOK-Synthese freigesetzt wird, wurde die Methode der Dialyse genutzt. Sowohl BSA als auch die aufgereinigte MOK-Synthese wurden in 1 x PBS (pH 7,4) aufgenommen und wie in 2.10.2 geschildert mit tRES beladen. 5mL der mit versetzten Proben wurden anschließend in Dialyseschläuche überführt und bei unterschiedlichen Temperaturen (Raumtemperatur oder 37°C) gegen 100 mL 1 x PBS dialysiert. Die Dialyse wurde unter ständigem Rühren durchgeführt. Zu mehreren Zeitpunkten (30, 60, 120, 180, 240 min nach Beginn der Dialyse) wurden 1 mL aus dem Dialysereservoir entnommen und spektrophotometrisch analysiert. Es wurden stets vollständige Spektren (200-800 nm) aufgezeichnet. Das entnommene Volumen wurde sofort ersetzt, so dass während der gesamten Dialyse das Volumen konstant verblieb.

2.10.4 ABTS-Decolorisierungsassay

Bei einem auf ABTS basierenden Decolorisierungsassay handelt es sich um eine populäre Methode, die zur Ermittlung und Einordnung von antioxidativen Kapazitäten einzelner Substanzen und Systeme herangezogen wird. Dafür wird zunächst das stabile ABTS-Kationenradikal $\text{ABTS}^{+\cdot}$ mithilfe eines Oxidationsmittel erzeugt. In dieser Arbeit bediente man sich zwei verschiedener Vorgehensweise der Radikalgenerierung.

Im ersten Ansatz fungiert das starke Oxidationsmittel Kaliumperoxodisulfat über zwei Mechanismen als Radikalstarter: Zum einen über eine Protonierung und Zerfall zu $\text{HSO}_4\cdot$ und $\text{SO}_4^{\cdot-}$, gefolgt von einer Oxidation des ABTS durch $\text{SO}_4^{\cdot-}$. Zum anderen durch eine direkte Oxidation durch das Peroxodisulfat-Anion. Das dabei entstehende $\text{ABTS}^{+\cdot}$ weist eine dunkelgrüne Färbung auf und kann photometrisch bei 419 und 734 nm nachgewiesen werden. Durch die Zugabe einer antioxidativ aktiven Komponente findet eine Reduktion des Kationenradikal und eine Entfärbung der Lösung statt (Decolorisierungsreaktion), die als Abnahme der Absorption bei 419 und 734 nm spektrophotometrisch quantifiziert werden kann. Resultate wurden als Quotient der Absorptionwerte bei 350 und 419 nm dargestellt, da die reduzierte Form des ABTS bei 350 nm nachgewiesen werden kann. Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll wurde von der Vorgehensweise von Re et al. abgeleitet¹³⁸ und das Decolorisierungsassay wurde wie folgt durchgeführt:

Am Tag zuvor wurde eine ABTS-Radikalkation-Stammlösung angesetzt, in der das ABTS-Reagenz und das Oxidationsmittel Kaliumperoxidsulfat in 10 mL 1 x PBS (pH 7,4) aufgenommen wurde. Die finalen Konzentrationen lagen bei 7 mM ABTS und 2,45 mM Kaliumperoxodisulfat. Das Gemisch wurde lichtgeschützt und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Der Versuchsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1,5 mL ABTS-Stammlösung

6 mL 1 x PBS

2,5 mL zu untersuchende Komponente

Die Gesamtdauer des Versuchs belief sich auf drei Stunden. Messungen wurden 30, 60, 120 und 180 min nach Versuchsbeginn durchgeführt. Nach dem ersten Messpunkt wurde der Ansatz mit zusätzlichen 500 µL der ABTS-Radikalkation-Stammlösung versetzt. Die entnommenen Proben wurden spektrophotometrisch in zwei Dilutionen (1:10 und 1:100) analysiert, um alle für die Auswertung benötigten Absorptionswerte in dem Bereich von 0,1-1 halten zu können.

Die zweite Form bediente sich einer Enzymkaskade, bestehend aus der Glucoseoxidase (GOx) und der Meerettichperoxidase (HRP). Das von der GOx produzierte H₂O₂ wurde von der HRP zur Generierung des ABTS-Kationradikals verwendet. Ein Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

320 µL GOx-HRP-Stammlösung

4,68 mL 1 x PBS

1 mL der zu untersuchenden Komponente

Proben für Messungen wurden zu drei Zeitpunkten entnommen (10, 20 und 30 min nach Versuchsbeginn) und photometrisch bei 734 nm analysiert

Die photometrische Untersuchung partikelhaltiger Proben erforderte einen vorangehenden Zentrifugationsschritt (1 min bei 13.400 rpm), um die A-AOCs aus der flüssigen Phase zu eliminieren.

2.10.5 SIN-1-Chemilumineszenz-Assay

Das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Chemilumineszenz-Assay beruhte auf den zwei Komponenten Luminol und SIN-1. Luminol diente dabei als Signalmolekül. Die Generierung eines Lumineszenzsignals durch Luminol erforderte die Bildung eines angeregten, radikalisierten Intermediats, welches aus einer Reaktion von Luminol und ROS hervorgeht. Bei der spontan ablaufenden Rückkehr zum Grundzustand ergibt sich eine Lichtemission von 425 nm, die sich mit einem Luminometer detektieren und quantifizieren lässt. Als treibende Kraft der Luminol-Radikalisierung diente dabei der Peroxynitritdonor SIN-1.

Die einzelnen Komponenten, die für das Experiment erforderlich waren, wurden in einem Messröhrchen zusammengeführt. Ein Messansatz setzte sich demnach wie folgt zusammen:

1,48 mL Chemilumineszenz-Gemisch

0,5 mL Aqua bidest./zu untersuchende Komponenten, aufgenommen in Aqua bidest.

0,02 mL 10 mM SIN-1-chlorid

Die Messungen wurden bei Raumtemperatur und einem leicht alkalischen pH-Wert von 8,2 durchgeführt, um ein stabileres und langlebigeres Lumineszenzsignal zu erhalten¹³⁹. Die Zugabe von SIN-1 erfolgte kurz vor Beginn des Experiments. Nach Zugabe des Oxidans wurden eine Messung nach 30 min durchgeführt.

2.11 Zellkulturelle Methoden

Die im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Arbeiten in der Zellkultur beschränken sich lediglich auf die Zelllinie HL-1. HL-1-Zellen stellen immortalisierte murine Kardiomyozyten dar, die zu spontanen Kontraktion und kontinuierlicher Teilung, bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung eines differenzierten kardialen Phänotyps, befähigt sind. Sie können seriell passagiert werden, ohne den Kardiomyozytenphänotyp, einschließlich morphologischer, biochemischer und elektrophysiologischer Charakteristika, zu beeinträchtigen. Somit stellen sie ein ideales Modell für *in vitro* Untersuchungen der Kardiomyozytenfunktion unter pathologischen Umständen, wie z.B. eine Ischämie-Reperfusion, dar. HL-1 Zellen waren ein großzügiges Geschenk der Arbeitsgruppe Hendgen-Cotta.

2.11.1 Auftauen, Kultivierung und Passage der HL-1 Zelllinie

Die Langzeitlagerung der angelegten HL-1 *Master-Cellbank* erfolgte in Kryogefäßen in flüssigem Stickstoff. Das verwendete Gefriermedium setzte sich zu 90 % aus fetalem Kälberserum und zu 10 % aus DMSO zusammen. Da DMSO zwar das Einfrieren von Zellen ermöglicht, jedoch auch eine cytotoxische Wirkung besitzt, wurde das Auftauen und Aussäen der gefrorenen Zellen auf eine besonders schonende Weise vollzogen. Zunächst tauchte man die Zellen für 2-3 min in ein 37 °C warmes Wasserbad, bis kein Eis mehr im Kryogefäß sichtbar war. Zügig wurde das Gefäß desinfiziert und unter eine Sterilbank überführt. Die Zellen wurden mit einem großzügigen Volumen in Zellkulturmedium aufgenommen und für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert und das Zellpellet in einem supplementierten Claycombvollmedium resuspendiert. Die Zellen wurden abschließend in eine Zellkulturflasche überführt. Der Austausch des Mediums erfolgte alle 48 h und eine Passage der Zellen wurde durchgeführt, sobald eine Konfluenz von 80-90% vorlag. Um den HL-1-Zellen ein möglichst ideales Milieu für die Adhäsion zu bieten, erforderte die Passage der Zellen die Beschichtung der neuen Kulturfläche mit einer Matrix bestehend aus Gelatine (0,2 g/L) und Fibronectin (5 mg/L) für mindestens eine Stunde bei 37 °C. Nach Abschluss der erforderlichen Inkubation der Gelatine/Fibronectin-Beschichtung wurde die Passage der Zellen in folgenden Schritten durchgeführt:

1. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und die Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen.
2. Um die adhäsiven Zellen ablösen zu können, war eine zweistufige Behandlung mit einer Trypsin-EDTA-Lösung vonnöten. Im ersten Schritt wurden die Zellen für eine Minute mit einem Trypsin/EDTA-Gemisch (0,05% Trypsin in 0,02% EDTA-Natrium) behandelt. Anschließend wurde die Lösung erneuert und die Zellen für weitere drei Minuten inkubiert.
3. Die sich nun in Lösung befindlichen Zellen wurden in serumhaltigen Waschmedium aufgenommen und bei 500 x g für fünf Minuten pelletiert.
4. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet nun in supplementierten Claycombmedium resuspendiert.
5. Für die Erhaltung der Kultur wurden die Zellen für gewöhnlich in Dilutionen von 1:10 und 1:20 in T25-Zellkulturflaschen passagiert. Die hohen Dilutionen waren für die Ausprägung des spontan kontraktiven, kardialen Phänotyps entscheidend.
6. Zur Kultivierung der Zellen wurde ein Inkubator mit Standardatmosphäre genutzt (37 °C, 5 % CO₂, 21 % O₂)

Die Zellkultur wurde alle 3 Monate durch das Auftauen einer neuen Kryokonserven erneuert. Bei der Kultivierung der HL-1 wurden die Vorgaben von Claycomb et al.¹⁴⁰ beachtet.

2.11.2 Durchführung einer *in vitro* Ischämie-Reperfusion-Simulation

A-AOC tendieren in statischen Zellkulturarbeiten zur Bildung von Agglomeraten, was in einer Beschleunigung der Partikelsedimentation resultiert. Partikelagglomerate senken sich als Teppich auf adhärenente Zellen ab und schränken die Zahl an anwendbaren molekularbiologischen Analysen stark ein. Es kann nicht zwischen Effekten unterschieden werden, die von der Behandlung oder den Partikeln hervorgerufen werden. Die Durchführung von Zellkulturarbeiten mit A-AOC erfordert demnach eine spatiale Trennung der Zellen und Partikel, die durch den Einsatz von Transwell-Inserts erreicht wurde (Abbildung 24)

Die Zellen wurden 48 Stunden vor Durchführung einer I/R-Simulation auf Transwell-Inserts mit für 6-Well-Zellkulturplatten passagiert. Für jede Bedingung wurden 300.000 Zellen verwendet. Die Zellzahl wurde mithilfe einer automatischen Zählhilfe oder manuell durch die Verwendung einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. 24 Stunden vor dem Experiment wurden die Zellen mit einem serumfreien Minimalmedium behandelt. Zusätzlich wurden für den Versuch benötigte Lösungen in die Hypoxiekammer überführt und über Nacht bei 37 °C und 0,1% O₂ äquilibriert. Am Tag der Versuchsdurchführung wurden Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen und entsprechend ihrer Bedingungen behandelt: Die Negativkontrolle wurde mit neuem Minimalmedium versorgt und über die gesamte Versuchsdauer unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Die restlichen Gruppen wurden in die Hypoxiekammer überführt und

das PBS wurde durch HOX-Lösung, welches bereits über Nacht desoxygeniert wurde, ersetzt. Nach erfolgter Überführung in die hypoxische Atmosphäre wurde die äußere Phase der Inserts entweder mit oxygeniertem Perfusionsmedium oder oxygenierten A-AOC befüllt

Dauer der hypoxisch, ischämischen Phase betrug drei Stunden. Nach Abschluss der simulierten Ischämie wurde ein Teil der Zellen geerntet, um Auswirkungen der Ischämie gesondert zu untersuchen. Die verbliebenen Zellen wurden mit 1xPBS gewaschen, mit normoxischem Minimalmedium versorgt und in einen Inkubator (5 % CO₂, 21 % O₂, 37 °C) überführt. Damit wurde die Reperfusion eingeleitet, welche eine Stunde andauerte. Eine Stunde nach Beginn der Reperfusion wurden die Überstände und Zellen der einzelnen Bedingungen geerntet und für die Durchführung verschiedener Methoden verwendet.

2.11.3 Oxygenierung von Partikeln

Oxygenierung von Partikeln, die in der Zellkultur eingesetzt werden sollten, erfolgte wie folgt: Im Falle von Zellkulturversuchen erfolgte der Einsatz von aufgereinigten A-AOC in einer Konzentration von 1:4. Die Verdünnung wurde mit Perfusionsmedium angefertigt und der Ansatz in ein gasdichtes Gefäß überführt, dessen Deckel mit mehreren Septen ausgestattet und für die Oxygenierung über Kanülen präpariert wurde. Für die Begasung kam 100% O₂ zum Einsatz. 8 mL der A-AOC-Dilution wurden für 30 min vor Beginn des Experiments mit O₂ begast. Die Oxygenierung wurde in einem Wasserbad mit 37 °C und einem Gasfluss von 0,5 L/min durchgeführt. Die Gasleitung mündete über eine Mikrolanzette im Gefäß (Zufluss). Eine zusätzliche Mikrolanzette diente als Ausfluss und ermöglichte einen vollständigen Austausch der Atmosphäre im Ansatz.

2.11.4 Ermittlung des Sauerstofftransports im Insertsystem

Der Einsatz eines Insertsystems in Zellkultur führt zu einer räumlichen Trennung der HL-1-Zellen und den künstlichen Sauerstoffträgern. Beide Phasen stehen jedoch über eine mit Poren versehene Membran in Kontakt, über die auch ein potentieller Gasaustausch stattfindet. Der Partialdruck für Sauerstoff wurde in der Flüssigphase im Inneren der Inserts ermittelt, da diese die Bedingungen der unmittelbaren Umgebung der Zellen widerspiegelt.

Der im Medium vorliegende O₂-Partialdruck wurde mithilfe eines optischen Messsystems von *PreSens*® durchgeführt. Das System setzt sich dabei aus einer Zellkulturplatte mit integrierten O₂-Sensoren (*OxoDish*® OD24) und einer quantifizierenden Messeinheit (*SDR SensorDish*® Reader) zusammen. Um Verfälschungen der Messungen zu vermeiden, wurden benötigte saline Lösungen und das *OxoDish*® OD24 24h vor Beginn des Versuchs in einer hypoxischen Atmosphäre vollständig desoxygeniert (0.1 % O₂, 5 % CO₂, 99.9 % N₂, 37 °C). A-AOC und modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer wurden nach 2.11.3 oxygeniert. Die mit Zellen besiedelten Inserts wurden in die Hypoxiekammer eingeschleust und das Medium im Insertinneren durch das desoxygenierte, saline Hypoxiemedium ersetzt. Die oxygenierten Proben wurden in die

äußere Phase des Inserts gegeben. Nach 10, 20 und 30 min nach Zugabe der oxygenierten Medien wurde das Insertinnere auf das OxoDish® OD24 übertragen, um den vorliegenden O₂-Partialdruck zu ermitteln. Für jeden Zeitpunkt wurde ein separates Insert verwendet. Der O₂-Partialdruck wurde als Hektopascal (hPa) gemessen.

2.11.5 Untersuchung der HIF-1 α -Stabilisierung in HL-1-Zellen

Um eine adäquate Sauerstoffversorgung der HL-1-Zellen durch oxygenierte A-AOC unter ischämischen Bedingungen beurteilen zu können, wurde als Indikator die O₂-sensitive HIF-1 α -Untereinheit verwendet. Die HIF-1 α -Untereinheit wird konstitutiv exprimiert, jedoch lediglich unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert. Bei ausreichenden O₂-Konzentrationen wird HIF-1 α ubiquitiniert und proteasomal abgebaut¹⁴¹. Die Zellen wurden in eine Hypoxiekammer überführt (0.1 % O₂, 5 % CO₂, 99.9 % N₂, 37 °C). Nach 0,5 - 6 Stunden Inkubationszeit wurden Zelllysate gewonnen, die Proben mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse zugeführt.

2.11.6 Einfluss oxygenierter Partikel auf HIF-1 α -Akkumulation

Um die Sauerstoffversorgung der HL-1-Zellen durch oxygenierten Partikel beurteilen zu können, wurde der Einfluss auf die HIF-1 α -Untereinheit untersucht. Zu diesem Zweck wurden HL-1-Zellen, kultiviert auf TC-Inserts, vier Stunden vor Beginn des Versuchs in die Hypoxiekammer überführt (0.1 % O₂, 5 % CO₂, 99.9 % N₂, 37 °C), um eine ausreichende HIF-1 α -Akkumulation zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen mit oxygenierten Partikeln behandelt. Als Kontrolle diente oxygenierter modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer (mKHP). Proteinlysate der Zellen wurden 10 und 30 min nach Zugabe der oxygenierten Medien gewonnen, mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und mithilfe einer Western Blot-Analyse untersucht.

2.11.7 Gewinnung von Proteinlysaten

Die Gewinnung von Proteinlysaten aus zellulären Proben war für die Durchführung weiterführender Analysemethoden (z.B. Western Blots) erforderlich. Nach Abschluss eines Experiments wurden Zellen mit 1xPBS gewaschen und anschließend mit unterschiedlichen Volumina des *Whole Cell*-Lysepuffers behandelt. Mit Hilfe von Zellschabern wurden die Zellen von der Wachstumsfläche mechanisch abgelöst und mit dem *Whole Cell*-Lysepuffer in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Um einen ausreichenden Aufschluss der Zellmembran und Austritt der cytosolischen Proteine garantieren zu können, wurden die Zelllysate im Lysepuffer für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 10.000 x g für 10 min in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Dabei wurde der unerwünschte Zelldebris pelletiert und aus der Probe entfernt. Die Überstände wurden für die Bestimmung der Proteinkonzentration aufbewahrt und die Pellets verworfen. Lagerung der Proteinlysate erfolgte bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C.

2.11.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen gewonnener Zelllysate wurden mithilfe der colorimetrischen Lowry-Assays bestimmt. Die Proteinquantifizierung nach Lowry basiert auf zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen. Im ersten Schritt erfolgt die sogenannte Biuret-Reaktion, bei der sich unter alkalischen Bedingungen bläulich-violette Komplexe zwischen Peptidbindungen und Cu^{2+} -Ionen ausbilden. Anschließend findet eine Reduktion der Cu^{2+} - zu Cu^+ -Ionen unter gleichzeitiger Oxidation aromatischer Aminosäuren statt. Darauf folgt die Folin-Ciocalteau-Reaktion, in der das gelbe Folin-Ciocalteau-Reagenz durch die Cu^+ -Ionen zu Molybdänblau reduziert wird.

Die Quantifizierung der Proteine wurde mithilfe des *Detergent Compatible* Proteinassay-Kit durchgeführt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration war die Erstellung einer Kalibrierkurve mit Standardproben mit bereits bekannten Konzentrationen von 25, 10, 5, 2, 5, 1, 0,5, 0,25, 0,1 und 0 mg/L erforderlich.

Die Vorbereitung der Proben wurde dabei wie folgt durchgeführt: 45 μL Aqua bidest. wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß vorgelegt und 5 μL Probe/Standard hinzugegeben. Für die Analyse wurden 20 μL des Gemischs auf eine 96-Well-Zellkulturplatte überführt. Jede Probe wurde in Duplikaten gemessen. Jede Probe wurde anschließend mit 15 μL Reagenz A und 75 μL Reagenz B des Kits versetzt. Die Reagenzien setzten die oben geschilderten Reaktionen in Gang, um die vorliegende Proteinkonzentration zu bestimmen. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 5 min bei RT wurde die beladene Platte in ein Mikrotiter-Spektralphotometer überführt und die Proben bei 700 nm analysiert. Die geräteinterne Software (Gen 5) nutzte die pipettierte Standardproben zur Erstellung einer Kalibrierkurve, die zur Kalkulation der unbekannt Proteinkonzentrationen genutzt wurde. Die Resultate der Proben wurden als arithmetisches Mittel der einzelnen Duplikate präsentiert.

2.11.9 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Durch das Verfahren der SDS-Page können Proteine einer Probe unter Verwendung eines elektrischen Felds anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Hierfür werden 40 - 80 μg eines Proteinlysats mit SDS-Puffer versetzt und in einem Heizblock für 10 min einer Temperatur von 95 °C ausgesetzt. Dieser Schritt dient zum einen zur Denaturierung der Proteine. Die Temperatur und das SDS führen eine initiale Entfaltung des Proteins herbei, das Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken und trägt somit zu einer vollständigen Denaturierung bei. Zusätzlich sorgt die Anlagerung des SDS an das Proteingerüst für eine stark negative Ladung, die Eigenladungen überlagert. Die gebundene SDS-Menge steigt proportional mit der Masse, womit auch die Ladung mit der Masse des Proteins zunimmt. Somit hängt die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel lediglich von dem Molekulargewicht der Proben ab.

Die Anatomie eines SDS-Gels setzt sich aus den zwei Komponenten oberes Sammelgel und unteres Trenngel zusammen. Das Sammelgel dient zur Aufkonzentrierung der Proteine und sorgt für einen gleichmäßigen Eintritt der aller Proben in das Trenngel, in welchem die eigentliche Auftrennung erfolgt.

Ansätze für Sammel- und Trenngele bestanden aus folgenden Anteilen:

Sammelgel

	Aqua. dest.	30 % Bisacrylamide	4x Sammelpuffer pH 6.8
5 %	5.84 mL	1.66 mL	2.5 mL
+ 100 µL APS and 10 µL TEMED			

Trenngel

	Aqua. dest.	30 % Bisacrylamide	4x Trennpuffer pH 8.8
7.5 %	10 mL	5 mL	5 mL
12.5 %	6.67 mL	8.33 mL	5 mL
+ 200 µL APS and 20 µL TEMED			

Für die Untersuchung der HIF-1 α -Akkumulation wurden Gele mit 7,5% verwendet, während die Auftrennung der Proben für die Untersuchung der gespaltenen Caspase 3 (clCaspase 3) in Gelen mit 12,5% durchgeführt wurde.

Das Gießen der Gele erfolgte zwischen zwei Glasplatten, eingespannt in eine Ständervorrichtung. Zu Beginn wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisierung wurde das Isopropanol entfernt und die Lage des Sammelgels hinzugefügt. Probetaschen wurden durch das Einführen eines Plastikkamms in der Schicht des Sammelgels erzeugt. Das polymerisierte Gel wurde in eine mit 1x Laufpuffer befüllte Gelelektrophoresekammer überführt, mit den Proben beladen und für 90 min bei 120 V laufen gelassen.

2.11.10 Western Blot-Analyse

Nach erfolgter Auftrennung der Proteinlysate folgte eine Western-Blot-Verfahren nach Lämmli. Zu diesem Zweck musste zunächst ein Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF) mithilfe des *Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kits* erfolgen. Der Transfer wurde in zwei Schritten (10 und 4 min) bei 1,3 A und 25 V durchgeführt. Anschließend wurde die PVDF-Membran mit einer 5% w/v Milchpulver-Lösung in TBS-T für 60 min blockiert. Darauf folgte eine Übernacht-Inkubation bei 4 °C mit einem proteinspezifischen Erstantikörper. Für HIF-1 α und clCaspase 3 wurde eine 1:1000 Verdünnung eines polyklonalen Antikörpers verwendet. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen und mit einem speziespezifischen Zweitantikörper (1:10000) behandelt, welcher mit einem Enzym assoziiert vorliegt. In beiden Fällen handelte es sich um einen Meerrettich-Peroxidase modifizierten Anti-Hase-Zweitantikörper. Die Inkubationszeit betrug mindestens 60 min. Abschließend wurde die Membran erneut dreimal

für 5 min mit TBS-T gewaschen und die markierten Proteine mithilfe eines Chemilumineszenzkits (*SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate*) und des Fusion FX700 visualisiert. Als Ladekontrolle diente stets β -Actin. Eine densitometrische Quantifizierung der visualisierten Proteinbanden erfolgte mit FIJI ImageJ.

2.11.11 Quantifizierung von intrazellulärem oxidativem Stress

Zur Visualisierung und Quantifizierung des oxidativen Stresses, der während der simulierten Ischämie/Reperfusion auftritt, wurde 2', 7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCF-DA) genutzt. Bei DCF-DA handelt es sich um ein membranpermeables Fluorophor, welches intrazellulär durch Esterasen seine Acetatgruppen verliert und erst nach erfolgter Oxidation zu dem stark fluoreszierenden 2', 7'-Dichlorofluorescein umgewandelt wird. Vor Beginn der hypoxischen Phase wurden HL-1-Zellen mit 20 μ M DCF-DA für 30 min vorbeladen. Im Anschluss an die Beladung wurden die Zellen der I/R-Behandlung ausgesetzt. Die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen wurden mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops festgehalten. Die Anregungswellenlänge lag bei 485 nm, die Fluoreszenzemission erfolgte bei 535 nm und die Auswertung der erstellten Aufnahmen wurde mit *ImageJ* vorgenommen. Die aus der Quantifizierung gewonnenen Daten wurden zur Berechnung eines *Corrected total cell fluorescence* (CTCF) genutzt:

$$CTFC = ID - (A_{cell} - \overline{F_B})$$

ID = Integrated Density; *A_{cell}* = Fläche der ausgewählten Zelle; *F_B* = Hintergrundsignal

2.11.12 Cytotoxizitätsmessungen

Um den Grad der Cytotoxizität einer Behandlung determinieren zu können, wurde auf die Bestimmung der im Ansatz vorliegenden Menge an Lactat-Dehydrogenase (LDH) zurückgegriffen. Bei der LDH handelt es sich um cytosolisches Enzyme, welches bei Zerfall der Zellmembranintegrität in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. Dieser Umstand macht die LDH zu einem idealen Kandidaten, um das Maß an Zellschäden bestimmen zu können. Die vorliegende LDH-Menge wurde mithilfe des CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay bestimmt. Die nötigen Arbeitsschritte werden im Folgenden skizziert:

1. Im Anschluss einer Versuchsdurchführung wurden Zellüberstände geerntet und in 1,5 mL Reaktionsgefäßen auf Eis überführt
2. 50 μ L des jeweiligen Überstandes wurden auf 96-Well mit 50 μ L einer Substratlösung versetzt. Diese Lösung enthielt Lactat, das Enzym Diaphorase und ein Tetrazoliumsalz. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 30 min in Dunkeln inkubiert. Das Lactat wurde von der vorliegenden LDH zu Pyruvat, bei gleichzeitiger Oxidation von NADH zu NAD⁺, umgesetzt. Die Diaphorase nutzte das NAD⁺ als Reduktionsäquivalent, um das Tetrazoliumsalz im Gemisch zu rötlich, violetterm

Formazan umzusetzen, welches photometrisch nachgewiesen werden kann. Für jede Bedingung wurden drei technische Replikate angefertigt.

3. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 50 µL einer Stop-Lösung zu dem Ansatz gegeben, um die Reaktion zu beenden. Im Anschluss folgte eine photometrische Analyse bei 490 nm in einem Microplate-Reader.

2.11.13 Exposition von HL-1-Zellen gegenüber der Glucoseoxidase

Zur Beurteilung der antioxidativen Kapazität von A-AOC-tRES-Komplexen außerhalb rein chemischer Systeme, bediente man sich eines zellulären Modells, bei dem das Enzym GOx als prooxidatives Element genutzt wurde. Die herkömmlichen Vorgehensweisen zur Untersuchung von oxidativem Stress in der Zellkultur nutzten oftmals instabilere und somit kurzlebige Substanzen (z.B. Wasserstoffperoxid (H₂O₂)), die nur innerhalb eines kleinen Zeitraums oxidativen Stress verursachen. Der Einsatz einer Glucoseoxidase ermöglichte die Generierung eines konstanten Stroms reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) über einen längeren Zeitraum.

Für die Behandlung mit GOx vorgesehene Zellen wurden 48 h vor Durchführung des Versuchs passagiert. Dabei überführte man die Zellen in ein Transwell-Insert, welches vorher mit Gelatine/Fibronectin beschichtet wurde. In jedes Transwell-Insert wurden dabei 150.000 Zellen überführt. Nach 24 h erfolgte ein Serumentzug über Nacht durch die Verwendung eines serumfreien Minimalmediums, welches eine Synchronisierung des Zellzykluses innerhalb der Zellpopulation ermöglichte.

Zur Detektion und Quantifizierung des oxidativen Stresses diente das Fluorophor CellROX® Green, welches bei 485 nm angeregt wird und eine Emission bei 520 nm aufweist. Es handelt sich dabei um einen membrangängigen Farbstoff, welcher im reduzierten Zustand schwach fluoresziert. Erst nach einer Oxidation durch reaktive Spezies lagert sich das Fluorophor an DNA an und akkumuliert im Nucleus und in Mitochondrien. Für die Vorbeladung wurden Zellen mit 1 mL einer 1:500 Dilution des Reagenzes in Minimalmedium behandelt. Die finale Konzentration betrug 5 nM. Die Inkubationszeit belief sich auf 30 min.

Nach erfolgreicher Vorbeladung wurden die Zellen zwei Mal mit 1 x PBS gewaschen und die Inserts mit 1 mL Minimalmedium befüllt. Die Differenzierung der einzelnen Konditionen erfolgte über die Zusammensetzung der äußeren Phase, deren Gesamtvolumen sich auf 2 mL belief. Sowohl BSA und die Partikel als auch deren mit tRES beladenen Äquivalenten wurden in einer 1:4 Dilution eingesetzt, so dass diese Komponenten 0,5 mL des äußeren Volumens bildeten. Als Trägermedium diente dabei 1 x PBS (pH 7,4). In den Kontrollansätzen wurde dieser Anteil durch die 1 x PBS substituiert.

2. Material und Methoden

Probenbezeichnung	Zusammensetzung
Negativkontrolle	1,5 mL Minimalmedium 0,5 mL 1 x PBS
Positivkontrolle	1,38 mL Minimalmedium 0,5 mL 1 x PBS 0,12 mL 1U GOx
Protein-/Partikelhaltige Proben	1,38 mL 0,5 mL BSA oder A-AOC \pm tRES 0,12 L 1U GOx

Die Zellen wurden in einen CO₂-Inkubator mit standardmäßiger Atmosphäre platziert und waren für 4 h der GOx-Aktivität exponiert. Nach Abschluss der Inkubationsdauer wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Von jedem Transwell wurden drei Aufnahmen an unterschiedlichen Positionen (obere Hälfte, Zentrum, untere Hälfte). Für die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals wurde die Software ImageJ genutzt. Die Auswertung erfolgte aus den quantifizierten Fluoreszenzsignalen von 60 Zellen pro Well. Abschließend wurden Zellen für Western-Blot-Analysen, sowie Bestimmung der Proteinkonzentration, geerntet.

3. Resultate

Aufgrund der Verwendung von zwei verschiedenen Synthesewege wird der Ergebnisteil dieser Arbeit in zwei Abschnitte unterteilt. Erste Erkenntnisse über die Interaktion zwischen tRES und A-AOC wurden mit der Standardsynthese gewonnen, da diese zu Beginn der experimentellen Arbeiten die am weitesten untersuchte und daher öftesten gebrauchte Form der A-AOC darstellte.

Mit der Entwicklung der modifizierten Kaltsynthese (MOK) wurde auch innerhalb des Projektes ein Wechsel zu dieser Syntheseform vollzogen. Der Großteil der präsentierten Daten basiert auf Arbeiten, die mit der MOK-Synthese durchgeführt wurden.

Im Folgenden werden nun zunächst Daten der Standardsynthese präsentiert, die das Fundament für das weitere Vorgehen bildeten. Anschließend folgt eine Charakterisierung der neuartigen MOK-Synthese und Anpassung bereits bei der Standardsynthese verwendeter Methoden. Alle darauffolgenden Experimente und daraus resultierende Daten wurden mithilfe der MOK-Synthese gewonnen.

3.1 Vorversuche

3.1.1 Interaktion zwischen Standardsynthese und *trans*-Resveratrol

Wie oben bereits einleitend erwähnt basieren erste Daten über die Interaktion zwischen tRES und A-AOC auf Versuche mit der Standardsynthese.

Initial war es erforderlich, festzustellen, ob eine detektierbare Wechselwirkung zwischen beiden Komponenten vorliegt. Dafür bediente man sich einer auf Photometrie basierenden Methode. Nach erfolgter Beladung der Standardsynthese (2.10.2) wurde der Ansatz zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Mithilfe einer spektrophotometrischen Analyse wurde die verbliebene tRES-Menge im Überstand ermittelt. Da die Ausgangskonzentration der tRES-Stammlösung bekannt war, konnte die gebundene Menge als Differenz beider Werte bestimmt werden (Abbildung 4A und B). Zusätzlich wurde nach Methode 2.10.2 die Freisetzung von assoziierten tRES von der Albuminhülle A-AOC untersucht (Abbildung 4B).

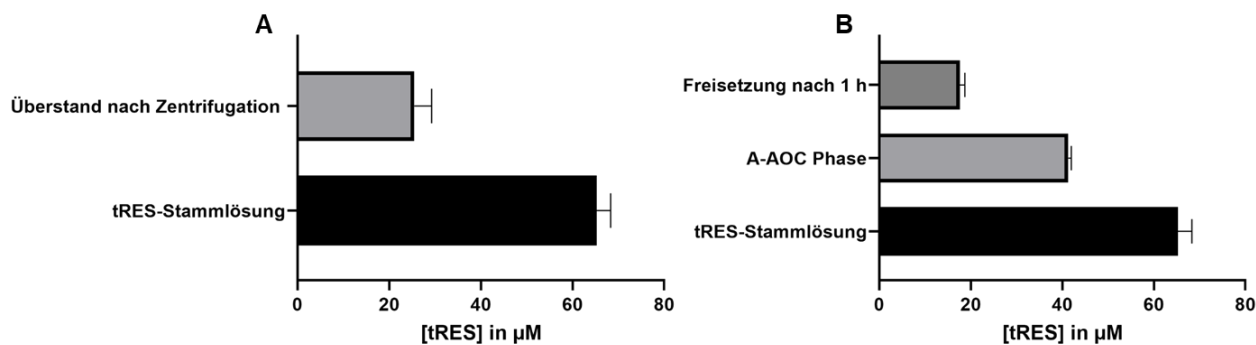


Abbildung 4: Photometrische Untersuchung der tRES-A-AOC-Interaktion.

A: Dargestellt sind die tRES-Konzentrationen im Überstand nach Pelletierung der A-AOC. **B:** Graphische Darstellung der ermittelten tRES-Konzentration an der A-AOC-Hülle und die freigesetzte Menge nach einer Stunde. Für alle Proben wurden vollständige spektrophotometrische Gesamtspektren (200-800 nm) angefertigt. Für die Auswertung und Berechnung der Konzentrationen wurden Absorptionswerte bei 304 nm und der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{304\text{nm}} = 30.335 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}$ verwendet. Messungen wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Aqua bidest. diente in allen Phasen als Trägermedium, Mittelwert \pm SD, n = 6.

Die photometrische Analyse des Überstandes nach Pelletierung der Standardsynthese zeigte eine drastische Reduktion der tRES-Konzentration um 60,95 % im Vergleich zur verwendeten Stammlösung (Abbildung 4A). Somit fiel die initiale Konzentration von 65,24 auf 25,48 μM ab. Die Differenz von etwa 40 μM sollte sich demnach in der Phase der Partikel befinden. Die nach Untersuchung der Freisetzung detektierbare tRES-Menge im Überstand belief sich auf 17,62 μM (Abbildung 4B).

3.1.2 Antioxidative Eigenschaften der Standardsynthese

Die antioxidative Wirkung des tRES stellt eine der zentralen Interessen dieser Arbeit dar. Daher war es notwendig, in Erfahrung zu bringen, welche Effekte die Präsenz der aufgereinigten Standardsynthese und die potenzielle Interaktion mit der Albuminhülle auf die antioxidative Kapazität des tRES entfalten. Hierzu bediente man sich zwei Varianten des ABTS-Decolorisierungsassays, um erste Erkenntnisse über die antioxidativen Eigenschaften des tRES-A-AOC-Systems zu gewinnen. Das erste System beruhte auf der Verwendung einer Enzymkaskade, bestehend aus der GOx und HRP, die über die gesamte Versuchsdauer für einen stetigen Strom an ABTS-Kationradikalen sorgten (Abbildung 5). Um mehr Kontrolle über die vorliegende Radikalkonzentration zu erhalten, bediente man sich der zweiten Vorgehensweise, bei der ABTS unter Einsatz von Kaliumperoxodisulfat vor Beginn des Versuchs vollständig radikalisiert wurde (2.10.4).

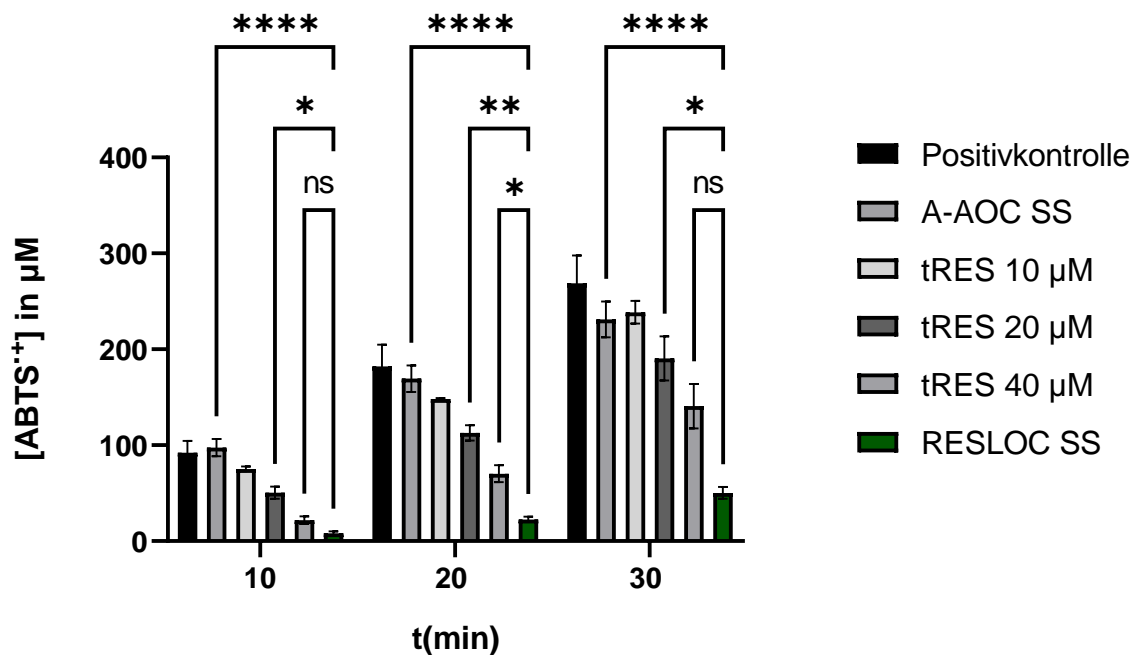


Abbildung 5: ABTS-Decolorisierungsassay unter Verwendung einer Enzymkaskade.

Dargestellt ist die zu unterschiedlichen Zeitpunkten (10, 20 und 30 min nach Reaktionsbeginn) vorliegende ABTS^{•+}-Konzentration in Anwesenheit von A-AOC sowie RESLOC der Standardsynthese (SS) und tRES. Als Positivkontrolle diente eine unbeeinträchtigte Umsetzung des ABTS durch die Enzymkaskade. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$, Two-Way ANOVA; Mittelwert \pm SD, $n = 6$ für Positivkontrolle, A-AOC SS und RESLOC SS; $n = 3$ für die tRES-Kontrollen.

In dem enzymbasierten Assay erfolgte ein Vergleich des tRES-A-AOC-Systems (RESLOC) mit sowohl unbehandelten A-AOC als auch unterschiedlich konzentrierten tRES-Lösungen. Nach photometrischer Analyse der jeweiligen Ansätze offenbarte sich für die RESLOC im Vergleich zu den A-AOC bei allen Messpunkten eine signifikante Reduktion der ABTS^{•+}-Konzentration. Auch die Ansätze mit freiem tRES zeigten über die gesamte Dauer des Experimentes höhere Werte für die ABTS^{•+}-Konzentration. Während die niedrigeren Konzentrationen von 10 und 20 μM signifikant höhere Messwerte zu allen Zeitpunkten lieferten, zeigte der Ansatz mit 40 μM im Vergleich zu den RESLOC lediglich bei 20 min eine statistische Signifikanz. Dennoch lag beim finalen Messpunkt für die RESLOC lediglich ein Drittel der ABTS^{•+}-Konzentration vor, die für 40 μM tRES nachgewiesen werden konnte (Abbildung 5).

Im zweiten Versuchsaufbau wurde die Ausgangskonzentration des ABTS deutlich gesteigert (von 2 mM auf 7 mM). Im Kontrast zum vorangehenden Versuch wurde hier lediglich eine Endpunktmessung nach Ablauf der 2 h vorgenommen. Als Kontrollgruppen zu den RESLOC dienten A-AOC in ihrem nativen Zustand, sowie eine tRES-Kontrolle mit äquivalenter Konzentration (s. 3.1.1). Anhand der Daten zeichnete sich eine signifikant stärkere Reduktion der Radikalkonzentration in den RESLOC-Ansätzen als in den Kontrollgruppen ab, wobei die

gemessene ABTS^{•+}-Menge in der A-AOC-Kontrolle ebenfalls signifikant geringer ist als in der tRES-Probe (Abbildung 6).

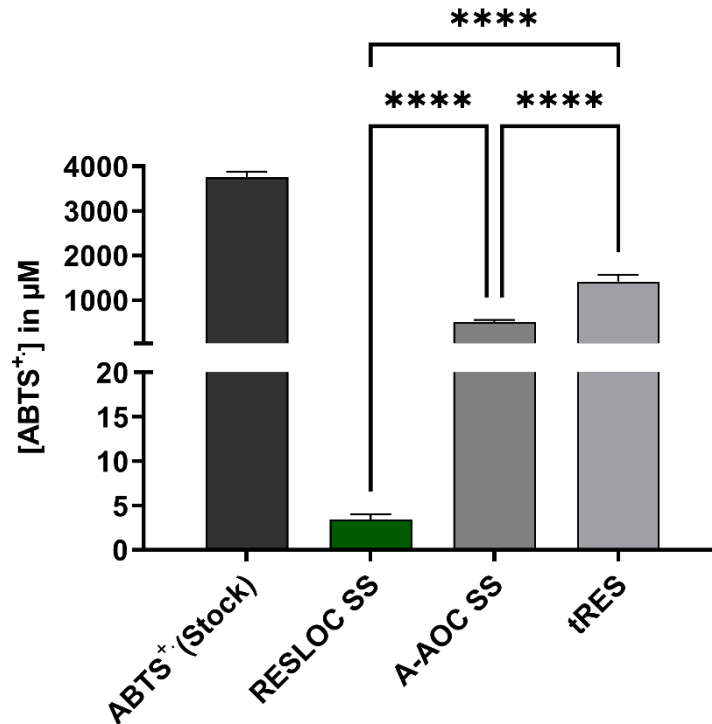


Abbildung 6: ABTS-Decolorisationsassay mit Standardsynthese.

Abgebildet sind die Konzentrationen des ABTS-Kationenradikals in Anwesenheit der jeweiligen Komponente (A-AOC und RESLOC der Standardsynthese sowie die äquivalente Menge tRES) aufgenommen in Aqua bidest. *** p < 0,001; One-Way ANOVA; Mittelwert ± SD, n = 6.

3.2 Etablierung und Wechsel zur modifizierten Kaltsynthese

Wie oben bereits angedeutet, wurde innerhalb des Projektes ein Wechsel von der

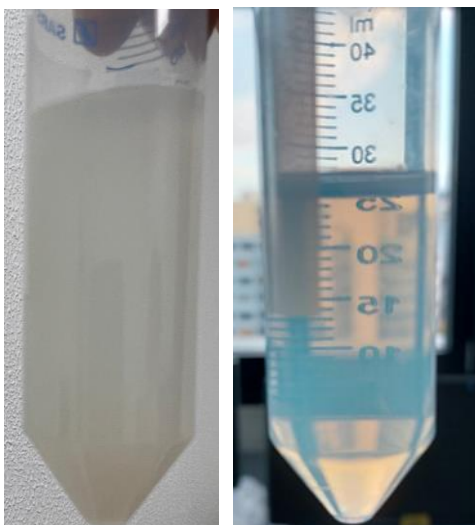


Abbildung 7: Visueller Vergleich der Standard- (links) und MOK-Synthese (rechts)

Standardsynthese zu der modifizierten Kaltsynthese vollzogen. Erste Grundlagen für diese Entscheidung lieferten präliminäre Beobachtungen von Fabian Nocke, aus denen eine höhere Stabilität der Partikel abgeleitet werden konnte¹⁴². Partikel dieser Synthese zeigten eine höhere Lagerstabilität (geringe bis keine Sedimentation über mehrere Tage). Die Synthese selbst war optisch transparent (Abbildung 7). Diese Eigenschaft eröffnete die Verwendung zahlreicher Untersuchungsverfahren, welche bei der milchartigen, trüben Standardsynthese nicht möglich waren. Da es sich jedoch um eine neuartige Syntheseform handelte,

wurde eine Charakterisierung der Partikel mit den gängigen Analysemethoden der

Arbeitsgruppe vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen und erste Erkenntnisse zur Interaktion zwischen der MOK-Synthese und tRES werden im Folgenden dargestellt.

3.2.1 Aufreinigung der MOK-Synthese und Beladung mit tRES

Der Wechsel der Syntheseformen wurde auch zum Anlass zur Optimierung und Anpassung des Aufreinigungsprotokolls genutzt (2.8.2). Um die Effektivität der Aufreinigung beurteilen zu können, wurde die detektierbare BSA-Menge im Überstand im Anschluss an den letzten Zentrifugationsschritt gemessen. Dabei wurde das freie Albumin mit dem hoch sensitiven Bromkresolgrün-Assay detektiert (2.8.7).

So ergibt sich nach Abschluss der Aufreinigung eine verbleibende BSA-Menge von 0,71 g/L, womit 99,98% des ursprünglich freien BSA nun an der Partikelgrenzfläche vorliegt oder durch die Prozedur der Aufreinigung aus dem Ansatz eliminiert wurde (Abbildung 8). Dank der hohen Aufreinigungseffizienz konnte ausgeschlossen werden, dass freies BSA einen nennenswerten Beitrag zu der Wirkung eines aufgereinigten A-AOC-Ansatzes leisten wird.

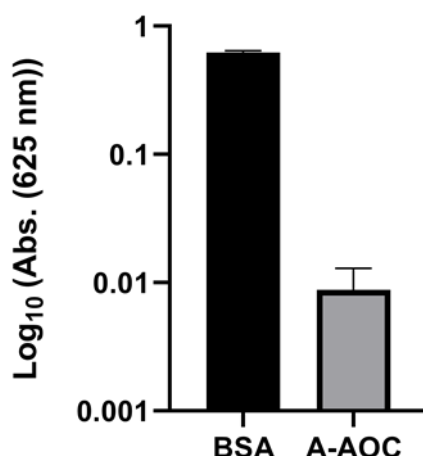


Abbildung 8: Effizienz des neuen Aufreinigungsprotokolls

In der Abbildung wird die 5% BSA-Lösung (BSA), die als Ausgangsmaterial der Synthese dient, mit der Konzentration an freiem Albumin verglichen, welche nach dem letzten Aufreinigungsschritt durch das BKG-Assay im Überstand des A-AOC-Ansatzes nachweisbar ist; Mittelwert \pm SD, n = 3.

Im selben Zuge wurde das Verfahren der tRES-Beladung ebenfalls angepasst (Methode 2.10.2). Zwei Veränderungen sollten dabei umgesetzt werden. Zum einen sollte der MOK-Ansatz mit tRES in fester Form versetzt werden. Zum anderen sollte eine maximale Konzentration für tRES bestimmt werden, welche an der Proteinhülle der A-AOC lösbar ist. Die erwartete Interaktion zwischen Albuminhülle und tRES sollte dabei die stark limitierte Löslichkeit des stark hydrophoben tRES anheben. Zusätzlich wäre dieses Vorgehen hinsichtlich der genutzten tRES-Menge ökonomischer, da lediglich das benötigte tRES verwendet wird, sowie zeitlich effizienter und schonender für die Partikel, da zwei Zentrifugationsschritte entfallen würden. Eine Quantifizierung der gebundenen Menge sollte,

wie in 3.1.1 bereits beschrieben, durch ein Pelletieren der A-AOC und eine photometrische Messung des Überstandes bestimmt werden. Im Zuge von Darius Molitor absolvierten, unabhängigen Untersuchungen konnte jedoch bei A-AOC, die mit tRES behandelt wurden, eine Korrelation zwischen tRES-Menge im Überstand und Zentrifugationskraft festgestellt werden. Bei der Verwendung verschiedener Kräfte zeigte sich bei identischer Zentrifugationsdauer signifikante Unterschiede in der detektierten Menge an tRES im Überstand. Während nach einer Zentrifugation bei 1500xg ~44 μM tRES gemessen wurden, ergab sich bei 5000xg eine Verdopplung der detektierbaren tRES-Menge auf ~92 μM (Abbildung 9).

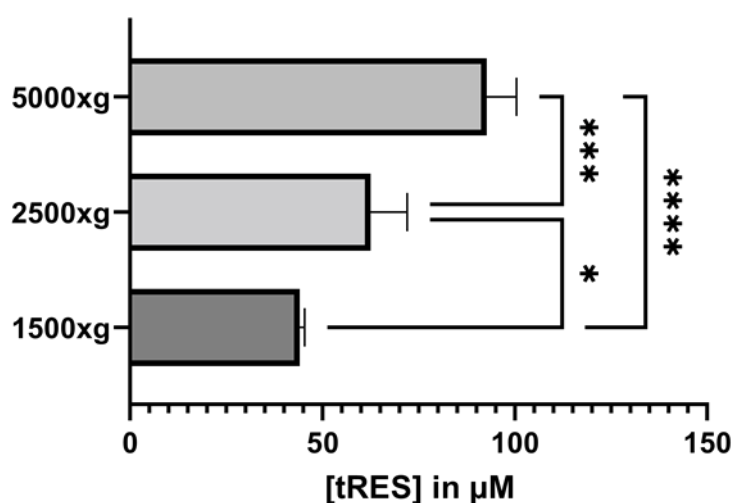


Abbildung 9: tRES-Freisetzung in Abhängigkeit der Zentrifugationskräfte

Abgebildet werden die photometrisch bestimmten tRES-Konzentrationen in Überständen von Partikelpellets bei drei unterschiedlichen Zentrifugationsgeschwindigkeiten. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; One-Way ANOVA; Mittelwert \pm SD, $n = 4$. Präsentierte Daten wurden von Darius Molitor erhoben.

Dieser Umstand beeinträchtigt eine verlässliche Detektion der gebundenen tRES-Menge mit der bisher genutzten Methode. Um die mechanische Einflüsse vollständig aus dem Verfahren eliminieren zu können, sollte die maximal lösliche tRES-Menge zunächst an freiem BSA ermittelt werden (2.10.1). Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollte dann auf die Proteinhülle der A-AOC übertragen werden.

Daher wurde zunächst die BSA-Menge bestimmt, die als A-AOC-Hülle vorliegt und als Interaktionspartner des tRES dienen würde. Im Anschluss an die Synthese wurde erneut unter Einsatz des Bromkresolgrüns die BSA-Konzentration im Überstand photometrisch ermittelt (2.8.7). Nach Pelletierung der Partikelphase konnte in den Überständen Absorptionswerte bestimmt werden, welche im Mittel 12% niedriger als die Ausgangskonzentration der Stammlösung waren (Abbildung 10A). Die Absorptionswerte wurden zur Berechnung der BSA-Konzentration verwendet, welche an der Partikelgrenzfläche vorzufinden ist. Die Berechnungen offenbarten, dass lediglich 11,11 g/L (167,1 μM) des Proteins als Hüllmaterial

vorlag und somit ~20% der eingesetzten BSA-Menge in Hüllmaterial umgewandelt wurde (Abbildung 10B). Im Vergleich zeigten präliminäre Daten, dass bei der Standardsynthese 4,8 g/L BSA während des Synthese verbraucht wurden (nicht abgebildet). Auch Fabian Nocke konnte bereits im Rahmen seiner Masterarbeit einen niedrigeren BSA-Verbrauch bei der Standardsynthese beobachten¹⁴².

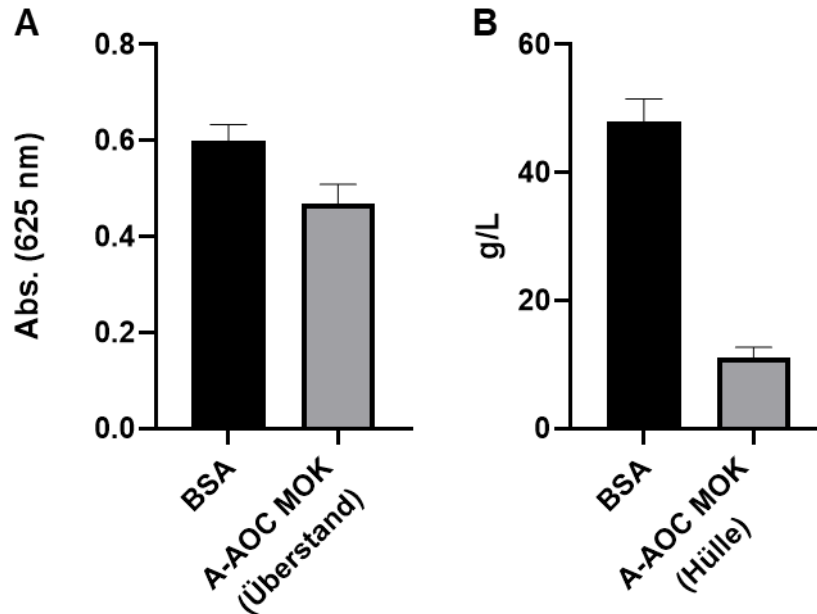


Abbildung 10: Als Proteinhülle vorliegende Albuminkonzentration

A: Die ermittelten Absorptionswerte der 5% Albuminstammlösung (BSA) und des Syntheseüberstandes sind hier gegenübergestellt. **B:** Abgebildet werden die photometrisch ermittelten Albuminkonzentrationen der Stammlösung, sowie die an der Formation der Partikelhülle beteiligte Proteinmenge; Mittelwert \pm SD, n = 5 für BSA, n = 10 für A-AOC-MOK.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurden eine äquimolare BSA-Menge für die Ermittlung der maximal löslichen tRES-Menge mit einem 2,35-fachen molaren Überschuss an tRES versetzt. Die in der Proteinphase verbleibende tRES-Menge wurde nach 2.10.1 quantifiziert. Die Daten werden zusammengefasst in

Tabelle 1 präsentiert.

Initiale tRES-Konzentration	Konzentration des resuspendierten Pellets	Konzentration an Albuminhülle
392,4 \pm 4,4 μ M	47,2 \pm 6,8 μ M	345,9 \pm 9,1 μ M

Tabelle 1 Maximal lösliche tRES-Menge an der Albuminhülle der MOK-Synthese
Mittelwert \pm SD, n = 6

Unter der Annahme, dass in einem MOK-Ansatz eine Proteinkonzentration von 167,1 μ M vorliegt, kann tRES in einem molaren Überschuss von 2,1:1 in einer BSA-haltigen Lösung gelöst werden, was eine drastische Steigerung der tRES-Löslichkeit in wässrigen Lösungen bedeutet.

Da nahezu alle Versuche mit aufgereinigten Synthesen durchgeführt wurden, wurde des Weiteren ein potenzieller Partikelverlust während der Aufreinigung untersucht. Ausgehend von der Annahme, dass mit Abnahme der Partikelzahl auch die PFD-Menge und somit die Sauerstoffkapazität einer Probe sinkt, bediente man sich einer oxygraphischen Methode, um die Proteinmenge in einer aufgereinigten MOK-Synthese ableiten zu können (2.8.4). Als Vergleich diente das unbehandelte Gegenstück. Weiterhin wurde auch die O₂-Kapazität der jeweiligen Trägermedien ermittelt und von den Werten der entsprechenden Partikelsuspension subtrahiert. Während die aufgereinigte MOK-Synthese in Aqua bidest. vorlagen, bestand das Medium des unbehandelten Gegenstücks aus einer 3,9 % BSA-Lösung (11,11 g/L der 50 g/L liegen als Partikelhülle vor, s. Abbildung 10).

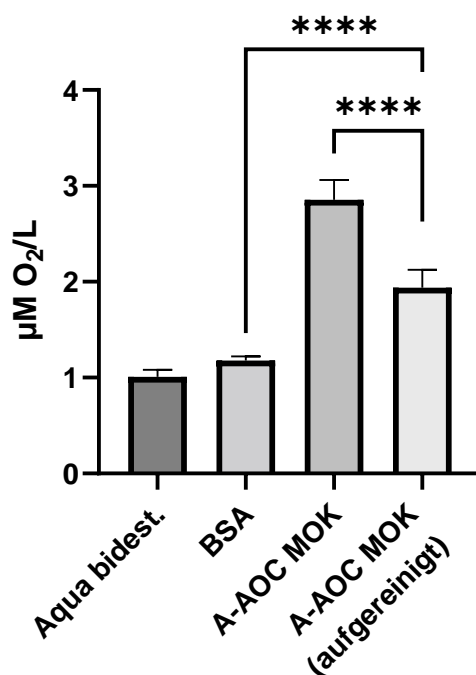


Abbildung 11 oxygraphische Untersuchung potenziellen Partikelverlusts:

Dargestellt sind oxygraphisch ermittelte O₂-Kapazitäten unbehandelter und aufgereinigter Ansätze der MOK-Synthese und der entsprechenden Trägermedien, **** p < 0,0001, One-Way ANOVA; Mittelwert ± SD, n = 10 für Trägermedien, n = 13 für Partikelmessungen. Präsentierte Daten wurden von Darius Molitor erhoben.

Die oxygraphische Analyse der Trägermedien offenbarte eine höhere O₂-Kapazität von 1,177 µM O₂/L für die albuminhaltige Lösung, während die Kapazität des Aqua bidest. bei 1,01 µM O₂/L lag. Durch Verwendung dieser Werte, wurden die Sauerstoffkapazitäten der zu untersuchenden A-AOC-Ansätze auf ihr Trägermedien normalisiert und korrigiert. Somit sinkt die ermittelte Kapazität der unbehandelten Probe von 2,853 auf 1,676 µM O₂/L. Die Daten des aufgereinigten Ansatzes lagen bei 1,939 und 0,931 µM O₂/L, vor und nach der Anpassung an das Trägermedium (Abbildung 11).

Die aufgereinigte MOK-Synthese weist demnach einen O₂-Kapazitätsverlust von 44,5% auf und ist im Vergleich zum unbehandelten Äquivalent signifikant reduziert. Dadurch sinkt die in einer Partikelsynthese vorliegende Albuminmenge von 11,11 g/l auf 6,17 g/L, was einer

molaren Konzentration von 92,8 μM entspricht. Überträgt man dies nun auf die Resultate, die aus der Ermittlung der maximal löslichen tRES-Konzentration hervorgehen, so sind 194,8 μM tRES in einem aufgereinigten Ansatz der MOK-Synthese lösbar.

3.2.2 Freisetzungskinetik von gebundenem *trans*-Resveratrol

Ergänzend zu der Beladung der Partikel wurde zusätzlich eine mögliche tRES-Freisetzung von der Proteinhülle der aufgereinigten MOK-Synthese ermittelt und mit der von freiem BSA verglichen.

Durch die Verwendung eines Dialyseverfahrens (2.10.3) wurde eine tRES-Freisetzungskinetik über eine Dauer von vier Stunden erstellt, da alle im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Versuche sich innerhalb dieses Zeitraums bewegen. Messungen wurden bei Raumtemperatur (RT) und 37°C vorgenommen.

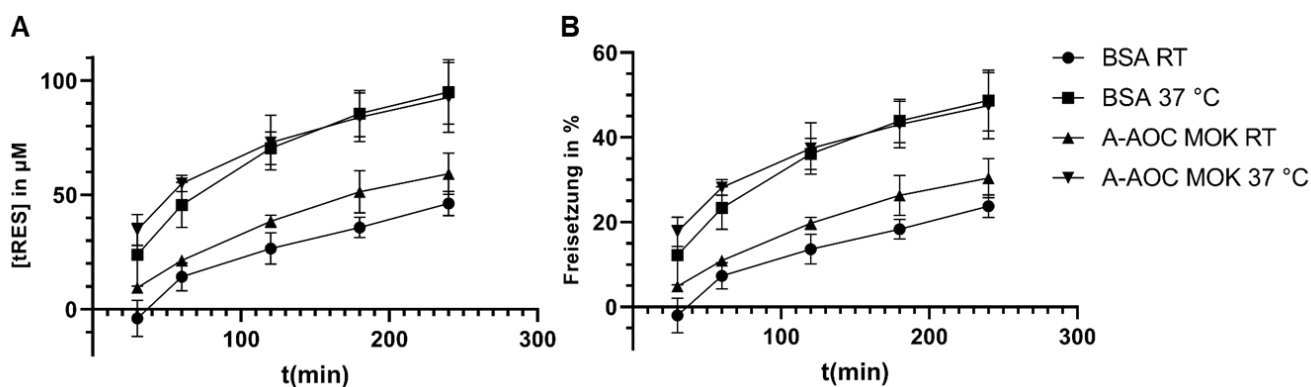


Abbildung 12 tRES-Freisetzungskinetik:

Dargestellt ist die Freisetzungskinetik von tRES von der Proteinhülle der MOK-Synthese über einen Zeitraum von vier Stunden in μM . Die freigesetzte Menge wird dabei zum einen als Konzentration in μM (A) und zum anderen als prozentualer Anteil der an der Albuminhülle gelösten tRES-Konzentration abgebildet (B). Als Referenz dient eine äquimolare Menge freien BSAs; Mittelwert \pm SD, $n = 4$.

In allen Ansätzen ließ sich mit zunehmender Versuchsdauer ein Anstieg der detektierbaren tRES-Menge in der äußeren Phase feststellen. Sowohl für BSA als auch für A-AOC wurde eine temperaturabhängige Steigerung der tRES-Freisetzungskinetik registriert. Die A-AOC zeigten bei beiden Temperaturen nach 30 min eine höhere tRES-Freisetzung als BSA. Während bei RT die ermittelte tRES-Konzentration über die gesamten vier Stunden über den Werten des freien Proteins lag, glich sie sich bei 37 °C nach 120 min an und die Graphen zeigen einen nahezu identischen Verlauf (Abbildung 12). Die zum letzten Messzeitpunkt (4 h) ermittelten Daten waren wie folgt:

	BSA		A-AOC MOK	
	RT	37°C	RT	37°C
µM	46,3 ± 5,3	95,01 ± 14,1 ***	59,3 ± 9,04	92,6 ± 15,2 *
%	23,7 ± 2,7	48,7 ± 7,2	30,4 ± 4,6	47,5 ± 7,8

Tabelle 2 freigesetzte Menge an tRES nach vier Stunden

Tabellarische Darstellung der freigesetzten tRES-Menge nach vier Stunden. Angegebene Signifikanzen beziehen sich auf Werte bei RT, * p < 0,05, *** p < 0,001, unpaired t-test; Mittelwert ± SD, n = 4.

3.2.3 Charakterisierung der Partikel

Die Charakterisierung der MOK-Synthese erforderte aufgrund ihrer Neuartigkeit die Ermittlung fundamentaler Eigenschaften wie Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung, Viskosität und Zeta-Potenzial. Als Referenz diente in einigen Fällen die Standardsynthese.

3.2.3.1 Partikelgröße und -verteilung

Die Analyse der Partikelgröße und ihrer Polydispersität (PDI) erfolgte mit der Methode der DLS (2.8.3). Im direkten Anschluss an die Synthesen durchgeführte DLS-Messungen offenbarten für die Standardsynthese eine mittlere Größe von 153,53 nm, während der mittlere hydrodynamische Durchmesser (MHD) der MOK-Partikel 99,36 nm betrug. Der Aufreinigungsprozess führte in beiden Fällen zu einem signifikanten Wachstum der Partikel (Abbildung 32 und Abbildung 33). Im Anschluss an die Aufreinigung wies die Standardsynthese eine Partikelgröße von 206,2 nm auf. Der MHD der MOK-Synthese lag in diesem Stadium bei 162,34 nm.

Nach einer Lagerungsperiode von 24 h und unmittelbar vor der Beladung war für beide Syntheseformen ein leichter Rückgang des MHD zu verzeichnen (189,84 nm für die Standardsynthese, 136,93 nm für MOK-Synthese). Dieser Durchmesser blieb auch nach der Beladung in beiden Fällen nahezu konstant. Im gesamten Prozess der Partikelauflösung verfügten die A.AOC der MOK-Synthese einen signifikant niedrigeren MHD als die A-AOC der Standardsynthese (Abbildung 13).

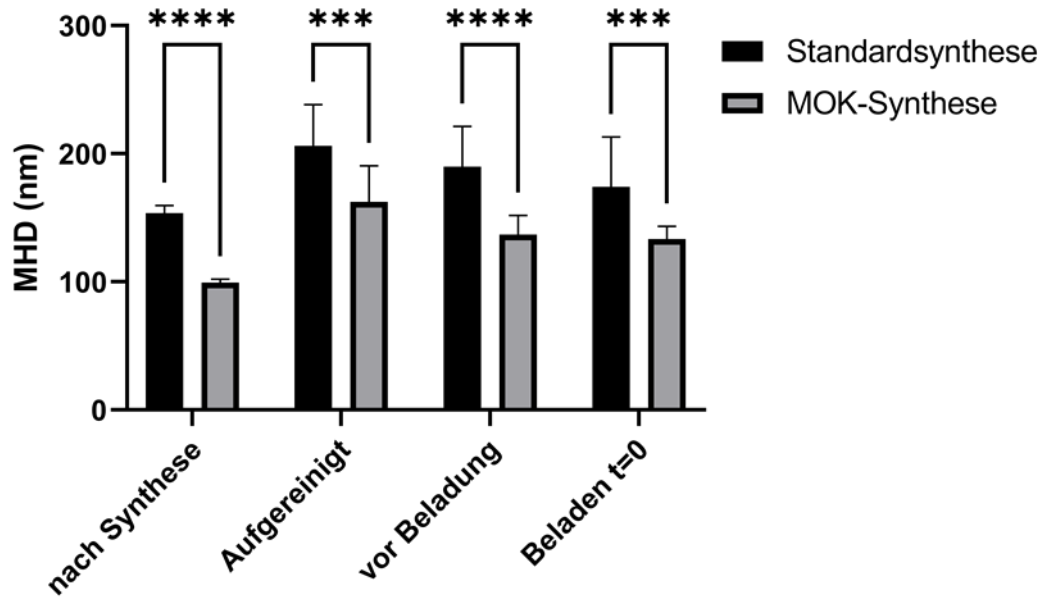


Abbildung 13 Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser verwendeter Synthesen:

Graphische Darstellung des mittleren hydrodynamischen Durchmessers beider Synthesewege im Anschluss des jeweiligen Prozessierungsschrittes; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; Two-Way ANOVA; Mittelwert \pm SD, $n = 9$ für Standardsynthese, $n = 12$ für MOK-Synthese.

Auch im Falle des PDI zeigten beide Syntheseformen nach der Aufreinigung einen signifikanten Anstieg in der Polydispersität (von 0,47 auf 2,85 bei der Standardsynthese; von 1,04 auf 3,32 für die MOK-Synthese). Beide Werte erholten sich jedoch und zeigten nach der Lagerperiode von 24 h einen deutlich reduzierten Polydispersitätswert. Die Abnahme des PDI in diesem Übergang ist für die MOK-Synthese statistisch signifikant (Abbildung 33).

Nach dem Herstellungsprozess wies die MOK-Synthese einen signifikant höheren PDI als die Standardsynthese auf. Auch im Anschluss an die Aufreinigung besitzt die MOK-Synthese eine breitere Partikelverteilung. Erst nach diesem Schritt trat eine Wende ein, bei der der PDI der MOK-Synthese unter dem der Standard-A-AOC fiel (Abbildung 14).

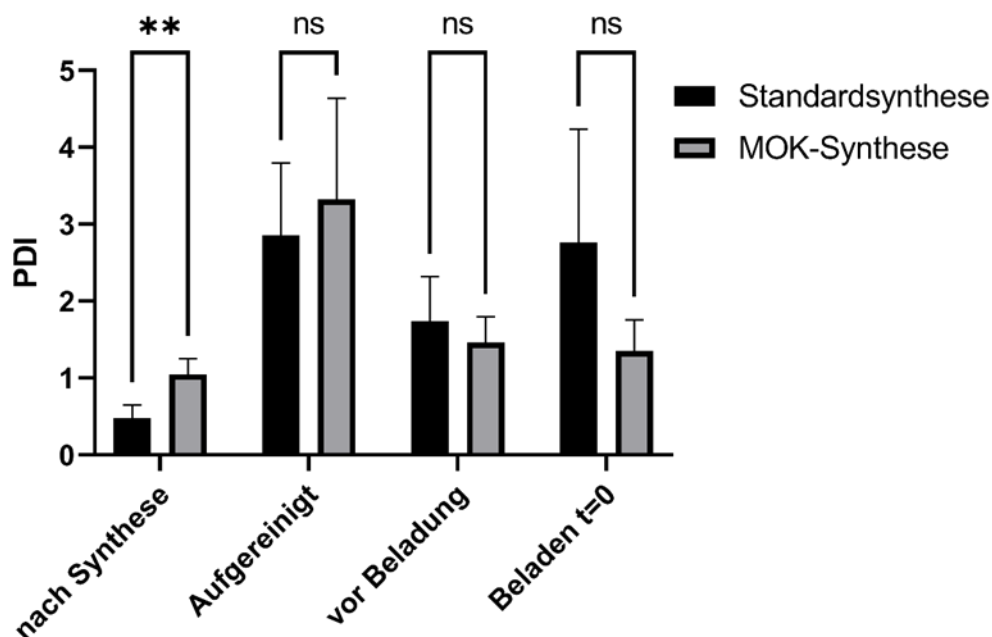


Abbildung 14 Polydispersitätsindex genutzter Synthesewege:

Graphische Veranschaulichung des ermittelten PDI der A-AOC beider Synthesewege zu unterschiedlichen Stadien des Aufbereitungsprozesses; ** $p < 0,01$; Two-Way ANOVA; Mittelwert \pm SD, $n = 9$ für Standardsynthese, $n = 12$ für MOK-Synthese.

3.2.3.2 Ermittlung der rheologischen Eigenschaften und des Zeta-Potenzials

Ein weiterer für künstliche Sauerstoffträger relevanter Parameter stellt die Viskosität dar, die Vorhersagen über ihr Fließverhalten in Gefäßsystemen erlauben. Daher spielen vor allem rheologische Eigenschaften im physiologischen Bereich des humanen Gefäßsystems von $10\text{--}2000\text{ s}^{-1}$ eine bedeutende Rolle¹⁴³. Viskositätswerte für $1\text{--}5000\text{ s}^{-1}$ wurden für A-AOC der Standard- und MOK-Synthese, sowie ihrer mit tRES assoziierten Form bestimmt (2.8.5; Abbildung 15A).

Im physiologischen Scherratenbereich des humanen Gefäßsystems zeigten alle Suspensionen ein nahezu idealvisköses Verhalten (Beim idealviskösen Fließverhalten ist die Viskosität unabhängig von der Scherrate). Die Viskositätswerte in diesem Bereich fielen unter $2\text{ mPa}\cdot\text{s}$, wodurch zwischen den einzelnen Proben bei diesen Scherraten keine nennenswerten Unterschiede zu erkennen waren. Größere Differenzen ergaben sich hingegen für den niedrigen Scherratenbereich von $1\text{--}6\text{ s}^{-1}$. Zum einen zeigten alle untersuchten Suspensionen ein nicht-newtonsches und pseudoplastisches Verhalten (eine sinkende Viskosität mit steigender Scherrate). Zum anderen ließ sich hier das Phänomen beobachten, dass in Anwesenheit von tRES die Viskosität der jeweiligen Synthese drastisch herabgesenkt wurde. Zur Verdeutlichung werden die Werte bei Scherrate 1 s^{-1} in einer zusätzlichen Grafik dargestellt (Abbildung 15B). Bei dieser Scherrate zeigte sich, dass die Viskosität der Standardsynthese bei Zugabe von tRES von $10,1$ auf $7,6\text{ mPa}\cdot\text{s}$ fiel. Im Falle der MOK-Synthese ließ sich sogar eine signifikante Reduktion der Viskosität in Anwesenheit von tRES

beobachten. Der Wert sank von 11,9 auf 4,1 mPa*s. Zwischen den RESLOC der Standard- und MOK-Synthese lagen keine signifikanten Differenzen vor.

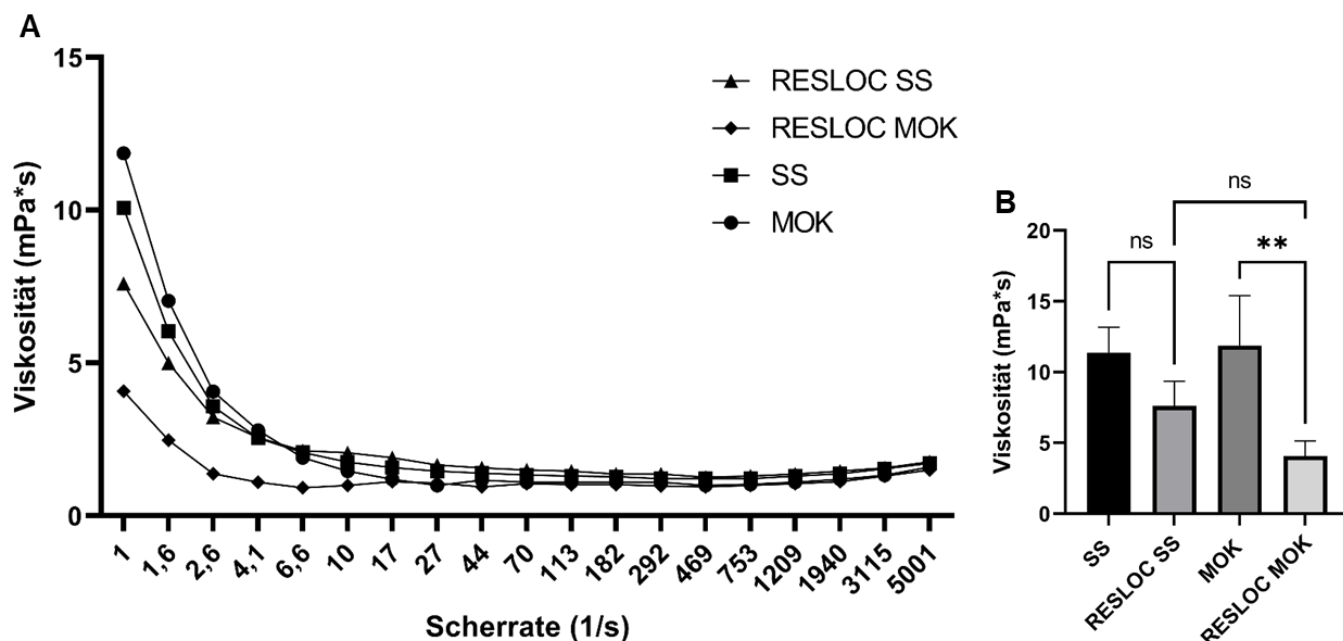


Abbildung 15 Scherviskosität verschiedener Partikelsynthese und -präparationen

A: Dargestellt wird die Viskosität in Abhängigkeit des Scherratenbereichs 1-5000 s⁻¹ der Standardsynthese und MOK-Synthese in und An- und Abwesenheit von tRES. **B:** Viskositätswerte bei einer Scherrate von 1 s⁻¹, ** p < 0,01, One-Way ANOVA; Mittelwert ± SD. n = 3 für SS (Standardsynthese), RESLOC SS und MOK, n = 4 für RESLOC MOK.

Als zusätzlichen Parameter zur Charakterisierung der MOK-Synthese wurde das für Nanoemulsionen bedeutende Zeta-Potenzial ermittelt (2.9.3). Das Zeta-Potenzial kann als Indikator für die Stabilität einer Emulsion gedeutet werden. Je niedriger, desto stärker wirken die elektrostatischen, repulsiven Kräfte.

Die durchgeführten Messungen einer aufgereinigten MOK-Synthese ergaben eine partikuläre Ladung von -57,83 mV. Durch Zugabe von tRES wurde das Zeta-Potenzial um etwa 12 mV auf -69,79 mV gesenkt. Die Reduktion der A-AOC-Oberflächenladung ist dabei statistisch signifikant (Abbildung 16).

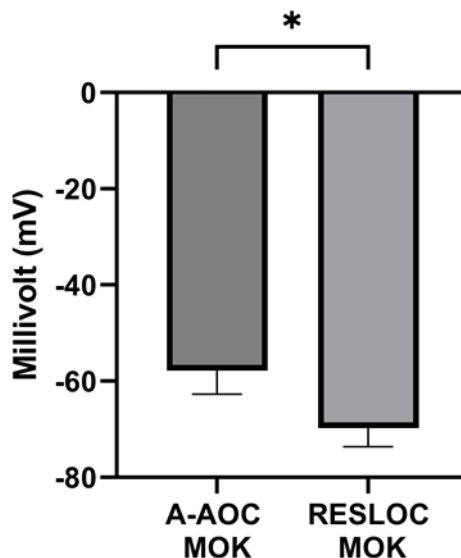


Abbildung 16 Zeta-Potenzial der MOK-Synthese:

Zeta-Potenzial aufgereinigter A-AOC der MOK-Synthese, die in ihrer nativen Form oder beladen mit tRES vorliegen,

* $p < 0,05$; unpaired t-test; Mittelwert \pm SD, $n = 3$.

3.3.Funktionelle Untersuchungen der antioxidativen Eigenschaften

Wie auch schon im Falle der Standardsynthese, wurden RESLOC, die mithilfe der MOK-Synthese hergestellt wurden, Untersuchungen in Bezug auf funktionelle Interaktionen unterzogen. Primäres Ziel der Experimente war es, in Erfahrung zu bringen, ob Hinweise für ein funktionelles Zusammenspiel hinsichtlich antioxidativer Kapazität vorliegt und wie die Komponenten des RESLOC-Systems (A-AOC und tRES) Einfluss aufeinander nehmen. Besonderes Interesse galt dem Vergleich zwischen freiem BSA und der Proteinhülle der A-AOC in Anwesenheit von tRES.

3.3.1 ABTS-Decolorisationsassay der MOK-Synthese

Für die Ermittlung eines Zusammenspiels funktioneller Natur wurde zunächst eine angepasste, optimierte Form des ABTS-Assays genutzt, welche zur Gewinnung von mehr Informationen verwendet werden sollte (2.10.4). Neben einer längeren Versuchsdauer und einer höheren Zahl an Messpunkten, wurde zur Evaluation der antioxidativen Eigenschaften das Verhältnis aus Messdaten zweier Wellenlängen (350 nm für die reduzierte Form des ABTS; 734 nm für das ABTS-Kationradikal) berechnet (Abbildung 17). Je größer der Wert des Verhältnisses, desto stärker die antioxidative Aktivität.

Anhand von Messungen nach 30 min konnten folgende Beobachtungen angestellt werden: Für freies BSA und tRES, sowie A-AOC konnten nahezu identische Werte ermittelt werden. Die Systeme BSA-tRES und RESLOC zeigten eine enorme, signifikante Zunahme des Verhältnisses im Vergleich zu den einzelnen Komponenten, wohingegen sich zwischen BSA und A-AOC in Anwesenheit von tRES keine signifikanten Unterschiede zeigten.

Mit der Probenentnahme nach 30 min wurde gleichzeitig die Radikalkonzentration der Ansätze weiter angehoben. Dieser Schritt sollte extreme Bedingungen und eine Erschöpfung der antioxidativen Kapazität der Protein-tRES-Komplexe herbeiführen.

Am zweiten Messpunkt (60 min) konnte für alle Bedingungen zunächst eine deutliche Reduktion der Werte beobachtet werden, die wahrscheinlich durch die Zugabe zusätzlicher Radikallösung ausgelöst wurde. Im weiteren Verlauf des Experimentes ergab sich für jede Probe mit zunehmender Dauer ein Anstieg der Werte von unterschiedlichem Ausmaß. BSA und A-AOC zeigten ähnliche Veränderungen (keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Bedingungen), wohingegen die Zunahme für tRES deutlich geringer ausfiel. Auch bei BSA-tRES und RESLOC trat bei beiden Werten beim Übergang von 60 auf 120 min ein deutliches Wachstum der Werte auf. Zu diesem Zeitpunkt war zum ersten Mal eine signifikante Differenzierung beider Bedingungen zu beobachten. Während das Verhältnis für BSA-tRES lediglich 72,6% (7,6 → 13,03) zunahm, war für RESLOC eine Zunahme von 97,4 % (9,8 → 19,3) zu verzeichnen (Abbildung 17).

Auch bei der finalen Messung (180 min) offenbarten die RESLOC einen signifikant höheren Wert als der BSA-tRES-Komplex. Der für die RESLOC bestimmte Wert betrug dabei 29,9, während der für BSA-tRES bei 19,6 lag.

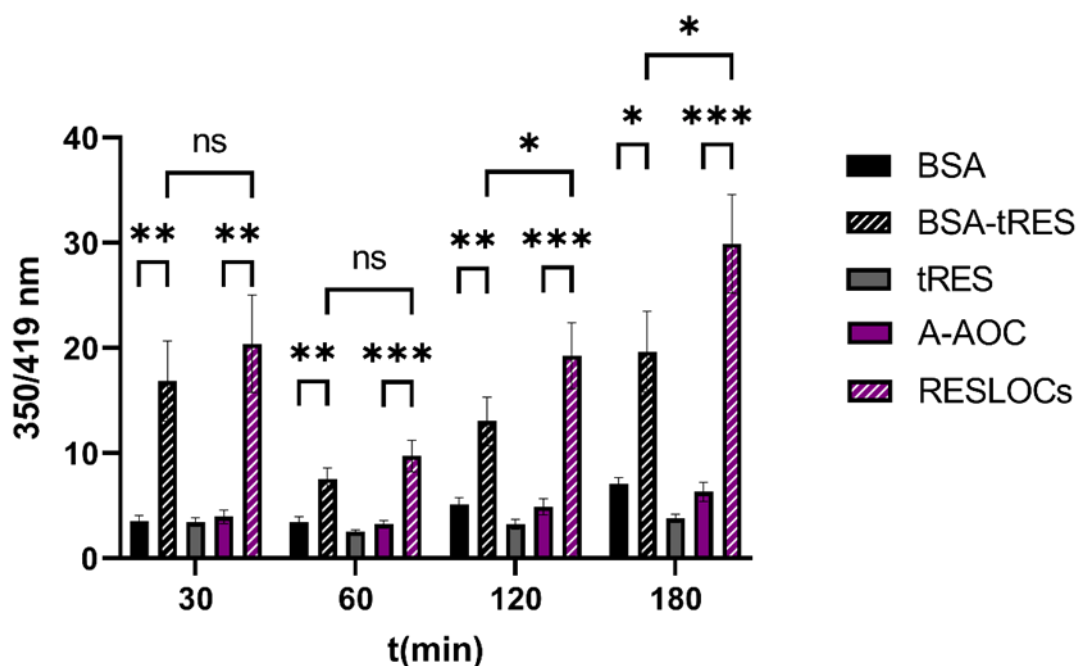


Abbildung 17 ABTS-Decolorisationsassay mit der MOK-Synthese:

Antioxidative Wirkung der jeweiligen Komponente wird als Verhältnis der photometrisch ermittelten Absorptionswerte bei 350 und 734 nm dargestellt. Messungen wurden 30, 60, 120 und 180 min nach Versuchsbeginn durchgeführt, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Two-Way ANOVA; Mittelwert \pm SD, $n = 5$.

Das ABTS-Decolorisationsassay ist eine auf Photometrie basierende Methode. Daher wurden A-AOC-Proben vor Durchführung von Messungen, trotz des geringen Trübungsgrad der MOK-Synthese, zentrifugiert, um mögliche Interferenzen durch die Partikel vermeiden zu können.

Da dieser Schritt bei freiem BSA entfällt, wurde ein weiteres Assay zur Evaluierung der antioxidativen Kapazität herangezogen, um die Resultate des Decolorisationsassays zu bestätigen.

3.3.2 Chemilumineszenzassay zur Evaluierung der antioxidativen Kapazität

Als ergänzende Methode wurde ein auf Lumineszenz basierender Versuch verwendet (2.10.5). Für die Ausbildung eines Lumineszenzsignals war die Generierung eines radikalisierten Intermediats von Luminol erforderlich. Somit war die antioxidative Wirkung einer Komponente proportional zur Reduktion des jeweiligen Lumineszenzsignals, welches in *relative light units* (RLU) dargestellt wird.

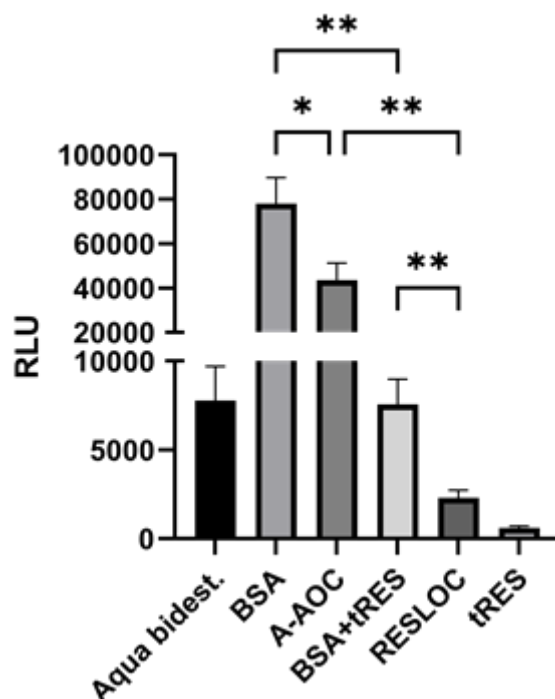


Abbildung 18 Lumineszenzassay zur Beurteilung antioxidativer Kapazitäten:

Abgebildet wird das Lumineszenzsignal von Luminol in Anwesenheit von mit tRES assoziierten BSA und A-AOC, sowie den äquimolaren Mengen der einzelnen Komponenten. Daten wurden 30 min nach Versuchsbeginn gewonnen, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, One-Way-ANOVA; Mittelwert \pm SD, $n = 5$ für Aqua bidest, BSA und A-AOC, $n = 6$ für BSA+tRES, RESLOC und tRES. Die präsentierten Daten wurden von Birgit Podleska erhoben.

Nach einer Inkubationszeit von 30 min konnten in Abwesenheit von tRES in den proteinhaltigen Proben (BSA und A-AOC) stark erhöhte Lumineszenzsignale registriert werden. Dabei war die Signalstärke in Anwesenheit von A-AOC im Vergleich zur äquimolaren Menge freien BSAs signifikant geringer. Durch die Verwendung von tRES konnte in beiden Fällen eine drastische Reduktion der Lumineszenz beobachtet werden. Die Werte für BSA sanken in Kombination mit tRES auf das Niveau der Wasserkontrolle (Aqua bidest.). Auch in diesem Fall lieferten die RESLOC signifikant niedrigere Werte und lagen sogar unter der Kontrolle. Die geringste Signalstärke konnte für freies tRES nachgewiesen werden, welches äquimolar eingesetzt wurde (Abbildung 18).

Die während der Untersuchung der funktionellen Interaktion zwischen Protein und dem Stilben tRES gewonnenen Erkenntnissen zeigten deutliche Unterschiede zwischen den beiden Komplexen BSA-tRES und RESLOC hinsichtlich ihrer antioxidativen Aktivität. Um die Ursache dieser Beobachtungen zu finden, wurden Methoden angewandt, die Informationen zu Struktur und Zustand des Proteins in der jeweiligen Phase liefern sollten.

3.3.3 Untersuchungen der Proteinhülle des künstlichen Sauerstoffträgers

Zur Gewinnung eines Überblicks über die Struktur des Albumins an der PFD-Grenzphase wurde die CD-Spektroskopie genutzt (2.9.1). Die durch die CD-Spektroskopie ermittelte Elliptizität (Abbildung 19) wurde für die Quantifizierung der Sekundärstrukturanteile verwendet.

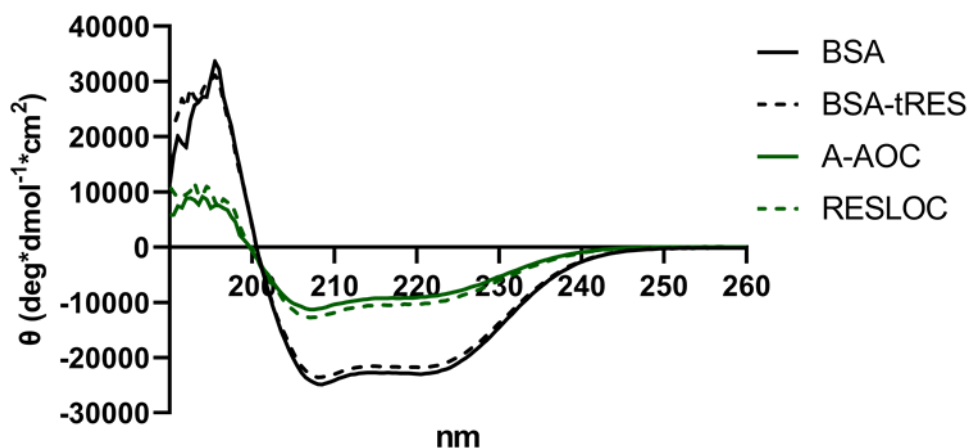


Abbildung 19 Graphische Darstellung der Elliptizität:

Dargestellt sind aufgezeichnete Datenpunkte für ein Spektrum von 190-260 nm für BSA und A-AOC, sowie die tRES assoziierte Äquivalente. Kurven zeigen das Mittel aus $n = 4$ (BSA, BSA-tRES) oder $n = 5$ (A-AOC, RESLOC). Aufgrund visueller Übersicht wurde auf die Darstellung der Standardabweichungen verzichtet.

Die Kurve des freien, nativen BSA erreichte im Vergleich zu den A-AOC-Proben zwischen 205-230 nm äußerst niedrige Elliptizitätswerte. In diesem Bereich bildeten sich zwei Minima aus, ein stark ausgeprägtes bei etwa 208 nm, ein schwächeres bei etwa 222 nm. Beim Verlassen dieses Tals beschrieb die BSA-Kurve einen rasanten Anstieg und formte bei etwa 195 nm ein Maximum und erreichte dabei erneut, in Relation zu den restlichen Bedingungen, hohe Werte (~ 35000).

Der Graph der A-AOC stand im starken Kontrast dazu. Die Kurve erreichte im Bereich von 205-230 nm deutlich höhere Werte für die negative Elliptizität. Während BSA in diesem Wellenlängenbereich Werte von -22000 zeigte, stieg die Elliptizität bei den A-AOC auf -10000 . Das oben erwähnte Minimum bei 208 nm war deutlich schwächer ausgeprägt, während das Minimum bei 222 nm vollständig verschwand. Die Wende im Kurventrend fand bei ähnlicher Wellenlänge statt, wobei die Steigung und das sich formierende Maximum erheblich geringer ausfielen. Das Maximum der A-AOC erreichte lediglich eine Elliptizitätswert von ~ 10000 . Lagen beide Komponenten mit tRES assoziiert vor, konnten keine starken Veränderungen in

den Kurvenverläufen beobachtet werden. Im Bereich 205-230 nm trat für BSA-tRES eine leichte Erhöhung der Elliptizität auf, während sie im Falle der RESLOC absank.

Im Allgemeinen weisen die Elliptizitätskurve von Proteinen eines hohen Ordnungsgrades und damit eines hohen helicalen Anteils einen distinkten Peak bei etwa 190 nm auf sowie ein ausgeprägtes Tal mit zwei Minima bei 208 und 222 nm, die auch zur Berechnung der helicalen Anteile verwendet werden. Steigt der Anteil an Strukturen eines niedrigeren Ordnungsgrades (β - und ungeordnete Strukturen), so spiegelt sich das im Verlauf der Elliptizitätskurve wider. Zum einen kommt es zu einer deutlichen Abnahme des Maximums bei 190 nm. Zum anderen lässt sich mit Zunahme der β - und ungeordneten Strukturen eine Abnahme der absoluten Elliptizitätswerte im Bereich 205-230 nm und somit eine Anhebung des Tals in diesem Abschnitt beobachten.

Die erfassten Datenpunkte wurden zur Quantifizierung der Anteile mit der Online-Software DiChroWeb verwendet und offenbarten die anhand der jeweiligen Elliptizitätskurve zu erwartenden strukturellen Verteilungen:

Probe/Sekundärstruktur	α -Helix	β -Faltblatt	β -Schleife/ungeordnete Strukturen
BSA	67,8 \pm 3,1	8,5 \pm 1	23,8 \pm 3,2
BSA-tRES	63,8 \pm 3,5	9 \pm 2,9	27,25 \pm 1,0
A-AOC	36,2 \pm 1,5 ****	14,4 \pm 1,3 **	49,4 \pm 1,7 ****
RESLOC	38,8 \pm 3,6 ****	12,2 \pm 1,6	49 \pm 2,8 ****

Tabelle 3: Quantifizierung der CD-Spektren

Tabellarische Darstellung des prozentualen Anteils der sekundären Strukturelemente, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, One-Way-ANOVA; Mittelwert \pm SD, $n = 4$ für BSA und BSA-tRES, $n = 5$ für A-AOC und RESLOC. Signifikanzen beziehen sich auf BSA bzw. BSA-tRES.

In seiner nativen Form zeigte BSA einen helicalen Anteil von nahezu 70% und somit einen hohen Ordnungsgrad. Tritt das BSA mit tRES in Interaktion, so nimmt das nahezu keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Proteins. Es konnte lediglich eine leichte Abnahme der α -Helices und eine Zunahme der β -Schleifen und ungeordneten Strukturen um wenige Prozent verzeichnet werden.

Im starken Kontrast dazu standen die Resultate der A-AOC-Proben. Die Auswertung der spektroskopischen Daten offenbarte für das Albumin an der PFD-Grenzphase eine signifikante Reduktion des α -helicalen-Anteils bei gleichzeitiger signifikanter Zunahme der *Random Coil*-Strukturen (β -Schleife/ungeordnete Strukturen). Auch hier schien tRES die Verteilung der sekundären Strukturen nicht ausschlaggebend zu verändern (Tabelle 3). Darüber hinaus war für A-AOC und RESLOC eine Zunahme des β -Faltblattanteils zu verzeichnen, wobei bei A-AOC eine signifikante Erhöhung vorlag.

3.3.4 Quenching der Tryptophanfluoreszenz

Der Prozess der A-AOC-Formation scheint erhebliche strukturelle Veränderungen des Albumingerüsts herbeizuführen. Diese massiven Veränderungen können die Interaktion zwischen BSA und tRES beeinträchtigen. Die CD-Daten erlauben keine genaue Lokalisation der betroffenen Proteindomänen. Als eine stark hydrophobe Verbindung lagert sich *trans*-Resveratrol bevorzugt in hydrophobe Bindetaschen des Albumins ein. Eine davon ist in der Subdomäne IIA lokalisiert, in dessen spatialer Nähe sich das Tryptophan-212 (Try-212) befindet^{136,144}. Tryptophane sind für die intrinsische Fluoreszenz des BSA verantwortlich. Interaktionen eines Bindungspartners mit der Bindetasche führen dabei zu einem *Quenching* der Tryptophanfluoreszenz, was vor allen in Bindungsstudien Verwendung findet^{144,145}. Dieser Umstand wurde auch ausgenutzt, um die Interaktion zwischen tRES und der Proteinhülle der MOK-Synthese zu untersuchen. Als Referenz diente erneut BSA und BSA-tRES.

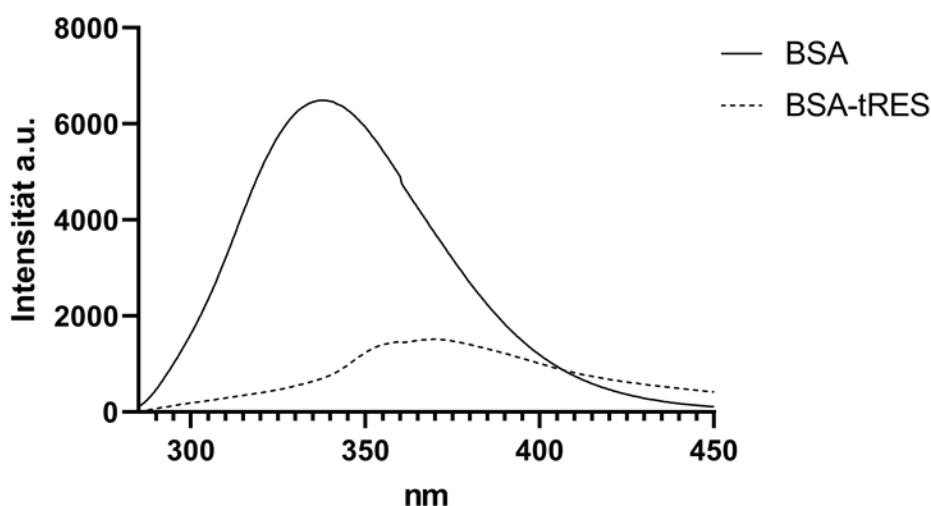


Abbildung 20 Emissionsspektrum des freien BSA

Dargestellte Graphen zeigen Emissionsintensität der BSA-Proben in Abhängigkeit der Wellenlänge. Der Verlauf der Kurven stellt ein Mittel aus $n = 5$ dar. Aufgrund visueller Übersicht wurde auf die Darstellung der Standardabweichungen verzichtet.

Die Tryptophanfluoreszenz wird bei 280 nm angeregt und zeigt eine Emission bei 340 nm. Der Graph des nativen BSA zeigte demnach einen typischen Verlauf, mit einem distinkten Maximum im zu erwartenden Emissionsbereich. Durch die Zugabe von tRES kam es zu einer signifikanten Reduktion und einer gleichzeitig stattfindenden bathochromen Verschiebung (Rotverschiebung) des Kurvenmaximums (Abbildung 20 und Tabelle 4).

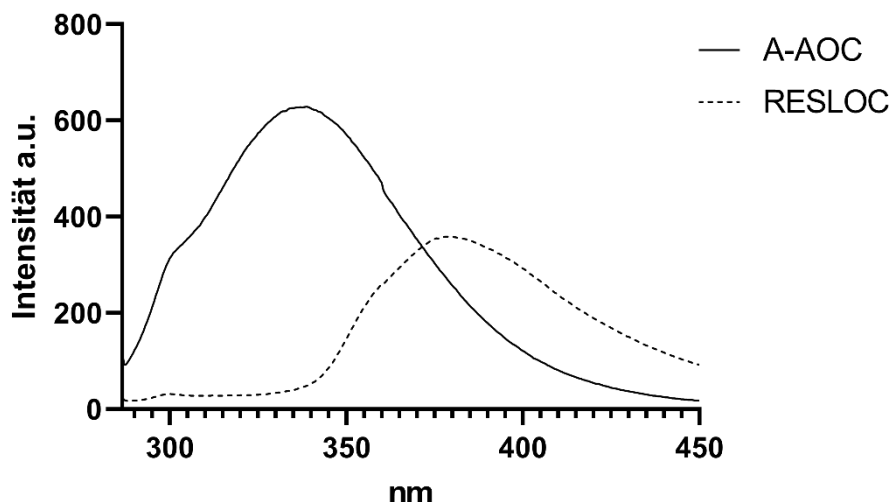


Abbildung 21 Emissionsspektrum der MOK-Partikeln

Dargestellt ist die Fluoreszenzemission partikelhaltiger Proben im abgebildeten Wellenlängenbereich. Der Verlauf der Kurven ergibt sich aus dem Mittelwert von fünf verschiedenen Proben ($n = 5$). Aufgrund visueller Übersicht wurde auf die Darstellung der Standardabweichungen verzichtet.

Bei Betrachtung der Partikelkurve zeigte sich im Vergleich zu BSA keine beträchtliche Verlagerung des Maximums, jedoch reduzierte sich die Emissionsintensität nahezu um das Zehnfache. In Anwesenheit von tRES ließ sich erneut das Phänomen der bathmochromen Verschiebung und eine signifikante Abflachung der Kurve beobachten. Jedoch fand die Reduktion des Emissionsmaximums im Falle der RESLOC in einem deutlich geringeren Ausmaß statt (Abbildung 21 und Tabelle 4).

	Wellenlänge des Maximums (nm)	Emissionsintensität Bei Maximum (a.u.)	Prozentuale Reduktion des Maximums durch tRES
BSA	337,5	6491,5 ± 208,2	76,6
BSA-tRES	369,5	1520,1 ± 111,5 ****	
A-AOC	338,5	617,6 ± 104	41,2
RESLOC	378	362,9 ± 37,8 *	

Tabelle 4 Emissionsmaxima der Tryptophanfluoreszenz protein- und partikelhaltiger Proben

Tabellarische Darstellung der Emissionswerte, die am Maximum der jeweiligen Graphen vorliegen, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$, One-Way ANOVA; Mittelwert ± SD, $n = 5$.

3.3.5 Untersuchungen der hydrophoben Domänen und Zustand der Disulfidbrücken

Um vorangehende Erkenntnisse der *Quenching*-Studie zu komplettieren und einen Eindruck über den Zustand aller hydrophoben Taschen des Albumins zu gewinnen, wurden freies BSA und A-AOC mit dem Fluorophor ANS untersucht (2.9.6). ANS zeichnet sich dabei durch die Besonderheit aus, lediglich in einem hydrophoben Milieu eine hohe Fluoreszenzintensität zu entwickeln, weswegen es sich hervorragend zur Untersuchung hydrophober Bindetaschen eignet.

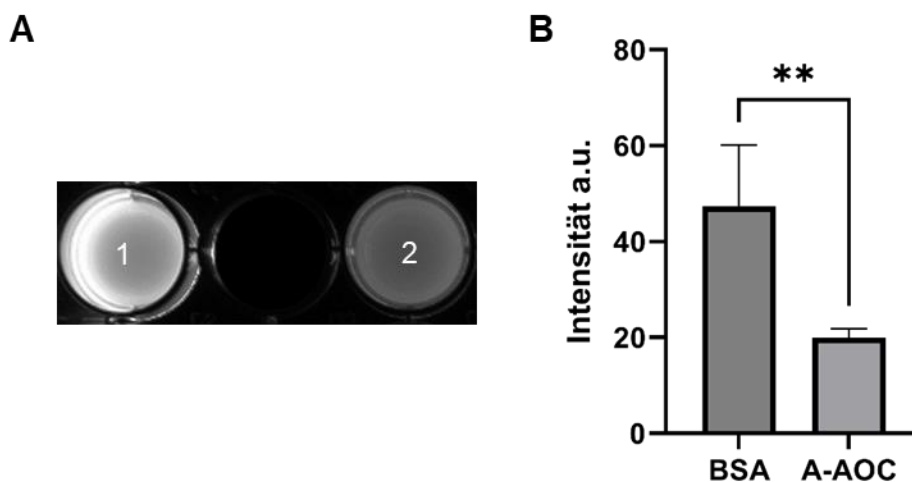


Abbildung 22 Auswertung des ANS-Assays

A: Visuelle Untersuchung der Fluoreszenzsignale mit einem UV-Transilluminator von BSA (1) und A-AOC (2). **B:** Intensität der Fluoreszenzintensität in quantifizierter Form, ** $p < 0,01$, *unpaired t-test*; Two-Way ANOVA; Mittelwert \pm SD, $n = 5$.

Aufgrund einer Anregungswellenlänge im UV-Bereich konnte die Fluoreszenz des ANS mithilfe eines UV-Transilluminators visualisiert werden. Das mit BSA (1) befüllte Well leuchtete mit hoher Intensität, während die Partikelprobe (2) schwach fluoreszierte (Abbildung 22A). Dieser Eindruck konnte bei der Quantifizierung der Fluoreszenzintensität bestätigt werden. Das freie BSA erreichte im Mittel einen Wert von 47,4 a.u., wohingegen die extrapolierte Emissionsintensität des ANS bei einer Interaktion mit A-AOC 19,9 a.u. betrug. Somit lag bei den A-AOC eine signifikante Reduktion des Fluoreszenzsignals von etwa 60% vor (Abbildung 22B).

Ein ähnliches System wurde zur Quantifizierung der Sulfhydrylgruppen des Albumins genutzt. BSA verfügt über 17 Disulfidbrücken. Der Einfluss der umfassenden strukturellen Veränderungen während der Partikelsynthese auf den Zustand der Disulfidbrücken wurde durch Einsatz des mBBR-Reagenz Thiolyte® untersucht (2.9.4). Monobromobimane (mBBR) weisen ein ähnliches Funktionsprinzip wie ANS auf, da sie erst nach der Reaktion mit einer Sulfhydrylgruppe ein Fluoreszenzsignal entwickeln. Als zusätzliche Kontrolle wurden die verfügbaren Thiolgruppen mit dem Reagenz NEM blockiert und anschließend mit dem mBBR behandelt. Auch hier war aufgrund eines Anregungsbereichs im UV-Spektrum eine Visualisierung der Emission mit einem UV-Transilluminator möglich.

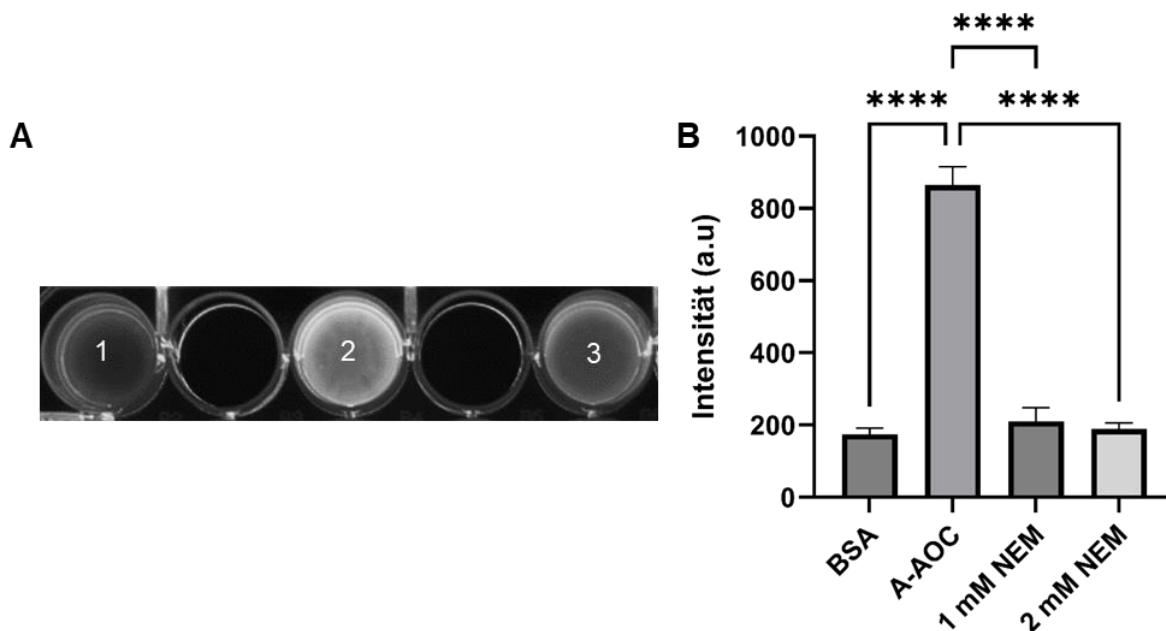


Abbildung 23 Auswertung der mBBR-Behandlung

A: Aufnahme einer visuellen Analyse der mBBR- Emission von BSA (1), A-AOC (2) und A-AOC behandelt mit 1mM NEM (3). **B:** Quantifizierung der mBBR-Fluoreszenzemission, **** $p < 0,0001$, One-Way ANOVA; Mittelwert \pm SD $n = 4$ für die NEM-Proben, $n = 6$ für BSA und A-AOC.

Die BSA-Probe (1) zeigte nach einer Inkubation mit mBBR eine geringe bis keine Fluoreszenz. Im Gegensatz dazu steht das A-AOC beherbergende Well (2), welches ein ausgeprägtes Leuchten aufwies. Eine Präinkubation mit 1 mM NEM führte bei den A-AOC zu einer deutlichen Senkung der Signalintensität (3) (Abbildung 23A). Diese Beobachtungen spiegeln sich auch in der Quantifizierung des Fluoreszenzsignal wider. Das Monobromobiman brachte in Interaktion mit der Partikelhülle eine Signalintensität von 864,8 a.u. hervor, was signifikant höher als das Fluoreszenzsignal der BSA-Probe war. Die Verwendung von NEM in zwei unterschiedlichen Konzentrationen senkte die Fluoreszenzintensität der Partikel signifikant auf das Niveau des freien BSA herab (Abbildung 23B).

3.4 Zellkultur

Mit tRES beladene A-AOC wurden neben den rein biochemischen Assays auch in der Zellkultur untersucht. Zum einen kamen die RESLOC erneut in einem antioxidativen Assay zum Einsatz, in dem ihre protektive Wirkung gegenüber oxidativen Schäden auf zellulärer Ebene analysiert wurde. Zum anderen galt ein Interesse daran, welchen Einfluss die A-AOC auf Zellschäden nehmen, die während eines I/R-Szenarios entstehen. Hierfür wurde eine *in vitro* I/R-Simulation etabliert. Beide Versuchsreihen wurden mit HL-1-Kardiomyozyten durchgeführt.

Die Verwendung der A-AOC in der Zellkultur gestaltete sich in der Vergangenheit der Arbeitsgruppe als herausfordernd, da die Partikel durch Inhalte der Zellkulturmedien und der

erhöhten Temperatur zu schnellerem Wachstum und zur Sedimentation neigen. Durch ein Absenken der Partikel auf adhäsive Zellen können unerwünschte Effekte entstehen, die sich verfälschend auf Resultate auswirken. Daher wurde in dieser Arbeit ein Zellkulturmodell etabliert, in dem sog. *Transwell*-Inserts verwendet wurden. Der Einsatz dieser Inserts erlaubt eine räumliche Trennung der Zellen und A-AOC, können jedoch dank einer mit Poren versehen Membran miteinander interagieren (Abbildung 24). Zusätzlich führt die Insertmembran eine endothelartige Barriere und somit eine Form der Sauerstoffversorgung ein, die näher an im Blutkreislauf vorherrschenden Bedingungen liegt.

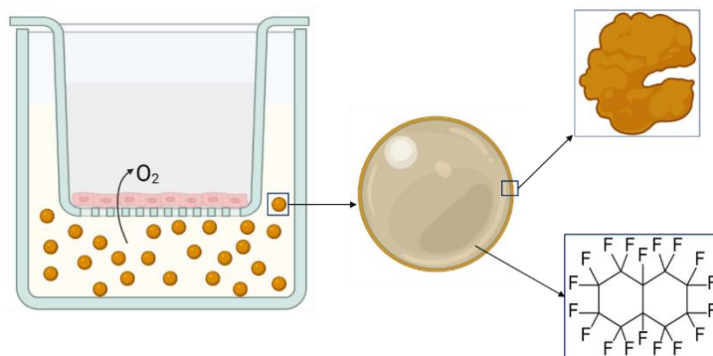


Abbildung 24 Graphische Zusammenfassung des verwendeten Zellkulturmodells

Die Zellen werden in dem korbartigen Insert auf einer mit Poren durchsetzten Membran kultiviert. Während des Versuches ermöglichen diese Poren einen Austausch zwischen den beiden Phasen und so auch eine O₂-Versorgung durch A-AOC (orangefarbene Sphären). Die Grafik wurde mithilfe von BioRender erstellt.

3.4.1 Evaluierung antioxidativer Effekte in Zellkultur

Für die Untersuchung der antioxidativen Kapazität nutzte man ein Assay, bei dem HL-1-Zellen durch das Enzym Glucoseoxidase (GOx) oxidativem Stress ausgesetzt wurden. Die GOx generiert durch Umsetzung der im Medium enthaltenen Glucose einen konstanten Strom an H₂O₂. Erneut wurden A-AOC und RESLOC untersucht und mit äquivalenten Menge an BSA und tRES verglichen. Als eine Art Positivkontrolle dienten Ansätze, in denen die Proben durch 1xPBS ersetzt wurden. Der oxidative Stress wurde mithilfe des Fluorophors CellROX® visualisiert und als CTCF quantifiziert (2.11.13).

Der Einsatz von BSA, tRES und A-AOC erwirkte, im Vergleich zur Positivkontrolle (PBS), lediglich eine geringe, nicht signifikante Verringerung des CTCF-Wertes. Auch untereinander konnte zwischen diesen Bedingungen keine bedeutenden Unterschiede festgestellt werden. Diese zeigten sich erst durch die Zugabe von tRES. Die Fluoreszenzwerte für die Ansätze mit BSA und A-AOC wurden in Anwesenheit von tRES deutlich gesenkt. Dabei präsentierten die RESLOC-Ansätze im Mittel einen signifikant stärkeren antioxidativen Effekt als BSA-tRES und A-AOC. Zwischen BSA und BSA-tRES hingegen konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden (Abbildung 25). Nach Abschluss des Experimentes konnte in partikelhaltigen Wells eine Sedimentation der A-AOC beobachtet werden.

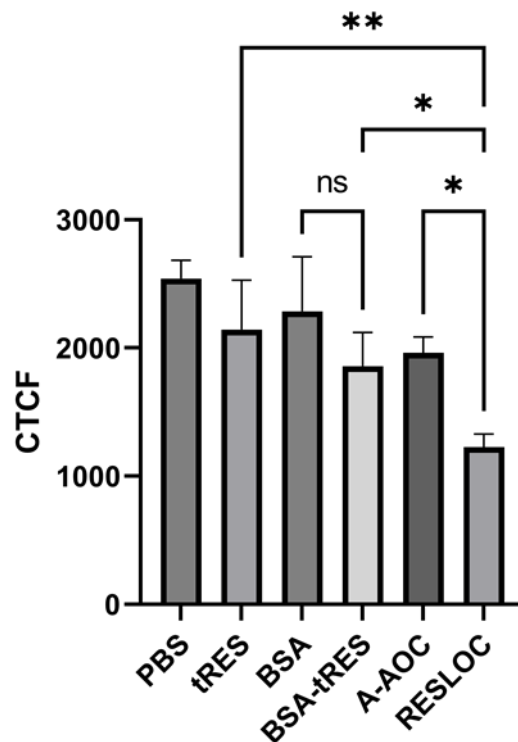


Abbildung 25 CTCF der GOx exponierten HI-1-Zellen

Graphische Darstellung der quantifizierten intrazellulären Fluoreszenz des CellROX als *Corrected Total Cell Fluorescence* (CTCF), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, One-Way ANOVA; Two-Way ANOVA; Mittelwert \pm SD, $n = 3$ für A-AOC und tRES, $n = 5$ gilt für die restlichen Bedingungen.

Während der mikroskopischen Untersuchung konnten Ablösungen von behandelten Zellen beobachtet werden. Für weiterführende Untersuchungen wurden Zelllysate gewonnen. Diese wurden in einer Western Blot-Analyse hinsichtlich ihres Gehalts an gespaltenen Caspase 3 (*cleaved Caspase 3*, clCaspase 3) verglichen. Mit Beginn apoptotischer Prozesse wird Caspase 3 als Effektorcaspase in ihre gespaltene Form überführt, die mit dem Voranschreiten der Apoptose in der Zelle akkumuliert und mit einer WB-Analyse nachgewiesen werden kann (2.11.10). Caspase 3 in seiner gespaltenen Form weist ein Molekulargewicht von 17 kDa auf. Keine der Proben bildete auf der entsprechenden Höhe des Proteinmarkers eine Bande aus (Abbildung 34).

3.4.2 In vitro Ischämie-Reperfuisionsmodell

Das Modell eines *in vitro* I/R-Szenarios soll als eine Versuchsplattform dienen, die nicht nur eine Untersuchung der adäquaten Sauerstoffversorgung, sondern auch der daraus folgenden funktionellen Effekte auf zellulärer Ebene mithilfe molekularbiologischer Methoden ermöglicht. So können mit geringem Aufwand, präliminäre Daten generiert werden, die eine rasche Evaluierung neuer Partikelsynthesen und -modifikationen der A-AOC in einem komplexen und klinisch relevanten Einsatzgebiet gestattet.

3.4.2.1 Sauerstoffversorgung durch A-AOC

Als Indikator für die Sauerstoffversorgung der HL-1 durch A-AOC während einer ischämischen Periode bediente man sich des HIF-1 α . Diese Untereinheit des HIF-Proteins wird lediglich bei O₂-Mangel stabilisiert. Eine Abnahme der detektierbaren HIF-1 α -Menge in Anwesenheit oxygenierter Partikel ist somit proportional zu ihrer Fähigkeit, die Zellen während einer Ischämie mit Sauerstoff zu versorgen.

Hierzu wurde zunächst eine Untersuchung zur Akkumulation der HIF-1 α -Untereinheit in den HL-1-Zellen durchgeführt, um zu ermitteln, wann eine ausreichende Menge an HIF-1 α vorliegt, um die Effekte oxygenierter A-AOC zu sehen. Die Zellen wurden einer hypoxischen Atmosphäre mit 0,1% O₂ ausgesetzt und die zu unterschiedlichen Zeitpunkten vorliegende Proteinmenge durch Western Blot-Analyse untersucht (Abbildung 26).

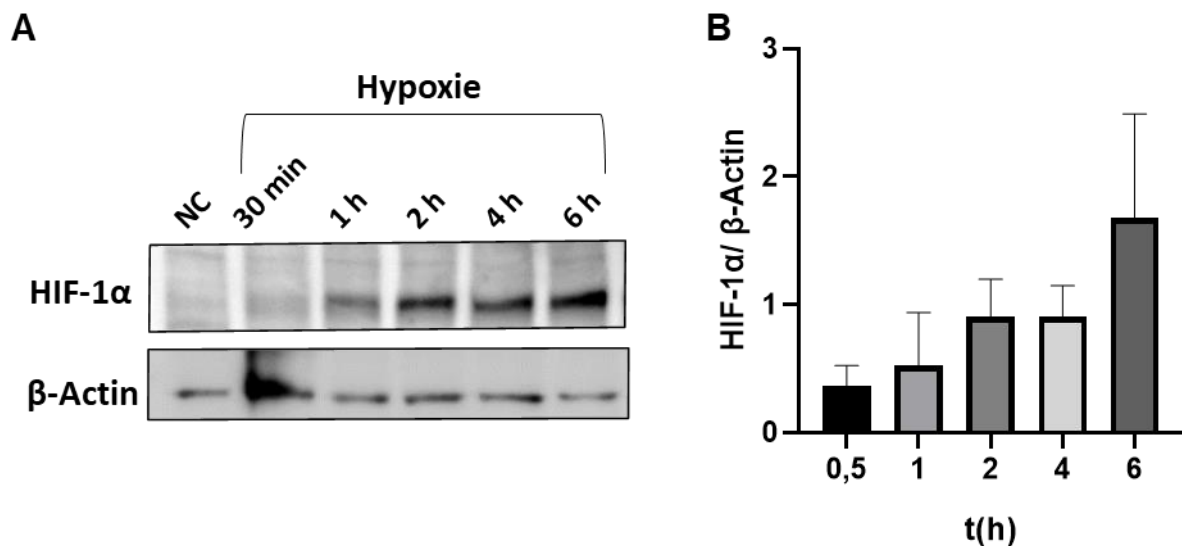


Abbildung 26 HIF-1 α -Akkumulation in HL-1-Zellen

A: Beispielhafte Darstellung einer Western Blot-Analyse der HIF-1 α -Akkumulation in HL-1-Kardiomyozyten. Als Negativkontrolle (NC) dient eine normoxische Probe. Proben wurden mit einer 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt. Als Ladekontrolle dient β -Actin. **B:** Quantifizierung der HIF-1 α -Akkumulation in HL-1-Zellen aufgetragen gegen die Zeit. Für HIF-1 α ermittelte Werte wurden mit β -Actin normalisiert; Mittelwert \pm SD, n = 3. Densitometrische Auswertung erfolgte mithilfe von ImageJ.

Zellen, die lediglich 30 min bei ischämischen Konditionen inkubiert wurden, zeigten bei der WB-Analyse keinen Unterschied zu der normoxischen Kontrolle (NC, Abbildung 26A). Erst eine Stunde nach Beginn des Versuchs, bildete die aufgetragene Probe eine Bande und eine visuell detektierbare Differenz zur Kontrolle. Mit zunehmender Dauer der Hypoxie gewann die Bande des HIF-1 α an Intensität und erreichte bei 6h ein Maximum. Lediglich die sich bei zwei und vier Stunden formierende Banden zeigten sowohl visuell auf dem Gel als auch bei der densitometrischen Analyse eine nahezu identische Intensität (Abbildung 26B).

Anhand der vorliegenden Ergebnisse wurde der Entschluss gefasst, die hypoxische Phase des I/R-Protokolls auf drei Stunden zu begrenzen, da bereits zu diesem Zeitpunkt eine ausreichende Stabilisierung der HIF-1 α -Untereinheit vorlag.

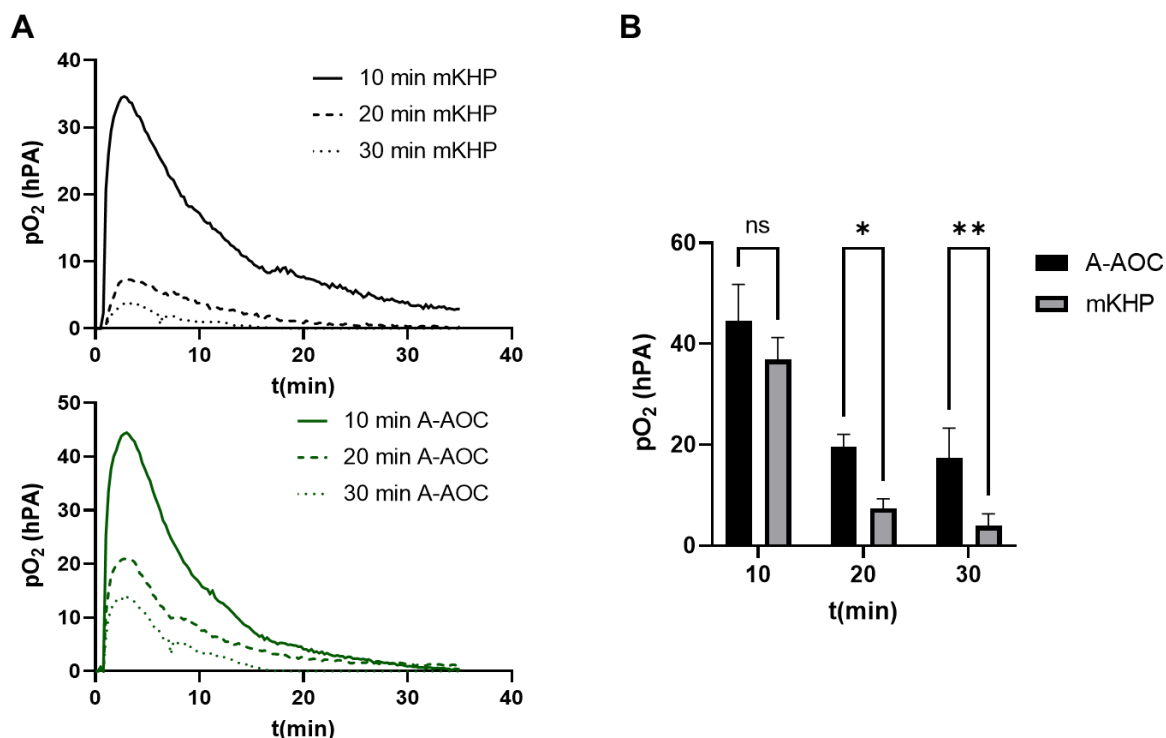


Abbildung 27 Sauerstofftransport durch Insertmembran

A: Graphischer Verlauf des O₂-Partialdrucks in einer 24-Well OxoDish-Platte. Untersucht wurde dabei der Partialdruck im Inneren des Inserts. Der Transfer des Mediums erfolgte nach 10, 20 und 30 min. Der Verlauf der Kurve stellt ein Mittel aus n = 3 dar. **B:** Separate Darstellung der maximalen O₂-Partialdruckwerte in Abhängigkeit des jeweiligen Messzeitpunkts; * p < 0,05, ** p < 0,01, Two-Way ANOVA; Mittelwert \pm SD, n = 3.

Um die Effizienz des Gasaustausches und die O₂-Versorgung der Zellen im Insert-Setup zu bestimmen, wurde die Sauerstoffmenge im Insert und somit in der Phase der Zellen mit dem PreSens-Setup (2.11.4) untersucht. Die MOK-Synthese und der als Referenz dienende mKHP wurden nach 2.11.3 mit 100% O₂ oxygeniert und direkt in das Well der Zellkulturplatte gegeben. In regelmäßigen Intervallen (10, 20 und 30 min) wurde ein Volumen aus dem Insert auf die PreSens-Platte übertragen.

Über den Verlauf des gesamten Versuches ließen sich in den Inserts, die mit den A-AOC behandelt wurden, höhere Partialdrücke für Sauerstoff nachweisen (Abbildung 27). In Anwesenheit oxygenierter Partikel erreichte die innere Phase des Inserts einen O₂-Partialdruck von 44,5 hPa, wohingegen die Zugabe des oxygenierte mKHP zu 34,6 hPa führte. Nach 20 min sank der Partialdruck für beide Probe signifikant auf 20,9 hPa (A-AOC) und 7,4 hPa (mKHP). Nach dem Verstreichen weiterer 10 min reduzierte sich die detektierbare Sauerstoffmenge im Falle der oxygenierten Partikel auf 14,2 und für den mKHP auf 3,9 hPa.

Zu den Zeitpunkten 20 und 30 min ergaben sich zwischen A-AOC und mKHP signifikante Unterschiede, die beim ersten Messpunkt nach 10 min nicht vorlagen (Abbildung 27B).

Um festzustellen, ob die im Insert vorherrschende O₂-Konzentration die HL-1-Zellen mit ausreichend Sauerstoff versorgt, wurde wieder anhand der HIF-1 α -Akkumulation beurteilt. Die Zellen wurden nach Methode 2.11.6 in der Hypoxiekammer präinkubiert und anschließend mit oxygenierten Partikeln oder mKHP behandelt. Die Akkumulation der HIF-1 α -Untereinheit wurde zu Zeitpunkten (10 und 30 min) nach Zugabe der oxygenierten Medien anhand Western Blot-Analyse bestimmt (Abbildung 28). Die Untersuchung der gewonnenen Zelllysate zeigte, dass sowohl für oxygenierte A-AOC als auch für mKHP bei 10 min keine Bande für HIF-1 α vorzufinden ist. Während sich diese Beobachtung für A-AOC beim zweiten Messzeitpunkt wiederholte, trat für mKHP eine klar sichtbare Bande nach 30 min auf.

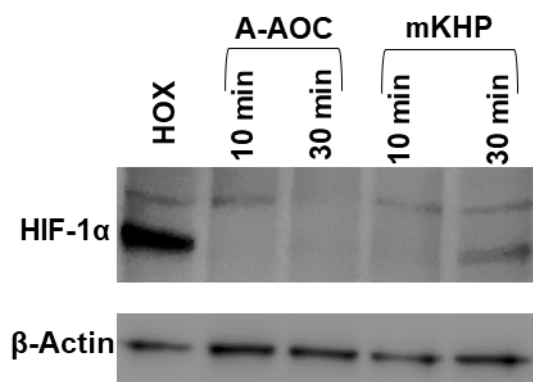


Abbildung 28 Western-Blot Analyse der HIF-1 α -Destabilisierung

Beispielhafte Darstellung einer Western Blot-Analyse zur Untersuchung der HIF-1 α -Akkumulation in Anwesenheit oxygenierter A-AOC und mKHP. Als Kontrolle diente eine unbehandelte, hypoxische Positivkontrolle (HOX), n = 3. Als Ladekontrolle diente β -Actin.

3.4.2.2 Etablierung von Untersuchungen für zelluläre Schädigungsparameter

Um umfassend beurteilen zu können, welche Effekte oxygenierte A-AOC während eines I/R-Szenarios entfalten, müssen neben der Sauerstoffversorgung auch zusätzliche Schädigungsparameter miteinbezogen werden. Aufgrund bereits publizierter Daten¹⁴⁶ und anhand der Resultate der HIF-1 α -Akkumulation wurde der Entschluss gefasst, die simulierte I/R aus einer dreistündigen Hypoxie, an die sich eine Reperfusionphase von einer Stunde anschließt, zusammensetzen. Die Eignung dieses Protokolls hinsichtlich zellulärer Schäden wurde mithilfe der drei zellulären Schädigungsparameter Cytotoxizität, Apoptose und oxidativem Stress geprüft (Abbildung 29).

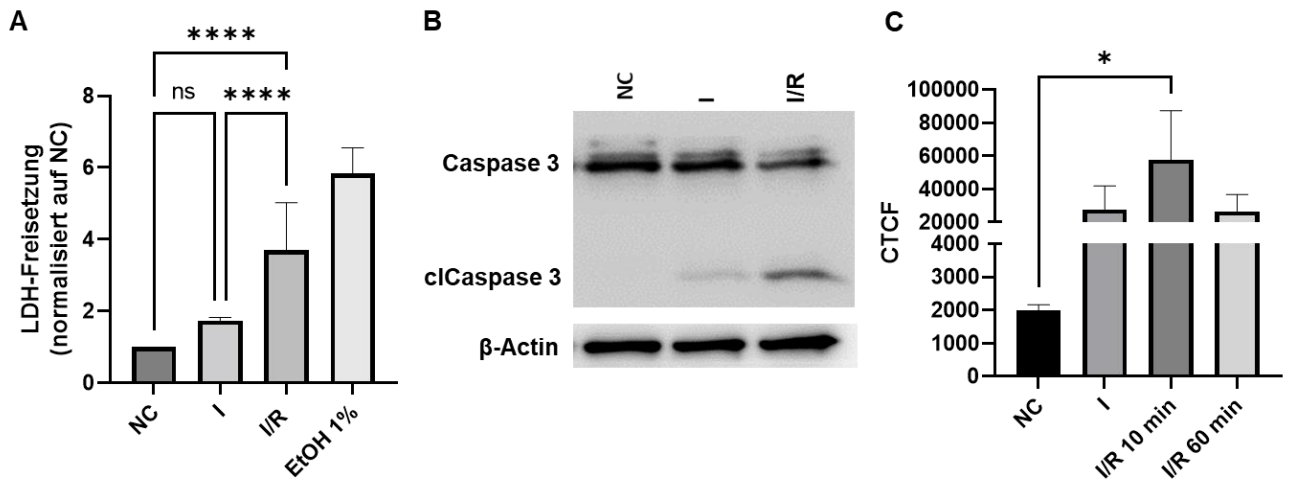


Abbildung 29 Evaluation des zellulären I/R-Schadens

Zusammenfassende Abbildung der Resultate hinsichtlich Cytotoxizität, Apoptose und oxidativem Stress, hervorgerufen durch die simulierte I/R. **A:** Dargestellt ist die LDH-Freisetzung der HL-1-Zellen nach der jeweiligen Phase der Behandlung. Die Resultate werden normalisiert auf die Daten der Negativkontrolle (NC) abgebildet; **** $p < 0,0001$, One-Way ANOVA; Mittelwert \pm SD, $n = 12$ für NC, I und I/R, $n = 8$ für EtOH 1%. **B:** Beispielhafte Western Blot-Analyse des Apoptosemarkers cCaspase 3. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer 12,5% SDS-PAGE. Als Ladekontrolle diente β -Actin, $n = 3$. **C:** Auswertung der intrazellulären Fluoreszenzintensität als CTCF-Wert nach jeweiliger Behandlung; * $p < 0,05$, One-Way ANOVA; Mittelwert \pm SD, $n = 3$.

Cytotoxische Analyse des I/R-Protokolls

Zu Beginn widmete man sich der Cytotoxizität. Als Indikator diente hierbei das Enzym LDH (2.11.12). Es wurden Proben nach drei Stunden Hypoxie/Ischämie (I) und im Anschluss an die Reperfusion (I/R) entnommen und untersucht. Als Negativkontrolle (NC) diente eine Kultur, die während des Experimentes in normoxischen Bedingungen verblieb. Mit 1% Ethanol (EtOH 1%) behandelte Zellen stellten eine Positivkontrolle (PC) dar. Die photometrische Erfassung der LDH-Freisetzung offenbarte folgendes Bild: Zellen, die lediglich der Hypoxie ausgesetzt wurden, zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle geringfügig erhöhte LDH-Werte. Erst nach der Reperfusion trat eine signifikante Steigerung der extrazellulären LDH-Menge auf. Die Reperfusion resultierte im Vergleich zur hypoxischen Probe in einer Verdopplung der detektierbaren LDH und zu einer 3,5-fachen Steigerung der NC-Werte (Abbildung 29A).

Untersuchungen bezüglich auftretenden Zelltods

Die Auswirkungen des I/R-Protokolls auf den Zelltod wurden mit dem Apoptosemarker Caspase 3 ermittelt. Hierbei wurden ebenfalls nach Abschluss jeder Phase, Proben gewonnen, und eine normoxische Probe als NC genutzt.

Im Falle der Negativkontrolle konnte keine cCaspase 3 detektiert werden. Eine leichte Bande für cCaspase 3 zeigte sich nach der hypoxischen Inkubation von drei Stunden. Nach der Reperusionsperiode ereignete sich eine drastische Zunahme in der Bandenintensität und somit auch der Akkumulation der cCaspase 3. Gleichzeitig konnte eine sichtliche Abnahme

der Bandenintensität für unprozessierte Caspase 3 bei I/R festgestellt werden (Abbildung 29B).

Evaluierung des oxidativen Stresses

Der bei der I/R-Simulation potenziell auftretende oxidative Stress wurde mithilfe des Fluorophors DCF-DA evaluiert. Mit DCF-DA vorbeladene Zellen wurden dem I/R-Szenario ausgesetzt. Fluoreszenzaufnahmen der Zellen wurden nach simulierter Ischämie, sowie 10 und 60 min nach Beginn der Reperfusion angefertigt. Bereits die hypoxische Probe zeigt eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Die Analyse der Reperfusionen offenbarte keine Unterschiede zwischen Ischämieprobe und I/R 60 min, wohingegen für I/R 10 min eine leichte Erhöhung des CTCF-Wertes vorlag (Abbildung 29C).

Die Evaluierung der zellulären Schäden zeigte, dass das verwendete Protokoll der simulierten I/R imstande ist, LDH- und cCaspase 3-Werte anzuheben, sowie oxidativen Stress zu induzieren und die erwähnten Analysemethoden geeignet sind, die erwünschten Schädigungsparameter nachzuweisen.

3.4.2.3 Einfluss oxygenierter Partikel auf Ischämie-Reperfusionsschäden

Um feststellen zu können, welche Effekte die künstlichen Sauerstoffträger auf I/R-Schäden entfalten, wurden HL-1-Zellen während der ischämischen Phase in der Hypoxiekammer mit oxygenierter A-AOC behandelt. Die zellulären Schäden wurden anhand Cytotoxizität (LDH) und Apoptose (cCaspase 3) evaluiert (Abbildung 30).

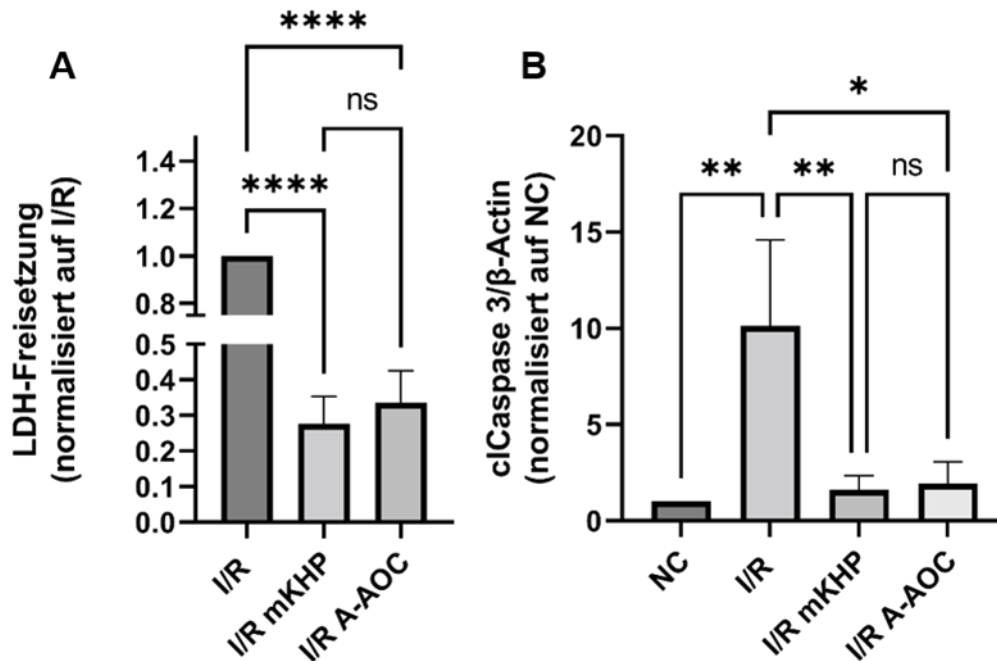


Abbildung 30 LDH-Freisetzung und cCaspase 3-Akkumulation in Anwesenheit von A-AOC

A: Quantifizierung der LDH-Freisetzung nach Durchführung der *in vitro* I/R-Simulation. Die Zellen wurden in der ischämischen Periode entweder mit oxygeniertem mKHP oder A-AOC der MOK-Synthese behandelt. Eine unbehandelte Probe (I/R) wurde als Positivkontrolle genutzt, **** $p < 0,0001$, One-Way-ANOVA; Mittelwert \pm SD, $n = 5$. **B:** Densitometrische Auswertung der cCaspase 3-Western Blot-Analysen. Die Quantifizierung der Bandenintensität erfolgte unter Verwendung von ImageJ. Die Zellen wurden in der ischämischen Periode entweder mit oxygeniertem mKHP oder A-AOC behandelt. Eine unbehandelte Probe (I/R) wurde als Positivkontrolle genutzt, wohingegen eine normoxische Probe als Negativkontrolle (NC) diente, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, One-Way-ANOVA; Mittelwert \pm SD, $n = 3$.

Sowohl LDH-Freisetzung als auch Akkumulation des Apoptosemarkers cCaspase 3 wurden durch die Behandlung der Zellen durch oxygeniertes mKHP und A-AOC signifikant reduziert. Dabei lagen zwischen der salinen Lösung und den A-AOC keine signifikanten Unterschiede vor.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit widmete man sich primär dem strukturellen und funktionellen Zusammenspiel zwischen der Albuminhülle der A-AOC und *trans*-Resveratrol. Zwei verschiedene Protokolle für die Synthese der A-AOC wurden verwendet und mithilfe verschiedener charakterisierender Methoden gegenübergestellt. Besonderes Interesse galt dabei der neueren Synthese, der modifizierten Kaltsynthese (MOK), deren Proteinhülle analysiert wurde, um ein besseres Verständnis der tRES-A-AOC-Interaktion zu gewinnen. Das funktionelle Zusammenspiel beider Komponenten wurde anhand der antioxidativen Kapazität beurteilt. Als finale und komplexere Form der funktionellen Untersuchung wurde eine *in vitro* Simulation eines Ischämie-Reperfusionsszenarios etabliert und angewandt.

Die im Ergebnisteil erwähnten präliminären Resultate zur Standardsynthese dienten hauptsächlich als narratives Element, um dem Leser den Prozess innerhalb des Projektes näherzubringen. Daher werden die Resultate der Standardsynthese lediglich in die Diskussion der MOK-Synthese an geeigneter Stelle eingeflochten.

4.1 Einfluss der Syntheseart auf die Partikelgröße

In experimentellen Untersuchungen, die im Zuge dieses Projektes durchgeführt wurden, kamen zwei Formen der A-AOC zum Einsatz: die Standardsynthese und die MOK-Synthese. Eine Unterscheidung beider Synthesen kann anhand der angewendeten Drücke und den Zyklen der Homogenisierung vorgenommen werden. Die Standardsynthese wurde einem Druck von maximal 20.000 psi ausgesetzt und durchlief lediglich eine einzelne Passage durch das Gerät. Die MOK-Synthese hingegen erforderte den Einsatz von 30.000 psi und eine Rezyklisierung der Probe. Insgesamt erstreckte sich die Synthese über 30 Homogenisierungszyklen bei zwei unterschiedlichen Drücken (20.000 und 30.000 psi).

Diese fundamentalen Unterschiede in der Herstellung spiegelten sich in den Eigenschaften der Partikel wider. Bei den DLS-Messungen ergab sich eine deutliche Korrelation zwischen Partikelgröße und der Form der Prozessierung. Die Partikel der MOK-Synthese zeigten im Mittel einen deutlich geringeren MHD (Abbildung 13). Als zusätzlicher visueller Indikator diente die optische Transparenz und der geringe Trübungsgrad der Probe (Abbildung 7). Der Trübungsgrad einer Emulsion korreliert mit der an Partikeln stattfindenden Lichtbrechung. Von besonderer Bedeutung ist dabei zunächst die Mie-Streuung, bei der der Lichtbrechungsindex proportional zum Partikelradius steigt. Ein größerer Partikelradius beeinträchtigt die lineare Transmission von Licht, führt damit zu einer stärkeren Mie-Streuung und zu einem höheren Trübungsgrad der Emulsion¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Der geringere MHD der MOK-Synthese könnte über diesen Mechanismus zu dem geringen Trübungsgrad führen.

Einen maßgeblichen Einfluss auf die niedrigeren MHD-Werte der MOK-Synthese nimmt der höhere Druck im Emulgierungsprozess. Der eingesetzte Druck wird während der Synthese in

kinetische und thermische Energie umgesetzt^{150,151}. So werden die Emulsionströpfchen stärker beschleunigt und erreichen mit höherer Geschwindigkeit die emulgierende Einheit der Mikrokanäle, wodurch Verwirbelungen mit größerer Intensität entstehen^{150,152}. Somit nimmt mit dem Druck die laminare und turbulente Strömung zu (Kolmogorov-Theorie)¹⁵⁰. Mit Eintrittsgeschwindigkeit der Partikel in die Mikrokanäle steigern sich auch die Scherkräfte und die Zahl und Intensität der Kollisionen. Die Tropfen werden stärker deformiert und feiner dispergiert. Gleichzeitig steigt auch die Frequenz, mit der neue Partikel entstehen, und damit die zu stabilisierende Grenzfläche^{150,152,153}. Das spiegelt sich auch in der verbrauchten BSA-Menge der beiden Synthesen bei gleicher Ausgangskonzentration wider. Bei der Standardsynthese lagen lediglich 4,8 g/L BSA als Hüllmaterial vor, während die Proteinkonzentration im Falle der MOK-Synthese 11,11 g/L betrug (Abbildung 10). Der höhere Proteinverbrauch impliziert eine größere Oberfläche im Emulsionssystem und somit eine feinere Dispergierung der MOK-Partikel, die sich auch mit den Daten der DLS deckt.

Während der Erzeugung der Emulsion finden zwei gegensätzliche Prozesse statt. Neu formierte Partikel weisen eine lückenhafte Proteinhülle auf und neigen aufgrund thermodynamischer Instabilität zur Rekoaleszenz. Dem gegenüber steht die Anlagerung des Emulgators, der die neu entstandene Grenzfläche stabilisieren muss^{150,152}. Die Anlagerungsgeschwindigkeit wird dabei durch mehrere Faktoren bestimmt:

1. Konzentration des Emulgators
2. Temperatur
3. Struktur des emulgierenden Proteins

Die Verwendung einer übermäßigen Emulgatormenge gewährleistet, dass die sich rapide vergrößernde Oberfläche stabilisiert werden kann und die Diffusionsstrecken minimiert werden¹⁵². In beiden Synthesen wurde die gleiche Proteinkonzentration verwendet und kann daher nicht als differenzierender Faktor genutzt werden. Nur ein Bruchteil des freien Albumins wurde in beiden Synthesen als Baumaterial der Partikelhülle verwendet, so dass bei beiden Synthesen eine Übersättigung vorzuliegen scheint (Abbildung 10).

Auf die Diffusionsgeschwindigkeit des Emulgators an die Grenzfläche nimmt auch die Temperatur Einfluss. Höhere Temperaturen begünstigen die Brown'sche Molekularbewegung und wirken sich somit fördernd auf die Anlagerung des Emulgators an die Grenzphase aus¹⁵⁴. Obwohl im Falle beider Synthesen eine Kühlung erfolgte, wird der gesteigerte Druck und Zyklenzahl der MOK-Synthese über die kinetische Energie auch zu einer Erhöhung der thermischen Energie führen^{151,155}. Dieses Phänomen könnte dazu beitragen, dass auch bei dem hohen Energieeintrag und der rapide wachsenden Partikeloberfläche der MOK-Synthese das Albumin rechtzeitig die Grenzfläche stabilisiert und eine Koaleszenz verhindert.

Ein zusätzlicher Faktor ist der Zustand des emulgierenden Proteins. Proteine, die partiell denaturiert und somit linearisiert vorliegen, können sich strukturell besser an die Grenzphase

anpassen. Zusätzlich können exponierte hydrophobe Domänen die Ausrichtung des Proteins an der Grenzphase beschleunigen und tragen zu einer thermodynamischen Stabilisierung des Systems bei^{152,156,157}. In Studien konnte bei Drücken, die bei der MOK- und Standardsynthese zum Einsatz kamen, eine Entfaltung emulgierender Proteine beobachtet werden^{157,158}. Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit mithilfe der CD-Spektroskopie nachgewiesen werden, dass das BSA an der Partikelhülle stark denaturiert vorliegt (Abbildung 19; die Ergebnisse der CD-Spektroskopie werden in 4.3.1 ausführlicher diskutiert). Somit könnte dieser Mechanismus ebenfalls zur Stabilisierung der MOK-Synthese beitragen.

Die oben angeführten Punkte liefern die theoretische Grundlage für die Beobachtung, dass ein erhöhter Druck und eine Zyklisierung, wie es bei der MOK-Synthese der Fall ist, eine stabile Emulsion mit kleineren Partikeln und erhöhter Transparenz hervorbringen können.

Die Partikelgrößenverteilung eines partikulären Systems ist ein weiterer Parameter, der in diesem Zusammenhang relevant ist und zur Charakterisierung der beiden Synthesen genutzt wurde (Abbildung 14). Laut einigen Studien nimmt primär die Zyklisierung einer Emulsion Einfluss auf die Größenverteilung der Partikel. In den Mikrokanälen ergeben sich Inhomogenitäten in den Scherkräften, die aus der Position der turbulenten Strömungen und der Partikel hervorgehen (*high* und *low shear zones*). Die multiplen, aufeinanderfolgenden Zyklen tragen für gewöhnlich dazu bei, die Inhomogenitäten auszugleichen und den PDI einer Emulsion zu senken¹⁵⁰.

Dieses Phänomen lässt sich jedoch im Falle der MOK-Synthese nicht beobachten, da hier trotz Zyklisierung der Probe nach Synthese ein signifikant höherer PDI als bei der Standardsynthese vorlag (Abbildung 14). Diese Beobachtung lässt sich mit dem Prozess des sogenannten *overprocessing* erklären. Wie oben bereits geschildert, konkurrieren zwei Prozesse in den Mikrokanälen miteinander: Die Rekoaleszenz zweier neu formierter Emulsionströpfchen und die Adsorptionskinetik des Emulgators sowie die daraus folgende Stabilisierung der neuen Oberfläche. Obwohl höhere Drücke fördernd auf den Emulgierungsprozess wirken können (s. oben), treten ab einem gewissen Energieeintrag negative Effekte auf. Bei diesem *overprocessing* der Emulsion ist das Zeitfenster der Kollisions- und Rekoaleszenzrate der Partikel so stark reduziert, dass es dem Emulgator nicht mehr gelingt, die sich stets vergrößernde Oberfläche des Systems zu stabilisieren^{152,159}. Albumin, als großes, globuläres Protein, weist ohnehin eine hohe Adsorptionszeit auf¹⁵². Bei Betrachtung des erhöhten PDI einer neu synthetisierten MOK-Emulsion liegt die Annahme nah, dass ein *overprocessing* vorliegt, welches sich nicht nur negativ auf die Partikelgrößenverteilung, sondern aufgrund vermehrter Koaleszenz auch auf die Partikelgröße auswirken kann¹⁵⁹.

Nach Abschluss der Aufreinigung zeigten beide Synthesen eine signifikante Steigerung des MHD und PDI. Aufgrund der wiederholt stattfindenden Pelletierung der Partikel und der sich

daraus ergebenden räumlichen Nähe der A-AOC werden interpartikuläre Interaktionen gefördert. Die Gebilde aus multiplen A-AOC wären imstande die erhöhten MHD- und PDI-Werte hervorzurufen. Dabei scheinen die A-AOC zum Teil durch reversible Flokkulationsprozesse zusammengehalten zu werden, wofür der Rückgang der Partikelgröße und -verteilung 24 h nach erfolgter Aufreinigung spricht (Abbildung 13 und Abbildung 14).

4.2 Zusammenspiel von Viskosität und Zeta-Potential

Bei Betrachtung der Viskosität in Abhängigkeit der Scherrate offenbarte sich im Bereich der niedrigen Scherraten ein überwiegend pseudoplastisches und nicht-newtonsches Fließverhalten (Abbildung 31A), welches dem typischen rheologischen Verhalten einer Emulsion entspricht und am deutlichsten bei den RESLOC der MOK-Synthese ausgeprägt ist^{160,161}. Besonders interessant ist, dass die A-AOC in Abwesenheit von tRES im niedrigen Scherratenbereich hohe Viskositäten aufwies und der Kurvenverlauf eher der einer plastischen Probe ähnelte, welche einen gewissen Mindesteintrag an Energie (sog. Fließgrenze) erfordert, bevor ein Fluss entsteht¹⁶¹ (Abbildung 15 und Abbildung 31B). Diese Beobachtungen könnten wie folgt erklärt werden:

Nach der Aufreinigung der A-AOC zeigten beide Synthesen eine breitere Partikelgrößenverteilung und einen erhöhten MDH, der nicht zum Ausgangswert zurückkehrte. Der Aufreinigungsprozess wird mithilfe eines Zentrifugationsprotokolls durchgeführt, bei der die A-AOC wiederholt in Form eines kompakten Pellets vorlagen. Der mechanische Stress der Zentrifugation überwindet die repulsiven Kräfte der Partikel, so dass die Gesamtheit der Partikel auf engem Raum konzentriert vorliegen. Diese spatiale Nähe fördert die Flokkulation und Ausbildung von Agglomeraten. Dabei werden interpartikuläre Interaktionen primär durch van der Waals-Kräfte vermittelt^{162,163}. Die Agglomeration von Nanopartikeln führt vor allem im niedrigen Scherratenbereich zu einer drastischen Erhöhung der Viskosität^{164–166}. Dieses Phänomen lässt sich auch bei den Partikelproben ohne tRES beobachten, so dass anzunehmen ist, dass die aufgereinigten Ansätze flokkulierte oder gar agglomerierte A-AOC enthalten.

Die Zugabe von tRES führte bei beiden Syntheseformen zu einer deutlichen Reduktion der Viskosität. Mit der Zugabe von tRES werden drei zusätzliche Hydroxylgruppen in das System eingeführt. Die Inkubation von A-AOC in einer tRES-haltigen Lösung und die anschließende Pelletierung der Partikel führte zu einer Verringerung der detektierbaren tRES-Konzentration im Überstand, was auf eine Interaktion zwischen Proteinhülle und tRES hindeutet (Abbildung 4). Als zusätzlicher Nachweis für eine stattfindende tRES-A-AOC-Interaktion können die Resultate des *Quenching*-Effekts herangezogen werden (Abbildung 18), die in 4.3.1 detaillierter diskutiert werden.

Unter der Annahme, dass das hydrophobe tRES bevorzugt an der Proteinhülle assoziiert vorliegt und eine Deprotonierung des tRES im physiologischen pH-Bereich stattfindet, könnten die deprotonierten Hydroxylgruppen zum Zeta-Potential der Partikel beitragen^{167–169}. Tatsächlich lässt sich im Falle der MOK-Synthese ein signifikant niedrigeres Zeta-Potential in Anwesenheit von tRES nachweisen (Abbildung 16), was zwei Auswirkungen auf den Zustand der aufgereinigten Emulsion haben kann:

Hinsichtlich der Viskosität besteht die Möglichkeit, dass die tRES-Zugabe und die daraus folgende Reduktion des Zeta-Potentials zu einer Abschwächung der flokkulierenden Kräfte führt, was in einer partiellen Auflösung der Nanopartikel-Cluster und in einer Herabsetzung der Viskositätswerte bei niedrigen Scherraten resultiert. Weiterhin nimmt das Zeta-Potential Einfluss auf die Stabilität einer Emulsion. Ein hohes Zeta-Potential (positiv oder negativ) geht mit stärkeren repulsiven Kräften einher, welche die Wahrscheinlichkeit von Partikelkollisionen und degradierende Prozessen (Flokkulation, Agglomeration und Koaleszenz) reduzieren¹⁷⁰. Inwieweit die Lagerstabilität der Emulsion mit derartigen Modifikationen verbessert werden kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, könnte jedoch in der Entwicklung neuer A-AOC-Formulierungen berücksichtigt werden.

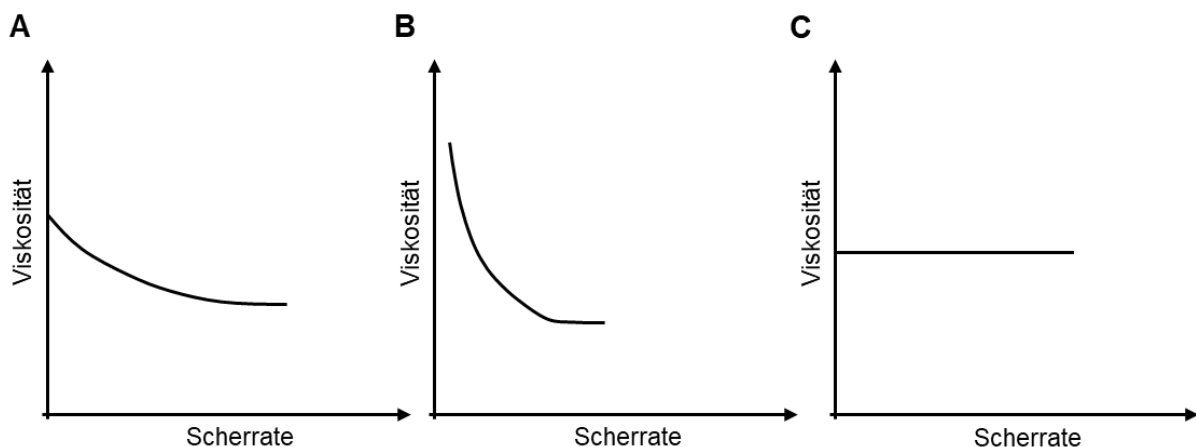


Abbildung 31 Idealer Kurvenverlauf verschiedener rheologischer Eigenschaften

Graphische Darstellung der typischen Viskositätsänderungen bei pseudoplastischen (A), plastischen (B) und newtonschen Fluiden (C) in Abhängigkeit der Scherrate. Abbildung wurde mithilfe von Microsoft PowerPoint erstellt.

Trotz dieser unterschiedlichen Ausgangsvoraussetzungen nähern sich alle Kurven mit Zunahme der Scherrate an (Abbildung 15) und zeigen ab 17s^{-1} ein newtonsches Fließverhalten^{160,161} (Abbildung 31C). Dieses Phänomen wird auch als *shear thinning* bezeichnet¹⁷¹. Zum einen könnte der zunehmende mechanische Stress der Scherrate zu einem Auflösen der flokkulierten Partikelagglomerate beitragen, was in einer Reduktion der Viskosität resultieren könnte^{171,172}. Zum anderen werden die Partikel, die im Ruhezustand eine sphärische Form aufweisen, zu Ellipsoiden verformt. Somit sinkt der Partikelquerschnitt orthogonal zur Fließrichtung und führt zu einem geringeren Strömungswiderstand. Zusätzlich sind die sphärischen Partikel und die fluide Membran zur Rotation befähigt. Mit steigender

Scherbelastung nimmt die Rotation in Fließrichtung zu, wodurch ebenfalls der Widerstand abnimmt^{172,173}. Beide Mechanismen könnten die Viskosität der Proben herabsenken und den Verlauf der Kurven erläutern.

Bei 230 s^{-1} (Scherrate, die an der humanen Arterienwand vorliegt) liefert Blut eine Viskosität von $3,8 \text{ mPa}\cdot\text{s}$. Im gesamten physiologischen Scherratebereich ($10\text{-}2000 \text{ s}^{-1}$) lagen für alle untersuchten A- AOC-Proben eine Viskosität von unter $2 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ vor (Abbildung 15). Damit befinden sich die Werte der Emulsionen deutlich unter denen des humanen Blutes, wodurch die A-AOC-Synthese eine der Hauptkriterien für künstliche Sauerstoffträger erfüllt. Als Referenz haben Haruki et al. für ihr HBOC-Präparat *HemoAct* für arterielle Scherraten eine Viskosität von lediglich $2,8 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ detektiert¹⁷⁴.

4.3 Untersuchung der funktionellen Interaktion der Albuminhülle der A-AOC und tRES hinsichtlich antioxidativer Kapazität

Das Stilben tRES zeichnet sich durch zahlreiche Funktionen aus, wobei die antioxidativen Effekte die prominenteste Eigenschaft darstellen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der Albuminhülle der MOK-Synthese auf die antioxidative Kapazität des tRES mithilfe drei verschiedener Assays evaluiert. Zu Beginn bediente man sich eines Decolorisationsassays, in dem die antioxidativen Eigenschaften anhand der Reduktion eines ABTS-Kationradikals beurteilt werden konnte. Weiterhin wurde eine Chemilumineszenzassay verwendet, bei dem die Radikalfängereigenschaften gegenüber Peroxinitrit und seinen Intermediaten im Fokus standen. Abschließend wurde die protektive Wirkung der RESLOC auf HL-1-Kardiomyozyten untersucht, die der H_2O_2 -Produktion der GOx ausgesetzt waren. Gleichzeitig erfolgten strukturelle Untersuchungen der partikulären Albuminhülle, die Erkenntnisse zur A-AOC-tRES-Interaktionen liefern sollten.

Im Folgenden werden die Resultate der Assays und der Einfluss der strukturellen Besonderheiten der Albuminhülle auf die antioxidativen Effekte einzeln diskutiert.

4.3.1 ABTS-Decolorisationsassay

Zu Beginn nutzte man ein Decolorisationsassay, welches auf der Reduktion von ABTS-Kationradikalen beruhte. Bei Betrachtung der Ergebnisse zeigte sich, dass über die gesamte Spanne des Experimentes die Systeme BSA-tRES und RESLOC eine deutlich höhere antioxidative Kapazität als die einzelnen Komponenten aufwiesen (Abbildung 17). Bereits nach 30 min war deutlich zu erkennen, dass die antioxidative Aktivität von tRES in Anwesenheit von BSA und A-AOC signifikant gesteigert wurde.

Der Ausgang des ABTS-Decolorisationsassays wirft die Frage auf, weshalb die einzelnen Komponenten den Protein-tRES-Komplexen derartig unterlegen waren.

Wie in der Einleitung (s. 1.6) bereits erwähnt, handelt es sich bei tRES um ein stark hydrophobes Molekül, welches eine niedrige Löslichkeit in wässrigen Medien besitzt^{65,175}. Um die antioxidative Kapazität der einzelnen Bedingungen adäquat vergleichen zu können, wurde in jedem Ansatz eine äquimolare Menge an tRES eingesetzt. Ohne die fördernde Wirkung des Albumins auf Löslichkeit und Dispergierung (Tabelle 1), lag die eingesetzte Konzentration des tRES deutlich über der maximalen Löslichkeit in wässrigen Lösungen. Hydrophobe Substanzen neigen in einem wässrigen Milieu zur Aggregation und damit zu einer inhomogenen Verteilung im Ansatz. Eine Aggregation von tRES lässt sich bereits bei 37 µM nachweisen und wird über hydrophobe Wechselwirkungen der Phenolringe vermittelt^{175,176}. Dieses Phänomen war auch bei unseren tRES-Proben zu beobachten, da makroskopische Aggregate im Ansatz erkennbar waren. Die Aggregatformation reduziert die Interaktionsoberfläche und die daraus folgende inhomogene Dispergierung wirkt sich negativ auf die Interaktionswahrscheinlichkeit aus^{175,176}.

Darüber hinaus wird die chemische und thermodynamische Stabilität des tRES-Gerüsts von dem umgebenden Milieu und die antioxidative Aktivität von tRES wird maßgeblich von der 4'-Hydroxylgruppe bestimmt. Aufgrund ihrer Position zeichnet sich diese Hydroxylgruppe durch eine besonders hohe Azidität aus, die in starker Abhängigkeit zu der tRES-Struktur steht. Denn die am 4'-OH entstehende Radikale können über die Phenolringe und die sie verbindende Doppelbindung stabilisiert werden, was die Bereitschaft als Radikalfänger deutlich erhöht^{79,175}. Die Umgebung nimmt erheblichen Einfluss auf die Stabilität und antioxidative Aktivität des tRES. Befindet sich das tRES-Gerüst nun in einem energetisch unvorteilhaften, hydrophilen Milieu, so könnte die Stabilität des Molekülgerüsts sinken, was wiederum einen negativen Einfluss auf die Azidität und somit antioxidative Aktivität der Hydroxylgruppen nehmen könnte⁷⁹.

Das Zusammenspiel dieser beiden Prozesse könnte zu der niedrigen antioxidativen Kapazität des freien tRES führen, da das Assay in einer wässrigen Umgebung durchgeführt wurde.

Im Falle der BSA- und A-AOC-Proben wurde bereits in Publikationen über eine geringe Reaktivität des BSA im ABTS-Assay berichtet, jedoch ohne einen mechanistischen Hintergrund zu liefern¹⁷⁷. Das ABTS misst primär die antioxidative Aktivität hinsichtlich der Elektronentransferbereitschaft^{83,178}. So könnte die Möglichkeit bestehen, dass die antioxidativen Strukturen des Albumins nur sehr langsam oder stark limitiert über den bevorzugten Mechanismus des Decolorisationsassay mit dem ABTS-Kationradikal reagieren, was die niedrige Aktivität des BSA und der A-AOC im Decolorisationsassay und die Unterschiede zu den kommenden Assays erklären könnte (s. 4.3.2).

Den einzelnen Komponenten gegenüber steht die erhebliche Steigerung der antioxidativen Aktivität, die bei den Protein-Polyphenol-Komplexen vorliegt. Die Zugabe des tRES in

albuminhaltige Ansätze könnte über folgende Mechanismen den beobachteten Effekt hervorrufen:

Unter der Annahme, dass tRES sich am Protein und der Partikelhülle anlagert, begibt sich das Stilben in eine hydrophobe Region und befindet sich somit in einem vorteilhafteren Milieu. Die hydrophobe und elektrostatische Interaktion mit dem Protein fixieren die Doppelbindung und stabilisieren das tRES-Molekül in seiner *trans*-Konfiguration, was den Elektronenfluss innerhalb des tRES-Gerüsts fördert⁷⁶. Die antioxidative Aktivität erfährt dadurch eine Steigerung, da Radikale leichter stabilisiert werden können^{179–181}. Zusätzlich sorgt die Interaktion mit dem Protein für eine erhöhte Löslichkeit und somit zu einer verbesserten Dispergierung⁹⁰. Die in den antioxidativen Assays zum Einsatz kommende Proteinmenge ist auf jeden Fall imstande die tRES-Löslichkeit in wässrigen Medien drastisch anzuheben (Tabelle 1) und durch die homogenere Verteilung sich vorteilhaft auf die antioxidative Aktivität des tRES auszuwirken.

Weiterhin führt eine Kombination beider Komponenten zu einer simplen Erweiterung der antioxidativen Kapazität im vorliegenden System. So besteht die Möglichkeit, dass die antioxidative Aktivität aufgrund der Anwesenheit des tRES nicht so rasch erschöpft, da tRES als primäres Antioxidans und effizienter Radikalfänger agieren kann¹⁸².

Über den gesamten Verlauf des Experimentes präsentierten die RESLOC eine überlegene antioxidative Aktivität gegenüber dem BSA-tRES-Komplex. In beiden Fällen wurde die eingesetzte Menge an Protein und tRES angepasst, so dass in den jeweiligen Ansätzen äquivalente BSA-Mengen vorlagen. Der einzige Unterschied bestand in der Form, in der das Albumin vorlag (frei in Lösung oder an der PFD-Grenzphase adsorbiert). Daher wurde der Entschluss gefasst, die Proteinhülle der MOK-Synthese zu analysieren.

Analyse der Sekundärstruktur der A-AOC-Proteinhülle

Um einen allgemeinen Eindruck der vorliegenden Struktur des Albumins an der Grenzfläche zu gewinnen, wurde die Sekundärstruktur mithilfe der CD-Spektroskopie ermittelt. Die Analyse der Sekundärstruktur offenbarte eine signifikante Reduktion des helicalen Anteils bei gleichzeitiger Zunahme der β - und *Random Coil*-Strukturen (Tabelle 3). Das Albumin zeigt demnach nach der Hochdruckhomogenisierung eine umfassende Veränderung der sekundären Struktur. Die drastische Abnahme der helicalen Strukturen deutet auf eine starke Denaturierung des Proteins hin. Während der Prozessierung der Emulsion durch Hochdruckhomogenisierung treiben zwei Prozesse die Denaturierung des emulgierenden Proteins voran. Zum einen löst bereits die Anlagerung von Proteinen an eine Grenzfläche eine partielle Denaturierung aus. Proteine sind aufgrund ihres amphiphilen Charakters hervorragende Emulgatoren. Bei der Adsorption an eine Öl/Wasser-Grenzphase neigen Proteine zu einer partiellen Denaturierung, um die eigene Struktur thermodynamisch günstig auszurichten und somit die Grenzphase energetisch zu stabilisieren. Dabei gelangen

hydrophobe Domänen näher an die Oberfläche und werden der Öl-Phase zugewandt, während hydrophile Strukturen zur wässrigen Seite ausgerichtet werden^{183–185}. Ähnliche Prozesse könnten im Falle der A-AOC an der PFD-Wasser-Grenze ablaufen, was zu der ermittelten Denaturierung des BSA (Tabelle 3) und einer Stabilisierung der Emulsion führen könnte.

Die beobachteten Veränderungen in den Anteilen der Sekundärstrukturen waren zu umfassend, um lediglich durch thermodynamisch getriebene Prozesse hervorgerufen zu werden. In zahlreichen Studien wurde der Einfluss der Hochdruckhomogenisierung auf die Proteinstruktur untersucht. Analysen der Sekundärstruktur zeigten eine drastische Abnahme in den α -Helices, einer Struktur mit hohem Ordnungsgrad. Die Proteine waren demnach stark denaturiert. Diese strukturellen Veränderungen wurden wahrscheinlich durch turbulente Strömungen und die enormen Scherkräfte verursacht, die in den Mikrokanälen auf die Probe wirken^{157,158,186}. Auch im Falle der MOK-Synthese ist das BSA hohen Drücken exponiert und zeigt ähnliche Veränderungen, so dass auch dieser Mechanismus einen Beitrag zur Entfaltung des Albumins leisten könnte.

Dank der CD-Spektroskopie konnte festgestellt werden, dass BSA als Partikelhülle massive strukturelle Unterschiede zu seiner nativen Konformation aufweist. Derartig große Veränderungen könnten auch Einfluss auf die Interaktion mit tRES nehmen, was im nächsten Abschnitt diskutiert wird.

Untersuchungen der hydrophoben Bindetasche

Die Interaktion zwischen Albumin und tRES findet primär über hydrophobe Bindetaschen statt (s. 1.7). Der Zustand dieser Bindetaschen wurde mithilfe des Fluorophors ANS untersucht, welches durch die Einlagerung in hydrophobe Taschen stabilisiert wird und ein starkes Fluoreszenzsignal entwickelt^{133,187}. Die Auswertung zeigte eine reduzierte Fluoreszenzaktivität des ANS bei Interaktion mit den Partikeln, was auf eine unzureichende Stabilisierung des Fluorophors hindeutete (Abbildung 22)¹³⁶. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass womöglich eine starke Deformation, wenn nicht sogar vollständige Auflösung der hydrophoben Bindetaschen vorliegt.

Eine simple, mit Partikeln realisierbare Methode zur weiterführenden Evaluierung der tRES-AOC-Interaktion stellte die Untersuchung der Tryptophanfluoreszenz in Anwesenheit von tRES dar. Bei einem direkten Vergleich zwischen dem Fluoreszenzsignal des freien Albumins und der A-AOC fällt zunächst die reduzierte Signalintensität im Falle der Partikel auf (Abbildung 21). Dies kann als zusätzliches Indiz für die Denaturierung der hydrophoben Bindetasche und der tRES-Interaktionsstätte gewertet werden. Denn das Try-212 liegt für gewöhnlich im Inneren der tRES-Bindetasche und hat keinen Kontakt zur äußeren Phase¹³⁶. Die beobachtete Denaturierung und die Entfaltung der hydrophoben Tasche kann die Verschiebung des Tryptophans in die Nähe der Proteinoberfläche bewirken. An dieser Position

kann eine Interaktion mit dem wässrigen Medium nicht mehr ausgeschlossen werden. Da Wassermoleküle einen *Quenching*-Effekt besitzen, tritt dann eine Reduktion des Fluoreszenzsignals auf¹³⁶. Dieses Phänomen könnte der reduzierten Signalintensität der A-AOC zugrunde liegen.

Eine weitere Auffälligkeit stellt die Beobachtung dar, dass das *Quenching* der Tryptophanfluoreszenz bei den RESLOC deutlich geringer ausfällt. Das Prinzip des Fluoreszenzquenchings beruht auf dem Fourier Resonanz Energietransfer (FRET), dessen Effizienz mit dem Abstand der beteiligten Komponenten korreliert; je größer der Abstand, desto ineffizienter der Energietransfer und desto geringer der *Quenching*-Effekt. Sobald der Abstand zwischen angeregtem Donor (in diesem Fall Tryptophan) und Akzeptor weniger als 7 nm beträgt, kann ein Energietransfer stattfinden⁹¹. Der Abstand zwischen tRES und Try-212 des BSA beträgt für gewöhnlich ~ 4nm¹⁴⁵.

Ausgehend von diesem Bild scheint es so, dass sich der Abstand zwischen der tRES-Interaktionsstätte und des Tryptophans vergrößert hat, was sich in der Abnahme der *Quenching*-Effizienz widerspiegelt¹³⁶. Die Entfaltung der Tasche führte also nicht nur zu der Relokalisation des Tryptophans an die Proteinoberfläche, sondern auch zu einer Zunahme des räumlichen Abstandes zwischen der Aminosäure und tRES. Auch die Konstellation der restlichen Aminosäuren der Bindetasche, die unter anderem die Interaktion zu tRES vermitteln, könnte ebenfalls verändert vorliegen. Nichtsdestotrotz ist das tRES imstande an der Albuminhülle einen bathmochromen Shift des Tryptophansignals, welcher charakteristisch für eine BSA-tRES-Interaktion ist⁹¹, und einen *Quenching*-Effekt zu vermitteln (Abbildung 21). Beide Effekte erfordern eine Distanz von wenigen Nanometern und können somit zusätzlich als ein Nachweis dafür gewertet werden, dass tRES in einem RESLOC-Ansatz assoziiert mit der Albuminhülle vorliegt.

Unabhängig vom Zustand der Bindetasche ergeben sich zwischen der Proteinhülle der A-AOC und dem freien BSA hinsichtlich der tRES-Freisetzungskinetik keine signifikanten Unterschiede. Die Stärke der Interaktion ist demnach nicht beeinträchtigt und bewegt sich bei beiden Systemen auf einem ähnlichen Niveau. Da die Interaktion zu BSA lediglich über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkung vermittelt wird, scheint die zusätzliche thermische Energie bei 37 °C die Interaktion zwischen Polyphenol und Protein zu schwächen und somit eine signifikant erhöhte Freisetzung zu induzieren (Abbildung 12)¹⁴⁵.

Im Falle des Decolorisationsassays liegt zwischen der antioxidativen Kapazität des freien BSA und der A-AOC keine signifikanten Unterschiede vor. Somit scheint es, dass die Struktur des Proteins in diesem Assay keinen direkten Einfluss auf die antioxidativen Eigenschaften des Albumins nimmt, obwohl in zahlreichen Studien eine Korrelation zwischen Protein-Entfaltungsprozessen und einer Steigerung ihrer antioxidativen Kapazität demonstriert werden

konnte^{188–191}. Dieser Punkt wird im Zusammenhang mit dem Chemilumineszenz-Assays (4.3.2) ausführlicher diskutiert.

Wie oben bereits angemerkt, zeigten die einzelnen Komponenten eine niedrige Aktivität gegen das ABTS-Kationradikal. Demnach werden BSA und A-AOC, mit hoher Wahrscheinlichkeit, nur einen geringfügigen Einfluss auf die Resultate der Protein-Polyphenol-Systeme nehmen. Schließt man eine direkte Beteiligung des Proteins aus, so scheinen die antioxidativen Effekte von BSA-tRES und RESLOC ein Zusammenspiel der Radikalfängeraktivität des tRES sowie die fördernden Effekte der Proteinphase auf Löslichkeit und Verteilung des Stilbens zu sein. Darüber hinaus zeigt tRES in einer stabilisierenden Umgebung eine höhere Tendenz zum SPLET (*sequential proton loss electron transfer*-) Mechanismus und damit zum Elektronentransfer, was eine zusätzliche Erklärung für die erhöhte Aktivität im ABTS-Assay liefert^{79,192}. Trotz des ausgeschlossenen Einflusses der Proteinstruktur auf die antioxidative Kapazität der Proben, liegen zwischen BSA-tRES und A-AOC deutliche Unterschiede vor. Eine mögliche Erklärung könnte eine genauere Betrachtung der tRES-Interaktionsstätte liefern. Denn neben den fördernden Effekten, die sich aus der Interaktion zwischen Protein und Polyphenol ergeben, können Bindetaschen von Proteinen einen negativen Einfluss auf die Aktivität von Polyphenolen nehmen. Die Einlagerung eines Polyphenols in eine hydrophobe Bindetasche eines Proteins wirkt sich zwar fördernd auf die strukturelle und chemische Stabilität des Polyphenols aus, jedoch wird es dadurch auch spatial isoliert und nicht alle Hydroxylgruppen können effizient mit den Radikalen reagieren. Bei diesem Effekt spricht man auch von Maskierung¹⁷⁶. Die Bindetasche des Albumins an der Partikelhülle liegt stark entfaltet vor. Während des Emulgierungsprozesses ergibt sich zwischen der Proteinhülle und dem eingeschlossenen PFD eine hydrophobe Grenzphase. Die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen offenbarte, dass tRES und andere hydrophobe Polyphenole in Anwesenheit von Emulsionssystemen dazu neigen, sich in hydrophoben Räumen anzusammeln, die sich an den Grenzphasen bilden^{167,193}. In Anbetracht des Zustandes der BSA-Bindetasche und der inerten Natur des PFD-Kerns sowie der *Quenching*-Wirkung des tRES im RESLOC-System ist anzunehmen, dass auch im Falle der MOK-Emulsion das tRES auf der hydrophoben Seite der Albuminhülle akkumuliert. Aufgrund der denaturierten Bindetasche findet wahrscheinlich eine Minderung des Maskierungseffekts des Albumins statt, womit sich mehr Hydroxylgruppen als Radikalfänger beteiligen können¹⁷⁶. Zusätzlich könnte die membranartige, fluide Albuminhülle die Passage von Radikalen und eine Interaktion mit dem an der Grenzphase befindlichen tRES ermöglichen. Aufgrund einer verringerten Maskierung des tRES würde die antioxidative Kapazität des RESLOC-System im Vergleich zu BSA-tRES später erschöpfen, was die Unterschiede vor allem bei 120 und 180 min erklären könnte (Abbildung 17).

In beiden Systemen korreliert die Freisetzungskinetik des tRES (Abbildung 12) mit der beobachteten Zunahme der antioxidativen Kapazität über die Zeit. Die stetig zunehmende

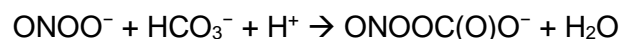
Menge an freigesetztem tRES könnte mit den ABTS-Kationradikalen in Lösung interagieren und die detektierbare Radikalkonzentration senken. Da jedoch eine nahezu identische Menge an tRES von beiden Systemen freigesetzt wurde, scheint es so, dass erst die strukturellen Besonderheiten des tRES-A-AOC-Interaktion zu einer Differenzierung zwischen BSA-tRES und RESLOC führen.

Auch die RESLOC der Standardsynthese zeigten im ABTS-Assay eine außerordentlich hohe antioxidative Kapazität (Abbildung 5 und Abbildung 6). Aufgrund des hohen Trübungsgrades der Standardsynthese war eine verlässliche Untersuchung der Hülle mit der CD-Spektroskopie nicht möglich. Da jedoch die Hochdruckhomogenisierung bereits bei 20.000 psi und einer einzelnen Passage eine Denaturierung des Albumins hervorrufen kann^{157,158}, ist anzunehmen, dass auch im Falle der Standardysnthese eine reduzierte Maskierung des tRES und Akkumulation an der PFD-Albumin-Grenzphase zu der erhöhten antioxidativen Kapazität der RESLOC beitragen.

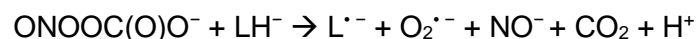
4.3.2 Chemilumineszenzassay

Als zusätzliche Methode zur Evaluierung der antioxidativen Kapazität der RESLOC wurde ein Chemilumineszenzassay verwendet, bei dem die treibende oxidative Kraft das Peroxinitrit (ONOO^-) darstellte. Bei einem Vergleich der Resultate mit dem Ausgang des Decolorisationsassays zeigten sich gewisse Parallelen, jedoch auch zahlreiche Unterschiede. Die erste Auffälligkeit lag in den Lumineszenzwerten der proteinhaltigen Proben ohne tRES (BSA und A-AOC), die deutlich über dem Signal des Kontrollansatzes (Aqua bidest.) lag (Abbildung 18). Um diese Beobachtung und auch die restlichen Resultate dieses Assays nachvollziehen zu können, müssen zunächst einige Mechanismen dargestellt werden.

Die für die Generierung eines Lumineszenzsignals erforderliche Radikalisierung des Luminols erfolgte über ein mehrschrittige Reaktion¹⁹⁴. Die Versuchsansätze enthielten Bicarbonat, welches in einer ersten Reaktion ONOO^- zu einem Peroxinitritcarbonat-Intermediat umwandelt:



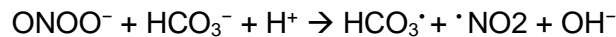
Diese Intermediat reagiert in einem zweiten Schritt mit dem Luminol (LH^-) unter Erzeugung eines Luminolradikals ($\text{L}^{\bullet-}$) und eines Superoxidanions ($\text{O}_2^{\bullet-}$):



Erst in einem weiteren, finalen Schritt reagiert das Luminolradikal mit $\text{O}_2^{\bullet-}$ zu einem Luminolendoperoxid, welches dann zum Aminophatalat zerfällt. Bei diesem Schritt entsteht das erwünschte Chemilumineszenzsignal.



Zwischen Bicarbonat und Peroxynitrit findet eine zusätzliche, in diesem Zusammenhang relevante Reaktion statt, die ein Bicarbonatradikal hervorbringt:



Bei Betrachtung der Reaktionsgleichungen fallen die Superoxidanionen und Bicarbonatradikale als hochreaktive Spezies auf, die imstande sind, die Formation von Proteinradikalen am Albumin hervorzurufen^{194,195}. Dabei ist vor allem die Ausbildung von Peroxylradikalen (POO[•]) bedenklich, da diese Radikalkettenreaktionen induzieren können, was in einer Vervielfachung der Radikale über die gesamte Proteinstruktur resultiert¹⁹⁵. Die Proteinradikale können sich an den radikalisierenden Prozessen des Luminols beteiligen. Dieser Effekt könnte durch die vergrößerte Oberfläche, die freies BSA und A-AOC bieten, verstärkt werden, da dadurch die umgesetzte Luminolmenge nochmal gesteigert werden kann. Die Entstehung von Proteinradikalen und die oben vorgestellten Mechanismen liefern somit eine mögliche Erklärung für den amplifizierenden Effekt der proteinhaltigen Proben auf das Chemilumineszenzsignal des Luminols.

Die zweite Auffälligkeit in den Ergebnissen des Chemilumineszenzassay stellte die Differenz zwischen dem Lumineszenzsignal der BSA- und A-AOC-Proben dar. Der A-AOC-Ansatz lieferte nämlich signifikant niedrigere Lumineszenzwerte als das native BSA. Im Gegensatz zum ABTS basierten Assay scheint es so, als würde die Struktur des Proteins in diesem Szenario einen Einfluss auf die antioxidative Kapazität nehmen. Wie in 4.3.1 bereits angeführt, kann die aus der Entfaltung des Proteins folgende Exposition der hydrophoben Domänen zur antioxidativen Kapazität des Albumins beitragen. Denn, wie in zahlreichen Publikationen bereits demonstriert, scheinen hydrophobe Aminosäuren (z.B. Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin) über eine höhere Radikalfänger-Effizienz zu verfügen als restliche Aminosäuren¹⁸⁸⁻¹⁹¹. Durch die Denaturierungsprozesse können diese an der Oberfläche effizienter als Radikalfänger agieren. Die hydrophoben Aminosäuren des entfalteten Albumins könnten so die Radikalintermediate der Luminol-Reaktionskaskade neutralisieren und somit die Luminolradikalisierung beeinträchtigen.

Da die strukturellen Eigenschaften des Albumins im Chemilumineszenzassay einen Beitrag zur antioxidativen Aktivität zu leisten scheinen, widmete man sich der Untersuchung einer Eigenschaft, die bisher unerwähnt blieb: die Thiolgruppen des Proteins. Die Thiolgruppen stellen eine der primären Waffen des Albumins im Kampf gegen oxidativen Stress dar. Daher gab der signifikante Unterschied zwischen A-AOC und BSA Anlass, den Einfluss der Denaturierung auf den Zustand der Disulfidbrücken zu untersuchen. Die Untersuchungen mit dem mBBR-Reagenz offenbarten eine signifikante Steigerung der detektierbaren, freien Thiolgruppen an der A-AOC-Oberfläche (Abbildung 23), so dass den A-AOC ein Vielfaches mehr an Thiolgruppen zur Verfügung steht als dem freien BSA.

In der Literatur wird über den Effekt der Hochdruckhomogenisierung auf die Disulfidbrücken berichtet. Durch die eingesetzten Drücke konnte ein Aufbrechen der Disulfidbrücken, eine Zunahme der Thiolgruppen und eine Denaturierung des Proteins beobachtet werden. In den Studien wird darüber hinaus über eine Restrukturierung der Proteine unter erneuter Ausbildung von Disulfidbrücken berichtet^{158,186,196}.

Im Falle der A-AOC scheinen die neu formierten Thiolgruppen erhalten zu bleiben. Der entscheidende Unterschied liegt darin, dass in der Literatur von freien Proteinen berichtet wird. Bei den Partikeln wird das denaturierte Protein in seiner aktuellen Konformation thermodynamisch an der PFD-Grenzfläche fixiert, so dass die oben beschriebenen Prozesse der Restrukturierung womöglich nicht stattfinden können.

Die Erkenntnis, dass den Partikeln eine größere Zahl an Sulfhydrylgruppen zur Verfügung steht, hat folgende Auswirkung auf das Chemilumineszenzassay:

Thiolgruppen besitzen die Fähigkeit unter Ausbildung von Sulfensäure als Fänger von Peroxinitrit zu agieren^{194,197,198}. Das Peroxinitrit kann somit nicht mehr zur Radikalisierung des Luminols beitragen. Je höher die Zahl der Sulfhydrylgruppen, desto mehr Peroxinitrit kann neutralisiert werden, wodurch sich die Differenz zwischen A-AOC und BSA ergibt.

Eine Gemeinsamkeit zwischen dem ABTS-Decolorisationsassay und dem Luminolassay stellt die Wirkung des tRES auf die antioxidative Aktivität des BSA und der A-AOC dar. Denn auch im Falle des Luminolassays ereignete sich für BSA und A-AOC eine signifikante Steigerung ihrer antioxidativen Kapazität, wenn sie im Komplex mit tRES vorlagen.

Diesen Effekt könnte das tRES über zwei Mechanismen entfalten:

1. Als primäres Antioxidans wirkt tRES als effektiver Radikalfänger der Superoxidanionen und des Bicarbonatradikals¹⁸². Zusätzlich ist tRES in der Lage Peroxinitrit unter Ausbildung eines Nitro-Resveratrol-Derivats zu neutralisieren¹⁹⁹.
2. *Trans*-Resveratrol besitzt das Potential als ein sekundäres Antioxidans zu agieren. Im Kontext des Chemilumineszenzassay wäre es somit imstande Proteinradikalkettenreaktionen zu unterbrechen und antioxidative Strukturen des Albumins zu regenerieren^{182,200,201}. Letzteres spielt vor allem für die A-AOC aufgrund ihrer exponierten, hydrophoben Aminosäuren eine übergeordnete Rolle.

Durch diese Prozesse wäre tRES nicht nur imstande, die Konzentration der ROS und RNS (reaktive Stickstoffspezies) im Ansatz zu reduzieren, sondern auch die eigene Abwehr der A-AOC zu verstärken und die schädlichen Prozesse durch Proteinradikale zu reduzieren. Eine vollständige Eindämmung des Proteinradikal-Effekts scheint jedoch nicht möglich zu sein, was die besonders niedrigen Werte für den reinen tRES-Ansatz vor Augen führen (Abbildung 18). Die Proteinradikale scheinen demnach einen erheblichen Anteil an der Luminolradikalisierung zu leisten.

Bei einem Vergleich der Protein-tRES-Komplexe offenbarte sich ein signifikant niedrigeres Lumineszenzsignal und somit eine antioxidative Überlegenheit der RESLOC gegenüber BSA-tRES. Die Unterschiede zwischen BSA-tRES und RESLOC können zum einen durch die erhöhte antioxidative Kapazität des Albumins an der A-AOC-Hülle erläutert werden (s. oben). Zum anderen können die Besonderheiten der Interaktion zwischen Proteinhülle der A-AOC und des tRES als Erklärung verwendet werden, die in 4.3.1 bereits aufgeführt wurden. Die fehlende Maskierung des Polyphenols und die sich daraus ergebende höhere Zahl freier Hydroxylgruppen, könnte das mit A-AOC assoziierte tRES zu einem effizienteren Radikalfänger sowie sekundärem Antioxidans machen und dadurch eine erhöhte Reduktion der Luminolradikalisierung herbeiführen. Zusätzlich könnte ein noch unerwähnter Mechanismus im Chemilumineszenz-Assay von Relevanz sein. Denn tRES-Radikale, die sich aus der Interaktion mit ROS ergeben, sind imstande, Dimere auszubilden^{79,167}. So könnten die tRES-Radikale, die aus einer Reaktion mit Proteinradikalen hervorgehen, eine Dimerisierung durchlaufen und potenziell folgende Radikalreaktionen terminieren. Dieser Mechanismus kann im Falle des freigesetzten tRES aus den BSA-tRES- und RESLOC-Komplexen auftreten. Die Akkumulation an der hydrophoben Grenzphase der A-AOC und die resultierende lokale Aufkonzentrierung des tRES könnte eine fördernde Wirkung auf die Dimerbildung und Terminierung von Radikalkettenreaktionen entfalten. Tatsächlich wurde von einem derartigen Effekt in einem liposomalen System berichtet, in dem tRES an der Lipid-Wasser-Grenzphase akkumulierte und erfolgreich Lipidperoxidationsprozesse durch verstärkte Dimerbildung unterband¹⁶⁷. Das Zusammenspiel der fehlenden Maskierung und die fördernde Wirkung auf die tRES-Dimerisierung im partikulären System, liefern eine theoretische Grundlage für die zwischen BSA-tRES und RESLOC vorliegenden Differenzen im Chemilumineszenzassay.

4.3.3 GOx-Exposition der HL-1-Kardiomyozyten

Als finales Assay zur Evaluierung der antioxidativen Eigenschaften der RESLOC bediente man sich eines zellulären Szenarios, bei dem HL-1-Zellen durch das von der GOx produzierte H₂O₂ oxidativem Stress ausgesetzt wurden. Im Gegensatz zu den rein chemischen Versuchen, die in denen kontrolliert reaktive Spezies erzeugt wurden, stellt das zelluläre Assay aus folgenden Gründen eine komplexere und unkontrollierbare Vorgehensweise dar: Das H₂O₂ ist membranpermeabel und vermittelt seine oxidativen Schäden primär über die Formation von Hydroxylradikalen^{202,203}. Zusätzlich wird vermutet, dass durch die von Catalase katalysierte Umwandlung des H₂O₂ das intrazelluläre O₂ stark ansteigt und somit die zelleigene Superoxid-Produktion steigert^{203,204}. Eine intrazellulär gesteigerte ROS-Konzentration führt zu oxidativen Schäden und Radikalisierung von Strukturen, wie Lipiden (Lipidperoxidation) und Proteine. Wie für das Albumin bereits in 4.3.2 geschildert wurde, neigen auch Lipidstrukturen der Zellmembranen zu Radikalkettenreaktionen²⁰⁵. Somit führen oxidative Schäden an zellulären Komponenten nicht nur zu einer Beeinträchtigung ihrer Funktionalität, sondern auch zu einer

Amplifikation des oxidativen Stresses, was in Zelltod resultieren kann^{205,206}. Auch extrazellulär können sich Hydroxylradikale bilden, die aus Reaktionen zwischen eisenhaltigem Serum und H₂O₂ entstehen, und sich an oxidativen Prozessen beteiligen können²⁰⁷. Diese können ebenfalls aufgrund ihrer Membranpermeabilität oxidative Schäden intrazellulär oder extrazellulär an der Zellmembran und anderen Bestandteilen des Zellkulturmediums vermitteln²⁰⁷.

Zellen, die während der GOx-Exposition mit RESLOC behandelt wurden, zeigten die geringste intrazelluläre Fluoreszenz (Abbildung 25). RESLOC scheinen somit von allen eingesetzten Komponenten der Oxidierung des Fluorophors und dem intrazellulären oxidativen Schaden am effizientesten entgegenwirken zu können. Da jedoch zwischen einer BSA und A-AOC-Behandlung keine signifikanten Unterschiede vorliegen, scheinen die strukturellen Unterschiede zwischen dem freien BSA und dem Albumin der Partikelhülle keinen Beitrag zur antioxidativen Kapazität zu leisten, wie es beim Chemilumineszenzassay der Fall war. Nach Abschluss des Versuches konnte stets eine Schicht sedimentierter Partikel am Boden der Zellkulturfläche beobachtet werden. Im Vergleich zu den restlichen Experimenten waren die A-AOC einer erhöhten Temperatur von 37 °C und über einen längeren Zeitraum statischen Bedingungen ausgesetzt, was die Agglomeration und Sedimentation der Partikel erheblich beschleunigt. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass die Bestandteile des Zellkulturmediums das Zeta-Potential der A-AOC herabsetzen und so die Flokkulation der Partikel verstärken. Bestandteile des fetalen Kälberserums können auch eine zusätzliche Corona um die Partikelhülle ausbilden, die interpartikuläre Interaktionen und somit die agglomerierenden Prozesse fördern^{208,209}. Die Ausbildung von Partikelagglomeraten könnte die Gesamtoberfläche der Partikelphase, die mit der äußeren Phase in Interaktion treten kann, stark reduzieren, was vor allem die Wirkung der A-AOC auf die extrazelluläre Radikale beeinträchtigen würde. Dieses Phänomen könnte geringe Differenz zwischen BSA und A-AOC-Behandlung erklären.

Interessanterweise zeigten RESLOC ein signifikant niedrigeres Fluoreszenzsignal und dadurch eine höhere antioxidative Aktivität als das BSA-tRES-System. In beiden Systemen ist ein starker Anstieg der tRES-Freisetzung bei erhöhter Temperatur zu beobachten. Das freigesetzte tRES kann mit extra- und intrazellulären Radikalen in Interaktion treten, was auch die Unterschiede zwischen BSA und BSA-tRES erklären könnte. Da jedoch RESLOC und BSA-tRES in beiden Fällen eine nahezu identische Menge an tRES freisetzen (Abbildung 12), scheint dieser Faktor nicht zu den Unterschieden zwischen beiden Ansätzen zu führen.

Womöglich liegt die Ursache wieder in der Besonderheit der Interaktion zwischen Proteinhülle und tRES, die sich aus der Entfaltung des Proteins und Bindungstasche ergibt und oben bereits diskutiert wurde. Die fehlende Maskierung und geförderte Dimerisierung des tRES an der Partikelhülle, die vorallem im Zusammenhang mit der Lipidperoxidation relevant wäre,

ermöglicht wahrscheinlich eine effizientere Interaktion und Neutralisierung der extrazellulären Radikale, wodurch indirekt der intrazelluläre Stress gesenkt wird.

Das Fehlen einer cIcaspase3- Akkumulation deutet darauf hin, dass der beobachtete Verlust der Zelladhäsion nicht durch apoptotische Prozesse (Abbildung 34), sondern durch eine andere Form des Zelltods verursacht wurde. Eine Analyse entsprechender Marker könnte Aufschluss über die vorliegenden Zelltodprozesse geben, wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt.

Im Gegensatz zu den rein chemischen Assays zeichnet der zelluläre Versuch ein etwas diffuseres Bild und die Unterschiede zwischen BSA, BSA-tRES sowie tRES allein sind aufgrund hoher Standardabweichungen nicht eindeutig. Zum einen könnte sich das durch das komplexere Zellkulturszenario ergeben. Zum anderen ist das Fluorophor zur Visualisierung oxidativer Prozesse zwar ideal zur Gewinnung eines ersten Eindrucks, besitzt jedoch zahlreiche Limitationen (z.B. unspezifische Reaktionen und Einfluss durch pH)²¹⁰, die das Fluoreszenzsignal beeinflussen, so dass die Resultate des zellulären Assays mit einer gewissen Vorsicht betrachtet werden sollten. Der Einsatz komplementierender Assays, wie der Quantifizierung der Lipidperoxidation und des GSH-Gehalts können wertvolle Informationen zu den antioxidativen Kapazitäten und ein vollständigeres Bild des zellulären Zustandes nach GOx-Exposition liefern.

4.4 *In vitro* Ischämie-Reperfusionmodell

Im Zuge dieser Arbeit erfolgte die Etablierung eines *in vitro* I/R-Modells, welches als Versuchsplattform für A-AOC und RESLOC dienen sollte, um deren Funktionalität in dem komplexen, klinisch relevanten Szenario der Organkonservierung zu untersuchen. Denn I/R-Schäden stellen immer noch eine unvermeidbare Konsequenz der Organtransplantation dar und die Sauerstoffversorgung der Transplantate während der Konservierung ist mit zahlreichen Schwierigkeiten verbunden. Das Zellkulturmodell soll demnach zur Untersuchung des Potentials der A-AOC und RESLOC in der Minimierung des ischämischen Schadens und die generierten Ergebnisse als präliminäre Daten sowie als Fundament komplexerer *in vivo* und *ex vivo*- Folgeexperimente dienen.

Die Sauerstoffversorgung durch die A-AOC wurde mit einem im Zuge dieser Arbeit etablierten Insert-Zellkulturmodell untersucht. Zusätzlich wurde das auserwählte I/R-Protokoll anhand verschiedener Zellschädigungsparameter evaluiert. Abschließend wurden die Auswirkungen der oxygenierten RESLOC auf I/R-Schäden ermittelt.

4.4.1 Sauerstoffversorgung der HL-1-Kardiomyozyten im Insertmodell

Eine adäquate O₂-Versorgung der Zellen wurde anhand des Proteins HIF-1 α beurteilt. Die in Abbildung 28 dargestellte WB-Analyse zeigte nach Gabe von oxygeniertem mKHP und A-AOC eine Destabilisierung des HIF-1 α innerhalb der ersten 10 min. Beide Proben scheinen

imstande zu sein, die Zellen im Insert mit ausreichend O₂ zu versorgen und den hypoxischen Zuständen der Hypoxiekammer entgegenzuwirken. Bei Betrachtung der PreSens-Daten (Abbildung 27) zeigte sich auch, dass beide oxygenierten Komponenten zu ähnlichen O₂-Partialdrücken im Inneren des Inserts führen, was das ähnliche Bild bei der HIF-1 α -Akkumulation bestätigen würde.

Die Werte für 30 min nach Gabe hingegen stehen im scharfen Kontrast hierzu. Die Partialdrücke sind in beiden Fällen stark gesunken, jedoch liegen die Werte der Partikel signifikant höher als die des mKHP (Abbildung 27). Diese Unterschiede in den O₂-Partialdrücken nehmen auch Einfluss auf die HIF-1 α -Akkumulation: Die von den Partikeln erzeugten O₂-Partialdrücke reichen über die gesamte Versuchsdauer von 30 min aus, um eine HIF-1 α -Akkumulation zu unterbinden, während die O₂-Versorgung durch oxygeniertes mKHP ab einem gewissen Punkt nicht mehr zur HIF-1 α -Destabilisierung genügt. Wie im Einleitungsteil (s. 1.2) bereits geschildert, verleihen schwache intermolekulare Interaktionen zwischen PFC-Molekülen dem PFD der A-AOC eine geringe Kohäsität und ein gasähnliches Verhalten, wodurch das Fluid große Gasmengen lösen kann^{11,12}. Dem gegenüber stehen Puffer und Medien auf Wasserbasis, die aufgrund von Wasserstoffbrücken einen hohen strukturellen Ordnungsgrad aufweisen. Das Lösen von Gasen in diesem dichten Molekülgeflecht ist energetisch aufwändig, was die Gaslöslichkeit des Wassers und die Retentionszeit des Gases drastisch herabsetzt^{11,12}.

Diese Unterschiede in der Gaslöslichkeit erlauben den PFD-haltigen A-AOC größere Mengen an O₂ aufzunehmen und über die gesamte Zeitspanne die Zellen ausreichend zu oxygenieren, wohingegen das wässrige mKHP aufgrund seiner geringen Gaslöslichkeit und -retention lediglich in den ersten 10 min ausreichend O₂ zur Verfügung stellen kann.

4.4.2 Evaluierung der I/R-Schäden der HL-1-Zellen

Inwieweit das verwendete Protokoll imstande ist I/R-Schäden in der Zellkultur zu induzieren, wurde anhand des oxidativen Stresses, der Cytotoxizität und apoptotischer Marker beurteilt. Wie in der Einleitung bereits ausführlich geschildert, ruft eine hypoxische Phase Veränderungen im Ionenhaushalt und Metabolismus der Zelle aus, die zu erhöhtem oxidativem Stress führen kann (Ausfall von Protonenpumpen, Aktivität membranständiger NADPH- und cytosolische Xanthineoxidasen). Die für die Ischämie auserwählten Bedingungen scheinen genau das zu bewirken, da nach der hypoxischen Phase der I/R-Behandlung ein signifikanter Anstieg des intrazellulären oxidativen Stresses, visualisiert durch das Fluorophor DCF-DA, zu registrieren ist (Abbildung 29). Die leichte Erhöhung der LDH-Werte und die geringfügige Akkumulation der cCaspase 3 deuten auf geringes Ausmaß an permanenten Zellschäden während der Ischämie hin, was im Einklang mit der Literatur ist²¹¹.

Erst die Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung durch die Reperfusion und die sich daraus ergebende Verstärkung der oxidativen Prozesse (sog. *oxidative burst*)²¹² führte zu

nennenswerten Änderungen in der Cytotoxizität und apoptotischen Prozessen (Abbildung 29). Zum einen ergab sich eine massive Steigerung der LDH-Menge, die im extrazellulären Raum detektiert werden konnte. Die prooxidativen Prozesse der Ischämie und der *oxidative burst* durch die Reperfusion führt zu oxidativen Schäden an Membranstrukturen. Mechanismen, wie die Lipidperoxidation, beeinträchtigen die Membranintegrität der Zellmembran, was zu der beobachteten Freisetzung des cytosolischen LDH führen kann^{146,213}.

Auch die mitochondriale Membran ist von den oxidativen Schäden betroffen, was in einer erhöhten Freisetzung vom Apoptoseinitiator Cytochrom c ins Cytosol resultiert²¹¹. Dort löst das Cytochrom c eine apoptotische Kaskade aus, die in der proteolytischen Prozessierung der Caspase 3 mündet. Diese ist an charakteristischen Prozessen der Apoptose (z.B. DNA-Fragmentierung, Zerfall der Membranen und Kompartimenten sowie Formation von *apoptotic bodies*) beteiligt²¹². Die Reperfusion ist demnach imstande die Apoptose auszulösen und zu verstärken^{146,211}. Dies deckt sich auch mit der Zunahme der cIcaspase3-Akkumulation, die in der WB-Analyse beobachtet werden konnte (Abbildung 29). Eine Zunahme der Zelltodrate wird auch unweigerlich zu einer Reduktion der zur Adhäsion befähigten Zellen führen, die mit den Waschschritten aus dem Ansatz eliminiert werden können. Dieses Phänomen könnte den Rückgang der Fluoreszenzintensität bei 60 min Reperfusion (Abbildung 29) erläutern, da auch zum selben Zeitpunkt die apoptotischen Prozesse ihren Höhepunkt im Versuch erreichten.

Anhand der durchgeführten Assays kann mit Sicherheit gesagt werden, dass das gewählte I/R-Protokoll in der Lage ist für Ischämie/Reperfusion typische Zellschäden in Form von oxidativem Stress, Cytotoxizität und daraus folgendem Zelltod (Apoptose) hervorzurufen.

4.4.3 Einsatz oxygenierter A-AOC in der *in vitro* I/R-Simulation

Um zu untersuchen, ob oxygenierte A-AOC als alleinige O₂-Quelle imstande sind das Auftreten eines hypoxischen Metabolismus und daraus folgende Zellschäden zu unterbinden, wurden die Zellen während der dreistündigen ischämischen Periode des Versuches mit oxygenierten A-AOC behandelt.

Trotz der Differenzen in ihrer Sauerstoffversorgung führten sowohl die oxygenierten A-AOC als auch der mKHP zu einer signifikanten Reduktion der Cytotoxizität und der Apoptoserate, die durch die I/R-Simulation verursacht wurde (Abbildung 30). Beide Ansätze scheinen die Kardiomyozyten mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen, so dass in den Zellen keine ischämischen Prozesse sich verfestigen können, die in der Reperfusion zu den cytotoxischen und apoptotischen Vorgängen führen. Obwohl der O₂-Partialdruck des mKHP nach Zugabe rasch abfiel, trug der Austausch der oxygenierten Phase allem Anschein nach auch hier dazu bei, dass ein aerober Metabolismus aufrechterhalten werden konnte. Einen Hinweis liefert die HIF-1 α -Akkumulation, die auch bei mKHP erst 30 min nach Gabe stattfand (Abbildung 28). Zusätzlich werden die meisten Gewebe in der klassischen Zellkultur im Vergleich zu ihren

Gegenständen *in vivo* unter hyperoxischen Bedingungen kultiviert²¹⁴. Kardiomyozyten sind im Körper einem O₂-Partialdruck von 5% (~49,5 hPa) ausgesetzt²¹⁵. Der durch Gabe von oxygenierten mKHP und A-AOC erreichte Partialdruck nach 10 min bewegte sich in diesem Bereich (Abbildung 27) und schien, gemeinsam mit dem regelmäßigen Austausch der oxygenierten Phase, die Zellschäden durch I/R effektiv zu verhindern.

Das hier vorgestellte Zellkulturmodell offenbarte das Potential oxygenierter A-AOC der MOK-Synthese, Zellschäden durch eine I/R-Simulation abzuwenden und die Zellen mit ausreichend O₂ zu versorgen, ohne selbst noxische Prozesse in Gang zu setzen. Um eine Überlegenheit der A-AOC gegenüber eines oxygenierten Mediums demonstrieren zu können, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit der Aufbau eines komplexeren Systems vonnöten, wie von unserer Arbeitsgruppe bereits am Beispiel isoliert perfundierter Organsysteme demonstriert werden konnte^{124,125}. Dennoch erlaubt das Insert-Modell eine spatiale Trennung von Zelle und Partikel und eröffnet so zahlreiche molekularbiologische Analysen, die zuvor durch sedimentierende A-AOC erschwert wurden. Aufgrund der simplen Handhabung und Flexibilität kann das aktuelle Modell zur Gewinnung erster Erkenntnisse zu neuartigen A-AOC-Formulierungen und -Synthesarten hinsichtlich ihrer Funktionalität in einem *in vitro* System genutzt werden.

5. Fazit

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen führen eindrücklich vor Augen, dass die Albuminhülle der A-AOC eine fördernde Wirkung auf die antioxidative Aktivität des Stilbens tRES entfaltet. Dieser Effekt der A-AOC-Proteinhülle wird dabei zum einen durch eine erhöhte Löslichkeit und daraus folgende homogenere Verteilung des hydrophoben tRES in wässrigen Systemen vermittelt. Darüber hinaus offenbarten Analysen der Proteinhülle strukturelle Besonderheiten der Albuminhülle, welche die antioxidativen Eigenschaften des tRES primär durch eine Abschwächung eines Maskierungseffektes zusätzlich verstärkten und die theoretische Grundlage für die signifikanten Differenzen zwischen den RESLOC und dem BSA-tRES-System lieferten.

Die umfassende Untersuchung der A-AOC-tRES-Interaktion wurde erst durch die Entwicklung der neuartigen MOK-Synthese ermöglicht. Die Verwendung eines Druckgradienten und einer Zyklisierung des Syntheseansatzes resultierten im Vergleich zur klassischen Standardsynthese in kleineren Partikeln und einer nahezu transparenten Lösung, die den Einsatz optischer Analysen ermöglichte. Die Charakterisierung der MOK-Synthese offenbarte eine überraschende Erhöhung des Zeta-Potentials der A-AOC durch tRES-Interaktion, die zu einer signifikanten Reduktion der Viskosität bei niedrigen Scherraten führte und womöglich imstande ist, die Stabilität der Emulsion anzuheben.

Abschließend konnte im Zuge dieser Arbeit eine *in vitro*-Simulation eines I/R-Szenarios erfolgreich etabliert werden, anhand dessen die protektive Wirkung oxygenierter A-AOC hinsichtlich Reperfusionsschäden demonstriert werden konnte.

6. Ausblick

Die Entwicklung eines neuen Syntheseprotokolls mit einem Druckgradienten und einer Zyklisierung der Emulsion führte zu der MOK-Synthese, die eine optimierte Form der klassischen Standardsynthese darstellte. Trotz der verbesserten Eigenschaften, wie kleinere Partikel und optische Transparenz, deuteten vor allem die PDI-Werte auf ein *overprocessing* der MOK-Synthese hin. Eine Optimierung des Syntheseprotokolls durch Anpassung der angewandten Drücke und damit des Energieeintrags sowie der Zyklenzahl kann ein *overprocessing* vermeiden und womöglich in einer stabileren Emulsion mit noch kleineren Partikeln und einem niedrigeren PDI resultieren.

Die überraschende Wirkung des tRES auf das Zeta-Potential eröffnet eine bisher nicht in Betracht gezogene Möglichkeit, Einfluss auf die A-AOC-Emulsion zu nehmen. Bei der Entwicklung neuer Formulierungen der A-AOC können Interaktionspartner des Albumins in erwogen werden, um eine fördernde Wirkung auf Parameter der Emulsion zu nehmen und so ihre Stabilität zu erhöhen.

Dank der unterschiedlichen Natur der angewandten antioxidativen Assays konnte eine vielseitige Radikalfängeraktivität und hohe antioxidative Kapazität der RESLOC gegenüber einer Vielzahl prooxidativer Faktoren demonstriert werden. Der konsequente Schritt wäre die Anwendung der RESLOC in der in dieser Arbeit etablierten *in vitro* I/R-Simulation, um die Wirkung in einem klinischen Szenario zu untersuchen. Der Einsatz von RESLOC und die Untersuchung ihrer Wirkung auf die oxidativen Prozesse des I/R-Szenarios war aufgrund zeitlicher Limitationen nicht möglich. In anderen Studien konnte bereits demonstriert werden, dass die Verwendung von tRES in der Ischämie und der Reperfusion zu einer Reduktion der Cytotoxizität führt. Zusätzlich wurde von fördernden Effekten auf endogene antioxidative Mechanismen der Zelle (z.B. Aktivierung der Superoxid-Dismutase) und von einer inhibierenden Wirkung auf NADPH-Oxidasen berichtet^{126,127}. Zur Beobachtung der letzteren Effekte ist jedoch eine längere Behandlungsdauer vonnöten²¹⁶, was mit dem aktuellen Versuchsaufbau nicht effizient realisierbar wäre. Optimal wäre die Etablierung einer *in vitro*-Mikroperfusionsanlage, auch als *Organ on a Chip* bezeichnet. Diese Plattform erlaubt eine kontrollierte Oxygenierung des Perfusionssystems und verhindert durch einen Flüssigkeitsfluss die Sedimentation der A-AOC, was längere Behandlungsdauern ermöglicht. Das *Organ on a Chip*-Modell wäre zusätzlich näher an den Perfusionssystemen, die in der Klinik eingesetzt werden²¹⁷. Sollten diese Ansätze zu vielversprechenden Resultaten führen, wären finale Experimente in *ex vivo*-Organperfusionen ideal, um mögliche protektive Wirkung der RESLOC auf explantierte Organe während der Konservierungsperiode zu untersuchen.

7. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit widmete sich der Untersuchung einer potenziellen strukturellen und funktionellen Interaktion zwischen der Albuminhülle der A-AOC und des Stilbens *trans*-Resveratrol (tRES). *Trans*-Resveratrol stellt ein facettenreiches Molekül mit zahlreichen Effekten dar. Jedoch zeichnet sich tRES auch durch eine hohe Hydrophobizität aus, was in einer geringen Löslichkeit in einem wässrigen Milieu resultiert und dadurch vor allem die *in vivo* einsetzbaren Konzentrationen stark einschränkt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass die tRES-Löslichkeit durch die in einem A-AOC-Ansatz vorliegende Proteinkonzentration drastisch gesteigert werden konnte. Zusätzlich konnte im Falle des A-AOC-tRES-Komplexes (RESLOC) ein erhöhtes Zeta-Potential festgestellt werden, was ein zusätzliches Indiz für eine Assoziation des tRES an der Albuminhülle der A-AOC war. Zudem offenbarte sich bei rheologischen Analysen im niedrigen Scherratenbereich eine signifikant reduzierte Viskosität der Emulsion in Anwesenheit von tRES, was ein Zusammenspiel zwischen den erhöhten repulsiven Kräften der RESLOC und der ermittelten Viskosität andeutete.

Neben einer erhöhten Löslichkeit und damit homogeneren Verteilung, nahm die Interaktion mit den A-AOC auch Einfluss auf funktionelle Aspekte des tRES. Eine der prominentesten Eigenschaften des tRES stellt seine antioxidative Aktivität dar. Mithilfe drei verschiedener Assays konnte demonstriert werden, dass die antioxidative Kapazität des tRES, wenn es assoziiert mit der Albuminhülle vorlag, drastisch gesteigert werden konnte. Anhand der unterschiedlichen Natur der einzelnen Assays konnte die antioxidative Aktivität des tRES und der RESLOC aus mehreren Blickwinkeln beleuchtet werden. Zum einen zeigte tRES im RESLOC-Komplex eine erhöhte Elektronentransferbereitschaft über den SPLET-Mechanismus. Zum anderen konnte beobachtet werden, dass tRES imstande ist, Radikalkettenreaktion am Albumin zu unterbinden und gleichzeitig als effizienter Radikalfänger für Peroxynitrit und seine Intermediate in einem Chemilumineszenzassay zu agieren. Auch in dem Zellkultur-Assay, in dem zahlreiche reaktive Spezies und oxidative Prozesse vorlagen, entfalteten die RESLOC eine bemerkenswerte antioxidative Aktivität und somit einen protektiven Effekt auf behandelte HL-1-Kardiomyozyten.

In allen Assays zeigten die RESLOC eine höhere antioxidative Kapazität als das BSA-tRES-System. Strukturelle Untersuchungen der Albuminhülle offenbarten eine starke Denaturierung des Proteins, die mit einer Entfaltung der hydrophoben Bindetaschen und einer Zunahme der Sulfhydrylgruppen einherging. Die strukturellen Veränderungen der hydrophoben Bindetaschen führten zu einer geringeren Maskierung der antioxidativen Kapazität des tRES durch die Proteininteraktion. Gleichzeitig nahm das antioxidative Potential des Albumins an der A-AOC-Hülle durch die gestiegene Zahl der Sulfhydrylgruppen und durch Denaturierung exponierte hydrophobe Domänen zu. Die Besonderheiten der Albuminstruktur an der

Proteinhülle der A-AOC und der A-AOC-tRES-Interaktion dienten als Erklärung für die beobachtete antioxidative Differenz zwischen RESLOC und BSA-tRES. Eine nahezu identische Freisetzungskinetik des assoziierten tRES im Falle beider Systeme, deutete darauf hin, dass die strukturellen Unterschiede keine Auswirkungen auf die Interaktionsstärke zwischen tRES und dem Protein hatten.

Im Zuge dieser Arbeit konnte eine *in vitro*-Simulation eines I/R-Szenarios erfolgreich etabliert werden. Das Insert-Modell sollte als Plattform für präliminäre Versuche dienen, die erste Eindrücke über die protektive Wirkung der A-AOC und RESLOC während einer Organkonservierung liefern sollte. Durch den Einsatz oxygenierter A-AOC konnte eine signifikante Reduktion der I/R-Schäden hinsichtlich Cytotoxizität und der Apoptoserate erreicht werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass A-AOC nicht nur imstande waren, die Limitationen des tRES zu überwinden, sondern auch seine positiven funktionellen Eigenschaften zu verstärken. Durch die durchgeführten Assays konnte, zum einen, eine überlegenere antioxidative Kapazität des tRES im RESLOC-System gegenüber der freien Form des Stilbens nachgewiesen werden. Zum anderen kamen auch strukturelle Besonderheiten der Albuminhülle zum Vorschein, die bisher in der AG Ferenz nicht untersucht wurden und auch in funktioneller Hinsicht für die antioxidative Aktivität der A-AOC von Bedeutung sind. Auch das etablierte Zellkulturmodell stellt eine Neuerung dar und ermöglicht die funktionelle Untersuchung neuer A-AOC-Formulierungen in einem klinikrelevanten Szenario.

8. Referenzen

1. Jahr JS, Guinn NR, Lowery DR, Shore-Lesserson L, Shander A. Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics: A Review. *Anesth Analg.* 2021;132(1):119-129. doi:10.1213/ANE.0000000000003957
2. Ferenz KB, Steinbicker AU. Artificial oxygen carriers—past, present, and future—a review of the most innovative and clinically relevant concepts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2019;369(2):300-310. doi:10.1124/jpet.118.254664
3. Cabrales P, Intaglietta M. Blood substitutes: Evolution from noncarrying to oxygen- and gas-carrying fluids. *ASAIO Journal.* 2013;59(4):337-354. doi:10.1097/MAT.0b013e318291fbaa
4. Hae WK, Greenburg AG. Artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: A selected review and current status. In: *Artificial Organs.* Vol 28. Blackwell Publishing Inc.; 2004:813-828. doi:10.1111/j.1525-1594.2004.07345.x
5. Tissot JD, Bardyn M, Sonogo G, Abonnenc M, Prudent M. The storage lesions: From past to future. *Transfusion Clinique et Biologique.* 2017;24(3):277-284. doi:10.1016/j.tracli.2017.05.012
6. Brunskill SJ, Wilkinson KL, Doree C, Trivella M, Stanworth S. Transfusion of fresher versus older red blood cells for all conditions. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2015;2015(5). doi:10.1002/14651858.CD010801.pub2
7. Nouwairi NS. The risks of blood transfusions and the shortage of supply leads to the quest for blood substitutes. *undefined.* Published online 2004.
8. Jahr JS, Walker V, Manoochehri K. Blood substitutes as pharmacotherapies in clinical practice. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2007;20(4):325-330. doi:10.1097/ACO.0b013e328172225a
9. Krafft MP, Riess JG. Highly fluorinated amphiphiles and colloidal systems, and their applications in the biomedical field. A contribution. *Biochimie.* 1998;80(5-6):489-514. doi:10.1016/S0300-9084(00)80016-4
10. Riess JG, Riess JG. Oxygen carriers (“blood substitutes”) - Raison d’etre, chemistry, and some physiology. *Chem Rev.* 2001;101(9):2797-2919. doi:10.1021/cr970143c
11. Jägers J, Wrobeln A, Ferenz KB. Perfluorocarbon-based oxygen carriers: from physics to physiology. *Pflugers Arch.* 2021;473(2):139-150. doi:10.1007/s00424-020-02482-2

12. Riess JG. Understanding the Fundamentals of Perfluorocarbons and Perfluorocarbon Emulsions Relevant to *In Vivo* Oxygen Delivery. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. 2005;33(1):47-63. doi:10.1081/BIO-200046659
13. Dalvi VH, Rossky PJ. Molecular origins of fluorocarbon hydrophobicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(31):13603-13607. doi:10.1073/pnas.0915169107
14. Smart BE. Characteristics of C-F Systems. In: *Organofluorine Chemistry*. Springer US; 1994:57-88. doi:10.1007/978-1-4899-1202-2_3
15. Riess JG. Perfluorocarbon-based Oxygen Delivery. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. 2006;34(6):567-580. doi:10.1080/10731190600973824
16. Spahn DR. Blood substitutes: Artificial oxygen carriers: Perfluorocarbon emulsions. *Crit Care*. 1999;3(5):R93. doi:10.1186/cc364
17. Faithfull NS. Oxygen delivery from fluorocarbon emulsions - aspects of convective and diffusive transport. *Biomaterials, Artificial Cells and Immobilization Biotechnology*. 1992;20(4--Feb):797-804. doi:10.3109/10731199209119721
18. Ferenz KB, Steinbicker AU. Artificial oxygen carriers—past, present, and future—a review of the most innovative and clinically relevant concepts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2019;369(2):300-310. doi:10.1124/jpet.118.254664
19. CABRALES P, VÁZQUEZ BYS, NEGRETE AC, INTAGLIETTA M. Perfluorocarbons as gas transporters for O₂, NO, CO and volatile anesthetics. *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine*. 2007;9(4):294-303. doi:10.1111/j.1778-428X.2007.00085.x
20. Mayer D, Ferenz KB. Perfluorocarbons for the treatment of decompression illness: how to bridge the gap between theory and practice. *Eur J Appl Physiol*. 2019;119(11-12):2421-2433. doi:10.1007/s00421-019-04252-0
21. McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*. 2012;8(6):1719-1729. doi:10.1039/c2sm06903b
22. Koh KS, Wong VL, Koh KS, Wong VL. *Nanoemulsions - Properties, Fabrications and Applications*. IntechOpen; 2019. doi:10.5772/intechopen.78812
23. Kale SN, Deore SL. Emulsion micro emulsion and nano emulsion: A review. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2016;8(1):39-47. doi:10.5530/srp.2017.1.8
24. Gadhave AD, Ashish D, Gadhave* et al Nanoemulsions: Formation, Stability and Applications.

25. Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004;108-109:303-318. doi:10.1016/j.cis.2003.10.023
26. Fryd MM, Mason TG. Advanced nanoemulsions. *Annu Rev Phys Chem.* 2012;63:493-518. doi:10.1146/annurev-physchem-032210-103436
27. Yoon JK, Burgess DJ. Comparison of dynamic and static interfacial tension at aqueous/perfluorocarbon interfaces. *J Colloid Interface Sci.* 1992;151(2):402-409. doi:10.1016/0021-9797(92)90489-9
28. Bąk A, Pilarek M, Podgórska W, Markowska-Radomska A, Hubacz R. Surface properties of perfluorodecalin-containing liquid/liquid systems: The influence of Pluronic F-68 dissolved in the aqueous phase. *J Fluor Chem.* 2018;215:36-43. doi:10.1016/j.jfluchem.2018.09.002
29. Freire MG, Carvalho PJ, Queimada AJ, Marrucho IM, Coutinho JAP. Surface tension of liquid fluorocompounds. *J Chem Eng Data.* 2006;51(5):1820-1824. doi:10.1021/je060199g
30. Norde W. Biocolloids and biosurfaces energy and entropy of protein adsorption. *J Dispers Sci Technol.* 1992;13(4):363-377. doi:10.1080/01932699208943322
31. Marrucci G. A theory of coalescence. *Chem Eng Sci.* 1969;24(6):975-985. doi:10.1016/0009-2509(69)87006-5
32. Voorhees PW. The theory of Ostwald ripening. *J Stat Phys.* 1985;38(1-2):231-252. doi:10.1007/BF01017860
33. Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Nano-emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2005;10(3-4):102-110. doi:10.1016/j.cocis.2005.06.004
34. Marhamati M, Ranjbar G, Rezaie M. Effects of emulsifiers on the physicochemical stability of Oil-in-water Nanoemulsions: A critical review. *J Mol Liq.* 2021;340. doi:10.1016/j.molliq.2021.117218
35. Kourniatis LR, Spinelli LS, Piombini CR, Mansur CRE. Formation of orange oil-in-water nanoemulsions using nonionic surfactant mixtures by high pressure homogenizer. *Colloid Journal.* 2010;72(3):396-402. doi:10.1134/S1061933X10030130
36. HAQUE ZA, KINSELLA JOE. Emulsifying Properties of Food Proteins: Bovine Serum Albumin. *J Food Sci.* 1988;53(2):416-420. doi:10.1111/j.1365-2621.1988.tb07719.x
37. Dichiarante V, Milani R, Mentrangolo P. Natural surfactants towards a more sustainable fluorine chemistry. *Green Chemistry.* 2018;20(1):13-27. doi:10.1039/c7gc03081a

38. Guo X, Chen M, Li Y, et al. Modification of food macromolecules using dynamic high pressure microfluidization: A review. *Trends Food Sci Technol.* 2020;100:223-234. doi:10.1016/j.tifs.2020.04.004
39. Tadros TF. 8. Preparation of nanoemulsion using high pressure homogenizers. In: *Nanodispersions*. De Gruyter; 2015:189-216. doi:10.1515/9783110290349-009
40. Bisten A, Schuchmann H. Optical Measuring Methods for the Investigation of High-Pressure Homogenisation. *Processes.* 2016;4(4):41. doi:10.3390/pr4040041
41. Levy R, Okun Z, Shpigelman A. High-Pressure Homogenization: Principles and Applications Beyond Microbial Inactivation. *Food Engineering Reviews.* 2021;13(3):490-508. doi:10.1007/s12393-020-09239-8
42. Hidajat MJ, Jo W, Kim H, Noh J. Effective Droplet Size Reduction and Excellent Stability of Limonene Nanoemulsion Formed by High-Pressure Homogenizer. *Colloids and Interfaces.* 2020;4(1):5. doi:10.3390/colloids4010005
43. Grumbach C, Krüger V, Czermak P. A New Control Strategy for High-Pressure Homogenization to Improve the Safety of Injectable Lipid Emulsions. *Pharmaceutics.* 2022;14(8):1603. doi:10.3390/pharmaceutics14081603
44. Carter DC, Ho JX. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem.* 1994;45(C):153-176. doi:10.1016/S0065-3233(08)60640-3
45. Day L, Zhai J, Xu M, Jones NC, Hoffmann S v., Wooster TJ. Conformational changes of globular proteins adsorbed at oil-in-water emulsion interfaces examined by synchrotron radiation circular dichroism. *Food Hydrocoll.* 2014;34:78-87. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.12.015
46. Khaibrakhmanova D, Nikiforova A, Sedov I. Binding constants of substituted benzoic acids with bovine serum albumin. *Pharmaceutics.* 2020;13(2). doi:10.3390/ph13020030
47. Cheng H, Fang Z, Wusigale, Bakry AM, Chen Y, Liang L. Complexation of trans- and cis-resveratrol with bovine serum albumin, β -lactoglobulin or α -lactalbumin. *Food Hydrocoll.* 2018;81:242-252. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.02.037
48. Tromelin A, Andriot I, Guichard E. Protein-flavour interactions. In: *Flavour in Food*. Elsevier Ltd.; 2006:172-207. doi:10.1533/9781845691400.2.172
49. Spector AA, John K, Fletcher JE. Binding of long-chain fatty acids to bovine serum albumin. *J Lipid Res.* 1969;10(1):56-67. doi:10.1016/s0022-2275(20)42649-5

50. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 2008;582(13):1783-1787. doi:10.1016/j.febslet.2008.04.057
51. Bolaños K, Kogan MJ, Araya E. Capping gold nanoparticles with albumin to improve their biomedical properties. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:6387-6406. doi:10.2147/IJN.S210992
52. Rezwan K, Meier LP, Rezwan M, Vörös J, Textor M, Gauckler LJ. Bovine serum albumin adsorption onto colloidal Al₂O₃ particles: A new model based on zeta potential and UV-Vis measurements. *Langmuir.* 2004;20(23):10055-10061. doi:10.1021/la048459k
53. Dominguez-Medina S, Blankenburg J, Olson J, Landes CF, Link S. Adsorption of a protein monolayer via hydrophobic interactions prevents nanoparticle aggregation under harsh environmental conditions. *ACS Sustain Chem Eng.* 2013;1(7):833-842. doi:10.1021/sc400042h
54. Pearce KN, Kinsella JE. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *J Agric Food Chem.* 1978;26(3):716-723. doi:10.1021/jf60217a041
55. Campana M, Hosking SL, Petkov JT, et al. Adsorption of bovine serum albumin (BSA) at the oil/water interface: A neutron reflection study. *Langmuir.* 2015;31(20):5614-5622. doi:10.1021/acs.langmuir.5b00646
56. Rubbo H, Parthasarathy S, Barnes S, Kirk M, Kalyanaraman B, Freeman BA. Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: Termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Arch Biochem Biophys.* 1995;324(1):15-25. doi:10.1006/abbi.1995.9935
57. Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW. Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology.* 2005;41(6):1211-1219. doi:10.1002/hep.20720
58. Neužil J, Stocker R. Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett.* 1993;331(3):281-284. doi:10.1016/0014-5793(93)80353-V
59. Neužil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for α -tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *Journal of Biological Chemistry.* 1994;269(24):16712-16719. doi:10.1016/s0021-9258(19)89449-8
60. Gutteridge JMC. Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin. A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with

- rheumatoid arthritis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*. 1986;869(2):119-127. doi:10.1016/0167-4838(86)90286-4
61. Carballal S, Radi R, Kirk MC, Barnes S, Freeman BA, Alvarez B. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry*. 2003;42(33):9906-9914. doi:10.1021/bi027434m
62. Bourdon E, Loreau N, Lagrost L, Blache D. Differential effects of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin. *Free Radic Res*. 2005;39(1):15-20. doi:10.1080/10715760400024935
63. Levine RL, Berlett BS, Moskovitz J, Mosoni L, Stadtman ER. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev*. 1999;107(3):323-332. doi:10.1016/S0047-6374(98)00152-3
64. Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(26):15036-15040. doi:10.1073/pnas.93.26.15036
65. Gambini J, Inglés M, Ollaso G, et al. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/837042
66. Abba Y, Hassim H, Hamzah H, Noordin MM. Antiviral Activity of Resveratrol against Human and Animal Viruses. *Adv Virol*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/184241
67. Trela BC, Waterhouse AL. Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. *J Agric Food Chem*. 1996;44(5):1253-1257. doi:10.1021/jf9504576
68. Adrian M, Jeandet P, Veneau J, Weston LA, Bessis R. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *J Chem Ecol*. 1997;23(7):1689-1702. doi:10.1023/B:JOEC.0000006444.79951.75
69. Langcake P, Pryce RJ. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*. 1977;33(2):151-152. doi:10.1007/BF02124034
70. Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M. Phytoalexins from the vitaceae: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J Agric Food Chem*. 2002;50(10):2731-2741. doi:10.1021/jf011429s

71. Chen X, He H, Wang G, et al. Stereospecific determination of cis- and trans-resveratrol in rat plasma by HPLC: Application to pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography*. 2007;21(3):257-265. doi:10.1002/bmc.747
72. Camont L, Cottart CH, Rhayem Y, et al. Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. *Anal Chim Acta*. 2009;634(1):121-128. doi:10.1016/j.aca.2008.12.003
73. Blache D, Rustan I, Durand P, Lesgards G, Loreau N. Gas chromatographic analysis of resveratrol in plasma, lipoproteins and cells after in vitro incubations. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1997;702(1-2):103-110. doi:10.1016/S0378-4347(97)00383-6
74. Basly JP, Marre-Fournier F, Bail JC le, Habrioux G, Chulia AJ. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)- resveratrol. *Life Sci*. 2000;66(9):769-777. doi:10.1016/S0024-3205(99)00650-5
75. Moreno A, Castro M, Falqué E. Evolution of trans- and cis-resveratrol content in red grapes (*Vitis vinifera* L. cv Mencía, Albarello and Merenza) during ripening. *European Food Research and Technology*. 2008;227(3):667-674. doi:10.1007/s00217-007-0770-1
76. Caruso F, Tanski J, Villegas-Estrada A, Rossi M. Structural basis for antioxidant activity of trans-resveratrol: Ab initio calculations and crystal and molecular structure. *J Agric Food Chem*. 2004;52(24):7279-7285. doi:10.1021/jf048794e
77. Basly JP, Marre-Fournier F, Bail JC le, Habrioux G, Chulia AJ. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)- resveratrol. *Life Sci*. 2000;66(9):769-777. doi:10.1016/S0024-3205(99)00650-5
78. Abou-Zeid LA, El-Mowafy AM. Differential recognition of resveratrol isomers by the human estrogen receptor-?: Molecular dynamics evidence for stereoselective ligand binding. *Chirality*. 2004;16(3):190-195. doi:10.1002/chir.20007
79. Shang YJ, Qian YP, Liu X Da, et al. Radical-scavenging activity and mechanism of resveratrol-oriented analogues: Influence of the solvent, radical, and substitution. *Journal of Organic Chemistry*. 2009;74(14):5025-5031. doi:10.1021/jo9007095
80. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*. 1992;339(8808):1523-1526. doi:10.1016/0140-6736(92)91277-F
81. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 2006;444(7117):337-342. doi:10.1038/nature05354

82. Vestergaard M, Ingmer H. Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;53(6):716-723. doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.02.015
83. Gülçin I. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2010;11(1):210-218. doi:10.1016/j.ifset.2009.07.002
84. Pervaiz S, Holme AL. Resveratrol: Its biologic targets and functional activity. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(11):2851-2897. doi:10.1089/ars.2008.2412
85. Jarosova V, Vesely O, Duskocil I, et al. Metabolism of cis- and trans-Resveratrol and Dihydroresveratrol in an Intestinal Epithelial Model. *Nutrients*. 2020;12(3):595. doi:10.3390/nu12030595
86. Giuliani C, Iezzi M, Ciolli L, et al. Resveratrol has anti-thyroid effects both in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*. 2017;107(Pt A):237-247. doi:10.1016/j.fct.2017.06.044
87. Stojanović S, Sprinz H, Brede O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Arch Biochem Biophys*. 2001;391(1):79-89. doi:10.1006/abbi.2001.2388
88. Stivala LA, Savio M, Carafoli F, et al. Specific Structural Determinants Are Responsible for the Antioxidant Activity and the Cell Cycle Effects of Resveratrol. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(25):22586-22594. doi:10.1074/jbc.M101846200
89. Nakanishi I, Kawashima T, Ohkubo K, et al. Electron-transfer mechanism in radical-scavenging reactions by a vitamin E model in a protic medium. *Org Biomol Chem*. 2005;3(4):626-629. doi:10.1039/b416572a
90. Tabibiazar M, Mohammadifar MA, Roufegarinejad L, Ghorbani M, Hashemi M, Hamishehkar H. Improvement in dispersibility, stability and antioxidant activity of resveratrol using a colloidal nanodispersion of BSA-resveratrol. *Food Biosci*. 2019;27:46-53. doi:10.1016/j.fbio.2018.10.015
91. Cao S, Wang D, Tan X, Chen J. Interaction between trans-resveratrol and serum albumin in aqueous solution. *J Solution Chem*. 2009;38(9):1193-1202. doi:10.1007/s10953-009-9439-7
92. Bourassa P, Kanakis CD, Tarantilis P, Pollissiou MG, Tajmir-Riahi HA. Resveratrol, genistein, and curcumin bind bovine serum albumin. *Journal of Physical Chemistry B*. 2010;114(9):3348-3354. doi:10.1021/jp9115996

93. Latruffe N, Menzel M, Delmas D, Buchet R, Lançon A. Compared binding properties between resveratrol and other polyphenols to plasmatic albumin: Consequences for the health protecting effect of dietary plant microcomponents. *Molecules*. 2014;19(11):17066-17077. doi:10.3390/molecules191117066
94. Jannin B, Menzel M, Berlot JP, Delmas D, Lançon A, Latruffe N. Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: Plasmatic protein binding and cell uptake. In: *Biochemical Pharmacology*. Vol 68. Biochem Pharmacol; 2004:1113-1118. doi:10.1016/j.bcp.2004.04.028
95. Guo L, Peng Y, Yao J, Sui L, Gu A, Wang J. Anticancer activity and molecular mechanism of resveratrol-bovine serum albumin nanoparticles on subcutaneously implanted human primary ovarian carcinoma cells in nude mice. *Cancer Biother Radiopharm*. 2010;25(4):471-477. doi:10.1089/cbr.2009.0724
96. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;46(4):1650-1667. doi:10.1159/000489241
97. Date T, Mochizuki S, Belanger AJ, et al. Expression of constitutively stable hybrid hypoxia-inducible factor-1 α protects cultured rat cardiomyocytes against simulated ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;288(2 57-2). doi:10.1152/ajpcell.00374.2004
98. Hyvärinen J, Hassinen IE, Sormunen R, et al. Hearts of hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase-2 hypomorphic mice show protection against acute ischemia-reperfusion injury. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(18):13646-13657. doi:10.1074/jbc.M109.084855
99. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*. 2015;6:524-551. doi:10.1016/j.redox.2015.08.020
100. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals - PubMed. Accessed January 26, 2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3529822/>
101. Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med*. 2014;76:208-226. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046
102. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000;86(5):494-501. doi:10.1161/01.RES.86.5.494

103. Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(5-6):691-728. doi:10.1089/ars.2006.8.691
104. Nakagiri A, Sunamoto M, Murakami M. NADPH oxidase is involved in ischaemia/reperfusion-induced damage in rat gastric mucosa via ROS production - Role of NADPH oxidase in rat stomachs. *Inflammopharmacology.* 2007;15(6):278-281. doi:10.1007/s10787-007-1587-z
105. Miller AA, Dusting GJ, Roulston CL, Sobey CG. NADPH-oxidase activity is elevated in penumbral and non-ischemic cerebral arteries following stroke. *Brain Res.* 2006;1111(1):111-116. doi:10.1016/j.brainres.2006.06.082
106. Ma MW, Wang J, Zhang Q, et al. NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Mol Neurodegener.* 2017;12(1). doi:10.1186/s13024-017-0150-7
107. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87(1):245-313. doi:10.1152/physrev.00044.2005
108. Park HS, Chun JN, Jung HY, Choi C, Bae YS. Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2006;72(3):447-455. doi:10.1016/j.cardiores.2006.09.012
109. Barth BM, Stewart-Smeets S, Kuhn TB. Proinflammatory cytokines provoke oxidative damage to actin in neuronal cells mediated by Rac1 and NADPH oxidase. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 2009;41(2):274-285. doi:10.1016/j.mcn.2009.03.007
110. Zhu J, Yao K, Wang Q, et al. Ischemic Postconditioning-Regulated miR-499 Protects the Rat Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting Apoptosis through PDCD4. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2016;39(6):2364-2380. doi:10.1159/000452506
111. Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *Journal of Investigative Surgery.* 2005;18(6):335-350. doi:10.1080/08941930500328862
112. Jing L, Yao L, Zhao M, Peng LP, Liu M. Organ preservation: From the past to the future. *Acta Pharmacol Sin.* 2018;39(5):845-857. doi:10.1038/aps.2017.182
113. Zhao H, Alam A, Soo AP, George AJT, Ma D. Ischemia-Reperfusion Injury Reduces Long Term Renal Graft Survival: Mechanism and Beyond. *EBioMedicine.* 2018;28:31-42. doi:10.1016/j.ebiom.2018.01.025

114. Cavallé-Coll M, Bala S, Velidedeoglu E, et al. Summary of FDA workshop on ischemia reperfusion injury in kidney transplantation. In: *American Journal of Transplantation*. Vol 13. Am J Transplant; 2013;1134-1148. doi:10.1111/ajt.12210
115. Parsons RF, Guarrera J v. Preservation solutions for static cold storage of abdominal allografts: Which is best? *Curr Opin Organ Transplant*. 2014;19(2):100-107. doi:10.1097/MOT.0000000000000063
116. Hendriks KDW, Brüggewirth IMA, Maassen H, et al. Renal temperature reduction progressively favors mitochondrial ROS production over respiration in hypothermic kidney preservation. *J Transl Med*. 2019;17(1). doi:10.1186/s12967-019-2013-1
117. Gracia-Sancho J, Villarreal G, Zhang Y, et al. Flow cessation triggers endothelial dysfunction during organ cold storage conditions: Strategies for pharmacologic intervention. *Transplantation*. 2010;90(2):142-149. doi:10.1097/TP.0b013e3181e228db
118. Rauen U, Elling B, de Groot H. Injury to cultured liver endothelial cells after cold preservation: Mediation by reactive oxygen species that are released independently of the known trigger hypoxia/reoxygenation. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(3):392-400. doi:10.1016/S0891-5849(96)00618-1
119. Debout A, Foucher Y, Trébern-Launay K, et al. Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation. *Kidney Int*. 2015;87(2):343-349. doi:10.1038/ki.2014.304
120. Quiroga I, McShane P, Koo DDH, et al. Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2006;21(6):1689-1696. doi:10.1093/ndt/gfl042
121. White CW, Hasanally D, Mundt P, et al. A whole blood-based perfusate provides superior preservation of myocardial function during ex vivo heart perfusion. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2015;34(1):113-121. doi:10.1016/j.healun.2014.09.021
122. Podesser BK, Hallström S, Schima H, et al. The erythrocyte-perfused "working heart" model: Hemodynamic and metabolic performance in comparison to crystalloid perfused hearts. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1999;41(1):9-15. doi:10.1016/S1056-8719(99)00018-0
123. Laing RW, Bhogal RH, Wallace L, et al. The Use of an Acellular Oxygen Carrier in a Human Liver Model of Normothermic Machine Perfusion. *Transplantation*. 2017;101(11):2746-2756. doi:10.1097/TP.0000000000001821

124. Jägers J, Kirsch M, Cantore M, Karaman O, Ferez KB. Artificial oxygen carriers in organ preservation: Dose dependency in a rat model of ex-vivo normothermic kidney perfusion. *Artif Organs*. 2022;46(9):1783-1793. doi:10.1111/aor.14264
125. Wrobeln A, Schlüter KD, Linders J, et al. Functionality of albumin-derived perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers in the Langendorff-heart†. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2017;45(4):723-730. doi:10.1080/21691401.2017.1284858
126. Shen M, Wu RX, Zhao L, et al. Resveratrol Attenuates Ischemia/Reperfusion Injury in Neonatal Cardiomyocytes and Its Underlying Mechanism. *PLoS One*. 2012;7(12). doi:10.1371/journal.pone.0051223
127. Goh SSC, Woodman OL, Pepe S, Cao AH, Qin C, Ritchie RH. The red wine antioxidant resveratrol prevents cardiomyocyte injury following ischemia-reperfusion via multiple sites and mechanisms. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(1):101-113. doi:10.1089/ars.2007.9.101
128. Schirardin H, Ney J. Eine vereinfachte Mikromethode zur Bestimmung von Serumalbumin mit Hilfe von Bromkresolgrün. *Clin Chem Lab Med*. 1972;10(7):338-344. doi:10.1515/cclm.1972.10.7.338
129. Trivedi VD, Saxena I, Siddiqui MU, Qasim MA. Interaction of bromocresol green with different serum albumins studied by fluorescence quenching. *Biochem Mol Biol Int*. 1997;43(1):1-8. doi:10.1080/15216549700203751
130. Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(WEB SERVER ISS.). doi:10.1093/nar/gkh371
131. Lobley A, Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics*. 2002;18(1):211-212. doi:10.1093/bioinformatics/18.1.211
132. Marley R, Patel RP, Orié N, Ceaser E, Darley-Usmar V, Moore K. Formation of nanomolar concentrations of S-nitroso-albumin in human plasma by nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(5):688-696. doi:10.1016/S0891-5849(01)00627-X
133. Guliyeva AJ, Gasymov OK. ANS fluorescence: Potential to discriminate hydrophobic sites of proteins in solid states. *Biochem Biophys Rep*. 2020;24:100843. doi:10.1016/j.bbrep.2020.100843

134. Matulis D, Lovrien R. 1-anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation. *Biophys J.* 1998;74(1):422-429. doi:10.1016/S0006-3495(98)77799-9
135. Güsten H, Meisner R. Influence of restricted intramolecular motions on the fluorescence quantum yield of fluorophores. *Journal of Photochemistry.* 1983;21(1):53-60. doi:10.1016/0047-2670(83)80007-0
136. Togashi DM, Ryder AG, O'Shaughnessy D. Monitoring local unfolding of bovine serum albumin during denaturation using steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. *J Fluoresc.* 2010;20(2):441-452. doi:10.1007/s10895-009-0566-8
137. Trela BC, Waterhouse AL. Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. *J Agric Food Chem.* 1996;44(5):1253-1257. doi:10.1021/jf9504576
138. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9-10):1231-1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3
139. Cui H, Shi MJ, Meng R, Zhou J, Lai CZ, Lin XQ. Effect of pH on Inhibition and Enhancement of Luminol-H₂O₂-Co²⁺ Chemiluminescence by Phenolic Compounds and Amino Acids. *Photochem Photobiol.* 2004;79(3):233. doi:10.1562/be-03-28.1
140. Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, et al. HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(6):2979-2984. doi:10.1073/pnas.95.6.2979
141. Berchner-Pfannschmidt U, Frede S, Wotzlaw C, Fandrey J. Imaging of the hypoxia-inducible factor pathway: Insights into oxygen sensing. *European Respiratory Journal.* 2008;32(1):210-217. doi:10.1183/09031936.00013408
142. Nocke F. Untersuchung der Stabilität von Perfluorcarbon-basierten Albumin-Nanopartikeln unter Stresssituationen und verschiedener Lagerungs- und Transportbedingungen.
143. Sakariassen KS, Orning L, Turitto VT. The impact of blood shear rate on arterial thrombus formation. *Future Sci OA.* 2015;1(4):30. doi:10.4155/fso.15.28
144. Tan M, Liang W, Luo X, Gu Y. Fluorescence spectroscopy study on the interaction between evodiamine and bovine serum albumin. *J Chem.* Published online 2013. doi:10.1155/2013/308054
145. Xiao JB, Chen XQ, Jiang XY, Hilczer M, Tachiya M. Probing the interaction of trans-resveratrol with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study with tachiya

- model. In: *Journal of Fluorescence*. Vol 18. Springer; 2008:671-678. doi:10.1007/s10895-008-0346-x
146. Habener A, Chowdhury A, Echtermeyer F, Lichtinghagen R, Theilmeyer G, Herzog C. MitoNEET protects HL-1 cardiomyocytes from oxidative stress mediated apoptosis in an in vitro model of hypoxia and reoxygenation. *PLoS One*. 2016;11(5). doi:10.1371/journal.pone.0156054
147. Wooster TJ, Golding M, Sanguansri P. Impact of oil type on nanoemulsion formation and ostwald ripening stability. *Langmuir*. 2008;24(22):12758-12765. doi:10.1021/la801685v
148. Zhang J, Reineccius GA. Factors controlling the turbidity of submicron emulsions stabilized by food biopolymers and natural surfactant. *LWT*. 2016;71:162-168. doi:10.1016/j.lwt.2016.03.035
149. Chung C, McClements DJ. Characterization of Physicochemical Properties of Nanoemulsions: Appearance, Stability, and Rheology. In: *Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization*. Elsevier Inc.; 2018:547-576. doi:10.1016/B978-0-12-811838-2.00017-5
150. Sadeghpour Galooyak S, Dabir B. Three-factor response surface optimization of nano-emulsion formation using a microfluidizer. *J Food Sci Technol*. 2015;52(5):2558-2571. doi:10.1007/s13197-014-1363-1
151. Desrumaux A, Marcand J. Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high-pressure homogenization (up to 350 MPa): effect of pressure on emulsion characteristics. *Int J Food Sci Technol*. 2002;37(3):263-269. doi:10.1046/j.1365-2621.2002.00565.x
152. Jafari SM, He Y, Bhandari B. Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. *European Food Research and Technology*. 2007;225(5-6):733-741. doi:10.1007/s00217-006-0476-9
153. Marie P, Perrier-Cornet JM, Gervais P. Influence of major parameters in emulsification mechanisms using a high-pressure jet. *J Food Eng*. 2002;53(1):43-51. doi:10.1016/S0260-8774(01)00138-8
154. Gaigalas AK, Hubbard JB, McCurley M, Woo S. Diffusion of bovine serum albumin in aqueous solutions. *Journal of Physical Chemistry*. 1992;96(5):2355-2359. doi:10.1021/j100184a063

155. Paquin P. Technological properties of high pressure homogenizers: The effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. In: *International Dairy Journal*. Vol 9. Elsevier; 1999:329-335. doi:10.1016/S0958-6946(99)00083-7
156. Perrier-Cornet JM, Marie P, Gervais P. Comparison of emulsification efficiency of protein-stabilized oil-in-water emulsions using jet, high pressure and colloid mill homogenization. *J Food Eng*. 2005;66(2):211-217. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.03.008
157. Bouaouina H, Desrumaux A, Loisel C, Legrand J. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. *Int Dairy J*. 2006;16(4):275-284. doi:10.1016/j.idairyj.2005.05.004
158. Maresca P, Ferrari G, Leite Júnior BR de C, et al. Effect of dynamic high pressure on functional and structural properties of bovine serum albumin. *Food Research International*. 2017;99:748-754. doi:10.1016/j.foodres.2017.06.047
159. Yang J, Zhou Y, Chen L. Elaboration and characterization of barley protein nanoparticles as an oral delivery system for lipophilic bioactive compounds. *Food Funct*. 2014;5(1):92-101. doi:10.1039/c3fo60351b
160. Metzger. T. G. *Angewandte Rheologie, 5. Auflage, Anton Paar GmbH, Graz, S. 22f.*; 2020. Accessed February 16, 2023. <https://www.anton-paar.com/de-de/angewandte-rheologie/>
161. Erfahren Sie mehr über Viskosität und Viskosimetrie | AMETEK Brookfield. Accessed February 7, 2023. <https://www.brookfieldengineering.de/brookfield-university/learning-center/learn-about-viscosity/what-is-viscosity>
162. Shrestha S, Wang B, Dutta P. Nanoparticle processing: Understanding and controlling aggregation. *Adv Colloid Interface Sci*. 2020;279. doi:10.1016/j.cis.2020.102162
163. Zuki NM, Ismail N, Omar FM. Evaluation of zeta potential and particle size measurements of multiple coagulants in semiconductor wastewater. In: *AIP Conference Proceedings*. Vol 2124. American Institute of Physics Inc.; 2019:020036. doi:10.1063/1.5117096
164. Changing the Properties of Particles to Control Their Rheology. Accessed February 16, 2023. <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=12304>
165. Castellanos MM, Pathak JA, Colby RH. Both protein adsorption and aggregation contribute to shear yielding and viscosity increase in protein solutions. *Soft Matter*. 2014;10(1):122-131. doi:10.1039/c3sm51994e

166. Amin S, Barnett G v., Pathak JA, Roberts CJ, Sarangapani PS. Protein aggregation, particle formation, characterization & rheology. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2014;19(5):438-449. doi:10.1016/j.cocis.2014.10.002
167. Konopko A, Litwinienko G. Unexpected Role of pH and Microenvironment on the Antioxidant and Synergistic Activity of Resveratrol in Model Micellar and Liposomal Systems. *Journal of Organic Chemistry.* 2022;87(3):1698-1709. doi:10.1021/acs.joc.1c01801
168. Yang B, Cheng X, Zhang Y, Li W, Wang J, Guo H. Probing the roles of pH and ionic strength on electrostatic binding of tetracycline by dissolved organic matters: Reevaluation of modified fitting model. *Environmental Science and Ecotechnology.* 2021;8:100133. doi:10.1016/j.es.2021.100133
169. Zhang J, Yu WJ, Yang N, Sun L. Interaction between resveratrol and thrombin and its biological implication. *Int J Food Sci Nutr.* 2011;62(8):814-820. doi:10.3109/09637486.2011.581651
170. Lu GW, Gao P. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. In: *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems.* Elsevier; 2010:59-94. doi:10.1016/b978-0-8155-2025-2.10003-4
171. Li D, Zhao Y, Wang X, et al. Effects of (+)-catechin on a rice bran protein oil-in-water emulsion: Droplet size, zeta-potential, emulsifying properties, and rheological behavior. *Food Hydrocoll.* 2020;98:105306. doi:10.1016/j.foodhyd.2019.105306
172. Pearce KN, Kinsella JE. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *J Agric Food Chem.* 1978;26(3):716-723. doi:10.1021/jf60217a041
173. Deeth HC, Bansal N. Whey proteins. From milk to medicine. *Whey proteins From milk to medicine.* Published online 2018.
174. Haruki R, Kimura T, Iwasaki H, et al. Safety Evaluation of Hemoglobin-Albumin Cluster "HemoAct" as a Red Blood Cell Substitute. *Sci Rep.* 2015;5. doi:10.1038/srep12778
175. López-Nicolás JM, García-Carmona F. Aggregation state and pKa values of (E)-resveratrol as determined by fluorescence spectroscopy and UV-visible absorption. *J Agric Food Chem.* 2008;56(17):7600-7605. doi:10.1021/jf800843e
176. Yin X, Cheng H, Wusigale, Dong H, Huang W, Liang L. Resveratrol Stabilization and Loss by Sodium Caseinate, Whey and Soy Protein Isolates: Loading, Antioxidant Activity, Oxidability. *Antioxidants.* 2022;11(4). doi:10.3390/antiox11040647

-
177. Romay C, Pascual C, Lissi E. The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Braz J Med Biol Res*. Published online 1996.
178. Takatsuka M, Goto S, Kobayashi K, Otsuka Y, Shimada Y. Evaluation of Pure Antioxidative Capacity of Antioxidants: ESR Spectroscopy of Stable Radicals by DPPH and ABTS Assays with Singular Value Decomposition. *SSRN Electronic Journal*. Published online January 31, 2022. doi:10.2139/ssrn.3997823
179. Zhang F, Khan MA, Cheng H, Liang L. Co-encapsulation of α -tocopherol and resveratrol within zein nanoparticles: Impact on antioxidant activity and stability. *J Food Eng*. 2019;247:9-18. doi:10.1016/j.jfoodeng.2018.11.021
180. Pantusa M, Bartucci R, Rizzuti B. Stability of trans -resveratrol associated with transport proteins. *J Agric Food Chem*. 2014;62(19):4384-4391. doi:10.1021/jf405584a
181. Porter WL, Black ED, Drolet AM. Use of Polyamide Oxidative Fluorescence Test on Lipid Emulsions: Contrast in Relative Effectiveness of Antioxidants in Bulk Versus Dispersed Systems. *J Agric Food Chem*. 1989;37(3):615-624. doi:10.1021/jf00087a009
182. Truong VL, Jun M, Jeong WS. Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *BioFactors*. 2018;44(1):36-49. doi:10.1002/biof.1399
183. Kihara S, van der Heijden NJ, Seal CK, et al. Soft and Hard Interactions between Polystyrene Nanoplastics and Human Serum Albumin Protein Corona. *Bioconjug Chem*. 2019;30(4):1067-1076. doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00015
184. Wang H, Lin Y, Nienhaus K, Nienhaus GU. The protein corona on nanoparticles as viewed from a nanoparticle-sizing perspective. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2018;10(4). doi:10.1002/wnan.1500
185. Park SJ. Protein–nanoparticle interaction: Corona formation and conformational changes in proteins on nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:5783-5802. doi:10.2147/IJN.S254808
186. Wang C, Wang J, Zhu D, Hu S, Kang Z, Ma H. Effect of dynamic ultra-high pressure homogenization on the structure and functional properties of whey protein. *J Food Sci Technol*. 2020;57(4):1301-1309. doi:10.1007/s13197-019-04164-z
187. Gasymov OK, Glasgow BJ. ANS fluorescence: Potential to augment the identification of the external binding sites of proteins. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2007;1774(3):403-411. doi:10.1016/j.bbapap.2007.01.002

188. Qian B, Zhao X, Yang Y, Tian C. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from oyster soft tissue by enzymatic hydrolysis. *Food Sci Nutr.* 2020;8(7):3947-3956. doi:10.1002/fsn3.1710
189. Ishtikhar M, Rabbani G, Khan S, Khan RH. Biophysical investigation of thymoquinone binding to “N” and “B” isoforms of human serum albumin: Exploring the interaction mechanism and radical scavenging activity. *RSC Adv.* 2015;5(24):18218-18232. doi:10.1039/c4ra09892g
190. Rakesh KP, Suhas R, Gowda DC. Anti-inflammatory and Antioxidant Peptide-Conjugates: Modulation of Activity by Charged and Hydrophobic Residues. *Int J Pept Res Ther.* 2019;25(1):227-234. doi:10.1007/s10989-017-9668-3
191. Medina-Navarro R, Durán-Reyes G, Díaz-Flores M, Vilar-Rojas C. Protein antioxidant response to the stress and the relationship between molecular structure and antioxidant function. *PLoS One.* 2010;5(1). doi:10.1371/journal.pone.0008971
192. di Meo F, Lemaur V, Cornil J, et al. Free radical scavenging by natural polyphenols: Atom versus electron transfer. *Journal of Physical Chemistry A.* 2013;117(10):2082-2092. doi:10.1021/jp3116319
193. Cheng H, Zhang H, Li D, Duan H, Liang L. Impact of oil type on the location, partition and chemical stability of resveratrol in oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate plus gum Arabic. *Food Hydrocoll.* 2020;109. doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106119
194. Radi R, Cosgrove TP, Beckman JS, Freeman BA. Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochemical Journal.* 1993;290(1):51-57. doi:10.1042/bj2900051
195. López-Alarcón C, Arenas A, Lissi E, Silva E. The role of protein-derived free radicals as intermediaries of oxidative processes. *Biomol Concepts.* 2014;5(2):119-130. doi:10.1515/bmc-2014-0004
196. Yu C, Wu F, Cha Y, et al. Effects of high-pressure homogenization on functional properties and structure of mussel (*Mytilus edulis*) myofibrillar proteins. *Int J Biol Macromol.* 2018;118:741-746. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.06.134
197. Turell L, Carballal S, Botti H, Radi R, Alvarez B. Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2009;42(4):305-311. doi:10.1590/S0100-879X2009000400001
198. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *Journal of Biological Chemistry.* 2013;288(37):26464-26472. doi:10.1074/jbc.R113.472936

199. Holthoff JH, Woodling KA, Doerge DR, Burns ST, Hinson JA, Mayeux PR. Resveratrol, a dietary polyphenolic phytoalexin, is a functional scavenger of peroxynitrite. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(8):1260-1265. doi:10.1016/j.bcp.2010.06.027
200. Pandey KB, Rizvi SI. Resveratrol may protect plasma proteins from oxidation under conditions of oxidative stress in vitro. *J Braz Chem Soc.* 2010;21(5):909-913. doi:10.1590/S0103-50532010000500020
201. Olas B, Nowak P, Kolodziejczyk J, Ponczek M, Wachowicz B. Protective effects of resveratrol against oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and lipids exposed to peroxynitrite. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2006;17(2):96-102. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.05.010
202. Wu ML, Tsai KL, Wang SM, Wu JC, Wang B sen, Lee YT. Mechanism of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical-induced intracellular acidification in cultured rat cardiac myoblasts. *Circ Res.* 1996;78(4):564-572. doi:10.1161/01.RES.78.4.564
203. Ransy C, Vaz C, Lombès A, Bouillaud F. Use of H₂O₂ to cause oxidative stress, the catalase issue. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):1-14. doi:10.3390/ijms21239149
204. Ruozi G, Bortolotti F, Recchia FA. Gut-Derived Hormones-Cardiac Effects of Ghrelin and Glucagon-Like Peptide-1. In: *Endocrinology of the Heart in Health and Disease: Integrated, Cellular, and Molecular Endocrinology of the Heart.* Elsevier Inc.; 2017:139-166. doi:10.1016/B978-0-12-803111-7.00006-3
205. Ng SCW, Furman R, Axelsen PH, Shchepinov MS. Free Radical Chain Reactions and Polyunsaturated Fatty Acids in Brain Lipids. *ACS Omega.* 2022;7(29):25337-25345. doi:10.1021/acsomega.2c02285
206. Ghosh N, Das A, Chaffee S, Roy S, Sen CK. Reactive oxygen species, oxidative damage and cell death. In: *Immunity and Inflammation in Health and Disease: Emerging Roles of Nutraceuticals and Functional Foods in Immune Support.* Elsevier; 2017:45-55. doi:10.1016/B978-0-12-805417-8.00004-4
207. Kakuta K, Orino K, Yamamoto S, Watanabe K. High levels of ferritin and its iron in fetal bovine serum. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology.* 1997;118(1):165-169. doi:10.1016/S0300-9629(96)00403-3
208. Kendall M, Hodges NJ, Whitwel H, Tyrrell J, Cangul H. Nanoparticle growth and surface chemistry changes in cell-conditioned culture medium. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2015;370(1661):20140100. doi:10.1098/rstb.2014.0100

209. Maiorano G, Sabella S, Sorce B, et al. Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *ACS Nano*. 2010;4(12):7481-7491. doi:10.1021/nn101557e
210. Murphy MP, Bayir H, Belousov V, et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nat Metab*. 2022;4(6):651-662. doi:10.1038/s42255-022-00591-z
211. vanden Hoek TL, Qin Y, Wojcik K, et al. Reperfusion, not simulated ischemia, initiates intrinsic apoptosis injury in chick cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(1 53-1). doi:10.1152/ajpheart.00132.2002
212. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999;6(2):99-104. doi:10.1038/sj.cdd.4400476
213. Ammendolia DA, Bement WM, Brumell JH. Plasma membrane integrity: implications for health and disease. *BMC Biol*. 2021;19(1):1-29. doi:10.1186/s12915-021-00972-y
214. Ast T, Mootha VK. Oxygen and mammalian cell culture: are we repeating the experiment of Dr. Ox? *Nat Metab*. 2019;1(9):858-860. doi:10.1038/s42255-019-0105-0
215. Bolli RAR, Arshia A, Hassan SA, et al. Cardiac Mesenchymal Cells Cultured at Physiologic Oxygen Tension Have Superior Therapeutic Efficacy in Heart Failure Caused by Myocardial Infarction. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:1230. doi:10.3389/fcell.2021.662415
216. Orallo F, Álvarez E, Camiña M, Leiro JM, Gómez E, Fernández P. The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol*. 2002;61(2):294-302. doi:10.1124/mol.61.2.294
217. Leprince P, Popov AF, Simon AR, Benk C, Siepe M. *Ex vivo* perfusion of the heart with the use of the Organ Care System. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2016;49(5):1318-1320. doi:10.1093/ejcts/ezw075

9. Anhang

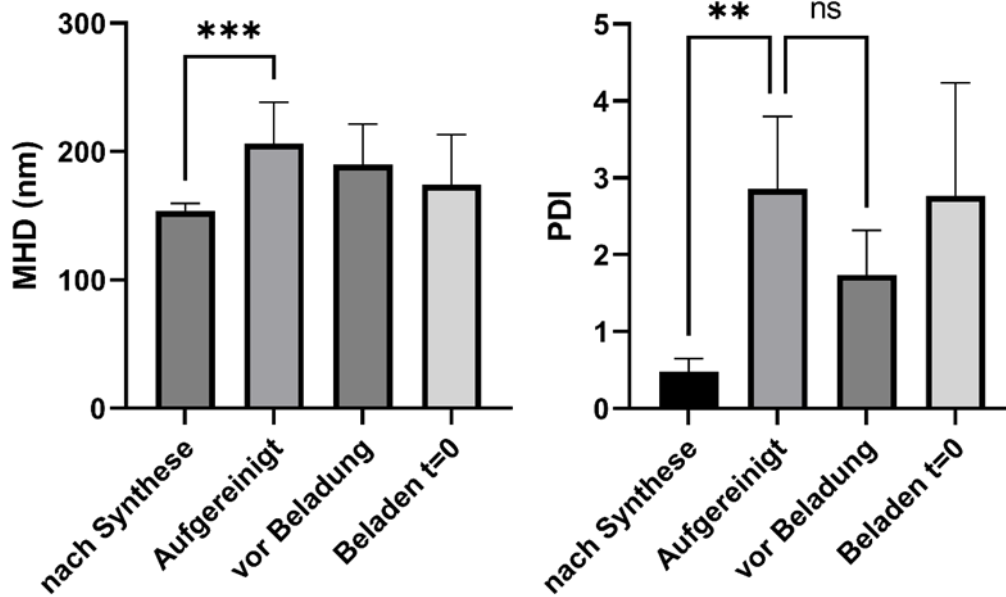


Abbildung 32 Gesonderte Darstellung des MHD und PDI der Standardsynthese

Eine zusätzliche Darstellung der Partikelgröße und -verteilung der Standardsynthese zur Veranschaulichung weiterer statistischer Auswertungen. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Two-Way ANOVA; Mittelwert \pm SD, $n = 9$.

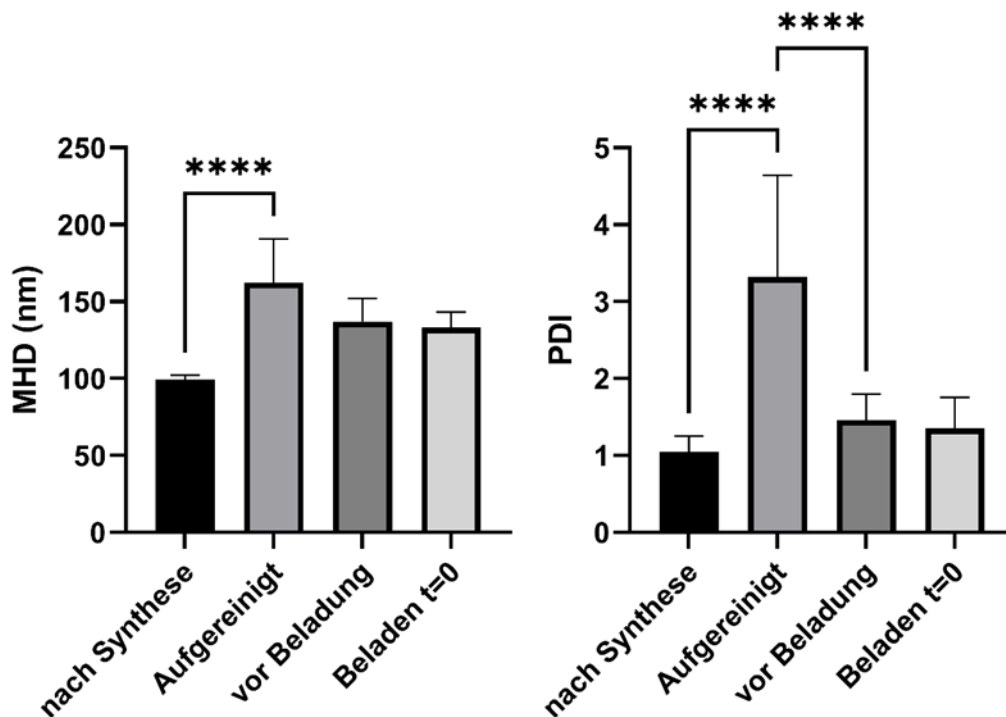


Abbildung 33 Gesonderte Darstellung des MHD und PDI der MOK-Synthese

Eine zusätzliche Darstellung der Partikelgröße und -verteilung der MOK-Synthese zur Veranschaulichung weiterer statistischer Auswertungen; **** $p < 0,0001$; Two-Way ANOVA; Mittelwert \pm SD, $n = 12$

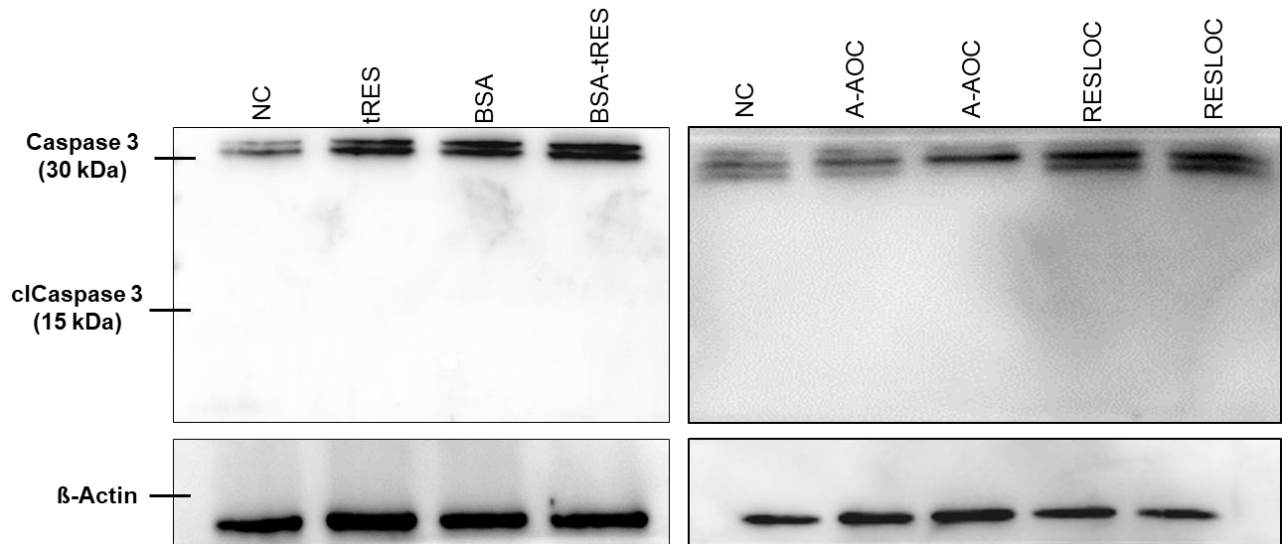


Abbildung 34 Western Blot-Analyse der GOx-Exposition

Dargestellt ist ein Western Blot von Caspase 3 und der gespaltenen Form (clCaspase 3). Als interne Ladekontrolle diente β -Actin. Die Western Blot-Analyse wurde von Dr. Miriam Cantore durchgeführt; n = 3.

9.1 Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Katja Ferenz bedanken, die stets ein offenes Ohr für die Belange ihrer Doktoranden hatte. Die mir in meinem Projekt gewährten Freiheiten trugen dazu bei, wertvolle Erfahrungen im wissenschaftlichen Handwerk zu sammeln und mich zu einem selbstständigen Forscher zu entwickeln. Den zahlreichen Hindernissen und Rückschlägen zum Trotz bewahrte Frau Prof. Dr. Ferenz stets eine positive Haltung und hob die Moral unserer Arbeitsgruppe auch in schwierigen Zeiten an. Von den in den vier Jahren meiner Promotion gesammelten Erkenntnissen werde ich wahrscheinlich meine gesamte wissenschaftliche Karriere zehren.

Auch Prof. Dr. Michael Kirsch gilt mein Dank, der sich nicht nur bereit erklärt hat, als Zweitgutachter zu fungieren, sondern dessen immenser Wissensschatz und seine Erfahrung mir stets geholfen haben, mein Projekt aus anderen Perspektiven zu betrachten und voranzutreiben.

Des Weiteren möchte ich mich bei Birgit Podleska, Eva Hillen und Natalie Homann für die Unterstützung im Labor und die freundliche Atmosphäre in der Biochemie bedanken. Auch Jacqueline Arnold-Thomas und Ute Häusler schulde ich meinen Dank, die mit viel Geduld stets für meine Belange bürokratischer Natur zur Verfügung standen.

Auch bei Dr. Christine Beuck aus der AG Bayer möchte ich mich bedanken, die mich in die Bedienung des CD-Spektropolarimeter und des Fluoreszenzspektrometers eingeführt hat.

Meinen herzlichsten Dank möchte ich Dr. Miriam Cantore aussprechen, die mich nicht nur im Labor, sondern auch mit anregenden wissenschaftlichen Diskussionen unterstützt hat. Im selben Atemzug möchte ich auch Fabian Nocke, Jan-Eric Sydow und Shah Bahrullah Shah danken, deren Gespräche und Freundschaft zu einer Auflockerung des Arbeitsalltages beitrugen.

Weiterhin möchte ich einen großen Dank an das gesamte Institut der Physiologie aussprechen. Selten erlebte ich eine Arbeitsgruppe, in der eine derartig willkommene und familiäre Gruppendynamik vorlag, wie es im Institut von Prof. Joachim Fandrey der Fall war. Vielen Dank für die moralische Unterstützung auch in den widrigsten Zeiten meiner Promotion, für die Freundschaften und die schönen Erfahrungen in und außerhalb des Labors.

Mein unendlicher Dank gilt Katharina Jacob, die zu Beginn meiner Promotion in mein Leben trat und mich seitdem in allen Lebenslagen mit ihrer bedingungslosen Liebe unterstützt.

Der Lebenslauf ist aus datenschutzrechtlichen Gründen in der
Online-Version nicht verfügbar

9.3 Publikationen

Artificial oxygen carriers in organ preservation: Dose dependency in a rat model of ex-vivo normothermic kidney perfusion

J. Jägers, M. Kirsch, M. Cantore, O. Karaman, K.B. Ferenz

Artificial Organs, Pages 1783-1793 (2022)

DOI: 10.1111/aor.14264

Artificial red blood cells

K.B. Ferenz, O. Karaman, S.B. Shah

Micro and Nano Technologies, Pages 397-427 (2022)

DOI: 10.1016/B978-0-12-823971-1.00018-0

9.4 Posterpräsentationen

Establishment of a dual-compartment cell culture system to study I-R-injury in HL-1 cardiomyocytes

O. Karaman, J. Hausherr, M. Cantore, K.B. Ferenz

Europhysiology, Kopenhagen, 16-18.9.2022

Attenuation of ischemia reperfusion injury in HL-1 cells by utilization of artificial oxygen carriers

O. Karaman, J. Hausherr, M. Cantore, M. Kirsch, K.B. Ferenz

11. Symposium der Jungen Physiologen, 31.03 – 01.04.22

Albumin derived artificial oxygen carriers enhancing anti-oxidative efficacy of the phytoalexin trans-resveratrol

O. Karaman, M. Kirsch, K.B. Ferenz

100th Meeting of the German Physiological Society, Frankfurt, 30.09 – 02.10.2021

Artificial oxygen carriers mitigate ischemia of the small intestine in vitro and in vivo

J. Jägers, A. Wrobeln, O. Karaman, K.B. Ferenz

Essener Forschungstag, Essen, 1. Sept. 2019

9.5 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Untersuchungen der strukturellen und funktionellen Interaktionen zwischen *trans*-Resveratrol und der Albuminhülle eines künstlichen Sauerstoffträgers auf Perfluordecalinbasis“

selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Arbeit sowie beigefügte Abbildungen, Zeichnungen oder Grafiken, die anderen Werken dem Wortlaut oder Sinn nach entnommen wurden, habe ich unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht. Die Arbeit ist noch nicht an anderer Stelle als Prüfungsleistung vorgelegt worden.

Essen, den 23.03.2023

Ozan Karaman