

# **Untersuchung oxidativer Prozesse anhand induzierter ultraschwacher Photonenemission (UPE)**

Anwendung für dermatologische und kosmetische  
Fragestellungen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches Chemie  
der Universität Hamburg



vorgelegt von

**Faryar Khabiri**  
aus Hamburg

Hamburg 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Februar 2001 bis Juli 2004 unter der Leitung von Prof. Dr. H.-J. Duchstein am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg in Kooperation mit der Beiersdorf AG durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Duchstein
2. Gutachter: Prof. Dr. K.-P. Wittern

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Juli 2005

All diese 50 Jahre konsequenten Grübelns haben mich der  
Antwort zu der Frage:

„Was ist Licht?“

nicht näher gebracht. Heute glaubt es jeder Lump zu  
wissen - aber er irrt sich!

*«Albert Einstein in einem Brief an Michael Besso, 1951»*

**Für meine Familie  
und Snežana**

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. H.-J. Duchstein für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit und seine stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Bei Prof. Dr. K.-P. Wittern und den Dres. H. Wenck, V. Schreiner und W. Mei bedanke ich mich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit bei der Beiersdorf AG, Hamburg.

Zusätzlich danke ich Prof. Dr. K.-P. Wittern für die Übernahme dieser Arbeit als Zweitgutachter.

Ebenfalls Danke sagen möchte ich Dr. W. Mei für seine Einführung und Hilfestellung bei der Thematik ultraschwache Photonenemission.

Für den Ideenaustausch, kollegiale Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima möchte ich mich bei Fr. Dipl. Ing. I. Grimm und Herr Dipl. Ing. R. Hagens ganz herzlich bedanken.

Für die Unterstützung in technischen Fragestellungen gebührt Dipl. Ing. R. Hagens besonderer Dank.

Ich möchte mich auch bei Dr. C. Smuda für die fachliche und experimentelle Unterstützung bei den *in vitro*-Untersuchungen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt natürlich auch meiner Familie für den moralischen und liebevollen Beistand über all die Jahre.

## Abkürzungsverzeichnis

|                  |  |
|------------------|--|
| 6-4-PP           | Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Photoaddukte |
| AA <sup>·-</sup> | Semidehydroascorbat                    |
| AAPH             | 2,2'-Azo-bis-(2-amidinopropan)         |
| Abb.             | Abbildung                              |
| AOX              | Antioxidantien                         |
| AP-1             | <i>activating protein 1</i>            |
| AS               | Aminosäure                             |
| ATP              | Adenosintriphosphat                    |
| BPO              | Benzoylperoxid                         |
| BSA              | Bovines Serum Albumin                  |
| bzw.             | beziehungsweise                        |
| CLZ              | Chemilumineszenz                       |
| CPD              | Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren           |
| cps              | <i>counts per second</i>               |
| CV               | Carbonylverbindungen                   |
| Cys              | Cystein                                |
| DFA              | Desferrioxamin                         |
| DHA              | Dehydroascorbat                        |
| DMPO             | 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid         |
| DNA              | Desoxyribonucleinsäure                 |
| DNP              | 2-4-Dinitrophenylhydrazon              |
| DNPH             | 2-4-Dinitrophenylhydrazin              |

---

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| DZR                           | Dunkelzählrate                                |
| ESI                           | Elektrospray-Ionisierung                      |
| ESR                           | Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie        |
| GC                            | Gaschromatographie                            |
| Glu                           | Glutaminsäure                                 |
| GSH-Px                        | Gluthathionperoxidase                         |
| GSSG-Red                      | Gluthathionreduktase                          |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid                            |
| HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | Hydrogencarbonat                              |
| His                           | Histidin                                      |
| HOCl                          | hypochlorige Säure                            |
| HPLC                          | <i>high performance liquid chromatography</i> |
| k                             | Geschwindigkeitskonstante                     |
| Kap.                          | Kapitel                                       |
| LADS                          | <i>Large Aperture Detection Shutter</i>       |
| LH                            | ungesättigte Lipide                           |
| LWL                           | Lichtwellenleiter                             |
| Lys                           | Lysin   |
| M                             | Multiplizität                                 |
| MDA                           | Malondialdehyd                                |
| Met                           | Methionin                                     |
| MS                            | Massenspektrometrie                           |
| N <sub>2</sub>                | Stickstoff                                    |
| NADH                          | Nicotinamidadenindinucleotid                  |
| NADPH                         | Nicotinamidadenindinucleotidphosphat          |

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| NaOCl                       | Natriumhypochlorid                         |
| ND                          | <i>neutral density</i>                     |
| NF- $\kappa$ B              | <i>nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i> |
| NH <sub>3</sub>             | Ammoniak                                   |
| NO $\cdot$                  | Stickstoffmonoxidradikal                   |
| <sup>1</sup> O <sub>2</sub> | Singulett-sauerstoff                       |
| <sup>3</sup> O <sub>2</sub> | Triplettsauerstoff                         |
| $\cdot$ OH                  | Hydroxylradikal                            |
| ONOO $^-$                   | Peroxynitrit                               |
| Phe                         | Phenylalanin                               |
| PM                          | Photomultiplier                            |
| PP                          | Polypropylen                               |
| QE                          | Quanteneffizienz                           |
| rel. LF                     | relative Luftfeuchtigkeit                  |
| RO $\cdot$                  | Alkoxyradikal                              |
| ROO $\cdot$                 | Peroxyradikal                              |
| ROOH                        | Hydroperoxide                              |
| ROS                         | <i>reactive oxygen species</i>             |
| SD                          | Standardabweichung                         |
| SOD                         | Superoxiddismutase                         |
| SSK                         | Strahlenschutzkommission                   |
| Tab.                        | Tabelle                                    |
| TBA                         | 2-Thiobarbitursäure                        |
| t-BOOH                      | tert-Butyl-hydroperoxid                    |
| Thr                         | Threonin                                   |



|   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| TMB                                       | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin     |
| Trp                                       | Tryptophan                        |
| u.  | und                               |
| UPE                                       | ultraschwache Photonenemission    |
| UPE <sub>BPO</sub>                        | Benzolyperoxid-induzierte UPE     |
| UPE <sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> | Wasserstoffperoxid-induzierte UPE |
| UPE <sub>Ozon</sub>                       | Ozon-inuzierte UPE                |
| UPE <sub>UV</sub>                         | UV-induzierte UPE                 |
| UPE <sub>UVA</sub>                        | UVA-inuzierte UPE                 |
| vgl.                                      | vergleiche                        |
| VIS                                       | <i>visible</i>                    |

# Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG.....</b>  | <b>14</b> |
| <b>2</b> | <b>PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG.....</b>   | <b>16</b> |
| <b>3</b> | <b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....</b>   | <b>17</b> |
| 3.1      | <b>Aufbau und Funktion der menschlichen Haut.....</b>                                 | <b>17</b> |
| 3.2      | <b>Sauerstoff und oxidativer Stress .....</b>   | <b>20</b> |
| 3.2.1    | Sauerstoffaktivierung und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) .....                      | 20        |
| 3.2.2    | Antioxidative Abwehrmechanismen.....  | 23        |
| 3.2.3    | Generierung von ROS und ihre Bedeutung für die Haut.....                              | 24        |
| 3.2.3.1  | Wechselwirkung von UV-Strahlung mit der Haut .....                                    | 25        |
| 3.2.3.2  | Mechanismen der Photooxidation .....  | 27        |
| 3.3      | <b>Methoden zur Messung und Quantifizierung oxidativer Prozesse in der Haut .....</b> | <b>30</b> |
| 3.4      | <b>Ultraschwache Photonenemission (UPE) .....</b>                                     | <b>36</b> |
| 3.4.1    | Begriffsdefinition .....  | 36        |
| 3.4.2    | Mechanismen der induzierten UPE .....   | 38        |
| 3.4.2.1  | Vorraussetzung für Chemilumineszenz.....  | 38        |
| 3.4.2.2  | Generierung angeregter Spezies und Emission von Photonen .....                        | 39        |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>   | <b>42</b> |
| 4.1      | <b>Messsysteme zur Detektion des UPE-Signals.....</b>                                 | <b>42</b> |
| 4.1.1    | Aufbau und Funktion des Photomultipliers (PM) .....                                   | 42        |
| 4.1.2    | UPE I-System .....  | 44        |
| 4.1.3    | SRUPE-System .....  | 45        |
| 4.1.4    | UPE II-System .....   | 50        |
| 4.2      | <b>Bestrahlungsquellen .....</b>  | <b>52</b> |
| 4.3      | <b><i>In vitro</i> Untersuchungen .....</b>   | <b>54</b> |
| 4.3.1    | UPE-Messung.....  | 54        |
| 4.3.2    | Bestimmung von Proteincarbonylverbindungen .....                                      | 56        |

---

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 4.3.3      | Oxygraphische Bestimmung von Wasserstoffperoxid.....  | 57        |
| 4.3.4      | Massenspektrometrie .....   | 60        |
| 4.3.5      | Gaschromatographische Bestimmung von CO <sub>2</sub> .....  | 60        |
| 4.3.6      | Fluorimetrische Bestimmung von Tryptophan.....  | 62        |
| <b>4.4</b> | <b>Ex vivo Untersuchungen .....</b>   | <b>64</b> |
| 4.4.1      | Schweinehaut .....  | 64        |
| 4.4.2      | Untersuchung des Einflusses von O <sub>2</sub> auf die UV-induzierte UPE.....                           | 65        |
| 4.4.3      | Geräte zur Untersuchung weiterer Einflussfaktoren auf die UV-induzierte UPE .....                       | 65        |
| <b>4.5</b> | <b>In vivo Untersuchungen .....</b>   | <b>67</b> |
| 4.5.1      | Probanden .....   | 67        |
| 4.5.2      | Studiendesign und Produktapplikation .....  | 67        |
| 4.5.3      | Messeinrichtung für Ozon-induzierte UPE .....   | 68        |
| <b>4.6</b> | <b>Statistische Auswertung .....</b>  | <b>69</b> |
| <b>5</b>   | <b>ERGEBNISSE.....</b>  | <b>70</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Untersuchung der stressinduzierten UPE auf der Haut.....</b>   | <b>72</b> |
| 5.1.1      | BPO-induzierte UPE (UPE <sub>BPO</sub> ) auf Humanhaut .....  | 72        |
| 5.1.2      | Ozon-induzierte UPE (UPE <sub>OZON</sub> ) auf Humanhaut .....  | 74        |
| 5.1.3      | UVA-induzierte UPE (UPE <sub>UVA</sub> ) auf Humanhaut.....   | 76        |
| 5.1.4      | Anteil tieferer Hautschichten an der UPE <sub>UVA</sub> .....   | 79        |
| 5.1.4.1    | Durchlässigkeit der Haut für induziertes UPE-Signal .....   | 79        |
| 5.1.4.2    | Abhängigkeit der UPE <sub>UVA</sub> von der Schichtdicke der bestrahlten Haut .....                     | 80        |
| 5.1.4.3    | Spektrale Verteilung der stressinduzierten UPE auf Schweinehaut .....                                   | 81        |
| <b>5.2</b> | <b>Untersuchung oxidativer Prozesse in vitro .....</b>  | <b>83</b> |
| 5.2.1      | Induzierte UPE nach Reaktion von BSA mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                            | 83        |
| 5.2.1.1    | Kinetische Untersuchung der UPE <sub>H2O2</sub> .....   | 85        |
| 5.2.1.2    | Einfluss des pH-Wertes der Reaktionslösung auf die UPE <sub>H2O2</sub> .....                            | 87        |
| 5.2.1.3    | Einfluss von Phosphatpuffer auf die UPE <sub>H2O2</sub> .....   | 88        |
| 5.2.1.4    | Umsatz von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in der Reaktion mit BSA und BSA + Fe <sup>2+</sup> -Ionen..... | 89        |
| 5.2.1.5    | Einfluss von Fe <sup>2+</sup> -Ionen auf die UPE <sub>H2O2</sub> .....                                  | 92        |
| 5.2.1.6    | Spektrale Verteilung der UPE <sub>H2O2</sub> .....  | 94        |
| 5.2.1.7    | Bestimmung von Carbonylverbindungen (CV) und Vergleich mit der UPE-<br>Messung .....                    | 95        |

---

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 5.2.2      | Induzierte UPE nach Reaktion von Aminosäuren (AS) mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....  | 98         |
| 5.2.2.1    | Massenspektrometrische Untersuchung der oxidativen Modifikationen von AS<br>nach Reaktion mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Fe <sup>2+</sup> ..... | 100        |
| 5.2.2.2    | Bestimmung von CO <sub>2</sub> nach Reaktion von His mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Fe <sup>2+</sup> .....  | 108        |
| 5.2.2.3    | Untersuchung der UPE <sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> nach Reaktion von AS-Mischungen mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Fe <sup>2+</sup> .....                                  | 109        |
| 5.2.2.4    | Einfluss von Hydrogencarbonat (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) auf die UPE <sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> .....   | 112        |
| 5.2.2.5    | Fluorimetrische Bestimmung von Trp und seine Oxidationsprodukte.....   | 117        |
| <b>5.3</b> | <b>Untersuchung potentieller Einflussfaktoren der UPE<sub>UV</sub> .....</b>   | <b>121</b> |
| 5.3.1      | Auswahl geeigneter Messfenster (Integrale) zur Untersuchung der Kinetik des<br>lichtinduzierten UPE-Signals .....  | 121        |
| 5.3.2      | Abhängigkeit der lichtinduzierten UPE von der Wellenlänge der Anregungsstrahlung<br>.....  | 123        |
| 5.3.3      | Abhängigkeit der UPE <sub>UV / UVA</sub> von der UV / UVA-Dosis .....  | 124        |
| 5.3.4      | Abhängigkeit der UPE <sub>UV</sub> vom pH-Wert der Haut.....   | 127        |
| 5.3.5      | Abhängigkeit der UPE <sub>UV/UVA</sub> von der Hautfeuchtigkeit.....   | 129        |
| 5.3.6      | Einfluss von O <sub>2</sub> auf die UPE <sub>UV / UVA</sub> .....  | 132        |
| 5.3.7      | Einfluss von Hauttemperatur auf die UPE <sub>UV / UVA</sub> .....  | 138        |
| 5.3.8      | Einfluss von Phosphoreszenzlöscher (Quencher) auf die UPE <sub>UV</sub> .....  | 141        |
| <b>6</b>   | <b>DISKUSSION .....</b>  | <b>144</b> |
| <b>6.1</b> | <b>Stressinduzierte UPE auf der Haut .....</b>   | <b>144</b> |
| 6.1.1      | Durchlässigkeit der Haut für induziertes UPE-Signal und die Beteiligung tieferer<br>Hautschichten an der UPE <sub>UVA</sub> .....  | 146        |
| 6.1.2      | Spektrale Verteilung der stressinduzierten UPE .....   | 146        |
| <b>6.2</b> | <b>Zusammenhang zwischen <i>in vitro</i> Oxidationsreaktionen und Emission von Photonen<br/>.....</b>  | <b>147</b> |
| 6.2.1      | Oxidative Modifikation von BSA .....   | 147        |
| 6.2.2      | Oxidative Modifikation von Aminosäuren .....   | 150        |
| 6.2.3      | Einfluss von Puffersystemen auf die UPE <sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> .....  | 154        |
| <b>6.3</b> | <b>Mechanismen der lichtinduzierten UPE-Generierung in der Haut .....</b>  | <b>157</b> |
| <b>7</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>162</b> |
| <b>8</b>   | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>  | <b>166</b> |

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>9 ANHANG .....</b>                               | <b>176</b> |
| <b>9.1 Chemikalien- und Gefahrstoffanhang .....</b> | <b>176</b> |
| <b>9.2 Eidesstattliche Erklärung .....</b>          | <b>177</b> |
| <b>9.3 Lebenslauf.....</b>                          | <b>178</b> |

# 1 Einleitung

Die Entdeckung des Enzyms Superoxid-Dismutase (SOD) durch McCord und Fridovich 1969 markierte einen Wendepunkt in der Erforschung des oxidativen Stresses. Die Charakterisierung dieses Enzyms, dessen einzige Funktion in der Umwandlung des Superoxidanion-Radikals in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid [McCord & Fridovich 1969] besteht, unterstrich die biologische Relevanz der Sauerstofftoxizität.

Heute versteht man unter oxidativem Stress ein Ungleichgewicht zwischen der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (Reactive oxygen species, ROS) und deren Abbau durch antioxidative Abwehrmechanismen der Zelle. Neben anderen Faktoren wird oxidativer Stress für viele Erkrankungen wie z. B. Krebs [Marnett 2000], Arteriosklerose [Schnackenberg 2002], Morbus-Alzheimer und Morbus-Parkinson [Smith et al 1996; Cohen 2000] verantwortlich gemacht.

Auch für die Dermatologie hat die Untersuchung von oxidativem Stress und die Wechselwirkung zwischen ROS und der Haut an Bedeutung gewonnen. Die Haut bildet mit ca. 2 m<sup>2</sup> Oberfläche die erste Verteidigungslinie des Körpers gegenüber einer Reihe von Umwelttoxinen wie z.B. UV-Strahlung, Ozon und Luftverschmutzung. Hinzu kommen endogene Quellen für ROS wie z. B. die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien [Lenaz 1998] und der Abbau der Purinbasen durch Xanthin-Oxidase [Friedl et al 1989], so dass die Haut einen ständigen Kampf gegen oxidativen Stress führt. Versagen dabei die antioxidativen Schutzmechanismen, kommt es zur Schädigung verschiedener Makromoleküle wie z. B. DNA [Marnett 2000], Lipiden [Shindo et al 1994a] und Proteinen [Stadtman & Levine 2003] und als Folge zur erhöhten Inzidenz von Hauttumoren [Armstrong & Krickler 2001] und zur klinischen Manifestation der Altershaut, mit Verlust der Elastizität und Faltenbildung [Benedetto 1998].

Für die Untersuchung oxidativer Prozesse in der Haut und Etablierung erfolgreicher Wirkprinzipien gegen Hautalterung braucht es Messmethoden, die oxidativen Stress charakterisieren können. Besonders für *in vivo* Messungen an Probanden sind Methoden gefragt, die eine nicht invasive Untersuchung der oxidativen Prozesse erlauben.

Neben anderen Methoden (vgl. Kap. 3.3) ist die Chemilumineszenzmessung (CLZ-Messung) besonders für die nicht invasive Erfassung oxidativer Prozesse geeignet. Sie wurde von einigen Arbeitsgruppen eingesetzt, vor allem um UVA

induzierten oxidativen Stress und den Schutzeffekt topisch applizierter Antioxidantien zu untersuchen. Hierbei zeigte sich eine Abhängigkeit des CLZ-Signals von oxidativen Prozessen und es konnte eine Reduzierung der UVA induzierten CLZ nach topischer Applikation von Antioxidantien festgestellt werden [EVELSON et al 1997; SAUERMANN et al 1999; YASUI & SAKURAI 2000].

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Die exakten Mechanismen der UV induzierten Chemilumineszenz (CLZ) sind nicht bekannt. Nach bisheriger Datenlage wird die Erzeugung von ROS nach UV-Bestrahlung und die anschließende oxidative Modifizierung von Makromolekülen der Haut für die Emission der Photonen verantwortlich gemacht [EVELSON et al 1997; YASUI & SAKURAI 2000]. Für den effektiven Einsatz der CLZ-Messung zur Entwicklung zielgerichteter Substanzen gegen oxidativen Stress wäre ein besseres Verständnis der Mechanismen der UV induzierten CLZ sehr hilfreich.

Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung der oxidativen Prozesse, die für die Emission von Photonen in der Haut verantwortlich sind. Neben der UV-Strahlung kamen auch andere Stressoren wie z. B. Ozon, Wasserstoffperoxid und Benzoylperoxid zum Einsatz.

Gemäß dieser Zielsetzung ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Welche Einflussgrößen gibt es bei der UV induzierten CLZ?
- Welche Hautschichten sind an der Generierung des UV-induzierten CLZ-Signals beteiligt?
- Welchen Einfluss haben Antioxidantien auf das stressinduzierte CLZ-Signal?
- Wie sieht die spektrale Verteilung des stressinduzierten CLZ-Signals aus und lässt sich daraus eventuell mehr über die angeregten Zustände und die Mechanismen ihrer Generierung schlussfolgern?

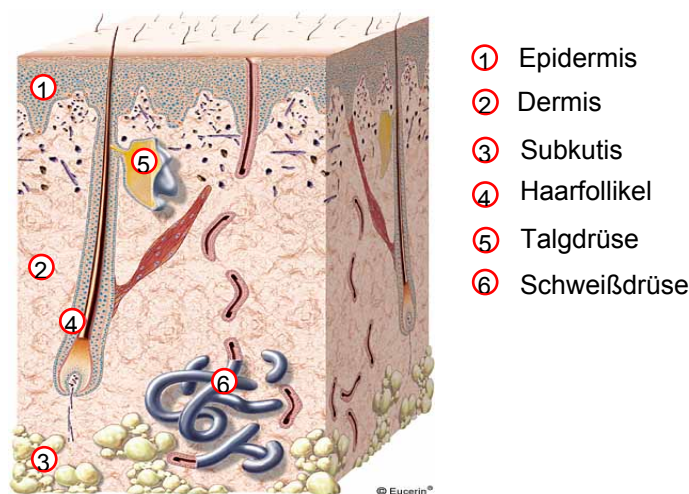


## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die Haut ist mit fast 2 m<sup>2</sup> Gesamtfläche und einem Anteil von ca. 15 % am Körpergewicht das größte Organ des Menschen und erfüllt eine Reihe lebenswichtiger Aufgaben. Neben dem Schutz vor chemischen, physikalischen und mechanischen Schädigungen verhindert sie das Eindringen von Mikroorganismen und spielt eine wichtige Rolle im Wasserhaushalt des Körpers. Über die Verdunstung an der Hautoberfläche ist sie an der Regulation der Körpertemperatur beteiligt und verhindert trotzdem den unkontrollierten Wasserverlust. Weiterhin ist die Haut eines der wichtigsten Sinnesorgane und besitzt Stoffwechselfunktionen wie z. B. die Biosynthese von Vitamin D<sub>3</sub> und Cholesterin [HEYMANN 1994; JUNG & MOLL 1995; RAWLINGS 2003].

Die Haut lässt sich grob in Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subcutis (Unterhautfettgewebe) einteilen (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1: Schematische Darstellung der menschlichen Haut [http://www.Eucerin.de/skin/skincell\_1.html].**

Die Epidermis variiert in ihrer Dicke zwischen 50 µm an den Augenlidern und 1 mm an Handflächen und Fußsohlen. Sie besteht zu über 90 % aus Zellen, von denen Keratinozyten mit 90 – 95 % den größten Anteil haben [PUGLIESE 1995; KANITAKIS 2002]. Die Keratinozyten befinden sich in einem ständigen Differenzierungsprozess, in dessen Verlauf sie sich über mehrere Zwischenstufen von jungen, teilungsfähigen Basalzellen in tote, kernlose und verhornte Zellen

(Korneozyten) umwandeln. Dieser Prozess beginnt an der Grenze zwischen Dermis und Epidermis (Basalmembran), an der die Basalzellen durch ständige Teilung ihre Tochterzellen immer mehr nach außen drängen. Dabei füllen sich die Keratinozyten mehr und mehr mit Keratin und flachen ab. Es kommt zur Bildung von membranbegrenzten Lipidgranula (Odland bodies) und den Keratohyalin granula, die zusammen eine entscheidende Rolle bei der Struktur und Barrierefunktion des Stratum corneums spielen [HEYMANN 1994; KANITAKIS 2002; RAWLINGS 2003].

Die Differenzierung der Epidermis dauert in der Regel zwischen 28 – 30 Tagen und führt zu morphologisch und biochemisch vier unterscheidbaren Schichten (Strata), die von außen nach innen wie folgt bezeichnet werden: Stratum corneum (Hornschicht), Stratum granulosum (Granularzellschicht), Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und Stratum basale (Basalschicht).

Weitere in der Epidermis vorkommende Zellpopulationen sind die Melanozyten, die das Hauptpigment Melanin synthetisieren, immunologisch aktive Langerhanszellen sowie Mechanorezeptoren (Mekel-Zellen) [HEYMANN 1994; KANITAKIS 2002].

Die Dermis ist durch die Basalmembran relativ scharf von der Epidermis abgegrenzt. Diese Grenze ist keine ebene Fläche, sondern eine enge wellenförmige Verzahnung, die durch höckerförmige Ausstülpungen (Papillen) der Dermis in die Epidermis gebildet wird. In den Papillen der Dermis befinden sich Blutkapillaren, die die blutgefäßlose Epidermis mit Nährstoffen versorgen. Neben der Versorgung der Epidermis ist die Dermis für die Reißfestigkeit und Elastizität der Haut verantwortlich. Die mechanischen Eigenschaften der Dermis werden durch eine Matrix aus Strukturproteinen gewährleistet, die zum größten Teil aus Kollagen, hauptsächlich Typ I und Typ III und im geringeren Maße aus Elastin besteht. In den Hohlräumen dieses Netzwerkes befindet sich neben Zellen eine viskose Grundsubstanz, die aus stark wasserbindenden Glykosaminoglykanen besteht. In die Dermis sind außerdem verschiedene Anhangsgebilde, wie z. B. Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen eingebettet.

Zelluläre Bestandteile der Dermis sind Fibroblasten, die für den Aufbau des Kollagenetzwerkes verantwortlich sind sowie immunologisch aktive Mastzellen und Makrophagen.

Die Subcutis ist ein läppchenartig aufgebautes Fettgewebe mit bindegewebigen Septen als Träger der Gefäß- und Nervenversorgung und dient im wesentlichen

als Kälteschutz, Energiereserve und Druckpolster [HEYMANN 1994; KANITAKIS 2002].

## 3.2 Sauerstoff und oxidativer Stress

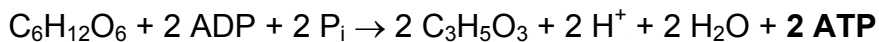
### 3.2.1 Sauerstoffaktivierung und reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Molekularer Sauerstoff besitzt im Grundzustand trotz seiner geraden Zahl von zwölf Valenzelektronen zwei ungepaarte Elektronen, die parallelen Spin aufweisen und zwei antibindende  $\pi^*$ -Orbitale besetzen. Daraus ergibt sich eine Gesamtspinquantenzahl von  $S = 1$  und eine Multiplizität von  $M = 3$  ( $2 * S + 1$ ). Das Sauerstoffmolekül liegt somit im Triplettzustand ( $^3O_2$ ) vor und ist paramagnetisch [DUCHSTEIN & GURKA 1992].

Die allermeisten Stoffe in der Natur haben im Grundzustand eine Singulettmultiplizität und sind vor einer schnellen chemischen Reaktion mit Sauerstoff im Triplettzustand aufgrund der Spinbarriere zwischen Singulett- und Triplettzustand geschützt. Das Leben in seiner Formenvielfalt wäre ohne diesen Effekt in einer sauerstoffhaltigen Atmosphäre nicht möglich [ADAM & CILENTO 1982; DUCHSTEIN & GURKA 1992].

Vergleicht man die Energiebilanz des anaeroben mit dem aeroben Abbauprozess der Glucose,

anaerobe Glykolyse:



aerober Stoffwechsel von Glucose:



so wird deutlich, dass die Aktivierung von Sauerstoff als Voraussetzung für aeroben Stoffwechsel einen deutlichen Vorteil (19-mal effektiver) bei der Energiegewinnung darstellt. Andererseits geht die Sauerstoffaktivierung auch mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) einher, die mit der Zeit zur Schädigung von Zellbestandteilen führen [VOET et al 2002] können.

Für eine Aktivierung von  $^3O_2$  muss eine Veränderung der Elektronenkonfiguration in den  $\pi^*$ -Orbitalen stattfinden. Dies kann entweder durch einen Spinumkehr bei einem der beiden ungepaarten Elektronen oder durch Aufnahme weiterer Elektronen erfolgen. Beim ersteren entsteht Sauerstoff im Singulettzustand, bei dem zwei Elektronen mit antiparallelem Spin entweder als Paar eines der beiden  $\pi^*$ -Orbitale besetzen ( $^1\Delta_g O_2$  oder  $^1O_2$ ;  $\Delta E$  94,7 kJ) oder sich über beide  $\pi^*$ -Orbitale verteilen ( $^1\Sigma_g^+ O_2$ ;  $\Delta E$  157,9 kJ). Letzterem Singulettzustand ( $^1\Sigma_g^+ O_2$ ) wird allerdings aufgrund der höheren Aktivierungsenergie und kürzerer Lebensdauer für biologische Systeme kaum eine Bedeutung zugeschrieben

[DUCHSTEIN & GURKA 1992]. Die Energieübertragung für die Spinumkehr erfolgt häufig über Photosensibilisatoren, die durch die Aufnahme von Strahlungsenergie in den angeregten Singulettzustand  $^1S^*$  überführt werden. Durch Übergang des angeregten Elektrons unter Spinumkehr auf ein niedrigeres Energieniveau entsteht der Triplettzustand des Sensibilisators  $^3S^*$ . In diesem Zustand kann der Sensibilisator aufgrund der Spinsymmetrie mit  $^3O_2$  reagieren, wobei  $^1O_2$  gebildet und der Sensibilisator in seinen Ausgangszustand zurückkehrt [FOOTE 1988]. Verglichen mit  $^3O_2$  ist Sauerstoff im Singulettzustand aufgrund der Aufhebung der Spinbarriere ein deutlich stärkeres Oxidationsmittel gegenüber organische Verbindungen und gilt insbesondere für UV-induzierte Zellschädigung als ein Schlüsselmolekül [DAVIES & TRUSCOTT 2001; GIROTTI 2001; RAVANAT et al 2001].

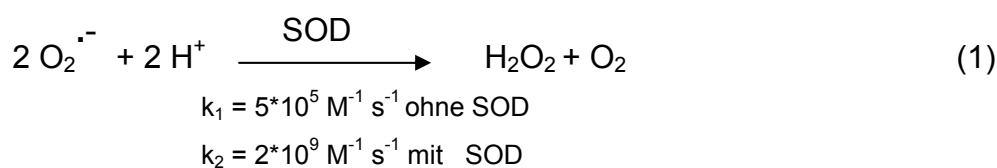
Die zweite Möglichkeit der Sauerstoffaktivierung, nämlich die Aufnahme weiterer Elektronen, erfolgt meistens durch Enzymkomplexe, die über Metallionen eine Bindung zum Triplett-Sauerstoff eingehen und somit die Spinbarriere für Elektronenübergänge aufheben. Aus  $^3O_2$  können durch Aufnahme von Elektronen folgende ROS entstehen [DUCHSTEIN & GURKA 1992]:

$O_2^{\bullet -}$             Superoxidation – Radikal

$H_2O_2$             Wasserstoffperoxid

$\cdot OH$             Hydroxylradikal

Das Superoxidation-Radikal entsteht durch Ein-Elektronen-Reduktion des Sauerstoffmoleküls und hat eine Schlüsselfunktion bei der Bildung weiterer ROS, denn  $O_2^{\bullet -}$  zerfällt nach einer Disproportionierungsreaktion (Dismutation) in  $H_2O_2$  und  $O_2$  (Reaktion 1). Die Dismutation wird durch das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) stark beschleunigt [DARR 1988].



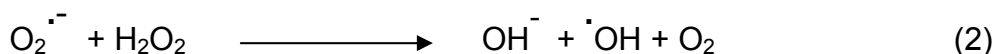
Physiologisch kann  $O_2^{\bullet -}$  z. B. in den Mitochondrien entstehen. Es wurde berechnet, dass ca. 1 – 4 % des umgesetzten Sauerstoffes in der Atmungskette nur unvollständig reduziert wird und somit ROS entstehen [LENAZ 1998]. Weitere enzymatische Quellen für  $O_2^{\bullet -}$  sind unter anderem die membrangebundene NADPH-Oxidase bei Granulozyten und Makrophagen [DARR & FRIDOVICH 1994] und Xanthinoxidase [FRIEDL et al 1989]. Die nicht enzymatische Autoxidationen

einiger Biomoleküle wie z. B. Hämoglobin, [MISRA & FRIDOVICH 1972] Katecholamine [COHEN & HEIKKILA 1974] und Cytochrom c [CASSELL & FRIDOVICH 1975] können ebenfalls  $O_2^{\bullet -}$  produzieren.

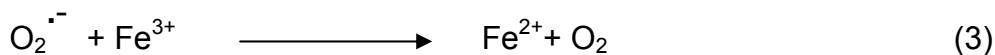
Wasserstoffperoxid kann auch über flavin gebundene Oxidasen direkt gebildet werden [MERRILL et al 1981]. Die größte Quelle der  $H_2O_2$ -Produktion ist jedoch die Dismutation von  $O_2^{\bullet -}$ . Obwohl das  $H_2O_2$ -Molekül relativ wenig reaktiv ist, spielt es eine wichtige Rolle beim oxidativen Stress. Seine lange Lebensdauer und das Fehlen einer Ladung ermöglichen einen Durchtritt durch Membranen und somit Schädigung auch außerhalb des Entstehungsortes. Durch Aufnahme eines weiteren Elektrons, verbunden mit der Spaltung der Sauerstoffbindung, entsteht aus  $H_2O_2$  neben dem Reaktionsprodukt  $OH^-$  das hochreaktive Hydroxylradikal [COHEN & HEIKKILA 1974; DUCHSTEIN & GURKA 1992].

Das Hydroxylradikal gehört zu den stärksten Oxidantien in biologischen Systemen. Es hat eine extrem kurze Lebensdauer und die meisten Reaktionen von  $\cdot OH$  mit Biomolekülen sind lediglich diffusionskontrolliert. Durch Reaktion von  $\cdot OH$  mit organischen Substanzen entstehen Radikale, die wiederum leicht mit dem sonst trägen Sauerstoffmolekül unter Bildung weiterer Radikale reagieren und somit eine Kettenreaktion in Gang setzen können [ADAM & CILENTO 1982].

Hydroxylradikale können z. B. nach Reduktion von  $H_2O_2$  durch  $O_2^{\bullet -}$  (Reaktion 2), die so genannte Haber-Weiss Reaktion entstehen [HABER & WEISS 1934].



George zeigte aber, dass diese Reaktion im Vergleich zur Dismutation von  $O_2^{\bullet -}$  sehr viel langsamer ist und nur katalysiert durch Eisensalze ablaufen kann [GEORGE 1947; BARB et al 1949] (Reaktion 3 u. 4).



Reaktion 4 wird als Fenton Reaktion bezeichnet [FENTON 1894] und die Gesamtreaktion aus 3 und 4 wird als metallkatalysierte Haber-Weiss Reaktion beschrieben [DARR 1988].

Weitere reaktive Spezies sind das Stickstoffmonoxid-Radikal ( $NO\cdot$ ) und sein Reaktionsprodukt mit  $O_2^{\bullet -}$ , das Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), hypochlorige Säure ( $HOCl$ ),

Ozon, sowie Alkoxy- ( $\text{RO}^\cdot$ ) und Peroxylradikale ( $\text{ROO}^\cdot$ ) [DARR & FRIDOVICH 1994; PUGLIESE 1995; KOHEN 1999; KUMARATHASAN et al 2001].

### 3.2.2 Antioxidative Abwehrmechanismen

Aerober Stoffwechsel und exogene Noxen erfordern effektive Abwehrmechanismen gegen ROS. Im Laufe der Evolution hat sich die Haut mit einem effizienten Netzwerk aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien an die prooxidativen Bedingungen angepasst.

#### **Enzymatische Antioxidantien:**

Zu den enzymatischen Antioxidantien gehören Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase, Gluthathion-Peroxidase und -Reduktase (GSH-Px, GSSG-Red) [SHINDO et al 1994b]. SOD kommt in der Haut als Kupfer/Zink SOD (Cu/Zn-SOD) und Mangan SOD (Mn-SOD) vor, wobei Cu/Zn-SOD im Cytosol und Mn-SOD in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist. SOD ist für den Abbau von Superoxidanion-Radikalen durch eine Disproportionierungsreaktion zu  $\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  verantwortlich. Das Hämprotein Katalase kommt vorwiegend in den Peroxisomen vor und katalysiert die Disproportionierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Wasser und  $\text{O}_2$ . GSH-Px ist ein Selenoprotein und kann sowohl  $\text{H}_2\text{O}_2$  als auch verschiedene organische Hydroperoxide entgiften. Hierbei erfolgt die Umsetzung der Peroxide nicht wie bei Katalase in einer Disproportionierungsreaktion, sondern über eine zwei-Elektronenreduktion. Als Reduktionsmittel wird dabei Glutathion (GSH) zum Disulfid (GSSG) oxidiert. Die Rückreduktion von GSSG zu GSH wird durch das Flavoprotein GSSG-Red unter NADPH-Verbrauch vollzogen [FUCHS et al 1992; AFAQ & MUKHTAR 2001].

#### **Nicht-enzymatische Antioxidantien:**

Die nicht-enzymatischen Antioxidantien der Haut lassen sich in lipophile und hydrophile Antioxidantien aufteilen. Zu der lipophilen Gruppe gehören  $\alpha/\gamma$ -Tocopherol (Vitamin E) und das Redoxsystem Ubichinol / Ubichinon. Ascorbinsäure (Vitamin C), Harnsäure und Glutathion bilden die hydrophile Gruppe [SHINDO et al 1994b].

Vitamin E lagert sich aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft in Lipidmembranen ein und kann hier durch das Abfangen von Peroxylradikalen die Radikalkettenreaktion zum Abbruch bringen [FUCHS et al 1992].

Mit einem Redoxpotential von 0,282 V ( $E_0 \text{ AA}^\cdot/\text{AA}^-$ , pH 7) [BUETTNER & JURKIEWICZ 1996] ist Vitamin C in der Lage die meisten organischen Radikale einschließlich des Tocopheroxyl-Radikals zu reduzieren. Dabei wird Vitamin C in zwei

reversiblen Schritten über das Semidehydroascorbat ( $AA^{\cdot-}$ ) zu Dehydroascorbat (DHA) oxidiert. Die Rückreduktion erfolgt im Falle von  $AA^{\cdot-}$  durch die NADH-abhängige  $AA^{\cdot-}$ -Reduktase und bei DHA entweder direkt durch GSH oder durch das GSH-abhängige Enzym DHA-Reduktase [WELLS & JUNG 1997].

Das Redoxsystem Ubichinol/Ubichinon ist für den Transport von Protonen und Elektronen entlang der Membranen verantwortlich. Neben dieser Funktion kann Ubichinol Lipidperoxidationen unterbinden und zusammen mit Vitamin C verbrauchtes Vitamin E regenerieren [GUTMAN 1980; CABRINI et al 1986].

Thiele hat ausführlich das antioxidative Netzwerk der Haut und die Auswirkung von Umwelttoxinen auf dieses System beschrieben [THIELE et al 2000].

### **3.2.3 Generierung von ROS und ihre Bedeutung für die Haut**

In der vorliegenden Arbeit steht die schädigende Wirkung von ROS resultierend aus der oxidativen Modifikation von Biomolekülen im Vordergrund. Es soll aber nicht verschwiegen werden, dass ROS auch eine entscheidende Rolle bei physiologisch fundamentalen Prozessen wie beispielsweise der Infektabwehr und der Regulation von Zellfunktionen spielen [DROGE 2002].

Ein wichtiger Teil der Infektabwehr ist die Phagozytose bei der neben Freisetzung von Proteasen und Lipasen antimikrobiell wirksame Sauerstoffmetaboliten wie z.B.  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  und HOCl für die Inaktivierung von Mikroorganismen verantwortlich sind [HAMPTON et al 1998]. Die regulatorische Einflussnahme der ROS ist sehr vielfältig. Sie umfasst die Steuerung des vaskulären Tonus durch Aktivierung der Guanylat-Cyclase [IGNARRO et al 1984; IGNARRO & KADOWITZ 1985], die Beteiligung am programmierten Zelltod (Apoptose) [SLATER et al 1995; DUMONT et al 1999], die Aktivierung von Proteinkinasen [KONISHI et al 1997] und die Kontrolle der Genexpression über Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 und NF- $\kappa$ B [SCHRECK et al 1991; MEYER et al 1993].

Die Generierung von ROS findet ubiquitär im Organismus in geringen doch nachweisbaren Konzentration statt und resultiert aus einem Gleichgewicht zwischen Produktions- und Abbaumechanismen, welches streng kontrolliert ist (Redox-Homöostase) [HALLIWELL & GUTTERIDGE 1989]. Eine kurzfristige Störung dieses Gleichgewichtes aktiviert redoxempfindliche Signalkaskaden, die über eine gesteigerte Expression von enzymatischen Antioxidantien oder eine Inhibierung der ROS Synthese die Redox-Homöostase auf das Ursprungsniveau einstellen. Eine erhöhte Produktion von ROS, die über regulatorischen Abwehrmechanismen nicht kompensiert werden kann, führt über längere Zeit zu einer Verschiebung des



Gleichgewichts in Richtung oxidativer Bedingungen (oxidativer Stress) und damit zur Schädigung zellulärer Bestandteile [HAMPTON et al 1998].

Die Haut ist durch den direkten Kontakt zur Umwelt einer Reihe Noxen wie UV-Strahlung, Ozon und Luftverschmutzung ausgesetzt, die zusätzlich zu intrinsischen Quellen die Belastung durch ROS erhöhen [THIELE et al 1997b; KOHEN 1999; WENK et al 2001]. Von den genannten Noxen ist besonders die UV-Strahlung für die Schädigung der Haut von großer Bedeutung, denn sie erreicht direkt lebende Zellschichten [DIFFEY 2002].

### 3.2.3.1 Wechselwirkung von UV-Strahlung mit der Haut

Als UV-Strahlung bezeichnet man elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 200 – 400 nm. Zur Charakterisierung der spektralen Abhängigkeit photobiologischer Wirkung hat sich die Einteilung der UV-Strahlung in die Bereiche UVC (200 – 290 nm), UVB (290 – 320 nm) und UVA (320 – 400 nm) durchgesetzt. Aufgrund der Filterwirkung der Atmosphäre, insbesondere der in der Stratosphäre vorhandenen Ozonschicht, erreicht nur Strahlung oberhalb von 290 nm die Erdoberfläche [DIFFEY 2002]. Innerhalb dieser Strahlung beträgt der UV-Anteil (290 – 400nm) ca. 5 %, wovon 96 % innerhalb des UVA-Bereiches liegen [DIFFEY 2002]. Trifft UV-Strahlung auf die Hautoberfläche, dringt sie in Abhängigkeit ihres Energiegehaltes unterschiedlich tief in die Haut ein (Abb. 3.2).

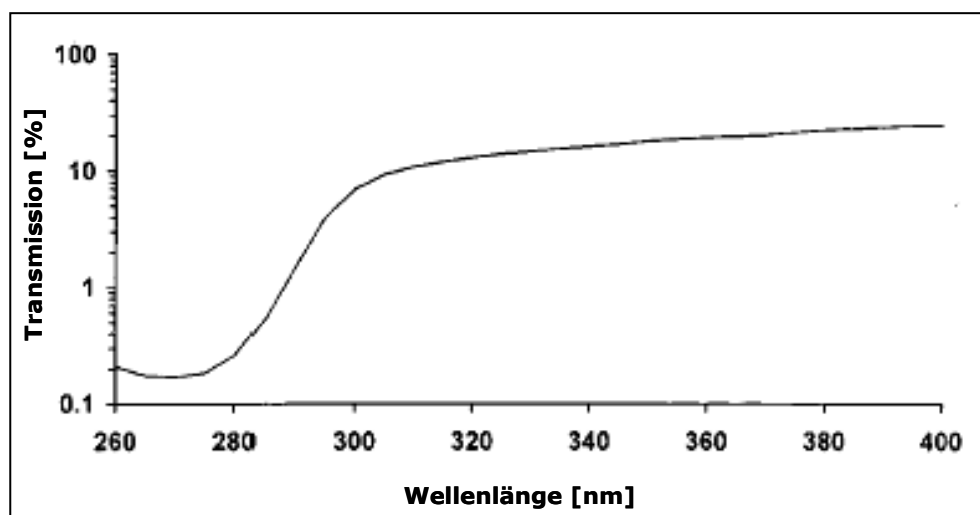


Abb. 3.2: Transmission von UV-Strahlung durch abgetrennte Human-Epidermis (Diffey 2002).

Die Eindringtiefe der UV-Strahlung nimmt mit zunehmendem Energiegehalt ab, so dass kurzwellige, energiereiche Strahlung im Bereich 290 – 300 nm nahezu

vollständig in der Epidermis absorbiert wird. Mit zunehmender Wellenlänge wächst der Anteil der UV-Strahlung, der in dermalen Schichten eindringt stetig. Dieser Anteil beträgt bei 313 nm ca. 10 % und steigt bei 365 nm bis auf ca. 20 % an [BRULS et al 1984; DIFFEY 2002].

Seit den letzten Jahrzehnten beobachtet die Strahlenschutzkommission (SSK) eine besorgniserregende Zunahme der UV-induzierten akuten und chronischen Hautschäden sowie Hautkrebserkrankungen (Basalzell- und Plattenepithelkarzinom sowie Melanom)\*. Zu einem großen Teil hängt dies mit einer erhöhten UV-Exposition zusammen, die einerseits durch die Ausdünnung der stratosphärischen Ozonschicht und andererseits durch das veränderte Freizeitverhalten und das Schönheitsideal einer ganzjährig gebräunten Haut zustande kommt.

Die physiologischen Reaktionen der Haut nach UV-Exposition sind mannigfaltig. Zu den akuten Effekten zählen die Stimulation der Pigmentierung, die Immunsuppression, die epidermale Hyperplasie (Lichtschwiele) und die inflammatorische Antwort mit der Ausbildung eines UV-Erythems [SOTER 1990; NORVAL 2001]. Chronische UV-Belastung führt neben einer Erhöhung der Inzidenz von Hauttumoren [ARMSTRONG & KRICKER 2001] zu einer Veränderung des Hautbildes, die sich sowohl optisch als auch in ihren mechanischen Eigenschaften widerspiegelt (Photoalterung oder Photoaging). Histologisch kann diese von der intrinsischen Alterung der Haut abgegrenzt werden [BENEDETTO 1998; WLASCHEK et al 2001].

Die biologische Wirkung der UV-Strahlung basiert auf einer photochemischen Modifikation von Biomolekülen (DNA, Proteine, Lipide), die entweder durch direkte Absorption der UV-Strahlung oder über Oxidationsprozesse durch UV-induzierte ROS und freie Radikale erfolgen kann. Eine direkte Modifikation der Biomoleküle findet überwiegend durch UVB-Strahlung statt, wobei DNA, aromatische Aminosäuren und Urocaninsäure die Hauptabsorber sind [YOUNG 1997]. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Bildung kovalenter Verknüpfungen zwischen benachbarten Pyrimidinbasen, die zur Ausbildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) und Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Photoaddukten (6-4-PP) führt. Mutationen im Tumor Suppressor Gen p53, die durch CPD und 6-4-PP entstehen,

---

\* Environmental UV-Radiation, Risk of Skin Cancer and Primary Prevention. Veröffentlichungen der Strahlenschutzkommission. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1996)

Ultraviolette Strahlung und malignes Melanom. Berichte der Strahlenschutzkommission. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1999)

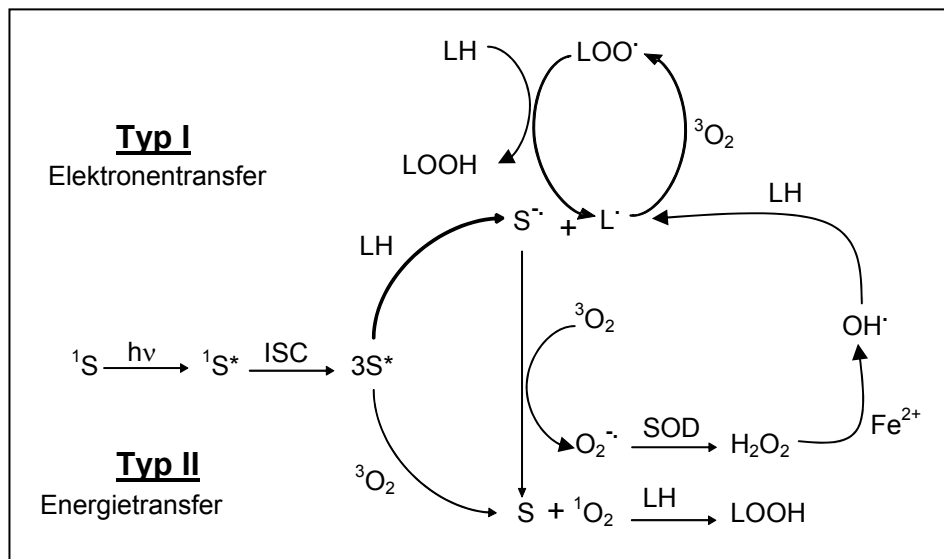
können mittlerweile als charakteristische Schädigung der DNA durch UVB-Strahlung angesehen werden [DE GRUIJL 2002].

UVA-Strahlung wirkt hauptsächlich durch photoinduzierte Generierung von ROS und freien Radikalen. An diesem Prozess sind endogene Chromophore (Photosensibilisatoren), wie z. B. Porphyrine (Protoporphyrin), Flavine (Riboflavin), Chinone (Ubichinon) oder andere Co-Enzyme wie NADH und NADPH beteiligt, die Lichtenergie auf  $^3\text{O}_2$  unter Bildung von ROS übertragen [DALLE CARBONARE & PATHAK 1992; YOUNG 1997] oder direkt die Entstehung freier Radikale induzieren. Neben der Bildung von ROS durch die genannten Photosensibilisatoren, können ROS auch nach UV-Bestrahlung von Strukturproteinen der Dermis nachgewiesen werden [WONDRAK et al 2003].

Beobachtete Schäden, die durch ROS in der Haut ausgelöst werden, sind Modifikationen von DNA-Basen [MARNETT 2000], die Oxidation von Proteinen, welche mit einem Aktivitätsverlust (Enzyme) oder Funktionsverlust (Strukturproteine) einhergeht [STADTMAN 2001] und die Bildung von Lipidperoxiden, verbunden mit einer Störung der Membranintegrität und Entstehung cytotoxischer Abbauprodukte [MICHIELS & REMACLE 1991; GIROTTI 2001]. Darüber hinaus sind ROS an allen drei Phasen der Karzinogenese (Initiation, Promotion und Progression) beteiligt [SANDER et al 2004]. Diese führen über die Aktivierung von AP-1 zu einer erhöhten Synthese von kollagenabbauenden Metalloproteinasen (MMP-1, MMP-3 und MMP-9), was zum Erscheinungsbild photogealterter Haut mit Elastizitätsverlust und Faltenbildung beiträgt [FISHER et al 2002]. Die durch ROS vermittelten Schäden der Haut werden zusätzlich durch eine UV-induzierte Abschwächung des antioxidativen Netzwerkes [FUCHS et al 1989; AFAQ & MUKHTAR 2001] und die Freisetzung von katalytisch aktiven Eisenionen aus eisenspeichernden Proteinen (Ferritin, Transferrin und Lactoferrin) verstärkt [BISSETT et al 1991; KITAZAWA & IWASAKI 1999].

### 3.2.3.2 Mechanismen der Photooxidation

Die Mechanismen der lichtinduzierten Oxidation (Photooxidation) lassen sich in zwei Kategorien einteilen, die als Typ-I bzw. Typ-II Mechanismus bezeichnet werden (Abb. 3.3). Der Typ-I Mechanismus ist durch einen Elektronentransfer von dem zu oxidierenden Substrat auf den angeregten Sensibilisator gekennzeichnet, wogegen der Typ II Mechanismus im wesentlichen auf einem Energietransfer zwischen dem Sensibilisator im angeregten Zustand und  $^3\text{O}_2$  beruht [FOOTE 1988].



**Abb. 3.3: Typ-I und Typ-II Photooxidation am Beispiel der Lipidperoxidation modifiziert nach GIROTTI 2001.**

Die Photooxidation beginnt mit der Aktivierung eines geeigneten Sensibilisators. Dabei wird der Sensibilisator nach Absorption von Lichtenergie in Form von Photonen aus seinem Singulett-Grundzustand  $^1S$  in den angeregten Singulett-Zustand  $^1S^*$  überführt. Die Lebensdauer dieses Singulett-Zustandes liegt im Bereich von Nanosekunden und ist in der Regel für eine direkte Reaktion mit einem Substrat viel zu kurz. Nach einer strahlungslosen Spinumkehr des angeregten Elektrons (intersystem crossing) geht der Singulett-Zustand in den etwas energieärmeren Triplett-Zustand  $^3S^*$  über. Durch die längere Lebensdauer ist der Triplett-Zustand in der Lage, mit Nachbarmolekülen zu interagieren und die Photooxidation zu initiieren.

In Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen (Substrat- bzw. Sauerstoffkonzentration) und den Eigenschaften des Sensibilisators erfolgt der weitere Reaktionsverlauf nach einem Typ-I bzw. Typ-II Mechanismus [FOOTE 1988]. Bei der Photooxidation nach Typ-I abstrahiert das angeregte Sensibilisator-Molekül ein Wasserstoffatom oder ein Elektron von einem Substratmolekül. Im Falle von ungesättigten Lipiden (LH) entstehen Lipidradikale, die nach Reaktion mit  $^3O_2$  eine Radikalkettenreaktion einleiten können. Der Sensibilisator im reduzierten Zustand ( $S^{\cdot-}$ ) regeneriert sich nach Übertragung des Elektrons auf  $^3O_2$  unter Bildung von  $O_2^{\cdot-}$ , was die Entstehung weiterer ROS zur Folge haben kann [GIROTTI 2001 vgl. Kap. 3.2.1.].

Bei der Typ-II Photooxidation überträgt der angeregte Sensibilisator  $^3S^*$  seine Energie direkt auf  $^3O_2$ . Bei dieser Reaktion wird der Sauerstoff vom Triplett- in den

Singulett-Zustand überführt, wobei der Sensibilisator in seinen Grundzustand (S) zurückkehrt. Sauerstoff im Singulett-Zustand ist deutlich reaktiver als  $^3\text{O}_2$  (vgl. Kap. 3.2.1) und kann direkt mit DNA [RAVANAT et al 2001], Proteinen [DAVIES & TRUSCOTT 2001; DAVIES 2003] und Lipiden [GIROTTI 2001; HANSON & CLEGG 2002] reagieren.

Zur Aufklärung des Mechanismus (Typ-I oder Typ-II) einer Photooxidation werden in der Literatur mehrere Methoden beschrieben [FOOTE 1988; GIROTTI 2001], die auf dem Nachweis unterschiedlicher, in Abhängigkeit vom jeweiligen Mechanismus gebildeter Oxidationsprodukte beruhen.

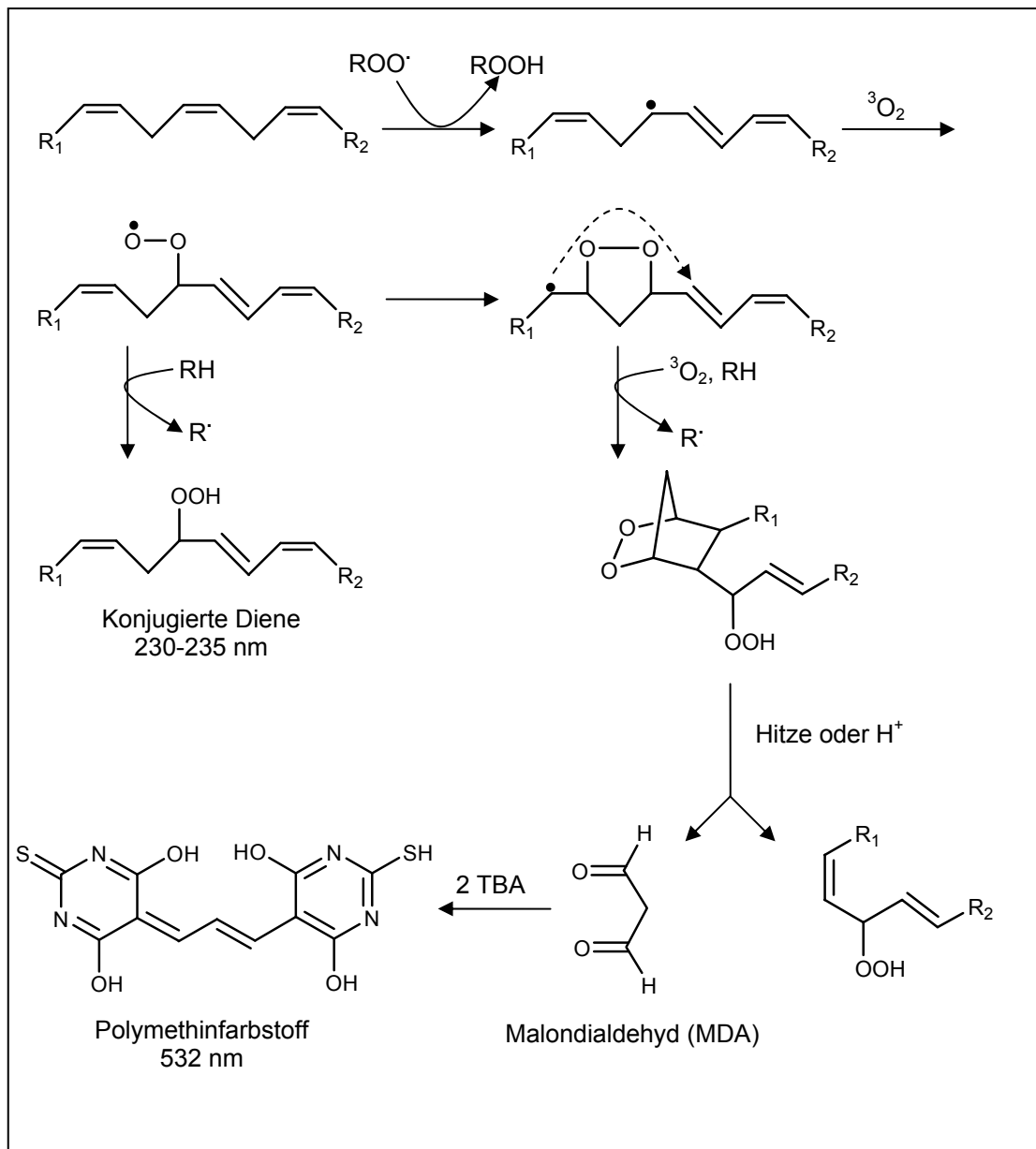
### 3.3 Methoden zur Messung und Quantifizierung oxidativer Prozesse in der Haut

Die Bedeutung von oxidativen Stress für die Manifestation von Hautschäden und die Pathogenese von Hautkrankheiten wurde bereits in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Anhand einiger Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass topisch applizierte Antioxidantien einen sinnvollen Beitrag zur Linderung umweltbedingter Schädigung der Haut leisten [DARR et al 1992; DREHER et al 1998; BLATT et al 1999; RIPPKE et al 2001]. Für die Bewertung des antioxidativen Potentials von Wirkstoffen und der Rolle von ROS bei der Entstehung von Hautschäden ist eine Quantifizierung oxidativer Prozesse unerlässlich.

Im Folgenden werden einige Methoden beschrieben, die eine quantitative Erfassung des oxidativen Stresses in biologischen Systemen ermöglichen. Einige dieser Methoden basieren auf der Messung von Oxidationsprodukten wie z.B. Lipidperoxide und Proteincarbonylverbindungen, die nach Reaktion von ROS mit Biomolekülen entstehen. Andere Methoden bieten die Möglichkeit oxidative Prozesse über Messung reaktiver Zwischenstufen zeitnah zu verfolgen. Dazu gehört die Detektion von Radikalen durch Elektronen-Spin-Resonanz Spektroskopie (ESR) und die Erfassung von Photonen (Chemilumineszenz-Messung), die während der Oxidationsreaktionen von angeregten Zwischenstufen emittiert werden.

#### ***Lipidperoxidation:***

Bei der Oxidation von Lipiden entstehen als Endprodukte hauptsächlich Hydroperoxide, die über chromatographische Methoden wie z.B. HPLC und GC getrennt und quantifiziert werden können [HUGHES et al 1983]. Sind mehrfach ungesättigte Lipide mit isolierten Doppelbindungen an der Autoxidation beteiligt, so entstehen im Laufe der Oxidation konjugierte Diene und als ein Abbauprodukt Malondialdehyd [PRYOR et al 1976] (Abb. 3.4). Konjugierte Diene können spektrometrisch über ihre charakteristische Absorption im Bereich 230 – 235 nm erfasst werden [IVERSEN et al 1984]. Malondialdehyd (MDA) reagiert mit zwei Molekülen 2-Thiobarbitursäure (TBA) in einer Aldolkondensation zu einem rosafarbenen Polymethinfarbstoff, der sich spektrometrisch bei 532 nm nachweisen lässt [HALLIWELL & GUTTERIDGE 1981].



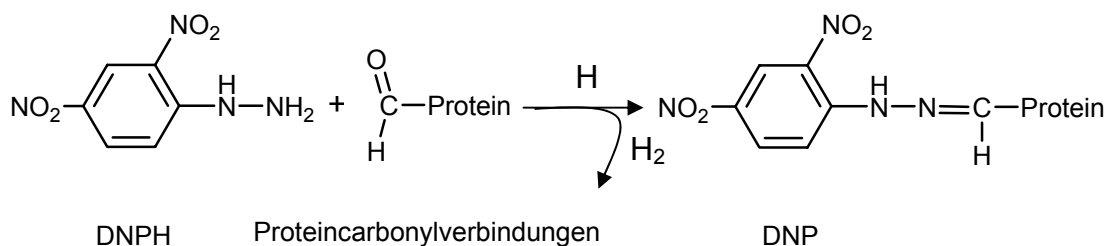
**Abb. 3.4:** Autoxidation von mehrfach ungesättigten Lipiden unter Bildung von Malondialdehyd nach PRYOR [PRYOR et al 1976] und die Nachweisreaktion von Malondialdehyd durch 2-Thiobarbitursäure.

Neben der direkten Bestimmung können Lipidhydroperoxide auch über ihre Fähigkeit andere Substanzen zu oxidieren nachgewiesen werden. Als Substrat werden Farbstoffe wie z. B. 2,7-Dichlorodihydro-fluorescein [CATHCART et al 1983] oder Diphenyl-1-pyrenylphosphin [AKASAKA et al 1992] eingesetzt, die in der oxidierten Form fluoreszieren. Die Bestimmung der Peroxidzahl nach Wheeler, die eine Kennzahl für die Qualität von Fetten und Ölen darstellt, beruht ebenfalls auf oxidativen Eigenschaften von Peroxiden. Dabei wird die aus der Reaktion von Iodid mit den Peroxidgruppen freigesetzte Iodmenge durch Titration mit

Natriumthiosulfat bestimmt. Kohen hat die iodometrische Bestimmung zu einer nicht invasiven Methode zur Messung von organischen Peroxiden auf der Hautoberfläche weiterentwickelt. Mit dieser Methode, die auf einer elektrochemischen Messung nach topischer Applikation einer Iodid/Iod-Lösung basiert, konnte er auf Rattenhaut eine erhöhte Menge von Peroxiden mit zunehmendem Alter der Tiere und nach UVA-Bestrahlung feststellen [KOHEN 1999].

### **Proteinoxidation:**

Proteine sind einer oxidativen Modifikation durch ROS leicht zugänglich und bilden in Abhängigkeit ihrer Aminosäuresequenz vielfältige Oxidationsprodukte. Aus Tyrosin und Histidin entstehen z.B. 2-Oxohistidin und Dityrosin. Thiolgruppen bilden Disulfide und Thiyl-Radikale. Tryptophan wird unter anderem zu Kynurenin und N-Formylkynurenin umgesetzt [STADTMAN 1998]. Die Einführung von Carbonylgruppen (Ketone und Aldehyde) stellt eine weitere oxidative Modifikation von Proteinen dar. Carbonylgruppen entstehen sowohl bei der metallkatalysierten Oxidation von Lysin, Arginin, Prolin und Threonin als auch durch oxidative Spaltung der Polypeptidkette [STADTMAN & LEVINE 2003]. Die Bestimmung der Carbonylgruppen in Proteinen ist die gängigste Methode zur Erfassung oxidativer Proteinmodifikationen in biologischen Systemen. Sie basiert auf der Umsetzung von Carbonylverbindungen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) zu den entsprechenden Hydrazonen (Abb. 3.5).



**Abb. 3.5: Reaktion von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) mit Proteincarbonylen zu den entsprechenden 2,4-Dinitrophenylhydrazonen (DNP).**

Die gebildeten Hydrazone sind sehr stabil und können entweder direkt spektrometrisch (Absorption 370 nm) oder nach Zugabe von Anti-DNP-Antikörper mittels ELISA [BUSS et al 1997], Western-Blott oder immunhistochemisch erfasst werden [SHACTER 2000].

Eine Akkumulation oxidierter Proteine konnte bei einer Vielzahl von Krankheiten, die mit oxidativem Stress in Verbindung stehen, wie z.B. Morbus-Alzheimer [SMITH et al 1998], Morbus-Parkinson und rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden



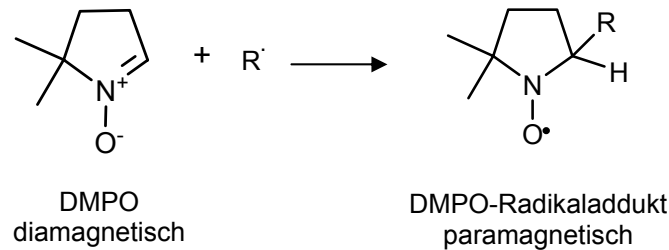
[STADTMAN 2001]. Thiele und Sander stellten erhöhte *Level* an oxidierten Proteinen in der Haut nach Exposition von Oxidantien (UV-Strahlung, BPO und HOCl) fest, wobei photogealterte Haut besonders hohe Werte lieferte [THIELE et al 1999; SANDER et al 2002].

### **Elektronen-Spin-Resonanz Spektroskopie (ESR):**

Die Elektronen-Spin-Resonanz Spektroskopie ist eine Methode, mit der spezifisch Radikale, d.h. Substanzen mit ungepaarten Elektronen untersucht werden können. Beim Anlegen eines starken, homogenen Magnetfeldes werden bei den Elektronen, die sich wie ein magnetischer Dipol verhalten, Zustände verschiedener Energie erzeugt, die aus einer parallelen oder antiparallelen Ausrichtung zum angelegten Magnetfeld resultieren. Die Energiedifferenz dieser beiden Zustände hängt von der Stärke des angelegten Magnetfeldes ab und kann durch die Absorption elektromagnetischer Wellen passender Frequenz (Resonanz) detektiert werden. Bei den meisten ESR-Spektrometern findet die Messung im Mikrowellenbereich bei einer Frequenz von 9 GHz statt [BÄR et al 1985].

Die ESR-Spektroskopie erlaubt nicht nur den Nachweis von Radikalen sondern anhand der ESR-Spektren auch die Charakterisierung ihrer lokalen Umgebung.

Die direkte Erfassung von Radikalen in biologischen Systemen ist allerdings bei Raumtemperatur aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer nicht möglich. Eine Ausnahme bildet das Ascorbyl-Radikal, das daher häufig als Indikator für Radikalreaktionen herangezogen wird [LANGE & BUETTNER 2001; HAYWOOD et al 2003]. Die Erfassung von anderen radikalischen Spezies erfolgt durch das *Spin-Trap*-Verfahren. Dabei werden die Radikale durch geeignete Reagenzien (*Spin-Traps*) abgefangen, die als Reaktionsprodukte Radikale mit erheblich längerer Lebensdauer bilden. Als *Spin-Traps* werden Nitrone oder Verbindungen mit Nitrosogruppen eingesetzt, die nach Reaktion mit Radikalen Nitroxide bilden [DAVIES & HAWKINS 2004]. Abbildung 3.6 stellt exemplarisch eine Abfangreaktion durch das häufig eingesetzte *Spin-Trap*-Reagenz, 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO) dar.



**Abb. 3.6: Abfangreaktion von Radikalen durch DMPO unter Bildung eines DMPO-Radikaladduktes.**

Die ESR-Spektroskopie wird häufig bei *in vitro* Untersuchungen eingesetzt, um Radikalreaktionen hinsichtlich ihrer Kinetiken und Mechanismen zu untersuchen [REINKE et al 1994; LLOYD et al 1997; MIZUTA et al 1997]. Dazu zählen auch zahlreiche Veröffentlichungen, die sich mit den Modifikationen von Biomolekülen durch ROS beschäftigen [NAGY & FLOYD 1984; OSTDAL et al 2002; WRIGHT et al 2002; DAVIES & HAWKINS 2004].

Der *in vivo* Einsatz der ESR-Technik für die Untersuchung von Radikalprozessen in der Haut ist mit den heutigen Messsystemen nur bedingt möglich. Die starke Absorption der Mikrowellen durch den hohen Wasseranteil in der Haut beschränkt den Einsatz dieser Technik auf Hautproben mit einem maximalen Durchmesser von 4-6 mm [FUCHS et al 2001]. *Ex vivo* konnte allerdings die Generierung von Radikalen nach UV-Exposition [LANGE & BUETTNER 2001; HERRLING et al 2003] und die positive Wirkung von Antioxidantien [JURKOVIC et al 2003] gezeigt werden.

#### **Chemilumineszenzmessung (CLZ-Messung):**

Die Messung der CLZ bietet eine weitere Möglichkeit zur Detektion und Quantifizierung oxidativer Prozesse. Die theoretischen Grundlagen und das Messprinzip werden im nächsten Kapitel (Kap. 3.4) detailliert beschrieben.

Die CLZ-Messtechnik kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eingesetzt werden. In vielfältigen *in vitro* Untersuchungen zeigte sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der oxidativen Modifikation von Biomolekülen und dem Auftreten von CLZ [FORNIER DE VIOLET et al 1984; NAKANO 1989; BARNARD et al 1993; WATTS et al 1995; ASPEE & LISSI 2002]. *In vivo* Messungen wurden hauptsächlich zur Charakterisierung des UVA-induzierten oxidativen Stresses in der Haut und der Schutzwirkung topisch applizierter Antioxidantien durchgeführt [EVELSON et al 1997; SAUERMAN et al 1999; YASUI & SAKURAI 2000; OU-YANG et al 2004].

Für die Untersuchung oxidativer Prozesse in der Haut bietet die CLZ-Messung gegenüber den anderen vorgestellten Methoden Vor- und Nachteile.

Ähnlich wie bei der ESR-Spektroskopie erfasst die CLZ-Messung reaktive Zwischenstufen (vgl. Kap. 3.4), die während oxidativer Prozesse entstehen können und ermöglicht somit eine schnelle Aufzeichnung von Reaktionskinetiken. Eine aufwendige analytische Nachbereitung der Proben, wie sie bei der Bestimmung von Oxidationsmarkern (oxidierte Proteine und Lipidperoxide) notwendig ist, entfällt.

Im Gegensatz zu ESR-Messung ist die direkte Erfassung von reaktiven Zwischenstufen auch bei Raumtemperatur ohne Zusatz von Reagenzien wie z.B. *Spin-Traps* möglich. Der Einsatz von *Spin-Traps* birgt nämlich einige Risiken. Diese Reagenzien greifen durch das Abfangen von Radikalen in die Radikalprozesse ein und könnten diese somit künstlich beeinflussen. In biologischen Systemen schränkt zudem die Metabolisierung und die mangelnde Penetration bei Messung intakter Haut die Einsatzmöglichkeiten von *Spin-Traps* ein [HERRLING et al 2003].

Der größte Vorteil der CLZ-Technik gegenüber den anderen Methoden besteht in der Möglichkeit einer nicht invasiven *in vivo* Messung.

Für die quantitative Messung kumulativer Schäden durch den oxidativen Stress sind CLZ- und ESR-Techniken allerdings weniger geeignet. Es ist zwar vorstellbar, die Langzeitschäden – wie die Abschwächung des antioxidativen Systems der Haut – auch über ihren Einfluss auf die akut induzierten Prozesse zu erfassen, jedoch stellt die Messung stabiler Oxidationsmarker eine bessere Möglichkeit der Quantifizierung dar.

Die größte Herausforderung beim Einsatz der CLZ-Technik besteht in der mangelnden Kenntnis der genauen Mechanismen und Einflussfaktoren der CLZ-Emission.

## 3.4 Ultraschwache Photonenemission (UPE)

### 3.4.1 Begriffsdefinition

#### **Lumineszenz**

Die Emission elektromagnetischer Strahlung im UV-, VIS- oder IR-Spektralbereich von Atomen oder Molekülen nach dem Übergang eines Elektrons aus einem angeregten in einen energetisch niedrigeren Zustand bezeichnet man als Lumineszenz. Entsteht die Lumineszenz aus einem Übergang von einem angeregten Singulett-Zustand (Lebensdauer  $10^{-10}$  –  $10^{-8}$  s) so spricht man von Fluoreszenz, während Phosphoreszenz den Übergang von einem angeregten Triplett-Zustand in den Singulett-Grundzustand (Lebensdauer  $10^{-5}$  s – einige Minuten) beschreibt [CAMPBELL 1988].

Eine Klassifizierung der Lumineszenz findet zusätzlich nach der Art des energieliefernden Prozesses statt (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Einteilung der Lumineszenz nach Art der energieliefernden Prozesse [CAMPBELL, 1988].

| <b>energieliefernder Prozess</b>                | <b>Bezeichnung der Lumineszenz</b> |
|---|------------------------------------|
| chemische Reaktion                              | Chemilumineszenz<br>Biolumineszenz |
| Absorption von UV-VIS-Strahlung                 | Photolumineszenz                   |
| mildes Erhitzen (weit unter der Glühtemperatur) | Thermolumineszenz                  |
| elektrische Entladung                           | Elektrolumineszenz                 |

Dabei lässt sich eine Abgrenzung nicht immer klar definieren. So könnte eine thermisch induzierte Lumineszenz (lt. Definition Thermolumineszenz) eigentlich auf eine gesteigerte chemische Reaktion aufgrund der Temperaturerhöhung beruhen und somit auch eine spezielle Art der Chemilumineszenz darstellen [CAMPBELL 1988].

#### **Ultraschwache Photonenemission (UPE)**

Die UPE beschreibt Lumineszenzphänomene sehr geringer Intensität von biologischen Systemen oder Proben ohne den Gebrauch von lichtverstärkenden Systemen wie Luminol oder Lucigenin. Diese UPE wird in der Literatur auch als *low-level chemiluminescence*, *dark chemiluminescence*, *low intensity*

*luminescence*, *delayed luminescence* oder *ultraweak luminescence* bezeichnet. Manche Autoren sprechen auch von Biophotonen. Der Terminus ultraschwache Photonen-Emission (UPE) ist wohl die beste Bezeichnung für die zu beobachtenden Phänomene, denn viele Quellen für die Emission von Photonen lassen sich noch nicht eindeutig spezifizieren und nicht nur chemischen Reaktionen zuweisen [MEI 1994].

Obwohl die UPE in vielen biologischen Systemen (Zellen und Organe) nachgewiesen wurde [SLAWINSKA & SLAWINSKI 1985], darf sie nicht mit der deutlich effizienteren Biolumineszenz, basierend auf der Luciferin-Luciferase Reaktion, verwechselt werden. Die Biolumineszenz ist vor allem bei Tiefseeorganismen verbreitet, die entweder selbst oder mit Hilfe von Symbionten (Leuchtbakterien) Licht erzeugen. Einige Insektenarten wie bsw. das in Europa vorkommende Glühwürmchen und die amerikanische Feuerfliege sind ebenfalls in der Lage, Biolumineszenz zu produzieren [CAMPBELL 1988].

Tab. 3.2: Vergleich zwischen Biolumineszenz und ultraschwachen Photonenemission (UPE) nach SLAWINSKA und SLAWINSKI, 1985

| <b>Merkmale</b>  | <b>Biolumineszenz</b>                  | <b>Ultraschwache Photonenemission (UPE)</b>                    |
|------------------|--|--|
| Intensität       | $10^3 - 10^{12} \text{ hv / sec}$      | $0,01 - 10^4 \text{ hv / sec}$                                 |
| Quantenausbeute  | 0,01 – 1                               | $10^{-14} - 10^{-10}$  |
| Lokalisation     | spezifische, lichtproduzierende Organe | nicht organspezifisch  |
| Substrat         | spezifisch, Luciferine                 | nicht spezifisch, Biomoleküle                                  |
| Anregungsprozess | enzymatische Oxidation der Luciferine  | enzymatische und nicht enzymatische Oxidation von Biomelekülen |

Die UPE kann eingeteilt werden in:

- **spontane UPE:** Photonenemissionen ohne äußere Anregung z.B durch Stoffwechselforgänge in der Zelle [ADAM & CILENTO 1982].
- **induzierte UPE:** Photonenemissionen nach einer äußeren Anregung. Die Anregung kann z.B. durch UV-Strahlung [SAUERMAN et al 1999; YASUI & SAKURAI 2000], Ozon oder topische Applikation von Peroxiden (eigene Untersuchungen) erfolgen. Die induzierte UPE weist verglichen mit der spontanen UPE eine deutlich höhere Strahlungsintensität auf.

In der vorliegenden Arbeit werden ausschließlich die Vorgänge bei der induzierten UPE untersucht. Bei der spontanen UPE reichen die Theorien von oxidativen Prozessen während metabolischer Stoffwechselfvorgänge [ADAM & CILENTO 1982] und Phagozytose [ALLEN 1982] bis hin zum Biophotonenkonzept [POPP et al 1984] von elektromagnetischen Feldern, die Regulationsfunktionen ausüben.

Hierzu sei auf die einschlägige Literatur [ADAM & CILENTO 1982; SLAWINSKA & SLAWINSKI 1985; CAMPBELL 1988; MEI 1994], die einen detaillierten Überblick gibt, hingewiesen.

### 3.4.2 Mechanismen der induzierten UPE

#### 3.4.2.1 Voraussetzung für Chemilumineszenz

Damit durch eine chemische Reaktion die Emission von Photonen erfolgt, müssen folgende Bedingungen erfüllt werden [CAMPBELL 1988]:

- Es muss eine exothermische Reaktion zugrunde liegen, die zwischen 160 und 300 KJ/mol Energie liefert
- Bei der Reaktion müssen Moleküle in einen geeigneten elektronisch angeregten Zustand überführt werden, der entweder eine direkte Emission von Photonen oder die Übertragung der Energie auf geeignete Fluorophore erlaubt.
- Die Deaktivierung der angeregten Spezies muss zumindest teilweise durch Emission von Photonen erfolgen.

Die Effizienz einer Chemilumineszenz-Reaktion wird durch die Chemilumineszenzquantenausbeute ( $\Phi_{CL}$ ) angegeben. Sie ist als Quotient aus der Anzahl emittierter Photonen und der Anzahl reagierender Moleküle definiert und setzt sich wie folgt zusammen:

$$\Phi_{CL} = \Phi_C * \Phi_{EX} * \Phi_F$$

Dabei gilt:

$\Phi_C$  = Anteil der Moleküle, die bei der Reaktion umgesetzt werden.

$\Phi_{EX}$  = Anteil der Moleküle, die sich nach der Reaktion in einem elektronisch angeregten Zustand befinden.

$\Phi_F$  = Quantenausbeute für strahlende Übergänge.

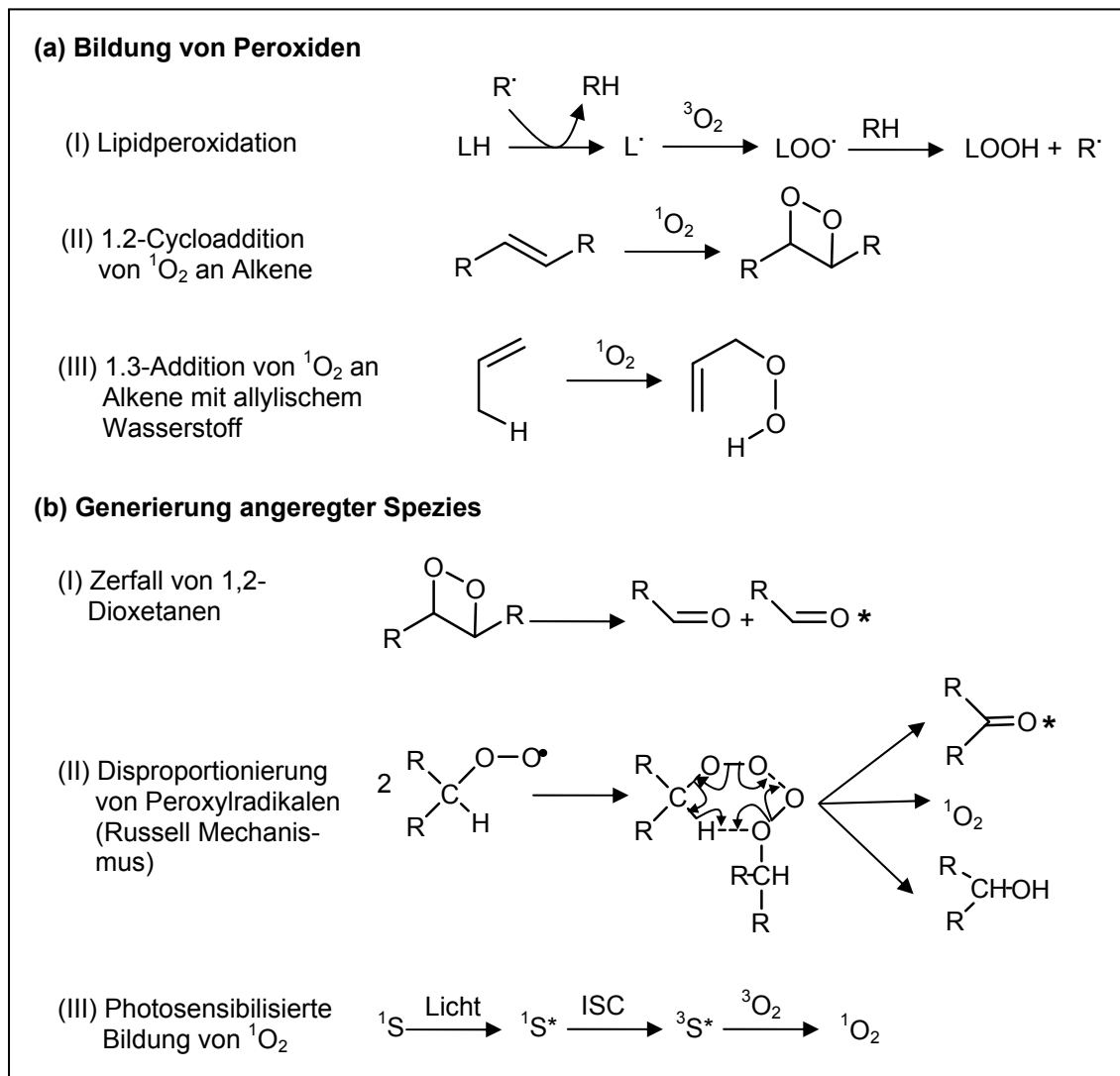
Die Photonquantenausbeute der meisten chemischen Reaktionen ist sehr gering ( $< 10^{-8}$ ). Sie kann jedoch bei einigen synthetischen Reagenzien wie z.B. Phtalsäurehydrazide (Luminol) und Acridinderivate (Lucigenin) bis auf 0,5 gesteigert werden [CAMPBELL 1988]. Diese Reagenzien haben eine breite

Anwendung in analytischen [FRANCIS et al 2004] und biochemischen [ALBRECHT et al 1990] Nachweisreaktionen gefunden. Sie werden auch teilweise bei der Detektion von ROS eingesetzt [YASUI & SAKURAI 2000; SARIAHMETOGLU et al 2003]. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit beruhen ausschließlich auf eine direkte Messung der UPE ohne Gebrauch von Lichtverstärkern wie Luminol oder Lucigenin.

### 3.4.2.2 Generierung angeregter Spezies und Emission von Photonen

Die Generierung angeregter Spezies durch Oxidation organischer Substanzen ist ein zentraler Schritt bei der induzierten UPE. Dabei werden als direkte Emitter immer wieder angeregte Carbonylverbindungen und  $^1\text{O}_2$  diskutiert [SLAWINSKA & SLAWINSKI 1985; CAMPBELL 1988]. Angeregte Carbonylverbindungen zeigen eine Emission im Bereich 380 – 460 nm, während Sauerstoff im Singulettzustand eine Dimolemission bei 633,4 und 703,2 nm und eine Monomolemission von 1268 nm aufweist. Die Monomolemission des  $^1\text{O}_2$  liegt allerdings deutlich außerhalb des Detektionsbereiches gängiger UPE-Messsysteme [CAMPBELL 1988]. Einige wichtige Reaktionen, die an der Generierung angeregter Carbonyle und  $^1\text{O}_2$  beteiligt sind, werden in Abbildung 3.7 zusammengefasst.

Zu den Reaktionen, die genügend Energie zur Generierung angeregter Carbonyle freisetzen, gehören die Disproportionierung von Peroxylradikalen (Russell's Mechanismus) und der Zerfall von instabilen Endoperoxiden wie z.B. 1,2-Dioxetane [CAMPBELL 1988; TIMMINS et al 1997]. Endoperoxide können sowohl nach einer Cycloaddition von  $^1\text{O}_2$  an Alkenen als auch durch Cyclisierung von Peroxylradikalen entstehen [DUCHSTEIN & GURKA 1992; TIMMINS et al 1997]. Hydroperoxide und Peroxylradikale sind Zwischenprodukte von Radikalreaktionen wie z. B. bei Lipidperoxidationen [GIROTTI 2001], können aber auch nach einer Addition von  $^1\text{O}_2$  an Alkenen mit allylischem Wasserstoff (En-Reaktion) gebildet werden [DUCHSTEIN & GURKA 1992]. Singulett-Sauerstoff kann neben einer photosensibilisierten Aktivierung von  $^3\text{O}_2$  (vgl. Kap. 3.2.3.2) zusätzlich aus der Russell-Reaktion mit einer relativ hohen Ausbeute (ca. 10 %) hervorgehen [NIU & MENDENHALL 1990].

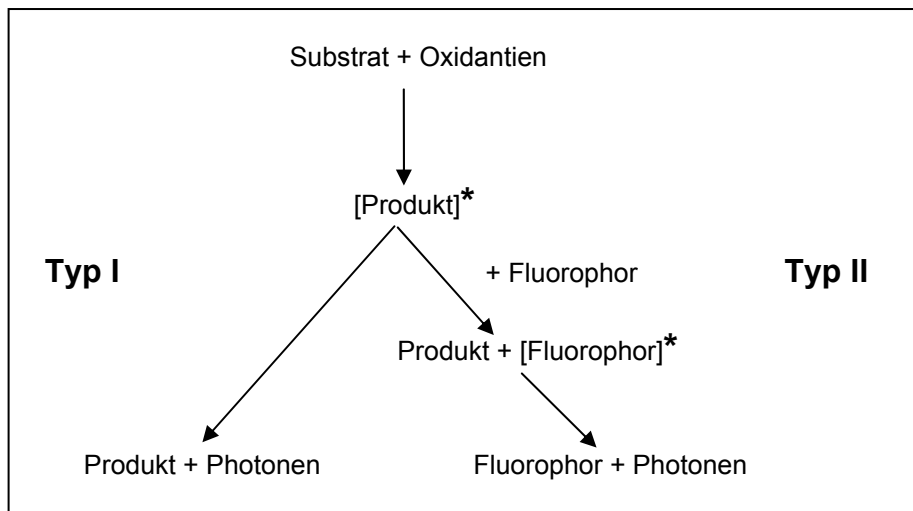


**Abb. 3.7: Bildung von Peroxiden (a) und deren Zerfall (b) unter Generierung angeregter Spezies [DUCHSTEIN und GURKA 1992, CAMPBELL 1988 und TIMMINS et al 1997].**

Die Reaktionen, die zur Emission von Photonen führen, können mechanistisch in zwei Gruppen eingeteilt werden, die mit Typ I und Typ II bezeichnet werden (Abb. 3.8). Typ I-Reaktionen sind mit der Generierung angeregter Spezies verbunden, die direkt über Photonen-emittierende Übergänge ihre Energie als Photonen abgeben. Die oben bereits angesprochenen angeregten Carbonylverbindungen und  ${}^1\text{O}_2$  sind zu einer direkten Emission von Photonen in der Lage. Bei den Typ II-Reaktionen findet ein Energietransfer von angeregten Spezies auf geeignete Fluorophore statt, die dadurch in eine angeregte Form übergehen und bei der Deaktivierung Photonen emittieren [CAMPBELL 1988].

Zu den Fluorophoren, die in biologischen Systemen an einer Typ II Reaktion beteiligt sein können, zählen Flavine und Porphyrine.





**Abb. 3.8: Typ I und Typ II Mechanismus bei der Photonenemission nach CAMPBELL 1989.**

Läuft der Energietransfer zwischen angeregter Spezies und Fluorophor effektiv ab, so kann das Emissionsspektrum vollständig vom angeregten Fluorophor dominiert werden. Das bedeutet zusätzlich, dass Oxidationsreaktionen, die normalerweise ohne Emission von Photonen ablaufen – weil die angeregten Spezies über strahlungslose Übergänge deaktiviert werden – in Gegenwart geeigneter Fluorophore über Energietransfer Photonen emittieren können [CAMPBELL 1988].

Die wichtigsten Kernaussagen, die sich aus den bisherigen Erläuterungen ergeben und für das Verständnis der weiteren Ausführungen bedeutsam sind, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die induzierte UPE steht im engen Zusammenhang zu oxidativen Prozessen *in vitro* und *in vivo*.
- Die Messung basiert auf einer direkten Detektion angeregter Zwischenstufen über die Erfassung „nativer“ Photonen, ohne Zusatz von Lichtverstärkern wie Luminol oder Lucigenin.
- Neben direkten Emittlern (angeregte Carbonylverbindungen und  $^1\text{O}_2$ ) können endogene Fluorophore über Energietransfer (Typ II Reaktion) das Emissionsspektrum erweitern.

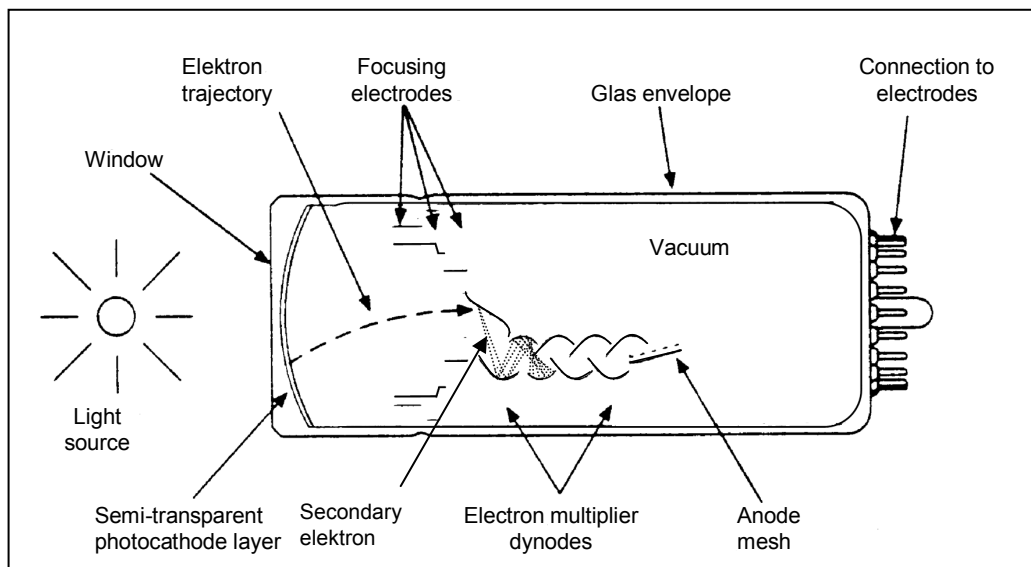
## 4 Material und Methoden

### 4.1 Messsysteme zur Detektion des UPE-Signals

Zur Untersuchung des UPE-Signals kamen drei Messsysteme zum Einsatz, die im folgenden mit UPE I-, UPE II- und SRUPE (spectral resolved UPE)-System bezeichnet werden. Das UPE I- und UPE II-System wurden zur Messung der Gesamtintensität des UPE-Signals eingesetzt, während das SRUPE-System sowohl eine Intensitätsmessung als auch eine spektrale Auflösung des UPE-Signals ermöglicht. Alle Messsysteme wurden bei der Firma Beiersdorf entwickelt und befinden sich in klimatisierten Dunkelräumen unter Standardbedingungen ( $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $50 \pm 5 \text{ } \%$  rel. LF).

#### 4.1.1 Aufbau und Funktion des Photomultipliers (PM)

Alle drei UPE-Systeme basieren auf der Nutzung eines Photomultipliers (PM) als Lichtdetektor. Aus diesem Grund wird hier zunächst die Funktionsweise des PM kurz erläutert (Abb. 4.1), bevor im Anschluss die UPE-Systeme vorgestellt werden.



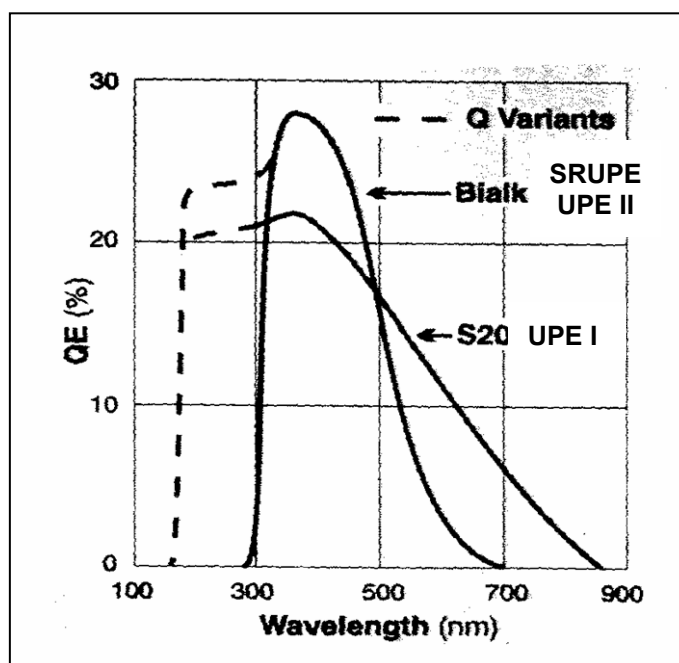
**Abb. 4.1: Aufbau des PM und das Prinzip der Sekundärelektronenvervielfachung.**

PM sind extrem empfindliche Lichtdetektoren, die ein zur Lichtintensität proportionales Spannungssignal erzeugen. An der Photokathode des PM werden beim Auftreffen von Photonen durch den photoelektrischen Effekt Elektronen emittiert (Primärelektronen). Diese Photoelektronen werden in einem elektrostatischen Feld beschleunigt und auf die erste Dynode eines

Sekundärelektronenvervielfachers fokussiert. Die Beschleunigung wird über eine Potentialdifferenz zwischen der Photokathode und der Anode realisiert (1 – 1,5 kV). Der Aufschlag eines jeden beschleunigten Primärelektrons löst aus der Dynode eine Anzahl von Sekundärelektronen, die wieder beschleunigt auf die nächste Dynode fokussiert werden (Abb. 4.1). So entsteht eine Elektronenlawine, die eine hohe Verstärkung erzeugt (im Bereich  $10^6$ ) und an der Anode gemessen wird.

Die Photokathoden können aus einer Vielzahl von Materialien mit unterschiedlichen Charakteristiken hergestellt werden. Das Material der Photokathode bestimmt maßgeblich dessen Empfindlichkeit für einen bestimmten Wellenlängenbereich (Abb. 4.2).

Die folgende Abbildung zeigt anhand der Quanteneffizienz (QE) die spektrale Empfindlichkeitsverteilung von zwei Photokathoden, die bei den verwendeten Messsystemen zum Einsatz kamen. Besteht das Eintrittsfenster des PM aus Quarz, erhöht sich die spektrale Empfindlichkeit im kurzwelligen Bereich (dargestellt durch die gestrichelte Linie). In den oben genannten Messsystemen waren Quarzfenster eingebaut.



**Abb. 4.2: Spektrale Empfindlichkeitsverteilung der eingesetzten Photokathoden.** Blalk-Photokathode für das SRUPE und UPE II System. S20-Photokathode für das UPE I System. Die gestrichelte Linie zeigt die erhöhte Empfindlichkeit durch Einsatz eines Quarzglases als Eintrittsfenster des PM.

### 4.1.2 UPE I-System

Das UPE-Messsystem besteht aus einer Kontrolleinheit in einem Messraum und einem Detektor in einem Dunkelraum. Die folgende Abbildung zeigt den schematischen Aufbau des Messsystems.

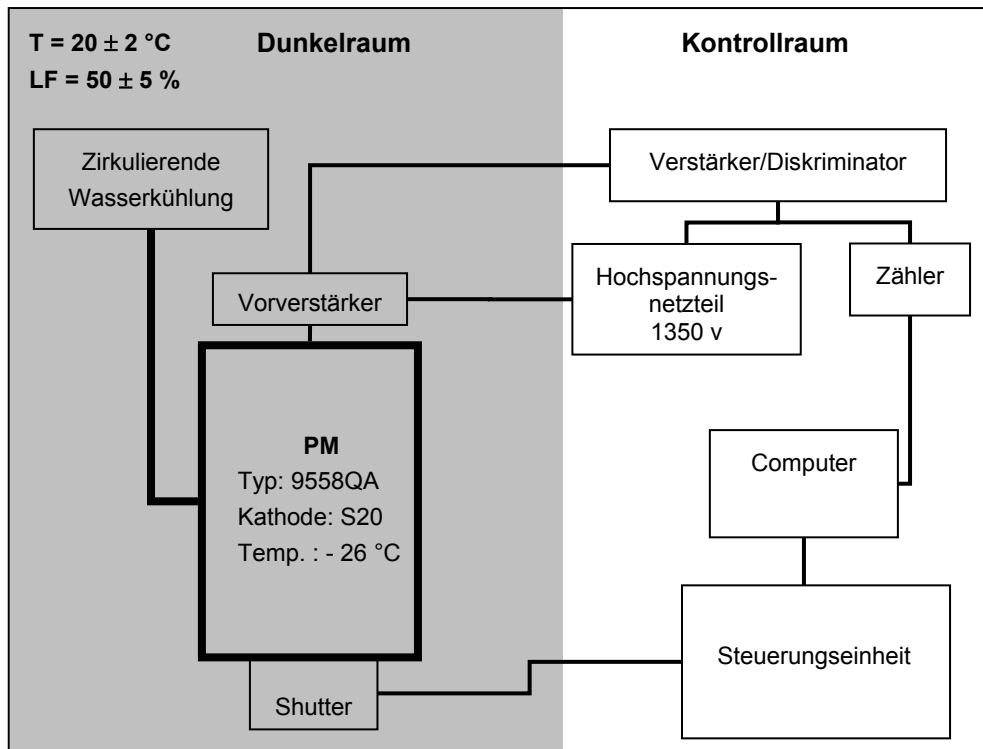


Abb. 4.3: UPE I-System

Über die Kontrolleinheit wird der Messablauf festgelegt. Dazu gehört die Steuerung des *Shutters* und der Lampe im Dunkelraum sowie die Datenerfassung über einen PC. Die Steuerungseinheit kann sowohl manuell als auch automatisch über festgelegte Programme bedient werden.

Die vom Detektor erhaltenen Elektronenimpulse werden zunächst verstärkt und durch einen Diskriminator, der das Grundrauschen vom Signal abtrennt an einen Zähler weitergeleitet. Durch diese Anordnung lässt sich der PM als Photonen-zähler verwenden.

Der Detektor besteht aus:

- dem Thorn-EMI Photomultiplier Typ 9558QA mit der Photokathode S 20,
- einem Peltier-Kühlelement angeschlossen an einen Umlaufkühler,
- einem Photosensor, der durch das Schließen des *Shutters* ab einer eingestellten Lichtstärke den PM vor Überbelichtung schützt..

Die Photokathode S 20 deckt einen Messbereich von ca. 200 – 800 nm ab und weist zwischen 260 nm und 360 nm ein Empfindlichkeitsmaximum auf (Abb. 4.2). Die Empfindlichkeit der Photokathode im langwelligen Bereich erfordert eine Kühlung unter 0°C, um die Dunkelzählrate (DZR, das thermische Rauschen) zu erniedrigen. Das UPE I-System wurde mit einer PM-Temperatur von -26 °C und einer Hochspannung von 1350 V betrieben und zeigte eine DZR von 15 cps (counts/s). Die DZR wurde immer von der Photonenzählrate der Probe abgezogen.

#### 4.1.3 SRUPE-System

Das SRUPE-System wurde in Zusammenarbeit mit der Firma m.u.t (m.u.t GmbH, Wedel) für eine spektrale Auflösung des UPE-Signals entwickelt. Abbildung 4.4 zeigt den Aufbau des Messsystems unterteilt in einer Detektoreinheit im klimatisierten Dunkelraum und einer Kontrolleinheit mit Steuerungssystemen im Messraum.

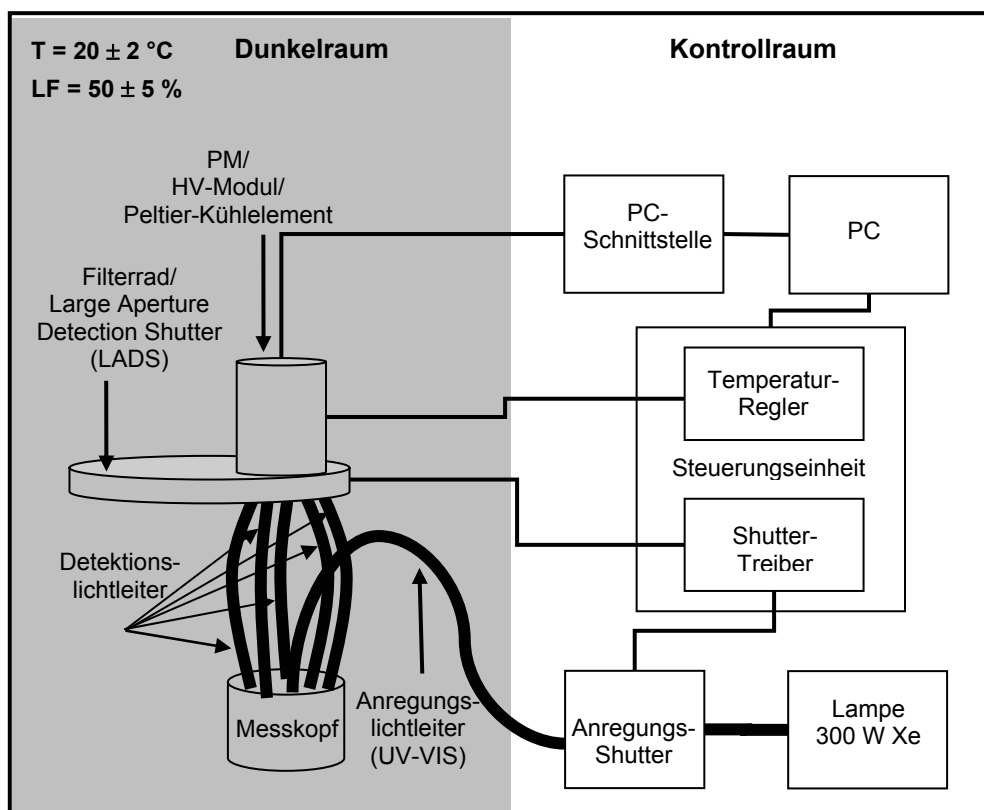


Abb. 4.4: SRUPE-System

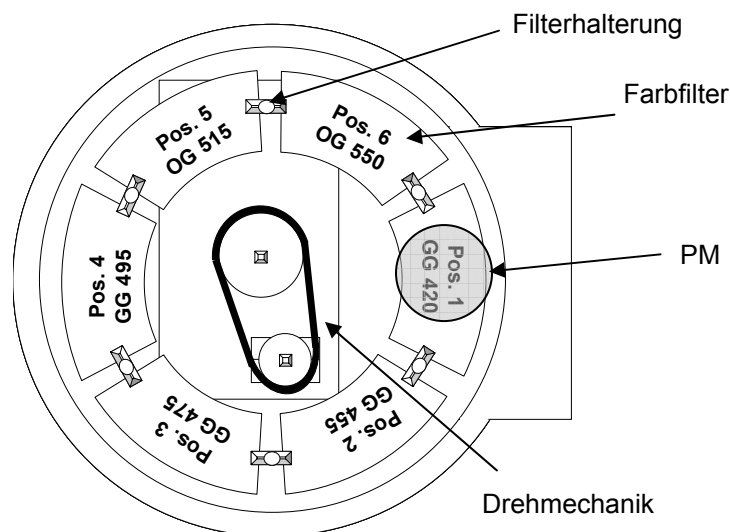
Die Detektoreinheit besteht aus:

- einer Hochspannungserzeugung und Diskriminatorelektronik,

- einem thermoelektrischen Kühlsystem und
- einem Photomultiplier Typ 9635QD mit einer Photokathode vom Typ *bialkali*.

Der Messkopf wird direkt auf das Untersuchungsmaterial aufgebracht und das UPE-Signal über fünf Flüssigkeitslichtwellenleiter (Detektions-LWL) zum Photomultiplier weitergeleitet. Durch die optische Kopplung bis zum PM werden ca. 3 % der emittierten Photonen eingefangen. Vor dem PM sitzen das Filterrad und der Detektions-*Shutter* (Large Aperture Detection Shutter, LADS) (Abb.4.4). Der Messkopf bietet eine Anschlussmöglichkeit für einen LWL zur Bestrahlung der Probe mit UV-Strahlung (Anregungs-LWL). Eine Linsenoptik ermöglicht dabei eine homogene Verteilung des Anregungslichtes. Jeder LWL ist einzeln mit einem *Shutter* versehen. Die fünf *Shutter* der Detektions-LWL werden synchron mit dem LADS betrieben und bleiben während der gesamten Bestrahlungsphase geschlossen. Nach der Bestrahlung werden die *Shutter* der Lampe und der Anregungs-LWL synchron geschlossen und 500 Millisekunden später die Detektions-*Shutter* (Detektions-LWL und LADS) gleichzeitig geöffnet. Durch die synchrone aber zeitversetzte Steuerung der Anregungs- und Detektions-*Shutter* wird verhindert, dass sich während der Bestrahlung die Detektions-LWL mit Reflexionslicht der Probe „aufladen“ und das UPE- Signal verfälschen.

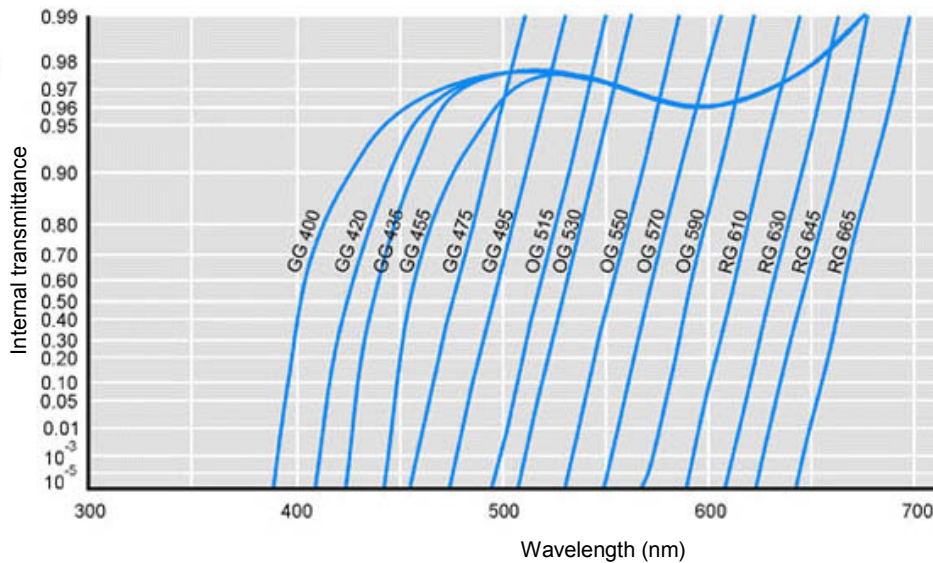
Die Steuerungseinheit beinhaltet sämtliche Spannungsversorgungen, den Treiber für die *Shutter* sowie Prozessorelektronik zur Temperaturregelung und zur Kommunikation mit dem PC und der Elektronik im SRUPE-System. Der PM liefert bei einer Betriebstemperatur von + 3 °C eine DZR von 15 – 20 cps, die immer von der Photonenanzahlrate der Probe abgezogen wurde. Die verglichen mit der Photokathode im UPE 1-System geringere Empfindlichkeit im langwelligen Bereich bei der Photokathode des SRUPE-Systems führt zu deutlich niedrigeren, thermisch bedingten Emissionsraten und erfordert somit keine Kühlung unter 0 °C. Das Filterrad ist eine drehbare Scheibe mit sechs Filtereinsätzen (Abb.4.5). Die Besonderheit des SRUPE-Systems ist die automatische Steuerung des Filterrades verbunden mit einer exakten Erfassung jeder einzelnen Filterposition. Bei jeder Messung mit drehendem Filterrad erkennt das System die sich gerade unter dem PM befindliche Filterposition und ordnet ihr die gemessenen Photonen zu (Abb.4.5). Somit werden pro Messung gleichzeitig sechs Datenreihen erzeugt, die quasi für sich gesehen eine Einzelmessung der entsprechenden Filterposition repräsentieren.



**Abb. 4.5:** *Abb. Darstellung des Filterrades mit den verwendeten Langpassfiltern. Das SRUPE-System erkennt automatisch die sich gerade unter dem PM befindliche Filterposition und ordnet ihr die gemessenen Photonen zu.*

Die Drehgeschwindigkeit von bis zu 20 Hz erlaubt auch bei einer schnellen Kinetik des UPE-Signals eine genaue Aufteilung entsprechend der sechs Filterpositionen. Die Umdrehungsgeschwindigkeit des Filterrades bestimmt direkt die Integrationszeit, in der die Signalintensität aufsummiert und ausgelesen wird. Bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 20 Hz ergibt sich eine Integrationszeit von 4,2 ms pro Filterposition in der vier Messwerte mit je ca. 1 ms Messzeit (minimale Messzeit der Software) integriert und als ein Messpunkt registriert werden. Zur spektralen Analyse des UPE-Signals wurden sechs speziell geschnittene Langpassfilter der Firma SCHOTT (SCHOTT AG, Mainz) eingesetzt.

Langpassfilter zeigen im kurzwelligen Bereich eine geringe Transmission ( $\tau$ ). Getrennt durch die charakteristische Filterkante, schließt sich zum langwelligen hin ein Bereich hoher Transmission an. Die Lage dieser Kante wird durch die Wellenlänge  $\lambda_c$  beschrieben, bei der  $\frac{1}{2} \tau_{\max}$  erreicht wird (Abb. 4.6). Bei der Auswahl der Langpassfilter wurden sowohl Literaturdaten als auch eigene Vorversuche berücksichtigt. Obwohl zur Zeit nur wenige Untersuchungen zur spektralen Analyse des induzierten UPE-Signals vorliegen, lässt sich zusammenfassend in Übereinstimmung mit eigenen Vorversuchen festhalten, dass der Großteil des UPE-Signals (> 80 %) über 400 nm zu erwarten ist [TORINUKI et al 1982; NAKANO 1989; KRUK & BOUNIAS 1992; TIMMINS et al 1997] und deshalb die untere Grenze des Messfensters bei ca. 400 nm liegen sollte. Die obere Grenze des Messfensters ist beim SRUPE-System durch die Empfindlichkeit der Photokathode vorgegeben und liegt bei ca. 600 nm (Abb 4.2).



**Abb. 4.6: Spektraler Transmissionsgrad einiger Langpassfilter [Optical filter guide, ANDOVER CORPORATION 2002. Hersteller: SCHOTT AG. Mainz].** Die Langpassfilter werden durch einen zweistelligen Buchstabencode (WG, GG, OG, RG für Weis-, Gelb-, Orange- bzw. Rotglas) gefolgt von der Angabe der Kantenwellenlänge  $\lambda_c$  gekennzeichnet.

Es galt also einen Messbereich von 400 – 600 nm mit sechs Farbfiltern so fein wie möglich aufzulösen und dabei die Bandbreite zwischen den einzelnen Filtern möglichst gleich groß zu wählen. Diese Vorgabe führte zum Einsatz folgender Langpassfilter:

Position 1, GG 420

Position 2, GG 455

Position 3, GG 475

Position 4, GG 495

Position 5, OG 515

Position 6, OG 550

Aus den resultierenden Datenreihen wurden rechnerisch (Differenzbildung aus zwei Datenreihen) sieben Spektralbereiche ermittelt:

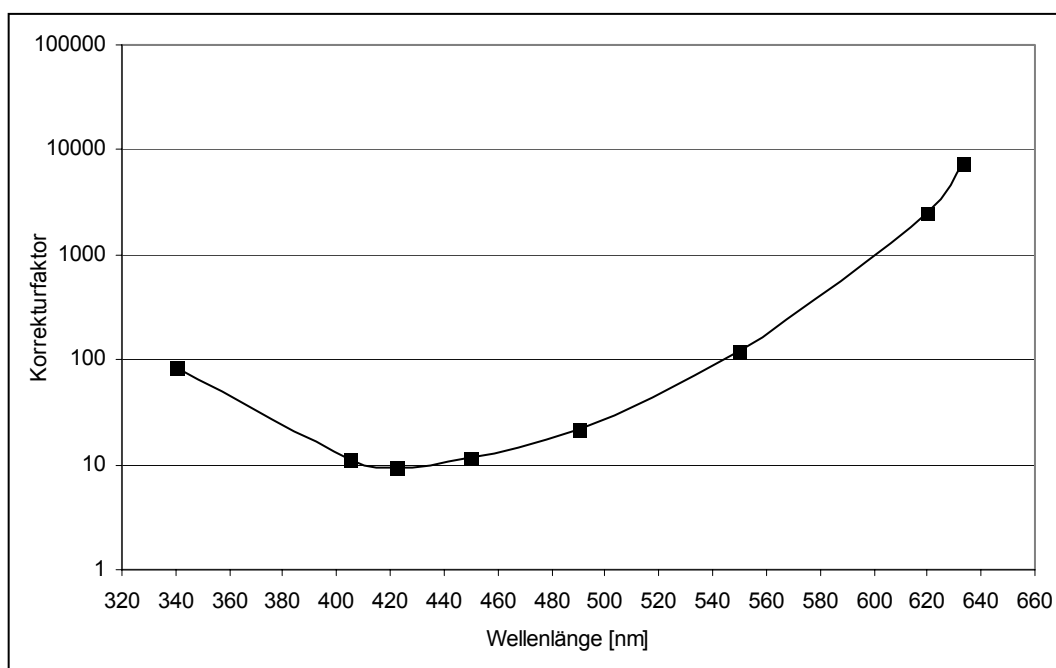
|                             |                          |
|-----------------------------|--------------------------|
| Datenreihe 1                | > 420 nm (Gesamt-signal) |
| Datenreihe 1 - Datenreihe 2 | 420 – 455 nm             |
| Datenreihe 2 - Datenreihe 3 | 455 – 475 nm             |
| Datenreihe 3 - Datenreihe 4 | 475 – 495 nm             |
| Datenreihe 4 - Datenreihe 5 | 495 – 515 nm             |
| Datenreihe 5 - Datenreihe 6 | 515 – 550 nm             |
| Datenreihe 6                | > 550 nm                 |



Zum Vergleich der spektralen Verteilung des UPE-Signals wurden die einzelnen Spektralbereiche auf das Gesamtsignal ( $> 420$  nm) relativiert und grafisch dargestellt. Eine Korrektur der Daten hinsichtlich der Bandbreite zwischen den Langpassfiltern und der spektralen Empfindlichkeit des Messsystems fand aus Gründen, die nachfolgend noch erläutert werden, bewusst nicht statt. Die so generierten Spektren sind zwar systemspezifisch, lassen jedoch aufgrund konstanter Versuchsbedingungen (gleiches Messsystem und gleiche Filterkombination) eine vergleichende Analyse zu.

Die Strategie der spektralen Auswertung des UPE-Signals bestand darin, aus Musterbildungen und Verschiebungen im relativen Spektrum mehr Informationen über die Mechanismen der UPE-generierenden Prozesse zu gewinnen.

Die Gründe, die zum Verzicht einer Korrektur der spektralen Daten geführt haben, lassen sich anhand der spektralen Empfindlichkeit des SRUPE-Systems erläutern. Die Messung wurde mit Hilfe einer Quecksilberkalibrierlampe durchgeführt.



**Abb. 4.7: Spektrale Empfindlichkeit des Gesamtsystems SRUPE (Photokathode und Detektions-LWL).** Mit Hilfe einer Kalibrierlampe (463 fW bei 490 nm) und Bandpassfiltern wurde das Verhältnis zwischen realer Intensität der Lampe und gemessener Intensität (Korrekturfaktor) bestimmt und gegen die entsprechende Wellenlänge aufgetragen.

Während im Bereich der höchsten Empfindlichkeit (400 – 450 nm) die Korrekturfaktoren Werte zwischen 9 und 12 annehmen, steigen diese mit zunehmender Wellenlänge stetig an und erreichen bei ca. 620 nm Werte von über 2400. Durch den steilen Anstieg der Korrekturfaktoren im langwelligen Bereich

verbunden mit einer spektralen Aufteilung des UPE-Signals (Spektralbandbreite zwischen 20 und 35 nm) wird die Zuordnung des zutreffenden Korrekturfaktors sehr schwierig und spekulativ. Dies wird für den Spektralbereich 515 – 500 nm (Bandbreite Zwischen Filter 5 und 6) besonders deutlich, in dem nach der Kalibrierkurve (Abb. 4.7) Korrekturfaktoren zwischen 20 und 120 anzuwenden wären. Eine weitere Überlegung, die gegen die Verwendung von Korrekturfaktoren spricht, beruht auf der Tatsache, dass gerade im langwelligen Bereich (>600 nm), in dem die Empfindlichkeit des SRUPE-Systems deutlich abnimmt und die Präzision der Messwerte gering ist, Korrekturfaktoren von über 1000 eher zur Generierung von Artefakten als zu objektiven Korrekturen führen würden.

Neben der spektralen Analyse wurde das SRUPE-System zusätzlich zur Messung der UPE-Intensität herangezogen. Dabei wurde mit stehendem Filterrad und ohne Einsatz von Farbfiltern die Intensität der UPE über den gesamten Empfindlichkeitsbereich der Photokathode aufgenommen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden Messungen mit dem SRUPE-System, bei denen nur die Intensität des UPE-Signals aufgenommen wurde, als Messungen im stationären Modus bezeichnet, während spektral aufgelöste UPE-Analyse die Bezeichnung Messung im mobilen Modus trägt.

#### **4.1.4 UPE II-System**

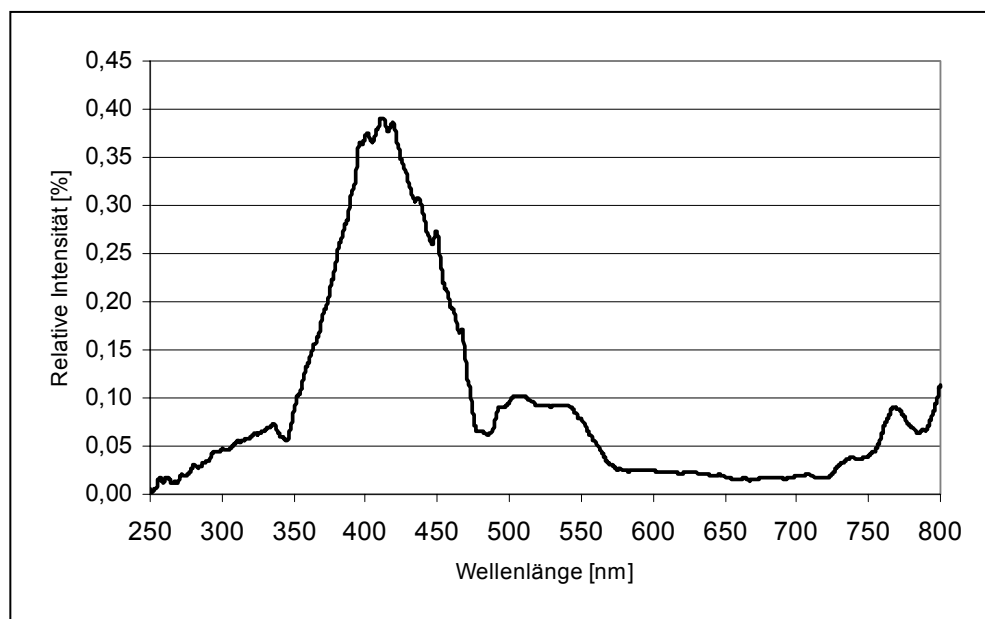
Das UPE II-System wurde genau wie das SRUPE-System in Zusammenarbeit mit der Firma MUT entwickelt und basiert auf der gleichen Detektor- und Steuerungstechnik (vgl. 4.1.3). Im Unterschied zum SRUPE-System erfolgt die optische Kopplung direkt und nicht über LWL. Das UPE II-System besitzt im Gegensatz zum SRUPE-System kein automatisch gesteuertes Filterrad und wurde daher nur zur Messung der Gesamtintensität des UPE-Signals eingesetzt. Über einen integrierten *Ringlichtshutter* kann eine externe Bestrahlungsquelle angeschlossen und das UPE-Signal unmittelbar (nach 500 ms) nach Bestrahlung der Probe untersucht werden (Abb. 4.8).



**Abb. 4.8:** Detektoreinheit des UPE II-Systems im Dunkelraum. (1) HV-Modul und PM. (2) Thermoelektrisches Kühlsystem (Peltier-Kühlelement). (3) Ringlichtshutter. (4) Anregungshutter.

## 4.2 Bestrahlungsquellen

Für die Untersuchung der UV-induzierten UPE wurden zwei Bestrahlungseinheiten (Oriellampe, L.O.T.-Oriell GmbH & Co. KG, Darmstadt und FXS-300, m.u.t GmbH, Wedel) mit jeweils 300 W Xenonbogenlampen eingesetzt. Die meisten Bestrahlungsversuche wurden mit der Oriellampe durchgeführt. Abbildung 4.9 zeigt die spektrale Intensitätsverteilung der Oriellampe, wobei die gemessenen Intensitätswerte auf die Gesamtintensität im Messbereich zwischen 250 und 800 nm normiert wurden.



**Abb. 4.9: Relative spektrale Intensitätsverteilung der Oriellampe.** Das Spektrum wurde mittels eines mobilen Spektrometers (TRISTAN, m.u.t GmbH, Wedel) am Ende eines LWL ( $\varnothing$  5 mm, LUMATEC, Deisenhofen) aufgenommen.

Die UV-Strahlungsintensität beider Bestrahlungseinheiten unterlag geringen Schwankungen (Tab. 4.1), die auf einer Abnahme der Strahlungsleistung mit zunehmender Brenndauer der Xenonlampen beruhen. Die genaue UV-Strahlungsintensität wurde vor jedem Bestrahlungsversuch mit einem Radimeter (IL-1700, International Light, Newburyport) mittels spezieller Messsonden\* nach einer 15-minütigen Aufwärmphase der Xenonlampe bestimmt.

---

\* International Light, Newburyport

UVA-Messsonde, Detektor: SED005#696, Filter: UVA#22039

UVB-Messsonde, Detektor: SED240#5537, Filter: UVB#22055

VIS-Messsonde, Detektor: SED033#6771, Filter: PAR#23450

UVA Bestrahlungsversuche wurden durch den Einsatz eines optischen Filters (WG 335, SCHOTT AG, Mainz) im Strahlengang der Xenon-Lampen realisiert.

*Tab. 4.3: UV-Strahlungsintensitäten der verwendeten Bestrahlungseinheiten. Die Intensitätsmessung fand mit IL-1700 am Enden eines LWL (Ø 5 mm, LUMATEC, Deisenhofen) statt.*

| <b>Bestrahlungseinheit</b> | <b>UVB-Intensität (mW / cm<sup>2</sup>)</b> | <b>UVA-Intensität (mW / cm<sup>2</sup>)</b> |
|----------------------------|---|---|
| Oriel-Lampe                | 1,76 – 2,10                                 | 6,75 -7,10                                  |
| Oriel-Lampe (WG 335)       | nicht messbar                               | 5,90 -6,25                                  |
| FXS 300                    | 1,41 -1,65                                  | 11,00 – 11,87                               |
| FXS 300 (WG 335)           | nicht messbar                               | 9,60 – 10,45                                |

Die Bestrahlungseinheiten wurden mittels LWL (Ø 5 mm, LUMATEC, Deisenhofen) an die entsprechenden UPE-Systeme gekoppelt.

## 4.3 *In vitro* Untersuchungen

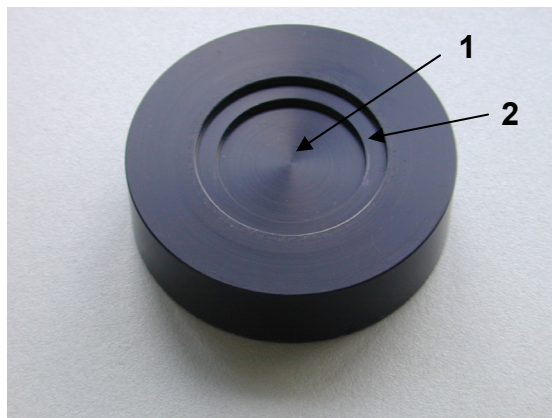
### 4.3.1 UPE-Messung

Die in Wasser gelösten Reagenzien wurden entweder manuell oder über ein Injektorsystem in speziell angefertigte Küvetten aus Polypropylen\* (PP) überführt und einer UPE-Messung unterzogen. Die angegebenen Konzentrationen im Ergebnisteil dieser Arbeit beziehen sich auf die Endkonzentrationen der einzelnen Reagenzien in der Messlösung nach der Mischung der Einzellösungen.

Nachfolgend werden die manuelle und automatische Applikation der Reagenzlösungen für die UPE-Messung näher beschrieben.

#### **Manuelle Applikation:**

Die Reagenzlösungen wurden mittels Mikropipetten (Eppendorf, Hamburg) in ein Falconröhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) zu einem Endvolumen von 3 ml pipettiert und durch dreimaliges Aufnehmen und Ablassen des Gesamtvolumens definiert vermischt. Nach der Mischung wurden 2,5 ml dieser Lösung in eine PP-Küvette (Abb. 4.10) überführt und unter der Detektoreinheit des jeweiligen UPE-Systems platziert. Die UPE-Messungen wurden stets 40 s nach der Mischung der Reagenzlösungen gestartet.



**Abb. 4.10:** PP-Küvette für manuelle Applikation der Messlösung. (1) Messkammer:  $\varnothing = 3 \text{ cm}$ ,  $h = 2 \text{ mm}$ . (2) Äußere Vertiefung zum Arretieren der UPE-Detektoreinheit.

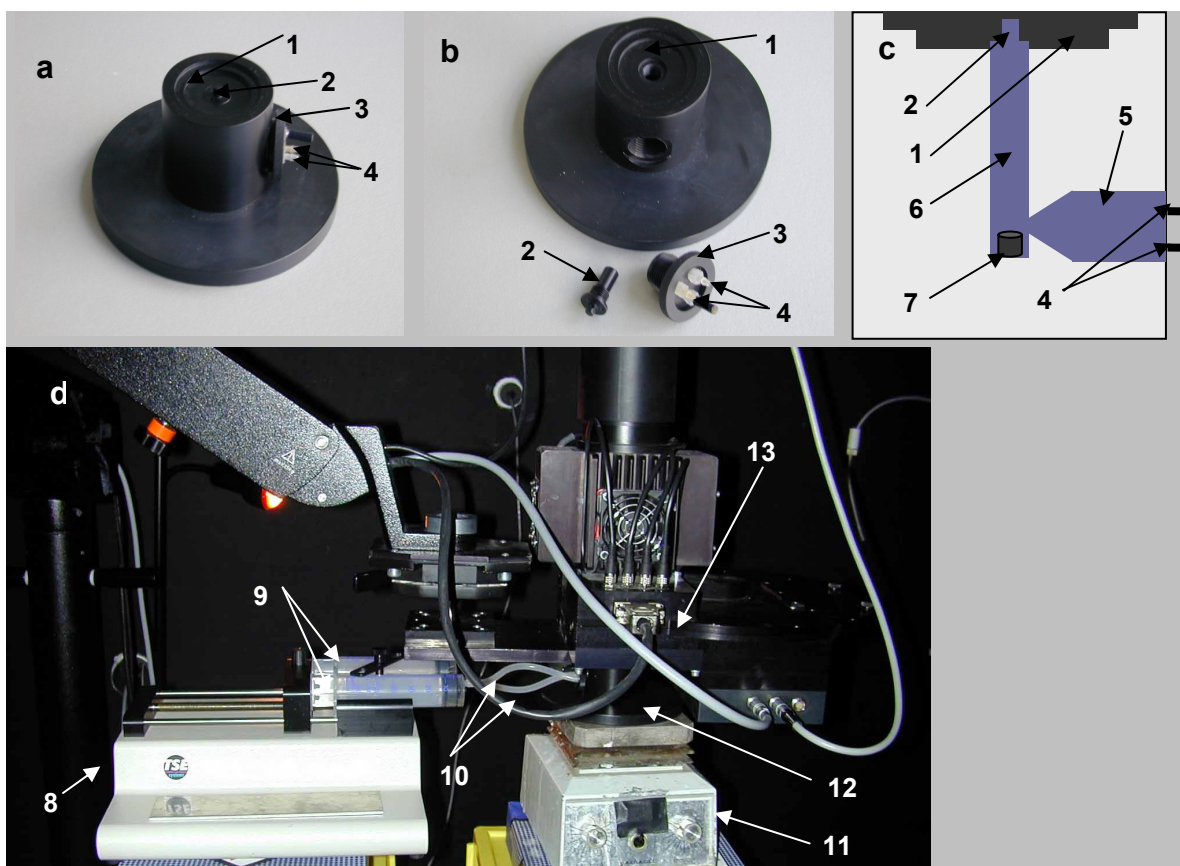
\* Polypropylen zeichnet sich durch eine sehr gute Chemikalienfestigkeit aus, ist stabil und korrodiert nicht. Es ist außerdem nicht magnetisch, nicht leitend und antistatisch. PP lässt sich leicht verarbeiten und rückstandslos reinigen.

Werkstoffdatenblätter von technischen Kunststoffen

Hrsg.: Kern GmbH, Technische Kunststoffteile, [http://www.kern-gmbh.de/index\\_datensblatt.html](http://www.kern-gmbh.de/index_datensblatt.html)

**Automatische Applikation:**

Für die automatische Applikation der Reagenzlösungen wurde eine spezielle Küvette aus PP (Abb. 4.11 a) mit Anschlussmöglichkeiten an eine Injektorpumpe (TSE SyringePump 540200, TSE Systems, Bad Homburg) entwickelt. Die Reagenzlösungen wurden mittels Spritzen (Omnifix 50 ml Luer Lock, B.Braun AG, Melsungen), die in die Injektorpumpe eingespannt waren, über Silikonschläuche in die Messküvette injiziert (Abb. 4.11 d). Die Lösungen wurden dabei zunächst in einer Vorkammer gemischt und gelangten über eine Verjüngung in ein Steigrohr. Unten im Steigrohr befand sich ein Rührstäbchen, das zusammen mit einem Magnetrührer für die endgültige Durchmischung der Messlösung sorgte. (Abb. 4.11 c).



**Abb. 4.11: PP-Küvette und die Messanordnung für automatische Applikation der Messlösung.** (a) PP-Küvette. (b) PP-Küvette mit aufgeschraubten Ein- und Auslass. (c) Schematischer Querschnitt der PP-Küvette. (d) Messaufbau für automatische Applikation am SRUPE-System. (1) Messkammer. (2) Auslass. (3) Einlass. (4) Anschlüsse für zwei Spritzen. (5) Vorkammer. (6) Steigrohr. (7) Rührstäbchen. (8) Injektorpumpe. (9) Spritzen. (10) Silikonschläuche. (11) Magnetrührer. (12) PP-Küvette. (13) SRUPE-System (Messkopf und Detektions - LWL entfernt).

Die Injektorpumpe wurde so eingestellt, dass sie pro Pumpvorgang 6,4 ml Reagenzlösung (je 3,2 ml pro Spritze) in die PP-Küvette injizierte und die

Messkammer nach ca. 5 s zu einem Endvolumen von 2,5 ml befüllte. Die Injektorpumpe wurde vom Kontrollraum aus synchron mit der UPE-Messung gestartet, wobei die UPE-Daten erst nach der vollständigen Füllung der Messkammer (5 s später) ausgewertet wurden.

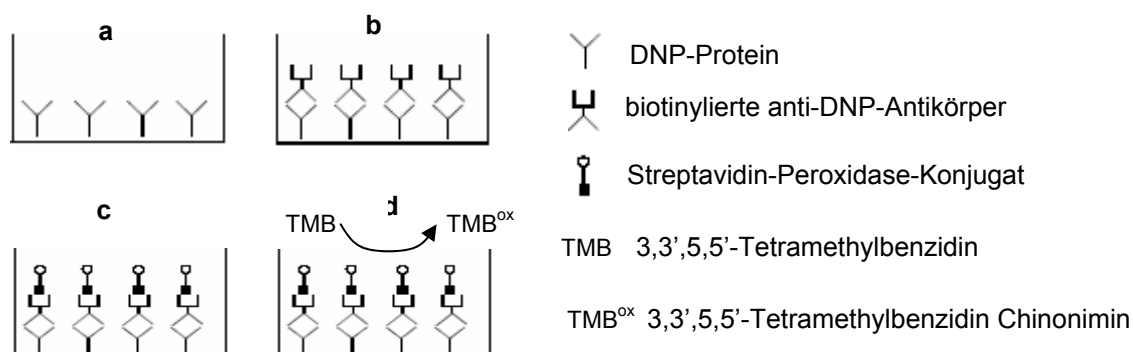
Nach jeder Messung wurden Ein- und Auslass der PP-Küvette abgeschraubt (Abb. 4.11 b), zusammen mit der Küvette unter warmen Wasser gründlich gereinigt und mit destilliertem Wasser abgespült. Aus den Silikonschläuchen wurde jeweils 1 ml Lösung abgepumpt, bevor die PP-Küvette zu einer erneuten Messung angeschlossen wurde. Pro Füllung der Spritzen (je 15 ml) wurden so drei Messungen hintereinander durchgeführt.

Die automatische Applikation der Reagenzlösungen wurde entwickelt, um die Kinetik der UPE-generierenden Reaktionen so schnell wie möglich erfassen zu können. Gegenüber der manuellen Applikation ergab sich dadurch ein Vorsprung in der Signalerfassung von ca. 35 s (40 s manuell vs. 5 s automatisch). Besonders für die spektrale Auflösung des UPE-Signals erwies sich die automatische Applikation aufgrund der höheren Signalausbeute als ein Vorteil, ohne den die Untersuchung einiger Reaktionen so nicht möglich gewesen wäre.

Für eine erhöhte Signalausbeute wurden beim SRUPE-System, sowohl für die manuelle als auch für die automatische Applikation, der Messkopf und die Detektions-LWL entfernt, um die Messküvette so nah wie möglich am Photomultiplier platzieren zu können (Abb. 4.11 d).

#### 4.3.2 Bestimmung von Proteincarbonylverbindungen

Zur Bestimmung der Proteincarbonyle wurde das ZENTECH PC Assay Kit (ZENITH TECHNOLOGY CORP. LTD, Dunedin) verwendet.



**Abb. 4.12: Zentech PC Assay Kit.** a) Unspezifische Immobilisierung der DNP-Proteine. b) Bindung der biotinylierten anti-DNP-Antikörper an DNP-Proteine. c) Koppeln der Streptavidin-Peroxidase-Konjugate an das Biotin d) Peroxidase-katalysierte Oxidation von TMB.

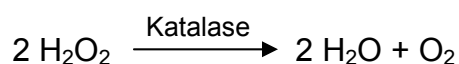


Die Erfassung der Proteincarbonylverbindungen basiert dabei auf die Umsetzung der Carbonylgruppen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) zu den entsprechenden Hydrazonen (DNP) (vgl. Kap. 3.3).

Die an DNP gebundenen Proteine werden auf einer 96-Loch-ELISA-Platte unspezifisch immobilisiert und über biotinylierte anti-DNP-Antikörper mit einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat gekoppelt (Abb. 4.12). Durch die Peroxidase wird das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) oxidiert und photometrisch bei 450 nm bestimmt. Die gemessenen Absorptionswerte können auf eine interne Standardreihe relativiert und somit die Proteincarbonylverbindungen quantitativ (ng / mg) bestimmt werden. Alle Schritte zur Bestimmung der Proteincarbonylverbindungen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die photometrische Bestimmung erfolgte mittels eines Mikroplattenphotometers (Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale).

#### 4.3.3 Oxygraphische Bestimmung von Wasserstoffperoxid

Zur Bestimmung der Wasserstoffperoxidkonzentration wurde die durch den Zusatz von Katalase freigesetzte Sauerstoffmenge gemäß der Reaktion:



herangezogen. Die Sauerstoffmessung erfolgte mittels eines faseroptischen Sensors (MICROX TX3, PreSens, Regensburg), dessen Messprinzip auf dem Effekt der dynamischen Lumineszenzlöschung eines sensitiven Farbstoffes durch molekularen Sauerstoff beruht. Das Messsignal (Lumineszenzabklingzeit) ist proportional zur  $\text{O}_2$ -Konzentration und kann mit dem Sauerstoffmessgerät angezeigt werden.

Der eingesetzte Fasersensor (Needle-type housing (NTH), PreSens, Regensburg), hat einen Durchmesser von  $< 50 \mu\text{m}$ , eine Ansprechzeit ( $t_{90}$ : Zeitdauer für eine 90 %ige Erfassung der totalen Signalveränderung) von ca. einer Sekunde in Flüssigkeiten und deckt einen Messbereich von 0 – 1,4 mmol  $\text{O}_2$  ab. Der Sensor ist in einem Spritzengehäuse untergebracht und kann über den Kolben aus der Kanüle befördert und nach der Messung auch wieder eingezogen werden. Die Kalibrierung des Sensors fand an jedem Messtag nach Angaben des Herstellers statt.

#### **Messablauf:**

Die Messlösung (2 ml) wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) pipettiert, der mit einem kleinen Rührstäbchen bestückt und über einen

Magnetrührer eingespannt wurde (Abb. 4.13). Durch ein kleines Loch im Deckel des Eppendorf-Reaktionsgefäßes wurde die Kanüle der Sensorspritze eingeführt. Über eine zusätzliche Spritze (Omnican 40 Insulinspritze 1 ml, B.Braun AG, Melsungen) wurden 100 U Katalase injiziert und der freigesetzte Sauerstoff kontinuierlich aufgezeichnet. Die Messlösung wurde während der gesamten Messung leicht gerührt.

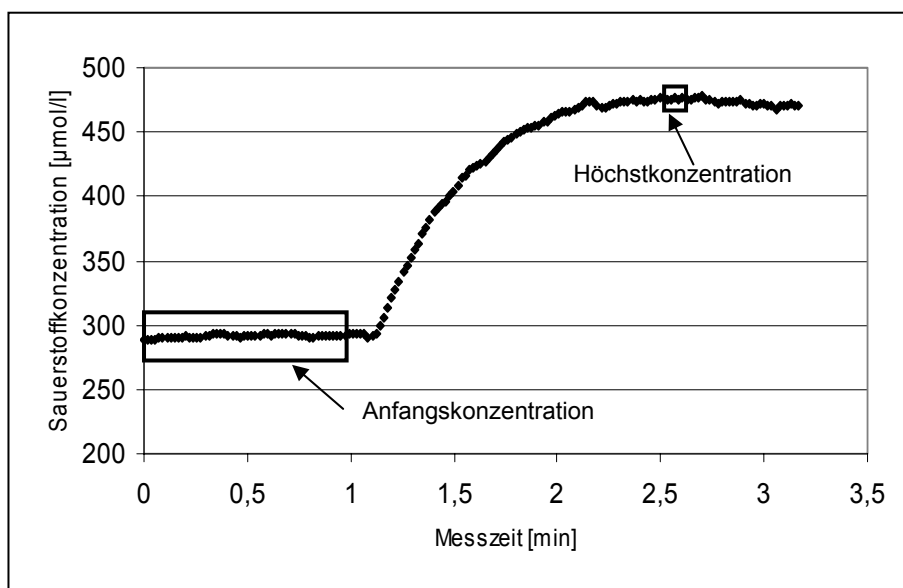


**Abb. 4.13: Messaufbau zur oxygraphischen Bestimmung von Wasserstoffperoxid.** (1) Messgerät (Microx TX3). (2) Magnetprüher (MR 3001, Heidolph, Kehleim). (3) Notbuck (Tecra 8100, Toshiba). (4) Spritze mit Fasersensor (NTH, PreSens, Regensburg). (5) Insulinspritze mit Katalaselösung. (6) 2 ml Epenndorf-Reaktionsgefäß..

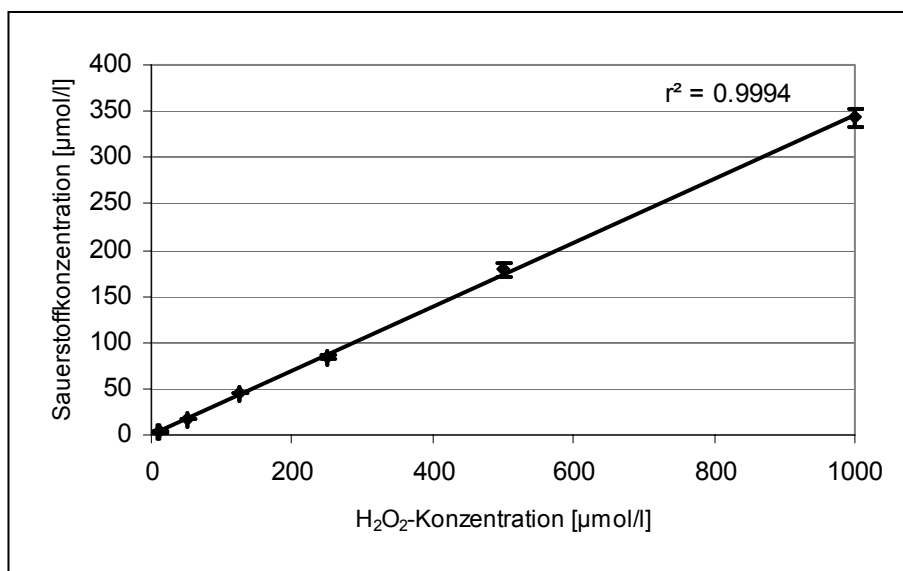
Als Messgröße für die Bestimmung der Wasserstoffperoxidkonzentration wurde die Konzentrationsspanne zwischen der Anfangskonzentration (Konzentration ohne Zusatz von Katalase) und der Höchstkonzentration (Konzentration nach Zugabe von Katalase) von Sauerstoff in der Messlösung zu Grunde gelegt. Zur Bestimmung der Anfangskonzentration wurden die Messwerte der ersten Minute (Messphase ohne Zusatz von Katalase) gemittelt. Die Höchstkonzentration ergab sich durch den Mittelwert von sieben Messwerten um den höchsten Messwert, der zuerst im Messverlauf erreicht wurde (Abb.4.14).

Unter Verwendung von 30 %igem Wasserstoffperoxid wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, die einen Konzentrationsbereich von 10  $\mu\text{M}$  – 1000  $\mu\text{M}$  abdeckte und zur Erstellung einer Eichgerade diente. Anhand der Eichgerade, die eine Beziehung zwischen der Wasserstoffperoxidkonzentration und die durch Katalase freigesetzte Sauerstoffmenge beschreibt, wurden unbekannte Wasserstoffperoxidkonzentrationen ermittelt (Abb. 4.15).

Die Verdünnungsreihe und die daraus ermittelte Eichgerade wurden vor jedem Versuchsdurchlauf neu erstellt.



**Abb. 4.14: Oxygraphische Messung von  $H_2O_2$  nach Zugabe von Katalase.** Dargestellt ist der exemplarische Messverlauf einer  $500 \mu M$   $H_2O_2$ -Lösung. Die Messwerte der ersten Minute wurden ohne Zusatz von Katalase aufgenommen und für die Bestimmung der Anfangskonzentration gemittelt. Nach Zusatz von Katalase steigt die Sauerstoffkonzentration der Messlösung an und fällt nach Erreichen der Höchstkonzentration wieder langsam ab. Für die Ermittlung der Höchstkonzentration wurde der Mittelwert aus sieben Messwerten (Höchstwert + jeweils drei Messwerte vor und danach) gebildet. Als Messgröße für die  $H_2O_2$ -konzentration wurde die Differenz zwischen Anfangs- und Höchstkonzentration herangezogen.



**Abb. 4.15: Eichgerade zur Ermittlung unbekannter  $H_2O_2$ -Konzentrationen.** Aus 30 %igem  $H_2O_2$  wurde eine Verdünnungsreihe mit sechs  $H_2O_2$ -Konzentrationen hergestellt. (10, 50, 125, 250, 500 und 1000  $\mu M$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei Messungen.

#### 4.3.4 Massenspektrometrie

Für die Untersuchung der oxidativen Modifikation einiger Aminosäuren (AS) wurde die Massenspektrometrie herangezogen. Dabei kamen folgende Geräte zum Einsatz:

- Bruker ESQUIRE LC Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen).
- Micromass QUATTRO MICRO Triple Quadrupol Massenspektrometer, (Micromass, Manchester).

Die Ionisierung der Analyten in der Gasphase erfolgte bei beiden Systemen über ein ESI-Interface (Elektrospray-Ionisation), welches bei den Untersuchungen im Positiv-Modus (Anlegen einer positiven Spannung) betrieben wurde und zur Entstehung positiv geladener Ionen, hauptsächlich  $[M+H]^+$  und  $[M+Na]^+$ , führte.

Die Detektoreinheit des Bruker-Systems besteht aus einer Ionenfalle, während das Micromass-System mit einem Triple-Quadrupol arbeitet. Die meisten Untersuchungen wurden mit dem Bruker-System im Scanmodus durchgeführt. Das Micromass-System wurde hauptsächlich eingesetzt, um Reaktionsprodukte, die anhand der Molekülmasse nicht eindeutig identifiziert werden konnten, über Tochterionenanalyse näher zu charakterisieren.

Die Probenzufuhr erfolgte bei beiden Systemen über Direkteinlass, wobei die AS-Lösungen in einer Konzentration von 100 µg / ml mittels einer Injektorpumpe (SyringePump 74900, Cole Parmer, Vernon Hills) und einer Hamiltonspritze mit einer Flussrate von 100 µl / h injiziert wurden.

Bei Lehmann findet sich eine detaillierte Einführung in die Massenspektrometrie mit ausführlicher Beschreibung der unterschiedlichen Ionisationsverfahren, Detektoreinheiten und Tochterionenanalyse [LEHMANN 1996].

#### 4.3.5 Gaschromatographische Bestimmung von CO<sub>2</sub>

Die Freisetzung von CO<sub>2</sub> aus einer Histidinlösung nach Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Fe<sup>2+</sup> wurde mittels Gaschromatographie (GC) bestimmt. Die Reaktionslösung (10 ml) wurde in einer *Headspace*-Ampulle (Kleinfeld Labortechnik, Gehrden) angesetzt und sofort mit einer Bördelkappe und passendem Septum (Kleinfeld

---

\*Pseudomolekülionen durch Anlagerung (Adduktbildung) von Ionen am Analyt (M).

$[M+H]^+$  Protonaddukt

$[M+Na]^+$  Natriumaddukt

Labortechnik, Gehrden) verschlossen. Über einen Kapillarschlauch wurden die austretenden Gase in eine andere Headspace-Ampulle weitergeleitet, die zuvor mit Argon befüllt und ebenfalls mit einer Bördelkappe samt Septum zugehalten wurde (Abb. 4.16). Nach einer 5-minütigen Gaszufuhr aus der Reaktionsampulle wurde die Bördelkappe der Gasampulle gasdicht verschlossen.

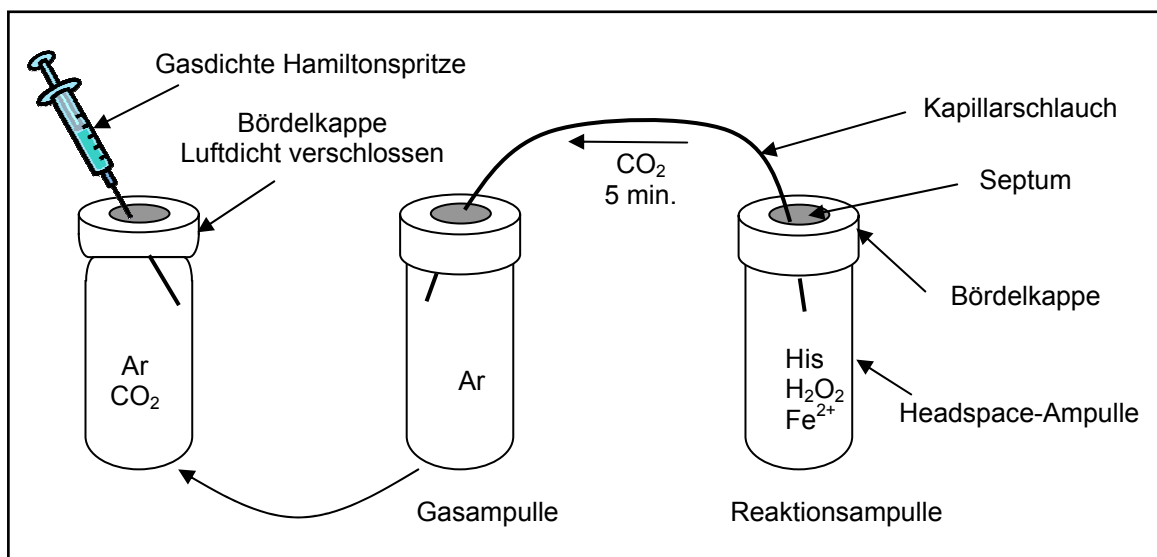


Abb. 4.16: Probenaufbereitung für die GC-Bestimmung von  $\text{CO}_2$ .

Mit einer gasdichten Hamiltonspritze wurden  $70 \mu\text{l}$  Gas aus der Gasampulle entnommen und davon  $50 \mu\text{l}$  in den Gaschromatographen injiziert. Als Referenz wurde eine Spatelspitze Natriumcarbonat in verdünnte Salzsäure gelöst und das austretende  $\text{CO}_2$ , wie bei der Probenaufbereitung erläutert, aufgefangen und vermessen. Es fanden noch zusätzliche Messungen mit Argon und Raumluft statt.

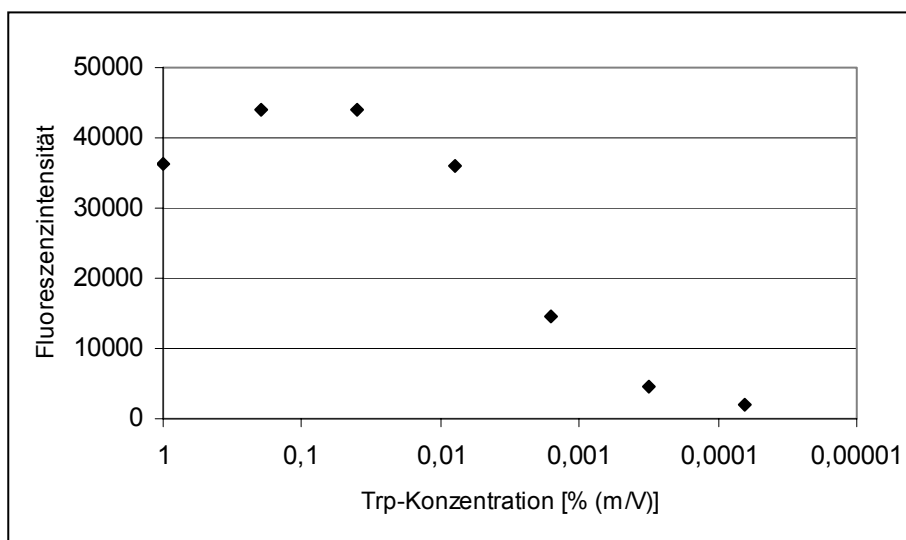
#### **Gaschromatograph und Messparameter:**

|                           |   |
|---------------------------|---|
| Kapillargaschromatograph: | SATOCHROM Doppelsäulen-GC,  |
| Kapillarsäule:            | 25 m PROAPLOT Q Plot Fused Silica Ø<br>0,32 mm, Varian, Palo Alto |
| Detektor:                 | Wärmeleitfähigkeitsdetektor, $130 \text{ }^\circ\text{C}$         |
| Injektor:                 | $150 \text{ }^\circ\text{C}$ , isotherm                           |
| Trägergas:                | Helium, $20 \text{ ml / min}$                                     |

### 4.3.6 Fluorimetrische Bestimmung von Tryptophan

Der Umsatz von Tryptophan (Trp) in der Fenton-Reaktion mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{Fe}^{2+}$  wurde anhand von Fluoreszenzmessungen verfolgt. Dabei wurde einerseits der Abbau von Trp durch die Abnahme der Trp-Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{Ex}}$  280 nm;  $\lambda_{\text{Em}}$  350 nm) und andererseits die Entstehung von Reaktionsprodukten über die Zunahme der Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{Ex}}$  370 nm;  $\lambda_{\text{Em}}$  440 und 500 nm) im Verlauf der oxidativen Modifikation von Trp detektiert. Die Messungen wurden an einem Mikroplattenfluorimeter (Safire, Tecan, Crailsheim) in 96-Loch-Mikroplatten mit einem optischen Fenster bis 200 nm (UV-Star, Greiner Bio-One, Frickenhausen) durchgeführt.

Für die fluorimetrische Bestimmung von Trp muss die Tatsache beachtet werden, dass ab einer bestimmten Trp-Konzentration die Trp-Fluoreszenz mit weiter ansteigenden Konzentrationen wieder abnimmt. Dies wird anhand der Abbildung 4.17 verdeutlicht.



**Abb. 4.17: Fluorimetrische Bestimmung von Trp.** Es wurde eine Verdünnungsreihe von Trp in Wasser hergestellt und bei einem eingestellten pH-Wert von 7,4 die Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{Ex}}$  280 nm;  $\lambda_{\text{Em}}$  350 nm) bestimmt.

Um den Umsatz von Trp über die Abnahme der Trp-Fluoreszenz detektieren zu können, war es nun wichtig eine Trp-Konzentration zu wählen, die einerseits zwar eine genügend hohe Fluoreszenzintensität aufweist andererseits aber bei

---

\*  $\lambda_{\text{Ex}}$  Anregungswellenlänge  
 $\lambda_{\text{Em}}$  Emissionswellenlänge

weiterem Rückgang mit einer steilen Abnahme der Fluoreszenzintensität verbunden ist.

Daher wurde die Trp-Konzentration von ursprünglich 0,5 % (m/V) in der Reaktionslösung auf 0,002 % (m/V) für die Fluoreszenzmessung verdünnt. Für die Bestimmung der Reaktionsprodukte ( $\lambda_{\text{Ex}}$  370 nm;  $\lambda_{\text{Em}}$  440 und 500 nm) wurde die Reaktionslösung aber unverdünnt vermessen.

## **4.4 Ex vivo Untersuchungen**

### **4.4.1 Schweinehaut**

Für die *ex vivo* Untersuchungen wurde Schweinehaut als Versuchsmaterial ausgewählt. Neben der kostengünstigen und leichten Verfügbarkeit eignet sich Schweinehaut aufgrund zahlreicher Übereinstimmungen hinsichtlich Morphologie, Physiologie und Biochemie besonders gut als Modell für die menschliche Haut. Dazu gehören neben einer spärlichen Behaarung noch die relativ dicke Epidermis mit der charakteristischen Verankerung in den Papillen der Dermis, ein hoher Anteil an elastischen Fasern in der Dermis, Parallelen im Aufbau und Zusammensetzung der Strukturproteine, ein ähnlicher Durchblutungsgrad der Haarfollikel, vergleichbare Enzymmuster der Epidermis und teilweise auch der apokrinen Drüsen sowie auffallende Übereinstimmungen in der Zusammensetzung des Lipidfilms der Hautoberfläche [HEINRICH et al 1971; MEYER et al 1978; GRAY et al 1982; WOLLINA et al 1991].

Die Ähnlichkeit der Schweinehaut mit der menschlichen Haut äußert sich auch in einer sehr guten Korrelation der Daten bezüglich der Hautpermeabilität für Testsubstanzen [BRONAUGH et al 1982; SIMON & MAIBACH 2000; SONGKRO et al 2003] und der untersuchten Parameter bei der Wundheilung [SULLIVAN et al 2001].

Neben den genannten Übereinstimmungen existieren jedoch auch Unterschiede. So fehlen in der Schweinehaut ekkrine Drüsen und die subkutane Fetteinlagerung ist verglichen mit der menschlichen Haut deutlich stärker ausgeprägt [MEYER et al 1978].

#### ***Vorbereitung der Schweinehaut :***

Die nicht abgebrühte Rückenhaut ausgewählter Schlachtschweine (weiblich, ca. 130 Tage alt) wurde von einem lokalen Schlachter in einer Kühlbox geliefert und direkt am Tag der Schlachtung verarbeitet und vermessen. Die Haut wurde rasiert und nach der Entfernung des Unterhautfettgewebes mit Leitungswasser abgespült. Anschließend wurden aus dem Hautlappen runde Stücke (d = 5 cm) ausgestanzt, in einer Plastiktüte luftdicht verpackt und bis zur Messung bei 4 °C gelagert.

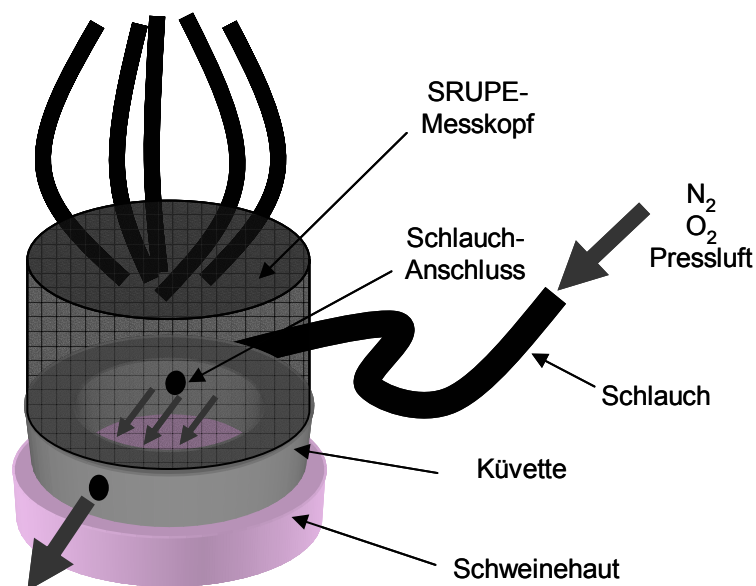
Für einige Untersuchungen wurden mit einem Dermatome ausgehend vom Stratum Corneum dünne Hautschnitte angefertigt.



#### 4.4.2 Untersuchung des Einflusses von O<sub>2</sub> auf die UV-induzierte UPE

Um den Effekt von Sauerstoff auf die UV-induzierte UPE zu untersuchen, wurde eine spezielle Küvette am SRUPE-Messkopf befestigt, die über einen Anschluss die Möglichkeit bot den Raum, den der Messkopf beim Aufsetzen auf die Haut einschloss, mit einem Gas zu überströmen, um somit sehr zügig über der Haut eine entsprechende Atmosphäre zu schaffen (Abb. 4.18).

Als einströmende Gase wurden wahlweise Stickstoff, Sauerstoff oder Pressluft gewählt und Messungen bei 0 %, 20 % (Pressluft) bzw. 100 % Sauerstoffanteil durchgeführt. Stickstoff und Pressluft wurden über hausinterne Leitungen, die an einer Kontrolleinheit angeschlossen waren, eingeleitet. Somit bestand die Möglichkeit auch während einer laufenden UPE-Messung zwischen Stickstoff und Pressluft vom UPE-Kontrollraum aus umzuschalten. Sauerstoff wurde über eine Gasflasche zugeführt und manuell bedient. Es war daher nicht möglich, die Sauerstoffzufuhr vom UPE-Kontrollraum zu steuern.



**Abb. 4.18:** Versuchsaufbau für die Untersuchung des O<sub>2</sub>-Effektes auf die UV-induzierte UPE. Die Messungen wurden mit dem SRUPE-System durchgeführt.

#### 4.4.3 Geräte zur Untersuchung weiterer Einflussfaktoren auf die UV-induzierte UPE

Die nachfolgend aufgeführten Geräte sind entsprechend der untersuchten Einflussfaktoren sortiert. Alle Geräte wurden ausschließlich im Rahmen der

Spezifikationen des Herstellers betrieben und falls erforderlich nach Herstellerangaben vor dem Einsatz kalibriert.

***Hautfeuchtigkeit:***

Exsikkator SCHOTT AG, Mainz

Corneometer CM 825, Courage + Khazaka electronic GmbH, Köln

***pH-Wert der Haut:***

pH-Elektrode Skincheck HI1413S/50, HANNA Instruments, Kehl

***Hauttemperatur:***

Strahlungspyrometer KT19.82, HEITRONICS Infrarot Messtechnik GmbH,  
Wiesbaden

## 4.5 *In vivo* Untersuchungen

### 4.5.1 Probanden

Die *in vivo*-Studien wurden an freiwilligen Versuchspersonen (Probanden) durchgeführt. Die Probanden wurden vor dem Studienbeginn schriftlich über den Ablauf der Studie unterrichtet und durften erst nach Abgabe einer Einwilligungserklärung an der Studie teilnehmen. Aufgrund geringerer Behaarung der Testareale (Innenseiten der Unterarme) wurden ausschließlich Frauen für die Studien eingeladen.

Folgende Ausschlusskriterien wurden für die Teilnahme an den Studien angelegt:

- Jünger als 18 und älter als 65 Jahren
- Schwangerschaft und/oder Stillzeit
- Hauterkrankungen, Wunden, Sonnenbrand, Narben, Tätowierungen, Pigmentierungen oder Muttermale in den Testarealen, die die Untersuchungen beeinträchtigen könnten
- Einnahme von antiallergischen oder antibakteriellen Medikamenten innerhalb der letzten 2 Wochen
- Topische Anwendung von immunsuppressiven, antiallergischen oder antibakteriellen Medikamenten im Testareal innerhalb der letzten 4 Wochen
- Schwere Immunsystemerkrankungen
- Alkoholkonsum vor Untersuchungsbeginn
- Gleichzeitige Teilnahme an anderen Studien
- Reinigungspersonal und Frisöre (mögliche Beeinträchtigung der Messareale durch Chemikalien wie z.B. Tenside und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Weiterhin sollten die Probanden im Rahmen einer Vorkonditionierung eine Woche vor Testbeginn auf Creme- und Ölbäder, Verwendung von Pflegeprodukten und Parfüm an den Armen und Solarienbesuche verzichten. Zusätzlich sollten Sauna- und Schwimmbadbesuche sowie die Ausübung schweißtreibenden Sport drei Tage vor Messbeginn vermieden werden.

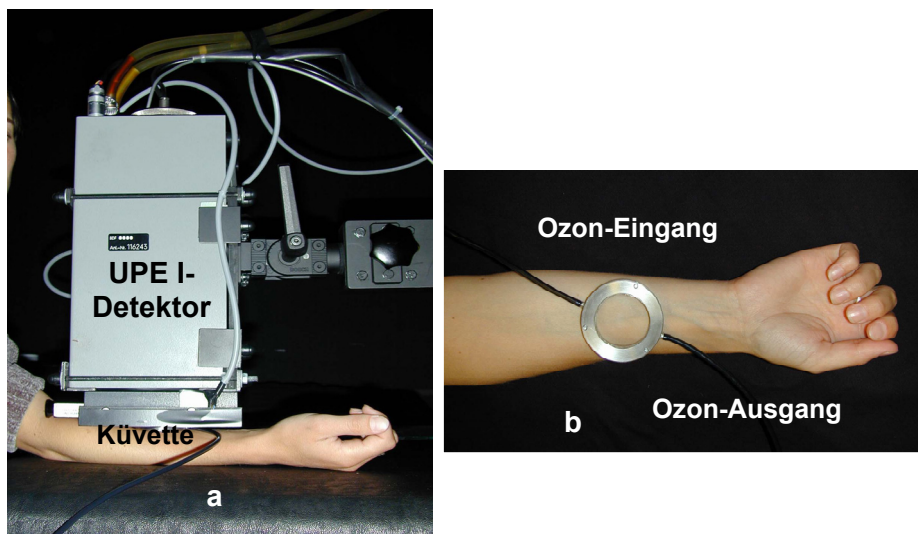
### 4.5.2 Studiendesign und Produktapplikation

Die *in vivo* Studien wurden vehikelkontrolliert und einfach blind durchgeführt. Die untersuchten Hautpartien beschränkten sich auf die Innenseiten der Unterarme, wobei jede Armseite in zwei Testareale unterteilt wurde. Die Zuordnung der Prüfprodukte zu den Testarealen erfolgte nach einem festgelegten

Permutationsschema, wodurch mögliche Einflüsse der Hautbereiche ausgeschlossen werden sollten. Die Anwendung der codierten Produkte erfolgte zweimal täglich in einem für die Studie festgelegten Zeitraum und wurde meistens durch den Probanden nach einer ausführlichen Einweisung eigenständig durchgeführt. Bei einer kontrollierten Anwendung wurde die Applikation der Prüfprodukte durch den Studiendurchführenden vorgenommen, wodurch drei Testareale pro Arminnenseite realisiert werden konnten.

#### 4.5.3 Messeinrichtung für Ozon-induzierte UPE

Zur Detektion ozoninduzierter UPE wurde eine Spezialküvette konstruiert (Abb. 4.19 b), die direkt auf die Haut aufgesetzt wurde. Durch diese Küvette wurde ein kontrollierter Strom von Ozon über die Haut geleitet und die ozoninduzierte UPE mit dem UPE I-System aufgenommen (Abb. 4.19 a). Gleichzeitig isolierte die Küvette mittels eines Quarzglases das Untersuchungsareal von Umgebungseinflüssen und schirmte darüber hinaus das Messsystem und den Probanden vom Ozon ab.



**Abb. 4.19: Küvette (b) und Mess-System (a) der ozoninduzierten UPE-Messung.**

Ozon wurde während der Messwertaufnahme von einer Ozonsimulationsanlage (COM-AD-02, Anseros Klaus Nonnenmacher GmbH, Tübingen) produziert und nach der Reaktion mit der Haut am Ende des Ozon-Ausganges durch einen Katalysator aus der Abluft entfernt.

## 4.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde bei normal verteilten Stichproben der t-Test herangezogen, wobei bei abhängigen Stichproben der gepaarte t-Test gewählt wurde. Alle für die statistische Auswertung relevanten Parameter (Mittelwert, Standardabweichung und t-Test) wurden mit Microsoft Excel berechnet.

Folgende Signifikanzniveaus ( $p$ ) wurden definiert:

\* =  $p < 0,05$

\*\* =  $p < 0,01$

\*\*\* =  $p < 0,001$

## 5 Ergebnisse

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit können grob in drei Abschnitte aufgeteilt werden:

Der erste Abschnitt befasst sich zunächst mit der *in vivo*-Erfassung der stress-induzierten UPE auf der Haut. Da die *in vivo* Messung als ein Haupteinsatzgebiet der UPE-Messtechnik angesehen wird, sollte zunächst geklärt werden, inwieweit gängige, oxidativ wirkende Noxen wie z.B. UVA-Strahlung, Ozon und Benzoylperoxid (BPO) auf der Haut ein UPE-Signal generieren und ob der Einsatz von topisch applizierten Antioxidantien dieses Signal modulieren kann.

Im Anschluss an diesen Untersuchungen stellte sich die Frage nach der Beteiligung tieferer Hautschichten an der induzierten UPE. Für die Relevanz der UPE-Messung war es wichtig zu wissen, ob das UPE-Signal hauptsächlich an den äußeren Schichten der Hautoberfläche, wo vorwiegend abgestorbene Hautzellen (Corneozyten) anzutreffen sind, generiert wird oder ob lebende Zellschichten der Epidermis ebenfalls einen Anteil am Signal haben. Diese Fragestellungen wurden an einem *ex vivo* Schweinehautmodell untersucht. Dieses Modell wurde ebenfalls zum Abschluss des ersten Abschnittes eingesetzt, um erstmalig eine stressor-abhängige, spektrale Auflösung des induzierten UPE-Signals aufzunehmen.

Der zweite Abschnitt behandelt oxidative Prozesse, die *in vitro* induziert und mit der UPE-Messtechnik gemessen wurden. Die Komplexität der Haut erforderte den Einsatz eines einfachen Systems mit überschaubaren Komponenten und Einflussgrößen, um die UPE-generierenden Reaktionen näher zu untersuchen.

Als Substrate wurden Bovines Serum Albumin (BSA) und einige Aminosäuren eingesetzt. Oxidationsmittel waren Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Einsatz in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen und  $\text{HCO}_3^-$

Einige UPE-Messungen wurden durch andere analytische Methoden wie ELISA-Technik, Massenspektrometrie und Fluorimetrie begleitet, um Stoffumsätze und Reaktionsprodukte beim Substrat bzw. Oxidationsmittel zu erfassen.

Im dritten Abschnitte liegt der Schwerpunkt auf Untersuchungen von Einflussfaktoren der UV-induzierten UPE. Denn wie bereits in Kapitel 3.2.3 erläutert wurde, spielt die UV-Strahlung die wichtigste Rolle bei der umweltbedingten Schädigung der Haut.

Als Einflussfaktoren wurden unter anderem die Hautfeuchtigkeit, der Haut pH-Wert, die Hauttemperatur und Luftsauerstoff untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten neue Erkenntnisse über die Kinetik der UV-induzierten UPE gewonnen und mögliche Reaktionswege aufgezeigt werden.

Die meisten Untersuchungen wurden an der Schweinehaut *ex vivo* durchgeführt. Einige Ergebnisse konnten aber auch bei *in vivo*-Untersuchungen bestätigt werden.

## 5.1 Untersuchung der stressinduzierten UPE auf der Haut

### 5.1.1 BPO-induzierte UPE ( $UPE_{BPO}$ ) auf Humanhaut

Benzoylperoxid ist ein gängiger Wirkstoff zur Aknebehandlung und wird in Konzentrationen zwischen 3 – 10 % topisch eingesetzt. Es ist bekannt, dass eine einmalige topische Applikation von BPO innerhalb 24 h einen dramatischen Rückgang (>90 %) der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration im gesamten Stratum Corneum bewirkt [THIELE 2001]. Zusätzlich konnte eine starke Oxidation der Proteine im Stratum Corneum nach Behandlung mit BPO *in vitro* beobachtet werden [THIELE et al 1999].

Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob die topische Applikation von BPO mit der Generierung von UPE verbunden ist und ob das UPE-Signal durch Zusatz von Antioxidantien (AOX) reduziert werden kann.

Zur Beantwortung wurde eine Anwendungsstudie mit 16 Probanden mit dem UPE I-System durchgeführt und dabei folgende Prüfprodukte eingesetzt:

*Tab. 5.1: Prüfprodukte, Stressor und ihre Zusammensetzung. Die Produkte (Vehikel und Vehikel + AOX) wurden kurz vor der Studie frisch hergestellt und in Aluminiumtuben abgefüllt. Der pH-Wert wurde auf 6,8 eingestellt. Cordes BPO wurde als Fertigarzneimittel von der Apotheke bezogen.*

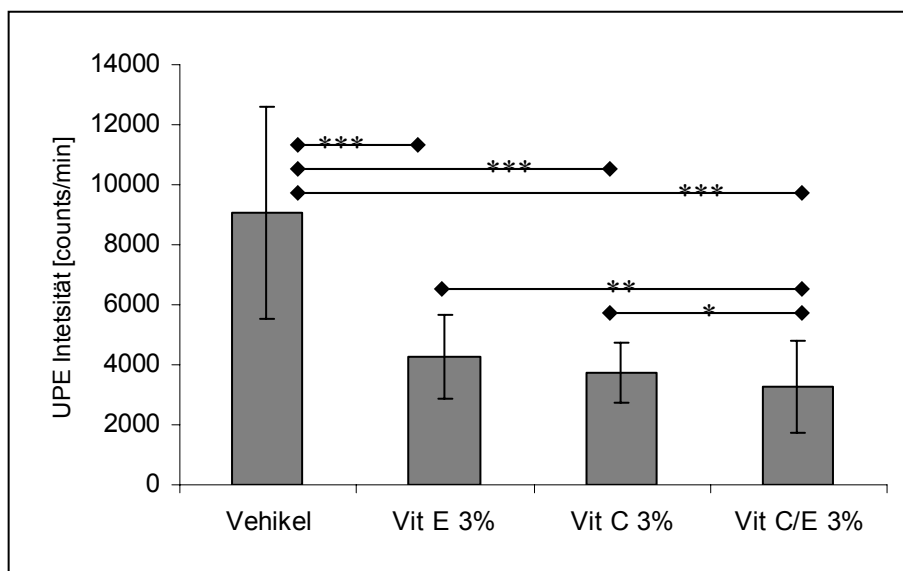
| <b>Prüfprodukte</b>                | <b>Produktzusammensetzung</b>                                      |
|------------------------------------|--|
| Vehikel                            | O/W-Grundlage  |
| Vit C 3 %                          | O/W-Grundlage + 3 % Ascorbinsäure                                  |
| Vit E 3 %                          | O/W-Grundlage + 3 % $\alpha$ -Tocopherol                           |
| Vit C/E 3%                         | O/W-Grundlage + 1,5 % Ascorbinsäure und 1,5 % $\alpha$ -Tocopherol |
| <b>Oxidationsmittel (Stressor)</b> |  |
| Cordes BPO 3 %                     | Gel mit 3 % BPO  |

Die Prüfprodukte wurde zum Zeitpunkt  $t_0$  durch den Testdurchführenden appliziert ( $2,5 \mu\text{l} / \text{cm}^2$ ). Nach einer Einwirkzeit von 15 min wurde das BPO-Gel aufgetragen ( $2,5 \mu\text{l} / \text{cm}^2$ ) und eine Minute später die induzierte UPE über eine Zeitspanne von einer Minute aufsummiert (Abb. 5.1).

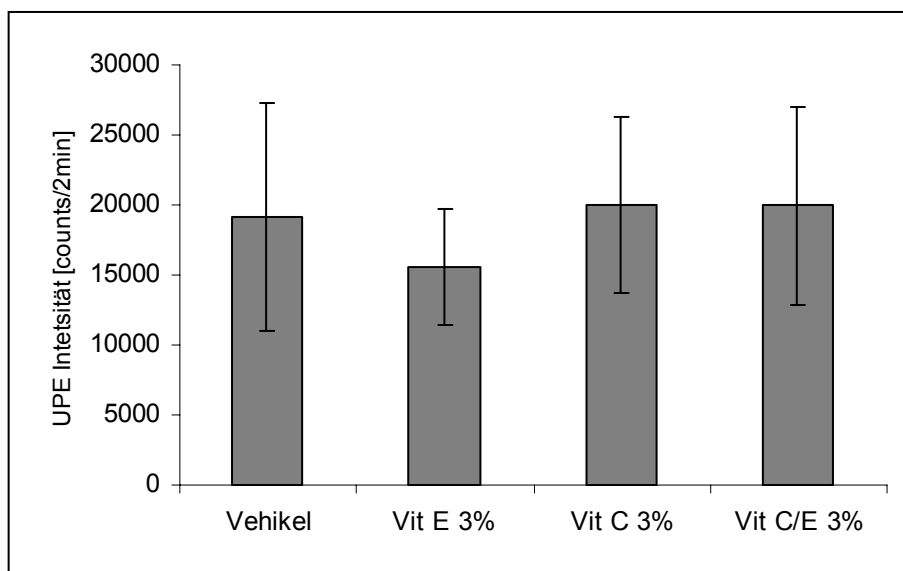
Nach einer einwöchigen (2 mal täglich) Behandlungsphase mit den Prüfprodukten wurden die Probanden erneut vermessen ( $t_1$ ). Die Testareale wurden wieder mit



BPO behandelt und nach einer Einwirkzeit von einer Minute einer UPE-Messung unterzogen. Im Unterschied zu der  $t_0$ -Messung (15 min nach Anwendung) lag hier die letzte Anwendung der Prüfprodukte mindestens 14 h zurück. Die induzierte UPE wurde bei der  $t_1$ -Messung über zwei Minuten aufsummiert (Abb. 5.2).



**Abb. 5.1:** UPE<sub>BPO</sub> in vivo zum Zeitpunkt  $t_0$ . BPO wurde 15 min nach der ersten Produktanwendung appliziert. Eine Minute später wurde die induzierte UPE über eine Minute aufsummiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der induzierten UPE-Intensität von 16 Probanden.



**Abb. 5.2:** UPE<sub>BPO</sub> in vivo zum Zeitpunkt  $t_1$ . Die Messung fand nach einer einwöchigen Anwendungsphase (2mal täglich) statt, wobei die letzte Anwendung mindestens 14 h zurück lag. Die induzierte UPE wurde eine Minute nach BPO-Applikation über zwei Minuten aufsummiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der induzierten UPE-Intensität von 16 Probanden.

Die topische Applikation von BPO induziert ein deutliches UPE-Signal (ca. 9000 counts / min), welches klar über der spontanen UPE (ca. 1100 counts / min) der Haut liegt (Abb. 5.1 u. 5.2). Die induzierte UPE resultiert dabei auf jeden Fall aus der Reaktion von BPO mit Hautbestandteilen. Ein UPE-Signal, das auf die Reaktion des BPO mit den Prüfprodukten oder aus möglichen Zerfallsreaktionen des BPO-Gels selbst resultiert, konnte durch Vorversuche ausgeschlossen werden.

Alle AOX-haltigen Prüfprodukte zeigen bei der  $t_0$ -Messung gegenüber dem Vehikel eine deutliche und signifikante Reduktion der  $UPE_{BPO}$ . Die Reduktion beträgt dabei ca. 60 %. Während die Produkte Vit E 3 % und Vit C 3% eine gleichwertige Reduktion der induzierten UPE aufweisen, ist diese beim Kombinationsprodukt signifikant stärker (Abb. 5.1).

Zum Zeitpunkt  $t_1$ , 14 h nach der letzten Produktanwendung, ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Veren und dem Vehikel nicht mehr vorhanden. Nur das Produkt mit 3 % Vitamin E weist eine tendenzielle Reduktion der  $UPE_{BPO}$  auf.

### 5.1.2 Ozon-induzierte UPE ( $UPE_{OZON}$ ) auf Humanhaut

Mit einem Redoxpotential von +2,07 mV gehört Ozon zu den stärksten Oxidationsmitteln und verursacht sowohl direkt als auch über Sekundärreaktionen vielfältige oxidative Modifikationen der Biomoleküle [PRYOR 1994].

Mit zunehmender Luftverschmutzung durch Straßenverkehr und Industrieabgase gewinnt die Ozonbelastung, als Hauptbestandteil des photochemischen Smogs, immer mehr an Bedeutung. Besonders an heißen und sonnigen Tage erreicht die Ozonkonzentration in Bodennähe Rekordwerte. Diese kann Reizungen der Schleimhäute sowie der Augen hervorrufen und zu einer Schädigung von Lungengewebe führen. Durch seine geringe Wasserlöslichkeit wird es in den oberen Atemwegen kaum zurückgehalten und dringt bis in die feinen Lungenbläschen vor [STROH 2004].

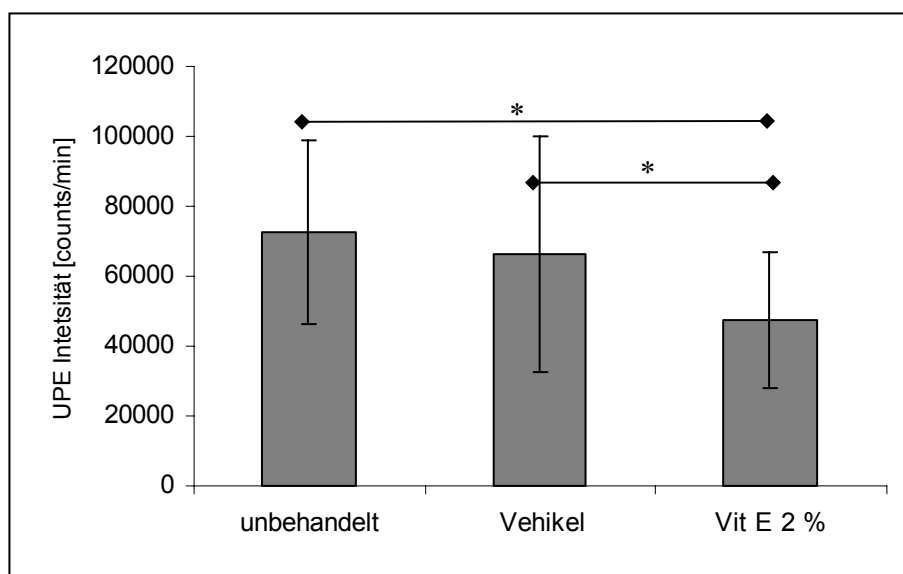
Untersuchungen mit Mäusen konnten eine signifikante Reduktion der hydrophilen und hydrophoben AOX-Konzentration im Stratum Corneum schon ab einer Ozonkonzentration von 5 ppm zeigen. Parallel dazu stieg die Konzentration von MDA (Abbauprodukt von Lipidhydroperoxiden) im Stratum Corneum an [THIELE et al 1997b; WEBER et al 2001].

In einer Anwendungsstudie mit 10 Probanden wurde nachfolgend die Generierung von UPE auf der Haut nach Ozonexposition und der Einfluss von AOX-haltigen Prüfprodukten auf die  $UPE_{OZON}$  untersucht.

Die Messung erfolgte mit der im Kapitel 4.5.3 beschriebenen Messeinrichtung, wobei die  $UPE_{OZON}$  während der Ozonexposition über eine Minute aufgenommen wurde. Vor der UPE-Messung wurden die Testareale drei Tage lang (2 mal täglich) mit den Prüfprodukten kontrolliert behandelt. Zum Messzeitpunkt lag die letzte Behandlung ca. 18 h zurück.

Folgende Prüfprodukte wurden eingesetzt:

- Tocopherol 2 % in einer O/W-Grundlage (Vit E 2 %)
- Vehikel (O/W-Grundlage ohne Tocopherol)



**Abb. 5.3:  $UPE_{Ozon}$  in vivo und der Einfluss von Vitamin E.** Ozonkonzentration  $50 \text{ mg} / \text{Nm}^3$ , Ozonfluss  $175 \text{ l} / \text{h}$ . Die  $UPE_{Ozon}$  wurde während Ozonexposition über eine Minute aufgenommen. Die Messung fand nach einer dreitägigen Behandlungsphase (2 mal täglich) mit den Testprodukten statt, wobei die letzte Anwendung ca. 18 h zurück lag. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der induzierten UPE-Intensität von 10 Probanden.

Die Exposition der Haut mit Ozon induziert ein UPE-Signal, dessen Intensität mit ca. 70000 counts / min deutlich über der der spontanen UPE liegt. Das mit Vitamin E vorbehandelte Areal zeigt im Vergleich zum Vehikel-behandelten und zum unbehandelten Areal signifikant geringere  $UPE_{Ozon}$ -Werte.

### 5.1.3 UVA-induzierte UPE ( $UPE_{UVA}$ ) auf Humanhaut

Die Bedeutung der UVA-Strahlung für den oxidativen Stress in der Haut wurde in Kapitel 3.2.3 bereits ausführlich besprochen. Es ist zudem bekannt, dass eine UVA-Exposition der Haut ein UPE-Signal generiert, welches durch topische Applikation von AOX reduziert werden kann [EVELSON et al 1997; SAUERMAN et al 1999; OU-YANG et al 2004].

Anhand von *in vivo* Studien sollten zunächst die oben zitierten Literaturdaten mit den für diese Arbeit eingesetzten UPE-Systeme bestätigt werden. Als AOX stand dabei Vitamin C im Vordergrund. Die *in vivo* Studien wurden mit UPE-Systemen durchgeführt, die eine Anschlussmöglichkeit für eine externe Lichtquelle besitzen (UPE II- und SRUPE-System).

#### **Anwendungsstudie mit dem UPE II-System:**

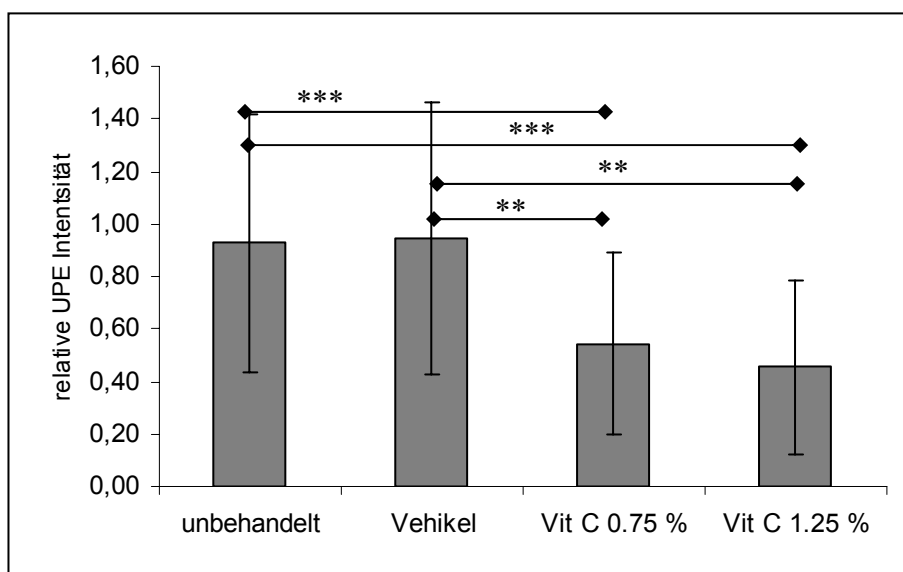
Die Studie wurde mit 18 Probanden begonnen und mit 18 Probanden beendet. Davon wurden 17 Probanden in die Auswertung eingeschlossen. Folgende Prüfprodukte kamen dabei zu Einsatz:

*Tab. 5.2: Prüfprodukte und ihre Zusammensetzung. Die Produkte wurden kurz vor der Studie frisch hergestellt und in Aluminiumtuben abgefüllt. Der pH-Wert wurde 6,8 eingestellt.*

| <b>Prüfprodukte</b> | <b>Produktzusammensetzung</b>        |
|---------------------|--------------------------------------|
| Vehikel             | O/W-Grundlage                        |
| Vit C 1,25 %        | O/W-Grundlage + 1,25 % Ascorbinsäure |
| Vit C 0,75 %        | O/W-Grundlage + 0,75 % Ascorbinsäure |

Zum Zeitpunkt  $t_0$  wurden alle Testareale zunächst im unbehandelten, vorkonditionierten Zustand vermessen. Nach einer einwöchigen (2 mal täglich) Behandlungsphase mit den Prüfprodukten erfolgte die  $t_1$ - Messung, wobei die letzte Anwendung mindestens 14 h zurück lag.

Die Testareale wurden mit der FXS 300 Lampe, gefiltert durch ein WG 335, mit einer UVA-Dosis von 75 mJ / cm<sup>2</sup> bestrahlt. Die  $UPE_{UVA}$  wurde direkt nach der Bestrahlung (*delay* 500 ms) über 40 s aufsummiert.



**Abb. 5.4:**  $UPE_{UVA}$  in vivo zum Zeitpunkt  $t_1$  normiert auf  $t_0$ . Die UPE-Messung wurde mit dem UPE II-System durchgeführt. Die Areale wurden mit  $75 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  UVA bestrahlt (FXS 300, WG 335) und die  $UPE_{UVA}$  über 40 s nach Bestrahlung aufsummiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der relativen UPE Intensität von 17 Probanden. Die  $UPE_{UVA}$  Intensität der Prüfareale zum Zeitpunkt  $t_1$  (nach einwöchiger Behandlungsphase, letzte Anwendung ca. 14 h vor der Messung) wurde dabei auf die Intensität der entsprechenden Areale zum Zeitpunkt  $t_0$  normiert.

Während sich die mit Vehikel behandelten Prüfareale auf dem gleichen Niveau wie die unbehandelten Areale befinden, zeigen die mit Vitamin C behandelten Areale eine signifikante Reduktion der  $UPE_{UVA}$  von über 50 %. Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen der Behandlung mit 0,75 % Vitamin C und 1,25 % Vitamin C nicht festgestellt werden.

### Anwendungsstudie mit dem SRUPE-System

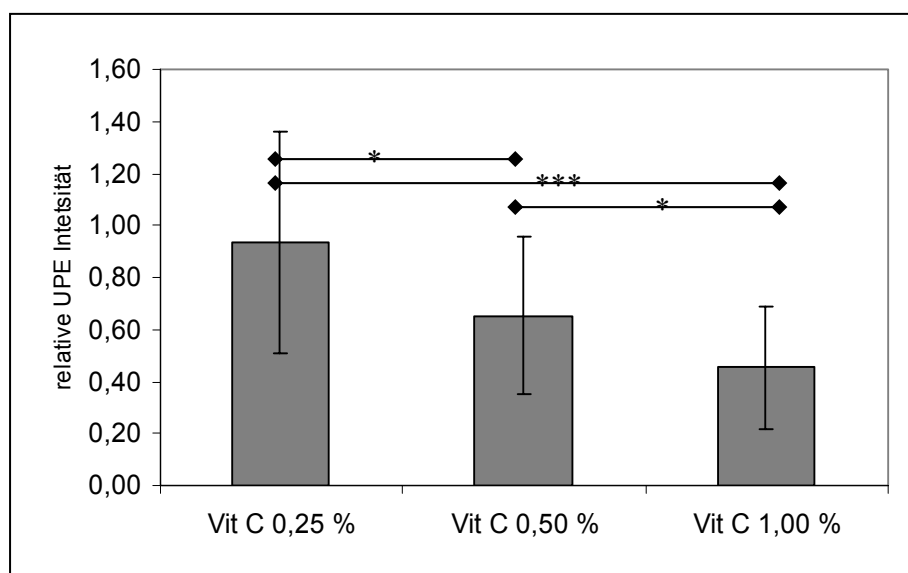
Die Studie wurde mit dem SRUPE-System im stationären Modus durchgeführt. An dieser haben 20 Probanden teilgenommen, von denen 16 die Studie beendet haben. In die Auswertung wurden die Daten von 15 Probanden aufgenommen. Die deutliche Reduktion der  $UPE_{UVA}$  durch Vitamin C sollte hier anhand einer Konzentrationsreihe genauer untersucht werden. Dabei wurden die in Tabelle 5.3 aufgeführten Prüfprodukte eingesetzt.

Zum Zeitpunkt  $t_0$  wurden alle Testareale zunächst im unbehandelten, vorkonditionierten Zustand vermessen. Im Anschluss fand eine kontrollierte Anwendung der Prüfprodukte (2 mal täglich) über einen Zeitraum von drei Tagen statt. Nach der Behandlungsphase folgte die  $t_1$ -Messung ca. 18 h nach der letzten Anwendung.

Tab. 5.3: Prüfprodukte und ihre Zusammensetzung. Die Produkte wurden kurz vor der Studie frisch hergestellt und in Aluminiumtuben abgefüllt. Der pH-Wert wurde 6,8 eingestellt.

| Prüfprodukte | Produktzusammensetzung               |
|--------------|--------------------------------------|
| Vehikel      | O/W-Grundlage                        |
| Vit C 0,25 % | O/W-Grundlage + 0,25 % Ascorbinsäure |
| Vit C 0,50 % | O/W-Grundlage + 0,50 % Ascorbinsäure |
| Vit C 1,00 % | O/W-Grundlage + 1,00 % Ascorbinsäure |

Die Prüfareale wurden mit einer UVA-Dosis von 86 mJ / cm<sup>2</sup> bestrahlt und die UPE<sub>UVA</sub> direkt nach der Bestrahlung (*delay* 500 ms) aufgenommen. Als Bestrahlungseinheit wurde die FXS 300 Lampe in Kombination mit einem WG 335 Filter eingesetzt.



**Abb. 5.5:** UPE<sub>UVA</sub> *in vivo* zum Zeitpunkt  $t_1$  normiert auf  $t_0$  und Vehikel. Die UPE-Messung wurde mit dem SRUPE-System im stationären Modus durchgeführt. Die Areale wurden mit 86 mJ / cm<sup>2</sup> UVA bestrahlt (FXS 300, WG 335) und die UPE<sub>UVA</sub> über 40 s nach Bestrahlung aufsummiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der relativen UPE Intensität von 15 Probanden. Die UPE<sub>UVA</sub> Intensität der Prüfareale zum Zeitpunkt  $t_1$  (nach drei tätiger Behandlungsphase, letzte Anwendung ca. 14 h vor der Messung) wurde dabei auf die Intensität der entsprechenden Areale zum Zeitpunkt  $t_0$  normiert. Die so erhaltenen Daten wurden anschließend auf das mit Vehikel behandelte Hautareal normiert.

Die topische Applikation von Vitamin C führt konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Reduktion der UPE<sub>UVA</sub>. Die minimale Wirkstoffkonzentration von Vitamin C liegt nach dieser Untersuchung zwischen 0,25 % und 0,50 %.

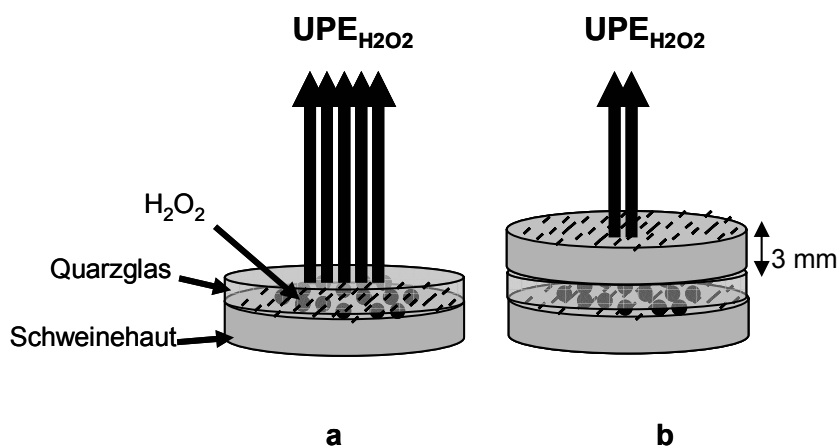
### 5.1.4 Anteil tieferer Hautschichten an der $UPE_{UVA}$

Beim Einsatz der UPE-Messtechnik für *in vivo*-Messungen und im besonderen Maße für die Untersuchung der  $UPE_{UVA}$  stellte sich die Frage nach der Beteiligung tieferer Hautschichten an der Generierung der stressinduzierten UPE. Da die UPE-Messung direkt auf der Hautoberfläche stattfindet, ist die Durchlässigkeit der Haut für das UPE-Signal die wichtigste Voraussetzung für die Erfassung der UPE-induzierenden Vorgänge aus tiefer liegenden Hautschichten.

#### 5.1.4.1 Durchlässigkeit der Haut für induziertes UPE-Signal

Die Durchlässigkeit der Haut für induzierte-UPE wurde *ex vivo* anhand eines Schweinehautmodells untersucht. Die Schweinehaut wurde wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben vorbereitet.

In einer ersten Versuchsreihe wurde eine 6 %ige  $H_2O_2$ -Lösung auf der Oberseite eines Schweinehautstückes aufgetragen und die Haut mit einem Quarzglas abgedeckt. Nach einer Minute Einwirkzeit wurde die  $H_2O_2$ -induzierte ( $UPE_{H_2O_2}$ ) eine Minute lang durch ein Quarzglas ( $d = 2 \text{ mm}$ ) aufgenommen (Abb.5.6 a). Die Ergebnisse aus der ersten Versuchsreihe wurden dann mit denen aus einer zweiten Versuchsreihe verglichen, bei der die  $UPE_{H_2O_2}$  zusätzlich zum Quarzglas ein weiteres Schweinehautstück ( $d = \text{ca. } 3 \text{ mm}$ ) auf dem Weg zum UPE-Detektor passieren musste (Abb. 5.6 b).



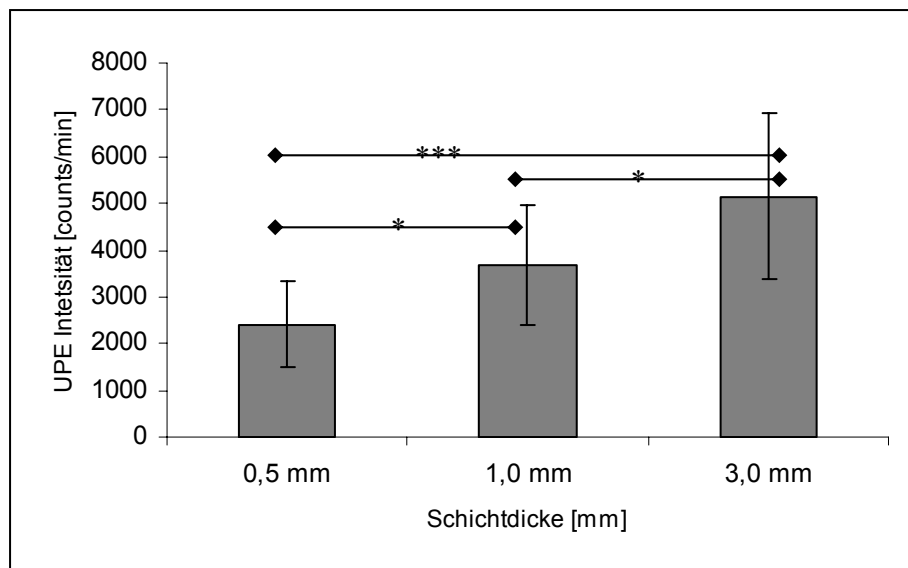
**Abb. 5.6: Durchlässigkeit der Haut für induziertes UPE Signal.** (a)  $UPE_{H_2O_2}$  auf Schweinehaut ausgelöst durch  $2,5 \mu\text{l} / \text{cm}^2$  6 %igen  $H_2O_2$  und gemessen durch ein Quarzglas ( $n = 4$ ; UPE Intensität:  $84582 \pm 985 \text{ counts} / \text{min}$ ). (b) Gleiche Messung wie bei (a), nur diesmal wurde das Quarzglas zusätzlich durch ein weiteres Schweinehautstück ( $d = 3 \text{ mm}$ ) bedeckt ( $n = 4$ ; UPE Intensität  $33693 \pm 623 \text{ counts} / \text{min}$ ). Alle Messungen wurden mit dem UPE I-System durchgeführt.

Der Vergleich der beiden Versuchsreihen macht deutlich, dass immerhin ca. 40 % des  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Signals ein 3 mm dickes Schweinehautstück passieren kann. Die Haut zeigt damit eine sehr gute Durchlässigkeit für induzierte UPE-Signale.

#### 5.1.4.2 Abhängigkeit der $\text{UPE}_{\text{UVA}}$ von der Schichtdicke der bestrahlten Haut

Um herauszufinden, ob auch tiefere Hautschichten an der Generierung der  $\text{UPE}_{\text{UVA}}$  beteiligt sind, wurde von der Schweinehaut ausgehend vom Stratum Corneum unterschiedlich dicke Hautschichten mit einer definierten Schichtdicke mittels eines Dermatoms abgetragen. Somit entstanden Hautstücke, die sich nur in ihrer Schichtdicke voneinander unterschieden.

Die so präparierten Hautstücke wurden von der Oberseite (Stratum Corneum) mit  $360 \text{ mJ/cm}^2$  UVA bestrahlt und die  $\text{UPE}_{\text{UVA}}$  direkt nach der Bestrahlung aufgenommen (Abb. 5.7).



**Abb. 5.7:  $\text{UPE}_{\text{UVA}}$  in Abhängigkeit von der Schichtdicke der bestrahlten Haut.** Von der Schweinehaut wurde ausgehend vom Stratum Corneum eine definierte Schichtdicke abgetragen (0,5, 1,0 bzw. 3 mm). Die  $\text{UPE}_{\text{UVA}}$  wurde nach Bestrahlung der Hautoberseite (Stratum Corneum) mit  $360 \text{ mJ/cm}^2$  UVA (Oriol-Lampe, WG 335) mit dem SRUPE-System im stationären Modus aufgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der  $\text{UPE}_{\text{UVA}}$  Intensität von 10 Messungen pro Schichtdicke.

Die Daten zeigen eine signifikante Steigerung der  $\text{UPE}_{\text{UVA}}$  mit zunehmender Schichtdicke der bestrahlten Schweinehaut. Da sich die Hautstücke nur bezüglich ihrer Schichtdicke unterschieden, kann die Steigerung der  $\text{UPE}_{\text{UVA}}$  nur mit der Beteiligung tiefer liegender Hautschichten an ihrer Generierung erklärt werden.



### 5.1.4.3 Spektrale Verteilung der stressinduzierten UPE auf Schweinehaut

Eines der Ziele dieser Arbeit bestand in der spektralen Analyse des induzierten UPE-Signals, um dadurch mehr Informationen über die UPE-generierenden Vorgänge zu erhalten. Wie in Kapitel 4.1.3 dargelegt, ist die Generierung absoluter UPE-Spektren aufgrund systemabhängiger Faktoren wie z.B. spektrale Empfindlichkeit der Photokathode und Bandbreite der eingesetzten Farbfilter sehr schwierig. Daher wurde die Strategie verfolgt, anhand vergleichender Analyse relativer UPE-Spektren die induzierte UPE näher zu charakterisieren.

Die Voraussetzung für eine vergleichende Analyse ist jedoch nur dann gegeben, wenn stressor- oder substratabhängige Unterschiede im spektralen Verlauf der induzierten UPE vorhanden sind. Da die Haut als Versuchsobjekt im Vordergrund stand, wurde zunächst überprüft, ob sich stressorabhängige Unterschiede im spektralen Verlauf der induzierten UPE auf der Haut feststellen lassen.

Die Untersuchungen fanden auf Schweinehaut unter Einsatz folgender Stressoren statt:

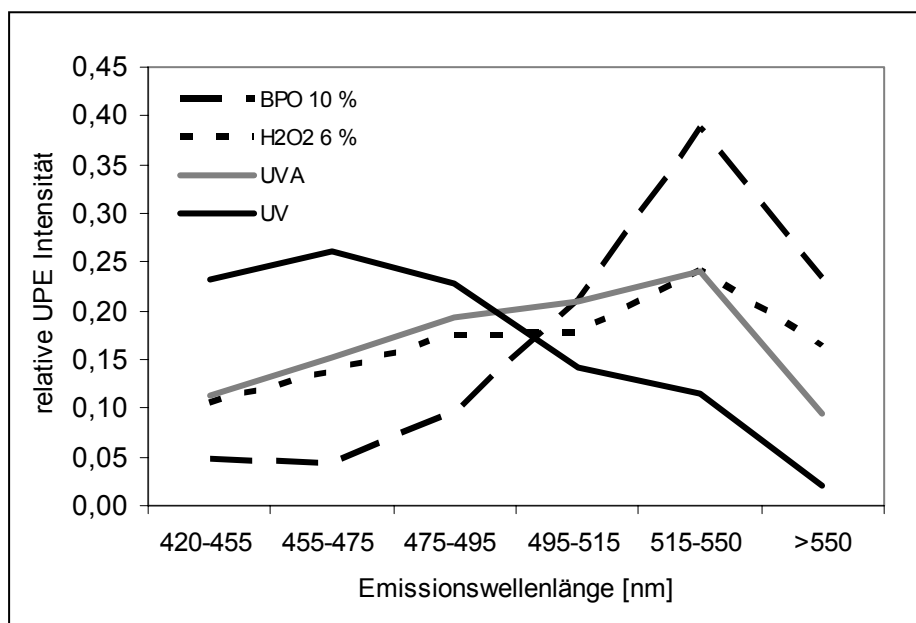
Tab. 5.4: Eingesetzte Stressoren zur spektralen Analyse der induzierte UPE

| <b>Stressor</b>                           | <b>Beschreibung</b>                                    |                             |
|---|--|-----------------------------|
| UV-Strahlung                              | Oriel-Lampe,   | 67 mJ / cm <sup>2</sup> UVA |
|   |  | 18 mJ / cm <sup>2</sup> UVB |
| UVA-Strahlung                             | Oriel-Lampe + WG 335                                   | 59 mJ / cm <sup>2</sup> UVA |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung 6 % | hergestellt aus 30 %igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |                             |
| BPO-Gel 10 %                              | Cordes BPO 10 %  |                             |

Die Versuche wurden mit dem SRUPE-System im mobilen Modus durchgeführt. Bei den Messungen ohne Bestrahlung wurden der SRUPE-Messkopf und die Detektions-LWL entfernt, so dass die Hautstücke direkt unter dem PM platziert werden konnten.

Bei den Untersuchungen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. BPO wurde die induzierte UPE eine Minute nach Applikation der Stressoren über fünf Minuten aufgenommen. Die Messung der UPE<sub>UV</sub> bzw. UPE<sub>UVA</sub> erfolgte für eine Minute direkt im Anschluss einer 10 sekundigen Bestrahlungsphase der Schweinehaut.

Die Intensität der einzelnen Spektralbereiche wurde auf das Gesamtsignal (> 420 nm) normiert und in einer graphischen Darstellung zusammengefasst.



**Abb. 5.8: Stressorabhängige spektrale Verteilung der induzierten UPE auf Schweinehaut.**  $H_2O_2$  6 % bzw. BPO 10% wurden auf Schweinehaut mittels Fingerlinge aufgetragen ( $2,5 \mu l / cm^2$ ) und die induzierte UPE nach einer Minute Einwirkzeit über 5 Minuten aufsummiert.  $UPE_{UV}$  und  $UPE_{UVA}$  wurden direkt nach der Bestrahlung eine Minute lang aufgenommen. UV-Strahlung: Oriol-Lampe UVA  $67 mJ / cm^2$ , UVB  $18 mJ / cm^2$ . UVA-Strahlung Oriol-Lampe + WG335, UVA  $59 mJ / cm^2$ . Dargestellt sind Mittelwerte der relativen UPE Intensität einzelner Spektralbereiche aus 7–10 Messungen pro Stressor. Die Intensität einzelner Spektralbereiche wurde auf die Gesamtintensität (>420 nm) der entsprechenden Messung normiert.

Die spektrale Verteilung der stressinduzierten UPE auf Schweinehaut zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom eingesetzten Stressor. Die Emissionsprofile der  $UPE_{UVA}$ ,  $UPE_{H_2O_2}$  und  $UPE_{BPO}$  weisen ein Maximum zwischen 515 – 550 nm auf. Im Vergleich zur  $UPE_{UVA}$  und  $UPE_{H_2O_2}$  zeigt das Spektrum der  $UPE_{BPO}$  geringere Anteile im kürzerwelligeren Bereich (<475 nm), während das Maximum im langwelligeren Bereich stärker ausgeprägt ist. Im Gegensatz dazu hat die  $UPE_{UV}$  den größten Anteil im kürzerwelligeren Bereich.

## 5.2 Untersuchung oxidativer Prozesse *in vitro*

Anhand von *in vitro* Untersuchungen sollte die induzierte UPE näher untersucht werden. Von besonderem Interesse war dabei der Zusammenhang zwischen der Emission von Photonen und oxidativer Modifikation von Biomolekülen.

In einigen Veröffentlichungen konnte bereits gezeigt werden, dass die Oxidation von Proteinen und Aminosäuren mit einer erhöhten Photonenemission verbunden ist. Als Substrat wurden dabei unter anderem BSA, Hämoglobin, Histone und Insulin eingesetzt. Die Oxidation der Proteine erfolgte entweder durch Oxidationsmittel wie z.B.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Natriumhypochlorid ( $\text{NaOCl}$ ) und Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) oder nach Zugabe von Radikalinitiatoren wie tert-Butyl-Hydroperoxid (t-BOOH) und 2,2'-Azo-bis-(2-amidinopropan) (AAPH) [BARNARD et al 1993; LISSI et al 1994; WATTS et al 1995; ASPEE & LISSI 2000, 2001]. Einige Autoren gehen davon aus, dass in Mischsystemen, bestehend aus Proteinen und Lipiden, die Oxidation von Proteinen für den Hauptanteil der emittierten Photonen verantwortlich ist [BARNARD et al 1993].

Unabhängig von diesen Befunden werden Proteine aufgrund ihrer Zugänglichkeit für oxidative Modifikationen durch ROS und der Stabilität der entstandenen Oxidationsprodukte sehr häufig als Marker für oxidativen Stress in biologischen Systemen herangezogen [SHACTER 2000]. So konnten Thiele und Sander *et al* auch in der Haut erhöhte Werte oxidierter Proteinen nach Exposition mit Stressoren wie z.B. UV-Strahlung, BPO und HOCl beobachten [THIELE et al 1999; SANDER et al 2002]. Möglicherweise spielt diese Oxidation der Hautproteine eine Rolle bei der Generierung der stressinduzierten UPE der Haut.

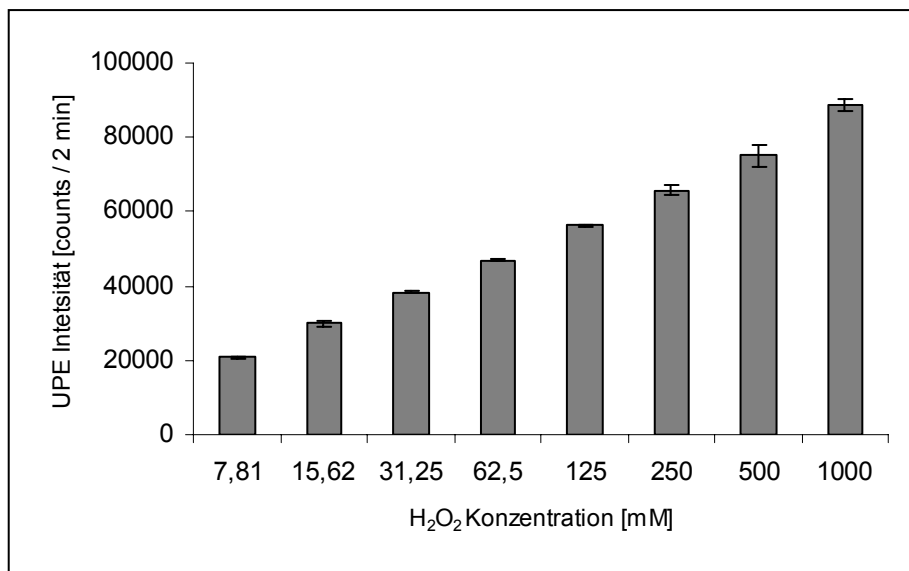
Im Anbetracht dieser Befunde wurden Proteine als Substrat für die Untersuchungen oxidativer Prozesse *in vitro* gewählt, um relevante Ergebnisse für die Interpretation der *in vivo* Daten zu erhalten.

Als Modellprotein wurde zunächst BSA als Substrat eingesetzt und der Oxidationsprozess mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  eingeleitet.

### 5.2.1 Induzierte UPE nach Reaktion von BSA mit $\text{H}_2\text{O}_2$

Die ersten Versuche sollten zunächst klären, ob die Reaktion von BSA mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  unter Emission von Photonen abläuft. Dazu wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  in unterschiedlichen Konzentrationen mit einer BSA-Lösung vermischt und die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  mit dem UPE I-System aufgenommen.

Die Messlösung wurde durch manuelle Mischung der Reagenzlösungen (BSA und  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) hergestellt (vgl. Kap. 4.3.1). Parallel dazu wurden Kontrollmessungen mit BSA und  $\text{H}_2\text{O}_2$  alleine durchgeführt.



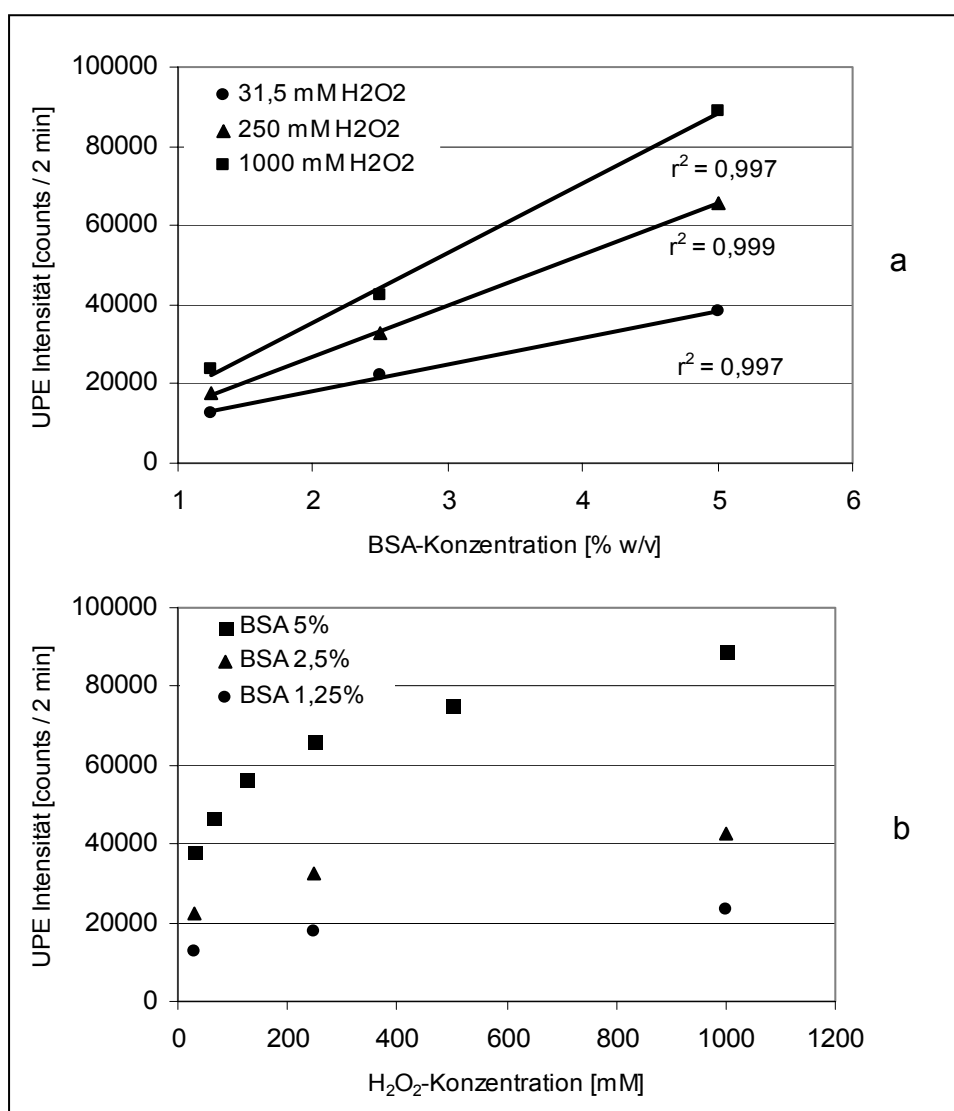
**Abb. 5.9:  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  nach Reaktion mit BSA.** Es wurden wässrige Reagenzlösungen eingesetzt. BSA-Lösung (5 % w/v),  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösungen 7,8 – 1000 mM. Die UPE wurde 40 s nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu BSA über zwei Minuten aufgenommen. Kontrollmessung: BSA in Küvette  $2235 \pm 27$  counts;  $\text{H}_2\text{O}_2$  1000 mM in Küvette  $3243 \pm 34$  counts. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  aus drei Messungen.

Die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu BSA führt konzentrationsabhängig zur Emission von Photonen, deren Intensität deutlich über der der Kontrollmessungen liegt und somit zuverlässig mit einer geringen relativen Standardabweichung von unter 4 % detektiert werden kann (Abb. 5.9).

Im Anschluss wurden weitere Versuche durchgeführt, um die Abhängigkeit der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  von der BSA- bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration näher zu untersuchen.

Es stellte sich heraus, dass die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  Intensität bei unterschiedlichen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen (31,5, 250 und 1000 mM) linear von der BSA-Konzentration (1,25 - 5 % BSA) abhängig ist. Die Steigung dieser linearen Konzentrationsabhängigkeit fällt mit zunehmender  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration steiler aus (Abb. 5.10 a).

Im Gegensatz dazu führt die Steigerung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration nicht zu einer linearen Zunahme der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität. Im Zuge der Erhöhung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration ist zunächst ein steiler Anstieg der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  zu beobachten, der sich im weiteren Verlauf deutlich abflacht. Dieser Anstieg der ersten Phase ist von der BSA-Konzentration abhängig und fällt bei geringeren Konzentrationen flacher aus (Abb. 5.10 b).



**Abb. 5.10:**  $UPE_{H_2O_2}$  in Abhängigkeit von der BSA- (a) bzw.  $H_2O_2$ -Konzentration (b). Die wässrigen Reagenzlösungen wurden manuell gemischt und die  $UPE_{H_2O_2}$  40 s nach der  $H_2O_2$ -Zugabe mit dem UPE I-System über zwei Minuten aufgenommen. Wie beim ersten Versuch wurden auch hier Kontrollmessungen durchgeführt und die UPE-Kontrollwerte von den  $UPE_{H_2O_2}$ -Werten abgezogen.

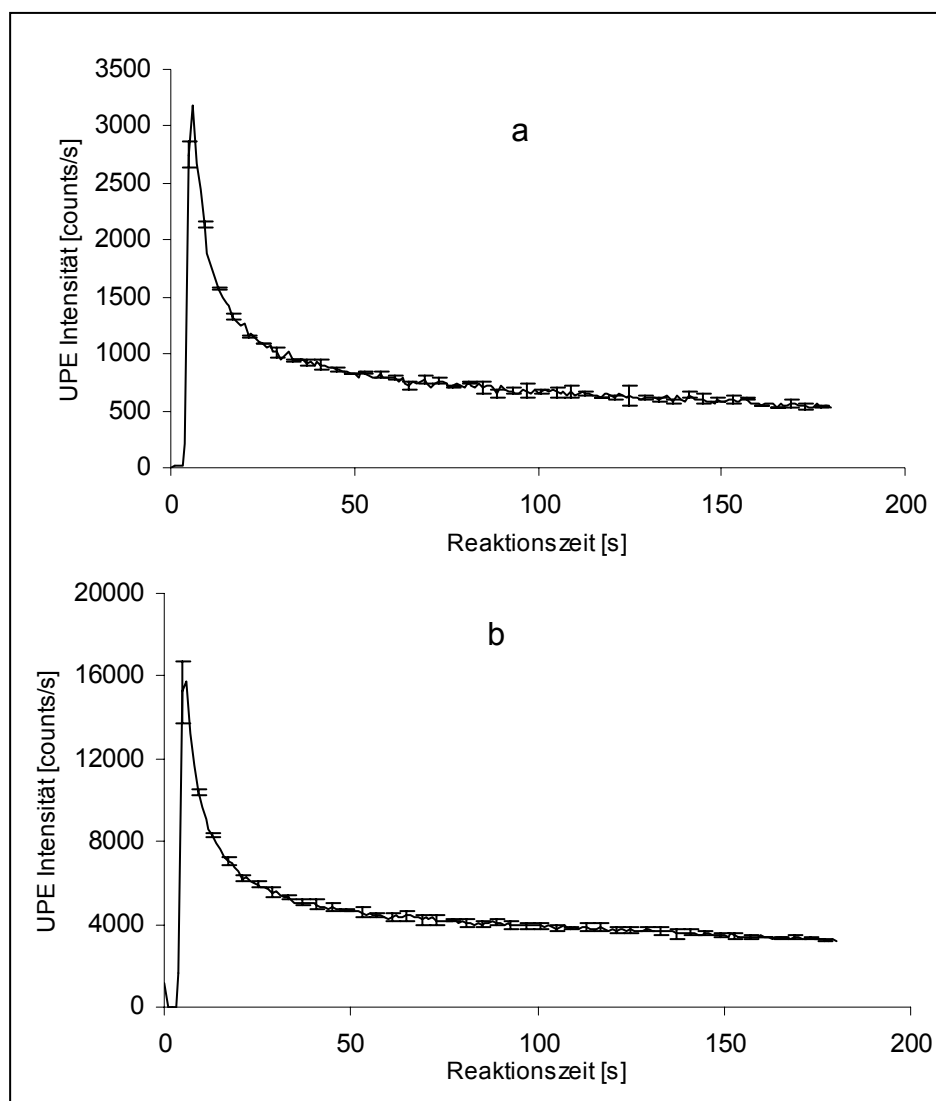
### 5.2.1.1 Kinetische Untersuchung der $UPE_{H_2O_2}$

Nachdem die ersten Versuche gezeigt hatten, dass die Reaktion von BSA mit  $H_2O_2$  unter Emission von Photonen abläuft, wurde die Kinetik der Photonenemission im Verlauf der Reaktion genauer untersucht. Dafür war es notwendig, das UPE Signal so schnell wie möglich nach Reaktionsbeginn aufzunehmen, was mit der in Kapitel 4.3.1 vorgestellten Versuchsanordnung auch gelang.

Zusätzlich wurde der Effekt von  $Fe^{2+}$ -Ionen auf die  $UPE_{H_2O_2}$  bezüglich der Gesamtintensität und des kinetischen Verlaufes untersucht. Durch Zugabe von

$\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zu einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung entstehen in einer so genannten Fenton-Reaktion Hydroxylradikale, die in ihrer Oxidationskraft und Reaktivität gegenüber organischen Verbindungen weitaus stärker sind als  $\text{H}_2\text{O}_2$  (vgl. Kap. 3.2.1). Daher wurde mit einer deutlichen Steigerung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  nach Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen gerechnet.

$\text{H}_2\text{O}_2$  und BSA wurden getrennt von einander in die Küvette eingespritzt. Bei den Versuchen mit  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen wurde eine entsprechende Menge einer Eisen-II-Sulfat-Lösung der BSA-Reagenzlösung kurz vor der Messung zugemischt.



**Abb. 5.11: Kinetik der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  nach Reaktion mit BSA (a) und BSA +  $\text{Fe}^{2+}$  (b).** Die wässrigen Reagenzlösungen wurden mit dem Injektorsystem injiziert. BSA und  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurden getrennt über zwei Spritzen appliziert.  $\text{Fe}^{2+}$  wurde kurz vor der UPE-Messung der BSA-Lösung zugemischt. Es ergaben sich folgende Endkonzentrationen in der Messlösung: BSA 5 (% w/v),  $\text{H}_2\text{O}_2$  1000 mM,  $\text{Fe}^{2+}$  1mM. Die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  wurde 5 s nach Reaktionsbeginn mit dem UPE I-System aufgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  aus drei Messungen.

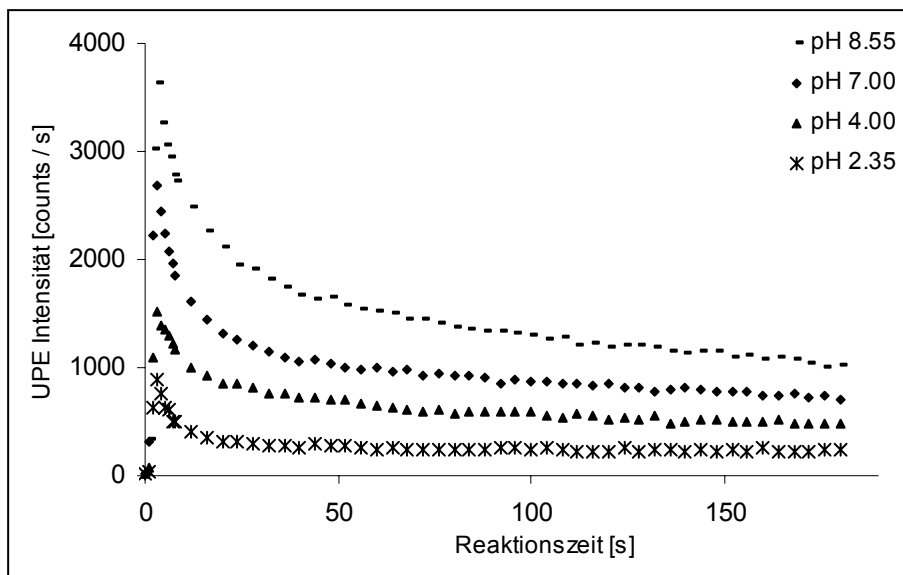
Die Kinetik der Photonenemission nach Reaktion von BSA mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  lässt sich in zwei Phasen einteilen. Die Intensität der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  fällt in der ersten Phase zunächst steil ab und geht ca. 40 s nach Reaktionsbeginn in eine zweite Phase über, die durch einen sehr langsamen und fast linearen Rückgang der Intensität gekennzeichnet ist (Abb. 5.11 a).

Wie erwartet führt die Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zu einer deutlichen Steigerung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität über den gesamten Reaktionszeitraum, ohne den kinetischen Verlauf der Reaktion groß zu verändern (Abb. 5.11 b).

Zudem zeigt die geringe Streuung der Messdaten, dass auch die Messkonfiguration für eine schnelle UPE-Detektion (Injektorsystem und Küvettenkonstruktion) reproduzierbare Ergebnisse liefert (Abb. 5.11 a u. b).

### 5.2.1.2 Einfluss des pH-Wertes der Reaktionslösung auf die $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$

In einigen Untersuchungen, die sich mit der Emission von Photonen nach Oxidation von Proteinen und Aminosäuren befassten, konnte eine deutliche pH-Abhängigkeit des induzierten UPE-Signals festgestellt werden [WATTS et al 1995; ASPEE & LISSI 2002]. Daher wurde in einem nachfolgenden Versuch der Einfluss des pH-Wertes auf die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  nach Reaktion mit BSA überprüft.



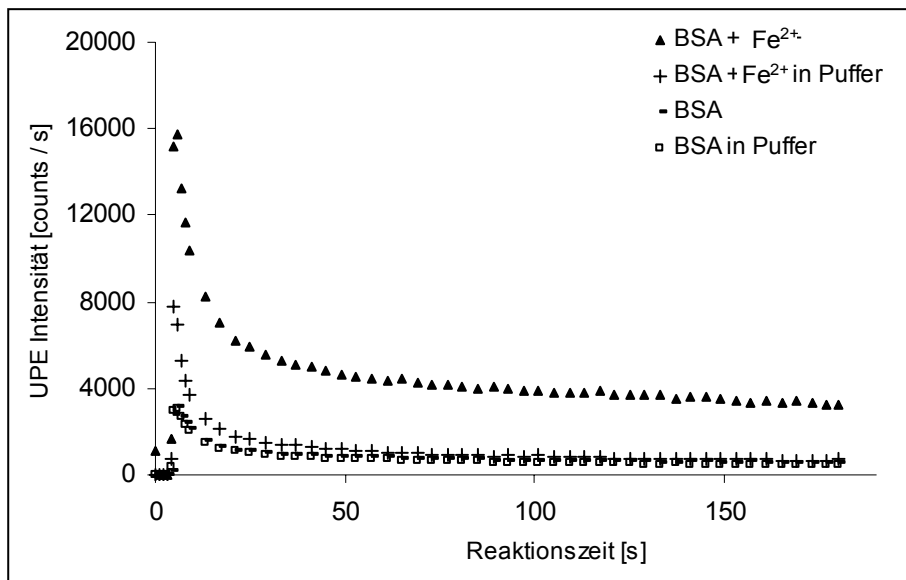
**Abb. 5.12: Einfluss des pH-Wertes auf die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  nach Reaktion mit BSA.** Die wässrigen Reagenzlösungen wurden mit dem Injektorsystem injiziert. BSA und  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurden getrennt über zwei Spritzen appliziert. Die angegebenen pH-Werte wurden durch Zugabe von HCl bzw. NaOH zu der BSA-Lösung erzielt und blieben auch nach der Reaktion nahezu unverändert. Die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  wurde 5 s nach Reaktionsbeginn mit dem UPE I-System aufgenommen. Jede Kurve repräsentiert den Mittelwert aus drei Messungen pro eingestelltem pH-Wert.

Die Intensität der  $UPE_{H_2O_2}$  nach Reaktion mit BSA zeigt eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert der Reaktionslösung. Die Abnahme des pH-Wertes bewirkt dabei eine deutliche Reduktion der  $UPE_{H_2O_2}$ -Intensität über den gesamten Reaktionsverlauf (Abb. 5.12).

### 5.2.1.3 Einfluss von Phosphatpuffer auf die $UPE_{H_2O_2}$

Nachdem eine deutliche Abhängigkeit der  $UPE_{H_2O_2}$  vom pH-Wert der Reaktionslösung festgestellt werden konnte, wurde der Einsatz eines Phosphatpuffers in Betracht gezogen, um den pH-Wert der Reaktionslösung stabil zu halten.

Es stellte sich aber heraus, dass Phosphatpuffer die Intensität der  $UPE_{H_2O_2}$  bei Reaktionsansätzen mit  $Fe^{2+}$ -Ionen deutlich mindert. Die nachfolgende Abbildung verdeutlicht diesen Sachverhalt.



**Abb. 5.13: Vergleich der  $UPE_{H_2O_2}$  nach Reaktion mit BSA in Phosphatpuffer vs. ungepufferter Reaktionslösung.** BSA 5% (w/v) wurde entweder in Phosphatpuffer (50 mM) oder destilliertem Wasser gelöst. In beiden Fällen wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Die Zugabe von  $Fe^{2+}$ -Ionen (1mM) zu der jeweiligen BSA-Lösung erfolgte kurz vor der Messung. Die Lösungen ( $H_2O_2$  1000 mM und BSA bzw. BSA +  $Fe^{2+}$ ) wurden mit dem Injektorsystem appliziert und die  $UPE_{H_2O_2}$  5 s nach Reaktionsbeginn mit dem UPE I-System aufgenommen. Jede Kurve stellt den Mittelwert aus drei Messungen dar.

Während bei den Reaktionsansätzen ohne  $Fe^{2+}$ -Ionen der Zusatz von Phosphatpuffer keinen Einfluss auf die  $UPE_{H_2O_2}$ -Intensität hat, wird diese bei den Ansätzen mit  $Fe^{2+}$ -Ionen durch Phosphatpuffer stark reduziert. Die massive Steigerung der  $UPE_{H_2O_2}$ -Intensität, die normalerweise durch Zusatz von  $Fe^{2+}$ -Ionen zu der BSA-Lösung erzielt wird, fällt beim Einsatz von Phosphatpuffer nahezu vollständig weg (Abb. 5.13).



Dieser deutliche Effekt beruht ausschließlich auf das Vorhandensein von Phosphatpuffer und nicht auf einer etwaigen Veränderung des pH-Wertes der ungepufferten Reaktionslösungen. Denn dieser blieb auch nach der Reaktion nahezu unverändert bei pH 7,2 (vor der Reaktion eingestellt auf 7,4).

Daher wurde beschlossen für die nächsten Versuche den pH-Wert der BSA-Lösung auf 7,4 einzustellen, ohne ein entsprechendes Puffersystem zu benutzen.

#### 5.2.1.4 Umsatz von $H_2O_2$ in der Reaktion mit BSA und BSA + $Fe^{2+}$ -Ionen

Nach der Untersuchung der Reaktionskinetik stellte sich die Frage in wie weit der Verbrauch von  $H_2O_2$  für den Verlauf der  $UPE_{H_2O_2}$  verantwortlich ist und ob die deutliche Zunahme der  $UPE_{H_2O_2}$  nach Zugabe von  $Fe^{2+}$ -Ionen mit einem gesteigerten Umsatz von  $H_2O_2$  verbunden ist.

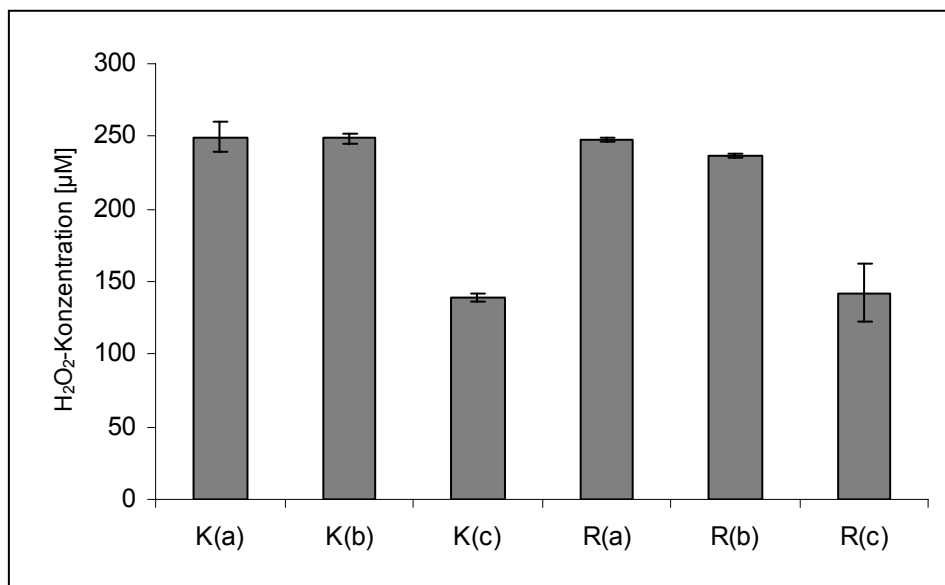
Um diesen Fragen nachzugehen, wurden die in Tabelle 5.5 angegebenen Reaktionsansätze, die durch unterschiedliche Kombinationen von BSA-,  $H_2O_2$ - und  $Fe^{2+}$ -Reagenzlösungen hergestellt wurden verwendet. Parallel dazu wurden Kontrollansätze vorbereitet und unter gleichen Bedingungen wie die Reaktionsansätze vermessen.

Tab. 5.5: Reaktions- und Kontrollansätze zur Bestimmung des  $H_2O_2$ -Verbrauches während der Reaktion von BSA und  $H_2O_2$  bzw. BSA +  $Fe^{2+}$  und  $H_2O_2$ . Die Reaktionsansätze wurden durch Mischung der jeweiligen Reagenzlösungen hergestellt.

| <b>Reaktionsansatz R(a)-R(c)</b>            | <b>Reagenzlösungen</b>                             |
|---|--|
| BSA 5 %(w/v), $H_2O_2$ 2 mM,                | BSA 10 %(w/v), $H_2O_2$ 4 mM,                      |
| BSA 5 %(w/v), $H_2O_2$ 1 mM                 | BSA 10 %(w/v), $H_2O_2$ 2 mM,                      |
| BSA 5 %(w/v), $H_2O_2$ 2 mM, $Fe^{2+}$ 1 mM | BSA 10 %(w/v), $H_2O_2$ 4 mM, Fe-II- $SO_4$ 200 mM |
| <b>Kontrollansätze K(a)-K(c)</b>            |  |
| $H_2O_2$ 2 mM                               | $H_2O_2$ 4 mM, dest. $H_2O$                        |
| $H_2O_2$ 1 mM                               | $H_2O_2$ 2 mM, dest. $H_2O$                        |
| $H_2O_2$ 2 mM, $Fe^{2+}$ 1 mM               | $H_2O_2$ 4 mM, dest. $H_2O$ , Fe-II- $SO_4$ 200 mM |

Die Erfassung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration erfolgte durch die in Kapitel 4.3.3 beschriebene Methode. Dazu wurden die Reaktions- bzw. Kontrollansätze 10 min nach Reaktionsbeginn (Mischung der Reagenzlösungen) je nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration der Ansätze im Verhältnis 1:3 bei 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  und 1:7 bei 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit destilliertem Wasser verdünnt und vermessen.

Abbildung 5.14 zeigt die gemessene  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration der verdünnten Reaktions- bzw. Kontrollansätze.



**Abb. 5.14:  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Verbrauch nach Reaktion von BSA bzw.  $\text{BSA} + \text{Fe}^{2+}$  mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** K(a):  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM. K(b):  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM. K(c):  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM +  $\text{Fe}^{2+}$  1 mM. R(a): BSA 5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM. R(b): BSA 5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM. R(c): BSA 5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM +  $\text{Fe}^{2+}$  1 mM. Die Reaktionsansätze R(a)-R(c) und Kontrollansätze K(a)-K(c) wurden 10 min nach Reaktionsbeginn im Verhältnis 1:3 bei 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  und 1:7 bei 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit destilliertem Wasser verdünnt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration aus drei Messungen der verdünnten Kontroll- bzw. Reaktionsansätze nach 10 min Reaktionszeit.

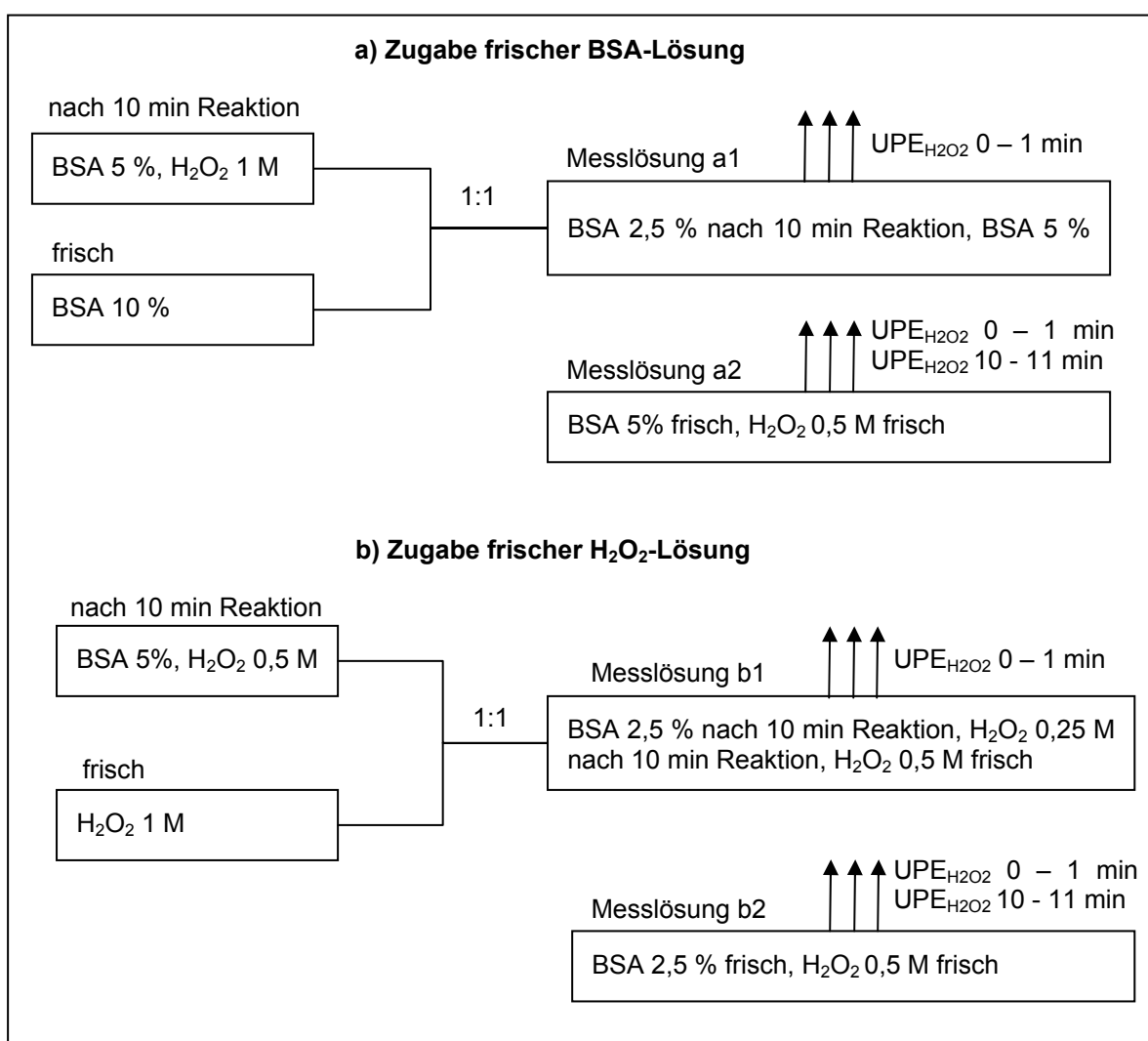
Vergleicht man die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen der Kontrollansätze ohne  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen mit denen der Reaktionsansätze, so ist ein Verbrauch von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nach einer 10 minütigen Reaktionszeit kaum feststellbar. Nur der Vergleich zwischen K(b) und R(b) weist auf einen sehr geringen Verbrauch hin. Nach Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen ist bei K(c) ein deutlicher Rückgang der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration messbar, der aber durch das Vorhandensein von BSA nicht verstärkt wird (R(c)). Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration fällt dabei nach Zusatz von 1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen von ursprünglich 2 mM auf ca. 1,1 mM zurück.

Der kaum messbare Verbrauch von  $\text{H}_2\text{O}_2$  während der Reaktion mit BSA zeigt, dass die deutliche Abnahme der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  besonders in der ersten Phase der Reaktion (vgl. Abb. 5.11) nicht auf einen Rückgang der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration

beruhen kann. Diese Aussage konnte durch den nachfolgenden Versuch bestätigt werden.

Dabei wurde einem Reaktionsgemisch aus BSA und  $\text{H}_2\text{O}_2$  nach 10 Minuten Reaktionszeit entweder frische BSA oder  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung zugesetzt und die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  über eine Minute aufgenommen. Diese  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  Werte wurden mit denen eines frisch angesetzten Reaktionsgemisches vergleichbarer Reagenzkonzentrationen verglichen.

Der genaue Versuchsablauf und die Reagenzkonzentrationen der Messlösungen sind in Abbildung 5.15 dargestellt. Die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Werte der Messlösungen sind in Tabelle 5.6 angegeben.



**Abb. 5.15:** Versuchsablauf zur Klärung der Bedeutung von BSA-(a) bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -(b) Verbrauch für die Abnahme der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität im Verlauf der Reaktion von BSA mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Tab. 5.6:  $UPE_{H_2O_2}$  –Werte der Messlösungen aus Abbildung 5.12. Die  $UPE_{H_2O_2}$  wurde 40 s nach Reaktionsbeginn mit dem UPE I-System aufgenommen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SD der aufsummierten UPE-Intensitäten der ersten bzw. zehnten Minute der Messung

| Messlösung | $UPE_{H_2O_2}$ 0-1 min | $UPE_{H_2O_2}$ 10-11 min |
|------------|------------------------|--------------------------|
| a1         | 26085 $\pm$ 565        |                          |
| a2         | 21610 $\pm$ 1756       | 8713 $\pm$ 92            |
| b1         | 5418 $\pm$ 173         |                          |
| b2         | 10869 $\pm$ 962        | 4342 $\pm$ 289           |

Ein frisch angesetztes Reaktionsgemisch aus 5 % BSA und 0,5 M  $H_2O_2$  zeigt in der ersten Minute der UPE-Messung eine  $UPE_{H_2O_2}$ -Intensität von ca. 21000 counts / min, die im Messverlauf auf ca. 9000 counts / min nach 10 min Reaktionszeit absinkt (Messlösung a2, Abb. 5.15 a u. Tab. 5.6). Die Zugabe einer frischen BSA-Lösung zu diesem Reaktionsgemisch steigert die  $UPE_{H_2O_2}$ -Intensität wieder auf dem ursprünglichen Niveau der ersten Minute (Messlösung a1, Abb. 5.15 u. Tab. 5.6).

Im Gegensatz dazu bleibt die  $UPE_{H_2O_2}$ -Intensität nach Zugabe einer frischen  $H_2O_2$ -Lösung zu einem Reaktionsgemisch aus 2,5 % BSA und 0,5 M  $H_2O_2$  auf dem nach 10 Minuten Reaktionszeit erreichten Niveau von ca. 5000 counts / min stehen und steigt nicht auf das Anfangsniveau von ca. 11000 counts / min wieder an (Messlösung b1 u. b2, Abb. 5.15 u. Tab. 5.6).

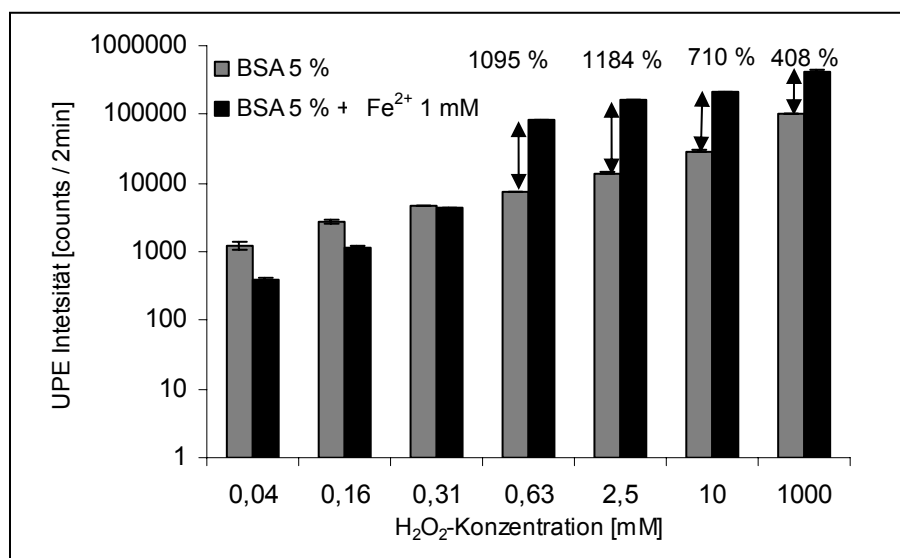
### 5.2.1.5 Einfluss von $Fe^{2+}$ -Ionen auf die $UPE_{H_2O_2}$

In Kapitel 5.2.1.2 konnte bereits eine deutliche Erhöhung der  $UPE_{H_2O_2}$  durch Zugabe von  $Fe^{2+}$ -Ionen zu der BSA-Lösung festgestellt werden. Dieser Effekt wurde nun durch Variation der  $Fe^{2+}$ - bzw.  $H_2O_2$ -Konzentration näher untersucht.

Zunächst wurde die  $Fe^{2+}$ -Konzentration bei 1 mM konstant gehalten und die  $H_2O_2$ -Konzentration von 0,04 bis 1000 mM variiert. Bis zu einer  $H_2O_2$ -Konzentration von 0,31 mM ist die  $UPE_{H_2O_2}$  bei den Reaktionsansätzen mit 1 mM  $Fe^{2+}$  geringer als die der vergleichbaren Ansätze ohne  $Fe^{2+}$ -Ionen. Erst ab einer  $H_2O_2$ -Konzentration von 0,63 mM führt die Zugabe von  $Fe^{2+}$ -ionen (1mM) zu einem deutlichen Anstieg der  $UPE_{H_2O_2}$  verglichen mit den Ansätzen ohne  $Fe^{2+}$ -Ionen, wobei der prozentuale Anstieg mit zunehmender  $H_2O_2$ -Konzentration abnimmt (Abb. 5.16).

Während die Zugabe von 1 mM  $Fe^{2+}$  bei einer  $H_2O_2$ -Konzentration von 0,31 mM  $UPE_{H_2O_2}$ -Intensitäten liefert, die auf dem gleichen Niveau des Ansatzes ohne  $Fe^{2+}$ -Ionen liegen (ca. 4600 counts / 2 min, vgl. Abb. 5.16), führt die Absenkung der

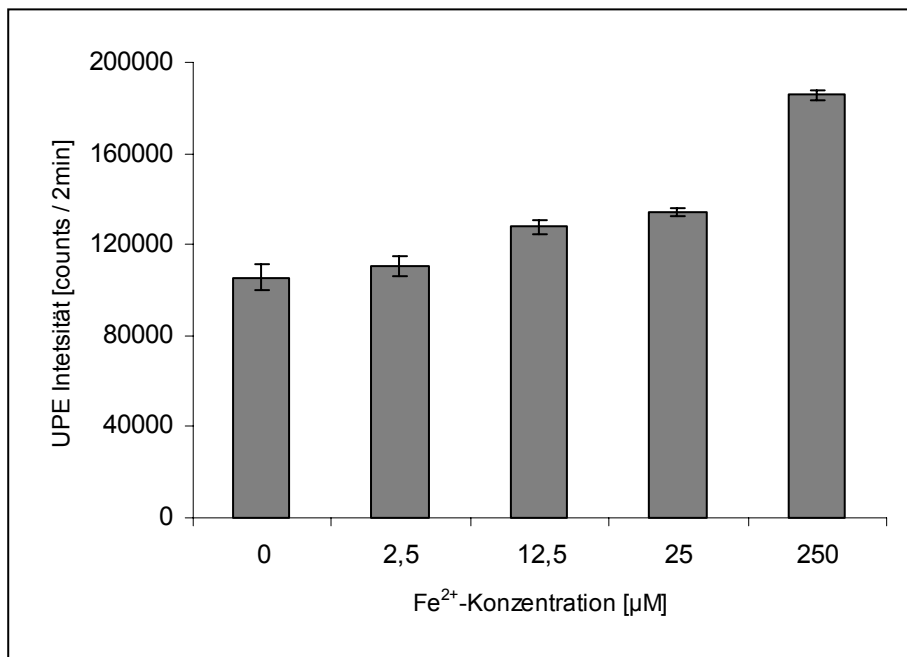
$\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration auf 0,5 mM zu einem Anstieg der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  auf ca. 85000 counts / 2 min (Daten nicht gezeigt). Dies macht deutlich, dass das Konzentrationsverhältnis von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen und  $\text{H}_2\text{O}_2$  für die Intensität der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  in der Reaktion mit BSA eine entscheidende Rolle spielt. Das molare Konzentrationsverhältnis von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen ( $c\{\text{H}_2\text{O}_2\} / c\{\text{Fe}^{2+}\}$ ), bei der eine deutliche Erhöhung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  erreicht wird, liegt zwischen 0,31 und 0,625.



**Abb. 5.16: Einfluss von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration auf die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  nach Reaktion mit BSA und BSA +  $\text{Fe}^{2+}$ .** Die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  wurde 40 s nach Reaktionsbeginn mit dem UPE I-System über 2 Minuten aufgenommen.  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen wurden kurz vor der Reaktion der BSA-Lösung zugesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  aus drei Messungen.

Im nächsten Versuch wurde die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration bei 1000 mM konstant gehalten und die  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration von 2,5 bis 250  $\mu\text{M}$  variiert. Die BSA Konzentration betrug bei allen Ansätzen 5 % (w/v).

Es stellte sich heraus, dass bereits ab einer  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  (0,70 ppm) deutlich höhere  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  Intensitäten erreicht werden, als beim vergleichbaren Reaktionsansatz ohne Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen (Abb. 5.17).



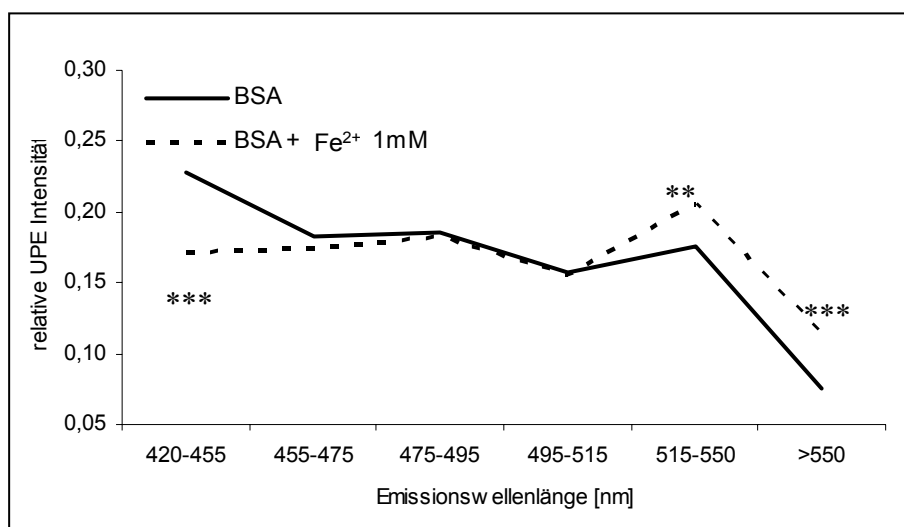
**Abb. 5.17: Einfluss von Fe<sup>2+</sup>-Konzentration auf die UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> nach Reaktion mit BSA.** BSA 5 % (w/v), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM. Die UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> wurde 40 s nach Reaktionsbeginn mit dem UPE I-System über zwei Minuten aufgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD der UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> Intensität aus drei Messungen.

#### 5.2.1.6 Spektrale Verteilung der UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub>

Mit dem SRUPE-System wurde die spektrale Verteilung der UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> nach Reaktion mit BSA untersucht. Dabei sollte die Frage geklärt werden, ob die deutliche Steigerung der UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub>-Intensität nach Zusatz von Fe<sup>2+</sup>-Ionen mit einer Verschiebung der spektralen Verteilung des UPE-Signals einhergeht.

Das relative Spektrum der UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> nach Reaktion mit BSA ändert sich durch Zugabe von Fe<sup>2+</sup>-Ionen. Während beim Spektrum ohne Zusatz von Fe<sup>2+</sup>-Ionen der größte Anteil der UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> im Spektralbereich zwischen 420 – 455 nm emittiert wird, verlagert sich dieser beim Vorhandensein von Fe<sup>2+</sup>-Ionen im Bereich 515 – 550 nm (Abb. 5.18).

Die Unterschiede der beiden relativen Spektren sind in den Spektralbereichen 420 – 455 nm, 515 – 550 nm und > 550 nm signifikant (Abb. 5.18).



**Abb. 5.18: Spektrale Verteilung der  $UPE_{H_2O_2}$  nach Reaktion mit BSA und BSA +  $Fe^{2+}$ .** BSA 5% (w/v),  $H_2O_2$  1000 mM,  $Fe^{2+}$  1 mM.  $Fe^{2+}$ -Ionen wurden kurz vor der Reaktion der BSA-Lösung zugesetzt. Die  $UPE_{H_2O_2}$  wurde 40 s nach Reaktionsbeginn mit dem SRUPE-System im mobilen Modus über 5 Minuten aufgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte der relativen UPE Intensität einzelner Spektralbereiche aus 7 Messungen. Die Intensität einzelner Spektralbereiche wurde auf die Gesamtintensität (>420 nm) der entsprechenden Messung normiert.

### 5.2.1.7 Bestimmung von Carbonylverbindungen (CV) und Vergleich mit der UPE-Messung

Anhand der nachfolgenden Untersuchung sollte der Zusammenhang zwischen oxidativer Modifikation von BSA und Emission von Photonen überprüft werden.

Als Marker für die oxidative Umsetzung von BSA wurde die Erhöhung des Gehaltes an CV herangezogen, die mit der in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Methode erfasst wurden. Parallel dazu wurde unter gleichen Versuchsbedingungen die induzierte UPE aufgenommen und mit dem Gehalt der CV verglichen.

Die untersuchten Reaktionsansätze mit den entsprechenden Endkonzentrationen eingesetzter Reagenzien sind in Tabelle 5.7 angegeben. Als wässrige Reagenzlösungen wurden BSA,  $H_2O_2$ , Fe-II-Sulfat und Desferrioxamin (DFA) eingesetzt. Die Reaktion wurde stets durch Zusatz von  $H_2O_2$  gestartet, nachdem zuvor die restlichen Reagenzien der BSA-Lösung zugeführt worden waren.

Für die Bestimmung der CV wurde die Reaktion nach 10 Minuten durch Zusatz von 2900 U Katalase (5 min bei 37 °C) beendet und die Reaktionslösung sofort bis zur Messung bei -80 °C gelagert. Bei den  $Fe^{2+}$ -haltigen Reaktionsansätzen wurde zusätzlich zu Katalase noch 10 mM DFA zugesetzt, um eine fortlaufende Reaktion, katalysiert durch  $Fe^{2+}$ -Ionen, zu verhindern.

Die UPE-Messung erfolgte 40 s nach Reaktionsbeginn mit dem UPE I-System, wobei die induzierte UPE über zwei Minuten aufsummiert wurde.

*Tab. 5.7: Reaktionsansätze für die Bestimmung von CV und der  $UPE_{H_2O_2}$ . Die Reagenzien wurden in destilliertem Wasser gelöst. Bei der BSA-Lösung wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.*

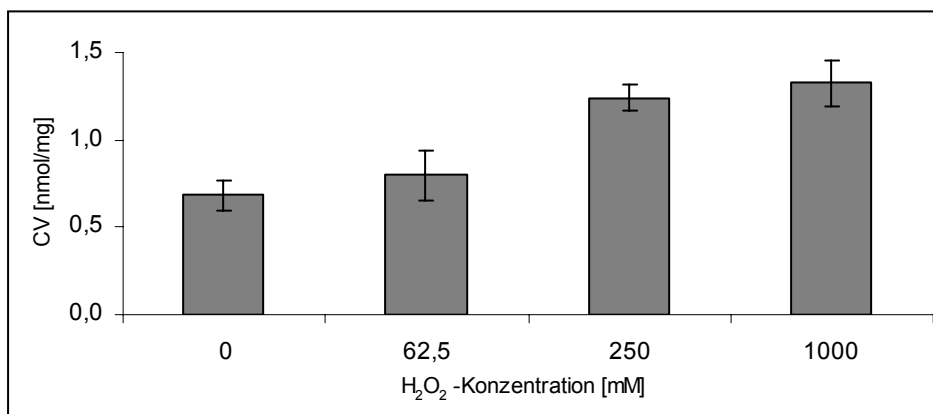
| <b>Reaktionsansatz</b>   | <b>Reagenzlösungen</b>   |
|--|--|
| BSA 5 %(w/v), $H_2O_2$ 62,5 mM                                 | BSA 10 %(w/v), $H_2O_2$ 125 mM                                       |
| BSA 5 %(w/v), $H_2O_2$ 250 mM                                  | BSA 10 %(w/v), $H_2O_2$ 500 mM                                       |
| BSA 5 %(w/v), $H_2O_2$ 1000 mM                                 | BSA 10 %(w/v), $H_2O_2$ 2000 mM                                      |
| BSA 5 %(w/v), $H_2O_2$ 1000 mM,<br>$Fe^{2+}$ 1mM               | BSA 10 %(w/v), $H_2O_2$ 2000 mM, Fe-II- $SO_4$<br>200 mM             |
| BSA 5 %(w/v), $H_2O_2$ 1000 mM,<br>$Fe^{2+}$ 0,5 mM            | BSA 10 %(w/v), $H_2O_2$ 2000 mM, Fe-II- $SO_4$<br>200 mM             |
| BSA 5 %(w/v), $H_2O_2$ 1000 mM,<br>$Fe^{2+}$ 1 mM, DFA 10 mM   | BSA 10 %(w/v), $H_2O_2$ 2000 mM, Fe-II- $SO_4$<br>200 mM, DFA 200 mM |
| BSA 5 %(w/v), $H_2O_2$ 1000 mM,<br>$Fe^{2+}$ 0,5 mM, DFA 10 mM | BSA 10 %(w/v), $H_2O_2$ 2000 mM, Fe-II- $SO_4$<br>200 mM, DFA 200 mM |

Bei den ersten drei Reaktionsansätzen (Tab. 5.7) wurde nur der Gehalt von CV bestimmt. Eine Messung der  $UPE_{H_2O_2}$  wurde bereits unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt (vgl. Abb. 5.9) und somit die vorhandenen als Vergleich herangezogen.

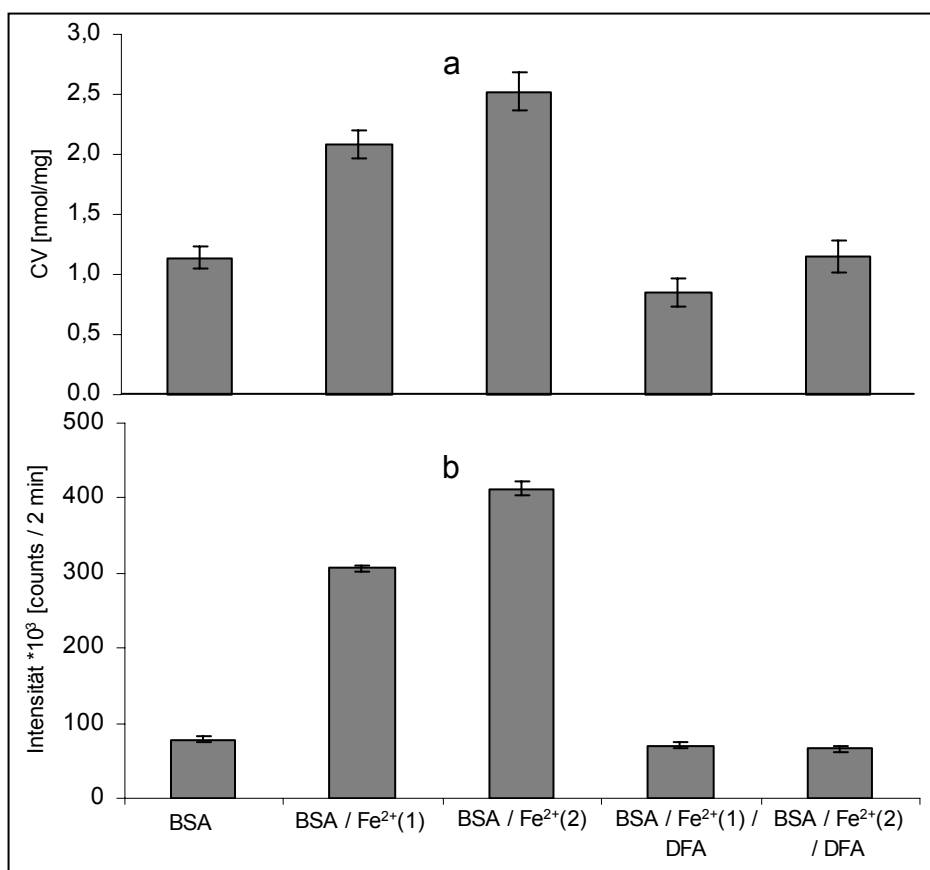
Die restlichen Reaktionsansätze wurden sowohl einer CV-Bestimmung als auch einer  $UPE_{H_2O_2}$ -Messung unterzogen.

Der Gehalt an CV bei BSA nimmt mit steigender  $H_2O_2$ -Konzentration zu, wobei ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle erst ab einer  $H_2O_2$ -Konzentration von 62,5 mM zu verzeichnen ist (Abb. 5.19). Die  $UPE_{H_2O_2}$  zeigte ebenfalls eine Zunahme der Intensität mit steigender  $H_2O_2$ -Konzentration, wobei schon ab einer Konzentration von 7,8 mM  $H_2O_2$  eine deutliche Erhöhung gegenüber den Kontrollmessungen detektiert werden konnte (vgl. Abb. 5.9). Bei anderen Messungen konnte sogar nach Zugabe von 0,04 mM  $H_2O_2$  ein Anstieg der  $UPE_{H_2O_2}$  beobachtet werden (vgl. Abb. 5.16).





**Abb. 5.19: Bestimmung von Carbonylverbindungen (CV) bei BSA in Abhängigkeit von der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration.** BSA 5 % (w/v). Die Reaktion wurde durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (62,5 – 1000 mM) gestartet und durch Zugabe von Katalase (2900 U) nach 10 Minuten Reaktionszeit gestoppt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der CV-Konzentration aus drei Messungen (ELISA).



**Abb. 5.20: Bestimmung von CV (a) und UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> (b) nach Reaktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit BSA bzw. BSA + Fe<sup>2+</sup>.** BSA 5 % (w/v), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM, Fe<sup>2+</sup> (1) 1 mM, Fe<sup>2+</sup> (2) 0,5 mM, DFA 10 mM. (a) ELISA: Die Reaktion wurde durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM gestartet und durch Zusatz von Katalase bzw. Katalase + DFA bei Ansätzen mit Fe<sup>2+</sup>-Ionen nach 10 Minuten beendet. Kontrollmessung: BSA + Katalase 0,66  $\pm$  0,03 nmol/mg; BSA + Fe<sup>2+</sup> + Katalase + DFA 0,66  $\pm$  0,07 nmol/mg. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der CV-Konzentration aus drei Messungen. (b) UPE-Messung: Die UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> wurde 40 s nach Reaktionsbeginn mit dem UPE I-System über 2 Minuten aufgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub>-Intensität aus drei Messungen.

Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Oxidation von BSA wird durch Zusatz von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen konzentrationsabhängig verstärkt, was sich durch eine Erhöhung des Gehaltes an CV eindeutig nachweisen lässt. Die Zugabe des Eisenchelators Desferrioxamin (DFA) senkt die  $\text{Fe}^{2+}$ -katalysierte Oxidation von BSA auf dem Niveau der Reaktionsansätze ohne Zusatz von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen (Abb. 5.20 a).

Die Messung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  deckt sich mit den Daten der ELISA-Messung und bestätigt sowohl die konzentrationsabhängige Verstärkung der Reaktion durch  $\text{Fe}^{2+}$ -Zugabe als auch die Reduktion nach DFA Zusatz (Abb. 5.20 b).

### 5.2.2 Induzierte UPE nach Reaktion von Aminosäuren (AS) mit $\text{H}_2\text{O}_2$

Um die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  nach der Reaktion mit BSA besser einordnen zu können, wurden einige AS als Substrat hinzugezogen und unter ähnlichen Versuchsbedingungen vermessen.

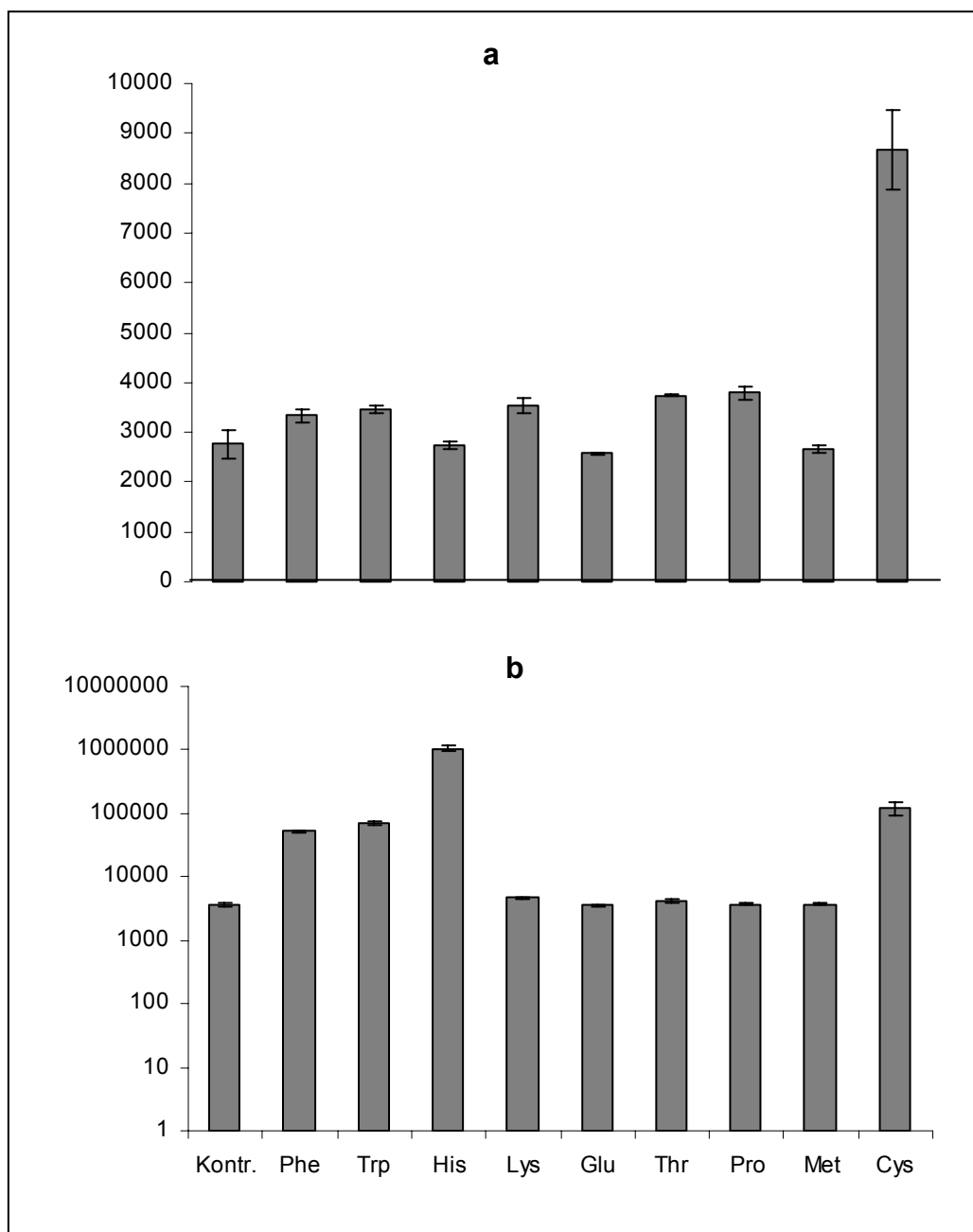
Bei der Auswahl der AS (Tab. 5.8) wurden Literaturdaten bezüglich ihrer Reaktivität gegenüber ROS [NAGY & FLOYD 1984; ALVAREZ & RADÍ 2003] und ihrer Fähigkeit zur Emission von Photonen [ASPEE & LISSI 2000] nach oxidativen Modifikationen berücksichtigt. Zudem wurden besondere funktionelle Gruppen wie beispielsweise Hydroxylgruppe bei Thr und sekundäres Amin bei Pro als Auswahlkriterium herangezogen.

Tyrosin wurde trotz bekannter Reaktivität gegenüber ROS aufgrund der schlechten Löslichkeit in Wasser nicht eingesetzt.

Tab. 5.8: Eingesetzte AS bei der Untersuchung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$

| <b>Name</b>   | <b>Abkürzung</b> |
|---------------|------------------|
| Cystein       | Cys              |
| Glutaminsäure | Glu              |
| Histidin      | His              |
| Lysin         | Lys              |
| Methionin     | Met              |
| Phenylalanin  | Phe              |
| Prolin        | Pro              |
| Threonin      | Thr              |
| Tryptophan    | Trp              |

Die AS wurden mit Ausnahme von Trp in einer Konzentration von 1% (w/v) in Wasser gelöst und bei einem eingestellten pH-Wert von 7,4 vermessen. Trp wurde aufgrund seiner schlechteren Wasserlöslichkeit in einer Konzentration von 0,5 % (w/v) eingesetzt.



**Abb. 5.21:** UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> nach Reaktion mit AS (a) und AS + Fe<sup>2+</sup> (b). Endkonzentrationen der Reagenzien in der Messlösung: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM, AS bis auf Trp 1% (w/v), Trp 0,5 % (w/v). pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. (a) Ohne Zusatz von Fe<sup>2+</sup>-Ionen. Kontrolle (Kontr.): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM ohne AS. (b) Fe<sup>2+</sup>-Ionen 1mM wurde kurz vor der Messung der AS-Lösung zugesetzt. Kontrolle (Kontr.): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM + Fe<sup>2+</sup> 1mM ohne AS. Die UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> wurde 40 s nach Beginn der Reaktion mit dem UPE I-System über zwei Minuten aufgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD der UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub>-Intensität aus drei Messungen.

Bei den Reaktionsansätzen ohne Zusatz von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zeigt nur Cys deutlich höhere  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Werte als die Kontrollmessung ohne AS (Abb. 5.21 a). In Gegenwart von  $\text{F}^{2+}$ -Ionen zeigt His mit Abstand die höchste  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität gefolgt von Cys, Trp und Phe. Bei allen anderen AS ist auch nach Zusatz von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen keine deutliche Erhöhung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität gegenüber der Kontrollmessung sichtbar. Die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität wird bei Cys in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen deutlich gesteigert (Abb. 5.21 b).

### 5.2.2.1 Massenspektrometrische Untersuchung der oxidativen Modifikationen von AS nach Reaktion mit $\text{H}_2\text{O}_2$ und $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$

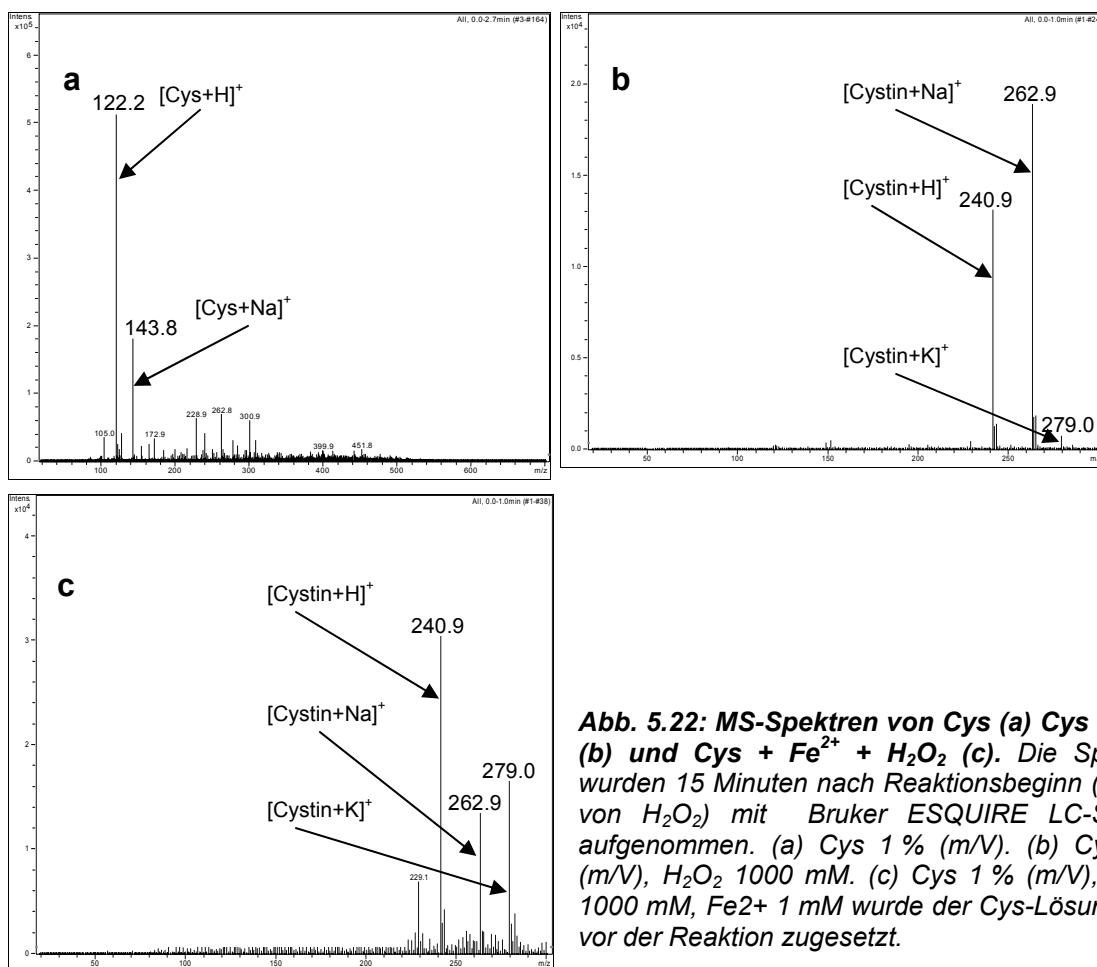
Die UPE-Messung hat bei Trp, His, Phe und Cys eine deutliche erhöhte Emission von Photonen nach Reaktion mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (nur bei Cys) bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$ -Ionen gezeigt. Bei diesen AS wurde nun der Stoffumsatz während der Reaktion mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit und ohne Zusatz von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen mittels Massenspektrometrie (MS) untersucht.

Die Reaktionsansätze für die MS-Untersuchungen wurden unter gleichen Reaktionsbedingungen und Reagenzkonzentrationen wie bei der UPE-Messung hergestellt. Nach einer definierten Reaktionszeit wurden die Reaktionsansätze im Verhältnis 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt und über Direkteinlass in die MS-Anlage überführt.

*Tab. 5.9: Reaktionsansätze und die für ihre Herstellung verwendeten Reagenzlösungen. Die Trp-Konzentration betrug in den entsprechenden Reaktionsansätzen anders als bei den übrigen AS 0,5 % (w/v) und wurde aus einer 1 %igen Reagenzlösung eingestellt. Bei allen AS-Lösungen wurden vor der Reaktion einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.*

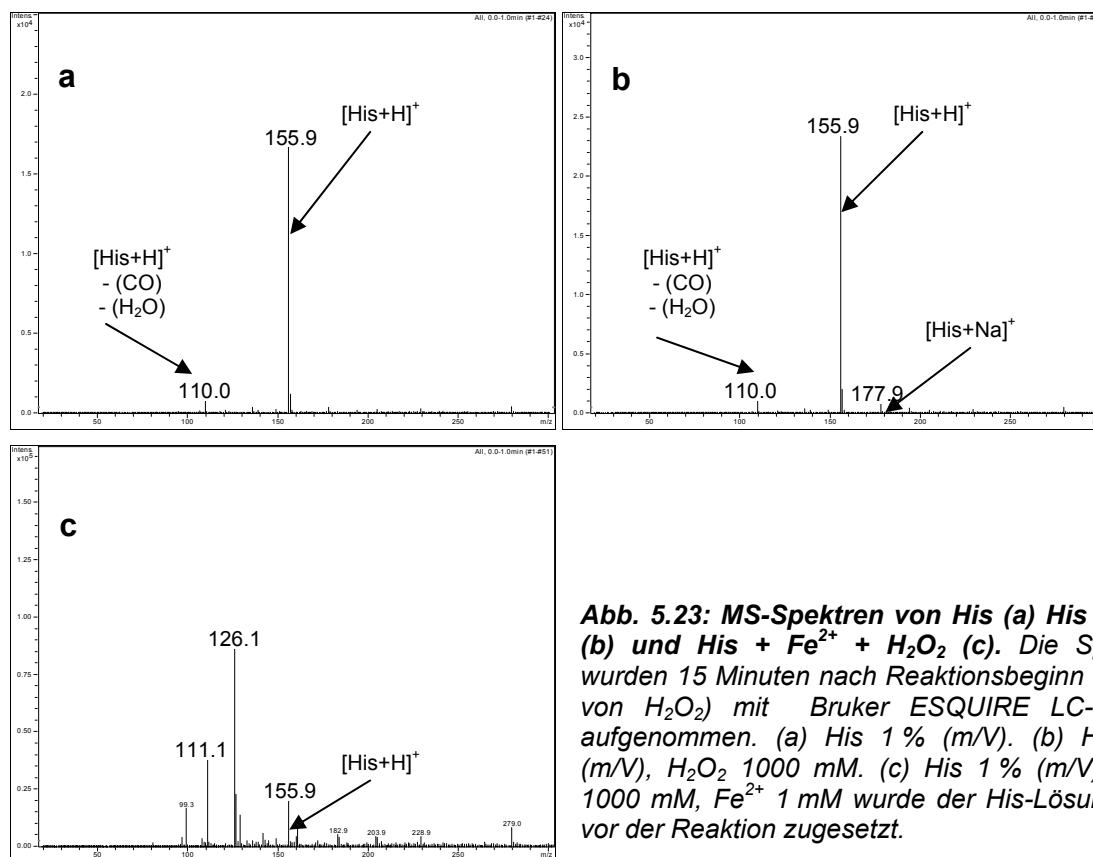
| <b>Reaktionsansatz</b>  | <b>Reagenzlösungen</b>  |
|---|---|
| AS 1 % (w/v),   | AS 2 % (w/v), $\text{H}_2\text{O}$ dest.                            |
| AS 1 % (w/v), $\text{H}_2\text{O}_2$ 1000 mM                        | AS 2 % (w/v), $\text{H}_2\text{O}_2$ 2000 mM                        |
| AS 1 % (w/v), $\text{H}_2\text{O}_2$ 1000 mM, $\text{Fe}^{2+}$ 1 mM | AS 2 % (w/v), $\text{H}_2\text{O}_2$ 2000 mM, $\text{Fe}^{2+}$ 1 mM |

Die nachfolgenden Abbildungen (Abb. 5.22-25) zeigen die MS-Spektren der Reaktionsansätze aus Tab. 5.9 nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten.



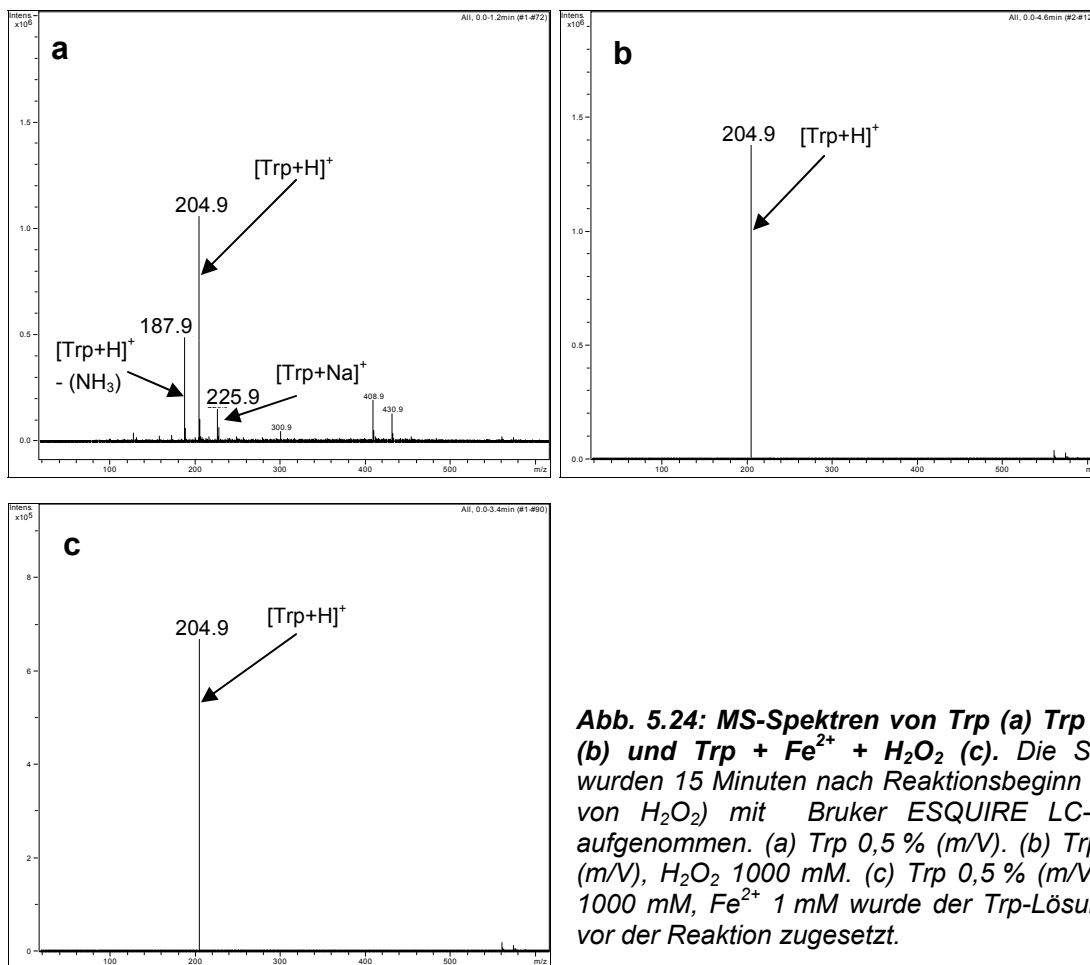
**Abb. 5.22:** MS-Spektren von Cys (a) Cys + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (b) und Cys + Fe<sup>2+</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (c). Die Spektren wurden 15 Minuten nach Reaktionsbeginn (Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mit Bruker ESQUIRE LC-System aufgenommen. (a) Cys 1 % (m/V). (b) Cys 1 % (m/V), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM. (c) Cys 1 % (m/V), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM, Fe<sup>2+</sup> 1 mM wurde der Cys-Lösung kurz vor der Reaktion zugesetzt.

Die Reaktion von Cys mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt unabhängig von Fe<sup>2+</sup>-Ionen zu einem vollständigen Abbau von Cys unter gleichzeitiger Bildung von Cystin. Das Signal des Cys-Protonenadduktes, [Cys+H]<sup>+</sup>, bei 122 m/z (Abb. 5.22 a) ist bei den Spektren der Reaktionsansätze mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup> nicht mehr vorhanden. Stattdessen können Ionenaddukte (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und H<sup>+</sup>) von Cystin in beiden Spektren detektiert werden (Abb. 5.22 b und c).



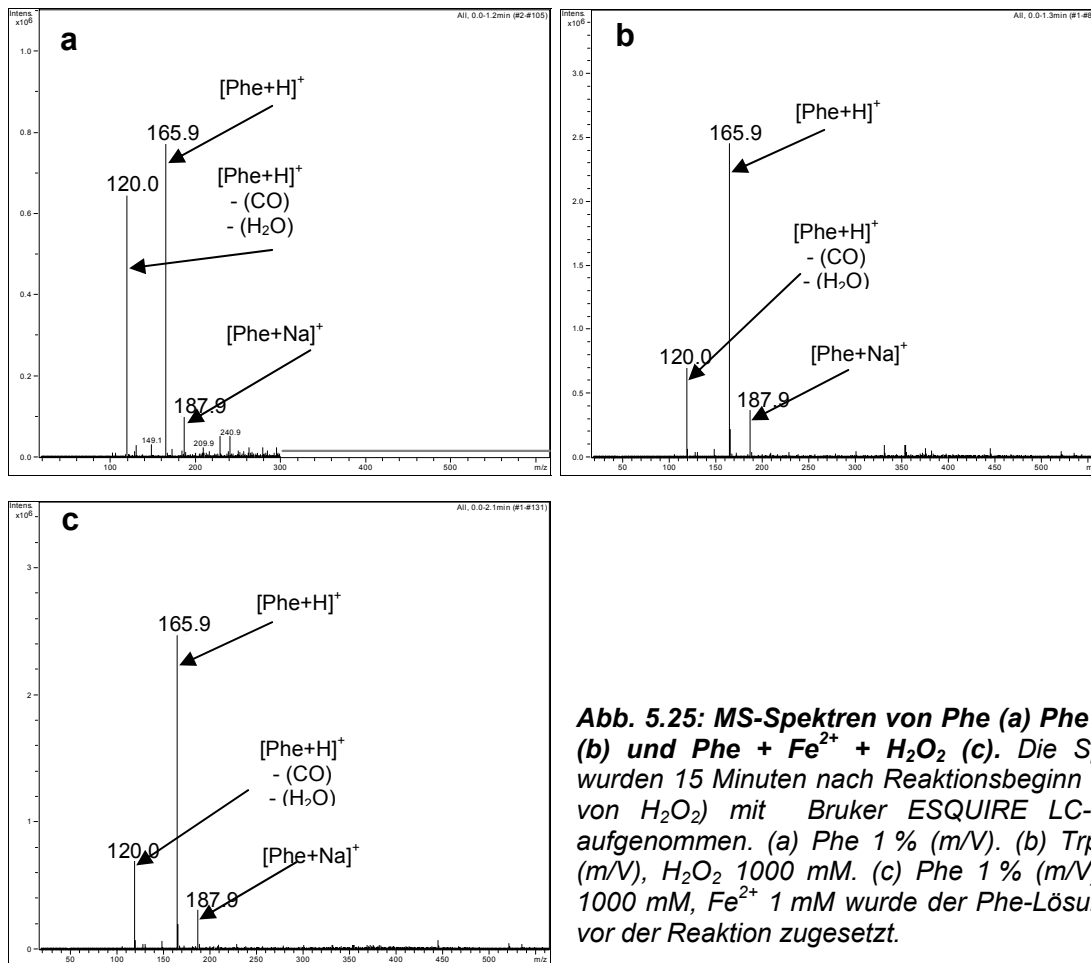
**Abb. 5.23: MS-Spektren von His (a) His + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (b) und His + Fe<sup>2+</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (c). Die Spektren wurden 15 Minuten nach Reaktionsbeginn (Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mit Bruker ESQUIRE LC-System aufgenommen. (a) His 1 % (m/V). (b) His 1 % (m/V), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM. (c) His 1 % (m/V), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM, Fe<sup>2+</sup> 1 mM wurde der His-Lösung kurz vor der Reaktion zugesetzt.**

Das MS-Spektrum von His nach Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigt keine Signale, die auf oxidative Modifikationen von His hinweisen (Abb. 5.23 b). Im Gegensatz dazu entstehen bei der Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Gegenwart von Fe<sup>2+</sup>-Ionen zwei Produkte, die im MS-Spektrum bei 126,1 m/z bzw. 111,1 m/z detektiert werden (Abb. 5.23 c). Dass es sich bei diesen Signalen um His-Fragmente handelt, die während des ESI-Vorganges entstanden sind, ist sehr unwahrscheinlich, da sie bei His- bzw. His + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Spektrum gänzlich fehlen (Abb. 5.23 a u. b).



**Abb. 5.24:** MS-Spektren von Trp (a) Trp +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (b) und Trp +  $\text{Fe}^{2+}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (c). Die Spektren wurden 15 Minuten nach Reaktionsbeginn (Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) mit Bruker ESQUIRE LC-System aufgenommen. (a) Trp 0,5 % (m/V). (b) Trp 0,5 % (m/V),  $\text{H}_2\text{O}_2$  1000 mM. (c) Trp 0,5 % (m/V),  $\text{H}_2\text{O}_2$  1000 mM,  $\text{Fe}^{2+}$  1 mM wurde der Trp-Lösung kurz vor der Reaktion zugesetzt.

Unabhängig von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen lassen sich im MS-Spektrum von Trp nach Reaktion mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  keine zusätzliche Reaktionsprodukte detektieren (Abb. 5.24 b u. c).



**Abb. 5.25: MS-Spektren von Phe (a) Phe + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (b) und Phe + Fe<sup>2+</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (c).** Die Spektren wurden 15 Minuten nach Reaktionsbeginn (Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mit Bruker ESQUIRE LC-System aufgenommen. (a) Phe 1 % (m/V). (b) Trp 0,5 % (m/V), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM. (c) Phe 1 % (m/V), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM, Fe<sup>2+</sup> 1 mM wurde der Phe-Lösung kurz vor der Reaktion zugesetzt.

Ähnlich wie bei Trp fehlen auch bei den MS-Spektren von Phe jegliche Anzeichen eines Stoffumsatzes nach Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup> (Abb. 5.25 b u. c).

Zusammenfassend zeigten die MS-Untersuchungen nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten nur bei folgenden Reaktionsansätzen einen detektierbaren Stoffumsatz:

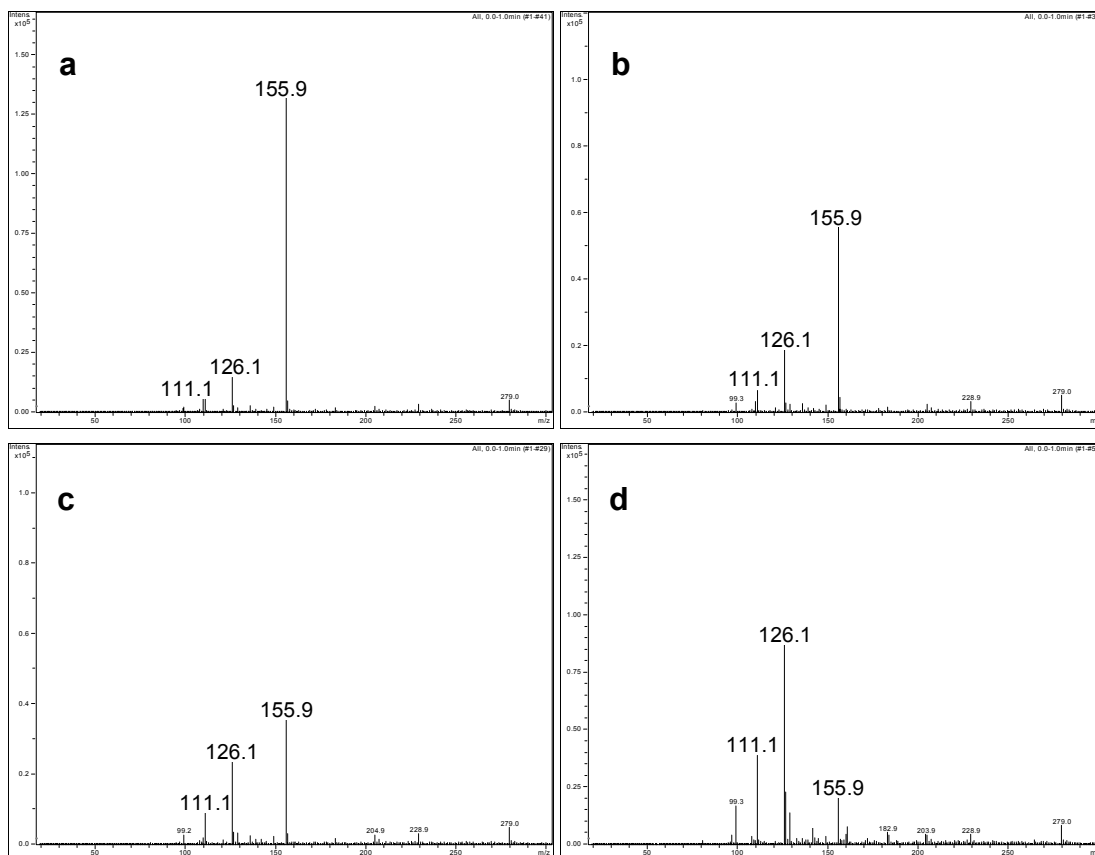
- Cys 1 % + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM
- Cys 1 % + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM + Fe<sup>2+</sup> 1 mM
- His 1 % + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM + Fe<sup>2+</sup> 1 mM

Bei diesen Ansätzen wurde nun der kinetische Verlauf der Reaktion näher untersucht. Dabei wurde nach Reaktionsbeginn in definierten Zeitabständen (20, 40, 60 und 300 s) ein Teil der Reaktionslösung einer MS-Analyse unterzogen.

Die MS-Spektren der beiden Reaktionsansätze mit Cys zeigten bereits nach 20 s Reaktionszeit eine vollständige Umwandlung von Cys in Cystin und entsprachen somit den Spektren nach einer Reaktionszeit von 15 min (vgl. Abb. 5.22 b u. c).



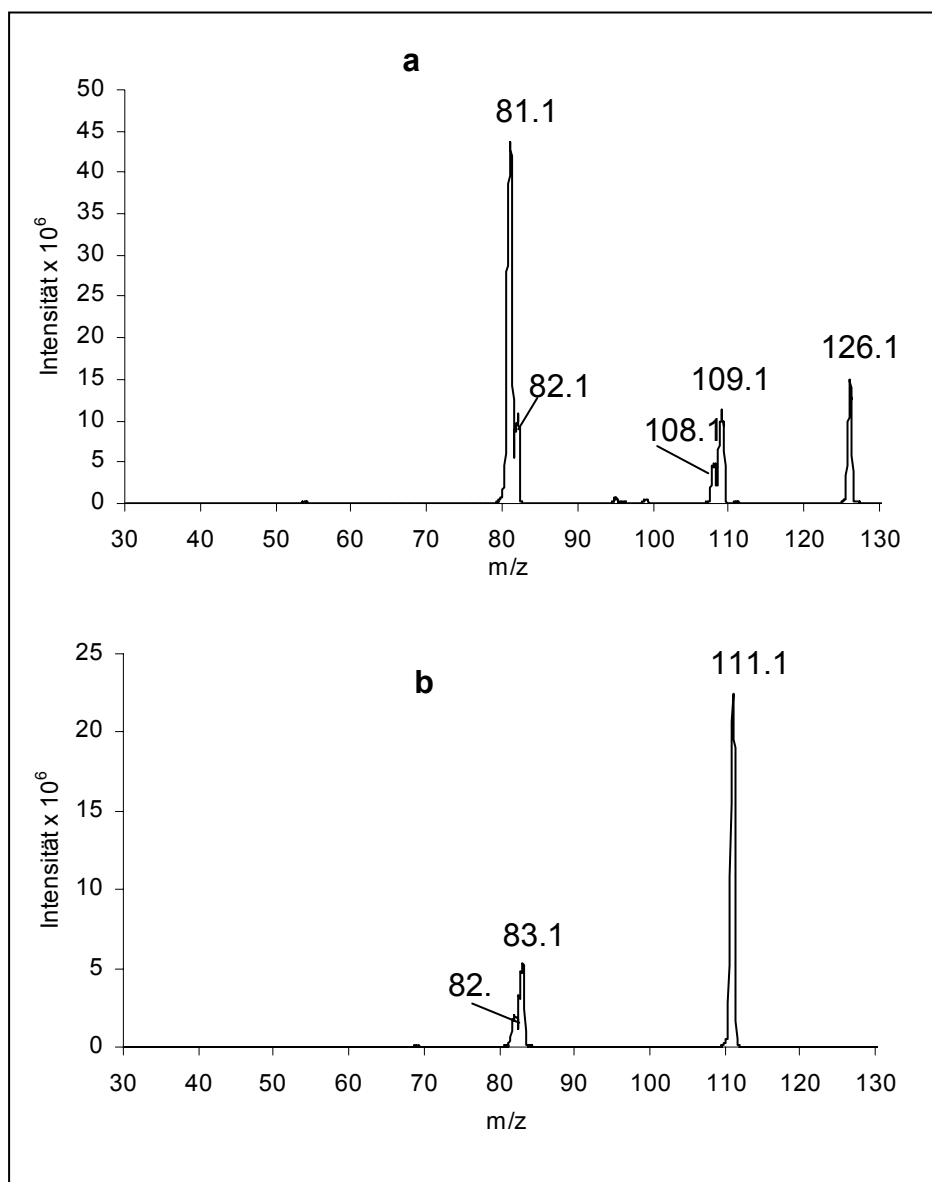
Der Reaktionsverlauf des Ansatzes mit His ist in der nachfolgenden Abbildung wiedergegeben.



**Abb. 5.26: MS-Spektren von His nach Reaktion mit  $H_2O_2 + Fe^{2+}$  in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.** His 1 % (m/V),  $H_2O_2$  1000 mM,  $Fe^{2+}$  1 mM. (a) 20 s nach Reaktionsbeginn. (b) 40 s nach Reaktionsbeginn. (c) 60 s nach Reaktionsbeginn. (d) 5 min nach Reaktionsbeginn.

Die beiden Reaktionsprodukte (126,1 m/z und 111,1 m/z), die zuvor beim gleichen Reaktionsansatz nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten beobachtet wurden (vgl. Abb. 5.23 c), sind schon nach einer Reaktionszeit von 20 s im MS-Spektrum sichtbar (Abb. 5.26 a). Die Signale dieser Reaktionsprodukte nimmt im Reaktionsverlauf deutlich zu, während das Signal des  $[His+H]^+$  (155,9 m/z) parallel dazu abnimmt (Abb. 5.26 a – d). Diese zeitabhängige Veränderung der Signalintensität macht deutlich, dass es sich bei den beiden Signalen um Reaktionsprodukte und nicht um His-Fragmente handelt.

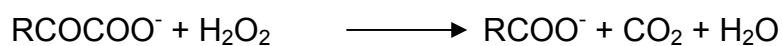
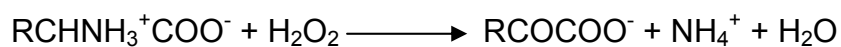
Um die Reaktionsprodukte näher zu untersuchen, wurde ihr Fragmentierungsverhalten analysiert. Abbildung 5.27 zeigt die Fragmentanalyse der beiden Reaktionsprodukte (126,1 m/z und 111,1 m/z) nach einer Stoßfragmentierung.

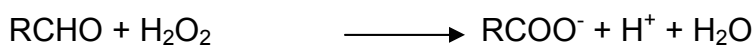
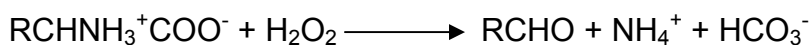
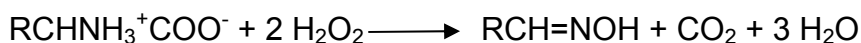


**Abb. 5.27:** MS-Spektren nach einer Stoßfragmentierung der Reaktionsprodukte bei 126.1 m/z (a) und 111.1 m/z (b). Untersucht wurde der Reaktionsansatz mit His 1 %, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM und Fe<sup>2+</sup> 1 mM. Die Spektren wurden nach einer Reaktionszeit von 5 min mit dem Micromass QUATTRO MICRO-System aufgenommen.

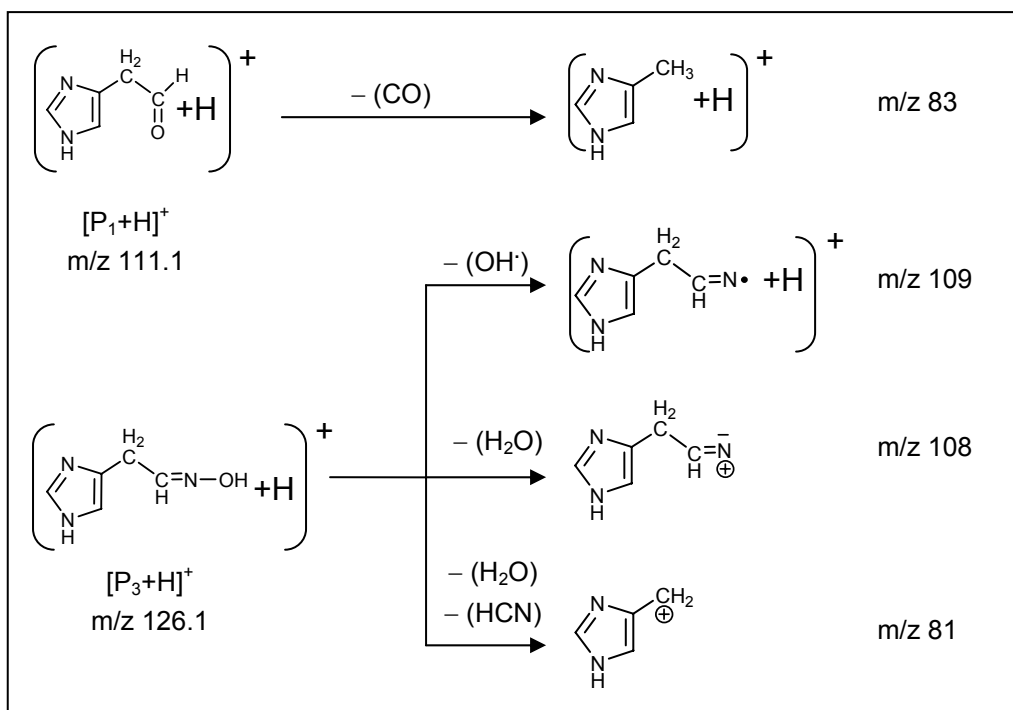
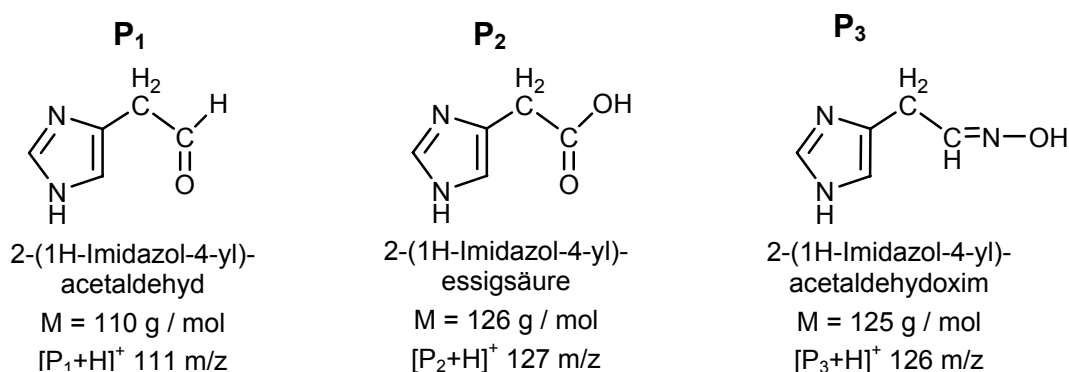
Nach Stadtman und Berlett verläuft die metallkatalysierte Oxidation von AS durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hauptsächlich über die drei folgenden Reaktionen, wobei die ersten beiden bevorzugt ablaufen [STADTMAN & BERLETT 1991].

### Reaktion A



**Reaktion B****Reaktion C**

Übertragen auf His wären folgende Reaktionsprodukte denkbar:



**Abb. 5.28:** Mögliches Fragmentierungsverhalten von [P<sub>1</sub>+H]<sup>+</sup> und [P<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup> unter Berücksichtigung der Fragmentanalyse aus Abbildung 5.27.

Von möglichen Reaktionsprodukten sind  $P_1$  und  $P_3$  sowohl mit den MS-Signalen bei 111.1 bzw. 126.1 m/z (Abb. 5.26) als auch mit den Daten der Fragmentanalyse vereinbar (Abb. 5.27 u. 5.28).  $P_2$  lässt sich in den untersuchten MS-Spektren nicht nachweisen.

Die Daten deuten somit daraufhin, dass die metallkatalysierte Oxidation von His bei den gewählten Versuchsbedingungen (vgl. Tab. 5.19) hauptsächlich über die Reaktionen B und C abläuft. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass  $P_1$  neben Reaktion B auch aus  $P_3$  durch Hydrolyse entstehen könnte, lässt sich sogar ein ausschließlicher Ablauf über Reaktion C postulieren.

Eine weitere Verbindung, die als Protonenaddukt für das Signal bei 126.1 m/z verantwortlich sein könnte ist 2-(1H-Imidazol-4-yl)-acetamid ( $M = 125 \text{ g/mol}$ ). Die Entstehung dieser Verbindung wäre, den Reaktionen A und B zur Folge, nur durch die Umsetzung von 2-(1H-Imidazol-4-yl)-essigsäure mit  $\text{NH}_4^+$  vorstellbar, was allerdings hohe Reaktionstemperaturen erfordert und bei den gegebenen Reaktionsbedingungen sehr unwahrscheinlich ist.

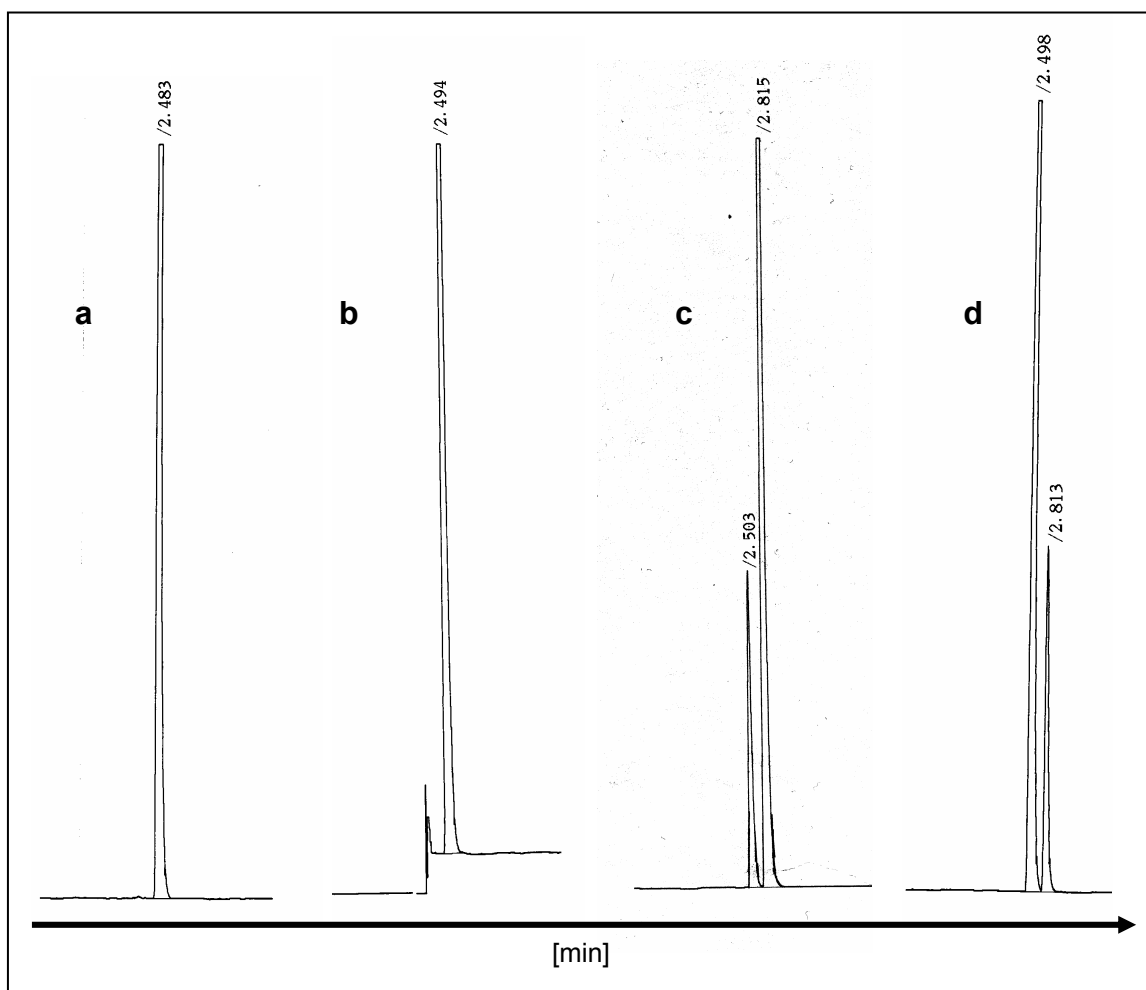
### 5.2.2.2 Bestimmung von $\text{CO}_2$ nach Reaktion von His mit $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$

Bei der Herstellung der Reaktionsansätze für die MS-Untersuchungen (vgl. Tab.5.9) konnte bei dem Ansatz mit His,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen eine starke Gasentwicklung beobachtet werden. Unter Berücksichtigung der allgemein formulierten Reaktionsgleichungen für die metallkatalysierte Oxidation von AS (Reaktion A – C Kap. 5.2.2.1) wurde vermutet, dass  $\text{CO}_2$  für einen Teil dieser Gasentwicklung verantwortlich sein könnte.

Daher wurden die bei der Reaktion freigesetzten Gase mit dem im Kapitel 4.3.5 vorgestellten Verfahren eingefangen und einer gaschromatographischen Untersuchung unterzogen.

Als Referenz wurde das durch die Reaktion von Natriumcarbonat mit verdünnter Salzsäure freigesetzte  $\text{CO}_2$  vermessen.

Der Vergleich des Gaschromatogramms der Probe mit denen der Referenzmessung bzw. der Kontrollmessungen (Argon und Luft) zeigt, dass bei der Oxidation von His durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen  $\text{CO}_2$  freigesetzt wird. Dies steht im Einklang zu den im Kapitel 5.2.2.1 formulierten Reaktionsgleichungen und unterstützt die Entstehung der postulierten Reaktionsprodukte, 2-(1H-Imidazol-4-yl)-acetaldehyd und 2-(1H-Imidazol-4-yl)-acetaldehyd-oxim.



**Abb. 5.29: GC-Bestimmung von  $\text{CO}_2$ .** (a) Kontrollmessung: Argon. (b) Kontrollmessung: Luft. (c) Referenzmessung:  $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{HCl}$  (d) Probe: His 1 %,  $\text{H}_2\text{O}_2$  1000 mM,  $\text{Fe}^{2+}$  1 mM.

### 5.2.2.3 Untersuchung der $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ nach Reaktion von AS-Mischungen mit $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$

Aufgrund von Interaktionen einzelner AS können oxidative Prozesse in Proteinen verglichen mit denen der freien AS deutlich stärker ablaufen [VLADIMIROV et al 1970]. Wie sich Interaktionen von AS auf die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  auswirken können, wurde exemplarisch anhand einfacher AS-Kombinationen untersucht. Dabei wurden Cys, His und Trp, die bereits bei den Versuchen zuvor ein intensives  $\text{UPE}$ -Signal gezeigt hatten, paarweise gemischt und die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  bezüglich Intensität und spektraler Verteilung mit der der Einzelmessungen verglichen.

Alle Untersuchungen wurden in Gegenwart von 1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt. Die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  erfolgte in einer Konzentration von 1000 mM. Tabelle 5.10 zeigt die gemessenen  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensitäten nach einer Reaktionszeit von 2 Minuten.

Tab. 5.10:  $UPE_{H_2O_2}$  nach Reaktion von AS bzw. AS-Kombinationen mit  $H_2O_2$  in Gegenwart von  $Fe^{2+}$ -Ionen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von  $H_2O_2$  1000 mM gestartet und die  $UPE_{H_2O_2}$  40 s danach über 2 min mit dem UPE I-System aufgenommen.  $Fe^{2+}$ -Ionen (1mM) wurden kurz vor der Reaktion der AS-Lösung zugesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der  $UPE_{H_2O_2}$ -Intensität von drei Messungen

| Reaktionsansatz                 | $UPE_{H_2O_2}$ Intensität [counts / 2 min] $\pm$ SD |
|---------------------------------|---|
| Cys 0,5 %(m/V)                  | 18838 $\pm$ 84                                      |
| His 0,5 %(m/V)                  | 40164 $\pm$ 851                                     |
| Trp 0,25 %(m/V)                 | 62840 $\pm$ 1493                                    |
| Cys 0,5 %(m/V), His 0,5 %(m/V)  | 197052 $\pm$ 6711                                   |
| Cys 0,5 %(m/V), Trp 0,25 %(m/V) | 164362 $\pm$ 5089                                   |
| His 0,5 %(m/V), Trp 0,25 %(m/V) | 2542147 $\pm$ 21951                                 |

Die  $UPE_{H_2O_2}$ -Intensität der AS-Kombinationen ist um ein vielfaches höher als die Summe der Einzelintensitäten entsprechender AS. Die mit Abstand höchste  $UPE_{H_2O_2}$ -Intensität wird durch die Kombination von Trp mit His erzielt (Tab. 5.10). Diese Kombination wurde nachfolgend durch Variation der Einzelkonzentrationen näher untersucht.

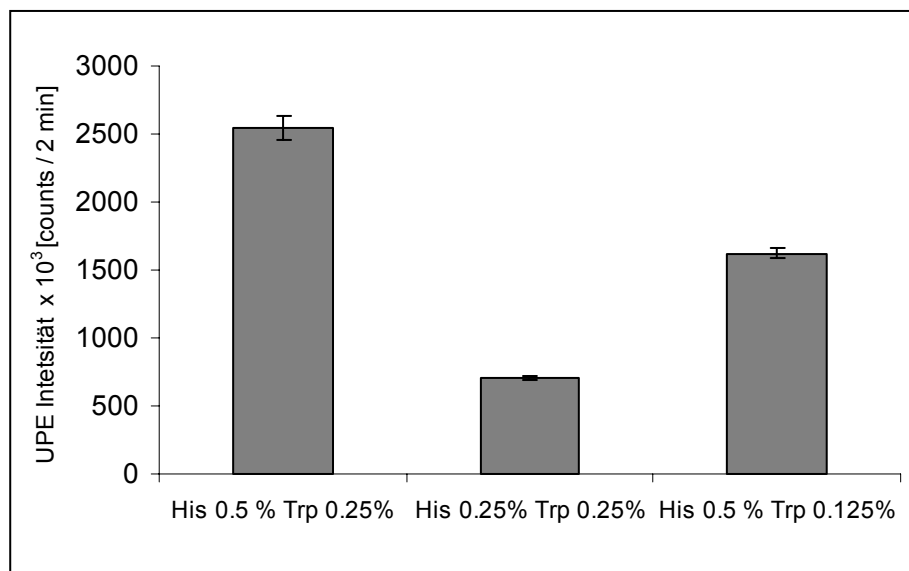
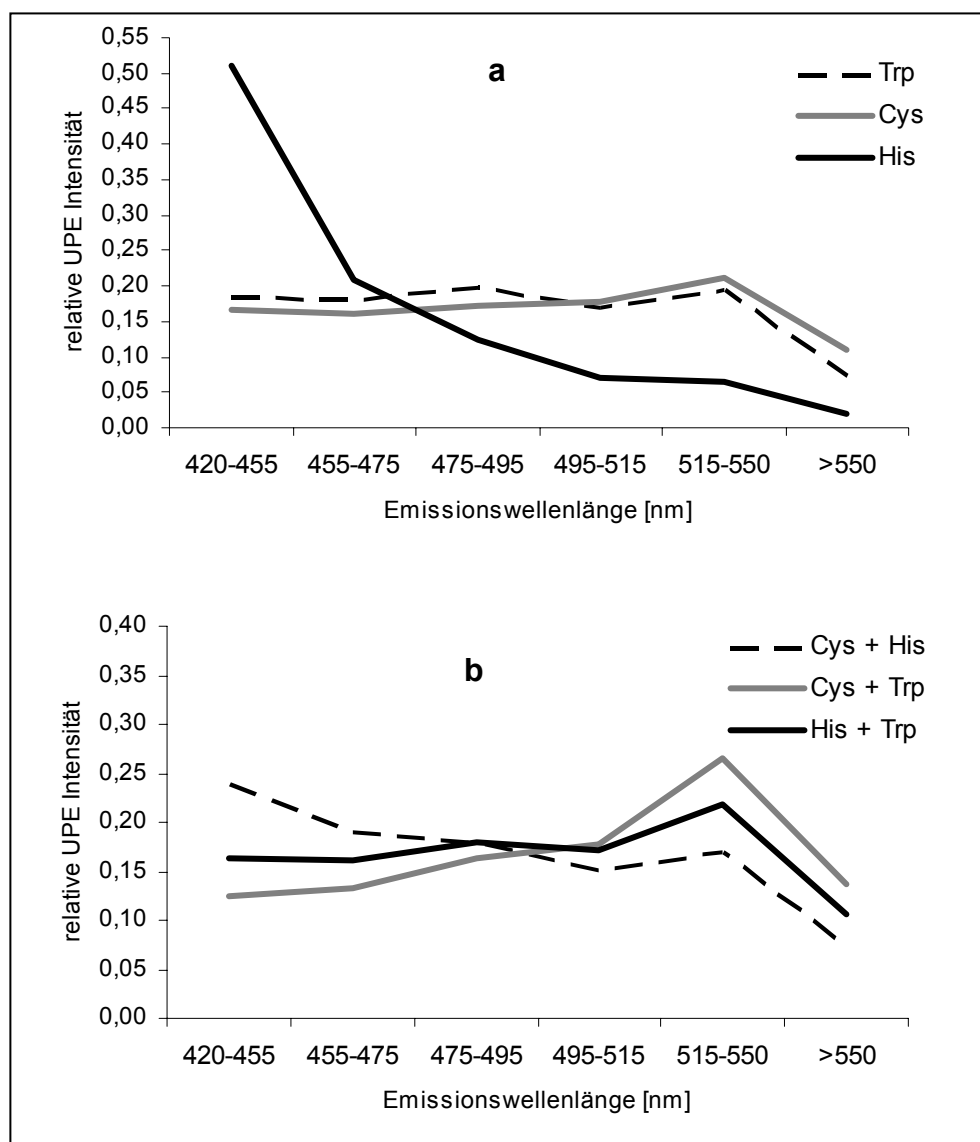


Abb. 5.30: Einfluss von Trp- bzw. His-Konzentration auf die  $UPE_{H_2O_2}$ -Intensität der AS-Kombination (His u. Trp).  $H_2O_2$  1000 mM,  $Fe^{2+}$ -Ionen 1 mM, pH-Wert 7,4. Die  $UPE_{H_2O_2}$  wurde 40 s nach Reaktionsbeginn mit dem UPE I-System über 2 min aufgenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der UPE-Intensität von drei Messungen.

Die Variation der Trp- bzw. His-Konzentration zeigt, dass die Intensität der  $UPE_{H_2O_2}$  beim Reaktionsansatz mit His und Trp stärker von der His-Konzentration abhängt. Eine Halbierung der His-Konzentration ist mit einem Rückgang der UPE-Intensität von ca. 70 % verbunden, während die der Trp-Konzentration lediglich eine Signaleinbuße von ca. 40 % bewirkt (Abb. 5.30).

Abbildung 5.31 gibt die spektrale Verteilung der  $UPE_{H_2O_2}$  der Reaktionsansätze aus Tabelle 5.10 wieder.



**Abb. 5.31: Spektrale Verteilung der  $UPE_{H_2O_2}$  der einzelnen AS (a) bzw. AS-Kombinationen (b) nach Reaktion mit  $H_2O_2$  in Gegenwart von  $Fe^{2+}$ .  $H_2O_2$  1000 mM,  $Fe^{2+}$  1 mM, AS-Konzentrationen siehe Tab. 5.10. Die  $UPE_{H_2O_2}$  wurde 40 s nach Reaktionsbeginn mit dem SRUPE-System im mobilen Modus über 5 Minuten aufgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte der relativen UPE Intensität einzelner Spektralbereiche aus 5 Messungen. Die Intensität einzelner Spektralbereiche wurde auf die Gesamtintensität (>420 nm) der entsprechenden Messung normiert.**

Bei den Einzelmessungen zeigt das relative Emissionsspektrum von His einen ausgeprägten Schwerpunkt im kurzwelligen Bereich (420 – 455 nm), der im weiteren Verlauf steil abfällt. Im Gegensatz dazu sind bei Trp und Cys die Anteile einzelner Spektralbereiche relativ gleichmäßig über das gesamte Spektrum verteilt (Abb. 5.31 a).

Die Kombination von His mit Trp erzeugt ein Emissionsspektrum, welches einen ähnlichen Verlauf wie die Einzelspektren von Trp und Cys aufweist. Der charakteristische Schwerpunkt im kurzwelligen Bereich des Einzelspektrums von His ist im Kombinationsspektrum mit Trp nicht mehr erkennbar (Abb. 5.31 b).

Im Emissionsspektrum der Kombination aus His und Cys sind die Charakteristiken der beiden Einzelspektren in nivellierter Form erkennbar (Abb. 5.31 b).

Im Vergleich zu den Einzelspektren zeichnet sich das Kombinationsspektrum aus Cys und Trp durch einen gesteigerten Anteil im Bereich 515 – 550 nm aus, während die Anteile im kurzwelligen Bereich (< 495 nm) geringer ausfallen (Abb. 5.31 b).

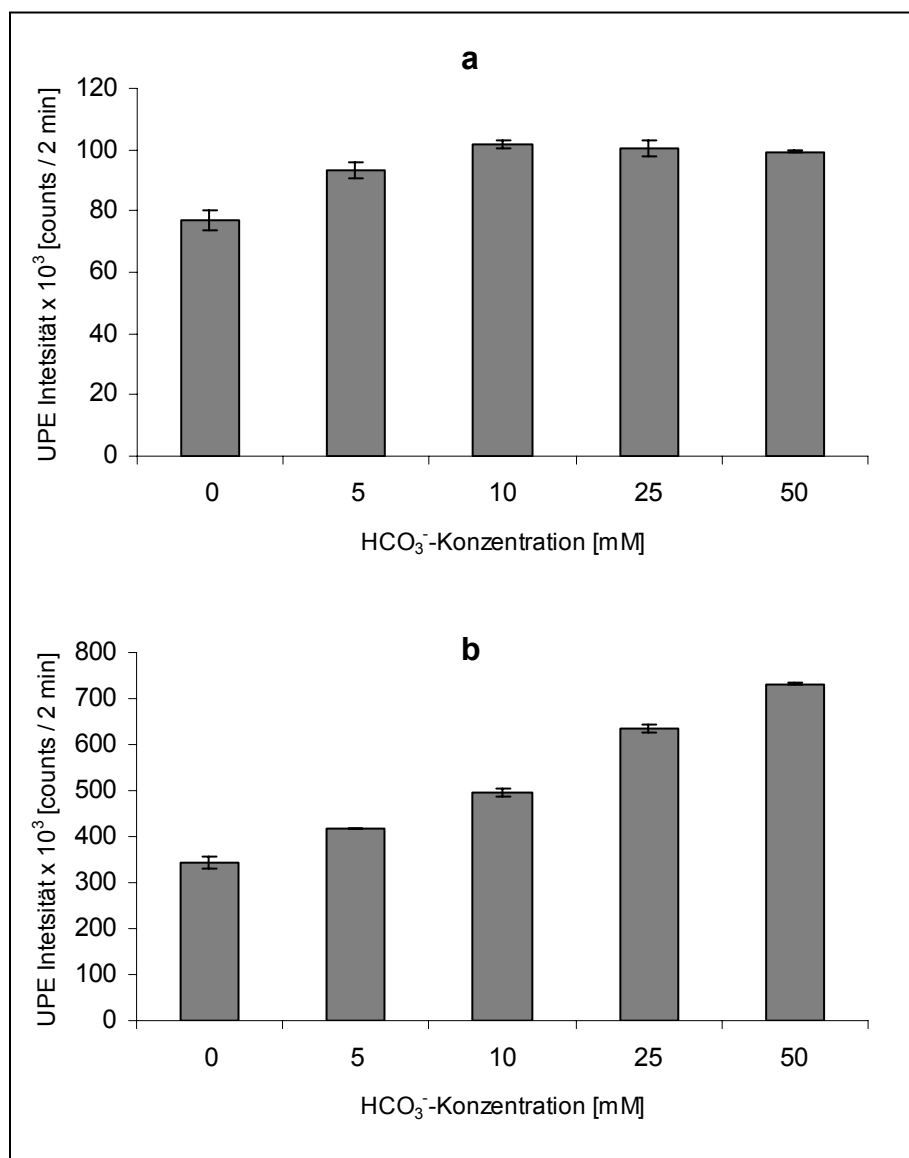
#### **5.2.2.4 Einfluss von Hydrogencarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) auf die $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$**

Stadtman und Berlett haben bei der Untersuchung der metallkatalysierten Oxidation von AS die essentielle Bedeutung von  $\text{HCO}_3^-$  für den Reaktionsverlauf entdeckt [STADTMAN & BERLETT 1991]. Für die stimulierende Wirkung von  $\text{HCO}_3^-$  wurde die Bildung eines katalytisch wirksamen Komplexes bestehend aus einem Metallion im Zentrum und  $\text{HCO}_3^-$  im Verhältnis von 1 : 3 postuliert. Der Effekt von  $\text{HCO}_3^-$  beschränkt sich nicht nur auf die Oxidation von AS. Eine erhöhte Oxidationsrate konnte auch bei Proteinen beobachtet werden [STADTMAN 1993].

Die stimulierende Wirkung von  $\text{HCO}_3^-$  könnte auch bei den oxidativen Modifikationen von Biomolekülen *in vivo* zum Tragen kommen, denn mit einer Konzentration von ungefähr 25 mM gehört  $\text{HCO}_3^-$  zum Hauptbestandteil des physiologischen Puffersystems [SARAN et al 2000].

Vor diesem Hintergrund wurden einige Untersuchungen unter Zugabe von  $\text{HCO}_3^-$  wiederholt. Dabei wurde zunächst die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  nach Reaktion mit BSA mit und ohne Zusatz von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen untersucht.





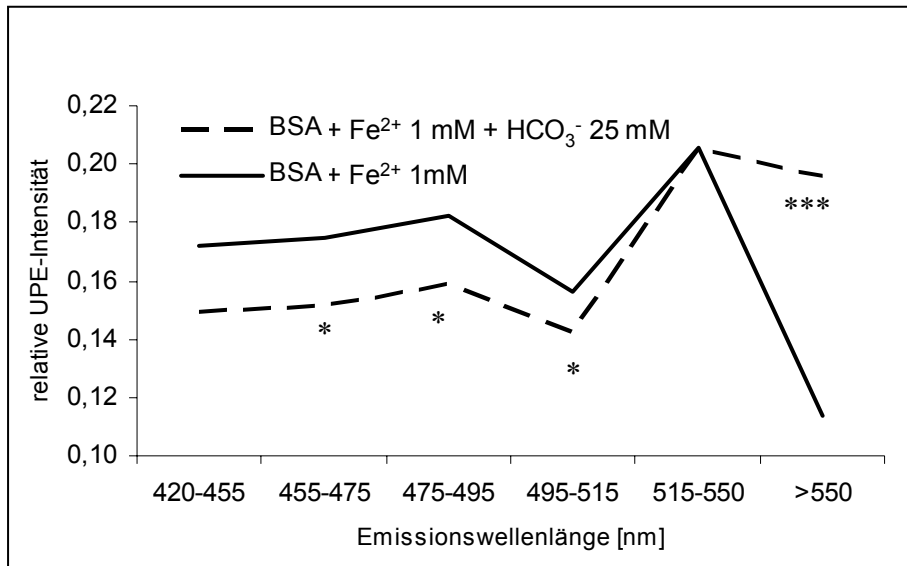
**Abb. 5.32: Einfluss von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> auf die UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> nach Reaktion von BSA ohne Zusatz von Fe<sup>2+</sup>-Ionen (a) und nach Zusatz von Fe<sup>2+</sup>-Ionen (b).** BSA 5% (m/V), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM. (a) Ohne Zusatz von Fe<sup>2+</sup>. (b) Nach Zusatz von 1 mM Fe<sup>2+</sup>. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> wurde kurz vor der Messung der BSA- Lösung zugesetzt. Die UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> wurde 40 s nach Reaktionsbeginn (Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mit dem UPE I-System über 2 min aufgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD der UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub>-Intensität aus drei Messungen.

Bei den Reaktionsansätzen ohne Zusatz von Fe<sup>2+</sup>-Ionen führt die Zugabe von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> zunächst zu einem leichten Anstieg der UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub>-Intensität. Dieser Anstieg erreicht bei einer HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Konzentration von 10 mM ein Maximum und bleibt auch bei weiterer Konzentrationserhöhung auf dem erreichten Niveau stehen (Abb. 5.32 a).

Bei Anwesenheit von Fe<sup>2+</sup>-Ionen ist eine von der HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Konzentration abhängige Steigerung der UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> zu beobachten. Der durch HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> verursachte Anstieg der

UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub>-Intensität beträgt bei einer HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Konzentration von 50 mM ca. 210 % (Abb. 5.32 b).

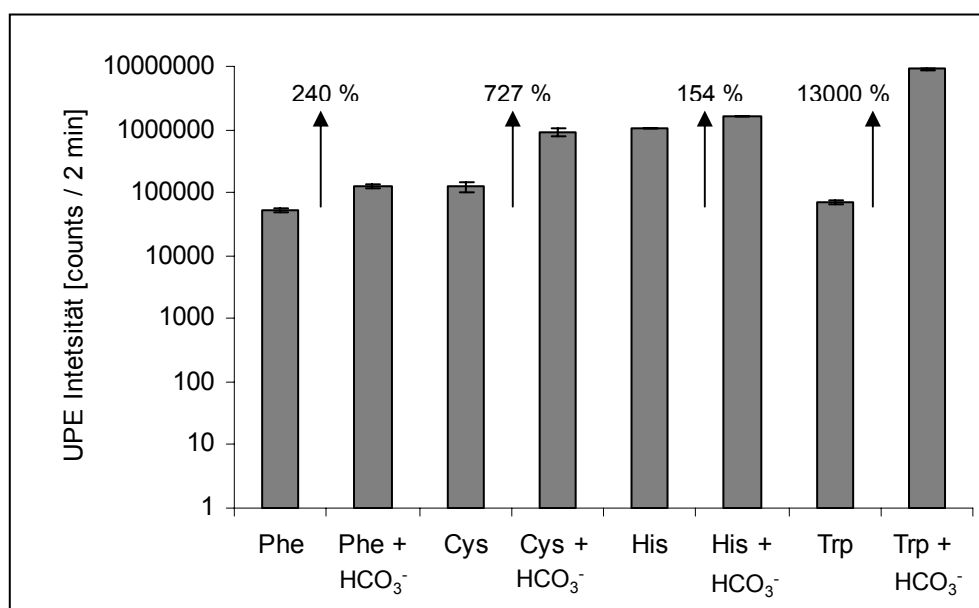
Die Zugabe von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> führt in Gegenwart von Fe<sup>2+</sup>-Ionen nicht nur zu einer deutlichen Steigerung der UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub>-Intensität, sondern auch zu einer Verschiebung der spektralen Verteilung des UPE-Signals.



**Abb. 5.33: Einfluss von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> auf die spektrale Verteilung der UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> nach Reaktion von BSA in Gegenwart von Fe<sup>2+</sup>-Ionen.** BSA 5% (m/V), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM, Fe<sup>2+</sup> 1mM, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 25 mM. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> und Fe<sup>2+</sup> wurden kurz vor der Messung der BSA-Lösung zugesetzt. Die UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> wurde 40 s nach Reaktionsbeginn mit dem SRUPE-System im mobilen Modus über 5 Minuten aufgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte der relativen UPE Intensität einzelner Spektralbereiche aus 4 Messungen. Die Intensität einzelner Spektralbereiche wurde auf die Gesamtintensität (>420 nm) der entsprechenden Messung normiert.

Der Vergleich der relativen Spektren zeigt bei dem Reaktionsansatz mit HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> einen signifikant höheren Anteil im Spektralbereich > 550 nm (Abb. 5.33).

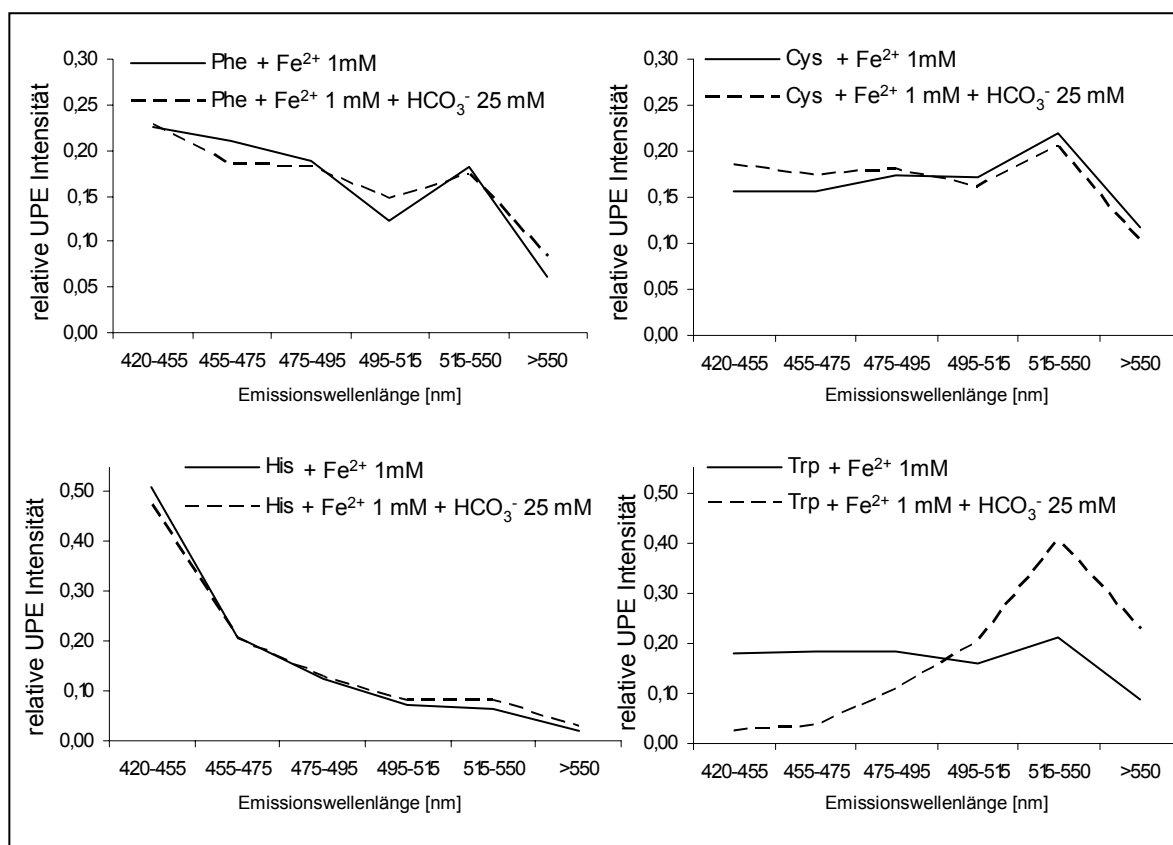
Auch bei den AS ist nach Zugabe von 25 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ein deutlicher Anstieg der UPE<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub>-Intensität in Gegenwart von Fe<sup>2+</sup>-Ionen messbar. Das Ausmaß des Anstieges hängt jedoch stark von der eingesetzten AS ab (Abb. 5.34).



**Abb. 5.34: Einfluss von  $\text{HCO}_3^-$  auf die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  nach Reaktion von AS in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen.** Phe, Cys und His 1 % (m/V), Trp 0,5 % (m/V),  $\text{H}_2\text{O}_2$  1000 mM,  $\text{Fe}^{2+}$  1mM,  $\text{HCO}_3^-$  25 mM.  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{Fe}^{2+}$  wurden kurz vor der Reaktion der AS-Lösungen zugesetzt. Die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  wurde 40 s nach Reaktionsbeginn mit dem UPE I-System über 2 min aufgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität aus drei Messungen.

Hinsichtlich der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität profitiert der Reaktionsansatz mit Trp am stärksten von der stimulierenden Wirkung von  $\text{HCO}_3^-$ . Verglichen mit dem gleichen Reaktionsansatz ohne  $\text{HCO}_3^-$  beträgt der Anstieg der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität 13000 %. Der zweit stärkste Anstieg (727 %) der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität fällt rund 20 fach geringer aus und ist bei dem Reaktionsansatz mit Cys zu beobachten. His, das ohne Zusatz von  $\text{HCO}_3^-$  die höchste  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität aufwies, reagiert mit einem Anstieg von 154 % am geringsten auf die Zugabe von  $\text{HCO}_3^-$ .

Neben Intensitätsmessungen wurde ebenfalls die spektrale Verteilung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  nach Reaktion von AS mit und ohne Zusatz von  $\text{HCO}_3^-$  analysiert. Alle Reaktionsansätze enthielten 1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen (Abb. 5.35).



**Abb. 5.35: Einfluss von  $\text{HCO}_3^-$  auf die spektrale Verteilung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  nach Reaktion von AS in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen.** Phe, Cys und His 1 % (m/V), Trp 0,5 % (m/V),  $\text{H}_2\text{O}_2$  1000 mM,  $\text{Fe}^{2+}$  1mM,  $\text{HCO}_3^-$  25 mM.  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{Fe}^{2+}$  wurden kurz vor der Reaktion der AS-Lösungen zugesetzt. Die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  wurde 40 s nach Reaktionsbeginn mit dem SRUPE-System im mobilen Modus über 5 Minuten aufgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte der relativen UPE Intensität einzelner Spektralbereiche aus 4 Messungen. Die Intensität einzelner Spektralbereiche wurde auf die Gesamtintensität (>420 nm) der entsprechenden Messung normiert.

Bei Phe, Cys, und His führt der Zusatz von  $\text{HCO}_3^-$  trotz einer Steigerung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  Intensität zwischen 150 und 730 % nicht zu einer signifikanten Änderung des spektralen Verlaufs des UPE-Signals. Die relativen Spektren zeigen mit und ohne  $\text{HCO}_3^-$  nahezu identische Anteile in den jeweiligen Spektralbereichen (Abb. 5.35). Bei Trp hingegen lässt sich eine deutliche Verschiebung im spektralen Verlauf der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  in Gegenwart von  $\text{HCO}_3^-$  beobachten. Verglichen mit dem Reaktionsansatz ohne  $\text{HCO}_3^-$  zeigt das Spektrum nach Zugabe von  $\text{HCO}_3^-$  deutlich erhöhte Anteile im langwelligen Bereich (> 495 nm) mit einem ausgeprägten Maximum bei 515 – 550 nm (Abb. 5.35).

### 5.2.2.5 Fluorimetrische Bestimmung von Trp und seine Oxidationsprodukte

Im letzten Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die aus der Literatur bekannte stimulierende Wirkung von  $\text{HCO}_3^-$  auf die metallkatalysierte Oxidation von AS und Proteinen mit einer deutlichen Steigerung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität verbunden ist. Dieser Effekt war besonders bei Trp sehr stark ausgeprägt, was sich sowohl in einer Intensitätssteigerung von ca. 13000 % als auch in einer Veränderung der spektralen Verteilung des  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Signals äußerte.

Die Hypothese war, dass die Steigerung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität durch Zusatz von  $\text{HCO}_3^-$  auf eine erhöhte Oxidationsrate von Trp beruht. Um dies zu überprüfen, wurde der Stoffumsatz von Trp unter gleichen Reaktionsbedingungen wie bei den UPE-Messungen fluorimetrisch untersucht.

Dabei wurde sowohl der Trp-Abbau (Abnahme der Trp-Fluoreszenz  $\lambda_{\text{Ex}}$  280 nm;  $\lambda_{\text{Em}}$  350 nm) als auch die Entstehung von Trp-Oxidationsprodukten (Zunahme der Fluoreszenz  $\lambda_{\text{Ex}}$  370 nm;  $\lambda_{\text{Em}}$  440 und 500 nm) herangezogen. Die Oxidationsprodukte von Trp zeigen eine Fluoreszenz im Bereich 400 – 500 nm. Dazu gehören unter anderem Kynurenin ( $\lambda_{\text{Ex}}$  370 nm;  $\lambda_{\text{Em}}$  490 nm) und N-Formylkynurenin ( $\lambda_{\text{Ex}}$  370 nm;  $\lambda_{\text{Em}}$  440 nm) [SLAWINSKI et al 1980].

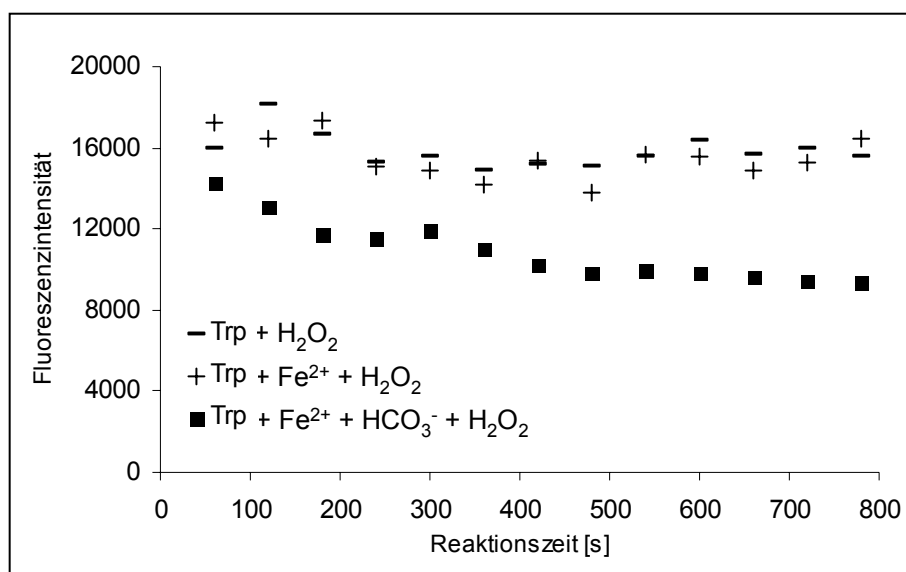
Für die Bestimmung wurde nach Reaktionsbeginn in festgelegten Zeitintervallen eine Probe aus dem Reaktionsansatz entnommen und einer Fluoreszenzmessung unterzogen. Für die Ermittlung der Abnahme der Trp-Fluoreszenz wurde die Probe im Verhältnis 1 : 250 verdünnt, während die Zunahme der Fluoreszenz aus der unverdünnten Probe gemessen wurde (vgl. Kap. 4.3.6).

Der Stoffumsatz von Trp wurde bei folgenden Reaktionsansätzen fluorimetrisch bestimmt:

Tab. 5.11: Reaktionsansätze zur Bestimmung des Stoffumsatzes von Trp

| <b>Reaktionsansatz</b>   | <b>Reagenzlösungen</b>   |
|--|--|
| Trp 0,5 % (m/V),   | Trp 1 % (m/V), H <sub>2</sub> O dest.  |
| Trp 0,5 % (m/V), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1000 mM   | Trp 1 % (m/V), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 mM   |
| Trp 0,5 % (m/V), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1000 mM, Fe <sup>2+</sup> 1 mM                                      | Trp 1 % (m/V), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 mM, Fe <sup>2+</sup> 2 mM  |
| Trp 0,5 % (m/V), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1000 mM, Fe <sup>2+</sup> 1 mM, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 25 mM | Trp 1 % (m/V), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 mM, Fe <sup>2+</sup> 2 mM, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 1000 mM |

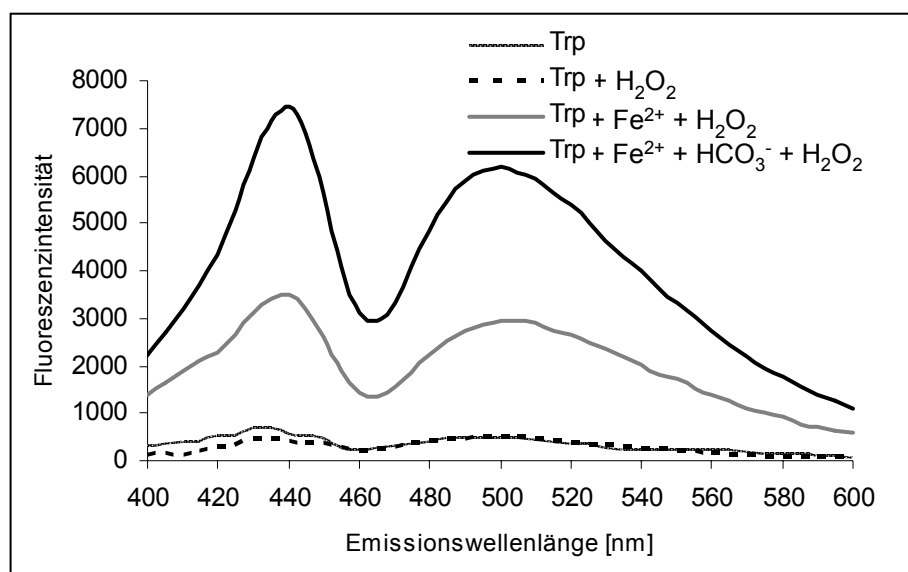
Abbildung 5.36 zeigt den Verlauf der Trp-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Reaktionszeit und vom untersuchten Reaktionsansatz.



**Abb. 5.36: Trp-Fluoreszenz der unterschiedlichen Reaktionsansätze in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.** Reagenzkonzentrationen der Reaktionsansätze: Trp 0,5 % (m/V), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM, Fe<sup>2+</sup> 1 mM, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 25 mM. Die Reaktionsansätze wurden vor der Fluoreszenzmessung im Verhältnis 1 : 250 verdünnt.  $\lambda_{Ex}$  280 nm;  $\lambda_{Em}$  350 nm.

Die Trp-Fluoreszenz bleibt bei den Reaktionsansätzen ohne HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> über den gesamten Messzeitraum konstant. Eine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität ist erst durch Zusatz von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> messbar.

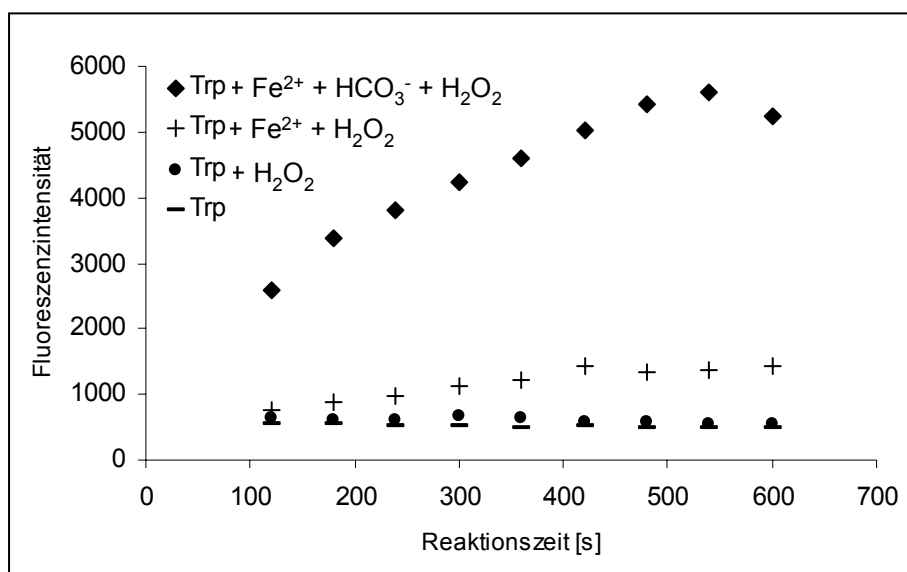
Die nächste Abbildung zeigt das Fluoreszenzspektrum der untersuchten Reaktionsansätze nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten.



**Abb. 5.37: Fluoreszenzspektrum unterschiedlicher Reaktionsansätze nach einer Reaktionszeit von 20 min.** Trp 0,5 % (m/V), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM, Fe<sup>2+</sup> 1 mM, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 25 mM. Das Emissionsspektrum wurde bei einer Anregungswellenlänge von 370 nm aufgenommen.

Bei den Reaktionsansätzen mit Fe<sup>2+</sup>-Ionen zeigt das Emissionsspektrum zwei ausgeprägte Maxima bei ca. 440 und 500 nm, wobei der Reaktionsansatz, der zusätzlich HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> enthielt, deutlich höhere Intensitätswerte aufweist. Das Emissionsspektrum des Reaktionsansatzes ohne Fe<sup>2+</sup>-Ionen und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Trp, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bleibt gegenüber des Kontrollansatzes (Trp) unverändert (Abb. 5.37).

Im nächsten Versuch wurde die Fluoreszenzzunahme bei  $\lambda_{Em}$  500 nm in Abhängigkeit von der Reaktionszeit untersucht (Abb. 5.38).



**Abb. 5.38: Verlauf der Fluoreszenzintensität bei  $\lambda_{Em}$  500 nm in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.** Trp 0,5 % (m/V), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 mM, Fe<sup>2+</sup> 1 mM, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 25 mM.  $\lambda_{Ex}$  370 nm;  $\lambda_{Em}$  500 nm.

Eine Zunahme der Fluoreszenzintensität ist nur bei Reaktionsansätzen mit Fe<sup>2+</sup>-Ionen sichtbar. Während diese Zunahme ohne HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> eher gering ausfällt, führt die Zugabe von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> zu einem steileren Anstieg der Fluoreszenzwerte im Reaktionsverlauf (Abb. 5.38).

Zusammenfassend haben die fluorimetrischen Untersuchungen einen Stoffumsatz von Trp nach Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nur in Gegenwart von Fe<sup>2+</sup>-Ionen gezeigt. Ohne Zusatz von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ist der Stoffumsatz allerdings sehr gering und konnte nur anhand der Fluoreszenzzunahme bei  $\lambda_{Em}$  500 nm nachgewiesen werden (Abb. 5.38). Eine Abnahme der Trp-Fluoreszenz konnte jedoch ohne Zusatz von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> nicht beobachtet werden (Abb. 5.36). Dabei muss allerdings beachtet werden, dass die Trp-Fluoreszenz aus einer sehr stark verdünnten Probe (1 : 250) ermittelt wurde (vgl. Kap. 4.3.6) und daher eine sehr geringe Abnahme vermutlich nicht ausreichend genau erfasst werden konnte.

In Gegenwart von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ist sowohl der Abbau von Trp (Abb. 5.36) als auch die Entstehung von Trp-Oxidationsprodukten deutlich sichtbar.



### 5.3 Untersuchung potentieller Einflussfaktoren der UPE<sub>UV</sub>

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der lichtinduzierten UPE von der Haut vorgestellt, wobei hauptsächlich die Bedeutung der UV-Strahlung für die Intensität, die Kinetik und die spektrale Verteilung des UPE-Signals im Vordergrund steht. Die Untersuchung der Auswirkungen potentieller Einflussfaktoren sollte dabei helfen, die Mechanismen der UPE-Generierung näher zu charakterisieren.

Bezogen auf das Spektrum der Anregungsstrahlung wurden für die nachfolgenden Versuche drei unterschiedliche Anregungsarten definiert (Tab. 5.12). Die Intensität und das Spektrum der Anregungsstrahlung waren durch die Bestrahlungsquelle und die optische Kopplung zum Messsystem vorgegeben (vgl. Kap. 4.2) und wurden mittels optische Filter wie WG 335, GG 400 und ND-Filter moduliert.

Tab. 5.12: Definition der Anregungsart in Abhängigkeit vom Spektrum der Anregungsstrahlung

| <b>Anregungsart</b> | <b>Optischer Filter</b> | <b>Bezeichnung der induzierten UPE</b> |
|---------------------|-------------------------|--|
| UV-Strahlung        | Ohne Filter             | UPE <sub>UV</sub>                      |
| UVA-Strahlung       | WG 335                  | UPE <sub>UVA</sub>                     |
| VIS-Strahlung       | GG 400                  | UPE <sub>VIS</sub>                     |

Die Spektren der hier definierten Anregungsarten UV-Strahlung und UVA-Strahlung beinhalten Anteile vom sichtbaren Licht (> 400 nm). Wie nachfolgend aber gezeigt wird, beruht die Wirkung dieser Anregungsarten zum größten Teil auf die UV-Anteile (< 380 nm) im Spektrum (Kap. 5.3.2). Daher wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit trotz des Vorhandenseins von sichtbaren Anteilen ausschließlich von UV- bzw. UVA-Strahlung gesprochen. Zudem ist die Intensität des sichtbaren Lichtes in beiden Anregungsarten nahezu identisch und daher für die Unterschiede, die noch aufgezeigt werden, irrelevant.

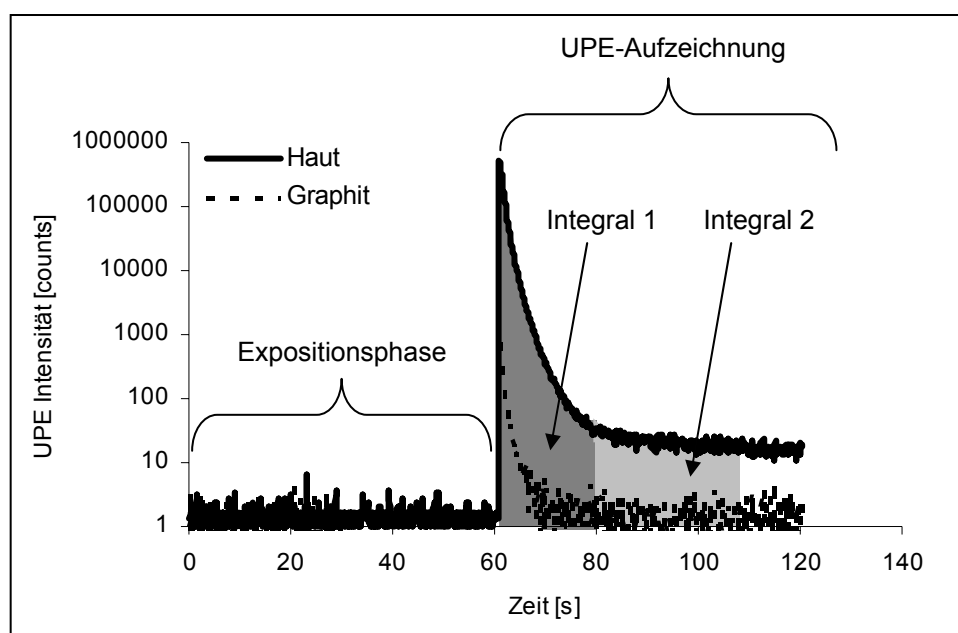
#### 5.3.1 Auswahl geeigneter Messfenster (Integrale) zur Untersuchung der Kinetik des lichtinduzierten UPE-Signals

Die Intensität der lichtinduzierten UPE zeigt nach der Expositionsphase ein Abklingverhalten, welches in zwei Abschnitte aufgeteilt werden kann. Während der erste Abschnitt durch eine steile Abnahme der UPE-Intensität innerhalb weniger Sekunden gekennzeichnet ist, bleibt die UPE-Intensität im zweiten Abschnitt auf niedrigem Niveau über Minuten stabil und nimmt nur sehr langsam ab.

Abbildung 5.39 zeigt am Beispiel der  $UPE_{UV}$  auf Schweinehaut das Abklingverhalten der lichtinduzierten UPE. Als Kontrollmessung wurde eine mit Graphit beschichtete Aluminiumplatte vermessen. Trotz der geringen Intensität des UPE-Signals im zweiten Abschnitt der Abklingkurve ist eine deutliche Differenzierung gegenüber der Kontrollmessung möglich (Abb. 5.39).

Bereits in Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass je nach Auswahl des Messfensters die Auswirkungen von Einflussfaktoren auf die Lichtinduzierte UPE unterschiedlich stark oder zum Teil sogar entgegengesetzt waren. Für eine systematische Untersuchung dieses Sachverhaltes wurden zwei Messfenster festgelegt, die nachfolgend mit Integral 1 und Integral 2 bezeichnet werden.

Integral 1 stellt die Summe der counts innerhalb der ersten 20 s direkt (0,5 s *delay*) nach der Expositionsphase dar, während Integral 2 die counts von der 20. bis zur 50. Sekunde nach der Expositionsphase zusammenfasst (Abb. 5.39). Die Festlegung der Integralgrenzen erfolgte empirisch anhand der Ergebnisse aus den Vorversuchen.



**Abb. 5.39: Abklingkurve der lichtinduzierten UPE am Beispiel der  $UPE_{UV}$  auf Schweinehaut.** Die Messung erfolgte mit dem SRUPE-System im stationären Modus. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriol-Lampe ohne Filter eingesetzt. Expositionsdauer 60 s, 105,6 mJ / cm<sup>2</sup> UVB, 441 mJ / cm<sup>2</sup> UVA.

### 5.3.2 Abhängigkeit der lichtinduzierten UPE von der Wellenlänge der Anregungsstrahlung

Um die wellenlängenabhängige Wirkung der Anregungsstrahlung zu untersuchen, wurden mittels optischer Filter bestimmte Spektralbereiche ausgeblendet. Tabelle 5.13 zeigt eine Aufstellung der eingesetzten Filter und die daraus resultierende Intensität einzelner Spektralbereiche. Die Messungen wurden mit dem SRUPE-System an Schweinehaut durchgeführt und die Oriol-Lampe als Bestrahlungsquelle eingesetzt.

Vor jeder Messung wurde eine Kontrollmessung mit Graphit durchgeführt und die erhaltenen UPE-Werte von den Messwerten der Haut abgezogen.

Tab. 5.13: Intensität einzelner Spektralbereiche der Anregungsstrahlung

| Anregungsart  | Optischer Filter | UVB-Intensität<br>$mW / cm^2$ | UVA-Intensität<br>$mW / cm^2$ | VIS-Intensität<br>$mW / cm^2$ |
|---------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| UV-Strahlung  | ohne Filter      | 1,8                           | 6,9                           | 48,5                          |
| UVA-Strahlung | WG 335           | —                             | 5,9                           | 44,5                          |
| VIS-Strahlung | GG 400           | —                             | —                             | 38,5                          |

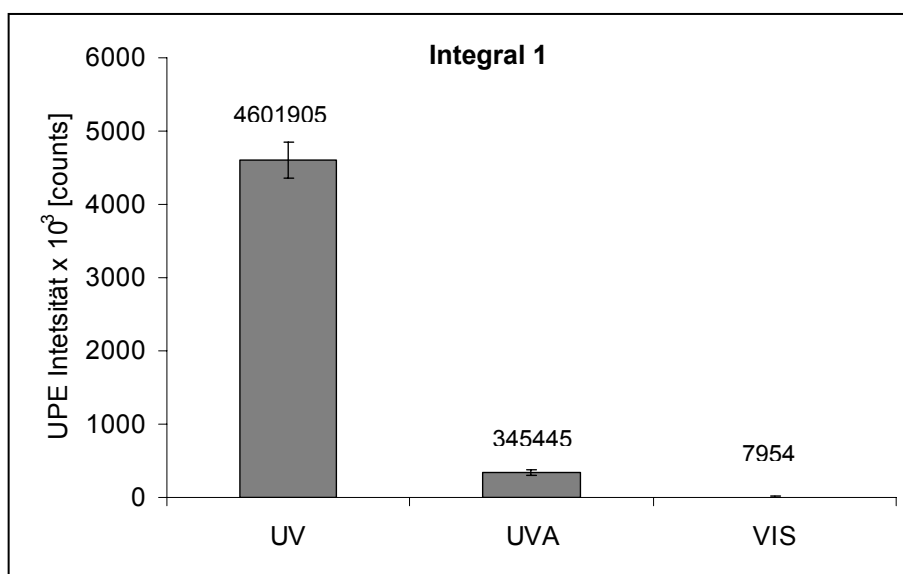
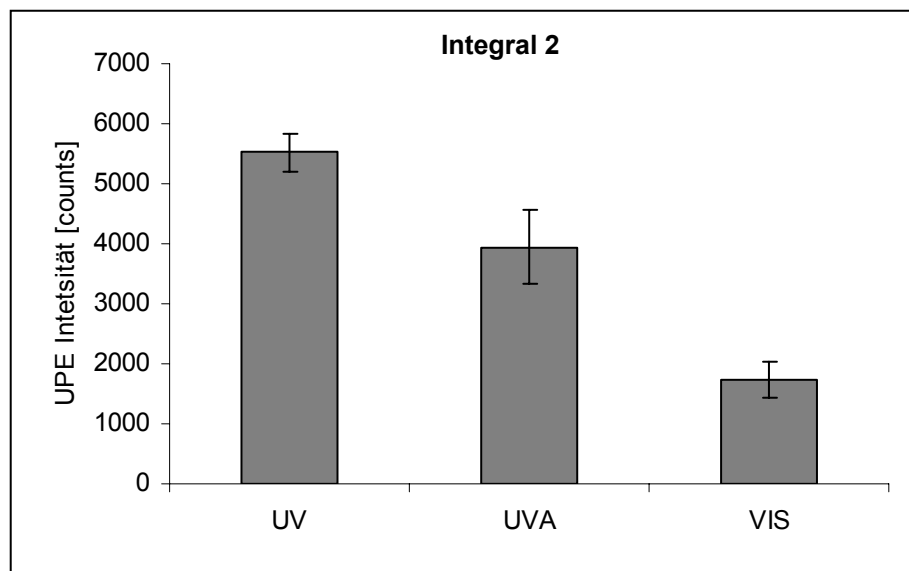


Abb. 5.40: Wellenlängenabhängige Wirkung der Anregungsstrahlung auf die lichtinduzierte UPE beim Integral 1. Die Messung erfolgte mit dem SRUPE-System im stationären Modus. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriol-Lampe eingesetzt. Expositionsdauer: 60 s. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der UPE- Intensität aus vier Messungen.

Beim Integral 1 zeigt sich eine starke Abhängigkeit der lichtinduzierten UPE vom UVB-Anteil der Anregungsstrahlung. Das Blocken des UVB-Anteils durch den Filter WG 335 reduziert die Signalintensität um ca. 90 %. Eine ausschließliche Bestrahlung mit sichtbarem Licht generiert im Vergleich zu den Anregungsarten UV- bzw. UVA-Strahlung vernachlässigbar geringe UPE<sub>VIS</sub>-Werte (Abb. 5.40).



**Abb. 5.41: Wellenlängenabhängige Wirkung der Anregungsstrahlung auf die Lichtinduzierte UPE beim Integral 2.** Die Messung erfolgte mit dem SRUPE-System im stationären Modus. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriol-Lampe eingesetzt. Expositionsdauer: 60 s. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der UPE- Intensität aus vier Messungen.

Beim Integral 2 ist der UVA-Anteil der Anregungsstrahlung für den größten Teil der UPE-Intensität verantwortlich. Das Vorhandensein des UVB-Anteils verursacht im Vergleich zum Integral 1 einen deutlich geringeren Anstieg der UPE-Intensität. Dieser Anstieg könnte auch zum Teil auf die etwas höhere Intensität der UVA-Strahlung bei der Anregungsart UV-Strahlung beruhen (Tab. 5.13, Abb. 5.41).

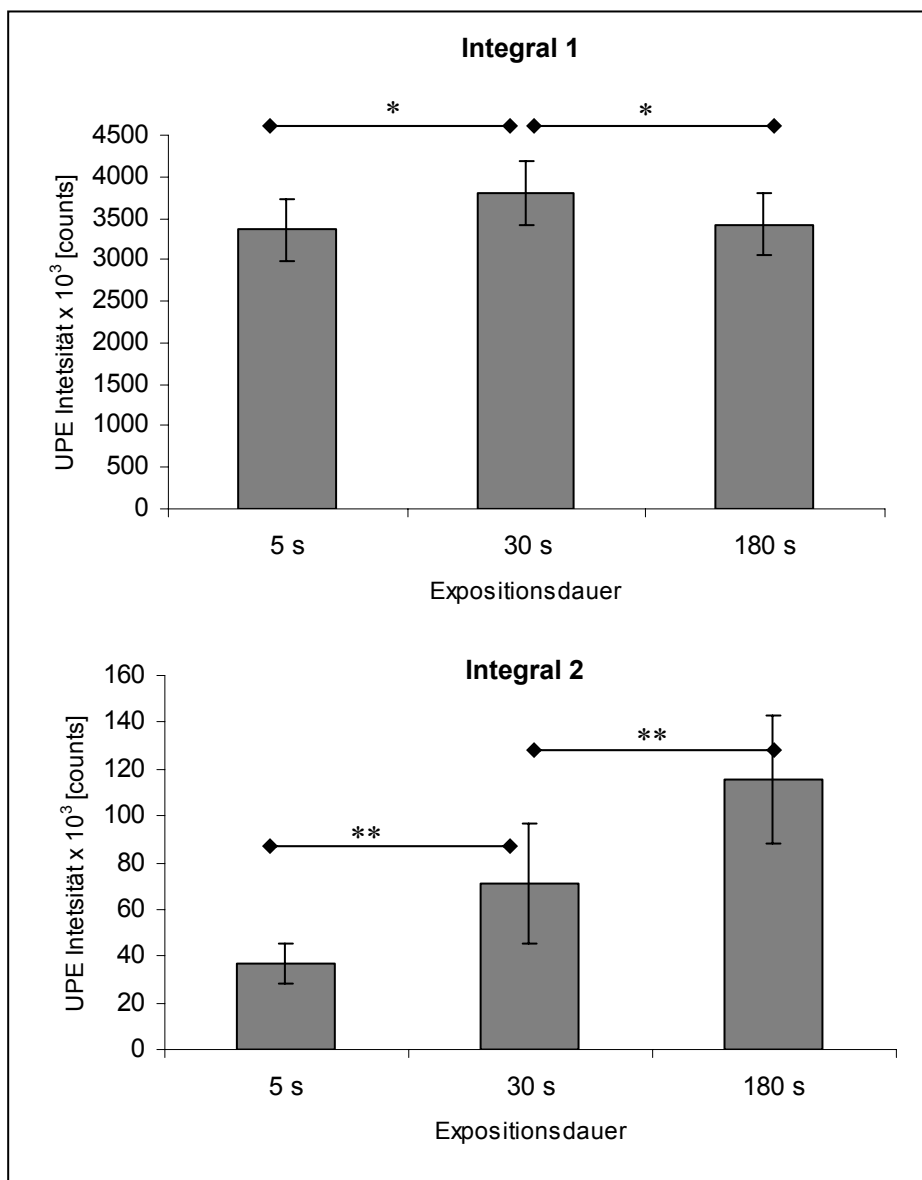
Die Bestrahlung mit sichtbarem Licht führt trotz – der im Vergleich zum UV-Anteil höheren Bestrahlungsintensität (Tab. 5.13) – zu geringeren UPE-Werten (Abb. 5.41).

### 5.3.3 Abhängigkeit der UPE<sub>UV / UVA</sub> von der UV / UVA-Dosis

Der Einfluss unterschiedlicher UV-Dosen auf die UPE<sub>UV</sub> wurde an Schweinehaut untersucht, wobei die UV-Dosis über die Expositionsdauer (5 s, 30 s und 180 s) variiert wurde (Tab. 5.14). Pro UV-Dosis wurden sieben unterschiedliche Hautstücke in randomisierter Reihenfolge vermessen. Die Messung erfolgte mit dem UPE II-System unter Verwendung der FXS 300 Bestrahlungseinheit.

Tab. 5.14: Expositionsdauer und die daraus resultierenden UV-Dosen

| Expositionsdauer               | 5 s  | 30 s  | 180 s  |
|--------------------------------|------|-------|--------|
| UVB-Dosis mJ / cm <sup>2</sup> | 7,1  | 42,3  | 253,8  |
| UVA-Dosis mJ / cm <sup>2</sup> | 59,4 | 356,1 | 1068,3 |



**Abb. 5.42: Abhängigkeit der  $UPE_{UV}$  von der UV-Dosis.** Die Messung erfolgte mit dem UPE II-System. Als Bestrahlungsquelle wurde die FXS 300-Lampe eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der UPE- Intensität von der Schweinehaut aus sieben Messungen.

Beim Integral 1 steigt die  $UPE_{UV}$ -Intensität zunächst mit zunehmender Expositionsdauer signifikant an (5 s vs. 30 s) und fällt wieder auf das

Ursprungsniveau zurück (30 s vs. 180 s). Zwischen 5 s und 180 s Expositionsdauer besteht kein signifikanter Unterschied in der  $UPE_{UV}$ -Intensität (Abb. 5.42).

Beim Integral 2 ist eine deutliche Zunahme der  $UPE_{UV}$ -Intensität mit zunehmender Expositionsdauer bzw. UV-Dosis zu sehen. Die Unterschiede sind jeweils signifikant (Abb. 5.42).

Der Einfluss von Bestrahlungsintensität und – dosis auf die induzierte UPE wurde nachfolgend anhand der  $UPE_{UVA}$  in einer *in vivo* Studie mit 15 Probanden genauer untersucht. Als Bestrahlungsquelle kam die FXS 300 Lampe in Kombination mit dem WG 335 Filter zum Einsatz. Die  $UPE_{UVA}$  wurde mit dem SRUPE-System im stationären Modus aufgenommen. Die Untersuchung erfolgte unter Verwendung von vier unterschiedlichen Bestrahlungsmodalitäten (Tab. 5.15), die anhand eines Permutationsschemas den Messarealen zugeordnet wurden.

Tab. 5.15: Bestrahlungsmodalitäten und Darstellung des Zusammenhanges zwischen UVA-Intensität, Expositionsdauer und UVA-Dosis

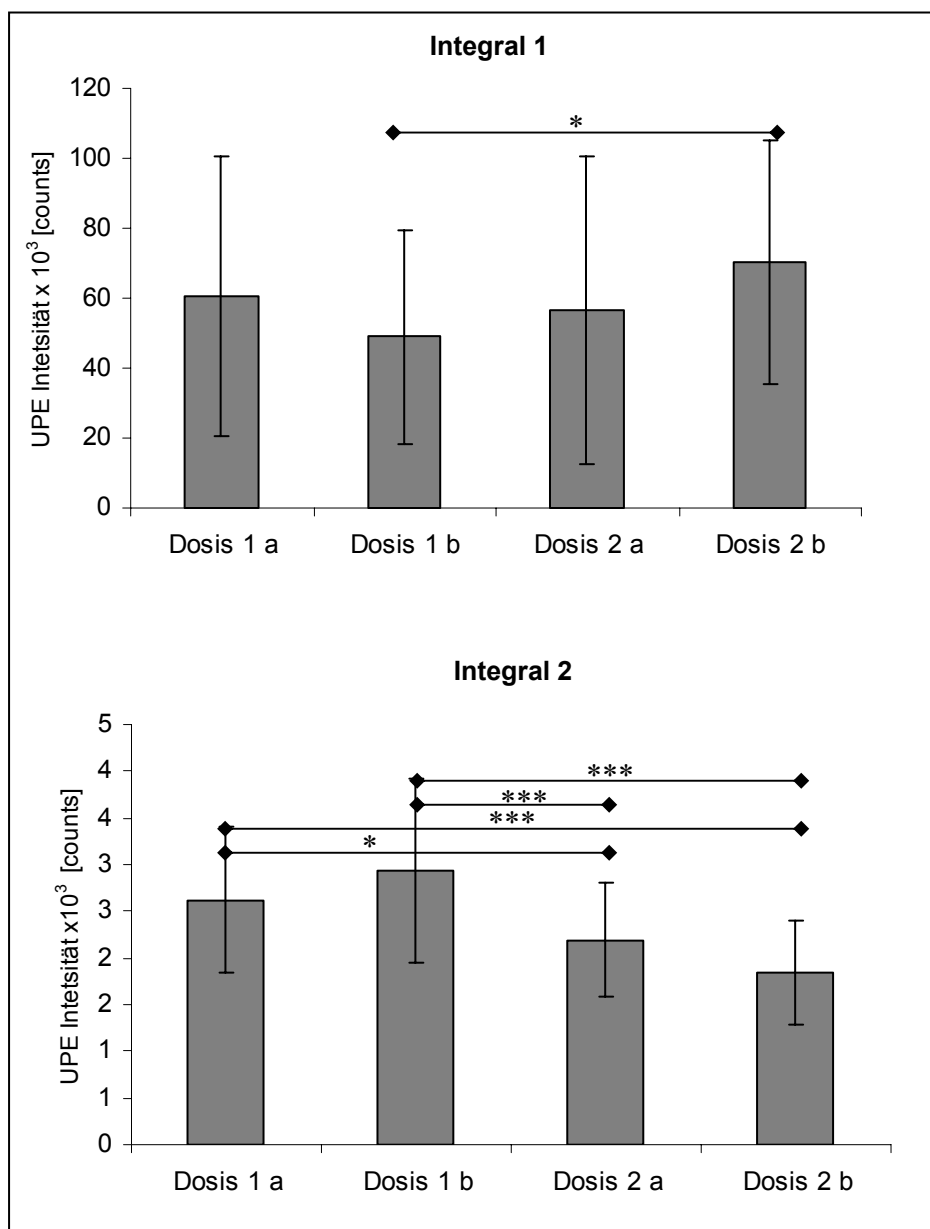
|                                      | <b>Dosis 1a</b> | <b>Dosis 1b</b> | <b>Dosis 2a</b> | <b>Dosis 2b</b> |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Expositionsdauer [s]                 | 35              | 70              | 35              | 18              |
| ND Filter                            | kein            | 0,3             | 0,3             | kein            |
| UVA Intensität [mW/cm <sup>2</sup> ] | 15,5            | 8,0             | 8,0             | 15,5            |
| UVA Dosis [mJ / cm <sup>-2</sup> ]   | 542,5           | 560             | 280             | 279             |

Beim Vergleich der  $UPE_{UVA}$  Intensitäten im Integral 1 können tendenziell zwei Effekte beobachtet werden:

- I. Eine höhere UVA-Intensität generiert unabhängig von der UVA-Dosis höhere  $UPE_{UVA}$ -Werte (Dosis 1 a u. 2 b vs. Dosis 1 b u. 2 a).
- II. Mit zunehmender Expositionsdauer nimmt die  $UPE_{UVA}$ -Intensität ab.

Die Addition beider Effekte führt schließlich zu einem signifikanten Unterschied der  $UPE_{UVA}$ -Werte bei den Bestrahlungsmodalitäten Dosis 1 b und Dosis 2 b (Abb. 5.43).

Im Gegensatz zum Integral 1 ist bei Integral 2 eine signifikante Steigerung der  $UPE_{UVA}$ -Intensität mit zunehmender UVA-Dosis messbar (Dosis 1 a u. 1 b vs. Dosis 2 a u. 2 b). Eine längere Expositionsdauer bewirkt bei Integral 2 anders als Integral 1 tendenziell höhere  $UPE_{UVA}$ -Werte.



**Abb. 5.43: Abhängigkeit der  $UPE_{UVA}$ -Intensität von der Bestrahlungsintensität bzw. – Dosis.** Die Messung erfolgte mit dem SRUPE-System im stationären Modus. Als Bestrahlungsquelle wurde die FXS 300 Lampe in Kombination mit dem WG 335 Filter eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der UPE- Intensität von 15 Probanden.

#### 5.3.4 Abhängigkeit der $UPE_{UV}$ vom pH-Wert der Haut

Der Einfluss des pH-Wertes der Hautoberfläche auf die Intensität der  $UPE_{UV}$  wurde untersucht, indem auf Schweinehaut Phosphatpuffer ( $5 \mu\text{l} / \text{cm}^2$ ) mit unterschiedlichen pH-Werten (2 – 9 pH) aufgetragen wurde. Nach einer Einwirkzeit von 60 Minuten erfolgte die Aufnahme der  $UPE_{UV}$  mit dem SRUPE-System im stationären Modus. Direkt nach der UPE-Messung fand an drei unterschiedlichen Hautstellen eine Überprüfung des pH-Wertes der Hautoberfläche mit einer Glas-

pH-Elektrode (Tab. 5.16) statt. Pro eingestelltem pH-Wert wurden vier Hautstücke vermessen.

Tab. 5.16: pH-Werte der Pufferlösungen und die resultierenden Haut pH-Werte 60 min nach Applikation von  $5 \mu\text{l} / \text{cm}^2$  Pufferlösung

| <b>pH-Werte Phosphatpuffer</b> | <b>pH-Werte auf der Hautoberfläche<br/>Mittelwert <math>\pm</math> SD</b> |
|--------------------------------|---|
| 2,0                            | $2,8 \pm 0,11$  |
| 4,0                            | $5,7 \pm 0,11$  |
| 7,0                            | $7,0 \pm 0,03$  |
| 9,0                            | $8,2 \pm 0,05$  |

Tabelle 5.16 zeigt eindeutig, dass 60 Minuten nach der Applikation der Pufferlösungen reproduzierbare pH-Werte auf der Hautoberfläche erreicht werden.

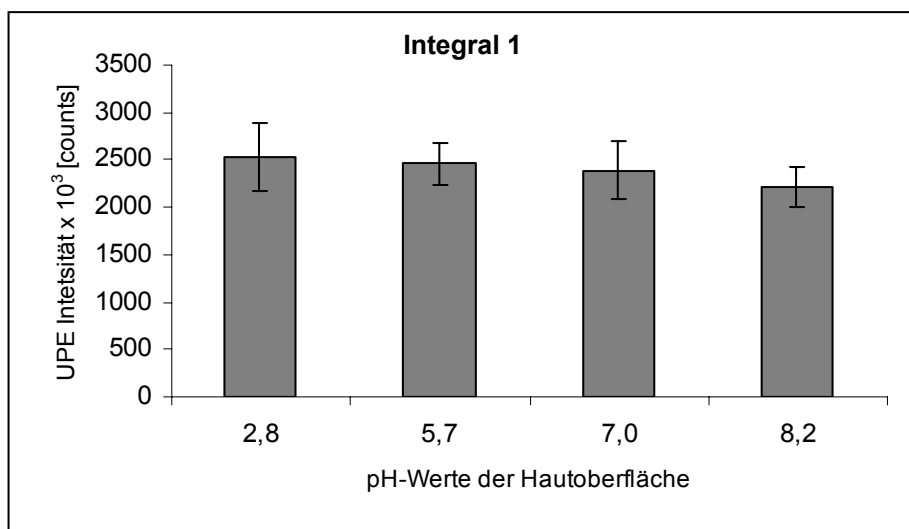
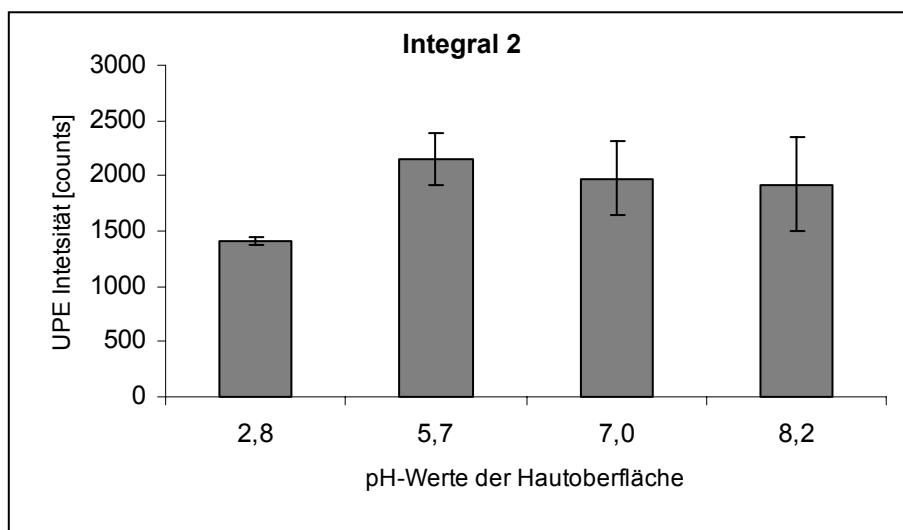


Abb. 5.44: Einfluss des pH-Wertes der Hautoberfläche auf die  $UPE_{UV}$  beim Integral 1. Die Messung erfolgte mit dem SRUPE-System im stationären Modus. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriol-Lampe ohne Filter eingesetzt. Expositionsdauer 30 s,  $63 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  UVB,  $202 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  UVA. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der UPE- Intensität von 4 Hautstücken.

Beim Integral 1 besteht keine signifikante Abhängigkeit der  $UPE_{UV}$ -Intensität vom pH-Wert der Hautoberfläche (Abb. 5.44). Beim Integral 2 dagegen ist ein signifikanter Anstieg der  $UPE_{UV}$  von 53 % beim pH-Übergang von 2,8 auf 5,7 zu beobachten, der sich im pH-Bereich von 5,7 – 8,2 aber nicht mehr verändert (Abb. 5.45).



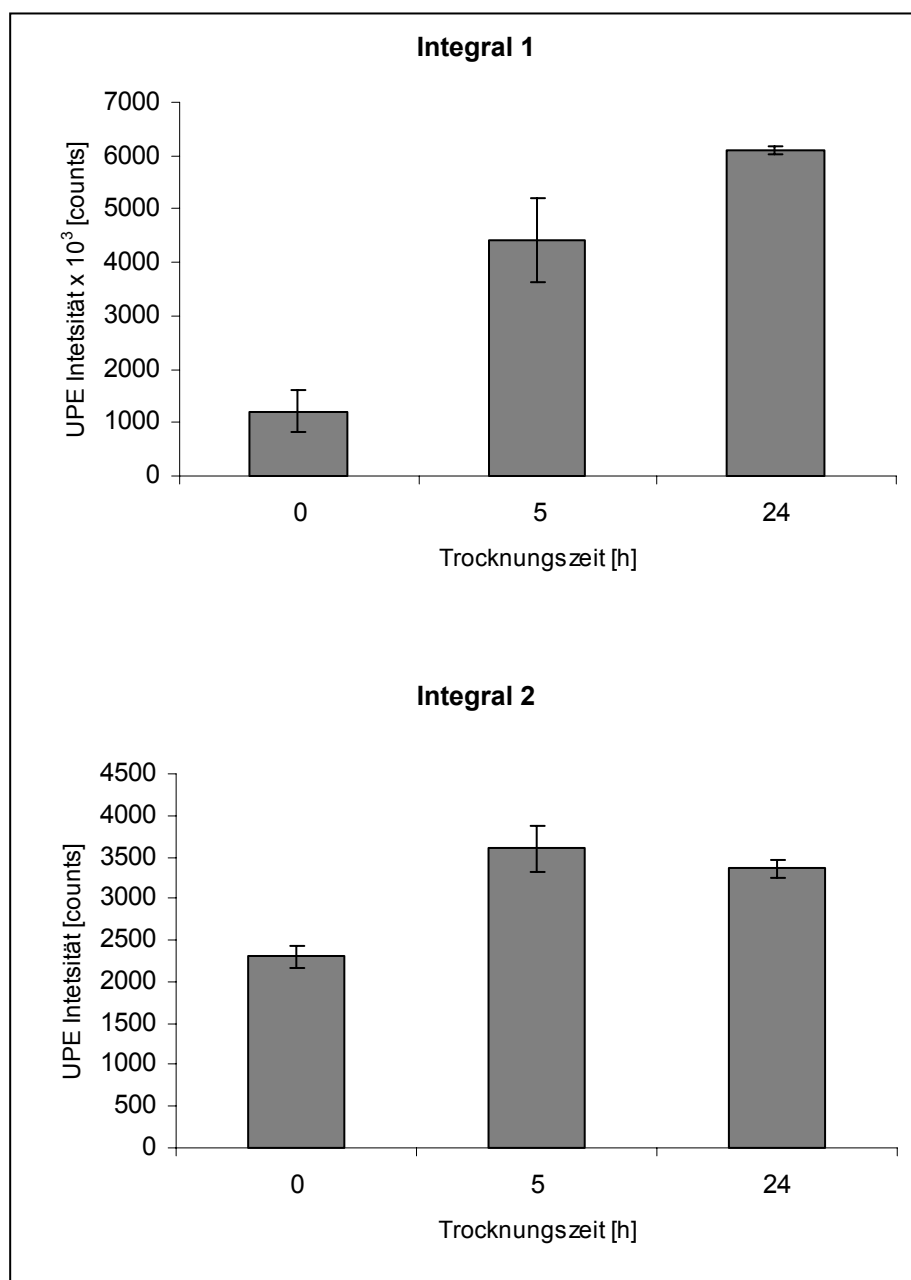


**Abb. 5.45: Einfluss des pH-Wertes der Hautoberfläche auf die  $UPE_{UV}$  beim Integral 2.** Die Messung erfolgte mit dem SRUPE-System im stationären Modus. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriol-Lampe ohne Filter eingesetzt. Expositionsdauer 30 s,  $63 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  UVB,  $202 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  UVA. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der UPE- Intensität von 4 Hautstücken.

### 5.3.5 Abhängigkeit der $UPE_{UV/UVA}$ von der Hautfeuchtigkeit

Der Einfluss von Hautfeuchtigkeit wurde zunächst anhand der  $UPE_{UV}$  auf Schweinehaut untersucht. Dabei wurde die Schweinehaut unterschiedlich lang (5 h und 24 h) in einem Exsikkator über Blaugel ausgetrocknet und die  $UPE_{UV}$  direkt im Anschluss mit dem SRUPE-System im stationären Modus aufgenommen.

Mit zunehmendem Austrocknungsgrad der Hautstücke steigt die Intensität der  $UPE_{UV}$  beim Integral 1 an. Nach einer Austrocknungszeit von 24 h beträgt die Steigerung der  $UPE_{UV}$ -Intensität ca. 500 % (Abb. 5.46). Beim Integral 2 fällt die Zunahme der  $UPE_{UV}$ -Intensität im Verlauf des Trocknungsvorganges deutlich niedriger aus und ein Unterschied zwischen 5 h und 24 h Trocknungszeit ist im Gegensatz zum Integral 1 nicht vorhanden (Abb. 5.46).



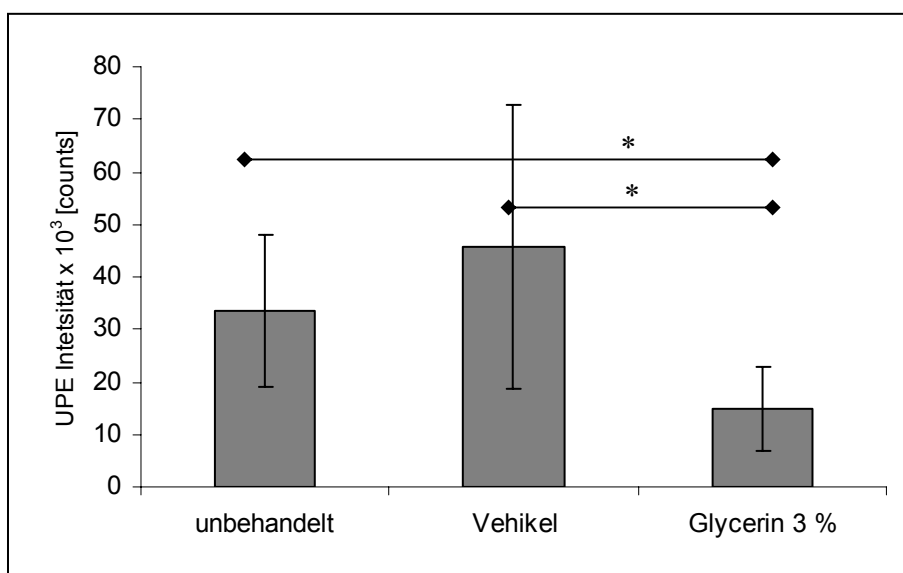
**Abb. 5.46: Einfluss der Hautfeuchtigkeit auf die  $UPE_{UV}$ .** Die Hautstücke wurden unterschiedlich lang im Exsikkator über Blaugel getrocknet und direkt im Anschluss mit dem SRUPE-System im stationären Modus vermessen. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriel-Lampe ohne Filter eingesetzt. Expositionsdauer 30 s, 63 mJ/cm<sup>2</sup> UVB, 202 mJ/cm<sup>2</sup> UVA. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der UPE- Intensität von 3 Hautstücken.

Zusätzlich zu den Versuchen mit Schweinehaut wurde der Einfluss von Hautfeuchtigkeit auf die  $UPE_{UV / UVA}$ -Intensität *in vivo* an zwei unterschiedlichen Probandenkollektiven (UV- und UVA-Kollektiv) a 10 Probanden untersucht. Um die Hautfeuchtigkeit zu erhöhen, wurde Glycerin 3 %ig in einer O / W-Grundlage topisch (2,5  $\mu$ l / cm<sup>2</sup>) appliziert. Zum Vergleich wurden Areale, die mit der gleichen O / W-Grundlage ohne Zusatz von Glycerin behandelt waren und unbehandelte

Areale herangezogen. Nach einer Einwirkzeit von 2 Stunden nach Produktapplikation fand die UPE-Messung mit dem SRUPE-System statt, wobei die Bestrahlung mit der Oriol-Lampe erfolgte.

Die Corneometer-Werte der Prüfareale, die als Maß für die Hautfeuchtigkeit mit gemessen wurden, stiegen durch die Anwendung von Glycerin von  $44,8 \pm 7$  im unbehandelten Zustand auf  $58,2 \pm 11$  zwei Stunden nach Behandlung an. Die Applikation des Vehikels brachte dagegen nur eine geringfügige Steigerung der Corneometer-Werte auf  $47,1 \pm 11$ .

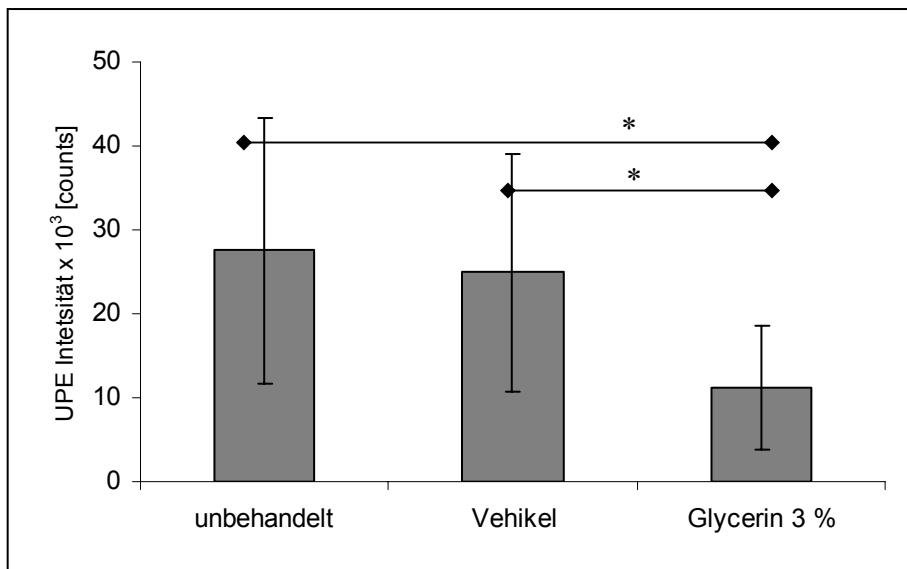
Da bei diesen Untersuchungen die Intensität des UPE-Signals beim Integral 2 sehr gering ausfiel, wurde nur Integral 1 ausgewertet.



**Abb. 5.47: Einfluss der Hautfeuchtigkeit auf die  $UPE_{UV}$  in vivo.** Die Messung wurde mit dem SRUPE-System im mobilen Modus durchgeführt. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriol-Lampe ohne Filter eingesetzt. Expositionsdauer 4 s,  $7,0 \text{ mJ/cm}^2$  UVB,  $27 \text{ mJ/cm}^2$  UVA. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der UPE- Intensität ( $>420 \text{ nm}$ ) von 10 Probanden.

Die Erhöhung der Hautfeuchtigkeit durch Glycerinbehandlung hat eine signifikante Reduktion der  $UPE_{UV/UVA}$ -Intensität zur Folge. Bei den mit Vehikel behandelten Areale zeichnet sich dagegen keine signifikante Veränderung der  $UPE_{UV/UVA}$ -Intensität ab (Abb. 5.47 u. 5.48).

Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten von der Schweinehaut überein, die ebenfalls eine Abnahme der UPE-Intensität mit zunehmender Hautfeuchtigkeit gezeigt haben (Abb. 5.46).



**Abb. 5.48: Einfluss der Hautfeuchtigkeit auf die UPE<sub>UVA</sub> in vivo.** Die Messung wurde mit dem SRUPE-System im mobilen Modus durchgeführt. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriell-Lampe mit dem Filter WG 335 eingesetzt. Expositionsdauer 8 s, 47,2 mJ / cm<sup>2</sup> UVA. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD der UPE- Intensität (>420 nm) von 10 Probanden..

### 5.3.6 Einfluss von O<sub>2</sub> auf die UPE<sub>UV / UVA</sub>

Der Messaufbau für die Untersuchung des O<sub>2</sub>-Einflusses auf die UPE<sub>UV / UVA</sub> wurde bereits in Kapitel 4.4.2 besprochen. Unter Einsatz dieses Messaufbaus wurden für die nachfolgenden Untersuchungen, bezüglich der Gaszufuhr über der Haut, drei unterschiedliche Versuchsbedingungen eingestellt (Tab. 5.17).

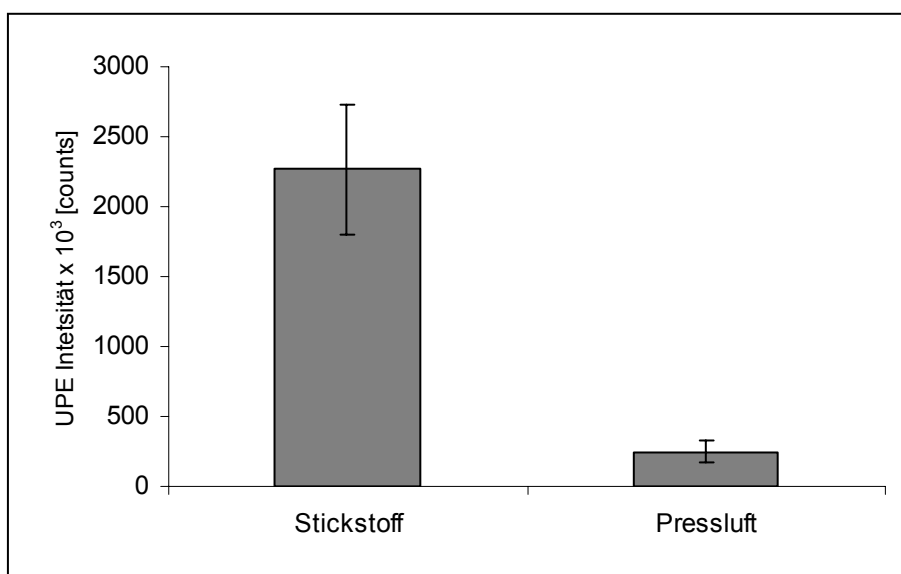
Tab. 5.17: Definition von Versuchsbedingungen anhand der Gaszufuhr im Verlauf der UPE-Messung

| Versuchsbedingung                | Expositionsphase     | UPE-Aufzeichnung     |
|----------------------------------|----------------------|----------------------|
| N <sub>2</sub> -Modus            | unter N <sub>2</sub> | unter N <sub>2</sub> |
| O <sub>2</sub> -Modus            | unter O <sub>2</sub> | unter O <sub>2</sub> |
| partieller N <sub>2</sub> -Modus | unter Pressluft      | unter N <sub>2</sub> |

Im N<sub>2</sub>-Modus fand die gesamte Messphase unter Ausschluss von O<sub>2</sub> statt, indem als Gas reiner Stickstoff zugeführt wurde. Im Gegensatz dazu bezeichnet der O<sub>2</sub>-Modus eine Versuchsdurchführung, die vollständig unter 100 % O<sub>2</sub>-Atmosphäre ablief. Beim "partiellen N<sub>2</sub>-Modus" wurde während der Expositionsphase Pressluft zugeführt und direkt im Anschluss für die UPE-Aufzeichnung auf N<sub>2</sub> umgeschaltet. Bei allen drei Modi wurde als Referenz die Messung unter Pressluft (20 % O<sub>2</sub>-Anteil) zu Grunde gelegt.

**Messungen unter N<sub>2</sub>-Modus:**

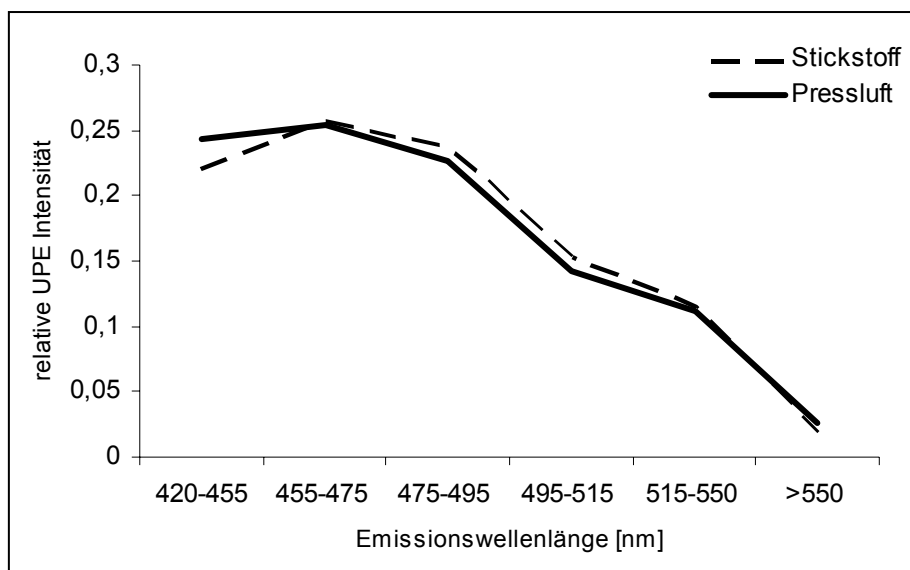
Unter N<sub>2</sub>-Modus steigt die UPE<sub>UV/ UVA</sub>-Intensität drastisch an und überschreitet besonders unter UV-Strahlung den Sättigungsbereich des Detektors. Dies hat zur Folge, dass das Abklingverhalten des UPE-Signals nicht mehr korrekt vom System wiedergegeben werden kann und daher eine Aufteilung des Signals in den im Kapitel 5.3.1 beschriebenen Integralen nicht möglich war. Daher wurde als Maß für die UPE-Intensität die Summe der counts innerhalb der ersten 30 Sekunden direkt nach der Expositionsphase herangezogen.



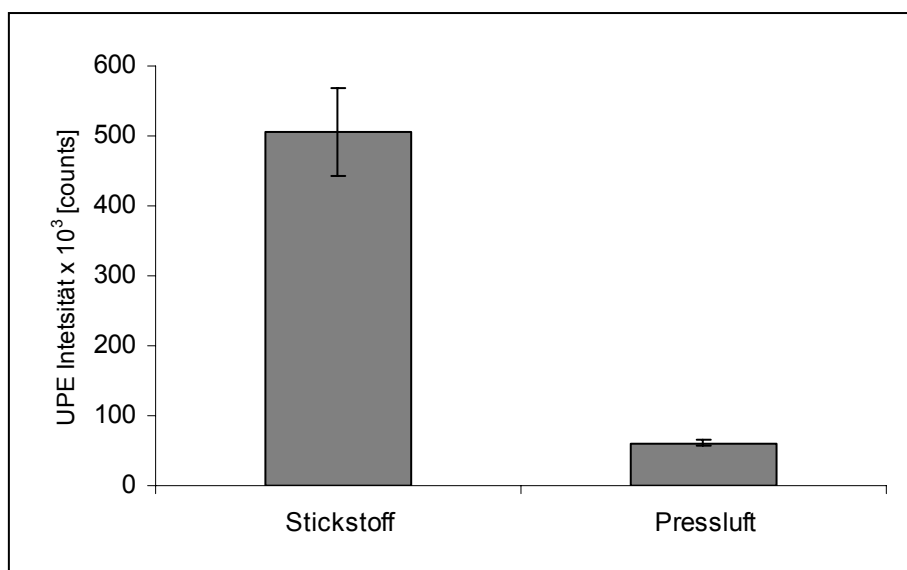
**Abb. 5.49: UPE<sub>UV</sub> unter N<sub>2</sub>-Modus.** Die Messung wurde mit dem SRUPE-System im mobilen Modus durchgeführt. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriol-Lampe ohne Filter eingesetzt. Expositionsdauer 30 s, 63,0 mJ / cm<sup>2</sup> UVB, 202,5 mJ / cm<sup>2</sup> UVA. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD der UPE- Intensität (>420 nm) von 5 Hautstücken.

Der Ausschluss von O<sub>2</sub> während der gesamten Messphase führt zu einer Steigerung UPE<sub>UV</sub>-Intensität um ca. 1000 % (Abb. 5.49). Diese Steigerung wäre ohne die oben beschriebenen Sättigungserscheinungen vermutlich noch höher ausgefallen. Die relative spektrale Verteilung der UPE<sub>UV</sub> bleibt aber nahezu unverändert (Abb. 5.50).

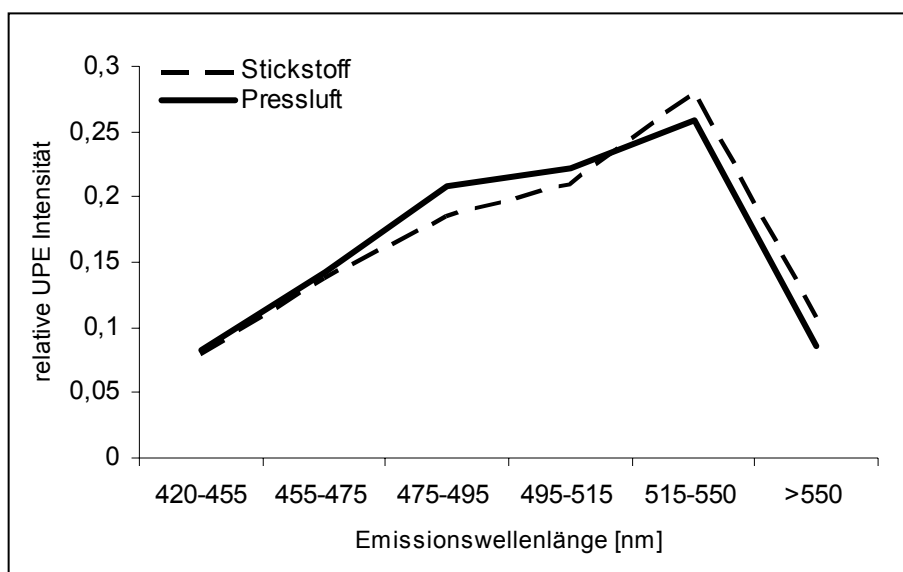
Bei der Bestrahlung mit UVA ist ebenfalls eine deutliche Zunahme (ca. 830 %) der UPE<sub>UVA</sub> unter N<sub>2</sub>-Modus zu beobachten, ohne dass es zu einer Veränderung der spektralen Verteilung des UPE-Signals kommt (5.51 u. 5.52).



**Abb. 5.50: Spektrale Verteilung der  $UPE_{UV}$  unter  $N_2$ -Modus.** Die Messung wurde mit dem SRUPE-System im mobilen Modus durchgeführt. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriol-Lampe ohne Filter eingesetzt. Expositionsdauer 30 s,  $63,0 \text{ mJ/cm}^2$  UVB,  $202,5 \text{ mJ/cm}^2$  UVA. Dargestellt sind Mittelwerte der relativen UPE Intensität einzelner Spektralbereiche aus 5 Messungen. Die Intensität einzelner Spektralbereiche wurde auf die Gesamtintensität ( $>420 \text{ nm}$ ) der entsprechenden Messung normiert.

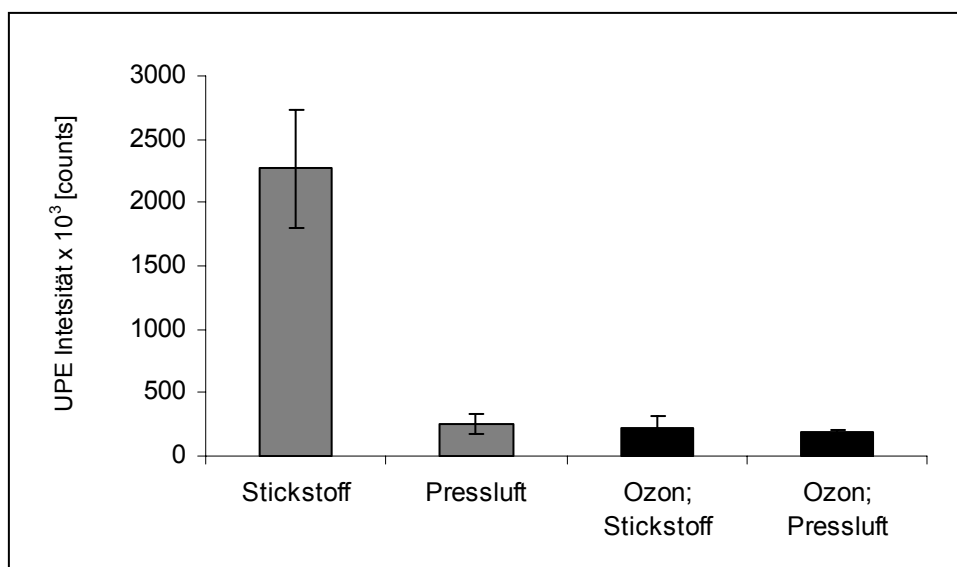


**Abb. 5.51:  $UPE_{UVA}$  unter  $N_2$ -Modus.** Die Messung wurde mit dem SRUPE-System im mobilen Modus durchgeführt. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriol-Lampe mit dem Filter WG 335 eingesetzt. Expositionsdauer 60 s,  $360 \text{ mJ/cm}^2$  UVA. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der UPE- Intensität ( $>420 \text{ nm}$ ) von 3 Hautstücken.



**Abb. 5.52: Spektrale Verteilung der UPE<sub>UVA</sub> unter N<sub>2</sub>-Modus.** Die Messung wurde mit dem SRUPE-System im mobilen Modus durchgeführt. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriell-Lampe mit dem WG 335 Filter eingesetzt. Expositionsdauer 60 s, 360,0 mJ / cm<sup>2</sup> UVA. Dargestellt sind Mittelwerte der relativen UPE Intensität einzelner Spektralbereiche aus 3 Messungen. Die Intensität einzelner Spektralbereiche wurde auf die Gesamtintensität (>420 nm) der entsprechenden Messung normiert.

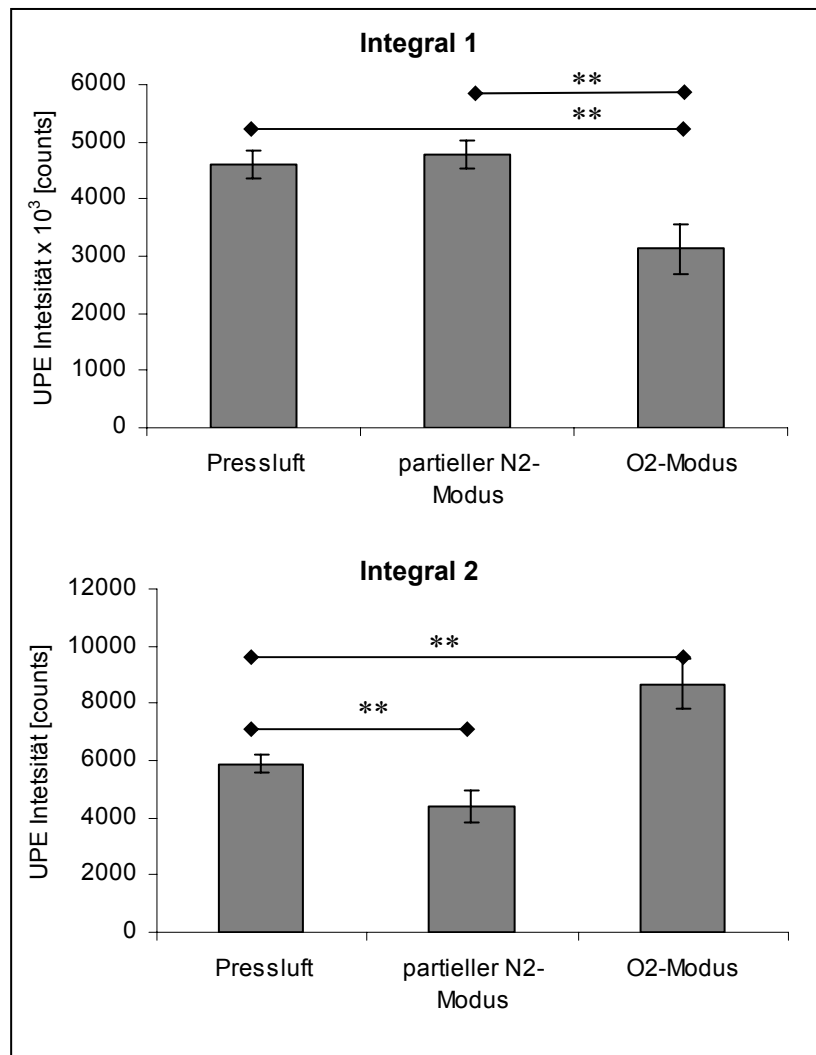
Als nächstes wurde untersucht, ob eine oberflächliche oxidative Modifikation der Hautbestandteile eine Auswirkung auf die Intensität der UPE<sub>UV</sub> zeigt. Dazu wurden einige Schweinehautstücke 4 Minuten lang mit Ozon (50 mg / Nm<sup>3</sup>) begast und nach einer Aklimatisierungsphase von 5 Minuten einer UPE-Messung unterzogen.



**Abb. 5.53: Einfluss einer Ozonvorbehandlung auf die Intensität der UPE<sub>UV</sub> unter N<sub>2</sub>-Modus bzw. unter Normalbedingungen (Pressluft).** Die Messung wurde mit dem SRUPE-System im mobilen Modus durchgeführt. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriell-Lampe ohne Filter eingesetzt. Expositionsdauer 30 s, 63,0 mJ / cm<sup>2</sup> UVB, 202,5 mJ / cm<sup>2</sup> UVA. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD der UPE- Intensität (>420 nm) von 5 Hautstücken.

Die drastische Zunahme der  $UPE_{UV}$ -Intensität unter  $N_2$ -Modus bleibt bei Hautstücken, die vorher mit Ozon behandelt wurden vollständig aus (Abb. 5.53, Stickstoff vs. Ozon; Stickstoff). Auf die  $UPE_{UV}$ -Intensität unter Normalbedingungen hat eine Ozonvorbehandlung fast keinen Einfluss (Abb. 5.53, Pressluft vs. Ozon; Pressluft).

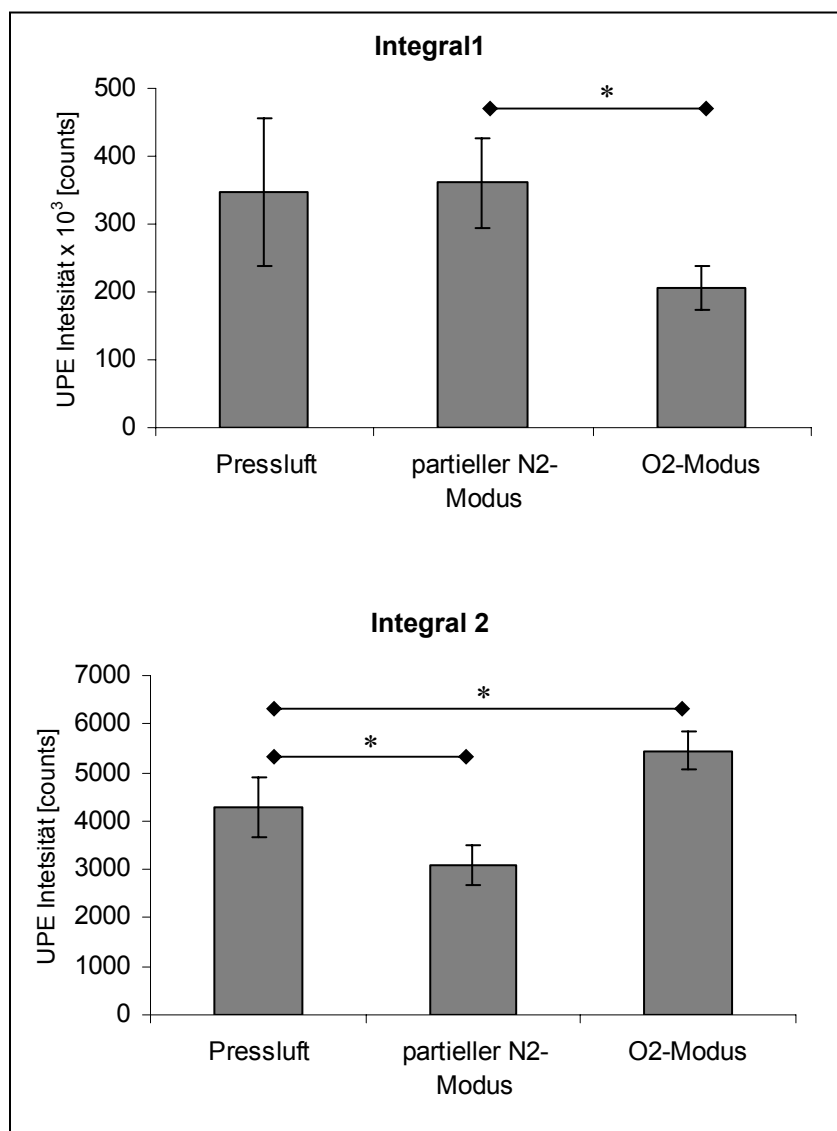
**Messungen unter  $O_2$ - bzw. partieller  $N_2$ -Modus:**



**Abb. 5.54:  $UPE_{UV}$  unter  $O_2$ - bzw. partieller  $N_2$ -Modus.** Die Messung wurde mit dem SRUPE-System im stationären Modus durchgeführt. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriell-Lampe ohne Filter eingesetzt. Expositionsdauer 60 s, 126,0 mJ / cm<sup>2</sup> UVB, 405,0 mJ / cm<sup>2</sup> UVA. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der UPE- Intensität von 3 Hautstücken.

Beim Integral 1 sinkt die  $UPE_{UV}$  bei der Messung unter  $O_2$ -Modus signifikant ab, während sie unter partieller  $N_2$ -Modus unverändert bleibt. Beim Integral 2 führt der partielle  $N_2$ -Modus zu einer signifikanten Abnahme der  $UPE_{UV}$ -Intensität, wohingegen der  $O_2$ -Modus zu einer Steigerung der UPE-Werte führt (Abb. 5.54).





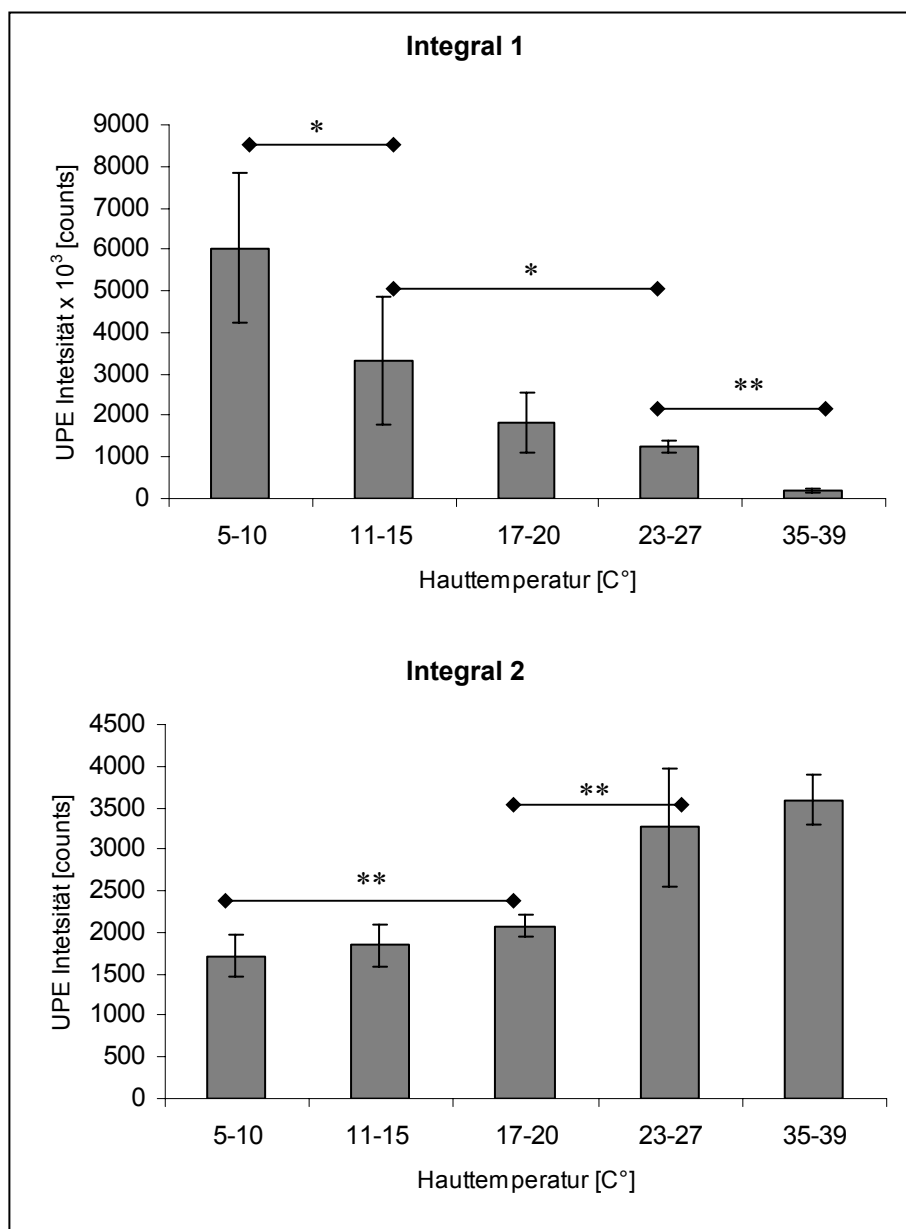
**Abb. 5.55:  $UPE_{UVA}$  unter  $O_2$ - bzw. partieller  $N_2$ -Modus.** Die Messung wurde mit dem SRUPE-System im stationären Modus durchgeführt. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriellampe mit dem Filter WG 335 eingesetzt. Expositionsdauer 60 s,  $360,0 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  UVA. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der UPE- Intensität von 3 Hautstücken.

Verglichen mit der Messung unter partieller  $N_2$ -Modus ist die  $UPE_{UVA}$ -Intensität unter  $O_2$ -Modus beim Integral 1 signifikant geringer. Beim Integral 2 führt der partielle  $N_2$ -Modus zu einer signifikanten Abnahme der  $UPE_{UVA}$ -Intensität, während unter  $O_2$ -Modus eine Steigerung der UPE-Werte beobachtet werden kann (Abb. 5.55).

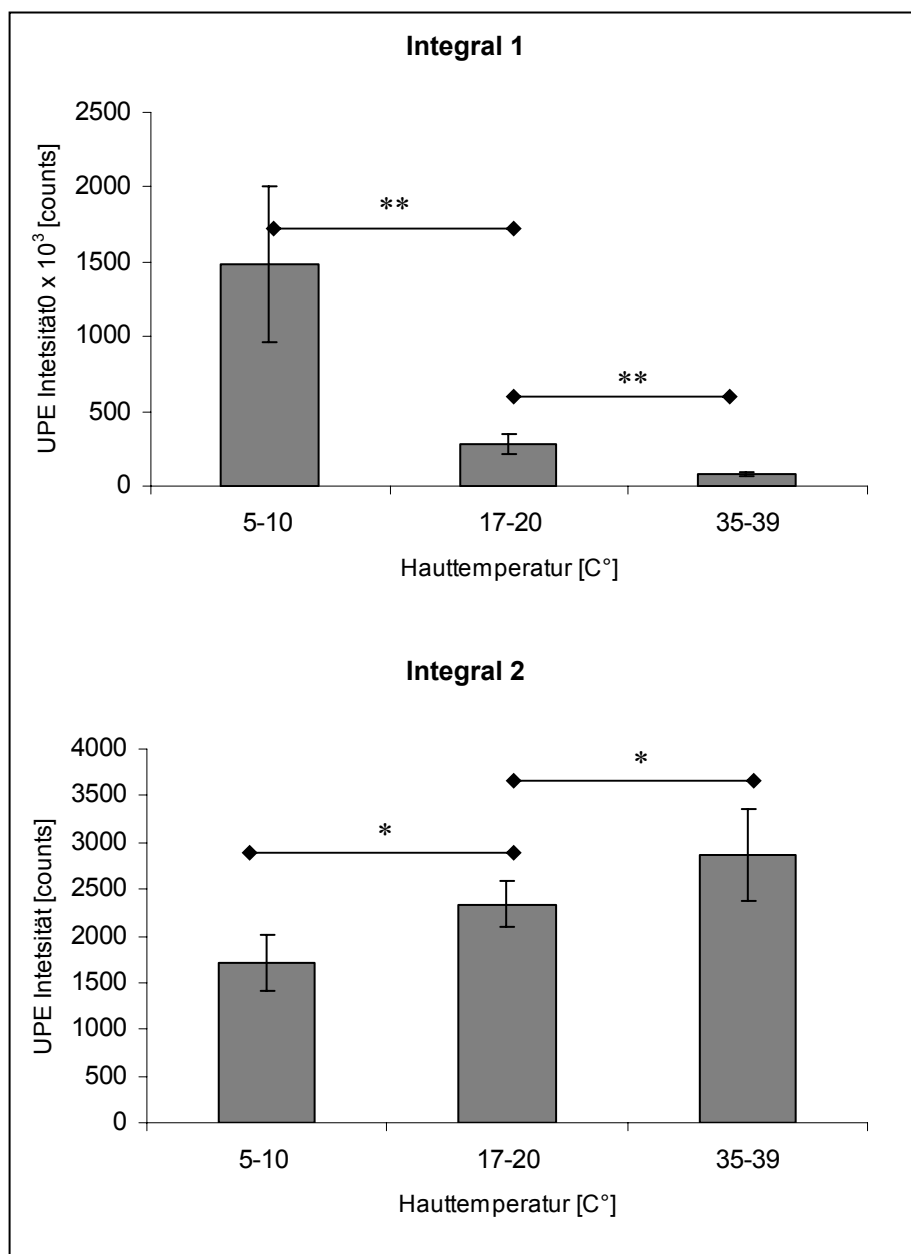
### 5.3.7 Einfluss von Hauttemperatur auf die $UPE_{UV/UVA}$

Die Einstellung einer bestimmten Temperatur erwies sich bei Schweinehaut als sehr schwierig. Künstliche Erwärmung oder Abkühlung führte zu einem sehr raschen Temperatenausgleich des Hautstückes mit der Umgebungstemperatur im Dunkelraum von ca. 20 °C. Der Einsatz einer Stahlküvette, die eine eingestellte Temperatur gegenüber der Raumtemperatur relativ konstant halten konnte, ermöglichte trotz der oben beschriebenen Schwierigkeiten die Durchführung einer temperaturabhängigen UPE-Messung. Dabei wurde die Schweinehaut zusammen mit der Stahlküvette erwärmt (Heizplatte) bzw. abgekühlt (Trockeneis). Die Temperatur wurde mit Hilfe eines Strahlungs-pyrometers auf der Schweinehautoberfläche vor und direkt nach der UPE-Messung aufgenommen. Es wurden nur die Schweinehautstücke ausgewertet, bei denen der Temperaturunterschied vor und nach der Messung weniger als 1 °C betrug. Obwohl die Stahlküvette eine relativ konstante Temperatureinstellung ermöglichte, war es trotzdem nicht machbar mit einer Heizplatte bzw. Trockeneis eine exakte Temperatur einzustellen. Aus diesem Grund können hier nur Aussagen über Temperaturbereiche von 3 – 5 °C getroffen werden. Für jeden Temperaturbereich wurden 4 – 6 Hautstücke vermessen.

Die Daten demonstrieren eindeutig den starken Einfluss der Hauttemperatur sowohl bei der  $UPE_{UV}$  (Abb. 5.56) als auch bei der  $UPE_{UVA}$  (Abb. 5.57). Auffällig ist zudem die unterschiedliche Wirkung einer Temperaturerhöhung im kinetischen Verlauf des UPE Signals. Beim Integral 1 ist eine massive Abnahme der  $UPE_{UV/UVA}$  mit steigender Hauttemperatur zu beobachten. Sie beträgt bei einer Temperaturerhöhung um ca. 28 °C (von 8 °C auf ca. 36 °C) über 90 % (Abb. 5.56 u. 5.57). Die Werte beim Integral 2 dagegen steigen im selben Temperaturbereich um ca. 100 % bei der  $UPE_{UV}$  und um ca. 70 % bei  $UPE_{UVA}$  (Abb. 5.56 u. 5.57). Die Werte für die spontane UPE (UPE ohne UV bzw. UVA Induktion) steigen zwar ebenfalls im oben genannten Temperaturbereich um 250 Counts (von ca. 300 auf ca. 550), können aber auf keinen Fall für die Erhöhung der  $UPE_{UV/UVA}$  Werte um über 1200 Counts beim Integral 2 verantwortlich sein.

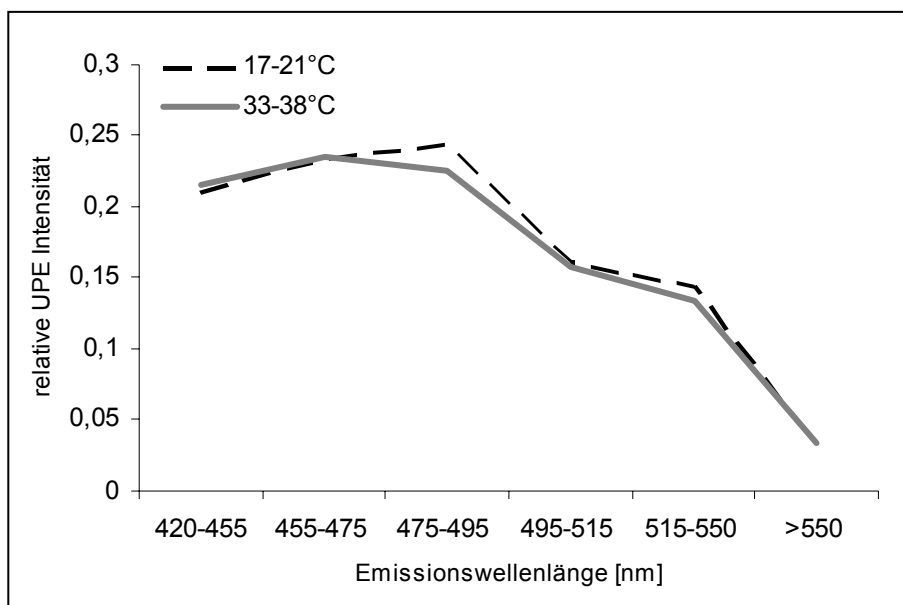


**Abb. 5.56: Einfluss von Hauttemperatur auf die  $UPE_{UV}$  beim integral 1 und 2.** Die Messung wurde mit dem SRUPE-System im stationären Modus durchgeführt. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriol-Lampe ohne Filter eingesetzt. Expositionsdauer 15 s,  $31,5 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  UVB,  $101,0 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  UVA. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der UPE- Intensität von 4 – 6 Hautstücken.



**Abb. 5.57: Einfluss von Hauttemperatur auf die  $UPE_{UVA}$  beim integral 1 und 2.** Die Messung wurde mit dem SRUPE-System im stationären Modus durchgeführt. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriol-Lampe mit dem Filter WG 335 eingesetzt. Expositionsdauer 15 s,  $88,5 \text{ mJ/cm}^2$  UVA. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der UPE- Intensität von 4–6 Hautstücken.

Zusätzlich zu den Intensitätsmessungen wurde die Abhängigkeit der spektralen Verteilung der  $UPE_{UV}$  von der Hauttemperatur untersucht.

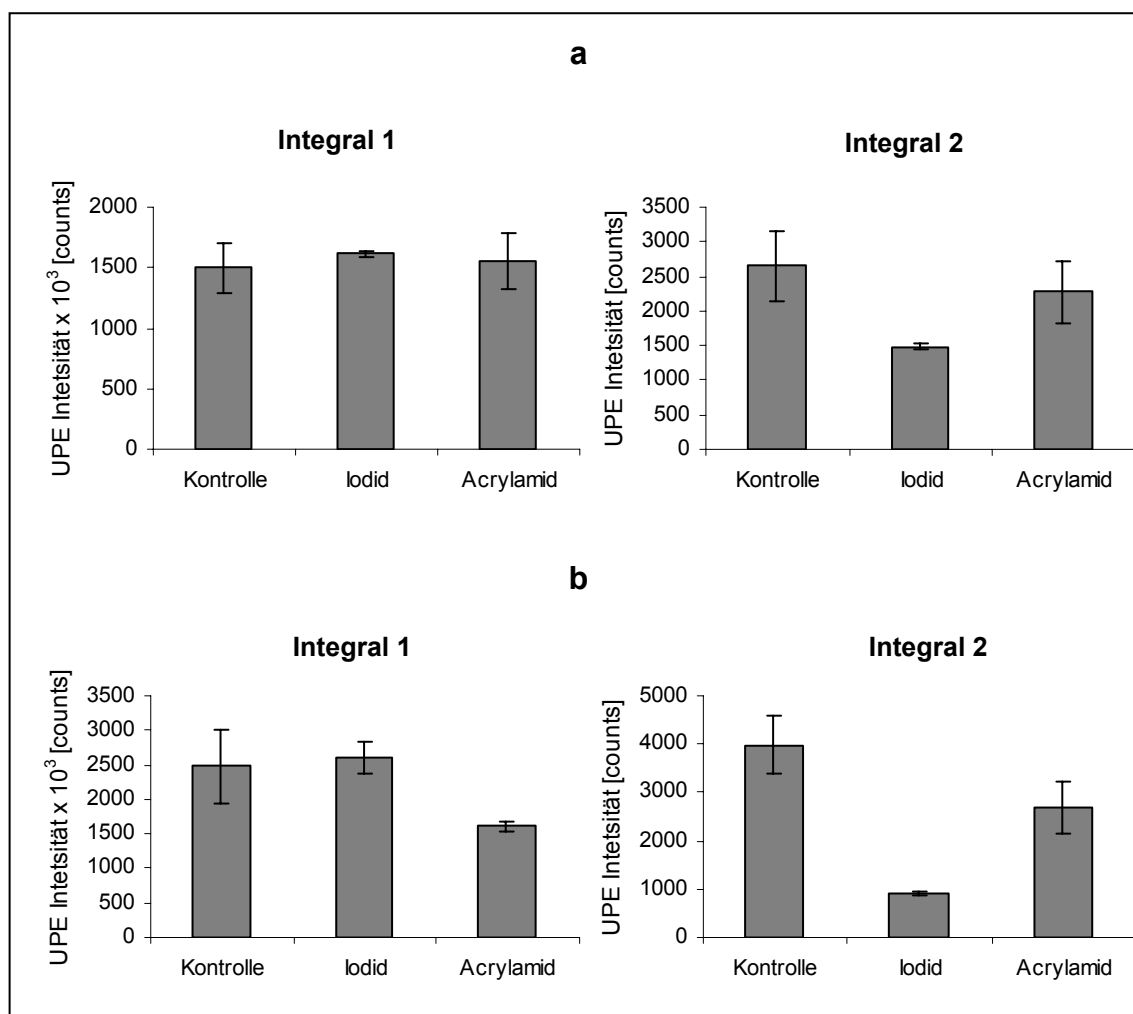


**Abb. 5.58: Einfluss von Hauttemperatur auf die spektrale Verteilung der  $UPE_{UV}$  beim Integral 1.** Die Messung wurde mit dem SRUPE-System im mobilen Modus durchgeführt. Als Bestrahlungsquelle wurde die Oriel-Lampe ohne Filter eingesetzt. Expositionsdauer 15 s,  $31,5 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  UVB,  $101,0 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  UVA. Dargestellt sind Mittelwerte der relativen UPE-Intensität einzelner Spektralbereiche aus 5 Messungen. Die Intensität einzelner Spektralbereiche wurde auf die Gesamtintensität ( $>420 \text{ nm}$ ) der entsprechenden Messung normiert.

Obwohl die Intensität der  $UPE_{UV}$  mit zunehmender Hauttemperatur stark abnimmt (Abb. 5.56), ist bei der spektralen Verteilung keine Temperaturabhängigkeit messbar.

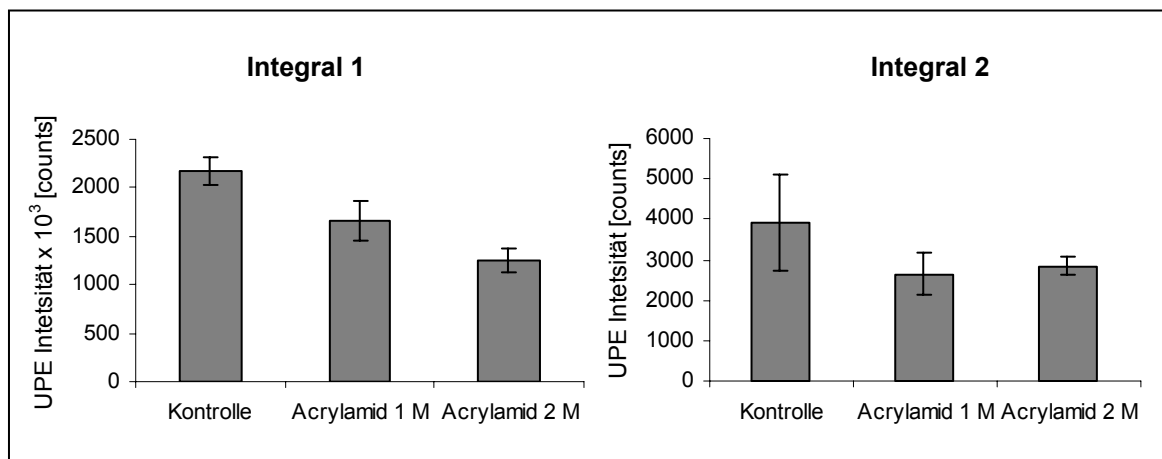
### 5.3.8 Einfluss von Phosphoreszenzlöscher (Quencher) auf die $UPE_{UV}$

Die Untersuchungen potentieller Einflussfaktoren haben besonders beim Integral 1 eine starke Abhängigkeit der  $UPE_{UV}$  von der Temperatur, Feuchtigkeit- und Sauerstoffgehalt der Haut gezeigt. Wie im Diskussionsteil dieser Arbeit näher erläutert wird, weisen die Auswirkungen dieser Einflussfaktoren auf die Beteiligung von Phosphoreszenzerscheinungen an der Gesamtintensität der  $UPE_{UV}$  hin. Um dies zu untersuchen, wurden aus der Literatur bekannte Phosphoreszenzlöscher wie Iodid und Acrylamid [ZELENT et al 1998; CIONI & STRAMBINI 2002; DI MURO et al 2002] eingesetzt. Während Iodid-Ionen aufgrund ihrer Ladung nur effizient Fluorophore an der polaren Proteinoberfläche quenchen können, erreichen neutrale Quenchemoleküle wie Acrylamid auch Fluorophore in unpolaren inneren Proteinregionen [DI MURO et al 2002].



**Abb. 5.59: Einfluss von Iodid und Acrylamid auf die  $UPE_{UV}$ .** a) Nach einer Einwirkzeit von einer Minute. b) Nach einer Einwirkzeit von 45 Minuten. Iodid und Acrylamid wurden in destilliertem Wasser zu einer Konzentration von 1 M gelöst und auf Schweinehaut appliziert ( $2,5 \mu\text{l} / \text{cm}^2$ ). Die Kontrollmessung erfolgte mit destilliertem Wasser ( $2,5 \mu\text{l} / \text{cm}^2$ ). Nach einer entsprechenden Einwirkzeit (1 min bzw. 45 min) wurde die behandelte Schweinehaut 30 s lang bestrahlt (Oriol-Lampe ohne Filter,  $57 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  UVB,  $201,7 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  UVA) und die  $UPE_{UV}$  mit dem SRUPE-System im mobilen Modus aufgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der UPE-Intensität von 3 Hautstücken.

Beim Integral 1 bewirkt nur die Applikation von Acrylamid eine Reduktion der  $UPE_{UV}$ -Intensität gegenüber der Kontrollmessung. Diese Wirkung ist jedoch erst nach einer längeren Einwirkzeit messbar (Abb. 5.59 a u. b). Beim Integral 2 wird die  $UPE_{UV}$  sowohl durch Iodid als auch durch Acrylamid reduziert. Das Ausmaß der Reduktion ist aber bei Iodid stärker und erhöht sich zusätzlich mit zunehmender Dauer der Einwirkzeit.



**Abb. 5.60: Einfluss von Acrylamid auf die  $UPE_{UV}$  in Abhängigkeit von der Einsatzkonzentration.** Acrylamid wurde in destilliertem Wasser zu einer Konzentration von 2 bzw. 1 M gelöst und auf Schweinehaut appliziert ( $2,5 \mu\text{l} / \text{cm}^2$ ). Die Kontrollmessung erfolgte mit destilliertem Wasser ( $2,5 \mu\text{l} / \text{cm}^2$ ) Nach einer Einwirkzeit von 45 Minuten wurde die behandelte Schweinehaut 30 s lang bestrahlt (Oriel-Lampe ohne Filter,  $57 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  UVB,  $201,7 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  UVA) und die  $UPE_{UV}$  mit dem SRUPE-System im mobilen Modus aufgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der UPE- Intensität von 3 Hautstücken.

Die reduzierende Wirkung von Acrylamid auf die  $UPE_{UV}$  ist beim Integral 1 abhängig von der Konzentration der applizierten Acrylamidlösung und fällt mit zunehmender Einsatzkonzentration stärker aus. Beim Integral 2 ist diese Konzentrationsabhängigkeit nicht messbar.

## 6 Diskussion

### 6.1 Stressinduzierte UPE auf der Haut

Bisher wurde die UPE-Messtechnik *in vivo* hauptsächlich zur Charakterisierung des UVA-induzierten oxidativen Stresses in der Haut eingesetzt (vgl. Kap. 3.3). Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgten *in vivo*-Messungen zeigen aber, dass der Einsatzbereich dieser Messtechnik auf die Untersuchung weiterer hautrelevanter Stressoren wie BPO und Ozon ausgeweitet werden kann.

BPO und Ozon induzieren ein UPE-Signal, welches gegenüber der spontanen UPE der Haut deutlich erhöht ist und dabei nicht auf der Eigenemission dieser Stressoren beruht (Kap. 3.1.1 u. 3.1.2). Die derzeitige Datenlage erlaubt zwar keine vollständige Aufklärung der Mechanismen und Reaktionsabläufe dieser UPE-Entstehung, weist jedoch stark auf die Beteiligung von Oxidationsreaktionen hin. Dafür sprechen zum einen Literaturdaten über den erhöhten Level oxidierter Hautbestandteile (Proteine und Lipide) nach Ozon- bzw. BPO-Exposition [THIELE et al 1997a; THIELE et al 1999; WEBER et al 2001] und zum anderen die Reduktion der  $UPE_{BPO/Ozon}$  durch topische Applikation von AOX (Abb. 5.1 u. 5.3).

Im Falle von BPO konnten AOX-haltige Prüfprodukte nur kurz nach der Anwendung (15 min) eine signifikante Reduktion der  $UPE_{BPO}$  bewirken. Lag die letzte Anwendung dagegen länger zurück (14 h), so war der Einfluss dieser Prüfprodukte nicht mehr signifikant nachweisbar (Abb. 5.1 u. 5.2).

Es ist davon auszugehen, dass die  $UPE_{BPO}$  hauptsächlich auf oxidative Prozesse an der Hautoberfläche beruht. Zumal die UPE-Messung unmittelbar (1min) nach der BPO-Applikation erfolgte und eine merkliche Penetration von BPO in tieferen Hautschichten innerhalb dieser kurzen Zeitspanne sehr unwahrscheinlich ist. Daher ist es einleuchtend, dass nur eine oberflächliche Anreicherung von AOX, wie es kurz nach einer Produktanwendung der Fall ist, eine Reduktion der Oxidationsrate an der Hautoberfläche und somit eine Absenkung der  $UPE_{BPO}$ -Intensität bewirken kann. Penetrieren dagegen AOX in Folge der längeren Einwirkzeit in tiefere Hautschichten oder werden durch Luftsauerstoff oxidiert, so sinkt ihre Konzentration an der Hautoberfläche und damit auch ihre Wirkung auf die  $UPE_{BPO}$ .

Bedingt durch den Messaufbau (vgl. 4.5.3) und die hohe Reaktivität von Ozon ist auch bei  $UPE_{Ozon}$  eher von einem "Oberflächensignal" auszugehen. Im Gegensatz



zur  $UPE_{BPO}$  bewirkte allerdings in der Ozon-Studie das Vitamin E-haltige Prüfprodukt trotz einer Einwirkzeit von ca. 14 h eine signifikante Reduktion der  $UPE_{Ozon}$  (Abb. 5.3). Aus anderen BDF internen *in vivo*-Studien ist bekannt, dass die topische Applikation von Vitamin C dagegen nach einer ähnlich langen Einwirkzeit nicht in der Lage ist die  $UPE_{Ozon}$ -Werte zu reduzieren. Es ist teilweise sogar eine Steigerung der  $UPE_{Ozon}$ -Intensität nach topischer Applikation von Vitamin C beobachtet worden. Diese unterschiedliche Langzeitwirkung der beiden Vitamine an der Hautoberfläche ist höchstwahrscheinlich auf die, verglichen mit Vitamin E, höhere Oxidationsempfindlichkeit von Vitamin C zurückzuführen. Vitamin C ist im sauren pH-Bereich ( $pH < 3$ ) und in Abwesenheit von katalytisch wirksamen Metallionen recht stabil. Bei pH-Werten über dem pKa-Wert von Vitamin C (4,2) und besonders in Anwesenheit von Übergangsmetallen wie z.B. Eisenionen nimmt die Stabilität von Vitamin C rapide ab [BUETTNER & JURKIEWICZ 1996]. Auf der Hautoberfläche sind freie Eisenionen (nicht proteingebunden) vorhanden [BISSETT et al 1991; TROMMER et al 2002] und der pH-Wert liegt meist zwischen 5 und 6 [HEYMANN 1994]. Somit sollte topisch appliziertes Vitamin C innerhalb weniger Stunden nahezu vollständig auf der Hautoberfläche oxidieren.

Wie anhand von Literaturdaten zu erwarten war [EVELSON et al 1997; SAUERMAN et al 1999; OU-YANG et al 2004] konnte *in vivo* nach Bestrahlung der Haut mit UVA ein gegenüber der spontanen UPE deutlich gesteigertes  $UPE_{UVA}$ -Signal gemessen werden. Die topische Applikation von Vitamin C erwies sich *in vivo* als sehr effektiv in der Reduktion der  $UPE_{UVA}$ . Diese Reduktion konnte konzentrationsabhängig nachgewiesen werden (Abb. 5.4 u. 5.5) und erreichte bei einer Vitamin C Konzentration von 1,25 % Werte von über 50% (Abb. 5.5). Die Fähigkeit von Vitamin C, die  $UPE_{UVA}$  zu reduzieren, wurde auch von anderen Arbeitsgruppen festgestellt [OU-YANG et al 2004]. Daneben existieren auch Daten, die unabhängig von der UPE-Messung den positiven Effekt von Vitamin C auf UV-induzierte Vorgänge in der Haut bestätigen. Dazu gehören z. B. eine signifikant geringere Bildung der so genannten *sunburn cells*<sup>\*</sup>, Schutz vor UVA-vermittelten phototoxischen Reaktionen (PUVA) [DARR et al 1992] sowie geringere Radikalbildung [JURKOVIC et al 2003].

Im Gegensatz zur  $UPE_{BPO}$  bzw.  $UPE_{Ozon}$  war Vitamin C bei der  $UPE_{UVA}$  auch nach einer Einwirkzeit von über 14 h wirksam (vgl. Kap. 5.1.3). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die unterschiedliche, vom Stressor abhängige Lokalisation der UPE-

---

\* Apoptotische Keratinozyten bedingt durch UV-Strahlung.

Generierung in der Haut. Während die  $UPE_{BPO}$  bzw.  $UPE_{Ozon}$  hauptsächlich an der Hautoberfläche generiert werden, sind bei der  $UPE_{UVA}$  auch tiefere Hautschichten maßgeblich an der Gesamtintensität des UPE-Signals beteiligt (Kap. 6.1.1).

Auf die Prozesse, die an der Generierung der  $UPE_{UVA}$  beteiligt sein könnten wird später im Rahmen der Diskussion über die Einflussfaktoren der  $UPE_{UV/UVA}$  näher eingegangen.

### **6.1.1 Durchlässigkeit der Haut für induziertes UPE-Signal und die Beteiligung tieferer Hautschichten an der $UPE_{UVA}$**

Die Untersuchungen an Schweinehaut *ex vivo* haben gezeigt, dass die Haut eine sehr gute Durchlässigkeit für das induzierte UPE-Signal aufweist (Abb. 5.7). Für die Einsatzmöglichkeit der UPE-Messtechnik bedeutet diese Tatsache, dass auch oxidative Prozesse in lebenden Zellschichten, die ein UPE-Signal generieren, an der Hautoberfläche mit dem UPE-Detektor erfasst werden können.

Zudem konnte anhand von Hautschnitten gezeigt werden, dass bei der  $UPE_{UVA}$  auch tiefere Hautschichten einen deutlich erkennbaren Anteil an der Gesamtintensität des UPE-Signals besitzen (Abb. 5.7). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die nach der Unterdrückung der arteriellen Sauerstoffversorgung der Haut eine Reduktion der  $UPE_{UVA}$  beobachtet haben. Sie haben diesen Effekt mit der Beteiligung innerer Hautschichten an der  $UPE_{UVA}$  erklärt, da die Schichten an der Hautoberfläche, unabhängig von der arteriellen Versorgung, vom atmosphärischen Sauerstoff versorgt werden ([OU-YANG et al 2004]).

### **6.1.2 Spektrale Verteilung der stressinduzierten UPE**

Auf der Schweinehaut konnte eine deutliche Abhängigkeit des Emissionsprofils der stressinduzierten UPE vom eingesetzten Stressor gezeigt werden (Abb. 5.8). Da die Stressoren keine Eigenemission aufwiesen können diese Unterschiede nur aufgrund unterschiedlicher Reaktionsmechanismen der UPE-Entstehung zustande gekommen sein. Die jetzige Datenlage und die Komplexität der Haut erlauben zurzeit keine genaue Zuordnung einzelner Spektralbereiche zu entsprechenden Reaktionen

## 6.2 Zusammenhang zwischen *in vitro* Oxidationsreaktionen und Emission von Photonen

### 6.2.1 Oxidative Modifikation von BSA

Die *in vitro* Untersuchungen zeigten, dass die Zugabe von ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zu einer BSA-Lösung mit Emission von Photonen verbunden ist (Abb. 5.9). Die Intensität der Photonenemission in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer wies in der ersten Reaktionsphase (ca. 40 s nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe) einen steilen Rückgang auf, gefolgt von einer zweiten Phase, welche durch einen langsamen und fast linearen Rückgang der Intensität gekennzeichnet war (Abb. 5.11).

Betrachtet man nun die Messungen des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Umsatzes, nach denen ein Verbrauch von  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Verlauf der Reaktion mit BSA (innerhalb von 10 min) nicht feststellbar war (vgl. Kap. 5.2.1.4), so kann die oben beschriebene Kinetik der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  nicht mit der Abnahme der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration erklärt werden. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass der kinetische Verlauf der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  auf mindestens zwei verschiedenen Reaktionen mit unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten beruht, die parallel ablaufen.

Aspée und Lissi, die die Kinetik der UPE nach der Reaktion von BSA und AS mit dem Radikalinitiator 2,2'-Azo-bis-(2-amidinopropan) (AAPH) untersuchten, kommen zu einer ähnlichen Schlussfolgerung. Sie haben durch den Einsatz von Trolox und Ebselen / GSH mindestens zwei Reaktionswege mit unterschiedlichen Kinetiken für die Entstehung emittierender Spezies postuliert. Für die erste schnelle Reaktion wurde die Beteiligung von freien Radikalen angenommen und somit die Empfindlichkeit gegenüber dem Radikalfänger Trolox erklärt. Diese Reaktion war für ca. 70 % der Emissionsausbeute verantwortlich. Die zweite Reaktion, die gegenüber Trolox unempfindlich war, wurde mit dem langsamen Zerfall von Oxidationsprodukten erklärt, die ohne Beteiligung von freien Radikalen unter Photonenemission abläuft. Die Unterdrückung dieser Reaktion durch die Zugabe von Ebselen / GSH und die höhere UPE-Intensität mit zunehmendem pH-Wert, haben die Autoren mit einer möglichen Beteiligung von Hydroperoxiden erklärt [ASPEE & LISSI 2000, 2001].

Auch wenn die Oxidation von BSA in dieser Arbeit durch den Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und nicht durch AAPH erfolgte, sind ähnliche Prozesse - gleichsam von Aspée und Lissi beschrieben - ebenso für die Entstehung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  denkbar. An der raschen Abnahme der hohen  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität in der ersten Reaktionsphase könnten Kombinations- und Disproportionierungsreaktionen von freien Radikalen

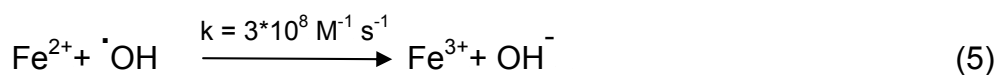
wie z.B. Alkoxy- und Peroxylradikale (Russell Mechanismus, Abb. 3.7) beteiligt sein [DE LA FUENTE & LISSI 1992; CILENTO & ADAM 1995]. In der zweiten Phase führen wahrscheinlich Proteinhydroperoxide, die als Zwischenprodukte im Oxidationsprozess von BSA entstehen, über langsame Zerfallprozesse zur Emission von Photonen [CILENTO & ADAM 1995]. Dies würde auch die Reduktion der  $UPE_{H_2O_2}$ -Intensität nach Absenken des pH-Wertes erklären (Abb. 5.13, [ASPEE & LISSI 2000]). Proteinhydroperoxide entstehen unter anderem durch die Reaktion von Proteinen mit  $\cdot OH$  und zerfallen mit einer Halbwertszeit von 1,5 Tagen (bei 20 °C) sehr langsam [GEBICKI & GEBICKI 1993]. Bei ihrem Zerfall werden freie Radikale gebildet, die ihrerseits die Oxidation weiterer Proteine initiieren können [DAVIES et al 1995].

Die Intensität der  $UPE_{H_2O_2}$  zeigte eine lineare Abhängigkeit von der BSA-Konzentration (1,25 – 5 % BSA), während die Erhöhung der  $H_2O_2$ -Konzentration eher einen logarithmischen Anstieg der  $UPE_{H_2O_2}$ -Intensität bewirkte (Abb. 5.10). Zusammen mit dem nicht detektierbaren Verbrauch von  $H_2O_2$  sprechen diese Daten dafür, dass einige wenige Gruppen im BSA für die UPE-generierenden Prozesse verantwortlich sind. Die Anzahl dieser Gruppen ist demnach proportional zu der BSA-Konzentration und bewirkt die lineare Abhängigkeit der  $UPE_{H_2O_2}$  von der BSA-Konzentration. Bei der oxidativen Umsetzung dieser Gruppen wird, aufgrund ihrer geringen Anzahl, wenig  $H_2O_2$  verbraucht. Der im Vergleich zu dem geringen Verbrauch erhöhte  $H_2O_2$ -Bedarf der  $UPE_{H_2O_2}$  deutet eine geringe Reaktivität dieser Gruppen an, so dass ein hoher Überschuss von  $H_2O_2$  notwendig ist, um die Oxidationsprozesse zu initialisieren.

Erwartungsgemäß führte die Zugabe von  $Fe^{2+}$ -Ionen zum Reaktionsansatz BSA +  $H_2O_2$  zu einer deutlichen Steigerung der  $UPE_{H_2O_2}$ -Intensität (Abb. 5.11 u. 5.17). Durch die Reaktion von  $Fe^{2+}$  mit  $H_2O_2$  (Fenton Reaktion, vgl. Kap. 3.2.1 Reaktion 4) entstehen hauptsächlich  $\cdot OH$  [MIZUTA et al 1997]. Daneben gibt es Hinweise auf die Bildung von Fe–O-Komplexen wie Oxoferryl- ( $Fe=O^{2+}$ ) und Peroxoferrylionen ( $Fe=O^{3+}$ ), die gegenüber organischen Verbindungen eine ähnlich hohe Reaktivität wie  $\cdot OH$  besitzen sollen [BIELSKI 1992; REINKE et al 1994]. Die Existenz dieser Verbindungen wird allerdings noch kontrovers diskutiert [GOLDSTEIN et al 1993; MIZUTA et al 1997]. Sowohl  $\cdot OH$  als auch die evtl. gebildeten Fe–O-Komplexe besitzen, verglichen mit  $H_2O_2$ , ein viel stärkeres Oxidationspotential ( $E^0 H_2O_2 = 0,320 V$ ,  $E^0 \cdot OH = 2,310 V$ ,  $E^0 Fe-O = 1,20 V$ ) [LARSON 1997; WELCH et al 2002] und führen zu einer gesteigerten Oxidationsrate bei BSA. Diese erhöht die Anzahl angeregter Zwischenstufen und als Folge die Emission von Photonen.

Da sich die Kinetik der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  nach Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen kaum verändert, ist die Erhöhung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität auf einen höheren Stoffumsatz ( $\text{H}_2\text{O}_2$  u. BSA) und nicht auf eine gesteigerte Reaktionsgeschwindigkeit zurückzuführen. Dies wird auch durch den erhöhten Verbrauch von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und die verstärkte Bildung von Carbonylverbindungen (CV) bestätigt (Abb. 5.14 u. 5.20).

Durch Variation der  $\text{Fe}^{2+}$ - bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration wurde deutlich, dass das molare Verhältnis von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen die Intensität der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  entscheidend beeinflusst. Bei einem deutlichen Überschuss von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen ( $c\{\text{Fe}^{2+}\} / c\{\text{H}_2\text{O}_2\} > 3 / 1$ ) wird die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität - verglichen mit den Reaktionsansätzen ohne Zusatz von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen - sogar gesenkt. Die Ursache ist höchstwahrscheinlich die Reduktion von  $\cdot\text{OH}$  durch überschüssige  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{OH}^-$ :



Diese Reaktion verläuft extrem schnell und konkurriert mit der Umsetzung von  $\cdot\text{OH}$  mit BSA.

Parallel zu den UPE-Messungen wurde der Gehalt von CV, als Marker für die oxidative Umsetzung von BSA, bestimmt. Insgesamt bestätigen die Daten den Zusammenhang zwischen der Emission von Photonen und oxidativer Modifikation von BSA (Abb. 5.19 u. 5.20). Der Eisenchelator Desferrioxamin setzt die katalytische Aktivität von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in der Fenton-Reaktion herab [WELCH et al 2002] und verringert folglich sowohl die Bildung von CV, wie auch die Emission von Photonen.

Bei der Erfassung der oxidativen Modifikation von BSA durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ , erwies sich die UPE-Messung gegenüber der CV-Bestimmung als wesentlich empfindlicher. Während eine signifikante Erhöhung der CV erst nach einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von 62 mM zu detektieren war (Reaktionszeit 10 min) (Abb. 5.19), konnte eine klare Steigerung der Photonenemission sofort nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe und schon ab einer Konzentration von 7,8 mM gemessen werden (Abb. 5.9).

Ein Grund für die hohe Empfindlichkeit der UPE-Messung ist wahrscheinlich die Tatsache, dass gerade die AS His, Cys und Trp, welche eine besonders hohe Oxidationsempfindlichkeit aufweisen [NAGY & FLOYD 1984; DAVIES et al 1987], hauptsächlich an der Emission von Photonen beteiligt sind (vgl. Kap. 6.2.2). Carbonylverbindungen entstehen hingegen aus größtenteils weniger oxidations-

empfindlichen AS wie Lys, Arg, Pro und Thr [SHACTER 2000; STADTMAN & LEVINE 2003].

Am Beispiel der oxidativen Modifikation von BSA durch  $H_2O_2$  lassen sich die Vor- und Nachteile der UPE-Messung gegenüber anderen Methoden sehr gut aufzeigen. Der größte Vorteil besteht in der direkten – ohne Zusatz von Reagenzien wie *Spin-Traps* bei ESR-Messungen – und sensitiven Erfassung oxidativer Prozesse ohne zeitaufwendige Nachbereitung der Proben, wie z.B bei der Bestimmung der CV. Die Erfassung kumulativer Schäden ist aufgrund der geringen Stabilität und Lebensdauer der emittierenden Spezies mittels UPE-Messtechnik nicht möglich. Hier bieten Methoden, welche einen stabilen Oxidationsmarker wie CV detektieren klare Vorteile.

### 6.2.2 Oxidative Modifikation von Aminosäuren

Von den untersuchten AS (vgl. Kap. 5.2.2) war ohne Zusatz von  $Fe^{2+}$ -Ionen nur Cys in der Lage nach Reaktion mit  $H_2O_2$  ein UPE-Signal zu generieren (Abb. 5.21 a). In Anbetracht der hohen  $UPE_{H_2O_2}$ -Intensität bei BSA (ohne  $Fe^{2+}$ -Zugabe), ist es unwahrscheinlich, dass ausschließlich die Oxidation von Cys für die Emission von Photonen verantwortlich ist. Für die Diskrepanz der Daten bezüglich der  $UPE_{H_2O_2}$ -Intensität bei den Messungen einzelner AS und BSA (ohne  $Fe^{2+}$ -Zugabe) sind folgende Ursachen denkbar:

- **Verunreinigung von BSA durch freie Fettsäuren.**

Barnard et al. haben die Beteiligung von Fettsäuren an der t-BOOH induzierten UPE vermutet und konnten durch den Einsatz von BSA mit unterschiedlichem Gehalt an freien Fettsäuren eine Abhängigkeit der UPE-Intensität vom Fettsäuregehalt in der Anfangsphase der Reaktion feststellen [BARNARD et al 1993]. Um den möglichen Einfluss von Fettsäuren auf die  $UPE_{H_2O_2}$  zu testen, wurden der BSA-Lösung bis zur maximalen Sättigung (ca. 0,03 %) Linolsäure bzw. Ölsäure zugesetzt. Eine Erhöhung der  $UPE_{H_2O_2}$  konnte aber nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

- **Verunreinigung von BSA durch katalytisch wirksame Metallionen**

Auch wenn eine Behandlung der BSA-Lösung über Nacht mit Chelex\* keine Änderung der  $UPE_{H_2O_2}$ -Intensität bewirkte (Daten nicht gezeigt), können

---

\* Chelex: Ionenaustauscher mit besonders hohen Affinität für zweiwertige Metallionen

evtl. Einflüsse von Metallionen, die an BSA gebunden bleiben, nicht ausgeschlossen werden. Zumal eine sehr geringe Konzentration von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen (0,7 ppm) bereits eine Steigerung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  verursachen kann (Abb. 5.17).

- **Synergetische Effekte durch Vernetzung mit anderen AS und Stabilisierung angeregter Zustände durch die räumliche Struktur von BSA**

Wie später noch genauer beschrieben wird, kann die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität von AS-Kombinationen um ein vielfaches höher als die Einzelintensität der entsprechenden AS sein. Zudem ist denkbar, dass durch die Oxidation von besonders reaktiven AS wie Cys weitere ROS ( $\text{ROO}^\cdot$ ,  $\text{RO}^\cdot$  und  $^\cdot\text{OH}$ ) generiert werden, die ihrerseits die Oxidation anderer AS initiieren.

In wie weit die Deaktivierung angeregter Spezies über Emission von Photonen oder über strahlungslose Übergänge erfolgt, wird nicht zuletzt durch die lokale Umgebung der Spezies beeinflusst. Zu den Einflussfaktoren zählen Beweglichkeit, Polarisierbarkeit und die Abschirmung gegenüber Quenchemolekülen. Die lokale Umgebung einer AS kann, eingebunden in einer Proteinstruktur, sich erheblich von der der freien AS in einer Lösung unterscheiden und somit die Quantenausbeute für die Emission von Photonen deutlich erhöhen [VANDERKOOI 1992].

Nach Zugaben von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zu den AS-Lösung konnte neben Cys zusätzlich bei His, Trp und Phe eine  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  registriert werden. Dabei zeigte His mit Abstand die höchste  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität gefolgt von Cys, Trp und Phe (Abb. 5.21 b). Bei den Untersuchungen von Oxidationsprodukten mittels MS konnte bei den Reaktionsansätzen ohne  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen nur bei Cys ein oxidativer Stoffumsatz festgestellt werden (Abb. 5.22 – 5.25). Es konnte – unter vollständigem Abbau von Cys – die Bildung von Cystin als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden (Abb. 5.22). Nach Zusatz von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen war neben Cys auch bei His die Bildung von Oxidationsprodukten zu messen, während bei Trp und Phe ein oxidativer Stoffumsatz anhand der MS-Spektren nicht messbar war (Abb. 5.22 – 5.25). Cys wurde auch in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen vollständig zu Cystin oxidiert, ohne dass weitere Oxidationsprodukte detektiert werden konnten (laut MS-Spektren Abb. 5.22). Als Oxidationsprodukte konnten nach Stoßfragmentierung bei His (in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$ ) 2-(1H-Imidazol-4-yl)-acetaldehyd und 2-(1H-Imidazol-4-yl)-acetaldehydoxim identifiziert werden (Abb. 5.28). Die Umsetzung von His läuft

dabei unter Freisetzung von  $\text{CO}_2$  ab (vgl. Kap. 5.2.2.3). Auf die Bildung weiterer His-Oxidationsprodukte wie 2-Oxo-histidin, Asparagin und Asparaginsäure, die in der Literatur nach metallkatalysierter Oxidation von His häufig beschrieben werden [STADTMAN 1998; SHACTER 2000], waren in den MS-Spektren keine Hinweise zu finden.

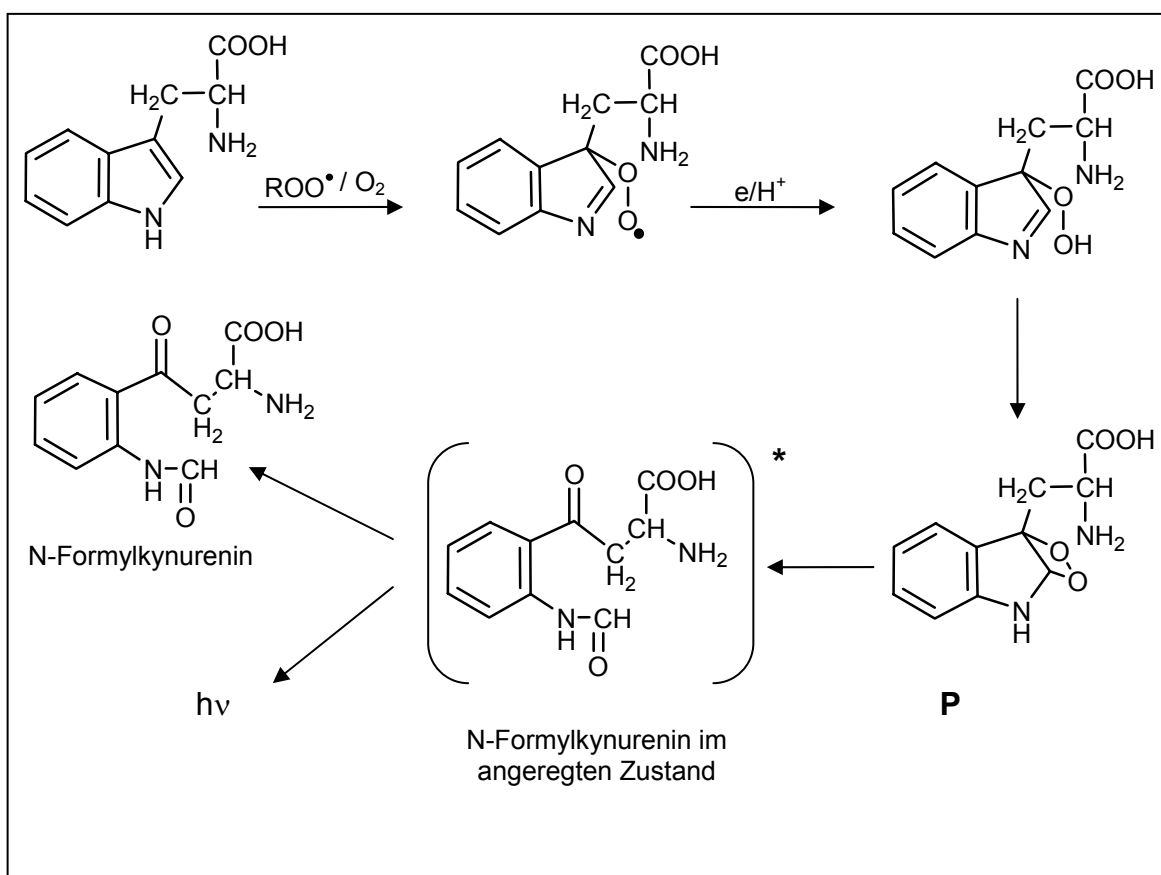
Diese Daten deuten daraufhin, dass die im Vergleich mit Trp und Phe hohe  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2^-}$  Intensität bei Cys und His auf dem höheren oxidativen Stoffumsatzes dieser AS beruht, während bei Trp und Phe eine analytisch kaum nachweisbare Reaktion für eine deutlich detektierbare Emission ausreichend ist. Dies wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass eine Halbierung der AS-Konzentration zu einem starken Rückgang der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2^-}$  Intensität bei Cys und His führt, während diese bei Trp nahezu unverändert bleibt (Daten nicht gezeigt).

Die spektrale Verteilung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  bei His deutet, aufgrund des hohen Anteils des UPE-Signals im kurzwelligen Bereich (420 – 455 nm, Abb. 5.31), auf die Entstehung von angeregten Carbonylverbindungen hin, die nach Literaturdaten im Bereich 380 – 460 nm emittieren.

Welche Spezies bei der Reaktion von Cys und Phe für die Emission von Photonen verantwortlich sind, kann nach derzeitiger Datenlage nicht geklärt werden. Dass Cys und Phe überhaupt eine deutliche Emission von Photonen zeigen, konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal belegt werden. Bei Untersuchungen mit anderen Oxidationsmitteln wie AAPH, HOCl, t-BOOH und  $\text{ONOO}^-$  konnte nach Reaktion mit Cys bzw. Phe keine erhöhte UPE festgestellt werden [BARNARD et al 1993; POLLET et al 1998; ASPEE & LISSI 2000, 2002]. Die Autoren wiesen stets auf die Rolle von Trp als nahezu einzige AS hin, die während oxidativer Umsetzung Photonen generiert.

Zur Generierung angeregter Spezies bei Trp wird die Bildung eines Endoperoxids (P, Abb. 6.1) als Zwischenprodukt allgemein akzeptiert [SLAWINSKI et al 1980; SAKURA 1992; ASPEE & LISSI 2000]. Durch Zerfall von P entsteht N-Formylkynurenin und im weiteren Verlauf auch Kynurenin. Tatsächlich sind N-Formylkynurenin und Kynurenin die häufigsten Reaktionsprodukte bei der metallkatalysierten Oxidation von Trp [STADTMAN 1998] und konnten auch in dieser Arbeit durch fluorimetrische Bestimmung nachgewiesen werden (Abb. 5.37).





**Abb. 6.1: Oxidativer Abbau von Trp unter Bildung angeregter Spezies**

Die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensitäten der untersuchten AS-Mischungen (in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$ ) waren in allen Fällen um ein vielfaches höher als die Summe der Einzelintensitäten entsprechender AS. Besonders die Kombination von Trp mit His wies im Vergleich zu den anderen AS-Kombinationen eine außergewöhnlich hohe  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität auf (Tab. 5.31). Die spektrale Analyse der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  bei den AS-Kombinationen deutet darauf hin, dass die deutliche Erhöhung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität gegenüber den Einzelintensitäten sowohl auf eine verstärkte Reaktionsrate – bei Cys / His- und Cys / Trp-Kombination – als auch auf Energietransfer – bei His / Trp – beruht.

Bei der Kombination von Cys mit His sollte Cys als Reduktionsmittel den Verbrauch von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in der Fenton-Reaktion – durch Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  – verringern und damit zu einer verstärkten Oxidation von His beitragen. Andererseits wird mit der His-Oxidation  $\text{CO}_2$  freigesetzt (vgl. 5.2.2.2), welches über die Bildung von  $\text{HCO}_3^-$  den oxidativen Abbau von Cys stimuliert (vgl. 6.2.2). Das UPE-Spektrum von der Cys / His-Kombination beinhaltet die Charakteristiken

beider Einzelspektren und weist dadurch auf eine verstärkte Reaktionsrate der beiden AS hin (Abb. 5.31).

Dass mit einer Kombination von Cys und Trp eine verstärkte Oxidationsrate von Cys durch Trp verursacht wird, ist aufgrund der geringen Reaktivität von Trp (vgl. Stoffumsatz von Trp, Abb. 5.24) eher unwahrscheinlich. Es ist eher davon auszugehen, dass Trp in Gegenwart Cys stärker oxidiert wird. Der im Vergleich zum UPE-Spektrum von Trp gesteigerte Anteil im Bereich 515 – 550 nm bei der Cys / Trp-Kombination (Abb. 5.31) weist auf eine erhöhte Oxidation von Trp hin. Ein ähnlicher Effekt konnte nach Zugabe von  $\text{HCO}_3^-$  – mit einer nachweislich höheren Oxidationsrate von Trp als Folge (Abb. 5.37) – zu einer Trp-Lösung beobachtet werden (Abb. 5.35).

Das UPE-Spektrum der Trp / His-Kombination zeigt einen ähnlichen Verlauf wie das von Trp. Der charakteristisch hohe Anteil im Bereich von 420 – 455 nm beim His-Spektrum ist im Kombinationsspektrum nicht mehr erkennbar. Hinweise auf eine erhöhte Oxidationsrate von Trp (hoher Anteil im Bereich 515 – 550 nm) sind im Kombinationsspektrum nicht vorhanden. Diese Daten weisen daraufhin, dass die hohe  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität der Trp / His-Kombination wohl auf einem Energie-transfer von angeregten Spezies aus der His-Oxidation auf das Trp-Molekül beruht, welches dadurch in einer angeregten Form überführt wird und bei seiner Deaktivierung Photonen emittiert (Typ-II Mechanismus, vgl. Kap. 3.4.2.2). Dies erklärt auch die Ähnlichkeit des Kombinationsspektrums zum Trp-Spektrum.

### 6.2.3 Einfluss von Puffersystemen auf die $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$

Puffersysteme haben besonders bei der metallkatalysierten Oxidation von organischen Substanzen einen wesentlichen Einfluss auf die Oxidationsrate [STADTMAN & BERLETT 1991; WELCH et al 2002]. Die *in vitro* Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnten diesen Einfluss bestätigen. Während der Einsatz von Phosphatpuffer bei den Reaktionsansätzen ohne  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen die  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität nicht wesentlich verändert hat, konnte bei den Ansätzen in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen eine starke Reduktion der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität beobachtet werden (Abb. 5.13). Vermutlich kommt es zwischen  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen und den Phosphationen zur Bildung eines Chelatkomplexes, welches die Reaktivität der  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in der Fenton-Reaktion herabsetzt.

Die Zugabe von  $\text{HCO}_3^-$  führte in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen sowohl bei BSA als auch bei den untersuchten AS (Trp, His, Cys und Phe) zu einer deutlichen Steigerung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität (Abb. 5.32 u. 5.34). Stadtman hat als Ursache

für die stimulierende Wirkung von  $\text{HCO}_3^-$  die Bildung eines katalytisch wirksamen Komplexes aus  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen im Verhältnis 3: 1 postuliert (Abb. 6.2).

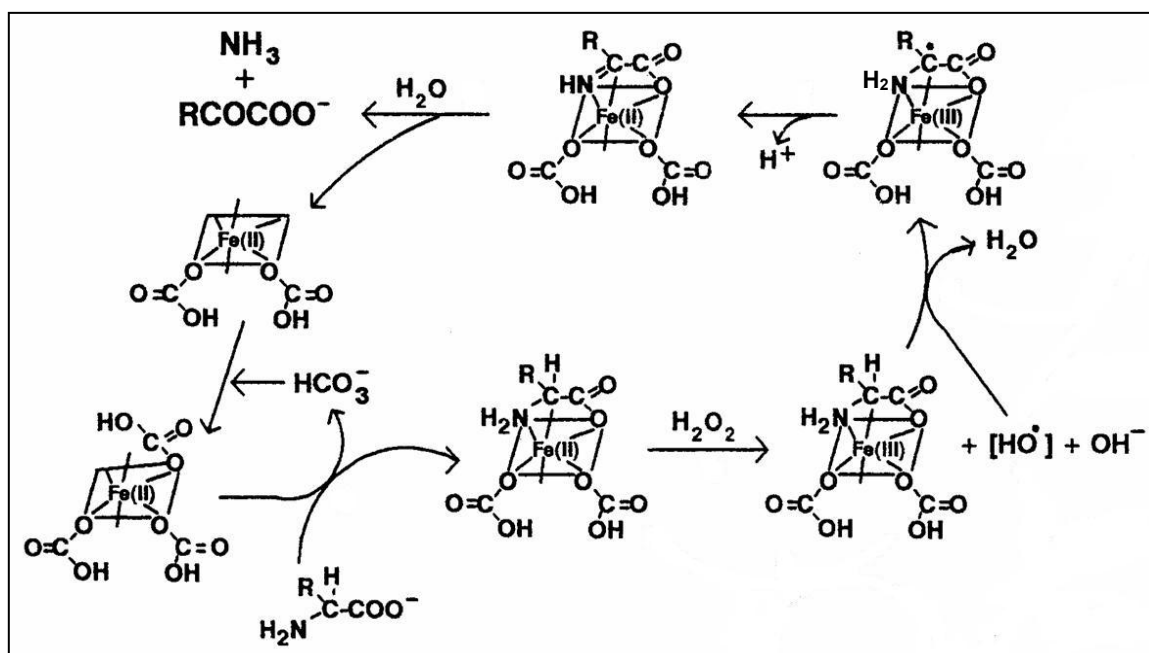


Abb. 6.2: Mechanismus der eisenkatalysierten Oxidation von AS in Gegenwart von  $\text{HCO}_3^-$  [Stadtman 1993].

In Gegenwart von AS wird aus dem  $\text{HCO}_3^- / \text{Fe}^{2+}$ -Komplex ein  $\text{HCO}_3^-$ -Anion durch ein AS-Molekül unter Bildung eines hoch reaktiven  $(\text{HCO}_3^-)_2\text{-Fe}^{2+}$ -AS-Komplexes ersetzt. Dieser Komplex wird durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  leicht oxidiert, wobei der korrespondierende  $\text{Fe}^{3+}$ -Komplex und  $\text{OH}^\bullet$  entstehen. Die in der direkten Nachbarschaft zu der AS gebildeten  $\text{OH}^\bullet$  abstrahieren ein Proton vom  $\alpha$ -Kohlenstoffatom der AS und generieren ein Alkylradikal. Durch Transfer eines Elektrons vom Alkylradikal wird unter Bildung eines Imins aus  $\text{Fe}^{3+}$  wieder  $\text{Fe}^{2+}$  regeneriert. Das Imin hydrolysiert spontan unter Freisetzung von  $\text{NH}_3$  und der Bildung der entsprechenden  $\alpha$ -Oxocarbonsäure [STADTMAN 1993].

Der verstärkende Effekt von  $\text{HCO}_3^-$  auf die metallkatalysierte Oxidation von AS ist möglicherweise für die im Vergleich zu den anderen AS ungewöhnliche hohe  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität nach Reaktion von His mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen verantwortlich (Abb. 5.21). Wie durch GC-Untersuchungen bewiesen werden konnte, wird bei der Oxidation von His durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  (in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$ )  $\text{CO}_2$  freigesetzt. Dieses bildet in Wasser  $\text{HCO}_3^-$  und erhöht dadurch die Oxidationsrate von His. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass nach Zugabe von  $\text{HCO}_3^-$  die relative Steigerung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$ -Intensität bei His im Vergleich zu den anderen AS am geringsten ausfiel (Abb. 5.34).

Die Zugabe von  $\text{HCO}_3^-$  führte bei Trp neben der massiven Intensitätssteigerung auch zu einer deutlichen Verschiebung der spektralen Verteilung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  (Abb. 5.35). Vermutlich wird das Spektrum der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  durch die verstärkte Bildung von Trp-Oxidationsprodukten (Kynurenin u. N-Formylkynurenin Abb. 5.37) beeinflusst. Die durch Zugabe von  $\text{HCO}_3^-$  verursachte Verschiebung im Spektrum der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  bei Trp könnte auch für die Verschiebung der spektralen Verteilung der  $\text{UPE}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  bei BSA nach Zugabe von  $\text{HCO}_3^-$  verantwortlich sein (Abb. 5.33).

### 6.3 Mechanismen der lichtinduzierten UPE-Generierung in der Haut

Durch Auswahl geeigneter Messfenster nach Bestrahlung (Integral 1 und Integral 2, vgl. Kap. 5.3.1) ist es gelungen hinsichtlich der Auswirkungen der untersuchten Einflussgrößen (Strahlungsdosis, Hautfeuchtigkeit, pH-Wert; Sauerstoffgehalt und Hauttemperatur) zwei unterschiedliche Prozesse der UPE-Generierung zu charakterisieren. Dabei wird die UPE-Intensität in der ersten Phase nach Bestrahlung (ca. 20 s) überwiegend durch Reaktionen mit einer schnellen Abklingkinetik dominiert, während im späteren Verlauf hauptsächlich langsamere Reaktionen an der Generierung des UPE-Signals beteiligt sind. Beim Integral 1 ist die Intensität der lichtinduzierten UPE sehr stark vom UVB-Anteil der Anregungsstrahlung abhängig. Das Blocken dieses Anteils reduzierte die Signalintensität um ca. 90 % (Abb. 5.40). Durch weitere Untersuchungen mit einem Monochromator konnte ein Maximum der UPE-Intensität (Integral 1) bei einer Anregungswellenlänge im Bereich zwischen 290 – 305 nm beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Beim Integral 2 dagegen ist der UVA-Anteil der Anregungsstrahlung für den größten Teil der UPE-Intensität verantwortlich.

Hinsichtlich der Bestrahlungsdosis bzw. – intensität konnten ebenfalls Unterschiede zwischen Integral 1 und Integral 2 beobachtet werden. Die UPE-Intensität ist bei Integral 1 vor allem von der Bestrahlungsintensität abhängig, während bei Integral 2 die Bestrahlungsdosis die Intensität des UPE-Signals bestimmt (vgl. Kap. 5.3.3).

Die Erhöhung der Hautfeuchtigkeit führte zu einer Reduktion der lichtinduzierten UPE-Intensität sowohl bei Integral 1 als auch bei Integral 2. Dieser Effekt war aber bei Integral 1 deutlich stärker ausgeprägt (Abb. 5.46). In einer *in vivo* Studie hat die Erhöhung der Hautfeuchtigkeit durch Applikation einer glycerinhaltigen Creme sowohl bei der  $UPE_{UV}$  als auch bei der  $UPE_{UVA}$  eine Reduktion der UPE-Intensität von ca. 50 % gegenüber vehikelbehandelten Arealen bewirkt (Abb. 5.47 u. 5.48).

Der größte Einfluss auf die Intensität der lichtinduzierten UPE konnte durch Variation des  $O_2$ -Gehaltes und der Hauttemperatur erzielt werden. Die komplett entgegengesetzte Wirkung dieser beiden Einflussgrößen hinsichtlich der UPE-Intensität bei Integral 1 und Integral 2 ist ein eindeutiger Beleg für die Verschiedenheit der UPE-generierenden Prozesse in den jeweiligen Phasen (Integral 1 u. Integral 2) nach der Bestrahlung. Beim Integral 1 wird die UPE-Intensität sowohl bei  $UPE_{UV}$  als auch bei  $UPE_{UVA}$  durch  $O_2$  stark gequenchet. Der

Entzug von Sauerstoff von der Hautoberfläche (durch  $N_2$ , vgl. Kap. 4.4.2) führte zu einem drastischen Anstieg der UPE-Intensität (Abb. 5.49 u. 5.51). Die spektrale Verteilung des UPE-Signals deutet daraufhin, dass dieser Anstieg unter  $N_2$ -Atmosphäre nicht mit einer Veränderung der UPE-generierenden Mechanismen verbunden ist (Abb. 5.50 u. 5.52). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der  $UPE_{UV}$ -Intensität unter  $N_2$ -Atmosphäre bei Hautstücken, die vorher mit Ozon behandelt wurden vollständig ausbleibt (Abb. 5.53, Stickstoff vs. Ozon; Stickstoff). Auf die  $UPE_{UV}$ -Intensität unter Normalbedingungen (20 %  $O_2$ -Anteil) hatte eine Ozonvorbehandlung jedoch fast keinen Einfluss (Abb. 5.53, Pressluft vs. Ozon; Pressluft). Das bedeutet, dass die Verstärkung der  $UPE_{UV}$ -Intensität unter  $N_2$ -Modus überwiegend durch oxidationsempfindliche Moleküle an der Hautoberfläche verursacht wird, so dass nach einer oxidativen Modifikation dieser Moleküle der verstärkende Effekt verloren geht. An der Generierung der  $UPE_{UV}$  unter Normalbedingungen sind jedoch mehrere Hautschichten nahezu gleichmäßig beteiligt. Daher wird durch eine oxidative Beschädigung der äußeren Hautschichten die Intensität der  $UPE_{UV}$  nicht maßgeblich beeinflusst.

Im Gegensatz zum Integral 1 führte die Erhöhung des  $O_2$ -Gehaltes beim Integral 2 zu einem signifikanten Anstieg der  $UPE_{UV}$  bzw.  $UPE_{UVA}$ .

Die Erhöhung der Hauttemperatur um ca. 28 °C (von 8 °C auf ca. 36 °C) bewirkte beim Integral 1 eine Abnahme der UPE-Intensität ( $UPE_{UV}$  u.  $UPE_{UVA}$ ) von ca. 90 %, während beim Integral 2 im selben Temperaturbereich die Werte der  $UPE_{UV}$  bzw.  $UPE_{UVA}$  um ca. 100 % anstiegen (5.56 u. 5.57). Die Abnahme der UPE-Intensität mit steigender Temperatur (Integral 1) verlief ohne Veränderung der spektralen Verteilung des UPE-Signals (Abb. 5.58). Dies lässt den Schluss zu, dass ähnlich wie beim  $O_2$ -Effekt sich die Mechanismen der UPE-Generierung beim Integral 1 durch Erhöhung der Hauttemperatur bzw. des  $O_2$ -Gehaltes nicht verändern, die emittierenden Spezies jedoch stark gequenchet werden.

Besonders die deutliche Auswirkung der Einflussgrößen Hautfeuchtigkeit, Hauttemperatur und  $O_2$ -Gehalt auf die Intensität der lichtinduzierten UPE ( $UPE_{UV}$  und  $UPE_{UVA}$ ) beim Integral 1 weist auf die Beteiligung von Phosphoreszenzerscheinungen hin. Solche langlebigen Phosphoreszenzerscheinungen bei Raumtemperatur sind hauptsächlich bei trp-haltigen Proteinen beobachtet worden [PAPP & VANDERKOOI 1989; GONNELLI & STRAMBINI 1995; TOLGYESI et al 1999]. Während die Phosphoreszenzlebenszeit ( $\tau_{pho}$ ) von freiem Tryptophan in Lösung nur ca. 20  $\mu s$  beträgt kann diese in Proteinen bis auf Sekunden ansteigen [BENT & HAYON 1975]. Interessanterweise wurden die längsten  $\tau_{pho}$  unter anderem bei Keratin

gemessen [GHIGGINI et al 1975; LEAVER 1978; PAPP & VANDERKOOI 1989], das bekanntlich ein Gerüstprotein der Epidermis darstellt. Die Intensität der Trp-Phosphoreszenz kann je nach Protein um sechs Größenordnungen variieren und ist innerhalb eines Proteins stark von der Proteinstruktur abhängig. Diese Tatsache wird bei der Untersuchung der Strukturveränderungen von Proteinen ausgenutzt [PAPP & VANDERKOOI 1989; GONNELLI & STRAMBINI 1995]. Eine Erhöhung des Wasseranteils [STRAMBINI & GABELLIERI 1984] und Temperaturerhöhung [TOLGYESI et al 1999] bewirken eine deutliche Reduktion der Trp-Phosphoreszenz-Intensität. Als Erklärung werden Veränderungen der Proteinstruktur verbunden mit einer besseren Zugänglichkeit der Trp-Moleküle für extrinsische Phosphoreszenzquencher wie  $O_2$  genannt [VANDERKOOI 1992].

Das Phosphoreszenzspektrum trp-haltiger Proteine ist durch ein Maximum zwischen 420 und 470 nm gefolgt von einer steil abfallenden Flanke Richtung 550 nm gekennzeichnet [GHIGGINI et al 1975; VANDERKOOI 1992]. Ein ähnlicher Verlauf ist auch beim Spektrum der  $UPE_{UV}$  von der Haut zu erkennen (Abb. 5.50 u. 5.58). Zusammen mit der Tatsache, dass die Intensität der  $UPE_{UV}$  (Integral 1) im Bereich des Absorptionsmaximums von Trp (290 – 305 nm) am stärksten ist, spricht dies für eine maßgebliche Beteiligung von Trp-Phosphoreszenz beim Integral 1 der  $UPE_{UV}$  hin.

Das Spektrum der  $UPE_{UVA}$  unterscheidet sich jedoch deutlich von dem der  $UPE_{UV}$  (Abb. 5.8). Die Wirkung der untersuchten Einflussgrößen (Hautfeuchtigkeit, Sauerstoffgehalt und Hauttemperatur) wiesen aber auch beim Integral 1 der  $UPE_{UVA}$  auf die Beteiligung von Phosphoreszenzerscheinungen hin. Möglicherweise sind für die Ausstrahlung von Phosphoreszenz nach UVA-Bestrahlung andere Chromophore als Trp verantwortlich. Zu den hauteigenen Chromophoren, die in der Lage sind UVA-Strahlung zu absorbieren gehören Protoporphyrin, Riboflavin Ubichinon und andere Co-Enzyme wie NADH und NADPH [DALLE CARBONARE & PATHAK 1992].

Die These, dass Phosphoreszenzerscheinungen eine wichtige Rolle bei der Intensität der lichtinduzierten UPE im Integral 1 spielen, konnte nicht zuletzt durch Einsatz von Phosphoreszenzlöschern unterstützt werden. Dabei konnte nur das ungeladene Acrylamid die Intensität der  $UPE_{UV}$  (Integral 1) konzentrationsabhängig reduzieren, während das geladene Iodid-Anion keinen Einfluss hatte (Abb. 5.59 u. 5.60). Dies spricht dafür, dass die Chromophore, die für die Phosphoreszenz nach UV-Bestrahlung der Haut verantwortlich sind (höchstwahrscheinlich Trp), in unpolaren inneren Proteinregionen verborgen sind

und durch geladene Moleküle wie Iodid-Anion nicht erreicht werden. Die Unzugänglichkeit der Chromophore würde auch die relativ lange  $\tau_{\text{pho}}$  erklären.

Dass Iodid-Anionen die Intensität der UPE<sub>UV</sub> im Integral 2 nahezu auf dem Niveau der Dunkelzählrate reduzieren, während sie auf die Intensität im Integral 1 keinen Einfluss haben (Abb. 5.59), unterstreicht noch einmal die Verschiedenheit der UPE-generierenden Prozesse in den jeweiligen Phasen (Integral 1 u. Integral 2) nach der Bestrahlung. Wie genau Iodid-Anionen die Prozesse der UPE-Generierung im Integral 2 unterbinden, kann zurzeit nur spekuliert werden. Möglicherweise verhindert der Abbau von Hydroperoxiden nach Reaktion 6 die Bildung emittierender Spezies, die normalerweise durch ihren Zerfall entstehen würden (vgl. Abb. 3.7).



Die Prozesse der lichtinduzierten UPE-Generierung können unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse und der Mechanismen der Photooxidation (vgl. Abb. 3.3) in einer vereinfachten Darstellung zusammengefasst werden (Abb. 6.3).

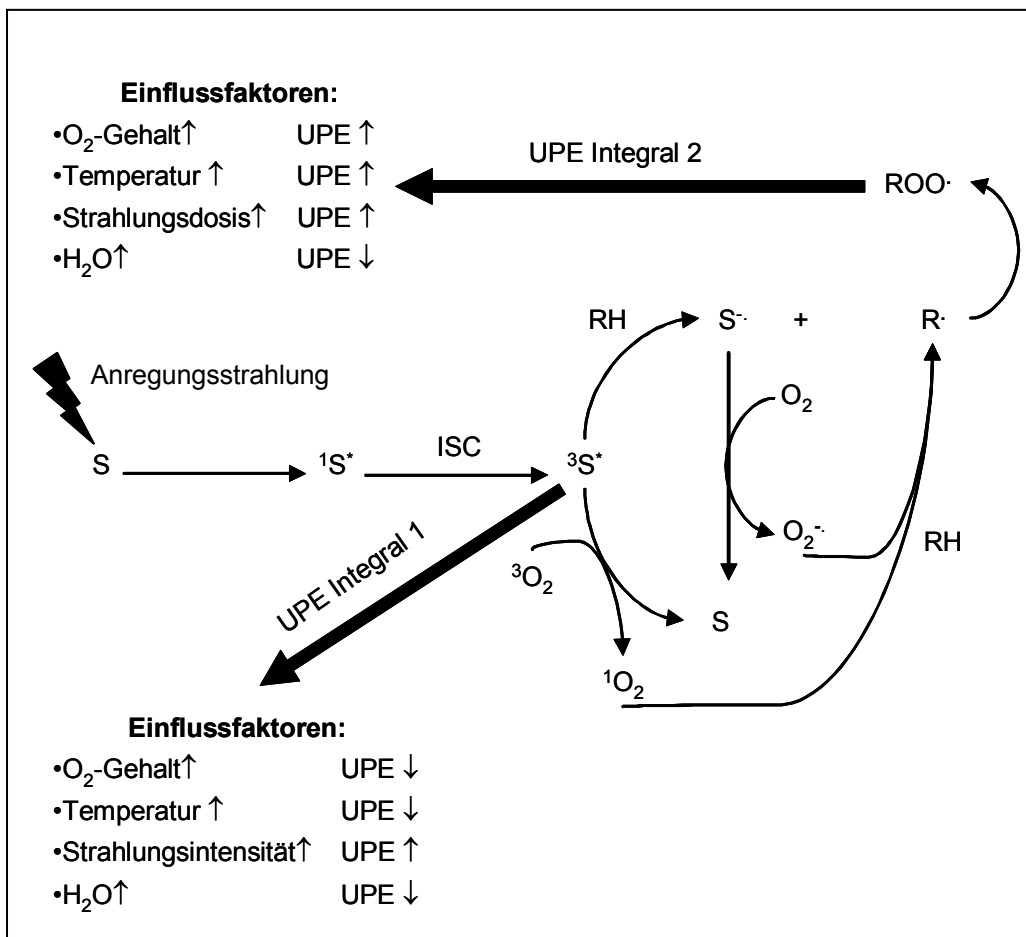
Am Anfang dieser Prozesse steht die Absorption von Lichtquanten durch geeignete endogene Chromophore. Die aktivierten Chromophore können über Elektronen- oder Energietransfer weitere angeregte Spezies generieren und somit die Oxidation von Biomolekülen initiieren (vgl. Kap. 3.2.3.2).

Einige Chromophore wie z. B. Trp besitzen eine relativ lange  $\tau_{\text{pho}}$  und sind an der UPE-Intensität in der ersten Phase nach Bestrahlung (Integral 1) maßgeblich beteiligt. Die Quantenausbeute der Phosphoreszenz und damit die Intensität der UPE hängen dabei stark von der Hautfeuchtigkeit, der Hauttemperatur und dem O<sub>2</sub>-Gehalt ab. Neben den genannten Einflussgrößen hängt die Intensität der UPE im Integral 1 von der Anzahl der sich im angeregten Zustand befindlichen Chromophore (kurz vor der UPE-Messung) ab. Diese Anzahl wird aufgrund der schnellen Abklingkinetik vorrangig durch die Intensität der Anregungsstrahlung bestimmt.

Die lichtinduzierte Oxidation von Biomolekülen (Photooxidation) kann unter anderem durch die Bildung von Hydroperoxiden zur Generierung emittierender Spezies führen. Diese Spezies sind höchstwahrscheinlich für die lichtinduzierte UPE im Integral 2 verantwortlich. Die Oxidationsrate von Biomolekülen und als Folge die Intensität der UPE (Integral 2) wird durch Temperaturerhöhung und



Erhöhung des O<sub>2</sub>-Gehaltes verstärkt. Da die Oxidationsprozesse im Vergleich zu den Phosphoreszenzerscheinungen im Integral 1 viel langsamer ablaufen, bestimmt hauptsächlich die Dosis der Anregungsstrahlung das Ausmaß dieser Prozesse.



**Abb. 6.3: Postulierte Mechanismen der lichtinduzierten UPE-Generierung in der Haut.** Die Pfeile demonstrieren die Änderung der untersuchten Versuchsparametern und die entsprechende Auswirkung auf die UPE-Intensität. ↑ Erhöhung. ↓ Erniedrigung. RH steht für Biomoleküle der Haut wie Proteine und Lipide, die nach oxidativer Modifikation angeregte Spezies generieren können.

## 7 Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren hat die Bedeutung von freien Radikalen und oxidativen Stresses auf die menschliche Haut in der dermatologischen und kosmetischen Forschung einen immer größeren Stellenwert errungen. Besonderes Interesse gilt dabei den Umweltnoxen wie UV-Strahlung, Ozon oder Luftverschmutzung, welche einen schädigenden Einfluss auf die Haut haben und den Möglichkeiten der Prävention durch Unterstützung hauteigener Schutzmechanismen.

*In vivo* Studien dieser Arbeit machen deutlich, dass sich die Messung der induzierten ultraschwachen Photonenemission (ultraweak photon emission, UPE) – eine einfache nicht invasive Technik – speziell zur Beurteilung der Wirksamkeit topisch applizierter Antioxidantien auf Humanhaut eignet. Es konnte sowohl eine deutliche Erhöhung der UPE nach Exposition der Haut mit relevanten Stressoren wie UVA Strahlung, Ozon und Benzolyperoxid beobachtet, als auch die Schutzwirkung von Antioxidation, über die Reduktion der induzierten UPE, aufgezeigt werden.

Untersuchungen an Schweinehaut zeigen zudem, dass auch oxidative Prozesse tieferer Hautschichten mit Hilfe der UPE-Messung erfasst werden können. So konnte eine Beteiligung innerer Hautschichten an der Gesamtintensität der UPE bei der UVA induzierten UPE ( $UPE_{UVA}$ ) nachgewiesen werden.

*In vitro* Untersuchungen zeigen eine klare Beziehung zwischen der Emission von Photonen und der oxidativen Modifikation von Bovinem Serum Albumin (BSA) bzw. einzelner Aminosäuren (AS). Dieser Befund ließ sich durch Erfassung des oxidativen Stoffumsatzes mittels der Bestimmung von Oxidationsmarkern – wie Carbonylverbindung und anderen Oxidationsprodukten – eindeutig nachweisen. Zusätzlich stellte sich die UPE-Messung als eine besonders empfindliche Methode zur Bestimmung oxidativer Prozesse heraus.

Für die Emission von Photonen nach oxidativer Modifikation von BSA ließen sich die Aminosäuren Phenylalanin, Cystein, Histidin und Tryptophan identifizieren. Untersuchungen der spektralen Verteilung der UPE zeigen, dass Tryptophan eine Schlüsselstellung einzunehmen scheint. Ein Vergleich des UPE-Spektrums einzelner Aminosäuren mit der von kombinierten Aminosäuren zeigt, dass Tryptophan nicht nur durch oxidative Modifikation, sondern möglicherweise auch über Energietransfer durch andere angeregte Spezies zur Emission von Photonen

in der Lage ist (Typ II-Mechanismus). Gerade für komplexere Systeme wie der Haut hätte dies zur Folge, dass spektrale Unterschiede möglicherweise durch Energietransfer auf Tryptophan nivelliert werden und somit eine Identifizierung einzelner Prozesse – aus der spektral aufgelösten UPE – nicht möglich ist.

UV-Strahlung, als wichtigster Einflussfaktor für die umweltbedingte Hautalterung, wurde hinsichtlich der UPE generierenden Mechanismen näher untersucht. Es stellte sich heraus, dass das Abklingverhalten der  $UPE_{UV}$  bzw. der  $UPE_{UVA}$  nicht einheitlich auf die untersuchten Einflussfaktoren (UV-Dosis, Sauerstoffgehalt, Hautfeuchtigkeit und Hauttemperatur) reagiert. Die Datenlage lässt den Schluss zu, dass die Abklingkurve der  $UPE_{UV}$  bzw. der  $UPE_{UVA}$  ein Summensignal – aus mehreren Reaktionen mit unterschiedlichen Kinetiken – darstellt. In Phase 1 der Abklingkurve (ca. 20 s nach Bestrahlung) dominieren höchstwahrscheinlich Phosphoreszenzerscheinungen, mit einer schnellen Abklingkinetik, die Intensität der UPE. In Phase 2 (ab der 20. Sekunde nach Bestrahlung) weist die Wirkung der untersuchten Einflussfaktoren auf die Beteiligung von Radikalprozessen hin, die mit einer deutlichen langsameren Abklingkinetik zur Generierung der UPE beitragen.

## Summary

In recent years, dermatological and cosmetic research has put increased emphasis on free radicals and oxidative stress on human skin. Special interest has been taken in environmental noxa such as UV-radiation, ozone or polluted air, which have a damaging impact on skin, and on the chances of prevention by supporting the skin's own protective mechanisms.

In vivo studies of this work clearly show that the measurement of the induced ultraweak photon emission (UPE) – a simple, non-invasive technique – is particularly suited to assess the effectiveness of topically applied antioxidants on human skin. A clear increase in UPE after exposition of the skin to relevant stressors such as UV- radiation, ozone and benzoyl peroxide and further, the protective effect of antioxidants, via a reduction of induced UPE, were observed.

Examinations of pig skin further demonstrate that oxidative processes of deeper skin layers can also be covered through UPE measurements. It was proven that inner skin layers are involved in the overall UPE intensity in the UVA induced UPE ( $UPE_{UVA}$ ).

In vitro examinations show that there is a clear connection between the emission of photons and the oxidative modification of bovine serum albumin (BSA) or individual amino acids respectively. This finding could be proven by measuring the oxidative conversion via a determination of oxidation markers such as carbonyl compounds and other oxidation products. Further, the UPE measurement was found to be a particularly sensitive method to ascertain oxidative processes.

For the emission of photons after oxidative modification of BSA the amino acids phenylalanine, cysteine, histidine and tryptophan could be identified. Examinations of the UPE's spectral distribution show that tryptophan seems to be a key factor. A comparison of the UPE spectrum of individual amino acids with the spectrum of combined amino acids shows that tryptophan is not only able to emit photons through oxidative modification, but also via energy transfer through other stimulated species (type II - mechanism). Particularly for complex systems such as skin this would mean that it might be possible to level spectral differences by energy transfer to tryptophan, and that therefore an identification of individual processes - within the spectrally dissolved UPE - is not possible.

UV-radiation, being the most important factor for an environmentally induced aging of the skin, was more closely examined as to its UPE generating mechanisms. It was found that the fall-off behaviour of  $UPE_{uv}$  or  $UPE_{UVA}$  respectively does not react uniformly to the influencing factors examined (UV dose, oxygen content, skin

moisture and skin temperature). The data found admit the conclusion that the UPE<sub>UV</sub>'s or UPE<sub>UVA</sub>'s fall-off curve forms a cumulative signal consisting of several reactions with differing kinetics. In phase 1 of the fall-off curve (approx. 20 s after exposure to radiation) phosphorescence phenomena, with a quick fall-off kinetic, probably dominate the UPE's intensity. In phase 2 (starting with the 20th second after exposure to radiation) the effect of the examined influencing factors suggests the participation of radical processes, which contribute to the generation of UPE with significantly slower fall-off kinetics.

## 8 Literaturverzeichnis

- ADAM, W., CILENTO, G.** (1982) Chemical and Biological Generation of Excited States. Academic Press, New York
- AFAQ, F., MUKHTAR, H.** (2001) Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. *J Photochem Photobiol B* **63**: 61-9
- AKASAKA, K., IJICHI, S., WATANABE, K., OHRUI, H., MEGURO, H.** (1992) High-performance liquid chromatography and post-column derivatization with diphenyl-1-pyrenylphosphine for fluorimetric determination of triacylglycerol hydroperoxides. *J Chromatogr* **596**: 197-202
- ALBRECHT, S., BRANDL, H., ADAM, W.** (1990) Chemilumineszenz-Reaktionen Anwendung in der klinischen Chemie, Biochemie und Medizin. *Chem Unserer Zeit* **24**: 227-38
- ALLEN, R. C.** (1982) Chemiluminescence and the study of phagocyte redox metabolism. *Adv Exp Med Biol* **141**: 411-21
- ALVAREZ, B., RADI, R.** (2003) Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* **25**: 295-311
- ARMSTRONG, B. K., KRICKER, A.** (2001) The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* **63**: 8-18
- ASPEE, A., LISSI, E. A.** (2000) Kinetics and mechanism of the chemiluminescence associated with the free radical-mediated oxidation of amino acids. *Luminescence* **15**: 273-82
- ASPEE, A., LISSI, E. A.** (2001) Kinetics of the chemiluminescence associated to the reaction between peroxy radicals and proteins. *J Protein Chem* **20**: 479-85
- ASPEE, A., LISSI, E. A.** (2002) Chemiluminescence associated with amino acid oxidation mediated by hypochlorous acid. *Luminescence* **17**: 158-64
- BÄR, F., BERNDT, A., DIMROTH, K.** (1985) ESR-Spektroskopie organischer Radikale. In: Schröder, B., Rudolph, J. (eds) *Physikalische Methoden in der Chemie*. VCH, Weinheim, pp 95-119
- BARB, W. G., BAXENDALE, J. H., GEORGE, P., HARGRAVE, K. R.** (1949) Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. *Nature* **163**: 692-4
- BARNARD, M. L., GURDIAN, S., DIEP, D., LADD, M., TURRENS, J. F.** (1993) Protein and amino acid oxidation is associated with increased chemiluminescence. *Arch Biochem Biophys* **300**: 651-6
- BENEDETTO, A. V.** (1998) The environment and skin aging. *Clin Dermatol* **16**: 129-39
- BENT, D. V., HAYON, E.** (1975) Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. III. Tryptophan. *J Am Chem Soc* **97**: 2612-9
- BIELSKI, B. H.** (1992) Reactivity of hypervalent iron with biological compounds. *Ann Neurol* **32 Suppl**: S28-32
- BISSETT, D. L., CHATTERJEE, R., HANNON, D. P.** (1991) Chronic ultraviolet radiation-induced increase in skin iron and the photoprotective effect of topically applied iron chelators. *Photochem Photobiol* **54**: 215-23

- BLATT, T., MUNDT, C., MUMMERT, C., MAKSIUK, T., WOLBER, R., KEYHANI, R., SCHREINER, V., HOPPE, U., SCHACHTSCHABEL, D. O., STAB, F.** (1999) Modulation of oxidative stresses in human aging skin. *Z Gerontol Geriatr* **32**: 83-8
- BRONAUGH, R. L., STEWART, R. F., CONGDON, E. R., GILES, A. L., JR.** (1982) Methods for in vitro percutaneous absorption studies. I. Comparison with in vivo results. *Toxicol Appl Pharmacol* **62**: 474-80
- BRULS, W. A., SLAPER, H., VAN DER LEUN, J. C., BERRENS, L.** (1984) Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photochem Photobiol* **40**: 485-94
- BUETTNER, G. R., JURKIEWICZ, B. A.** (1996) Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat Res* **145**: 532-41
- BUSS, H., CHAN, T. P., SLUIS, K. B., DOMIGAN, N. M., WINTERBOURN, C. C.** (1997) Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radicals Biol Med* **23**: 361-6
- CABRINI, L., PASQUALI, P., TADOLINI, B., SECHI, A. M., LANDI, L.** (1986) Antioxidant behaviour of ubiquinone and beta-carotene incorporated in model membranes. *Free Radical Res Commun* **2**: 85-92
- CAMPBELL, A. K.** (1988) Chemiluminescence, Principles and applications in biology and medicine. Ellis Horwood Ltd., Chichester, England
- CASSELL, R. H., FRIDOVICH, I.** (1975) The role of superoxide radical in the autoxidation of cytochrome c. *Biochemistry* **14**: 1866-8
- CATHCART, R., SCHWIERS, E., AMES, B. N.** (1983) Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem* **134**: 111-6
- CILENTO, G., ADAM, W.** (1995) From free radicals to electronically excited species. *Free Radicals Biol Med* **19**: 103-14
- CIONI, P., STRAMBINI, G. B.** (2002) Tryptophan phosphorescence and pressure effects on protein structure. *Biochim Biophys Acta* **1595**: 116-30
- COHEN, G.** (2000) Oxidative stress, mitochondrial respiration, and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* **899**: 112-20
- COHEN, G., HEIKKILA, R. E.** (1974) The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* **249**: 2447-52
- DALLE CARBONARE, M., PATHAK, M. A.** (1992) Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. *J Photochem Photobiol B* **14**: 105-24
- DARR, D., FRIDOVICH, I.** (1994) Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* **102**: 671-5
- DARR, D., COMBS, S., DUNSTON, S., MANNING, T., PINNELL, S.** (1992) Topical vitamin C protects porcine skin from ultraviolet radiation-induced damage. *Br J Dermatol* **127**: 247-53
- DARR, D. J.** (1988) The Biology of Oxygen Free Radicals and Their Relevance to Dermatology. In: Kligman, A. M., Takase, Y. (eds) *Cutaneous Aging*. University Of Tokyo Press, Tokyo, pp 415-33

- DAVIES, K. J., DELSIGNORE, M. E., LIN, S. W.** (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem* **262**: 9902-7
- DAVIES, M., TRUSCOTT, R.** (2001) Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. *J Photochem Photobiol B* **63**: 114-25
- DAVIES, M. J.** (2003) Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun* **305**: 761-70
- DAVIES, M. J., HAWKINS, C. L.** (2004) EPR spin trapping of protein radicals. *Free Radicals Biol Med* **36**: 1072-86
- DAVIES, M. J., FU, S., DEAN, R. T.** (1995) Protein hydroperoxides can give rise to reactive free radicals. *Biochem J* **305 ( Pt 2)**: 643-9
- DE GRUIJL, F. R.** (2002) Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **15**: 316-20
- DE LA FUENTE, J. R., LISSI, E. A.** (1992) Excited carbonyl formation in the combination and disproportionation of free radicals. *J Biolumin Chemilumin* **7**: 27-35
- DI MURO, P., BELTRAMINI, M., NIKOLOV, P., PETKOVA, I., SALVATO, B., RICCHELLI, F.** (2002) Fluorescence spectroscopy of the tryptophan microenvironment in *Carcinus aestuarii* hemocyanin. *Z Naturforsch [C]* **57**: 1084-91
- DIFFEY, B. L.** (2002) What is light? *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **18**: 68-74
- DREHER, F., GABARD, B., SCHWINDT, D. A., MAIBACH, H. I.** (1998) Topical melatonin in combination with vitamins E and C protects skin from ultraviolet-induced erythema: a human study in vivo. *Br J Dermatol* **139**: 332-9
- DROGE, W.** (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**: 47-95
- DUCHSTEIN, H. J., GURKA, H. J.** (1992) Activated species of oxygen: a challenge to modern pharmaceutical chemistry. *Arch Pharm (Weinheim)* **325**: 129-46
- DUMONT, A., HEHNER, S. P., HOFMANN, T. G., UEFFING, M., DROGE, W., SCHMITZ, M. L.** (1999) Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB. *Oncogene* **18**: 747-57
- EVELSON, P., ORDONEZ, C. P., LLESUY, S., BOVERIS, A.** (1997) Oxidative stress and in vivo chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. *J Photochem Photobiol B* **38**: 215-9
- FENTON, H. J. H.** (1894) The oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc* **10**: 157-8.
- FISHER, G. J., KANG, S., VARANI, J., BATA-CsORGO, Z., WAN, Y., DATTA, S., VOORHEES, J. J.** (2002) Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* **138**: 1462-70
- FOOTE, C.** (1988) Mechanistic Characterization of Photosensitized Reactions. In: Moreno, G., Pottier, R., Truscott, T. (eds) *Photosensitisation*, NATO ASI Series H: Cell Biology. Springer Verlag, Heidelberg, pp 125-44



- FORNIER DE VIOLET, P., VEYRET, B., VINCEDEAU, P., CARISTAN, A.** (1984) Chemiluminescence induced by oxidation of tryptophan by singlet oxygen and by hypochlorous acid. Implications in the luminescence emitted in phagocytosis. *Photochem Photobiol* **39**: 707-12
- FRANCIS, P. S., BARNETT, N. W., LEWIS, S. W., LIM, K. F.** (2004) Hypohalites and related oxidants as chemiluminescence reagents: a review. *Luminescence* **19**: 94-115
- FRIEDL, H. P., TILL, G. O., TRENTZ, O., WARD, P. A.** (1989) Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. *Am J Pathol* **135**: 203-17
- FUCHS, J., FREISLEBEN, H.-J., PACKER, L.** (1992) Antioxidants in the Skin. In: Mukhtar, H. (ed.) *Pharmacology of the Skin*, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, p 250
- FUCHS, J., HERRLING, T., GROTH, N.** (2001) Detection of free radicals in skin: a review of the literature and new developments. *Curr Probl Dermatol* **29**: 1-17
- FUCHS, J., HUFLEJT, M. E., ROTHFUSS, L. M., WILSON, D. S., CARCAMO, G., PACKER, L.** (1989) Acute effects of near ultraviolet and visible light on the cutaneous antioxidant defense system. *Photochem Photobiol* **50**: 739-44
- GEBICKI, S., GEBICKI, J. M.** (1993) Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. *Biochem J* **289 ( Pt 3)**: 743-9
- GEORGE, P.** (1947) Some experiments on the reactions of potassium superoxide in aqueous solutions. *Disc Faraday Soc* **2**: 196-205
- GHIGGINI, K. P., NICHOLLS, C. H., PAILTHORPE, M. T.** (1975) Excitation energy transfer in wool keratin. *Photochem Photobiol* **4**: 155-9
- GIROTTI, A. W.** (2001) Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J Photochem Photobiol B* **63**: 103-13
- GOLDSTEIN, S., MEYERSTEIN, D., CZAPSKI, G.** (1993) The Fenton reagents. *Free Radicals Biol Med* **15**: 435-45
- GONNELLI, M., STRAMBINI, G. B.** (1995) Phosphorescence lifetime of tryptophan in proteins. *Biochemistry* **34**: 13847-57
- GRAY, G. M., WHITE, R. J., WILLIAMS, R. H., YARDLEY, H. J.** (1982) Lipid composition of the superficial stratum corneum cells of pig epidermis. *Br J Dermatol* **106**: 59-63
- GUTMAN, M.** (1980) Electron flux through the mitochondrial ubiquinone. *Biochim Biophys Acta* **594**: 53-84
- HABER, F., WEISS, J.** (1934) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc Roy Soc* **147**: 332-51
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M.** (1981) Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Lett* **128**: 347-52
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C.** (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford

- HAMPTON, M. B., KETTLE, A. J., WINTERBOURN, C. C.** (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* **92**: 3007-17
- HANSON, K. M., CLEGG, R. M.** (2002) Observation and quantification of ultraviolet-induced reactive oxygen species in ex vivo human skin. *Photochem Photobiol* **76**: 57-63
- HAYWOOD, R., WARDMAN, P., SANDERS, R., LINGE, C.** (2003) Sunscreens inadequately protect against ultraviolet-A-induced free radicals in skin: implications for skin aging and melanoma? *J Invest Dermatol* **121**: 862-8
- HEINRICH, W., LANGE, P. M., STIRTZ, T., IANCU, C., HEIDEMANN, E.** (1971) Isolation and characterization of the large cyanogen bromide peptides from the alpha1- and alpha2-chains of pig skin collagen. *FEBS Lett* **16**: 63-7
- HERRLING, T., FUCHS, J., REHBERG, J., GROTH, N.** (2003) UV-induced free radicals in the skin detected by ESR spectroscopy and imaging using nitroxides. *Free Radicals Biol Med* **35**: 59-67
- HEYMANN, E.** (1994) *Haut, Haar und Kosmetik*. S. Hirzel, Stuttgart
- HUGHES, H., SMITH, C. V., HORNING, E. C., MITCHELL, J. R.** (1983) High-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry determination of specific lipid peroxidation products in vivo. *Anal Biochem* **130**: 431-6
- IGNARRO, L. J., KADOWITZ, P. J.** (1985) The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **25**: 171-91
- IGNARRO, L. J., WOOD, K. S., WOLIN, M. S.** (1984) Regulation of purified soluble guanylate cyclase by porphyrins and metalloporphyrins: a unifying concept. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* **17**: 267-74
- IVERSEN, S. A., CAWOOD, P., MADIGAN, M. J., LAWSON, A. M., DORMANDY, T. L.** (1984) Identification of a diene conjugated component of human lipid as octadeca-9,11-dienoic acid. *FEBS Lett* **171**: 320-4
- JUNG, E. G., MOLL, I.** (1995) *Dermatologie*. Thieme, Stuttgart
- JURKOVIC, P., SENTJURC, M., GASPERLIN, M., KRISTL, J., PECAR, S.** (2003) Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions. *Eur J Pharm Biopharm* **56**: 59-66
- KANITAKIS, J.** (2002) Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* **12**: 390-9; quiz 400-1
- KITAZAWA, M., IWASAKI, K.** (1999) Reduction of ultraviolet light-induced oxidative stress by amino acid-based iron chelators. *Biochim Biophys Acta* **1473**: 400-8
- KOHEN, R.** (1999) Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress--new approaches for their evaluation. *Biomed Pharmacother* **53**: 181-92
- KONISHI, H., TANAKA, M., TAKEMURA, Y., MATSUZAKI, H., ONO, Y., KIKKAWA, U., NISHIZUKA, Y.** (1997) Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11233-7
- KRUK, I., BOUNIAS, M.** (1992) Chemiluminescence from oxidation of formamidine amitraz. The generation of cytotoxic oxygen species and electronically excited compounds. *Sci Total Environ* **123-4**: 195-203

- KUMARATHASAN, P., VINCENT, R., GOEGAN, P., POTVIN, M., GUENETTE, J.** (2001) Hydroxyl radical adduct of 5-aminosalicylic acid: a potential marker of ozone-induced oxidative stress. *Biochem Cell Biol* **79**: 33-42
- LANGE, B. A., BUETTNER, G. R.** (2001) Electron paramagnetic resonance detection of free radicals in UV-irradiated human and mouse skin. *Curr Probl Dermatol* **29**: 18-25
- LARSON, R. A.** (1997) Naturally occurring antioxidants. Lewis Publishers, Boca Raton
- LEAVER, I. H.** (1978) On the room temperature phosphorescence of wool keratin. *Photochem Photobiol* **27**: 439-43
- LEHMANN, W. D.** (1996) Massenspektrometrie in der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- LENAZ, G.** (1998) Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Biochim Biophys Acta* **1366**: 53-67
- LISSI, E. A., ESCOBAR, J., PASCUAL, C., DEL CASTILLO, M., SCHMITT, T. H., DI MASCIO, P.** (1994) Visible chemiluminescence associated with the reaction between methemoglobin or oxyhemoglobin with hydrogen peroxide. *Photochem Photobiol* **60**: 405-11
- LLOYD, R. V., HANNA, P. M., MASON, R. P.** (1997) The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radicals Biol Med* **22**: 885-8
- MARNETT, L. J.** (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21**: 361-70
- MCCORD, J. M., FRIDOVICH, I.** (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**: 6049-55
- MEI, W. P.** (1994) About the nature of biophotons. *J Biol Syst* **2**: 25-42
- MERRILL, A. H., JR., LAMBETH, J. D., EDMONDSON, D. E., MCCORMICK, D. B.** (1981) Formation and mode of action of flavoproteins. *Annu Rev Nutr* **1**: 281-317
- MEYER, M., SCHRECK, R., BAEUERLE, P. A.** (1993) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *Embo J* **12**: 2005-15
- MEYER, W., SCHWARZ, R., NEURAND, K.** (1978) The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. *Curr Probl Dermatol* **7**: 39-52
- MICHIELS, C., REMACLE, J.** (1991) Cytotoxicity of linoleic acid peroxide, malondialdehyde and 4-hydroxynonenal towards human fibroblasts. *Toxicology* **66**: 225-34
- MISRA, H. P., FRIDOVICH, I.** (1972) The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* **247**: 6960-2
- MIZUTA, Y., MASUMIZU, T., KOHNO, M., MORI, A., PACKER, L.** (1997) Kinetic analysis of the Fenton reaction by ESR-spin trapping. *Biochem Mol Biol Int* **43**: 1107-20
- NAGY, I., FLOYD, R. A.** (1984) Hydroxyl free radical reactions with amino acids and proteins studied by electron spin resonance spectroscopy and spin-trapping. *Biochim Biophys Acta* **790**: 238-50
- NAKANO, M.** (1989) Low-level chemiluminescence during lipid peroxidations and enzymatic reactions. *J Biolumin Chemilumin* **4**: 231-40

- NIU, Q., MENDENHALL, G. D.** (1990) Structural effects on the yields of singlet molecular oxygen ( $^1\Delta_g O_2$ ) from alkylperoxyl radical recombination. *J Am Chem Soc* **112**: 1656-7
- NORVAL, M.** (2001) Effects of solar radiation on the human immune system. *J Photochem Photobiol B* **63**: 28-40
- OSTDAL, H., DAVIES, M. J., ANDERSEN, H. J.** (2002) Reaction between protein radicals and other biomolecules. *Free Radicals Biol Med* **33**: 201-9
- OU-YANG, H., STAMATAS, G., SALIOU, C., KOLLIAS, N.** (2004) A chemiluminescence study of UVA-induced oxidative stress in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* **122**: 1020-9
- PAPP, S., VANDERKOOI, J. M.** (1989) Tryptophan phosphorescence at room temperature as a tool to study protein structure and dynamics. *Photochem Photobiol* **49**: 775-84
- POLLET, E., MARTINEZ, J. A., METHA, B., WATTS, B. P., JR., TURRENS, J. F.** (1998) Role of tryptophan oxidation in peroxynitrite-dependent protein chemiluminescence. *Arch Biochem Biophys* **349**: 74-80
- POPP, F. A., NAGL, W., LI, K. H., SCHOLZ, W., WEINGARTNER, O., WOLF, R.** (1984) Biophoton emission. New evidence for coherence and DNA as source. *Cell Biophys* **6**: 33-52
- PRYOR, W. A.** (1994) Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radicals Biol Med* **17**: 451-65
- PRYOR, W. A., STANLEY, J. P., BLAIR, E.** (1976) Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids* **11**: 370-9
- PUGLIESE, P. T.** (1995) The skin, free radicals, and oxidative stress. *Dermatol Nurs* **7**: 361-9; quiz 370-1
- RAVANAT, J. L., DOUKI, T., CADET, J.** (2001) Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B* **63**: 88-102
- RAWLINGS, A. V.** (2003) Trends in stratum corneum research and the management of dry skin conditions. *Int J Cosmet Sci* **25**: 63-95
- REINKE, L. A., RAU, J. M., MCCAY, P. B.** (1994) Characteristics of an oxidant formed during iron (II) autoxidation. *Free Radicals Biol Med* **16**: 485-92
- RIPPKE, F., WENDT, G., BOHNSACK, K., DORSCHNER, A., STAB, F., HOLZLE, E., MOLL, I.** (2001) Results of photoprovocation and field studies on the efficacy of a novel topically applied antioxidant in polymorphous light eruption. *J Dermatol Treat* **12**: 3-8
- SAKURA, S.** (1992) Chemiluminescence of tryptophan enhanced by electrochemical energy. *Electrochimica Acta* **37**: 2731-5
- SANDER, C. S., CHANG, H., HAMM, F., ELSNER, P., THIELE, J. J.** (2004) Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol* **43**: 326-35
- SANDER, C. S., CHANG, H., SALZMANN, S., MULLER, C. S., EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S., ELSNER, P., THIELE, J. J.** (2002) Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* **118**: 618-25

- SARAN, M., MICHEL, C., STETTMAIER, K., BORS, W.** (2000) Arguments against the significance of the Fenton reaction contributing to signal pathways under in vivo conditions. *Free Radical Res* **33**: 567-79
- SARIAHMETOGLU, M., WHEATLEY, R. A., CAKICI, I., KANZIK, I., TOWNSHEND, A.** (2003) Flow Injection Analysis for Monitoring Antioxidant Effects on Luminol Chemiluminescence of Reactive Oxygen Species. *Anal Lett* **36**: 749-66
- SAUERMAN, G., MEI, W. P., HOPPE, U., STAB, F.** (1999) Ultraweak photon emission of human skin in vivo: influence of topically applied antioxidants on human skin. *Methods Enzymol* **300**: 419-28
- SCHNACKENBERG, C. G.** (2002) Oxygen radicals in cardiovascular-renal disease. *Curr Opin Pharmacol* **2**: 121-5
- SCHRECK, R., RIEBER, P., BAEUERLE, P. A.** (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J* **10**: 2247-58
- SHACTER, E.** (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* **32**: 307-26
- SHINDO, Y., WITT, E., HAN, D., PACKER, L.** (1994a) Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. *J Invest Dermatol* **102**: 470-5
- SHINDO, Y., WITT, E., HAN, D., EPSTEIN, W., PACKER, L.** (1994b) Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J Invest Dermatol* **102**: 122-4
- SIMON, G. A., MAIBACH, H. I.** (2000) The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **13**: 229-34
- SLATER, A. F., STEFAN, C., NOBEL, I., VAN DEN DOBBELSTEEN, D. J., ORRENIUS, S.** (1995) Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol Lett* **82-83**: 149-53
- SLAWINSKA, D., SLAWINSKI, J.** (1985) Low-level luminescence from biological objects. In: Burr, J. G. (ed.) *Clinical and biological analysis chemi- and bioluminescence*. Marcel dekker, New York Basel, pp 495-531
- SLAWINSKI, U., ELBANOWSKI, M., SLAWINSKA, D.** (1980) Spectral characteristics and mechanism of chemiluminescence from tryptophan solutions induced by UV-irradiation. *Photochem Photobiol* **32**: 253-60
- SMITH, M. A., PERRY, G., RICHEY, P. L., SAYRE, L. M., ANDERSON, V. E., BEAL, M. F., KOWALL, N.** (1996) Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* **382**: 120-1
- SMITH, M. A., SAYRE, L. M., ANDERSON, V. E., HARRIS, P. L., BEAL, M. F., KOWALL, N., PERRY, G.** (1998) Cytochemical demonstration of oxidative damage in Alzheimer disease by immunochemical enhancement of the carbonyl reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J Histochem Cytochem* **46**: 731-5
- SONGKRO, S., PURWO, Y., BECKET, G., RADES, T.** (2003) Investigation of newborn pig skin as an in vitro animal model for transdermal drug delivery. *STP Pharma Sci* **13**: 133-9
- SOTER, N. A.** (1990) Acute effects of ultraviolet radiation on the skin. *Semin Dermatol* **9**: 11-5

- STADTMAN, E. R.** (1993) Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* **62**: 797-821
- STADTMAN, E. R.** (1998) Free Radical Mediated Oxidation of Proteins. In: Oezben, T. (ed.) *Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants: Pathological and Physiological Significance*. Plenum Press, New York, pp 51-64
- STADTMAN, E. R.** (2001) Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* **928**: 22-38
- STADTMAN, E. R., BERLETT, B. S.** (1991) Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J Biol Chem* **266**: 17201-11
- STADTMAN, E. R., LEVINE, R. L.** (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* **25**: 207-18
- STRAMBINI, G. B., GABELLIERI, E.** (1984) Intrinsic phosphorescence from proteins in the solid state. *Photochem Photobiol* **39**: 725-9
- STROH, K.** (2004) In: *Bodennahes Ozon*. Bayerisches Landesamt für Umweltschutz
- SULLIVAN, T. P., EAGLSTEIN, W. H., DAVIS, S. C., MERTZ, P.** (2001) The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen* **9**: 66-76
- THIELE, J. J.** (2001) Oxidative targets in the stratum corneum. A new basis for antioxidative strategies. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **14 Suppl 1**: 87-91
- THIELE, J. J., PODDA, M., PACKER, L.** (1997a) Tropospheric ozone: an emerging environmental stress to skin. *Biol Chem* **378**: 1299-305
- THIELE, J. J., DREHER, F., PACKER, L.** (2000) Antioxidant defense systems in skin. In: Elsner, P., Maibach, H. (eds) *Cosmeceuticals – Drugs vs. Cosmetics*. Marcel Dekker, New York, Basel, pp 145-87
- THIELE, J. J., HSIEH, S. N., BRIVIBA, K., SIES, H.** (1999) Protein oxidation in human stratum corneum: susceptibility of keratins to oxidation in vitro and presence of a keratin oxidation gradient in vivo. *J Invest Dermatol* **113**: 335-9
- THIELE, J. J., TRABER, M. G., POLEFKA, T. G., CROSS, C. E., PACKER, L.** (1997b) Ozone-exposure depletes vitamin E and induces lipid peroxidation in murine stratum corneum. *J Invest Dermatol* **108**: 753-7
- TIMMINS, G. S., DOS SANTOS, R. E., WHITWOOD, A. C., CATALANI, L. H., DI MASCIO, P., GILBERT, B. C., BECHARA, E. J.** (1997) Lipid peroxidation-dependent chemiluminescence from the cyclization of alkylperoxyl radicals to dioxetane radical intermediates. *Chem Res Toxicol* **10**: 1090-6
- TOLGYESI, F., ULLRICH, B., FIDY, J.** (1999) Tryptophan phosphorescence signals characteristic changes in protein dynamics at physiological temperatures. *Biochim Biophys Acta* **1435**: 1-6
- TORINUKI, W., KUMAI, N., MIURA, T., SEIJI, M.** (1982) Chemiluminescence of UV-irradiated linolenic acid and squalene. *Tohoku J Exp Med* **136**: 135-40
- TROMMER, H., BOTTCHE, R., POPPL, A., HOENTSCHE, J., WARTEWIG, S., NEUBERT, R. H.** (2002) Role of ascorbic acid in stratum corneum lipid models exposed to UV irradiation. *Pharm Res* **19**: 982-90

- VANDERKOOI, J. M.** (1992) Tryptophan Phosphorescence from Proteins at Room Temperature. In: Lakowicz, J. R. (ed.) Topics in Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York, pp 113-36
- VLADIMIROV, Y. A., ROSHCUPKIN, D. I., FESENKO, E. E.** (1970) Photochemical reactions in amino acid residues and inactivation of enzymes during U.V.-irradiation. A review. *Photochem Photobiol* **11**: 227-46
- VOET, D., VOET, J. G., PRATT, C. W.** (2002) Lehrbuch der Biochemie. WILEY-VCH, Weinheim
- WATTS, B. P., JR., BARNARD, M., TURRENS, J. F.** (1995) Peroxynitrite-dependent chemiluminescence of amino acids, proteins, and intact cells. *Arch Biochem Biophys* **317**: 324-30
- WEBER, S. U., HAN, N., PACKER, L.** (2001) Ozone: an emerging oxidative stressor to skin. *Curr Probl Dermatol* **29**: 52-61
- WELCH, K. D., DAVIS, T. Z., AUST, S. D.** (2002) Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffers, ligands, and chelators. *Arch Biochem Biophys* **397**: 360-9
- WELLS, W. W., JUNG, C.-H.** (1997) Regeneration of Vitamin C. In: Packer, L., Fuchs, J. (eds) Antioxidants in Health and Disease Series. Marcel Dekker, INC, Basel, pp 109-122
- WENK, J., BRENNISEN, P., MEEWES, C., WLASCHEK, M., PETERS, T., BLAUDSCHUN, R., MA, W., KUHR, L., SCHNEIDER, L., SCHARFFETTER-KOCHANER, K.** (2001) UV-induced oxidative stress and photoaging. *Curr Probl Dermatol* **29**: 83-94
- WLASCHEK, M., TANTCHEVA-POOR, I., NADERI, L., MA, W., SCHNEIDER, L. A., RAZI-WOLF, Z., SCHULLER, J., SCHARFFETTER-KOCHANER, K.** (2001) Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B* **63**: 41-51
- WOLLINA, U., BERGER, U., MAHRLE, G.** (1991) Immunohistochemistry of porcine skin. *Acta Histochem* **90**: 87-91
- WONDRAK, G. T., ROBERTS, M. J., CERVANTES-LAUREAN, D., JACOBSON, M. K., JACOBSON, E. L.** (2003) Proteins of the extracellular matrix are sensitizers of photo-oxidative stress in human skin cells. *J Invest Dermatol* **121**: 578-86
- WRIGHT, A., BUBB, W. A., HAWKINS, C. L., DAVIES, M. J.** (2002) Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. *Photochem Photobiol* **76**: 35-46
- YASUI, H., SAKURAI, H.** (2000) Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. *Biochem Biophys Res Commun* **269**: 131-6
- YOUNG, A. R.** (1997) Chromophores in human skin. *Phys Med Biol* **42**: 789-802
- ZELENT, B., KUSBA, J., GRZYCZYNSKI, I., JOHNSON, M. L., LAKOWICZ, J. R.** (1998) Time-resolved and steady-state fluorescence quenching of N-acetyl-L-tryptophanamide by acrylamide and iodide. *Biophys Chem* **73**: 53-75

## 9 Anhang

### 9.1 Chemikalien- und Gefahrstoffanhang

| <i>Substanz</i>                     | <i>Hersteller</i> | <i>R- und S-Sätze</i>                               | <i>Gefahren-<br/>symbole</i> |
|-------------------------------------|-------------------|---|------------------------------|
| Acrylamid                           | Merck             | R: 45-46-20/21-25-36/38-43-48/23/24/25-62, S: 53-45 | T                            |
| Ammonium-Eisen(II)sulfat-Hexahydrat | Sigma             | R: 36/37/38, S: 26-36                               | Xi                           |
| BSA                                 | Merck             |   |                              |
| Desferrioxamin-Mesylat              | Sigma             | S: 22-24/25   |                              |
| di-Natriumhydrogenphosphat          | Merck             |   |                              |
| DL- $\alpha$ -Tocopherol            | Merck             |   |                              |
| Glycerin                            | Merck             |   |                              |
| Kaliumiodid                         | Merck             |   |                              |
| L-Ascorbinsäure                     | Merck             |   |                              |
| L-Cystein                           | Sigma             | R: 22   | Xn                           |
| L-Glutaminsäure                     | Sigma             |   |                              |
| L-Histidin                          | Sigma             |   |                              |
| L-Lysin                             | Sigma             |   |                              |
| L-Methionin                         | Sigma             |   |                              |
| L-Phenylalanin                      | Sigma             |   |                              |
| L-Prolin                            | Sigma             |   |                              |
| L-Threonin                          | Sigma             |   |                              |
| L-Tryptophan                        | Sigma             |   |                              |
| Natriumhydrogencarbonat             | Merck             |   |                              |
| Wasserstoffperoxid 30%              | Sigma             | R: 34, S: 3-26-36/37/39-45                          | C                            |



## **9.2 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

Untersuchung oxidativer Prozesse anhand induzierter ultraschwacher  
Photonenemission

Anwendung für dermatologische und kosmetische Fragestellungen

selbstständig, ohne unzulässige Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde. Alle Ausführungen, die wörtlich oder sinngemäß übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Diese Arbeit ist oder war nicht im In- oder Ausland in gleicher oder ähnlicher Form Gegenstand eines anderen Prüfungs- oder Promotionsverfahrens.

Hamburg, den 16.05.2005

Faryar Khabiri

### 9.3 Lebenslauf

**Persönliche Daten:**

|                       |                                |
|-----------------------|--------------------------------|
| Name                  | Faryar Khabiri                 |
| Anschrift             | Flassheide 44<br>22525 Hamburg |
| Geburtsdatum und -ort | 14.07.1975 in Teheran          |
| Familienstand         | ledig                          |
| Staatsangehörigkeit   | deutsch                        |

**Schulbildung:**

|             |                                       |
|-------------|---------------------------------------|
| 1981 – 1986 | Grundschule Sorousheh Azadi Teheran   |
| 1986 – 1988 | Hauptschule Wahlstedt                 |
| 1988 – 1989 | Realschule Wahlstedt                  |
| 1990 – 1994 | Gymnasium Dahlmansschule Bad Segeberg |
| 1994 – 1995 | Bramfeld Gymnasium Hamburg            |
| Juni 1995   | Abitur                                |

**Universität:**

|                            |  |
|----------------------------|--|
| 1995 – 2001                | Studium der Pharmazie an der Uni Hamburg   |
| Oktober 1995 – März 1998   | Grundstudium und erstes Staatsexamen   |
| April 1998 – November 1999 | Hauptstudium und zweites Staatsexamen  |
| November 1999 – April 2000 | 1. Teil des Praktischen Jahres im Berufsgenossenschaftlichen Unfallkrankenhaus Hamburg   |
| Mai 2000 – November 2000   | 2. Teil des Praktischen Jahres in der Apollo Apotheke Hamburg  |
| Februar 2001               | Drittes Staatsexamen   |
| Februar 2001 bis Juli 2004 | Dissertation an der Universität Hamburg, Fachbereich Pharmazie, Arbeitskreis Prof. Dr. H.- J. Duchstein, in Kooperation mit der Firma Beiersdorf AG Hamburg, Abteilung Forschung |
| Seit März 2005             | Grundwehrdienst als Stabsapotheker   |