

**Bestimmung von Stickstoffmonoxid und Kohlendioxid
auf humaner Haut *in vivo***

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

aus dem
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
– Abteilung Lebensmittelchemie –
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ilka Vogel
aus Hamburg

Hamburg 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1998 bis August 2001 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie, der Universität Hamburg in Kooperation mit der Beiersdorf AG Hamburg, Abteilung Analytische Forschung, angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart
2. Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Duchstein

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Oktober 2001

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart für die Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Duchstein danke ich für die Übernahme des Korreferats und das weit darüber hinausgehende Interesse an meiner Arbeit.

Bei Herrn Dr. K.-P. Wittern und Herrn Dr. U. Hintze bedanke ich mich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit bei der Beiersdorf AG Hamburg, Abteilung Analytische Forschung.

Herrn Dr. W. Mei danke ich sehr herzlich für die engagierte Betreuung auf Unternehmensseite und die zahlreichen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die große Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen jeglicher Art sowie die außerordentlich gute kollegiale Zusammenarbeit möchte ich mich herzlichst bei Herrn Dipl.-Ing. R. Hagens bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. G. Sauer mann für seinen Ideenreichtum und die stete Diskussionsbereitschaft.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern des Testcenters der Beiersdorf AG, die mich bei der Planung und Auswertung von Probandenstudien unterstützt haben, sowie den vielen Probanden, ohne die die Durchführung dieser Studien nicht möglich gewesen wäre.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie die große Rücksichtnahme und moralische Unterstützung während des gesamten Studiums und der Dissertation.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-diphosphat
AGR	α -Glucosylrutin
ATP	Adenosin-triphosphat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton
cfu	koloniebildende Einheiten
cGMP	zyklisches Guanosin-monophosphat
cNOS	konstitutive NO-Synthase
CoQ	Coenzym Q
DAN	2,3-Diaminonaphthalin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-alanin
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ESR	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
FMN	Flavin-mononukleotid
GDP	Guanosin-diphosphat
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GTP	Guanosin-triphosphat
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IR	infrarot
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
L-NA	N ^G -Nitro-L-arginin
L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-arginin
LPS	Lipopolysaccharide
MED	minimale Erythemdosis
NADPH	hydriertes Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NOS	NO-Synthase
O/W	Öl in Wasser
PE	Polyethylen

P _i	anorganisches Phosphat
PMT	Photomultiplerröhre
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RSH	Thiol
RSNO	Nitrosothiol
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
sGC	lösliche Guanylatzyklase
t ₀	Zeitpunkt vor Behandlung
t ₁ , t ₂ , ...	Zeitpunkte nach Behandlung
TEWL	transepidermaler Wasserverlust
UPE	ultraschwache Photonenemission
UV	ultraviolett
VIS	sichtbar
W/O	Wasser in Öl

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung	3
3	Theoretische Grundlagen	4
3.1	Aufbau und Funktion der menschlichen Haut.....	4
3.2	Stickstoffmonoxid.....	7
3.2.1	Physikalische und chemische Eigenschaften.....	7
3.2.2	Biosynthese.....	8
3.2.3	Funktion.....	9
3.2.4	NOS-Inhibitoren.....	10
3.3	Kohlendioxid.....	11
3.4	Potentielle NO- bzw. CO ₂ -Einflussfaktoren.....	13
3.4.1	UV-Strahlung.....	13
3.4.2	Psoriasis.....	15
3.4.3	Kosmetische Mittel.....	16
3.4.3.1	Hautpflegeprodukte.....	16
3.4.3.2	Wirkstoffe.....	18
4	Material und Methoden	20
4.1	Probanden.....	20
4.2	Schweinehaut.....	21
4.3	NO-Messung.....	22
4.3.1	Messprinzip.....	22
4.3.2	Probennahme.....	23
4.4	CO ₂ -Messung.....	27
4.4.1	Messprinzip.....	27
4.4.2	Probennahme.....	28
4.5	Messung der ultraschwachen Photonenemission.....	30
4.6	Corneometrie.....	31
4.7	Messung des transepidermalen Wasserverlustes.....	32

4.8	Quantifizierung und Differenzierung der Hautbakterien.....	33
4.8.1	Armfloraabspülung.....	33
4.8.2	Keimzahlbestimmung.....	33
4.8.3	Bakteriencharakterisierung.....	34
4.9	Statistische Auswertung.....	35
5	Ergebnisse.....	36
5.1	Untersuchung potentieller NO-Einflussfaktoren.....	36
5.1.1	Beeinflussung der exogenen NO-Synthese.....	36
5.1.1.1	Schweiß.....	36
5.1.1.2	Bakterien.....	37
5.1.1.3	Nitrit.....	40
5.1.1.4	pH-Wert.....	41
5.1.2	Beeinflussung der endogenen NO-Synthese.....	42
5.1.2.1	L-Arginin.....	42
5.1.2.2	L-NA.....	43
5.1.2.3	Durchblutung.....	43
5.1.2.4	UV-Strahlung.....	44
5.1.3	Physikalische Einflussfaktoren.....	46
5.1.3.1	Temperatur.....	46
5.1.3.2	Hautbarriere.....	47
5.1.4	Chemische Einflussfaktoren.....	48
5.1.4.1	Natriumlaurylsulfat.....	48
5.1.4.2	Wasserstoffperoxid.....	49
5.1.5	Einfluss individueller Disposition.....	50
5.1.5.1	Tageszeit.....	50
5.1.5.2	Körperregion.....	51
5.1.5.3	Alter.....	52
5.1.5.4	Psoriasis.....	53
5.1.5.5	Rauchen.....	54
5.1.6	Einfluss kosmetischer Mittel.....	58
5.1.6.1	Hautpflegeprodukte.....	58
5.1.6.2	Wirkstoffe.....	59

5.2	Untersuchung potentieller CO ₂ -Einflussfaktoren.....	65
5.2.1	Physikalisch-chemische Einflussfaktoren.....	65
5.2.1.1	Temperatur.....	65
5.2.1.2	Feuchtigkeit.....	66
5.2.1.3	pH-Wert.....	67
5.2.1.4	Hautbarriere.....	68
5.2.2	Einfluss der Durchblutung.....	70
5.2.2.1	Reibung.....	70
5.2.2.2	Nicotinsäureester.....	71
5.2.3	Einfluss von UV-Strahlung.....	72
5.2.3.1	UV-A-Strahlung.....	72
5.2.3.2	Sonnensimulator.....	73
5.2.4	Einfluss der Hautbakterien.....	74
5.2.5	Einfluss individueller Disposition.....	75
5.2.5.1	Körperregion.....	75
5.2.5.2	Alter.....	76
5.2.5.3	Ethnische Herkunft.....	77
5.2.6	Einfluss kosmetischer Mittel.....	78
5.2.6.1	Öle.....	78
5.2.6.2	Hautpflegeprodukte.....	79
5.2.6.3	Wirkstoffe.....	82
6	Diskussion.....	84
6.1	Methoden.....	84
6.1.1	NO-Messung.....	84
6.1.2	CO ₂ -Messung.....	85
6.2	Ergebnisse.....	86
6.2.1	Untersuchung potentieller NO-Einflussfaktoren.....	86
6.2.1.1	Beeinflussung der exogenen NO-Synthese.....	86
6.2.1.2	Beeinflussung der endogenen NO-Synthese.....	87
6.2.1.3	Physikalische Einflussfaktoren.....	88
6.2.1.4	Chemische Einflussfaktoren.....	88
6.2.1.5	Einfluss individueller Disposition.....	89
6.2.1.6	Einfluss kosmetischer Mittel.....	91

6.2.2	Untersuchung potentieller CO ₂ -Einflussfaktoren.....	92
6.2.2.1	Physikalisch-chemische Einflussfaktoren.....	92
6.2.2.2	Einfluss der Durchblutung.....	93
6.2.2.3	Einfluss von UV-Strahlung.....	93
6.2.2.4	Einfluss der Hautbakterien.....	93
6.2.2.5	Einfluss individueller Disposition.....	94
6.2.2.6	Einfluss kosmetischer Mittel.....	94
7	Zusammenfassung / Summary.....	96
8	Anhang.....	100
8.1	Originaldaten.....	100
8.1.1	Methoden.....	100
8.1.1.1	NO-Messung.....	100
8.1.1.2	CO ₂ -Messung.....	101
8.1.2	Ergebnisse.....	101
8.1.2.1	Untersuchung potentieller NO-Einflussfaktoren.....	101
8.1.2.2	Untersuchung potentieller CO ₂ -Einflussfaktoren.....	110
8.2	Geräte und Chemikalien.....	117
8.2.1	Geräte.....	117
8.2.2	Chemikalien und anderes Verbrauchsmaterial.....	117
8.2.3	Pufferlösungen und Nährmedien.....	119
9	Literaturverzeichnis.....	120

1 Einleitung

Die Haut ist das größte Organ des Menschen. Sie besteht aus drei Hauptschichten, die von Haaren, Nägeln, Talg- und Schweißdrüsen durchdrungen werden. Die äußerste Schicht, die Epidermis, ist ein verhornendes Plattenepithel, das die Hautpigmente enthält. Darunter liegt die Dermis, ein faserreiches Bindegewebe, in dem Blutgefäße und Nerven lokalisiert sind. Die innerste Hautschicht wird als Subkutis bezeichnet und besteht vorwiegend aus Fettzellen. Neben ihrer offenkundigen Funktion als Körperhülle dient die Haut vor allem als Schutz, z. B. vor Austrocknung, indem sie gewährleistet, dass der Körper nicht zu viel Flüssigkeit in Form von Schweiß oder Wasserdampf verliert (DU VMIER, 1996; ROBBINS, 1997).

Wasserdampf ist jedoch nicht das einzige Gas, das von der Haut freigesetzt wird. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Emission von cutan gebildetem Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlendioxid (CO₂).

NO ist – trotz seines Radikalcharakters – ein nur mäßig reaktives, unpolares Molekül (DUCHSTEIN et al., 1999). Grundsätzlich können zwei Biosynthesewege unterschieden werden: die NO-Bildung aus Arginin in der Haut, die durch spezifische NO-Synthasen (NOS) katalysiert wird (WELLER, 1999), und die NOS-unabhängige NO-Entstehung auf der Hautoberfläche durch Reduktion von Nitrat aus dem Schweiß (WEITZBERG und LUNDBERG, 1998). Das biochemische Interesse an NO stieg sprunghaft an, als sich im Jahre 1986 herausstellte, dass es sich bei NO um den sog. „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) handelt, der durch Entspannung der glatten Gefäßmuskulatur Vasodilatation bewirkt (PALMER et al., 1987). 1992 wurde NO dann von der Zeitschrift „Science“ zum „Molekül des Jahres“ gekürt (CULOTTA und KOSHLAND, 1992), und 1998 erhielten Furchgott, Ignarro und Murad für ihre bahnbrechenden Untersuchungen in der NO-Forschung den Nobelpreis für Medizin (FURCHGOTT, 1999; HOWLETT, 1998; IGNARRO, 1999; MURAD, 1999). Ihre Hypothesen konnten lange Zeit nicht überprüft werden, da noch keine geeigneten Methoden entwickelt worden waren. Inzwischen stellt die Chemilumineszenzreaktion mit Ozon eines der empfindlichsten Verfahren zur direkten analytischen Erfassung von NO dar (HAMPL et al., 1996).

CO₂ ist ein energetisch äußerst stabiles, sehr gut wasserlösliches Gas, das von Mitochondrien im Citrat-Zyklus gebildet wird und somit eine wesentliche Rolle im Energiestoffwechsel der Zellen spielt (STRYER, 1994). Der physiologische Zusammenhang zwischen NO und CO₂ besteht darin, dass NO die mitochondriale Atmung hemmt (BROOKES et al., 1999). Dass die menschliche Haut CO₂ freisetzt, wurde erstmals 1851 von GERLACH nachgewiesen. Intensivere Studien zum cutanen CO₂-Haushalt wurden später u. a. von SHAW et al. (1929), ROTHMAN (1957) sowie AMMAN und GALVIN (1968) durchgeführt. Die hierbei verwendeten Bestimmungsmethoden basierten vorwiegend auf der Eigenschaft von CO₂, Strahlung im infraroten (IR) Spektralbereich zu absorbieren. Anfang der achtziger Jahre fand die Forschung auf diesem Gebiet jedoch ein vorläufiges Ende, vermutlich aufgrund der damals noch sehr aufwendigen instrumentellen Analytik.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war zunächst die Entwicklung und Validierung von Methoden zur direkten Erfassung von cutan gebildetem NO und CO₂ *in vivo*. Entsprechend empfindliche Messinstrumente existierten zwar bereits, wurden jedoch hauptsächlich in der Umweltanalytik für NO- bzw. CO₂-Bestimmungen in Umgebungsluft eingesetzt. Daher war es erforderlich, Probennahmeverfahren für Routinemessungen auf Humanhaut zu entwickeln.

Im zweiten Schritt sollten diese Methoden dann angewendet werden, indem u. a. folgende potentielle NO- bzw. CO₂-Einflussgrößen untersucht werden sollten:

- physikalisch-chemische Faktoren wie Temperatur, pH-Wert der Hautoberfläche und UV-Strahlung
- physiologische Faktoren wie Durchblutung und Lebensalter
- Bakterienflora der Haut
- Körperregion
- topisch applizierte Hautpflegeprodukte und Wirkstoffe (z. B. Vitamin C)

Die erzielten Ergebnisse sollten anschließend mit Literaturdaten (sofern vorhanden) verglichen werden.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die Haut (Cutis) stellt mit einer Gesamtoberfläche von 1,5 – 2 m² das größte Organ des Menschen dar. Ihr Gewicht beträgt ca. 10% des Körpergewichts.

Bei der Haut handelt es sich um ein multifunktionelles Organ: Sie dient in erster Linie als mechanisches, chemisches und immunologisches Schutzorgan, das aufgrund seiner Barrierefunktion die Austrocknung des Körpers verhindert, vor ultravioletter (UV) Strahlung schützt sowie wärmeregulatorisch wirkt. Darüber hinaus ist die Haut Sinnesorgan und besitzt Stoffwechselfunktionen (JUNG, 1995; MÖLLER und MATTHIES, 1995; SMOLLE, 1992).

Die menschliche Haut besteht aus mehreren Schichten (s. Abb. 1), der Epidermis (Oberhaut), der Dermis (Lederhaut) und der Subkutis (Unterhautfettgewebe), ist mit Blutgefäßen und Nerven ausgestattet und wird von den Hautanhangsgebilden (Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen) durchdrungen (MÖLLER und MATTHIES, 1995; SMOLLE, 1992).

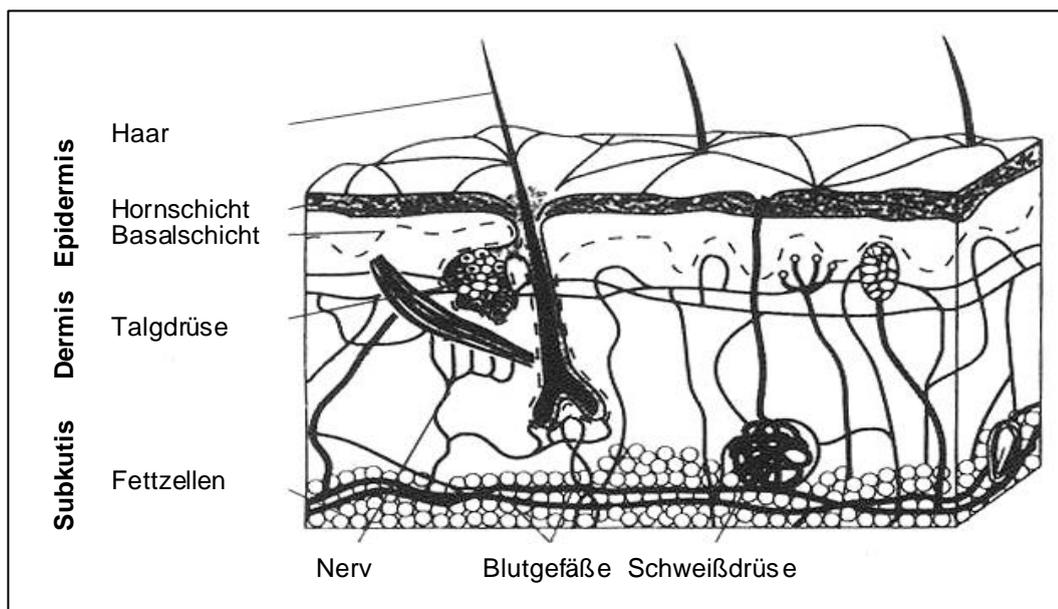


Abb. 1 Schematische Darstellung der humanen Haut (MÖLLER und MATTHIES, 1995)

Als äußerste Hautschicht bildet die Epidermis die eigentliche Schutzhülle gegenüber der Umwelt. Ihre Dicke variiert – abhängig von der Körperregion – zwischen 30 µm und 1,4 mm und ist an Handteller und Fußsohle am größten (GAWKRODGER, 1995; MÖLLER und MATTHIES, 1995). Den Hauptanteil der Epidermiszellen machen die hornbildenden Keratinozyten aus. Sie sind in Form eines mehrschichtigen Plattenepithels angeordnet, in dem man von außen nach innen zwischen *Stratum corneum*, *Stratum granulosum*, *Stratum spinosum* und *Stratum basale* unterscheidet (SMOLLE, 1992). Im mitotisch sehr aktiven *Stratum basale* (Basalschicht) wird der Keratinisierungsprozess initiiert. Außerdem finden sich hier Melanozyten, die das Hautpigment Melanin synthetisieren und an benachbarte Keratinozyten weitergeben (JUNG, 1995; MÖLLER und MATTHIES, 1995). Die Tochterzellen der Keratinozyten der Basalschicht bilden das *Stratum spinosum*, die Stachelzellschicht (MÖLLER und MATTHIES, 1995). Im *Stratum granulosum* (Granularzellschicht) flachen die Keratinozyten ab und verlieren ihren Zellkern. Es werden Keratohyalin granula sowie Keratinosomen (Odland-Körperchen) gebildet, die ihren Lipidinhalt in den Interzellularraum entleeren (GAWKRODGER, 1995; MÖLLER und MATTHIES, 1995). Das *Stratum corneum* (Hornschicht) stellt das Endergebnis der Keratinozytenreifung dar. Es besteht aus verhornten Zellen (Korneozyten), die untereinander durch einen „Lipidkitt“ verbunden sind (GAWKRODGER, 1995).

Die Dermis ist durch die Basalmembran fest mit der Epidermis verbunden und stellt ein gut durchblutetes, von Lymphbahnen und Nerven durchzogenes Bindegewebe dar. Sie gliedert sich in das dünne, zell- und gefäßreiche *Stratum papillare* und das *Stratum reticulare*. Letzteres besteht aus dicken Kollagenfaserbündeln, zwischen denen ein Netz elastischer Fasern angeordnet ist. Eingebettet sind diese faserigen Proteine in eine gelartige Grundsubstanz. Zu den Aufgaben der Dermis gehört zum einen die Versorgung der Epidermis, zum anderen ist sie für die mechanische Festigkeit der Haut verantwortlich (JUNG, 1995; MÖLLER und MATTHIES, 1995; SMOLLE, 1992).

Die Subkutis ist nicht scharf von der Dermis abgetrennt. Sie besteht aus einem lockeren, stark dehnbaren Bindegewebe, das Agglomerate von Fettzellen enthält (MÖLLER und MATTHIES, 1995). Sie dient vor allem der Energiespeicherung und Wärmeisolation, aber auch der mechanischen Polsterung (SMOLLE, 1992).

Die Talgdrüsen sind Teil des Follikelapparates und dementsprechend über die gesamte behaarte Haut verbreitet. Ihre größte Dichte erreichen sie auf Kopfhaut und Stirn, während auf Handteller und Fußsohle keine Talgdrüsen zu finden sind. Aus den Talgdrüsen stammt der größte Teil des Hautoberflächenfettes, des sog. Sebums (MÖLLER und MATTHIES, 1995; SMOLLE, 1992).

Bei den Schweißdrüsen unterscheidet man zwischen ekkrinen und apokrinen Schweißdrüsen. Die ekkrinen Schweißdrüsen dienen in erster Linie der Temperaturregulation. Sie produzieren den wässrigen Schweiß, eine vorwiegend Natriumchlorid enthaltende Salzlösung, und kommen am gesamten Körper vor, besonders auf der Oberfläche von Handteller und Fußsohle. Sie bestehen aus einem stark geknäuelten Endstück, das an der Dermis-Subkutis-Grenze liegt, und einem Ausführungsgang, der die Dermis gestreckt und die Epidermis spiralig gewunden durchzieht. Die apokrinen Schweißdrüsen sind vor allem in den Achselhöhlen und der Genitalregion zu finden und werden mit der Geschlechtsreife aktiv. Ihr lipidhaltiges Sekret ist aufgrund bakterieller Zersetzung für den Körpergeruch verantwortlich (JUNG, 1995; MÖLLER und MATTHIES, 1995; SMOLLE, 1992).

3.2 Stickstoffmonoxid

3.2.1 Physikalische und chemische Eigenschaften

Bei NO handelt es sich um ein farbloses, schlecht wasserlösliches Gas. Trotz seines Radikalcharakters ist NO relativ stabil und zeigt nur mäßige chemische Reaktivität (DUCHSTEIN et al., 1999).

Durch Abspaltung des einzelnen Elektrons entsteht das Nitrosyl-Kation (NO^+), durch Aufnahme eines Elektrons das Nitroxylat-Anion (NO^-). NO^+ bildet in wässriger Lösung sofort salpetrige Säure:



NO^- ist zwar dem molekularen Sauerstoff isoelektronisch, im Gegensatz zu diesem aber sehr instabil (BUTLER et al., 1995; DUCHSTEIN et al., 1999).

Das NO-Radikal selbst reagiert in Gegenwart von molekularem Sauerstoff spontan zu Stickstoffdioxid, einem braunen Gas mit Radikalcharakter:



Diese Reaktion verläuft nur bei hoher NO-Konzentration mit großer Geschwindigkeit, da es sich um eine Reaktion 2. Ordnung handelt und sich damit die Halbwertszeit von NO in Gegenwart von O_2 umgekehrt proportional zum Quadrat der NO-Konzentration verhält. NO_2 besitzt eine relativ große Dimerisierungstendenz und bildet daher das farblose Distickstofftetroxid (N_2O_4). Bei der Reaktion von N_2O_4 mit Wasser entstehen als stabile Zersetzungsprodukte Nitrit und Nitrat:



Mit NO reagiert NO_2 zu Distickstofftrioxid (N_2O_3), das mit Wasser ebenfalls NO_2^- bildet:



(BECKMAN, 1996; BUTLER et al., 1995; DUCHSTEIN et al., 1999)

Einen weiteren möglichen Reaktionspartner für NO stellt das Superoxidanionradikal (O_2^-) dar. Die Reaktion von NO mit O_2^- verläuft äußerst schnell und führt zur Bildung von Peroxynitrit, einem sehr starken Oxidationsmittel:

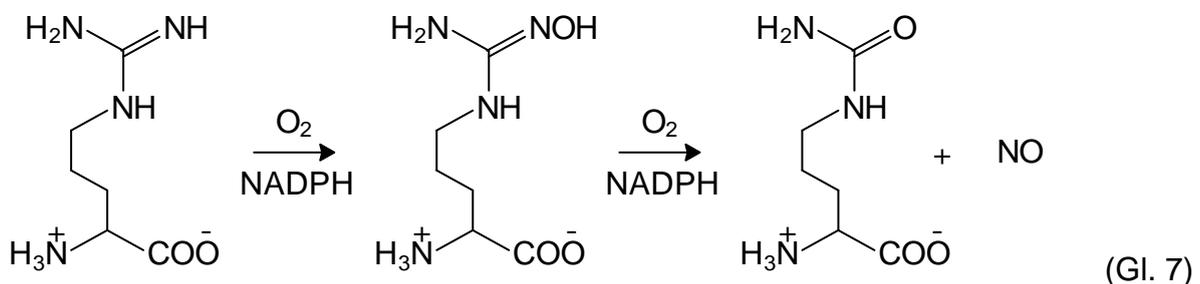


(DUCHSTEIN et al., 1999)

Mit Thiolen (RSH) ist die Bildung von Nitrosothiolen (RSNO) möglich, die als NO-Speicherverbindungen fungieren. Die Nitrosierung von RSH durch NO kann jedoch nur in Anwesenheit eines starken Elektronenakzeptors erfolgen (KOPPENOL, 1998; STAMLER et al., 1997).

3.2.2 Biosynthese

Die endogene NO-Bildung (s. Gl. 7) wird durch ein spezifisches Enzym, die NOS, katalysiert. Diese bewirkt, dass die Aminosäure L-Arginin in Gegenwart von molekularem Sauerstoff zu gleichen Teilen Citrullin und NO umgesetzt wird (verkürzter Harnstoffzyklus). Hierbei wird der Guanidino-Stickstoff des L-Arginins durch Übertragung von fünf Elektronen zu NO oxidiert. Als Coenzyme fungieren hydriertes Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (NADPH), Flavin-mononukleotid (FMN), Flavin-adenin-dinukleotid (FAD) und Tetrahydrobiopterin (BH_4). Als Intermediat tritt N^{ω} -Hydroxy-L-arginin auf (BRUCH-GERHARZ et al., 1998; GALLA, 1994; Stühr et al., 1991).



Bei der NOS handelt es sich um ein Dimer, von dem bisher drei verschiedene Isoformen identifiziert wurden, die endotheliale NOS (eNOS), die neuronale NOS (nNOS) und die induzierbare NOS (iNOS). Die eNOS und die nNOS sind konstitutiv und werden daher zusammen auch als cNOS bezeichnet. Sie werden über Calciumionen und Calmodulin reguliert. Die iNOS wurde vor allem in aktivierten Makrophagen nachgewiesen, ist Ca^{2+} -unabhängig und produziert nach Induktion durch Cytokine oder Lipopolysaccharide (LPS) deutlich größere Mengen an NO als die beiden cNOS-Isoformen (ANDREW und MAYER, 1999; IGNARRO, 1997).

Ferner wurde nachgewiesen, dass NO kontinuierlich über einen NOS-unabhängigen Mechanismus auf der menschlichen Haut produziert wird: Nitrat aus dem Schweiß wird durch die Nitratreduktase der Hautbakterien zu Nitrit umgesetzt und dieses dann wiederum aufgrund des leicht sauren Milieus auf der Hautoberfläche weiter zu NO reduziert (WEITZBERG und LUNDBERG, 1998; WELLER, 1997).

3.2.3 Funktion

NO fungiert als Botenstoff. Seine biologische Halbwertszeit beträgt zwar nur einige Sekunden, aufgrund seiner geringen Größe und seiner Lipophilie kann es jedoch Zellmembranen schnell passieren und dadurch relativ große Diffusionsstrecken zurücklegen.

Bei NO handelt es sich um den EDRF, der durch Entspannung der glatten vaskulären Muskulatur Vasodilatation bewirkt sowie die Aggregation von Blutplättchen und deren Adhäsion an der Gefäßwand verhindert. Dies erfolgt durch Bindung von NO an die Häm-Gruppe der löslichen Guanylatzyklase (sGC) und die damit verbundene Aktivierung des Enzyms, welches die Umwandlung von Guanosin-triphosphat (GTP) in zyklisches Guanosin-monophosphat (cGMP) katalysiert und so zu einer Abnahme des intrazellulären Pegels an freiem Ca^{2+} führt. NO spielt damit eine wichtige physiologische Rolle bei der Regulation des Blutdrucks (FURCHGOTT, 1999; IGNARRO, 1999).

Außerdem ist NO in die Neurotransmission und – in hohen Konzentrationen – in die unspezifische Fremdstoffabwehr (z. B. von Bakterien und Parasiten) involviert (KLATT et al., 1992; QURESHI et al., 1996; XIE et al., 1992).

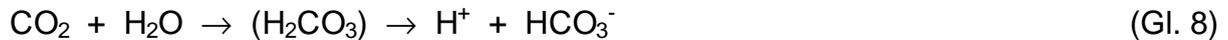
3.2.4 NOS-Inhibitoren

Die endogene NO-Synthese kann durch L-Arginin-Derivate inhibiert werden. Beispiele hierfür sind N^G-Nitro-L-arginin (L-NA) und N^G-Monomethyl-L-arginin (L-NMMA). Sie agieren, indem sie mit L-Arginin um das aktive Zentrum der NOS konkurrieren (FELDMAN et al., 1993; FURFINE et al., 1993; GOLDSMITH et al., 1996).

Weitere Inhibitoren stellen das Antioxidans 2-Phenyl-1,2-benzisoselenazol-3-(2H)on (Ebselen), das sowohl die c- als auch die iNOS in ihrer Funktion hemmt, sowie Oxyhämoglobin dar. Methylenblau verhindert die Aktivierung der sGC durch NO. Bei Aminoguanidin handelt es sich zwar um einen schwachen, dafür aber iNOS-spezifischen Inhibitor (ÄNGGARD, 1994; MISKO et al., 1993).

3.3 Kohlendioxid

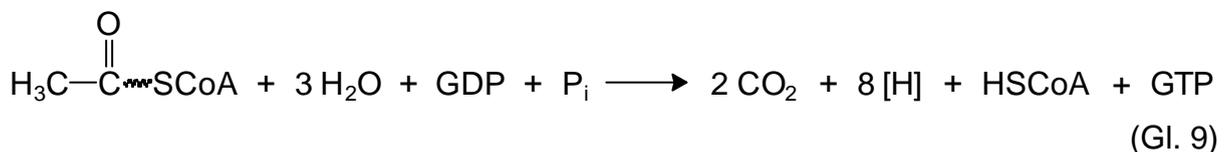
CO₂ ist ein farbloses, energetisch äußerst stabiles Gas, das sich sehr gut in Wasser löst, wobei Kohlensäure entsteht:



(FALBE und REGITZ, 1997)

CO₂ wird in eukaryontischen Zellen von Mitochondrien gebildet. Mitochondrien sind Organellen, deren Innenraum, die sog. Matrix, von zwei Membranen, der inneren und der äußeren Mitochondrienmembran, umschlossen wird (FREY und MANNELLA, 2000). Sie werden als „biochemische Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet, da ihre wesentliche Aufgabe die Aufnahme von Substraten des Energiestoffwechsels aus dem Zytoplasma und deren oxidativer Abbau zu CO₂ und H₂O ist – unter Gewinn von Adenosin-triphosphat (ATP), der wichtigsten Speicherform chemischer Energie (KOOLMAN und RÖHM, 1994).

Das CO₂ entsteht im Citrat-Zyklus, einem Stoffwechselweg in der Mitochondrienmatrix, durch vollständige Oxidation von Acetyl-Resten:



Die dabei gewonnenen Reduktionsäquivalente werden vorübergehend auf Coenzyme (NAD⁺, FAD) übertragen und von diesen in die Atmungskette eingebracht.

Die Atmungskette (oxidative Phosphorylierung) läuft in der inneren Mitochondrienmembran ab. Die von den Coenzymen gelieferten Elektronen dienen der Reduktion von O₂ und der Bildung von H₂O. Diese Redoxreaktion ist stark exergon. Unter Beteiligung verschiedener Redoxpaare (u. a. Ubichinon/Ubichinol) kommt es zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten, den die Mitochondrien mit Hilfe der ATP-Synthase zur Bildung von ATP aus Adenosin-diphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat (P_i) nutzen (KARLSON et al., 1994; KOOLMAN und RÖHM, 1994; STRYER, 1994).

In der Haut wird CO₂ von proliferierenden Keratinozyten der lebenden Epidermis produziert. Es diffundiert entweder durch das *Stratum corneum* in die Atmosphäre oder in die Dermis, um von dort in die Blutbahn zu gelangen (BERARDESCA und MAIBACH, 1993).

3.4 Potentielle NO- bzw. CO₂-Einflussfaktoren

3.4.1 UV-Strahlung

Das Sonnenlicht umfasst ein breites Strahlungsspektrum, von dem nur ein vergleichsweise schmaler Bereich mit Wellenlängen von 400 – 800 nm für das menschliche Auge sichtbar (VIS) ist. Oberhalb von 800 nm schließt sich die IR-Strahlung an; unterhalb von 400 nm liegt die UV-Strahlung. Aufgrund der unterschiedlichen physiologischen Wirkungen hat man drei UV-Bereiche mit folgenden Wellenlängen definiert:

UV-C = 200 – 280 nm

UV-B = 280 – 320 nm

UV-A = 320 – 400 nm

Die UV-C-Strahlung wird in der Ozonschicht der Erdatmosphäre absorbiert und hat daher für die Haut keine Bedeutung. Die auf die Erdoberfläche auftreffende Sonnenstrahlung schwankt in ihrer Zusammensetzung sehr stark. Die Anteile der verschiedenen Strahlenbereiche an der Gesamtstrahlung betragen ungefähr:

UV-B 0,4%

UV-A 5,6%

VIS 52,0%

IR 42,0%

(FINKEL, 1995b)

Der relativ kleine Anteil UV-Strahlung ist im Wesentlichen für die durch Sonnenlicht verursachten akuten und chronischen Hautveränderungen verantwortlich, denn einer der wichtigsten Faktoren für das Wirksamwerden elektromagnetischer Strahlen in der Haut ist deren Eindringtiefe, die wiederum in engem Zusammenhang mit der Energie der Strahlung steht. Die Strahlen werden beim Auftreffen auf die Haut teils reflektiert, teils gestreut und/oder absorbiert, wobei der reflektierte Anteil sehr gering ist. Der Prozentsatz der eindringenden Strahlen nimmt mit steigender Wellenlänge zu: Bei 300 nm erreichen immerhin schon 10% der Strahlen die Basalzellen; die UV-A-Strahlung dringt sogar bis ins Bindegewebe vor (FINKEL, 1995b; KINDL und RAAB, 1993).

UV-Bestrahlung löst die unterschiedlichsten Reaktionen in der Haut aus: So kommt es beispielsweise zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie dem Hydroxylradikal, dem Superoxidanionradikal oder Wasserstoffperoxid (BETTERIDGE, 2000; MÜLLER, 1988):



Außerdem wird die Vitamin-D-Synthese stimuliert und das Eigenschutzsystem der Haut aktiviert. Letzteres umfasst insbesondere die Pigmentierung, die Lichtschwiele (Verdickung der Hornschicht), das Dark-Repair-System (enzymatische Reparatur der Desoxyribonukleinsäure DNA) und die Synthese von Urocaninsäure, einer körpereigenen Lichtfiltersubstanz (FINKEL, 1995b; KINDL und RAAB, 1993).

Die Pigmentierung der Haut erfolgt durch Stimulierung der Melanozyten. Biochemisch kommt es dabei zu einer Aktivierung des Enzyms Tyrosin-Hydroxylase, das die oxidative Umwandlung der Aminosäure Tyrosin in 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-alanin (DOPA) bewirkt. Über weitere Reaktionsschritte entsteht schließlich das Polymer Melanin. Diese Pigmentneubildung wird überwiegend durch UV-B-Strahlung initiiert und als „indirekte Pigmentierung“ bezeichnet. Die so erhaltene Bräune besteht über mehrere Wochen. Dagegen werden bei der „Direktpigmentierung“ farblose Melanin-Vorstufen durch UV-A-Strahlung zu dunkel gefärbtem Melanin oxidiert. Dieser Prozess ist reversibel und die auf diese Weise entstandene Bräune folglich nur von kurzer Dauer (FINKEL, 1995b).

Übermäßige Bestrahlung führt sowohl zu akuten (Sonnenbrand) als auch zu chronischen Schäden (Hautalterung, Hautkrebs). Der Sonnenbrand zeigt die typischen Merkmale einer Entzündung. Er stellt in erster Linie eine Folge zu intensiver UV-B-Bestrahlung dar. Ca. 6 – 12 Stunden nach der UV-B-Exposition erreicht die Vasodilatation ihr Maximum; etwa 24 Stunden danach sind die zellulären Reaktionen am stärksten ausgeprägt (FINKEL, 1995b; KINDL und RAAB, 1993).

3.4.2 Psoriasis

Die Psoriasis vulgaris (Schuppenflechte) ist eine sehr häufige, gutartige, erbliche Dispositionskrankheit der Haut (erythematosquamöse Dermatose). Sie zeigt scharfe, aber oft unregelmäßig begrenzte, streckseitenbetonte, entzündliche Papeln mit parakeratotischer silberglänzender Schuppung. Statt der üblichen Schwielenbildung steigert sich die Mitoserate in der Epidermis auf etwa das Fünffache des Normalen unter Ausbildung einer krankhaften Hornschicht. Sichtbar wird die Abschilferung der Hornschicht in Form der Schuppenbildung und eine Rötung der Haut. Die Psoriasis schmerzt nicht und juckt nur, wenn die befallene Haut gereizt wird (JUNG, 1995; STEIGLEDER, 1987).

Unter allen Bevölkerungsgruppen erkranken die Europäer am häufigsten (Morbidität: 2 – 3 %). Frauen und Männer sind gleichermaßen betroffen. Epidemiologisch können zwei Typen unterschieden werden:

Typ I: - 60 – 70 % der Patienten

- schwere Fälle mit früher Manifestation (10 – 25 Jahre)
- familiäre Belastung
- durch mechanische Irritation isomorph auslösbar (Köbner-Phänomen)

Typ II: - 30 – 40 % der Patienten

- leichte und spät manifeste Fälle (35 – 60 Jahre) ohne familiäre Häufung
- Köbner-Phänomen kaum auslösbar

Charakteristisch ist der Gestaltwandel der psoriatischen Veränderungen sowie wellenförmige Verläufe mit Besserung im Sommer (Einfluss von Sonnenlicht und Badegewohnheiten) und Rückfällen im Winter. Erscheinungsfreie Intervalle können Monate bis Jahre dauern (JUNG, 1995).

3.4.3 Kosmetische Mittel

Der Begriff „kosmetische Mittel“ wird in § 4 Abs. 1 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (LMBG) definiert. Demnach sind kosmetische Mittel „Stoffe oder Zubereitungen aus Stoffen, die dazu bestimmt sind, äußerlich am Menschen oder in seiner Mundhöhle zur Reinigung, Pflege oder zur Beeinflussung des Aussehens oder des Körpergeruchs oder zur Vermittlung von Geruchseindrücken angewendet zu werden, es sei denn, dass sie überwiegend dazu bestimmt sind, Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder krankhafte Beschwerden zu lindern oder zu beseitigen“.

3.4.3.1 Hautpflegeprodukte

Hautpflege hat zum Ziel, die Haut geschmeidig zu halten und ihre Hornschicht bei aufgetretenen Schäden in ihrem natürlichen Regenerationsvermögen zu unterstützen bzw. deren Barriereeigenschaften wiederherzustellen.

Den bei weitem wichtigsten Produkttyp der Hautpflegemittel stellen die Emulsionen dar. Hierbei handelt es sich um Abmischungen aus Ölen bzw. öllöslichen Substanzen und Wasser bzw. wasserlöslichen Komponenten. Allgemein versteht man unter einer Emulsion ein heterogenes System aus zwei miteinander nicht oder nur begrenzt mischbaren Flüssigkeiten (Phasen). Die eine liegt dabei in Form von Tröpfchen vor (disperse oder innere Phase), während die andere Flüssigkeit eine kontinuierliche (kohärente oder äußere Phase) bildet. Liegen Öltröpfchen fein verteilt in Wasser vor, so handelt es sich um eine Öl-in-Wasser-Emulsion (O/W-Emulsion), deren Grundcharakter vom Wasser bestimmt wird. Bei der Wasser-in-Öl-Emulsion (W/O-Emulsion) handelt es sich um das umgekehrte Prinzip.

Der Stabilität einer Emulsion wirken Aufrahmen bzw. Sedimentation, Aggregation und Koaleszenz entgegen. Emulsionen von zwei ineinander nicht mischbaren Flüssigkeiten, die durch Rühren oder Schütteln hergestellt wurden, trennen sich daher schnell wieder in zwei Phasen. Um eine große und stabile Oberfläche zu erhalten, müssen grenzflächenaktive Stoffe, sog. Emulgatoren, zugegeben werden. Diese weisen einen amphiphilen Molekülaufbau auf, bestehend aus einer polaren (hydrophilen) sowie einer apolaren (lipophilen) Gruppe. Emulgatoren setzen die Grenzflächenspannung zwischen den Phasen herab und bilden an der Phasen-

grenze Öl – Wasser einen Grenzflächenfilm aus. Dadurch wird dem irreversiblen Zusammenfließen der Tröpfchen entgegengewirkt.

Die Zahl der bekannten Rahmenrezepturen und der auf dem Markt befindlichen W/O-Cremes ist weitaus kleiner als die der O/W-Emulsionen. Dafür ist die relativ kleine Zahl an verfügbaren W/O-Emulgatoren verantwortlich (SCHNEIDER und WITTERN, 1995). Typische Zusammensetzungen häufig verwendeter Hautpflegemittel gehen aus den nachfolgenden Rezepturbeispielen hervor (s. Tab. 1).

Tab. 1 Rahmenrezepturen O/W- und W/O-Creme (SCHNEIDER und WITTERN, 1995)

O/W-Creme		W/O-Creme	
Inhaltsstoff	Massengehalt [%]	Inhaltsstoff	Massengehalt [%]
Glycerinmonostearat	2,0	PEG-7-hydriertes Rizinusöl	4,0
Cetylalkohol	3,0	Wollwachsalkohol	1,5
Paraffinöl, subliquidum	15,0	Bienenwachs	3,0
Vaseline	3,0	Triglycerid, flüssig	5,0
Caprylcaprinsäure-triglycerid	4,0	Vaseline	9,0
Octyldodecanol	2,0	Ozokerit	4,0
hydriertes Kokosfett	2,0	Paraffinöl, subliquidum	4,0
Cetylphosphat	0,4	Glycerin	2,0
Glycerin	3,0	Magnesiumsulfat · 7 H ₂ O	0,7
Natriumhydroxid	q. s.	Konservierungsmittel	q. s.
Parfümöl	q. s.	Parfümöl	q. s.
Konservierungsmittel	q. s.	aq. dest.	ad 100,0
aq. dest.	ad 100,0	—	—

Eine spezielle Form der Hautpflegemittel stellen Produkte zur Lippenpflege dar. Charakteristisch für die Haut der Lippen ist eine sehr dünne Hornschicht. Die Lederhaut schiebt gut durchblutete Papillen bis dicht unter die Oberfläche. Schweißdrüsen sind an den Lippen nicht zu finden. Die Feuchtigkeit der Lippen rührt hauptsächlich vom Mundspeichel her. Da Talgdrüsen nur vereinzelt vorkommen, ist die Lippenoberfläche praktisch fettfrei. Sie neigt daher stark zum Austrocknen.

Lippenpflegemittel haben als vornehmliche Aufgabe, das Austrocknen und Rissigwerden der Lippen zu verhindern. Es handelt sich meist um Mischungen von Wachsen und Ölen. Daneben werden Konservierungsmittel, Antioxidantien und Pflegestoffe eingearbeitet (MOTITSCHKE, 1995). In Tab. 2 ist ein Beispiel für eine Lippenpflegestiftrezeptur aufgeführt.

Tab. 2 Rahmenrezeptur Lippenpflegestift (MOTITSCHKE, 1995)

Inhaltsstoff	Massengehalt [%]
Lanolinalkohol	3,0
Carnaubawachs	3,0
Candellilawachs	7,0
Ozokerit	3,0
Bienenwachs	7,0
Lanolin	10,0
α -Bisabolol	0,1
Panthenol	0,5
Vitamin-E-acetat	2,0
Konservierungsmittel	q. s.
Parfümöl	0,7
Aloe-Extrakt lipoid	0,5
Antioxidans	q. s.
Stearoxydimethicon	1,0
Rizinusöl	ad 100,0

3.4.3.2 Wirkstoffe

Von UMBACH wurde der Begriff „kosmetischer Wirkstoff“ 1995 wie folgt definiert: „Substanz in kosmetischen Zubereitungen mit unter Anwendungsbedingungen physikalischer, physikalisch-chemischer, chemischer, biochemischer und/oder subjektbezogener Wirkung, u. a. zur Beeinflussung von Physiologie und/oder Funktion der Haut bzw. Schleimhaut und ihrer Anhangsgebilde sowie der Zähne bei Ausschluss einer signifikanten Wirkung auf den Organismus.“

Hier soll im Besonderen auf die Wirkstoffgruppe der Antioxidantien mit ihren wasserlöslichen Vertretern α -Glucosylrutin (AGR) und Vitamin C (L-Ascorbinsäure) sowie dem fettlöslichen Vitamin E (α -Tocopherol) und dem Coenzym-Q10-System (CoQ10, Ubichinon) eingegangen werden (Strukturformeln s. Abb. 2).

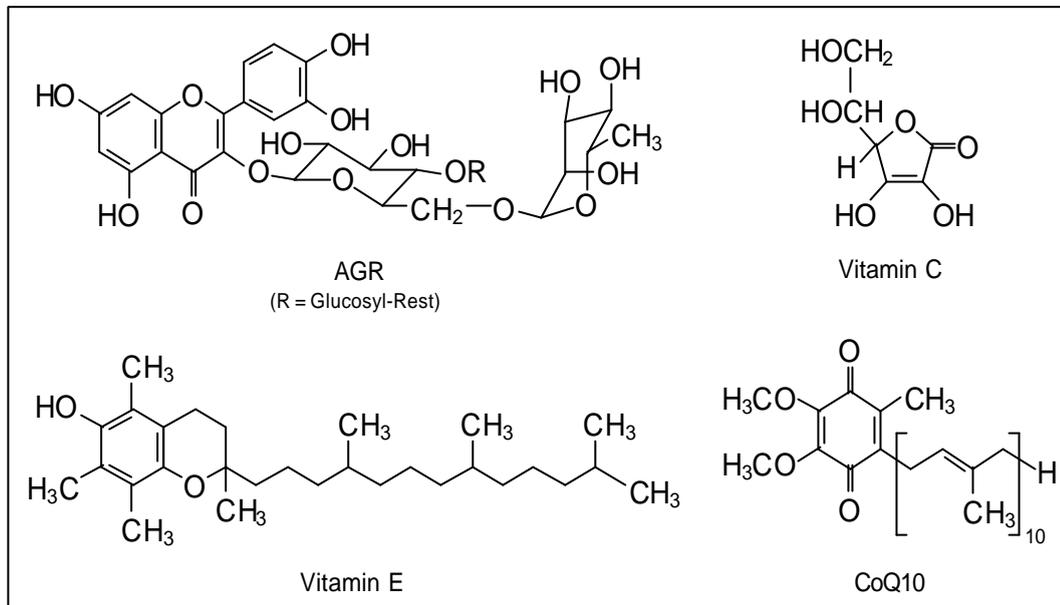


Abb. 2 Strukturformeln ausgewählter kosmetischer Wirkstoffe

Die Aufgabe von Antioxidantien in kosmetischen Produkten für die Haut besteht u. a. darin, diese gegen „oxidativen Stress“ zu schützen. Darunter versteht man z. B. Umwelteinflüsse wie UV-Strahlung, Zigarettenrauch, aber auch in der Atmosphäre enthaltenes Ozon, die durch Produktion freier Radikale Lipidperoxidation bewirken und so die Haut schädigen. Die Schutzwirkung von AGR, den Vitaminen C und E sowie dem CoQ10 in seiner reduzierten Form (Hydrochinon, Ubichinol) ist auf deren Radikalfängereigenschaften zurückzuführen (FÖRSTER et al., 1999).

4 Material und Methoden

4.1 Probanden

Die *in-vivo*-Studien wurden an freiwilligen Versuchspersonen, den Probanden, durchgeführt. Die Probanden waren beiderlei Geschlechts und je nach Art der Studie 18 – 83 Jahre alt. Als Testareale dienten vorwiegend die Innenseiten der Unterarme hautgesunder (mit Ausnahme der NO/Psoriasis-Studie) Probanden. Im Falle der CO₂-Messung mussten diese möglichst unbehaart sein. Grundsätzlich sollten die Probanden am Vortag der Gasmessungen auf Sauna, schweißtreibenden Sport, Schwimmbadbesuche sowie intensive Sonnenexposition bzw. Solarium (bei Bestrahlungstests ab vier Wochen vor Studienbeginn) verzichten. Bei Creme-Studien durften die Unterarme zudem ab eine Woche vor Testbeginn nicht mehr mit Hautpflegeprodukten behandelt werden.

4.2 Schweinehaut

NO wurde nicht nur *in vivo* auf Humanhaut, sondern auch *ex vivo* auf exzidiierter, nicht abgebrühter Rückenhaut ausgewählter Schlachtschweine (weiblich, ca. 130 Tage alt und 100 kg schwer) bestimmt, und zwar direkt am Tag der Schlachtung nach Rasur und Entfernung des Unterhautfettgewebes.

Die Wahl fiel auf Schweinehaut, da diese leicht verfügbar und in ihrer Struktur der Humanhaut sehr ähnlich ist. Es gibt jedoch auch Unterschiede: So verfügt Schweinehaut beispielsweise nicht über ekkrine Drüsen, und das Ausmaß der Behaarung variiert in Abhängigkeit von der Jahreszeit (BUSCH et al., 1996).

Allgemein ist die Haut von Schweinen an Nacken, Schulter und Rücken am dicksten. Den Hauptanteil der Cutis macht die Dermis aus. Ihre Dicke beträgt bei männlichen Hausschweinen ca. 5 mm, bei weiblichen dagegen nur knapp 3 mm (MEYER, 1986).

4.3 NO-Messung

4.3.1 Messprinzip

Die direkte Erfassung von NO ist mit sog. NO-Analysatoren möglich. Dieses äußerst empfindliche Verfahren basiert auf der Reaktion von NO mit Ozon und der daraus resultierenden Chemilumineszenz. Es entstehen energetisch angeregte NO₂-Moleküle, die eine breite Strahlungsbande im Wellenlängenbereich von ca. 600 – 1200 nm aussenden, wenn sie auf niedrigere Energieniveaus zurückfallen:



(ARCHER, 1993; HAMPL et al., 1996; YAN, 1999)

Abb. 3 zeigt die Funktionsweise eines solchen NO-Analysators: Das (NO-haltige) Messgas wird in den NO-Analysator gesaugt und strömt durch einen Partikelfilter in die Reaktionskammer. Außerdem wird getrocknete Umgebungsluft in das Gerät gezogen und in einen Ozonator geleitet, wo durch elektrische Entladung die für die Chemilumineszenzreaktion notwendige O₃-Konzentration erzeugt wird. In der Reaktionskammer wird das Ozon mit dem Messgas vermischt. Eine gekühlte Photomultiplerröhre (PMT) detektiert die NO₂-Lumineszenz, deren Intensität nahezu direkt proportional zur NO-Konzentration ist. Die Nachweisgrenze liegt bei 50 ppt NO. Spezifität wird dadurch gewährleistet, dass nur gasförmige Stoffe, die durch Reaktion mit Ozon Chemilumineszenz zeigen, detektiert werden (ARCHER, 1993; HAMPL et al., 1996; THERMO INSTRUMENTS, 1997).

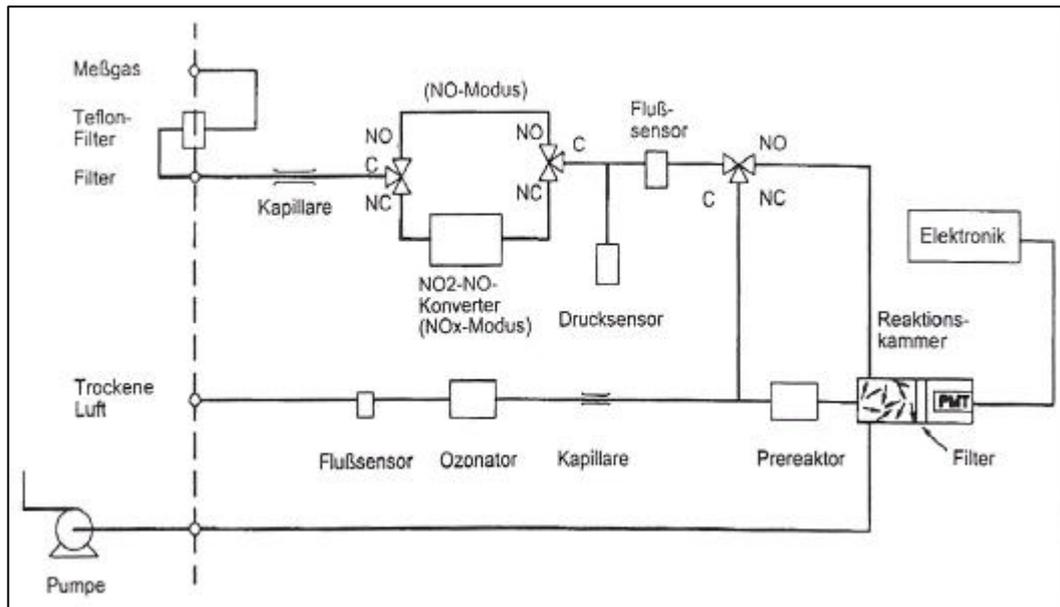


Abb. 3 Gasflussdiagramm NO-Analysator (THERMO INSTRUMENTS, 1997)

4.3.2 Probennahme

Grundsätzlich können zwei Arten der Probennahme unterschieden werden, die Steady-State- und die Trap-Technik. Im Falle der Steady-State-Technik wird das von der Haut diffundierende NO kontinuierlich gemessen, während das Gas bei der Trap-Technik über einen definierten Zeitraum gesammelt wird.

Die Probennahme erfolgte in Anlehnung an WELLER et al. (1996) sowie WELLER und ORMEROD (1997). Es wurde sowohl mit der Steady-State- als auch mit der Trap-Technik gearbeitet.

Bei der Steady-State-Technik wurde der gesamte Unterarm (inklusive Hand) in ein einseitig geschlossenes Edelstahlrohr (Länge: 43,0 cm, Durchmesser: 11,5 cm) eingeführt. An der offenen Seite war ein Schlauch aus gasdichtem Stoff befestigt, der unterhalb des Ellenbogens per Stretchband zusammengezogen wurde, so dass der Innenraum des Rohres nach außen luftdicht verschlossen war. Am Rohr befanden sich diagonal zueinander Schlauchanschlüsse, über die der Gastransport stattfand (s. Abb. 4).

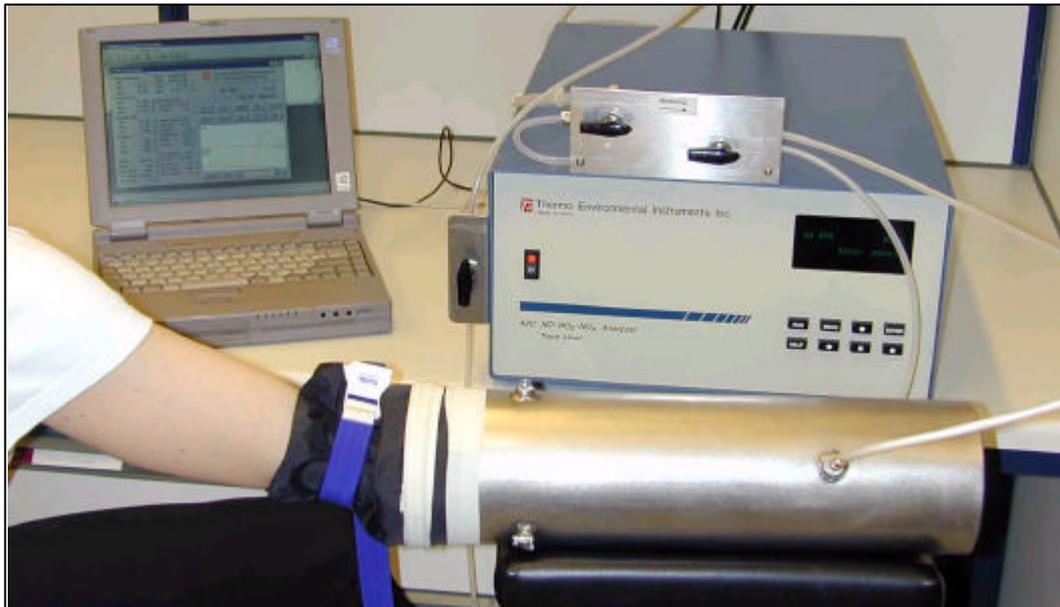


Abb. 4 Probenahme mittels Steady-State-Technik

Auch im Falle der Trap-Technik erfolgte die Probenahme mittels eigens zu diesem Zweck konstruierter Probenahmegefäße, sog. Küvetten (Durchmesser: 4,0 cm, Höhe: 2,0 cm). Es wurden Küvetten aus Polyethylen (PE) und aus Edelstahl (mit Decke aus Quarzglas) verwendet, mit jeweils einander gegenüberliegenden Schlauchanschlüssen. In Abb. 5 ist zu sehen, wie die Küvette zur Probenahme per Stretchband auf der Haut befestigt wurde. Nach Spülen des Gefäßinnenraums mit „Nullgas“ wurde sie verschlossen und über einen Zeitraum von 20 min auf der Haut belassen. Dann wurde der Küvetteninhalt in den NO-Analysator überführt.



Abb. 5 Probenahme mittels Trap-Technik

Die verwendeten Schläuche waren aus Teflon bzw. PE und hatten einen Innendurchmesser von 4,0 mm. Als praktisch NO- und O₃-freies Träger- bzw. Spülgas fungierte mittels Oxidationsmasse/Aktivkohle gefilterte Raumluft.

Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis einer NO-Messung unter Anwendung der Trap-Technik. Die dicke Linie stellt die NO-Freisetzung des Unterarms eines Probanden dar, die dünne Linie den Blindwert, der auf Edelstahl aufgenommen wurde. Man sieht, dass die Messung auf Haut zu einem deutlichen Signal führte, was bei dem Blindwert nicht der Fall war. Die Auswertung erfolgte jeweils über die Peakhöhe.

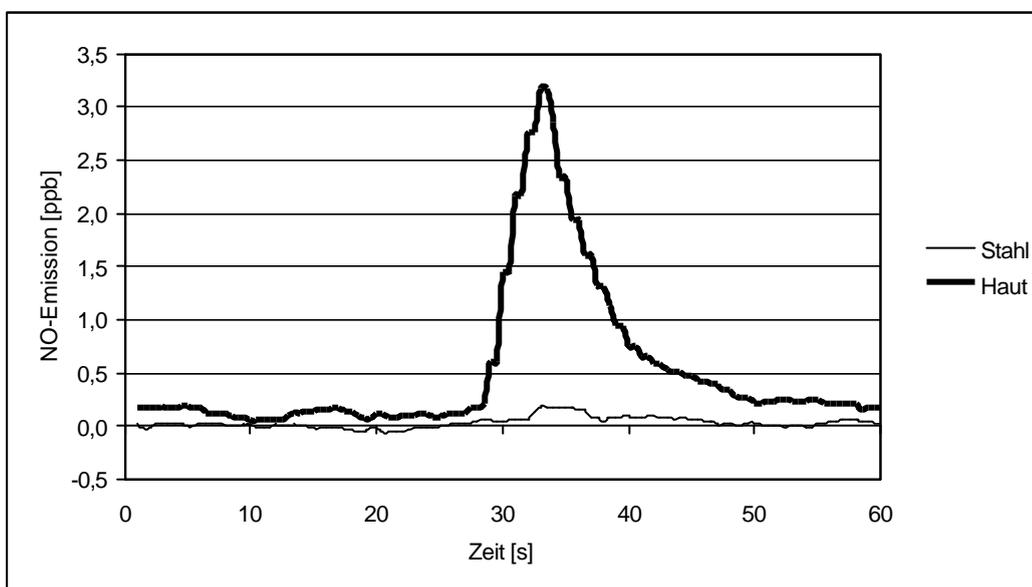


Abb. 6 NO-Messung auf Edelstahl bzw. Haut (Trap-Technik)

Zur Überprüfung, ob der durch das Stretchband auf die Haut ausgeübte Druck die NO-Messung beeinflusst, wurde bei drei Probanden eine Küvette erst mit minimalem, dann mit Maximaldruck am Unterarm befestigt. Dabei stellte sich heraus, dass der Küvettendruck keinen merklichen Einfluss auf die NO-Werte besitzt (wenig Druck: $4,5 \pm 1,3$ ppb NO, viel Druck: $4,7 \pm 0,9$ ppb NO).

Als nächstes wurden Reproduzierbarkeitstests durchgeführt. Jeweils fünfmal wurde dasselbe Hautareal vermessen. Die Testergebnisse sind in Abb. 7 dargestellt. Im Falle der Steady-State-Technik lag die Standardabweichung bei ca. 10%, für die Trap-Technik ergaben sich 8%.

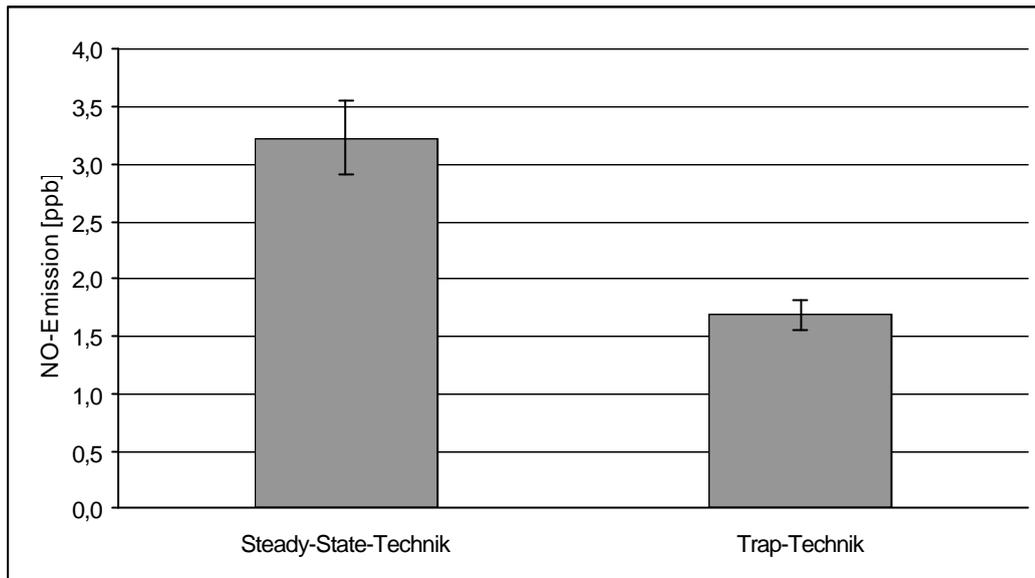


Abb. 7 Reproduzierbarkeitstests (n = 5)

Zuletzt wurde überprüft, ob bei der Trap-Technik zwischen Sammlungsdauer und gemessenem NO-Wert ein linearer Zusammenhang besteht. Hierzu wurde die Küvette bei zwei Probanden über Zeiträume von 10, 20 und 30 min verschlossen auf der Haut belassen. Das Ergebnis ist in Abb. 8 zu sehen. Es ergab sich ein relativ hoher Korrelationskoeffizient von 0,99.

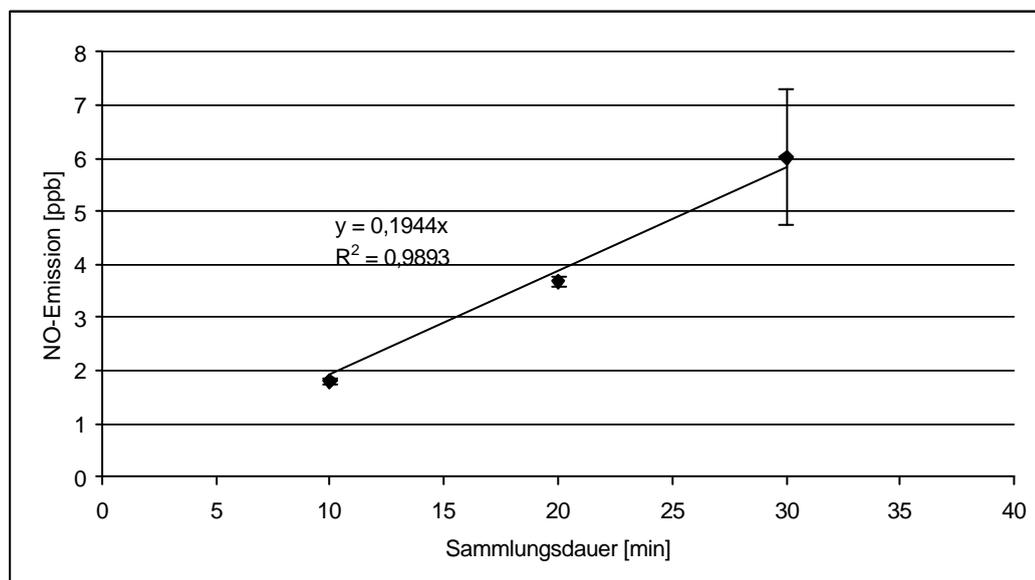


Abb. 8 Zusammenhang zwischen Sammlungsdauer und NO-Werten (n = 2)

4.4 CO₂-Messung

4.4.1 Messprinzip

Das Verfahren beruht darauf, dass CO₂ Strahlung im IR-Bereich bei einer Wellenlänge von 4,3 µm absorbiert. Das Messgas wird kontinuierlich in einen sog. CO₂-Analysator gesaugt (s. Abb. 9). Als praktisch CO₂-freies Träger- bzw. Nullgas fungiert per Natronkalk gefilterte Umgebungsluft. Im CO₂-Analysator wird IR-Strahlung abwechselnd durch einen CO₂- und einen N₂-Gasfilter geleitet. Der CO₂-Gasfilter dient der Erzeugung eines Referenzsignals, das durch CO₂ im Messgas nicht weiter abgeschwächt werden kann. Der N₂-Gasfilter ist für IR-Strahlung durchlässig. Der Analysator reagiert spezifisch auf CO₂, da andere Gase auch das Referenzsignal schwächen. Die Nachweisgrenze beträgt 6 ppb CO₂ (THERMO INSTRUMENTS, 1996; THIELE und VAN KEMPEN, 1972).

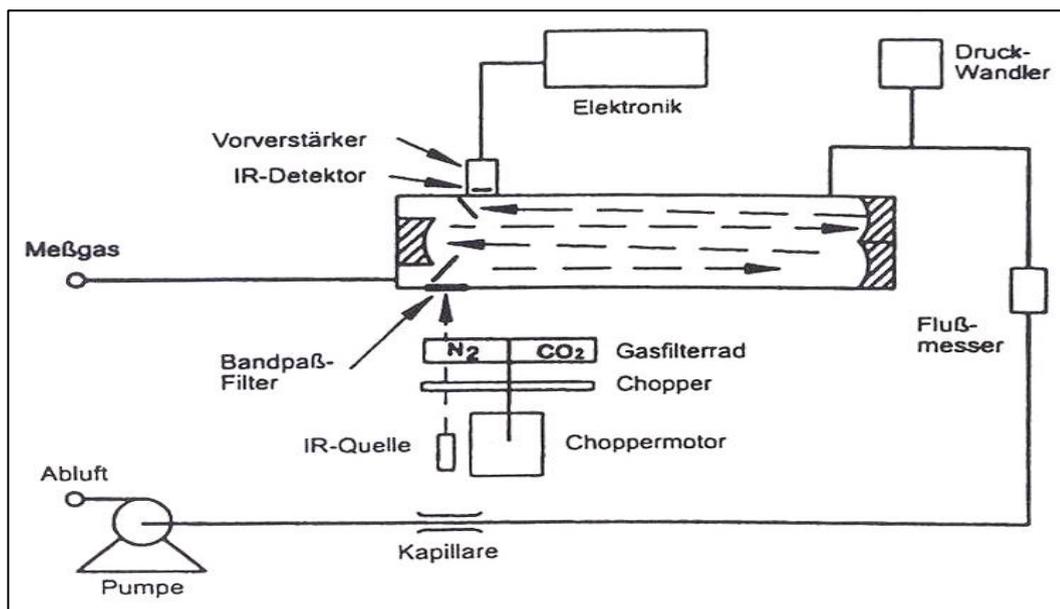


Abb. 9 Gasflussdiagramm CO₂-Analysator (THERMO INSTRUMENTS, 1996)

4.4.2 Probennahme

Die Probennahme erfolgte, indem die bereits in 4.3.2 beschriebene Stahlküvette auf die Haut gedrückt wurde (Messareal: 12,5 cm²). Es wurde kontinuierlich gemessen (Steady-State-Technik), bis sich ein konstanter Wert eingestellt hatte (ca. 5 min). Als praktisch CO₂-freies Trägergas fungierte per Natronkalk gefilterte Raumluft.

Abb. 10 zeigt das Ergebnis einer solchen CO₂-Messung. Der starke Anstieg der CO₂-Konzentration zu Messbeginn ist auf den vergleichsweise hohen CO₂-Gehalt der Raumluft zurückzuführen.

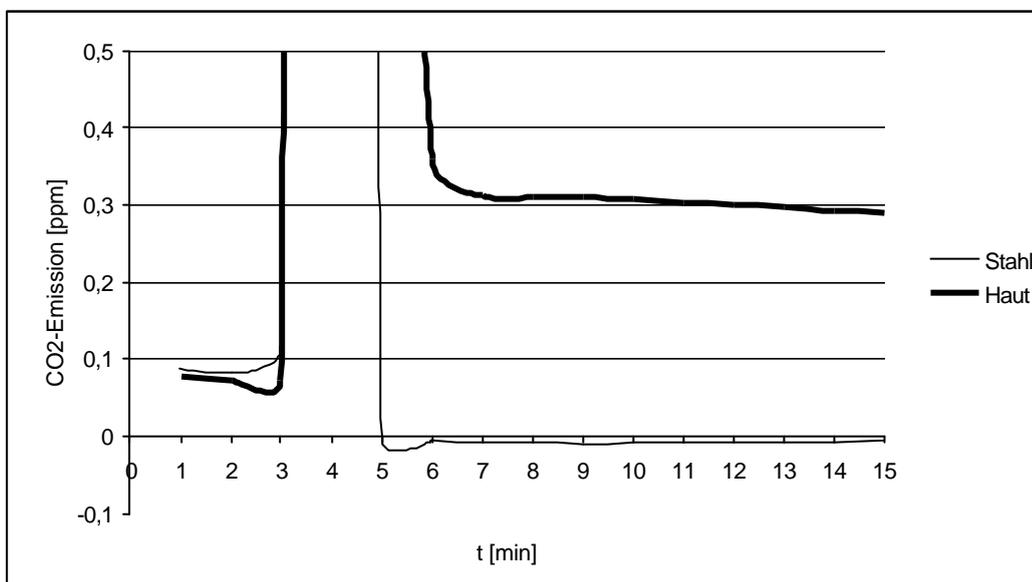


Abb. 10 CO₂-Messung auf Edelstahl bzw. Haut (Steady-State-Technik)

Das Ergebnis des Reproduzierbarkeitstests ist in Abb. 11 dargestellt. Es wurden jeweils direkt nacheinander fünf Messungen auf Edelstahl (Blindwert) bzw. auf demselben Hautareal durchgeführt. Auf Edelstahl wurde fünfmal der gleiche Wert (0,02 ppm CO₂) erzielt. Auf Haut ergaben sich im Mittel 0,19 ppm CO₂ mit einer Standardabweichung von 0,01 ppm CO₂, also etwa 5%.

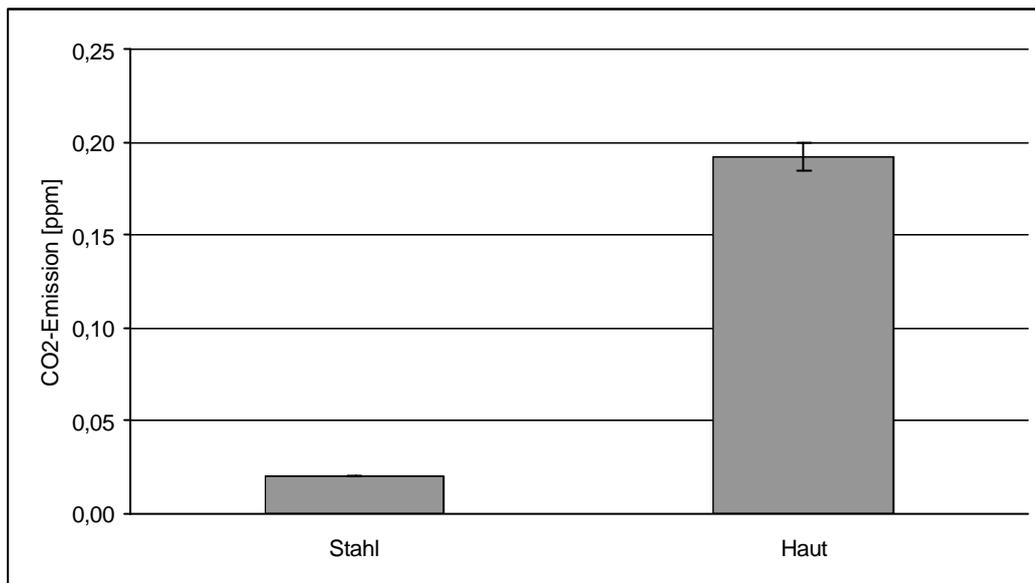


Abb. 11 Reproduzierbarkeitstest (n = 5)

4.5 Messung der ultraschwachen Photonenemission

Bei der ultraschwachen Photonenemission (UPE) handelt es sich um eine Lumineszenzerscheinung. Darunter versteht man elektromagnetische Strahlung im Spektralbereich von UV bis IR, die Atome oder Moleküle aussenden, wenn sie von angeregten Energiezuständen auf niedrigere zurückfallen (SAUERMANN et al., 1999).

Alle lebenden Systeme emittieren permanent Licht geringer Intensität ($10^1 - 10^3$ Photonen $s^{-1}cm^{-2}$). Die Herkunft dieser „Biophotonen“ ist noch nicht eindeutig geklärt. Eine Theorie ist, dass sie bei Radikalprozessen (z. B. Lipidperoxidation), ausgelöst durch ROS wie Singulett-Sauerstoff, Superoxidationradikale, Wasserstoffperoxid oder Hydroxylradikale, freiwerden (MEI, 1994; SAUERMANN et al., 1999).

Die UPE-Messung erfolgt in einer Dunkelkammer, indem der Detektorkopf, der einen äußerst leistungsstarken Photomultiplier enthält, auf die Haut aufgesetzt wird (MEI, 1996; SAUERMANN et al., 1999).

4.6 Corneometrie

Bei der Corneometrie handelt es sich um eine kapazitive Methode zur Messung der Hautfeuchtigkeit. Nur ausreichend mit Feuchtigkeit versorgte Haut ist voll funktionsfähig. Von grundsätzlicher Bedeutung für den Wasserhaushalt der Haut ist die Hornschicht; die lebende Epidermis ist praktisch konstant feucht. Die Corneometrie beruht auf den sehr unterschiedlichen Dielektrizitätskonstanten von Wasser (81) und anderen Stoffen (meist < 7). Auch die trockene Hornschicht ist ein dielektrisches Medium, dessen dielektrische Eigenschaften sich in Abhängigkeit vom Feuchtegehalt ändern (COURAGE, 1994).

Der Messkopf wird mit einem konstanten Druck von 3,5 N auf die Haut gedrückt. Die Fläche des Messareals beträgt 49 mm^2 . Während der Messung durchdringt ein elektrisches Streufeld die oberste Hautschicht. Der Messkondensator reagiert auf die in sein Messvolumen eingebrachten Proben – je nach Wassergehalt – mit unterschiedlichen Kapazitätsänderungen. Während einer Messdauer von 20 ms wird so der H_2O -Gehalt der Epidermis in einer Tiefe von 60 – 100 μm bestimmt (BAREL et al., 1991; COURAGE, 1994).

4.7 Messung des transepidermalen Wasserverlustes

Der transepidermale Wasserverlust (TEWL) ist ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Schutzfunktion der Haut, die u. a. darin besteht, nicht zu viel Flüssigkeit in Form von Wasserdampf oder Schweiß aus dem Körper austreten zu lassen.

Durch die Diffusion von körpereigenem Wasser baut sich ein Druck auf, der als TEWL in $\text{g}/(\text{h}\cdot\text{m}^2)$ messbar ist. Die physikalische Grundlage für die TEWL-Messung stellt das Ficksche Diffusionsgesetz dar:

$$\frac{dm}{dt} = -D \cdot A \cdot \frac{dc}{dx} \quad (\text{Gl. 15})$$

Der Diffusionsstrom dm/dt gibt an, wieviel Wasser pro Zeiteinheit transportiert wird, und ist proportional zur Fläche A und zum Dichtegradienten dc/dx . D ist hierbei der Diffusionskoeffizient des Wasserdampfes in der Luft.

Die TEWL-Bestimmung erfolgt mit Hilfe eines sog. Tewameters. Das Herzstück des Tewameters ist die Sonde mit einem engen Hohlzylinder (Durchmesser: 10 mm, Höhe: 20 mm) als Messkopf. Dieser wird auf die Haut aufgesetzt, so dass das von der Hautoberfläche verdunstende Wasser durch die Sonde austritt. Der dabei auftretende Dichtegradient wird durch zwei im Zylinder befindliche Sensorenpaare (Feuchte- und Temperatursensoren) gemessen und mit einem Mikroprozessor ausgewertet.

Je vollkommener die Hautbarriere, desto größer ist der dermale Wassergehalt. Ein niedriger TEWL-Wert charakterisiert folglich einen guten Hautzustand. Schädigungen der Hautbarriere können durch TEWL-Messungen bereits frühzeitig erkannt werden (COURAGE und KHAZAKA, 1998).

4.8 Quantifizierung und Differenzierung der Hautbakterien

4.8.1 Armfloraabspülung

Zur Gewinnung der auf der Arminnenseite angesiedelten Bakterienflora wurde die Detergenswaschmethode („Scrubbing“-Methode) angewandt (RENNIE et al., 1991): Den Probanden wurde ein Teflonzylinder auf die Haut gesetzt, in den 1 ml Abspülpuffer pipettiert wurde. Durch vorsichtiges Abschaben (1 min) der obersten Hautschicht(en) mit einem teflonbeschichteten Rundspatel gelangten die Bakterien in den Abspülpuffer. Das im Abspülpuffer enthaltene Triton X-100, ein nichtionisches Tensid, erleichterte die Ablösung der Bakterien von den Korneozyten. Die so gewonnene Bakteriensuspension wurde dann in 0,5 ml nährstoffreiches Enthemmungsmedium überführt.

4.8.2 Keimzahlbestimmung

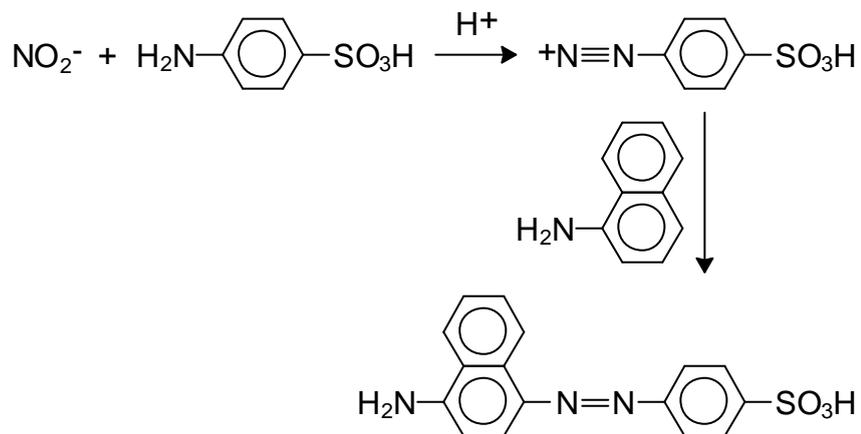
Die Keimzahlbestimmung erfolgte mittels Plattenverfahren, d. h. die Proben wurden per Spiralplattierer auf Agarplatten aufgetragen. Der Spiralplattierer benutzt eine nockenaktivierte Spritze, um die Bakteriensuspension in einer Spiralspur auf die Oberfläche der Agarplatte zu bringen. Die flüssigkeitspendende Spritze lagert abnehmende Mengen von Probenflüssigkeit ab, während sie sich von der Mitte der Platte zum Rand bewegt. Die Auszählung der Kolonien – angegeben als „koloniebildende Einheiten pro ml“ (cfu / ml) – erfolgt über die Koloniezähleinheit des Gerätes.

Die Armfloraprobe wurde unmittelbar nach Probennahme mit Caseinpepton-Sojamehlpepton-Spezialbouillon (CASO-Spezialbouillon) verdünnt und auf Coryne-Spezialagar aufgebracht. Dieser Agar wird generell für die kulturelle Anzucht lipophiler Corynebakterien herangezogen. Inkubiert wurde 48 h bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre (DERWORT, 2000).

4.8.3 Bakteriencharakterisierung

Die Vordifferenzierung der Bakterien erfolgte nach Anzucht durch makroskopische Morphologiebetrachtung. Diese umfasst Größe, Form, Profil und Pigmentbildung der Kolonien.

Zur weiteren Differenzierung der isolierten Bakterienpezies wurden standardisierte biochemische Identifizierungssysteme, *api Coryne* für koryneforme Bakterien und *ID 32 Staph* für Staphylokokken, eingesetzt. Diese Testsysteme basieren auf den unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften der Bakterien: Es wird untersucht, ob vorgelegte Substrate (z. B. Nitrat) chemisch verändert werden. Die Detektion abgelaufener Stoffwechselreaktionen erfolgt vorwiegend über Farbumschläge (DERWORT, 2000). So beruht der Nitratreduktase-Nachweis beispielsweise auf der Umsetzung von Nitrat zu Nitrit. Er erfolgt durch Zugabe von Sulfanilsäure, 1-Naphthylamin und Essigsäure (Grieß-Ilosvay-Reaktion). Bei Anwesenheit von Nitrit entsteht ein roter Azofarbstoff (BAUMGART, 1993):



(Gl. 16)

4.9 Statistische Auswertung

Gearbeitet wurde entweder mit den Originaldaten oder mit einfach bzw. doppelt relativierten Daten. Die statistische Auswertung dieser Daten erfolgte über Mittelwert, Standardabweichung und – im Falle normalverteilter Daten und $n \geq 5$ – (gepaarten) zweiseitigen t-Test, ansonsten mittels Wilcoxon-Test. Es wurden folgende Signifikanzniveaus unterschieden:

hochsignifikanter Unterschied			p	\leq	0,01
signifikanter Unterschied	0,01	$<$	p	\leq	0,05
wahrscheinlicher Unterschied	0,05	$<$	p	\leq	0,10
tendenzieller Unterschied	0,10	$<$	p	\leq	0,20
kein Unterschied			p	$>$	0,20

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung potentieller NO-Einflussfaktoren

5.1.1 Beeinflussung der exogenen NO-Synthese

5.1.1.1 Schweiß

Nachweislich wird NO nicht nur endogen, sondern auch auf der menschlichen Haut gebildet – durch Reduktion von Nitrat aus dem Schweiß. Ziel dieser Studie war daher die Untersuchung des Zusammenhangs von Schweißsekretion und NO-Konzentration auf der Hautoberfläche. Zunächst wurden die unbehandelten Unterarme von fünf Probanden vermessen (Zeitpunkt t₀). Dann wurden auf je ein Messareal per Pflaster 2 ml Antitranspiranslösung (Zirkonal) aufgebracht. Nach 4 h wurde das Pflaster wieder entfernt. Am folgenden Tag fand ein 15minütiger Saunaaufenthalt bei 60 °C statt. Im Anschluss daran wurden erneut NO-Messungen durchgeführt (Zeitpunkt t₁). Der Saunagang bzw. das damit verbundene Schwitzen der Probanden bewirkte eine mittlere Erhöhung der NO-Werte um ca. 40% (s. Abb. 12). Außerdem zeigte sich, dass die Antitranspirans-Behandlung wirksam war: Die NO-Werte der behandelten Haut zum Zeitpunkt t₁ lagen im Mittel sogar um ca. 15% niedriger als vor dem Saunagang.

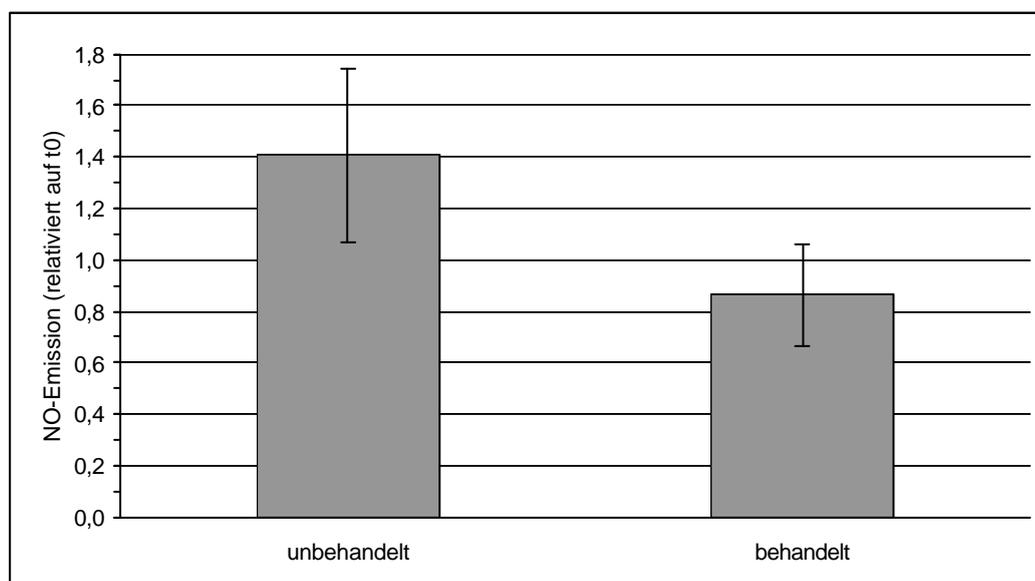


Abb. 12 NO-Werte un behandelter und mit Antitranspirans behandelter Haut nach Saunagang (n = 5)

5.1.1.2 Bakterien

Der Einfluss der cutanen Bakterienflora auf die NO-Emission der Haut wurde untersucht, indem vor und nach Desinfektion der Hautoberfläche Keimzahlbestimmungen sowie NO-Messungen durchgeführt wurden. Außerdem wurde eine Identifizierung der Hautbakterien vorgenommen und geprüft, ob die nachgewiesenen Bakterienspezies über das Enzym Nitratreduktase verfügen. Die Untersuchungen wurden an den Unterarmen von vier Probanden, zwei weiblichen (Proband 1 und 3) sowie zwei männlichen (Proband 2 und 4), durchgeführt. Die Keimzahlbestimmungen und NO-Messungen erfolgten an unbehandelter, lediglich mit Wasser gewaschener und mit Sterillium® Virugard (Wirkstoff: Ethanol) desinfizierter Haut, jeweils 30 min nach der Behandlung. An den unbehandelten Arealen fand außerdem die Keimdifferenzierung statt. In Abb. 13 ist zu sehen, dass die beiden weiblichen Probanden im Vergleich zu den männlichen selbst auf den unbehandelten Arealen kaum Bakterien aufwiesen (Größenordnung: 10^2 cfu/ml). Dennoch zeigte sich, dass die Desinfektion in allen Fällen zu 100% wirksam war und bereits Waschen mit Wasser eine starke Reduktion der cutanen Keime bewirkte.

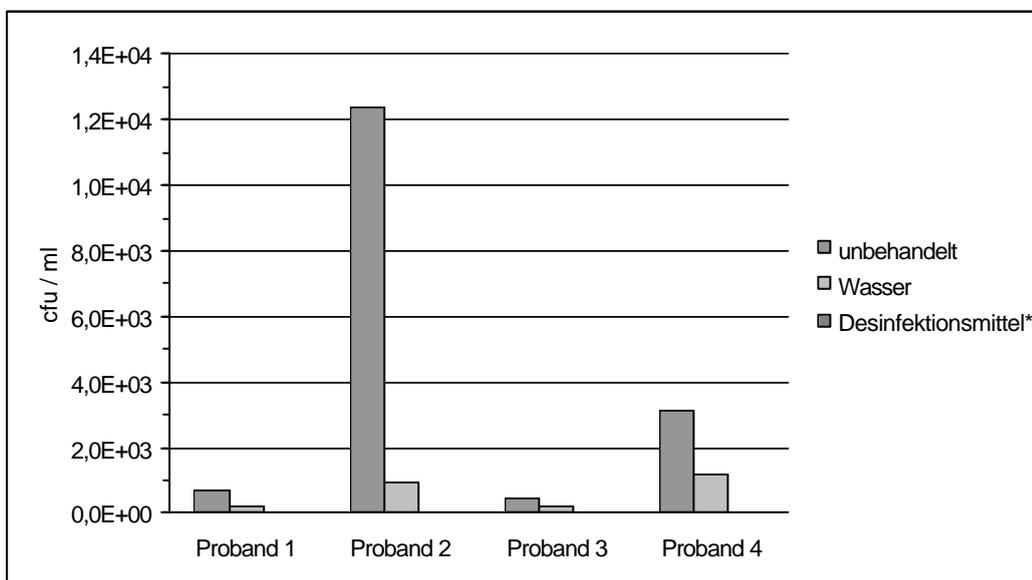


Abb. 13 Keimzahlen in Abhängigkeit von Behandlung mit Wasser bzw. Sterillium® Virugard

* nach Desinfektion keine Keime mehr nachweisbar

Das Ergebnis der Bakteriendifferenzierung ist in Tab. 3 dargestellt. *Staphylococcus hominis* und *Micrococcus luteus* waren die an den Unterarmen der Probanden dominierenden Bakterienspezies, die beide über das Enzym Nitratreduktase verfügen und damit in der Lage sind, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, was Voraussetzung für die Entstehung von NO auf der Hautoberfläche ist.

Tab. 3 Vorkommen und Eigenschaften der identifizierten Bakterien

Proband	Identifikationsergebnis	Vorkommen	Nitratreduktase
1	<i>Micrococcus luteus</i>	dominierend	+
	<i>Staphylococcus hominis</i>	vereinzelt	+
	<i>Corynebacterium sp. (lipophil)</i>	vereinzelt	+
2	<i>Staphylococcus hominis</i>	dominierend	+
	<i>Staphylococcus caprae</i>	vereinzelt	+
3	<i>Staphylococcus hominis</i>	dominierend	+
	<i>Staphylococcus capitis</i>	vereinzelt	+
	<i>Corynebacterium sp. (lipophil)</i>	vereinzelt	–
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	vereinzelt	+
4	<i>Staphylococcus hominis</i>	dominierend	+
	<i>Micrococcus luteus</i>	dominierend	+
	<i>Corynebacterium sp. (lipophil)</i>	vereinzelt	–

Dementsprechend wies das mit Wasser gewaschene Hautareal im Mittel niedrigere NO-Werte auf als das unbehandelte und das desinfizierte wiederum niedrigere als das mit Wasser behandelte (s. Abb. 14).

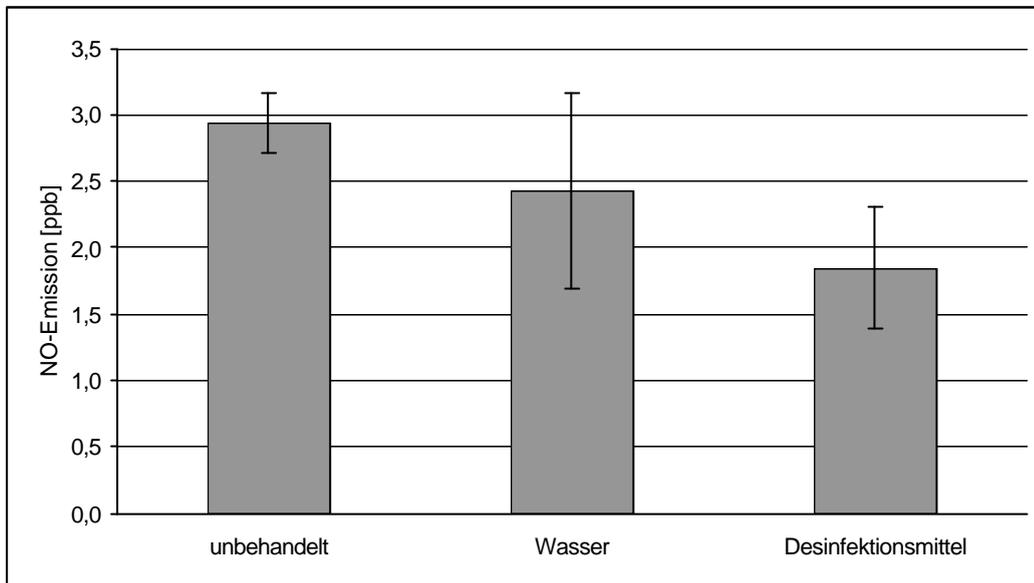


Abb. 14 NO-Werte vor und nach Behandlung mit Wasser bzw. Sterillium® Virugard (n = 4)

5.1.1.3 Nitrit

Zur Untersuchung des Einflusses von Nitrit auf die NO-Emission der Haut wurden bei drei Probanden die Messareale mit 50 µl einer 0,5% Natriumnitrit enthaltenden O/W-Emulsion bzw. dem entsprechenden Placebo behandelt. Vor sowie 1½ h nach Produktanwendung wurden NO-Messungen durchgeführt. Abb. 15 zeigt, dass die Nitritbehandlung einen starken Anstieg der NO-Werte zur Folge hatte. Ergänzend dazu wurde bei einem anderen Probandenkollektiv die UPE in Abhängigkeit von Nitritapplikation gemessen. Auch hierbei war eine Erhöhung der Werte zu verzeichnen.

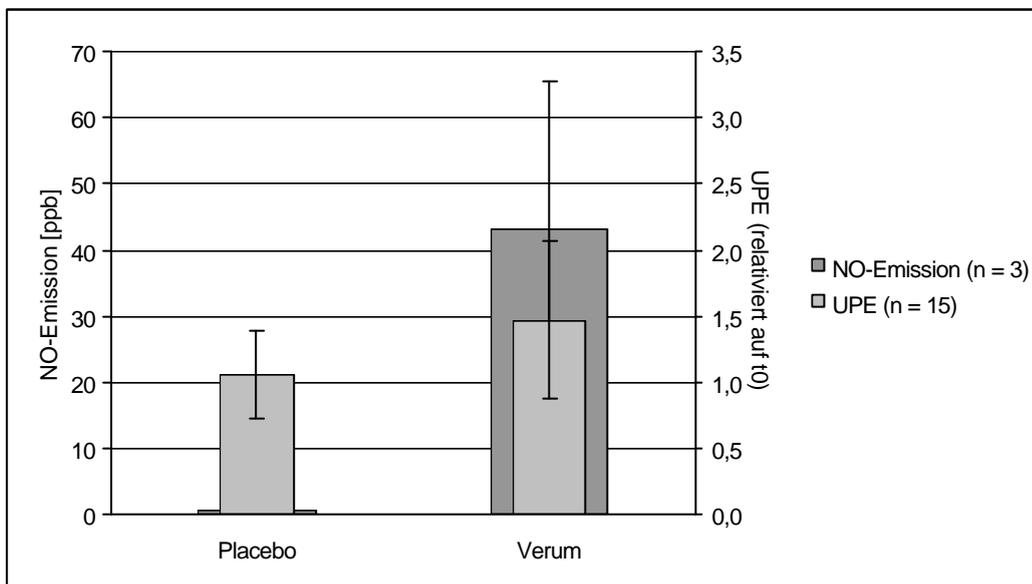


Abb. 15 Einfluss topischer Nitritapplikation auf NO- und Photonemission der Haut

5.1.1.4 pH-Wert

In diesem Experiment wurde der Einfluss des pH-Wertes von Hautpflegeprodukten auf die NO-Emission der Haut untersucht. Hierzu wurden bei drei Probanden 50 μ l einer auf pH 5 bzw. pH 9 eingestellten O/W-Emulsion auf die Messareale aufgebracht. Nach 1 h wurden diese Hautareale sowie ein unbehandeltes Kontrollareal vermessen. Das Ergebnis ist in Abb. 16 zu sehen. Relativiert auf „unbehandelt“ führte die sauer eingestellte Emulsion zu deutlich höheren NO-Werten ($1,5 \pm 0,3$) als das entsprechende basische Produkt ($1,0 \pm 0,2$).

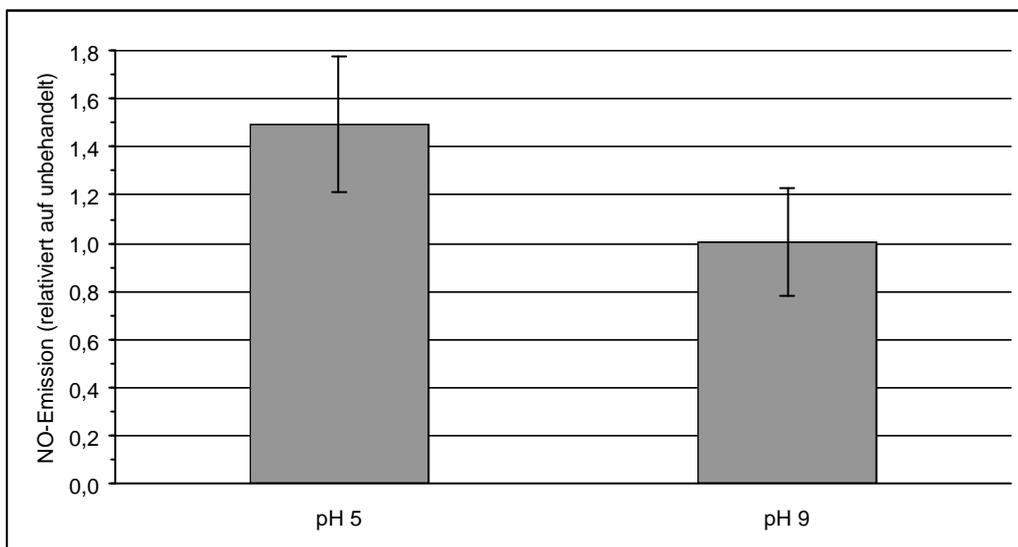


Abb. 16 pH-Abhängigkeit der NO-Emission der Haut (n = 3)

5.1.2 Beeinflussung der endogenen NO-Synthese

5.1.2.1 L-Arginin

Ziel dieser Studie war herauszufinden, ob topische Applikation von L-Arginin eine messbare Steigerung der NO-Emission der Haut bewirkt. Hierzu wurde L-Arginin 1%ig in eine O/W-Emulsion eingearbeitet. Es wurden ein Kurz- und ein Langzeittest durchgeführt. Der Kurzzeittest erfolgte mit drei Probanden, deren cutane NO-Emission vor sowie 1 h nach einmaliger Applikation von 50 µl argininhaltigem Produkt bzw. entsprechendem Placebo auf das Messareal bestimmt wurde. Für den Langzeittest wurden die beiden Produkte von zehn Probanden über einen Zeitraum von einer Woche zweimal täglich an den Unterarmen angewendet, am Messtag jedoch nicht mehr. Abb. 17 zeigt, dass weder im Kurz- noch im Langzeittest eine Zunahme der NO-Werte durch Behandlung mit L-Arginin zu verzeichnen war.

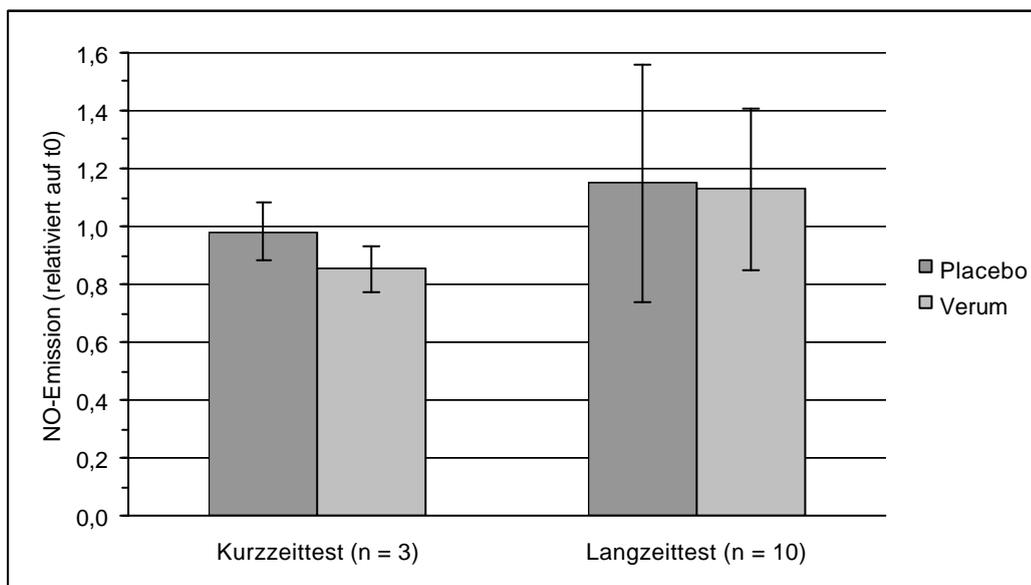


Abb. 17 Einfluss topischer Applikation von L-Arginin auf die NO-Emission der Haut

5.1.2.2 L-NA

Als nächstes wurde untersucht, ob topische Applikation des NOS-Hemmers L-NA eine Reduktion der NO-Emission der Haut bewirkt. Hierzu wurden an fünf Probanden vor sowie 1 h nach Anwendung von 50 µl einer 1% L-NA enthaltenden O/W-Emulsion bzw. dem entsprechenden Placebo NO-Messungen durchgeführt. In drei Fällen kam es zwar zu einer Abnahme der NO-Werte durch Behandlung mit dem Verum, bei zwei Probanden jedoch zu einer Erhöhung, so dass im Mittel kein Unterschied zwischen Placebo und Verum feststellbar war.

5.1.2.3 Durchblutung

Einige Nicotinsäureester, darunter Methylnicotinat, zeichnen sich durch hyperämisierende Wirkung aus (MUTSCHLER, 2001). Daher wurden drei Probanden mit 0,05% in eine W/O-Emulsion eingearbeitetem Methylnicotinat behandelt. Gemessen wurde jeweils 30 min nach Applikation von 50 µl nicotinathaltigem Produkt bzw. entsprechendem Placebo. Aus der folgenden Abbildung geht hervor, dass Methylnicotinat bei allen Probanden zu einer Steigerung der NO-Emission der Haut führte.

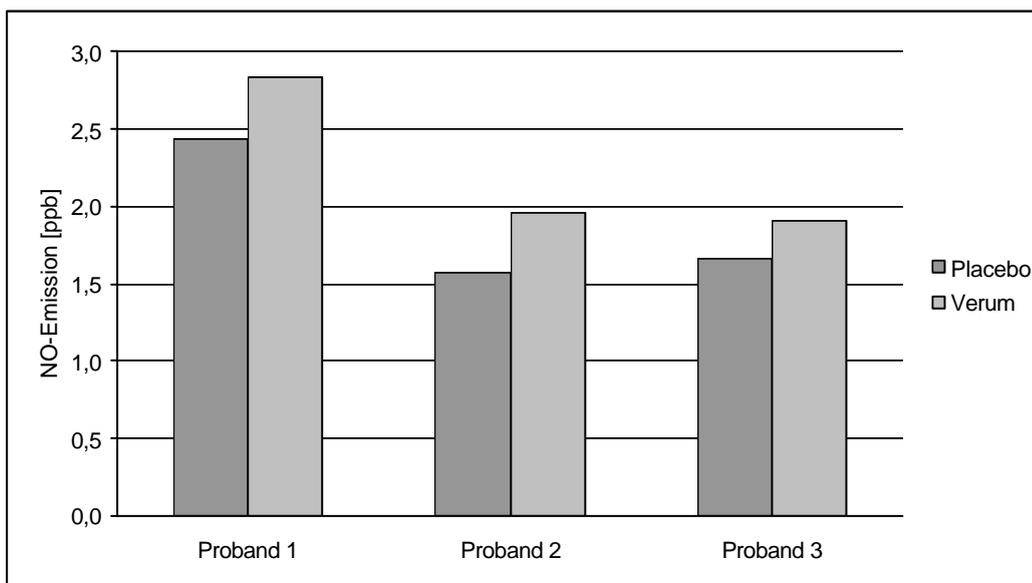


Abb. 18 NO-Werte nach Durchblutungsförderung mit Methylnicotinat

5.1.2.4 UV-Strahlung

UV-A-Strahlung

Zur Untersuchung des Einflusses von UV-A-Bestrahlung auf die NO-Emission der Haut wurden bei drei Probanden NO-Messungen während fünfminütiger UV-A-Exposition (Strahlungsleistung: $6,0 \text{ mW/cm}^2$) durchgeführt. Als Probennahmegefäß diente die Stahlküvette mit der Decke aus Quarzglas. In einem Kontrollexperiment wurde die gleiche Messung statt auf Haut auf Edelstahl durchgeführt. Abb. 19 zeigt, dass die UV-A-Exposition zwar eine Zunahme der NO-Emission der Haut zur Folge hatte, dass aber auch auf Stahl ein Bestrahlungseffekt zu verzeichnen war.

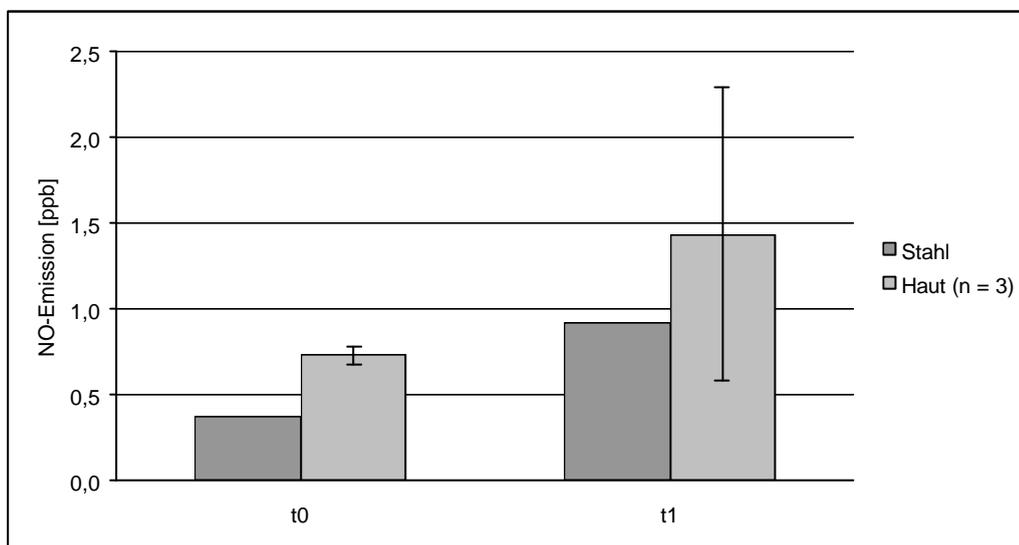


Abb. 19 NO-Messung während 5 min UV-A-Bestrahlung mit $6,0 \text{ mW/cm}^2$

Sonnensimulator

In einer weiteren Bestrahlungsstudie wurde untersucht, inwiefern UV-Bestrahlung (UV-A und -B) mit minimaler Erythemdosis (MED) die NO-Emission der Haut beeinflusst. Vermutet wurde, dass UV-induzierte Hautrötung aufgrund der damit verbundenen Vasodilatation zu einem Anstieg der NO-Werte führt. Um dies zu zeigen, wurden zunächst die unbestrahlten Unterarme von fünf Probanden vermessen. Dann wurde bestrahlt und unmittelbar, 3, 6 und 24 h nach der UV-Exposition erneut die NO-Emission der Haut bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 20 dargestellt. Überraschenderweise war kein Zusammenhang zwischen UV-Bestrahlung und NO-Freisetzung der Haut erkennbar.

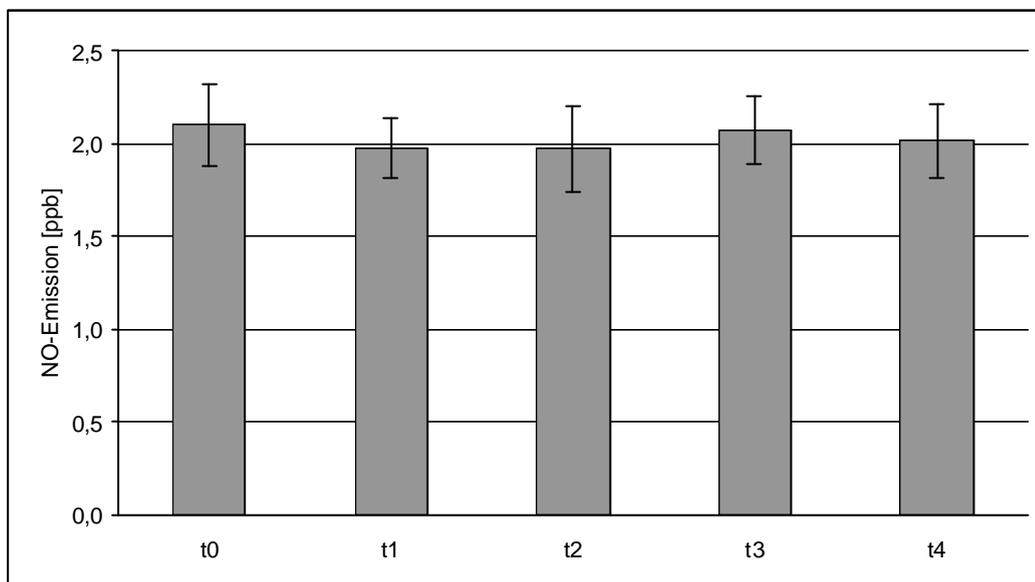


Abb. 20 Zusammenhang zwischen Bestrahlung mit 1,0 MED und NO-Emission der Haut (n = 5)

t1: sofort nach Bestrahlung

t2: 3 h nach Bestrahlung

t3: 6 h nach Bestrahlung

t4: 24 h nach Bestrahlung

5.1.3 Physikalische Einflussfaktoren

5.1.3.1 Temperatur

Zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die NO-Emission der Haut wurde zunächst bei drei Probanden je eine NO-Messung bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Anschließend wurde das Hautareal durch Föhnen erwärmt und ein zweites Mal an derselben Stelle gemessen, was bei allen Probanden eine Zunahme der NO-Werte zur Folge hatte (s. Abb. 21).

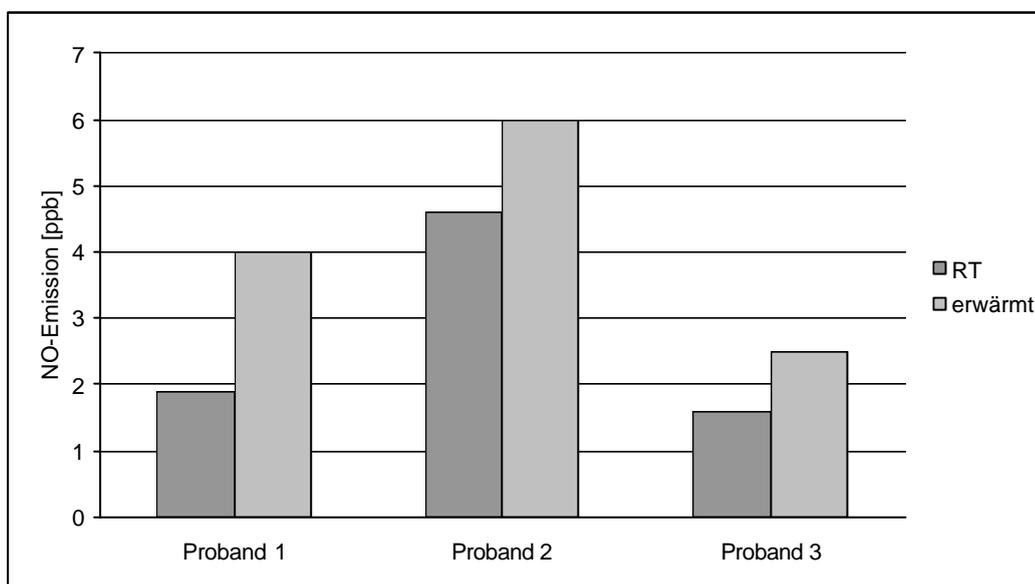


Abb. 21 Temperaturabhängigkeit der NO-Emission der Haut

5.1.3.2 Hautbarriere

Der Einfluss der Hautbarriere auf die NO-Emission der Haut wurde untersucht, indem bei drei Probanden die Haut am Unterarm mit verschiedenen Methoden geschädigt wurde:

1. Das zu vermessende Hautareal wurde hundertmal mit einem Einmalrasierer behandelt.
2. Mit drei in Aceton getränkten Wattestäbchen wurde mehrere Minuten über die gestraffte Haut gerieben.
3. An ein Hautareal mit einem Durchmesser von 5 mm wurde über einen Zeitraum von 2 – 3 h ein leichter Unterdruck (ca. 250 mbar) angelegt und die so entstandene Saugblase (Suction Blister) dann abgeschnitten.

Es wurden jeweils vor und nach der Hautschädigung NO-Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 22 zu sehen. In allen drei Fällen kam es zu einer Steigerung der NO-Emission der Haut durch die Barrierschädigung. Das Rasieren bewirkte eine mittlere Erhöhung der NO-Werte um ca. 85%, die Aceton-Behandlung um ca. 50% und das Blasenziehen um ca. 20%.

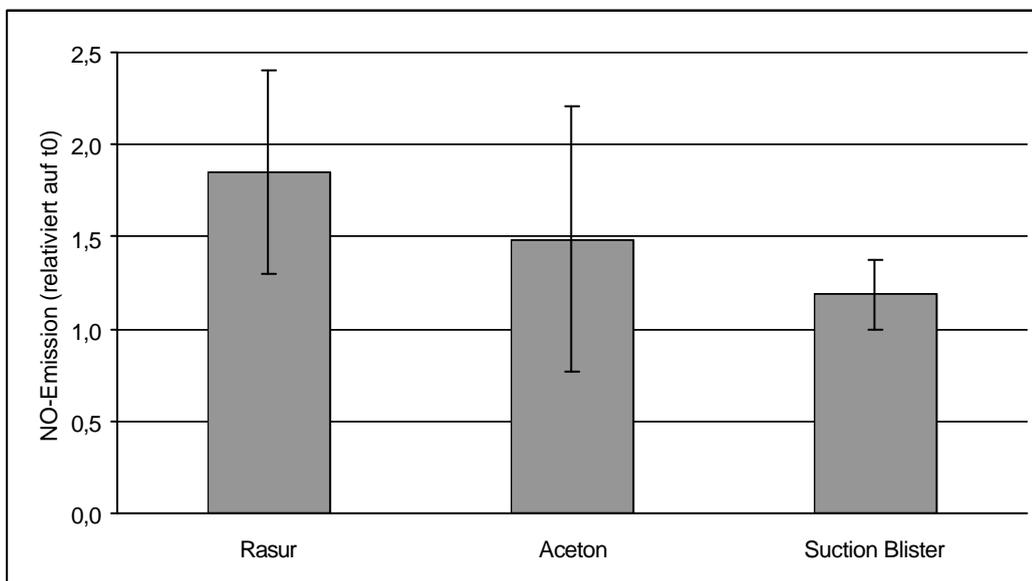


Abb. 22 Einfluss unterschiedlicher Arten der Hautschädigung auf die NO-Emission der Haut (n = 3)

5.1.4 Chemische Einflussfaktoren

5.1.4.1 Natriumlaurylsulfat

Bei drei Probanden wurde auf chemischem Weg eine Entzündung verursacht, indem 0,1 ml einer 2%igen Lösung von Natriumlaurylsulfat (SDS) für 24 h okklusiv auf ein Hautareal mit einem Durchmesser von 1,5 cm aufgebracht wurde. Vor und nach Behandlung der Haut mit dem hautreizenden Tensid wurden NO-Messungen durchgeführt. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abb. 23 dargestellt. Es kam zu einem Anstieg der NO-Werte von $2,2 \pm 0,4$ auf $2,7 \pm 0,1$ ppb. Das Ausmaß der Hautschädigung zeigte sich anhand von TEWL-Werten, die sich verdoppelt hatten.

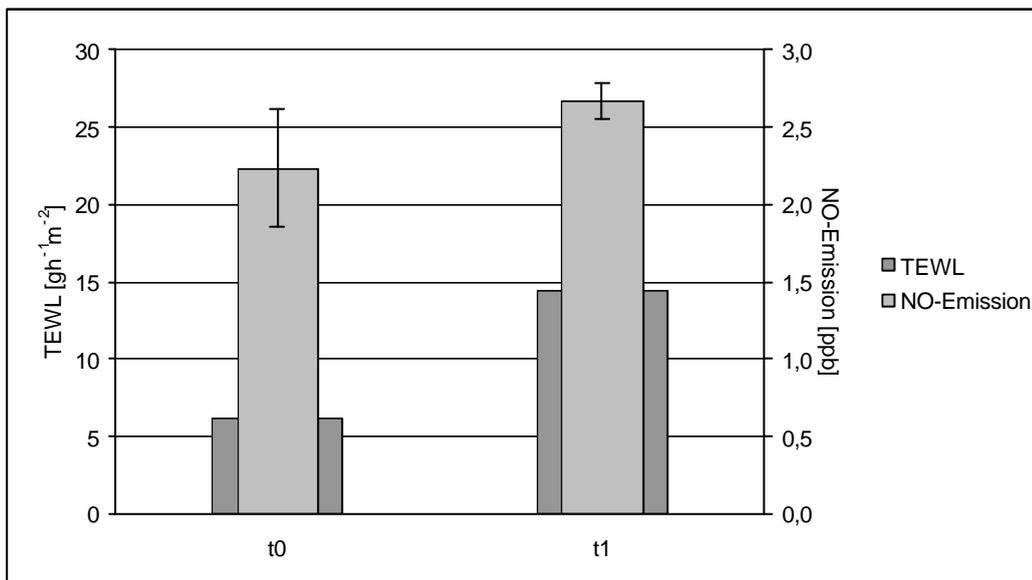


Abb. 23 TEWL- und NO-Werte vor und nach chemischer Induktion einer Entzündung (n = 3)

5.1.4.2 Wasserstoffperoxid

Hier wurde untersucht, inwiefern Behandlung mit 2%iger Wasserstoffperoxidlösung die NO-Emission der Haut beeinflusst. Bei vier Probanden wurden vor sowie ca. 2 min nach Behandlung des Messareals mit 50 μl H_2O_2 -Lösung (nach Einziehen bzw. Verdampfen des Lösungsmittels) NO-Messungen durchgeführt. Die H_2O_2 -Behandlung bewirkte eine Erhöhung der NO-Werte von $1,9 \pm 0,6$ auf $2,8 \pm 0,4$ ppb (s. Abb. 24). Bei einem Probanden wurden zudem UPE-Messungen in Abhängigkeit von H_2O_2 -Behandlung durchgeführt, wobei ebenfalls ein deutlicher Anstieg der Werte zu verzeichnen war.

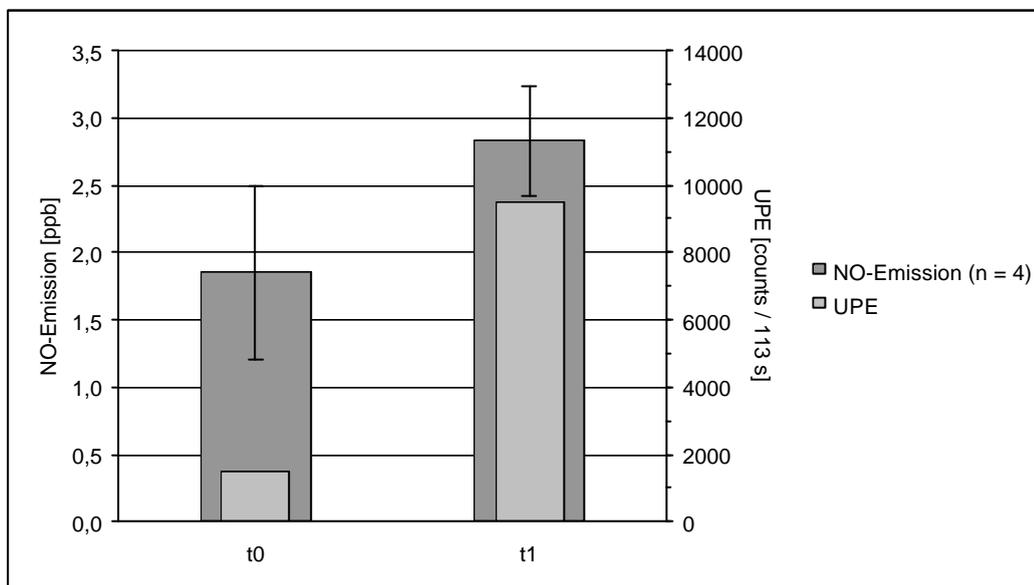


Abb. 24 NO- und UPE-Werte in Abhängigkeit von H_2O_2 -Behandlung

5.1.5 Einfluss individueller Disposition

5.1.5.1 Tageszeit

Zur Untersuchung, ob die NO-Emission der Haut einen circadianen Rhythmus aufweist, wurden im zeitlichen Abstand von 4 h an den Unterarmen von vier Probanden morgens, mittags und abends NO-Messungen durchgeführt. Abb. 25 zeigt, dass es im Laufe des Vormittags zu einem recht starken Absinken der NO-Werte von $0,7 \pm 0,4$ auf $0,3 \pm 0,1$ ppb kam, während sich die Werte am Nachmittag kaum noch veränderten.

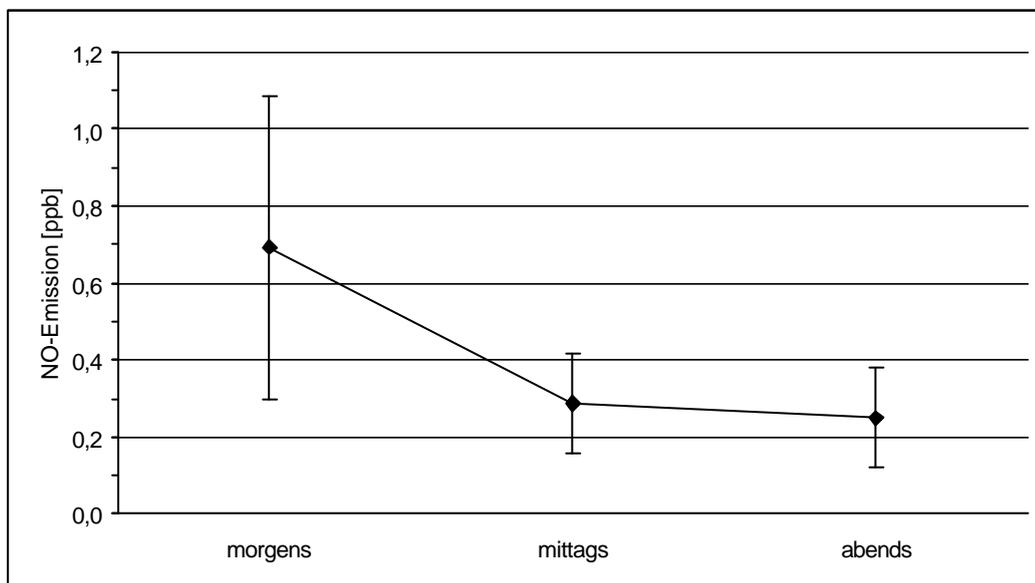


Abb. 25 Tageszeit-Abhängigkeit der NO-Emission der Haut (n = 4)

5.1.5.2 Körperregion

Da NO nachweislich nicht nur endogen, sondern auch auf der Hautoberfläche durch Reduktion von Nitrat aus dem Schweiß produziert wird, war angenommen worden, dass Körperregionen mit besonders hoher Schweißdrüsendichte, wie z. B. der Handteller, auch verstärkt NO emittieren. In der folgenden Abbildung ist zu sehen, dass dies bestätigt werden konnte.

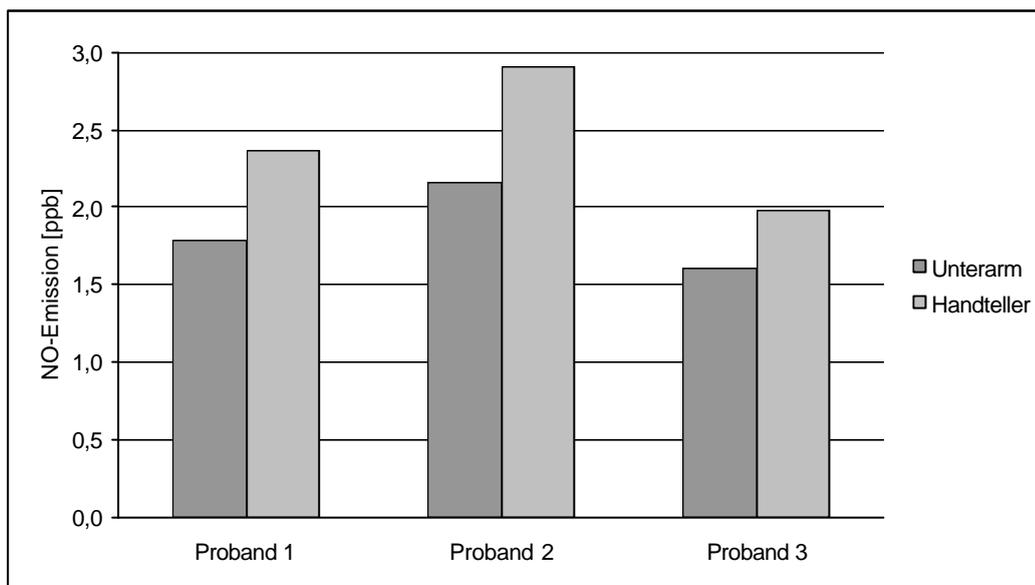


Abb. 26 Vergleich der NO-Emission von Unterarm und Handteller

5.1.5.3 Alter

In dieser Studie wurde untersucht, ob zwischen Lebensalter und NO-Emission der Haut ein Zusammenhang besteht. Hierzu wurden an den linken Unterarmen acht junger sowie acht älterer Probanden (Durchschnittsalter: 21,3 bzw. 73,9) NO-Messungen durchgeführt. Für das junge Probandenkollektiv ergaben sich zwar etwas höhere NO-Werte als für das ältere, dieser Unterschied erwies sich jedoch nicht als statistisch signifikant (s. Abb. 27).

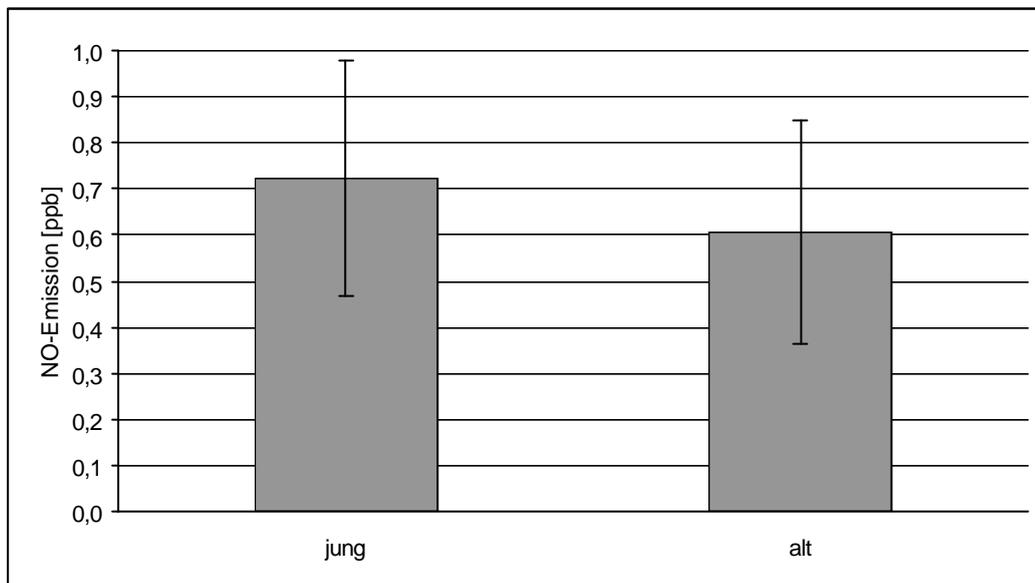


Abb. 27 Zusammenhang zwischen Alter und NO-Emission der Haut (n = 8)

5.1.5.4 Psoriasis

Zur Untersuchung des Einflusses der Hautkrankheit Schuppenflechte auf die NO-Emission der Haut wurden an den linken Unterarmen acht kranker und sieben gesunder Probanden NO-Messungen durchgeführt. Abb. 28 zeigt das Ergebnis dieser Studie. Die Psoriasis-Kranken emittierten $1,2 \pm 0,9$ ppb NO, die Hautgesunden dagegen lediglich $0,8 \pm 0,2$ ppb. Dieser Unterschied erwies sich jedoch nicht als signifikant.

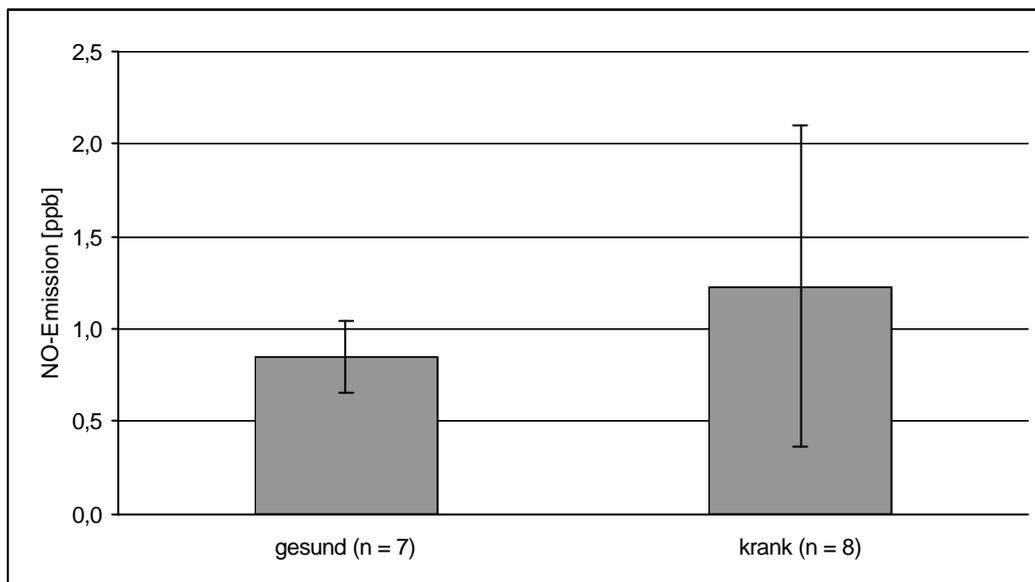


Abb. 28 Einfluss von Psoriasis auf die NO-Emission der Haut

5.1.5.5 Rauchen

Aktivrauchen

Ziel dieser Studie war die Untersuchung des Einflusses von Zigarettenrauchinhalation auf die NO-Emission der Haut. Hierzu wurden sowohl die Basiswerte der linken Unterarme eines Raucher- und eines Nichtraucherkollektivs miteinander verglichen als auch – bei den Rauchern wie bei den Nichtrauchern – NO-Messungen (Steady-State-Methode) vor und unmittelbar nach dem Rauchen einer Filterzigarette der Marke „Gauloises Blondes“ durchgeführt. Bedingung für die Raucher war, durchschnittlich nicht weniger als fünf Zigaretten am Tag zu rauchen, vor Studienbeginn jedoch mindestens 12 h nicht geraucht zu haben. Kontamination des Messareals mit Zigarettenrauch von außen wurde durch vollständiges Abdecken des linken Arms sowie Rauchen mit der rechten Hand im Freien ausgeschlossen. Abb. 29 zeigt, dass sich der Akuteffekt des Rauchens in einer leichten (nicht signifikanten) Abnahme der NO-Emission der Haut äußerte, bei den Rauchern in stärkerem Ausmaß als bei den Nichtrauchern. Dagegen war die Wirkung chronischen Rauchens eindeutig: Die Haut der Raucher wies mit $13,5 \pm 7,0$ ppb signifikant höhere NO-Werte auf als die der Nichtraucher ($8,6 \pm 5,0$ ppb; $p = 0,022$).

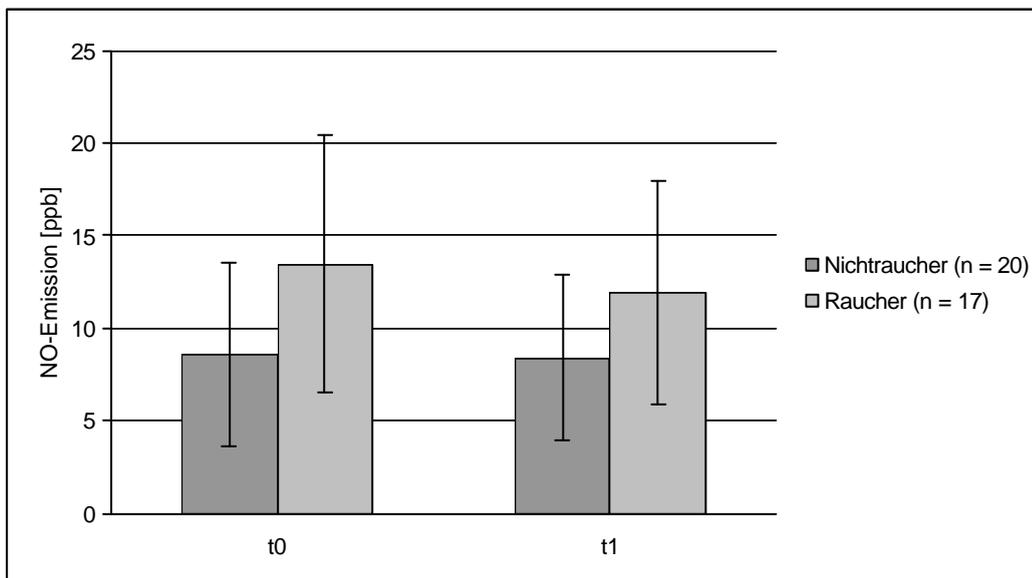


Abb. 29 Einfluss von Rauchen auf die NO-Emission der Haut

In einem Folgeexperiment wurde der Akuteffekt von Zigarettenrauchinhalation auf die UPE untersucht. Es wurden ausschließlich Raucher vor und nach dem Rauchen einer Zigarette vermessen. Aus Abb. 30 geht hervor, dass das Rauchen der Zigarette ein signifikantes – wenn auch geringes – Absinken der UPE-Werte zur Folge hatte ($p = 0,043$).

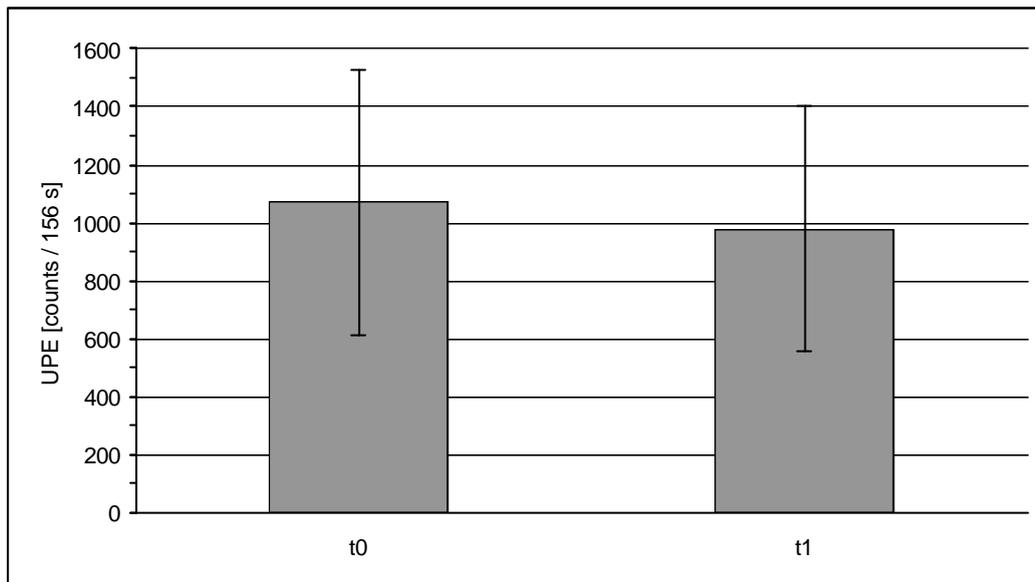


Abb. 30 UPE-Werte vor und nach Rauchen einer Zigarette ($n = 22$)

Passivrauchen

Als nächstes wurde untersucht, wie von außen an die Haut gelangender Zigarettenrauch die NO-Konzentration auf der Hautoberfläche beeinflusst. Mit der Stahlküvette wurden NO-Messungen an drei Probanden *in vivo* sowie *in vitro* (auf Glas) vor und nach 30 s Zigarettenrauchexposition durchgeführt. Die Messergebnisse sind in Abb. 31 zusammengefasst. Der Zigarettenrauch bewirkte bei Glas und Haut einen starken Anstieg der NO-Werte, der auf Haut aber entschieden ausgeprägter war.

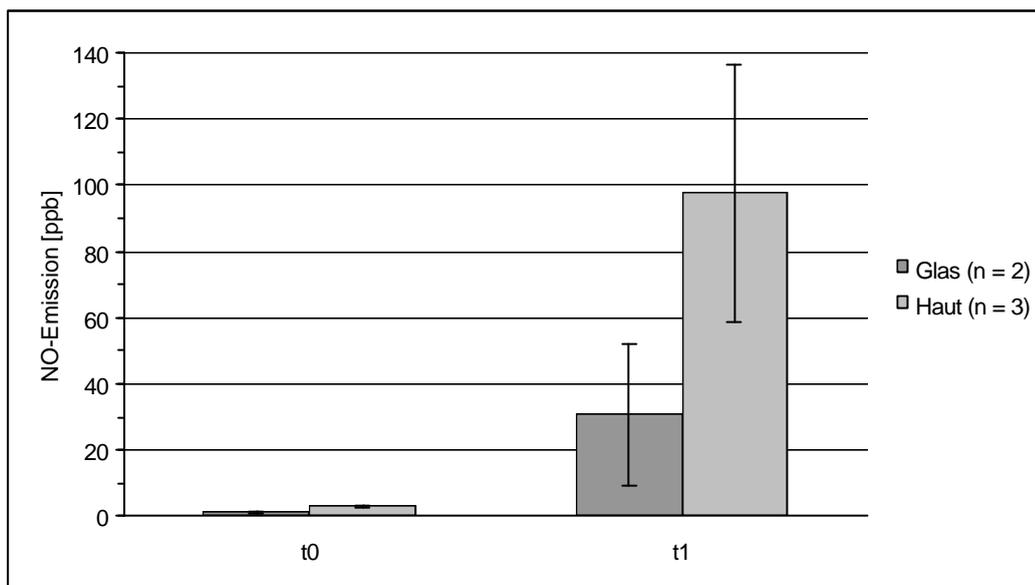


Abb. 31 NO-Werte vor und nach Zigarettenrauchexposition

Ergänzend hierzu wurden bei einem Probanden UPE-Messungen vor und nach Zigarettenrauchexposition durchgeführt. Das Resultat ist in Abb. 32 zu sehen. Der Zigarettenrauch bewirkte eine deutliche Zunahme der Photonenemission.

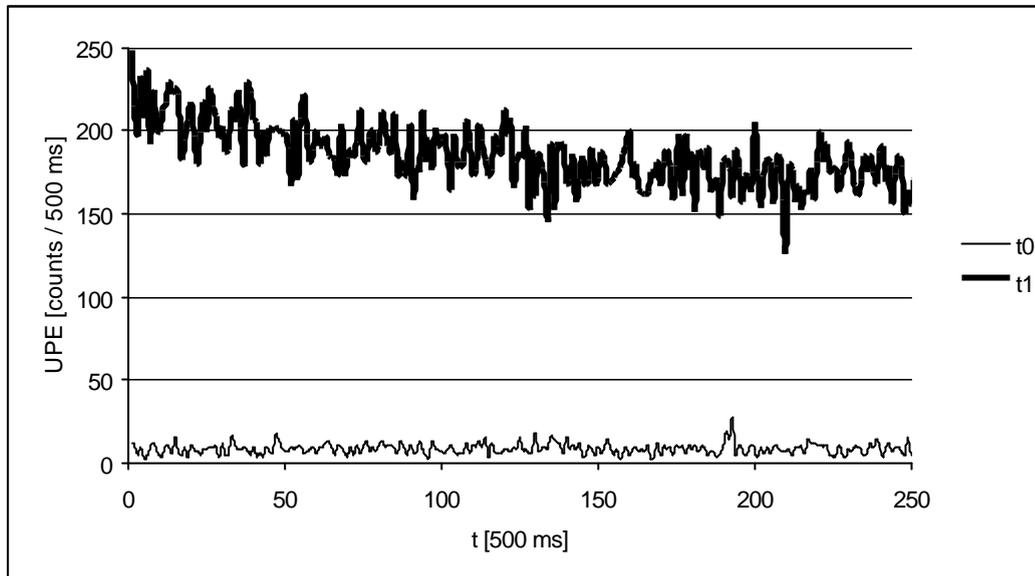


Abb. 32 UPE der Haut in Abhängigkeit von Zigarettenrauchexposition

Nicotin

Ziel dieses Experiments war die Untersuchung der Wirkung von Nicotin auf die NO-Emission der Haut. Hierzu wurden bei fünf Nichtrauchern NO-Messungen (Probenahme mittels Stahlrohr) vor und nach 3½ständigem Tragen von Nicotin-Pflastern (Nicotinell 3 \Rightarrow 17,5 mg Nicotin / 24 h) durchgeführt. Gemäß Abb. 33 war im Mittel eine Reduktion der NO-Emission der Haut durch das Nicotin-Pflaster zu verzeichnen.

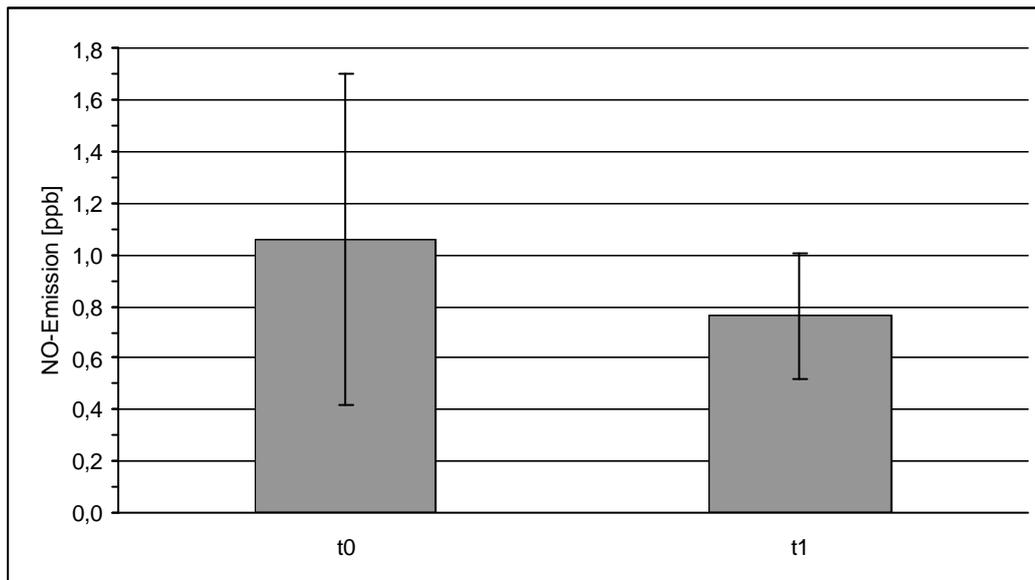


Abb. 33 Wirkung von Nicotin auf die NO-Emission der Haut (n = 5)

5.1.6 Einfluss kosmetischer Mittel

5.1.6.1 Hautpflegeprodukte

Der Einfluss einer klassischen O/W-Emulsion auf die NO-Emission der Haut wurde in Form eines Kurz- und eines Langzeittests untersucht. In beiden Fällen wurden zunächst die unbehandelten Unterarme der Probanden vermessen. Beim Kurzzeittest wurden auf ein Messareal einmalig 50 μ l Produkt aufgebracht, während ein anderes unbehandelt blieb. Bereits nach 1 h fand die t1-Messung statt. Im Langzeittest wurde die Emulsion über einen Zeitraum von einer Woche zweimal täglich angewendet und erst am Tag darauf wieder gemessen. Beide Testdesigns führten zu dem gleichen Ergebnis: Es war kein Unterschied zwischen behandelter und unbehaltener Haut feststellbar.

5.1.6.2 Wirkstoffe

Untersuchungen *in / ex vivo*

Zur Untersuchung des Einflusses topischer Applikation unterschiedlicher Antioxidantien auf die NO-Emission der Haut wurde mit 0,3% Vitamin E, 3% Vitamin C bzw. 0,3% AGR enthaltenden Produkten ein Kurzzeittest durchgeführt. Mit Vitamin C und AGR fand zudem ein Langzeittest statt. Für die Vitamin-E-Studie standen fünf Probanden zur Verfügung, für Vitamin C neun, und das AGR-Kollektiv umfasste zehn Probanden. Zunächst wurden die unbehandelten Unterarme vermessen. Dann wurden definiert 50 µl wirkstoffhaltiges Produkt bzw. das entsprechende Placebo auf die Messareale aufgebracht. 2 h nach dieser einmaligen Produktapplikation (Kurzzeittest) sowie im Falle des Langzeittests nach einer Woche zweimal täglicher Produktanwendung (mit Ausnahme des Messtages) wurden weitere NO-Messungen durchgeführt. Das Vitamin-C-haltige Produkt bewirkte innerhalb von 2 h nach einmaliger Anwendung eine hochsignifikante Erhöhung der NO-Werte um mehr als Faktor 5, während bei den beiden anderen wirkstoffhaltigen Präparaten im Vergleich zu den entsprechenden Placebos kein Unterschied feststellbar war (s. Abb. 34). Abb. 35 zeigt, dass einwöchige Behandlung mit Vitamin C zwar auch zu einem Anstieg der NO-Werte führte, jedoch lediglich um ca. 85% und nicht signifikant. Eine statistisch signifikante Zunahme der NO-Emission der Haut um fast 40% wurde dagegen im AGR-Langzeittest erzielt ($p = 0,044$).

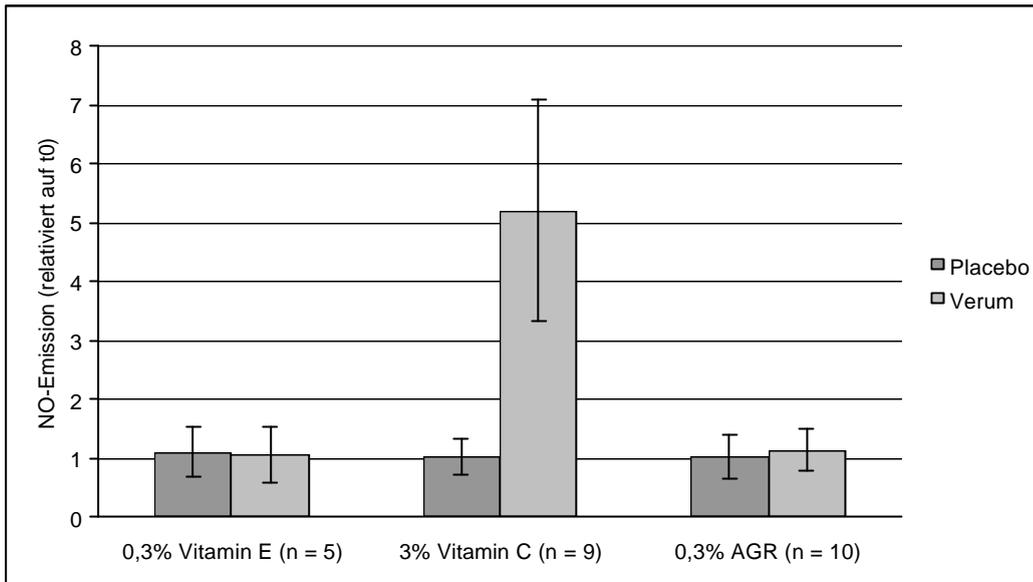


Abb. 34 Wirkung verschiedener Antioxidantien auf die NO-Emission der Haut (Kurzzeittest)

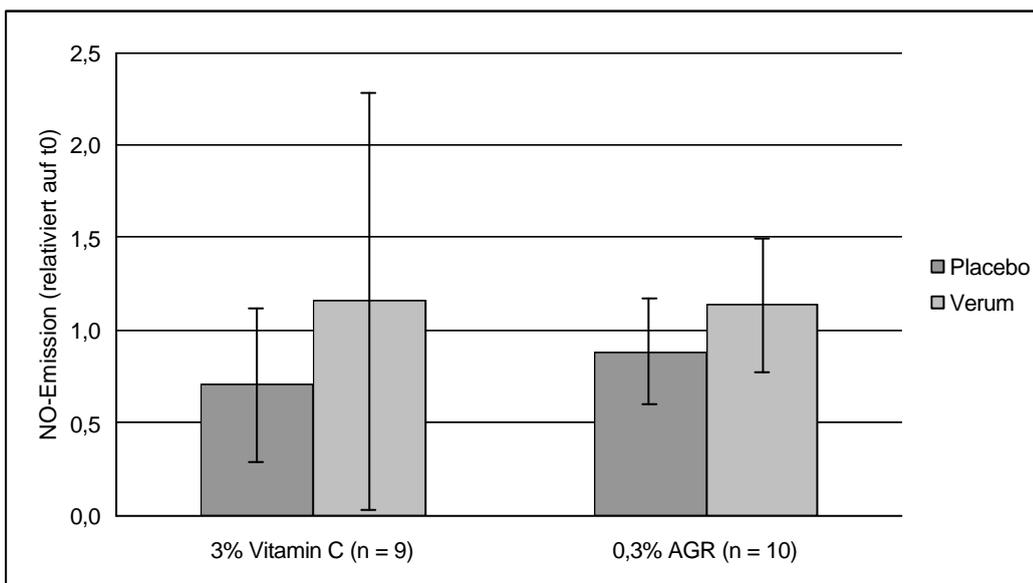


Abb. 35 Wirkung von Vitamin C und AGR auf die NO-Emission der Haut (Langzeittest)

Ergänzend zu dieser Studie wurden weitere Experimente durchgeführt, um aufzuklären, auf welchen Mechanismus der starke Anstieg der NO-Werte innerhalb von 2 h nach einmaliger Vitamin-C-Applikation zurückzuführen ist. Bei einem Probanden wurde die NO-Emission der Haut in unterschiedlichen Zeitintervallen (sofort, 30 min, 1 h, 2 h und 4 h) nach Behandlung mit Vitamin C bestimmt. Die NO-Sammlungsdauer betrug in diesem Fall nur 10 min. In Abb. 36 ist zu sehen, dass die NO-Werte unmittelbar nach Anwendung des Vitamin-C-haltigen Produktes stark anstiegen, nach 30 – 60 min ihr Maximum erreichten und dann wieder rapide abfielen. Im Anschluss daran wurde der Versuch *ex vivo* auf Schweinehaut wiederholt. Auch hierbei nahmen die NO-Werte zu, jedoch deutlich langsamer als auf Humanhaut *in vivo*, so dass das Maximum erst nach 2 h erreicht war.

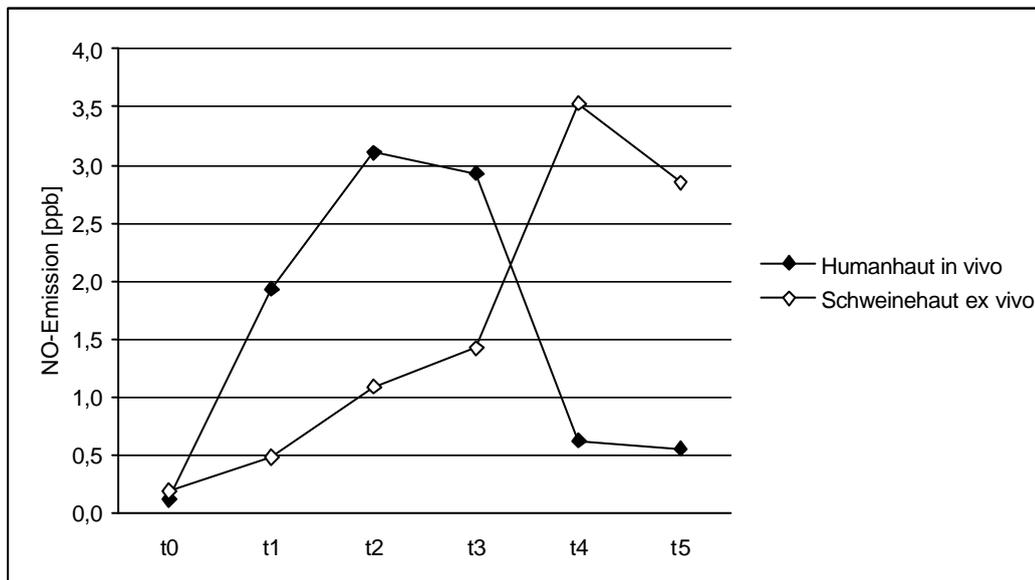


Abb. 36 Vitamin-C-Kinetik auf Humanhaut *in vivo* sowie Schweinehaut *ex vivo*

t1: sofort nach Behandlung

t2: 30 min nach Behandlung

t3: 1 h nach Behandlung

t4: 2 h nach Behandlung

t5: 4 h nach Behandlung

Untersuchungen *in vitro*

Bei Applikation von Vitamin C enthaltendem Produkt *in vitro* (auf Glas bzw. Edelstahl) konnte sofort nach Behandlung zwar kein Vitamin-C-Effekt festgestellt werden, 2 h später war jedoch eine große Zunahme der NO-Werte zu verzeichnen – unabhängig vom verwendeten Material. Außerdem wurde ein 24-h-Wert aufgenommen, der sogar noch etwas höher lag (s. Abb. 37).

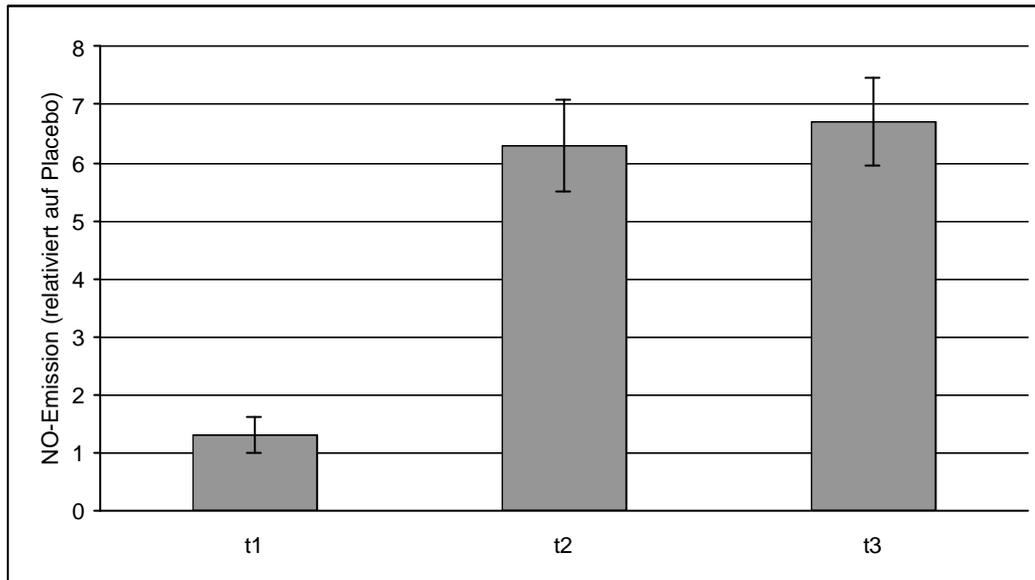


Abb. 37 Vitamin-C-Kinetik auf Glas (n = 2)

t1: sofort nach Behandlung

t2: 2 h nach Behandlung

t3: 24 h nach Behandlung

Zur Erklärung dieses Phänomens wurde untersucht, ob der Gasraum über der Probe einen Einfluss hat. In einem ersten Versuch hierzu wurde die Küvette vor der Messung statt mit gefilterter Raumluft mit Stickstoff durchgespült und auch Stickstoff als Trägergas verwendet. Dies brachte jedoch keine Veränderung. Daraufhin wurden die Umgebungsbedingungen nach Produktapplikation variiert. Die Probe wurde unter ungefilterter Raumluft, gefilterter Raumluft, Stickstoff bzw. Argon aufbewahrt. Das Ergebnis ist in Abb. 38 dargestellt: Je „sauberer“ der die Probe während der Lagerung umgebende Gasraum war, desto niedriger waren auch die Messwerte.

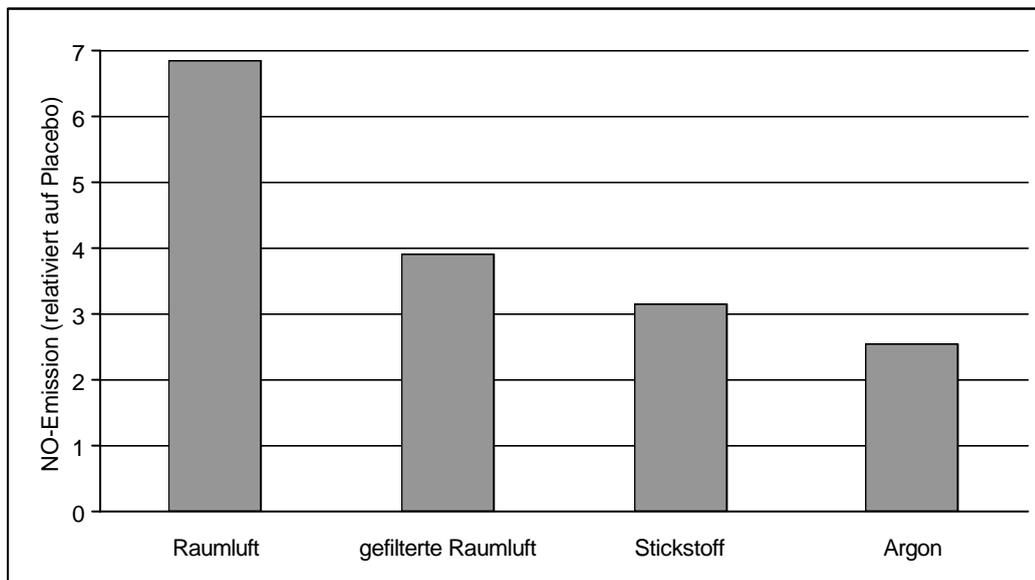


Abb. 38 Vitamin-C-Effekt in Abhängigkeit von der Lageratmosphäre

Ein weiteres Experiment diente der Untersuchung des Einflusses der Produktmatrix auf die NO-Werte. Es wurden sowohl die 3% Vitamin C enthaltende Emulsion als auch eine 3%ige wässrige Vitamin-C-Lösung auf Glas aufgetragen (je 50 μ l) und jeweils 2 h nach der Behandlung NO-Messungen durchgeführt. Für die Emulsion ergaben sich 6,0 ppb NO, für die wässrige Lösung 6,1 ppb. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die Produktmatrix für den Vitamin-C-Effekt verantwortlich ist.

Abschließend wurde untersucht, ob der Vitamin-C-Effekt auf die reduzierenden Eigenschaften der Ascorbinsäure zurückzuführen ist, indem eine 3%ige wässrige Lösung von L(+)-Ascorbinsäure mit ebenfalls reduzierend wirkender Kaliumiodidlösung gleicher Konzentration verglichen wurde. Wie aus Abb. 39 ersichtlich, führte die Vitamin-C-Lösung wieder zu einem deutlichen Ansteigen der NO-Konzentration, während bei der Iodidlösung praktisch kein Effekt feststellbar war.

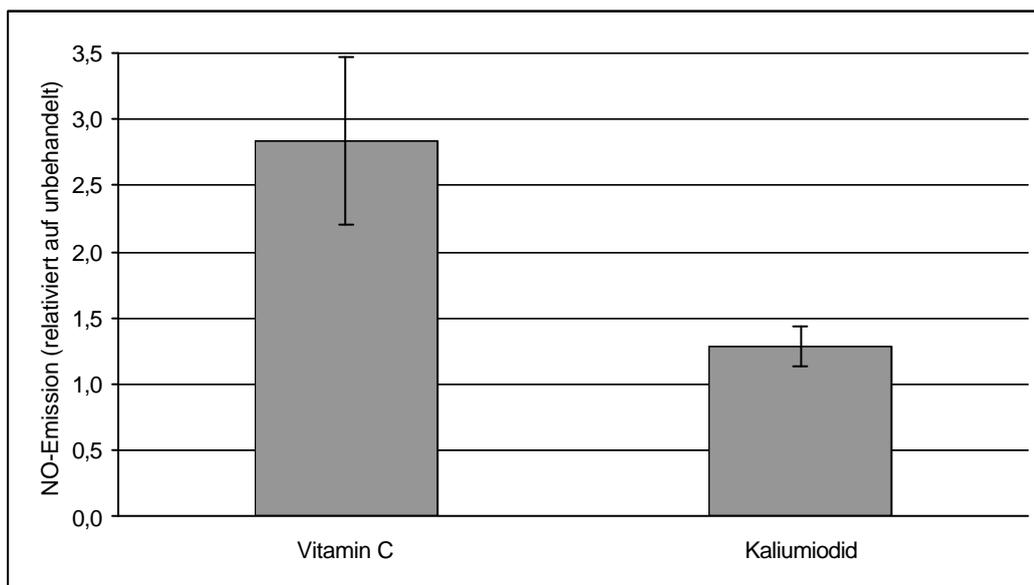


Abb. 39 Einfluss der reduzierenden Eigenschaften von Ascorbinsäure auf den Vitamin-C-Effekt (n = 2)

5.2 Untersuchung potentieller CO₂-Einflussfaktoren

5.2.1 Physikalisch-chemische Einflussfaktoren

5.2.1.1 Temperatur

Zur Untersuchung des Einflusses der Hauttemperatur auf die CO₂-Emission wurde bei drei Probanden zunächst eine CO₂-Messung bei RT durchgeführt. Dabei ergaben sich $0,24 \pm 0,04$ ppm CO₂. Anschließend wurde ein zweites Mal an derselben Stelle gemessen, das Hautareal währenddessen jedoch warm geföhnt, was einen Anstieg der CO₂-Werte auf $0,35 \pm 0,08$ ppm zur Folge hatte (s. Abb. 40).

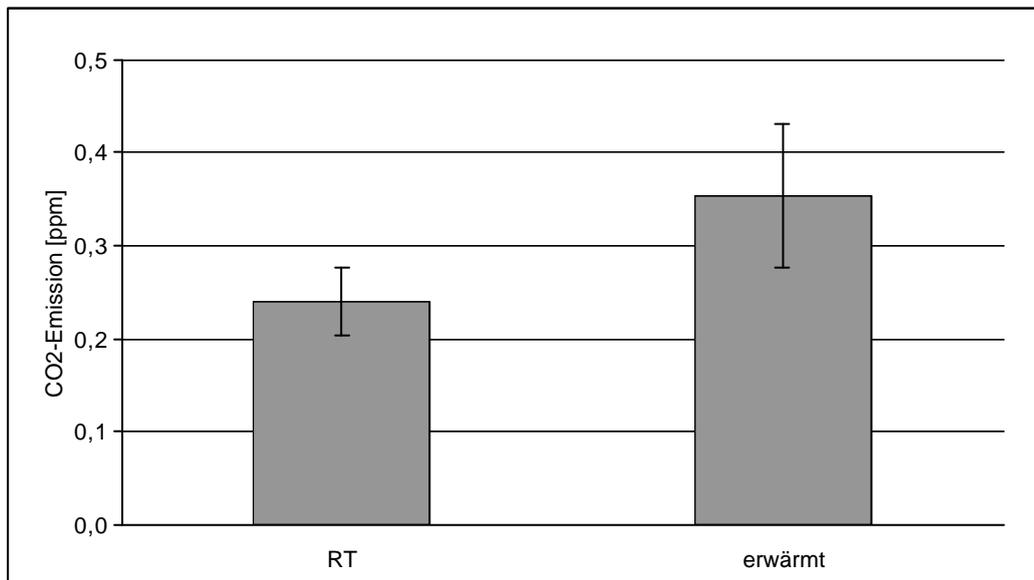


Abb. 40 Temperaturabhängigkeit der CO₂-Emission der Haut (n = 3)

5.2.1.2 Feuchtigkeit

Nach einer t_0 -Messung wurde der Unterarm eines Probanden für 5 min in Wasser gebadet, abgetrocknet und sofort sowie nach 30 und 60 min vermessen. Neben CO_2 wurde die Hautfeuchte bestimmt. Abb. 41 zeigt das Ergebnis dieses Experiments. Sowohl der Corneometer- als auch der CO_2 -Wert stiegen durch die Hautbefeuchtung stark an. Die Hautfeuchte hatte bereits nach 30 min wieder ihren Ausgangswert erreicht, während dies beim CO_2 auch nach 60 min noch nicht ganz der Fall war.

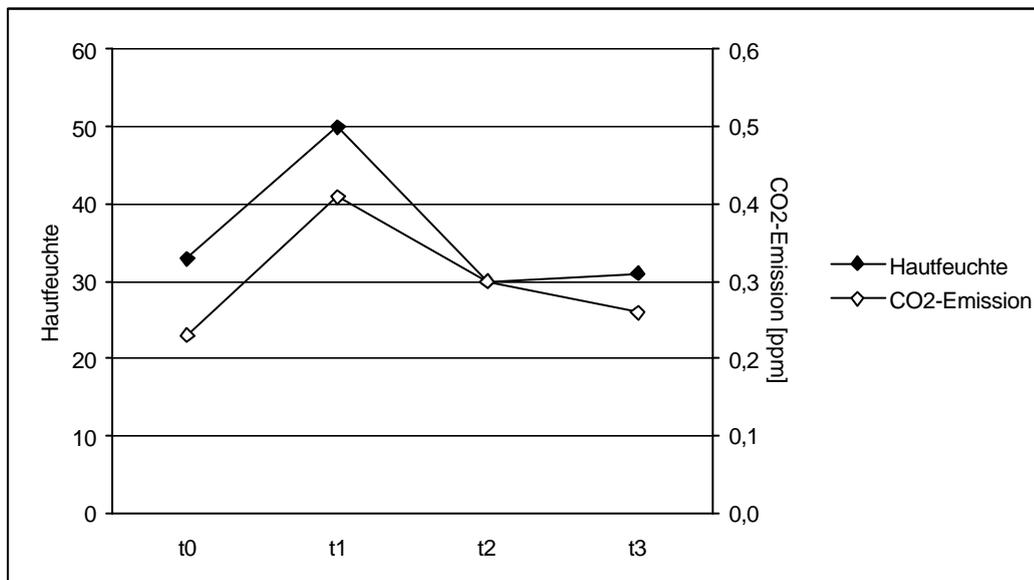


Abb. 41 Hautfeuchte und CO_2 -Emission der Haut vor und nach fünfminütigem Wasserbad

t_1 : sofort nach Wasserbad

t_2 : 30 min nach Wasserbad

t_3 : 60 min nach Wasserbad

5.2.1.3 pH-Wert

Der Einfluss des pH-Wertes der Hautoberfläche auf die CO₂-Emission der Haut wurde untersucht, indem bei drei Probanden jeweils ein Messareal mit 50 µl einer auf einen pH-Wert von 5 eingestellten Creme, ein anderes mit dem entsprechenden pH-9-Produkt behandelt wurde. Es wurden sowohl pH- als auch CO₂-Messungen vor sowie 15 min nach der Behandlung durchgeführt. In Abb. 42 ist zu sehen, dass mit der pH-5-Creme im Mittel ein Haut-pH-Wert von 5,2 und mit dem pH-9-Produkt ein mittlerer Haut-pH von 6,4 erzielt wurde. Die auf t₀ relativierten CO₂-Werte des pH-5-Hautareals waren mit $1,11 \pm 0,06$ deutlich höher als die des mit der pH-9-Creme behandelten Areals ($0,91 \pm 0,08$).

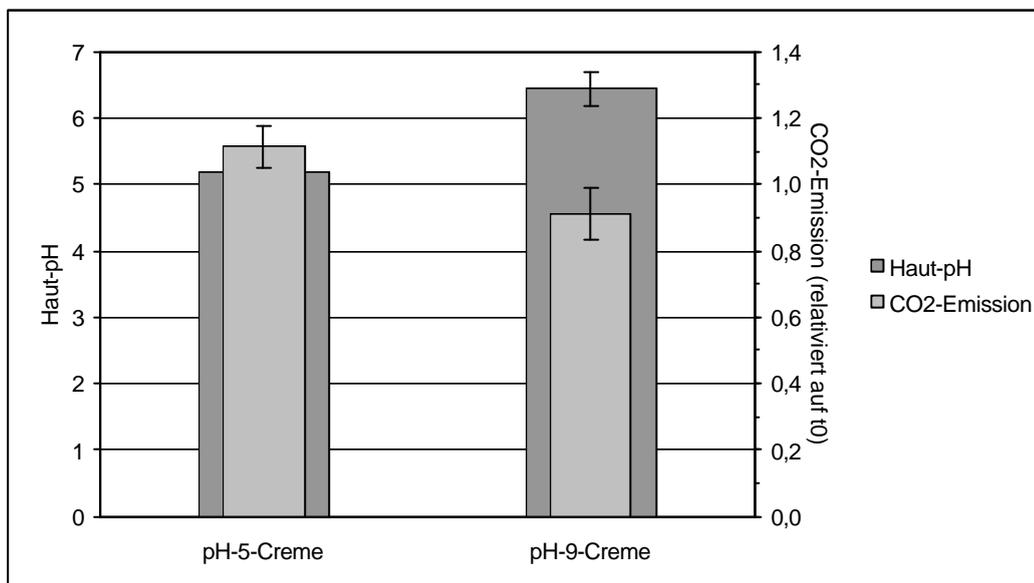


Abb. 42 Zusammenhang zwischen pH-Wert der Hautoberfläche und CO₂-Emission der Haut (n = 3)

5.2.1.4 Hautbarriere

Ziel der folgenden Untersuchungen war festzustellen, ob der Zustand der Hautbarriere einen Einfluss auf die CO₂-Emission der Haut hat. Hierzu wurde die Hautbarriere mit unterschiedlichen Mitteln geschädigt und verfolgt, ob sich dies auf die CO₂-Werte auswirkt.

tesa[®]-Stripping

Für das tesa[®]-Stripping wurden tesa[®]-Film-Streifen der Maße 5 cm x 10 cm auf die Haut geklebt, durch fünfmaliges Hin- und Herbewegen einer 1-kg-Andrückrolle ange-drückt und anschließend wieder abgezogen. Je Proband wurden von einem Hautareal nacheinander fünf tesa[®]-Strips genommen. In allen vier Fällen führte die Barriere-schädigung durch tesa[®]-Stripping zu einem Anstieg der CO₂-Werte (s. Abb. 43).

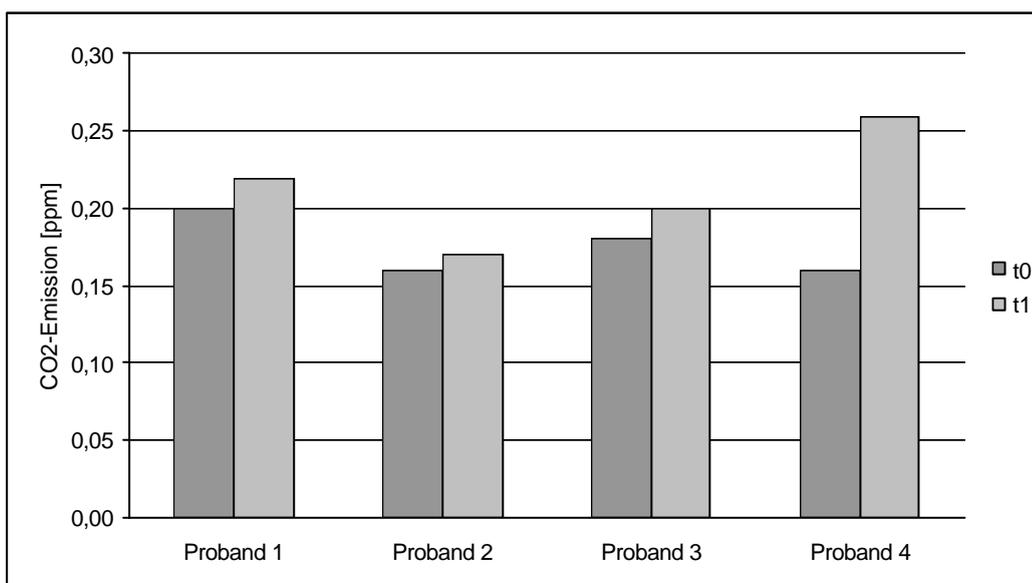


Abb. 43 CO₂-Emission der Haut vor und nach fünfmaligem tesa[®]-Stripping

Rasur

Eine andere Möglichkeit der Barrierschädigung stellt das hundertmalige Rasieren eines Hautareals mit einem Einmalrasierer dar. Bei drei Probanden wurden vor sowie sofort und 30 min nach der Barrierschädigung TEWL- und CO₂-Werte aufgenommen. Abb. 44 zeigt, dass unmittelbar nach dem Rasieren ein deutlicher Anstieg bei der Messparameter zu verzeichnen war, die Werte jedoch nach 30 min bereits wieder sanken.

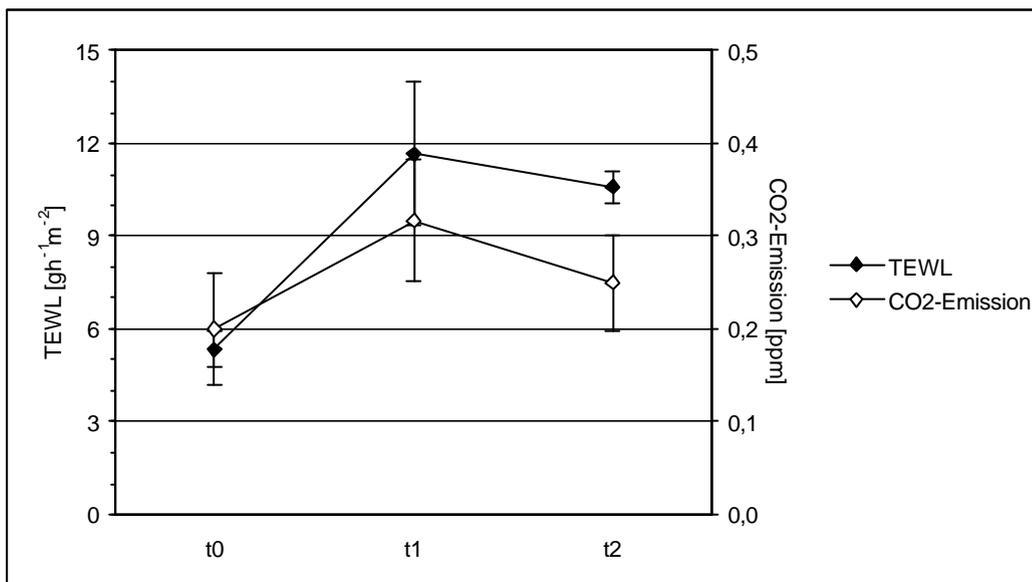


Abb. 44 TEWL- und CO₂-Werte vor und nach Barrierschädigung durch Rasur (n = 3)

t₁: sofort nach Rasur

t₂: 30 min nach Rasur

5.2.2 Einfluss der Durchblutung

5.2.2.1 Reibung

Zunächst wurde die Durchblutung der Haut mechanisch mittels Reibung angeregt, indem bei drei Probanden 10 s lang kräftig mit einem Frottiertuch über die Haut gerieben wurde. Vorher sowie im direkten Anschluss daran wurde jeweils eine CO₂-Messung durchgeführt. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 45 dargestellt. Reibung bewirkte bei allen Probanden eine Zunahme der CO₂-Emission der Haut.

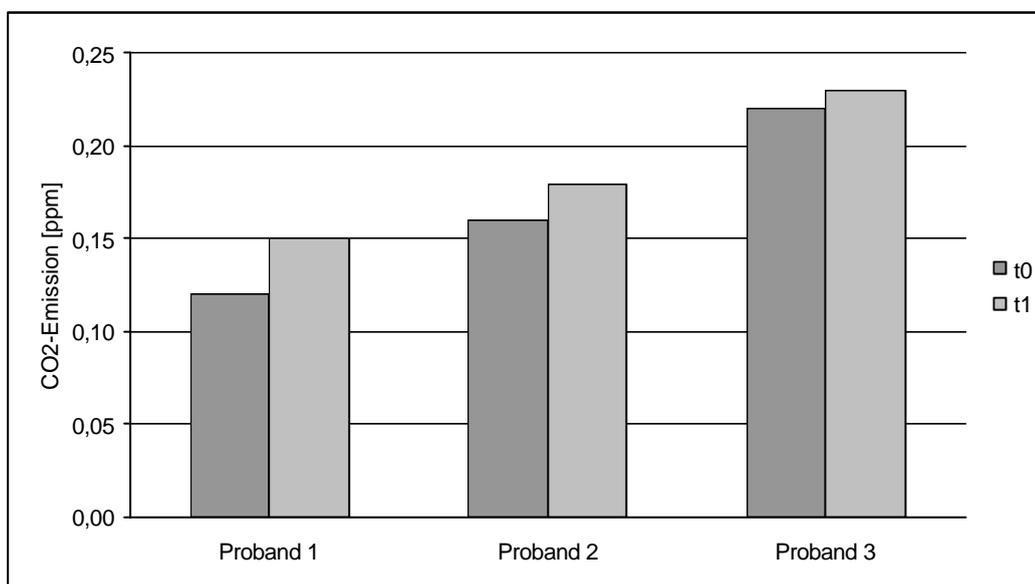


Abb. 45 Einfluss von Reibung auf die CO₂-Emission der Haut

5.2.2.2 Nicotinsäureester

In einem zweiten Experiment wurde die Durchblutung der Haut chemisch durch topische Applikation des durchblutungsfördernd wirkenden Nicotinsäureesters Methylnicotinat stimuliert. Hierzu wurden bei drei Probanden jeweils 50 µl einer 0,05% Methylnicotinat enthaltenden Creme bzw. des entsprechenden Placebos auf das Messareal aufgebracht. Vor sowie 30 min nach der Behandlung, als eine deutliche Hautrötung zu verzeichnen war, wurden die Hautfeuchte und die CO₂-Emission der Haut gemessen. Abb. 46 zeigt, dass das nicotinathaltige Präparat im Vergleich zum Placebo bei allen Probanden – trotz Zunahme der Hautfeuchte (s. 5.2.1.2) – eine Reduktion der CO₂-Werte bewirkte.

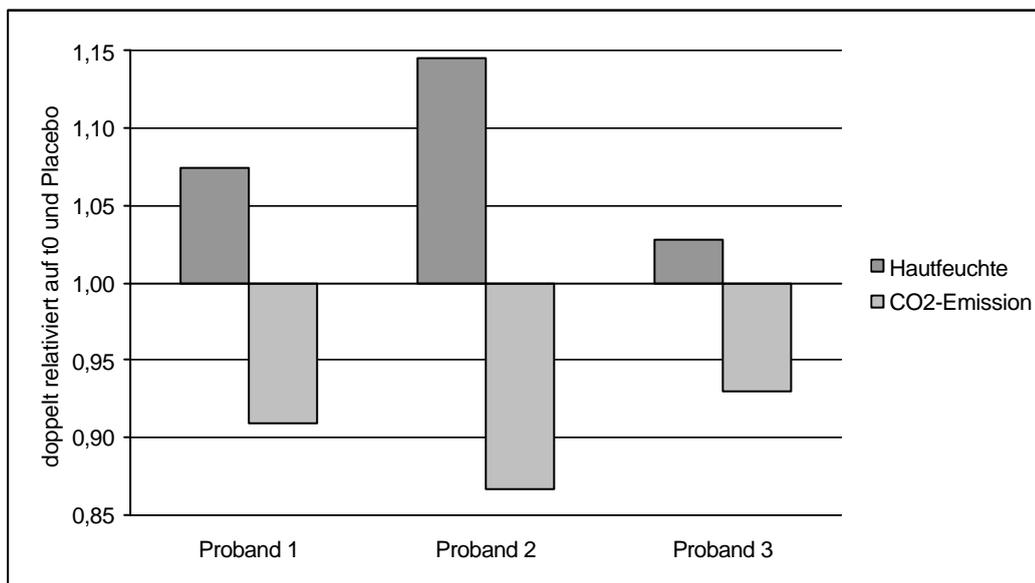


Abb. 46 Hautfeuchte und CO₂-Emission nach Durchblutungsförderung mit 0,05% Methylnicotinat

5.2.3 Einfluss von UV-Strahlung

5.2.3.1 UV-A-Strahlung

Zuerst wurde untersucht, ob unmittelbar nach einmaliger UV-A-Exposition eine Veränderung der CO₂-Werte feststellbar ist. Hierzu wurden drei Probanden vor sowie unmittelbar nach 45 s UV-A-Bestrahlung (Strahlungsleistung: 18,5 mW/cm²) vermessen. Das Ergebnis ist in Abb. 47 dargestellt. Direkt nach einmaliger UV-A-Exposition war bei allen Probanden eine leichte Erhöhung der CO₂-Werte zu verzeichnen.

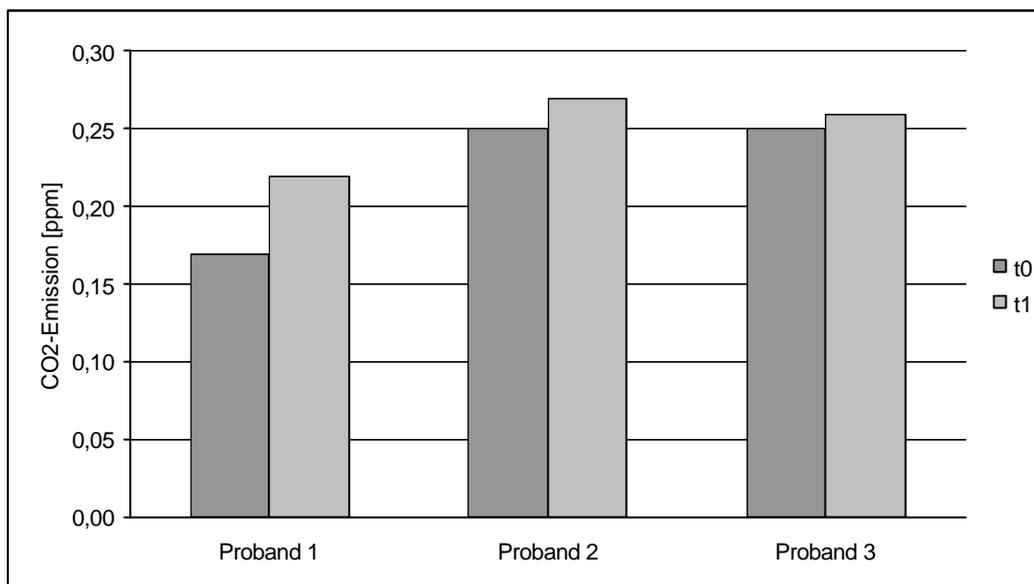


Abb. 47 CO₂-Werte vor und sofort nach einmaliger UV-A-Bestrahlung mit 0,8 J/cm²

Als nächstes wurde bei sieben Probanden je ein Unterarmareal über einen Zeitraum von 19 Tagen repetitiv UV-A-Strahlung steigender Dosis (Gesamtstrahlungs-dosis: ca. 400 J/cm²) ausgesetzt. Vor und ca. 24 h nach dem Bestrahlungsblock wurden sowohl auf dem bestrahlten Hautareal als auch auf einem unbestrahlten Kontrollareal CO₂-Messungen durchgeführt. Relativiert auf t₀ ergaben sich für den unbestrahlten Unterarm im Mittel $1,12 \pm 0,26$ und für das bestrahlte Areal $1,11 \pm 0,19$ ppm CO₂. Folglich hat repetitive UV-A-Bestrahlung keinen Einfluss auf die CO₂-Emission der Haut.

5.2.3.2 Sonnensimulator

Abschließend wurde untersucht, inwiefern UV-Bestrahlung mit 1,3 MED die CO₂-Emission der Haut beeinflusst. Zunächst wurde bei sieben Probanden die CO₂-Emission unbestrahlter Haut bestimmt. Weitere CO₂-Messungen fanden unmittelbar, 3, 6 und 24 h nach der UV-Exposition statt. Die bestrahlten Hautareale wiesen zwar zu jedem Zeitpunkt t1 bis t4 nach UV-Exposition etwas niedrigere CO₂-Werte auf als die unbestrahlten Kontrollareale (s. Abb. 48), lt. gepaartem t-Test waren jedoch zu keinem der vier Messzeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen bestrahlt und unbestraahlt nachweisbar.

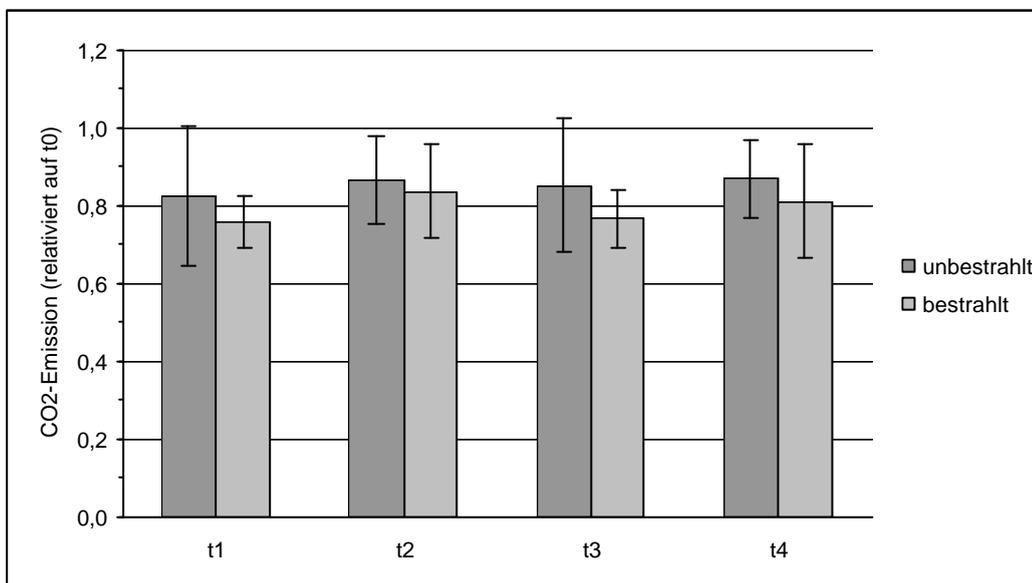


Abb. 48 Einfluss von UV-Bestrahlung mit 1,3 MED auf die CO₂-Emission der Haut (n = 7)

t1: sofort nach Bestrahlung

t2: 3 h nach Bestrahlung

t3: 6 h nach Bestrahlung

t4: 24 h nach Bestrahlung

5.2.4 Einfluss der Hautbakterien

Zur Untersuchung des Einflusses der cutanen Bakterienflora auf die CO₂-Emission der Haut wurde bei vier Probanden jeweils ein Unterarm mit Sterillium[®] Virugard desinfiziert. Gemessen wurde vor sowie 30 min nach der Desinfektion. Abb. 49 zeigt, dass die Sterillium[®]-Behandlung bei allen Probanden zu einer deutlichen Verringerung der CO₂-Werte führte.

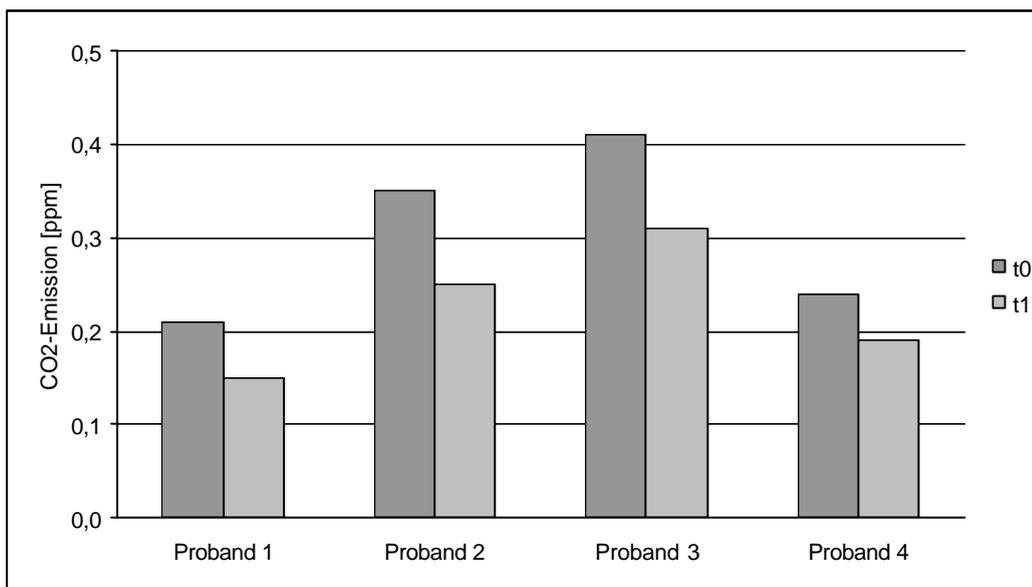


Abb. 49 CO₂-Werte vor und 30 min nach Desinfektion der Haut mit Sterillium[®] Virugard

5.2.5 Einfluss individueller Disposition

5.2.5.1 Körperregion

Bei vier Probanden wurde ein direkter Vergleich der CO₂-Emission von Unterarm und Wade durchgeführt. In allen Fällen ergaben sich an der Wade niedrigere CO₂-Werte als am Unterarm (s. Abb. 50).

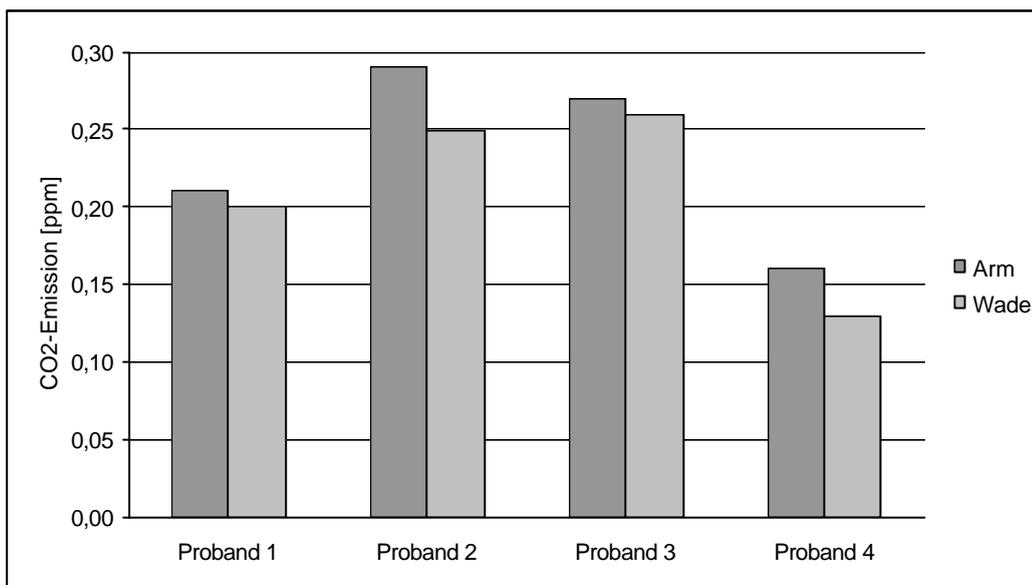


Abb. 50 Vergleich der CO₂-Emission von Unterarm und Wade

5.2.5.2 Alter

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Altersabhängigkeit der CO₂-Emission der Haut. Hierzu wurden die Unterarme zehn junger (unter 25 Jahre alt) sowie neun älterer Probanden (über 70 Jahre alt) vermessen. Neben den CO₂-Messungen wurden corneometrische Messungen zur Bestimmung der Hautfeuchte durchgeführt. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Das junge Probandenkollektiv wies im Vergleich zu den älteren Probanden zwar eine hochsignifikant geringere Hautfeuchtigkeit auf, zeigte jedoch ein signifikant größeres Ausmaß an CO₂-Emission (jung: $0,31 \pm 0,06$ ppm, alt: $0,25 \pm 0,02$ ppm; $p = 0,020$).

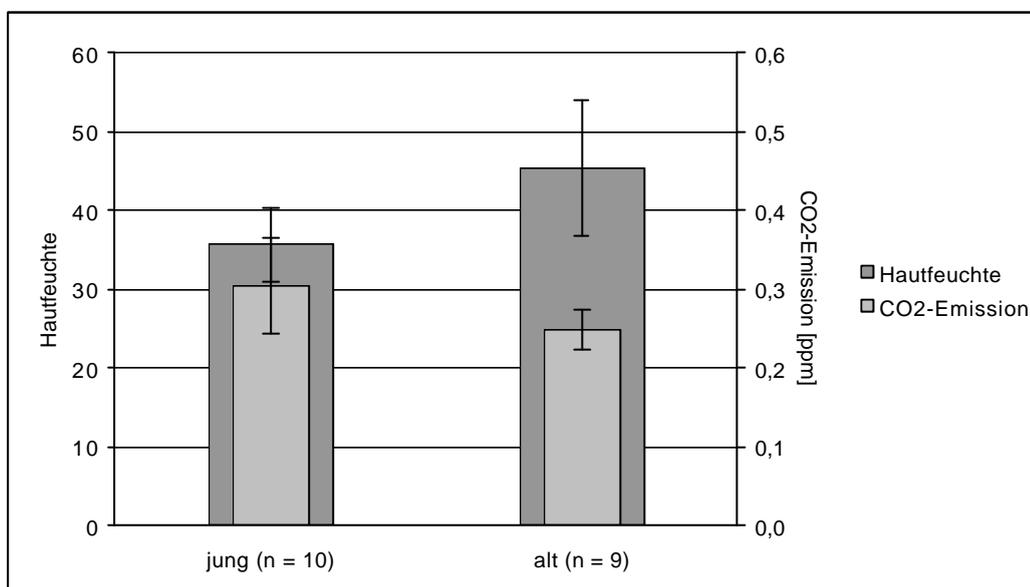


Abb. 51 Altersabhängigkeit von Hautfeuchte und CO₂-Emission der Haut

5.2.5.3 Ethnische Herkunft

Es wurde untersucht, ob sich die Unterarmhaut von Kaukasiern, Asiaten (vorwiegend Philippiner) und Schwarzafrikanern ungefähr gleichen Alters hinsichtlich ihrer CO₂-Emission unterscheidet. In Abb. 52 ist zu sehen, dass sich bei Kaukasiern und Asiaten im Mittel der gleiche Wert, nämlich $0,22 \pm 0,04$ ppm CO₂ ergab, während bei den Probanden aus Schwarzafrika ein mittlerer CO₂-Wert von $0,26 \pm 0,04$ ppm gemessen wurde. Leider erwies sich der Unterschied zwischen Kaukasiern/Asiaten und Schwarzafrikanern mit $p = 0,055$ bzw. $p = 0,071$ jedoch nicht als signifikant.

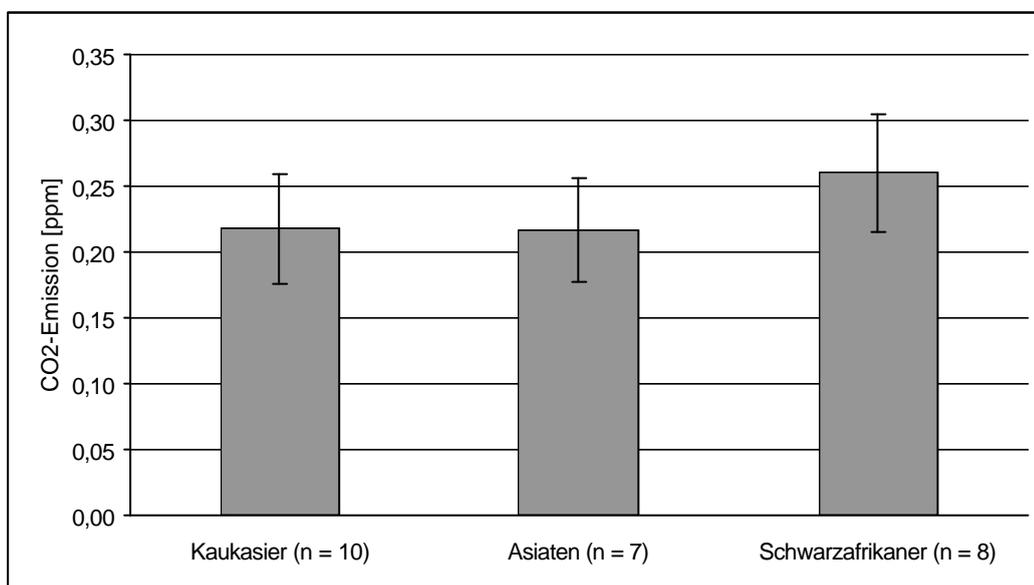


Abb. 52 Vergleich der CO₂-Emission von Probanden unterschiedlicher ethnischer Herkunft

5.2.6 Einfluss kosmetischer Mittel

5.2.6.1 Öle

Ziel dieses Experiments war herauszufinden, ob topisch auf die Haut aufgebracht Pflanzenöl die Haut weniger verschließt, also besser „atmen“ lässt als Mineralöl. Hierzu wurden 15 µl Gelb-, Mandel- und Sonnenblumenöl auf die Haut dreier Probanden pipettiert und gleichmäßig auf dem Messareal verteilt. Nach 5 min wurden dann CO₂-Messungen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 53 dargestellt. Wider Erwarten erwies sich das Mineralöl als durchlässiger für CO₂ als die beiden getesteten Pflanzenöle.

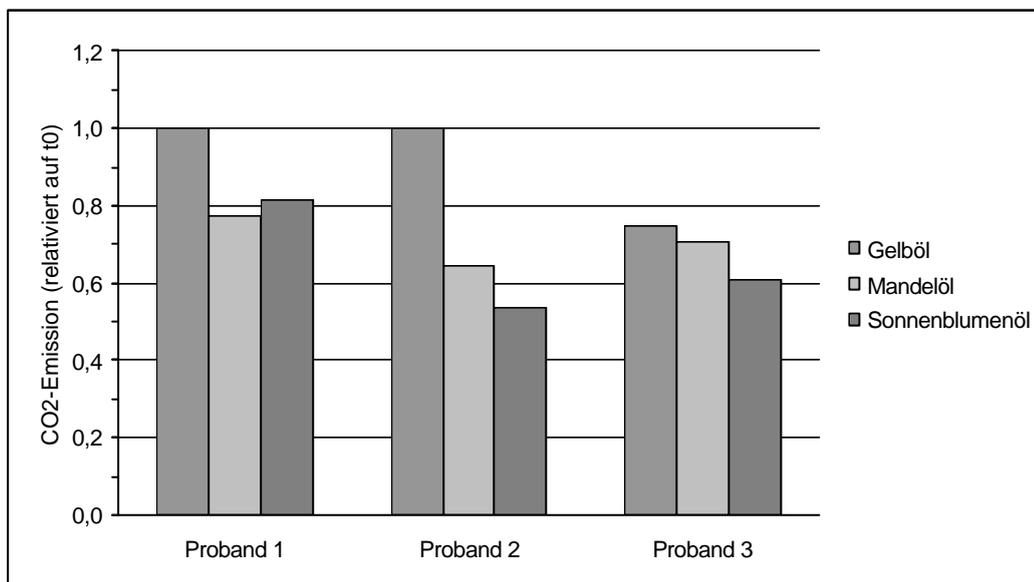


Abb. 53 Einfluss verschiedener topisch applizierter Öle auf die CO₂-Emission der Haut

5.2.6.2 Hautpflegeprodukte

Hautpflegecreme

Die Wirkung einer klassischen O/W-Emulsion auf die CO₂-Emission der Haut wurde sowohl mit fünf Probanden in einem Kurzzeittest als auch mit neun Probanden in einem Langzeittest untersucht. Für den Kurzzeittest wurden einmalig 50 µl Produkt auf das Messareal aufgebracht und nach 1 h die Hautfeuchte sowie die CO₂-Emission der Haut bestimmt. Beim Langzeittest wurde die Creme über einen Zeitraum von einer Woche zweimal täglich am Unterarm angewendet, am Messtag jedoch nicht mehr. Die Ergebnisse sind in Abb. 54 und 55 zu sehen. In beiden Fällen korrelierten Corneometer- und CO₂-Werte gut miteinander. Die Zunahme der Hautfeuchtigkeit war sogar hochsignifikant, bei der CO₂-Emission war im Kurzzeittest immerhin ein wahrscheinlicher Unterschied zwischen behandelt und unbehandelt feststellbar ($p = 0,094$).

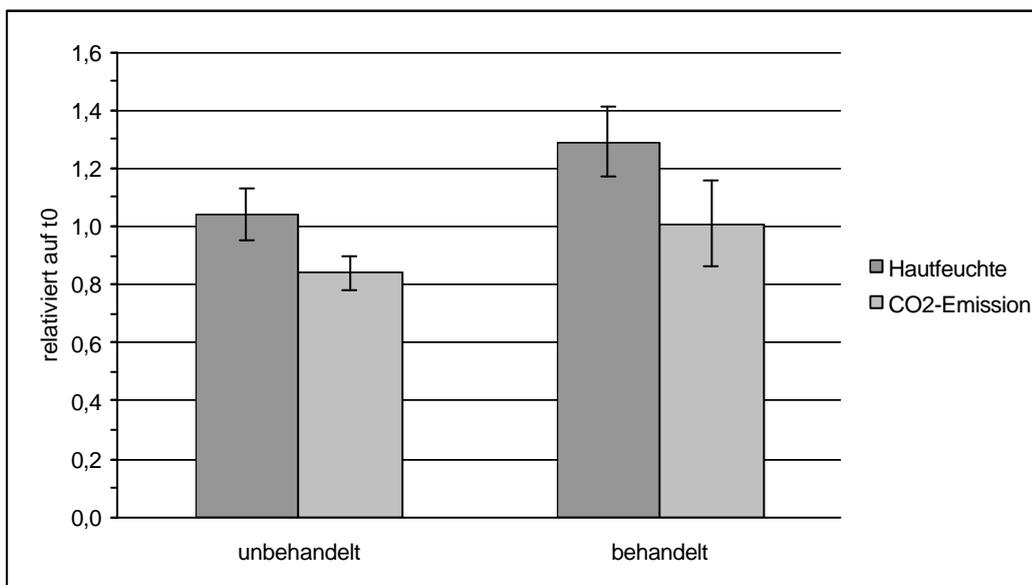


Abb. 54 Kurzzeittest (n = 5)

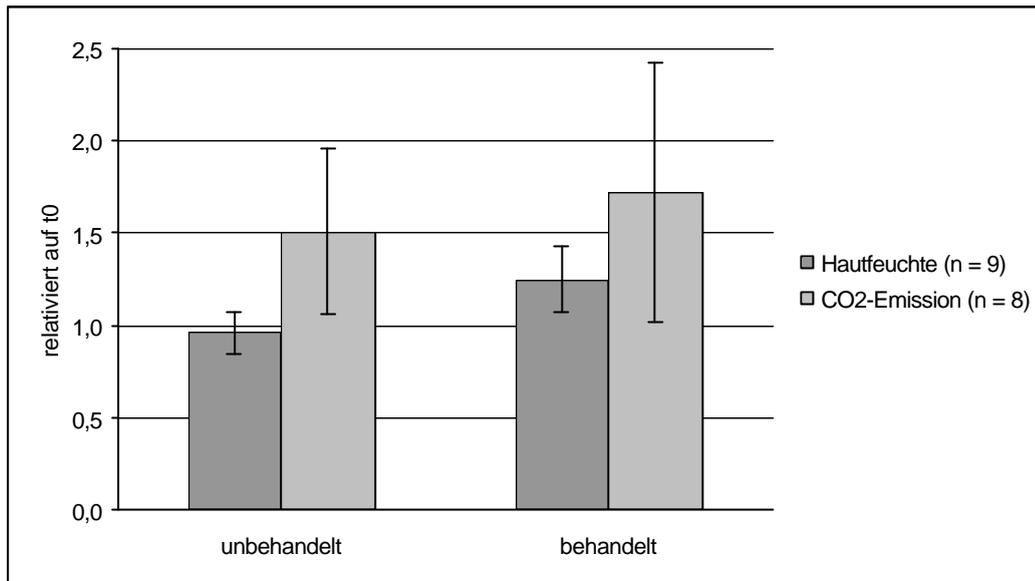


Abb. 55 Langzeittest

Lippenpflegestift

Ziel dieses Experiments war die Untersuchung der Wirkung von Lippenpflegestiften auf die CO₂-Emission der Haut. Hierzu wurden TEWL- und CO₂-Messungen vor sowie in unterschiedlichen Zeitintervallen nach Anwendung eines Lippenpflegestiftes am Unterarm durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 56 und 57 dargestellt. Die Anwendung des Lippenpflegestiftes führte zwar zu einer Erniedrigung der TEWL-Werte, hatte aber eine Zunahme der CO₂-Emission der Haut zur Folge. Etwa 1 h nach Produktapplikation näherte sich die CO₂-Konzentration dann wieder dem Ausgangswert an.

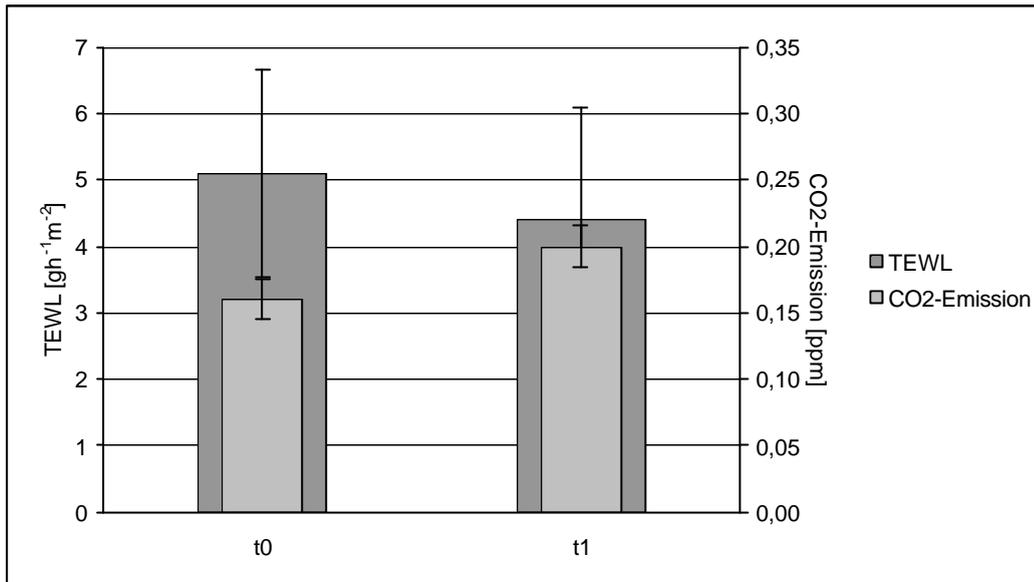


Abb. 56 TEWL- und CO₂-Werte vor und 30 min nach Anwendung eines Lippenpflegestiftes (n = 3)

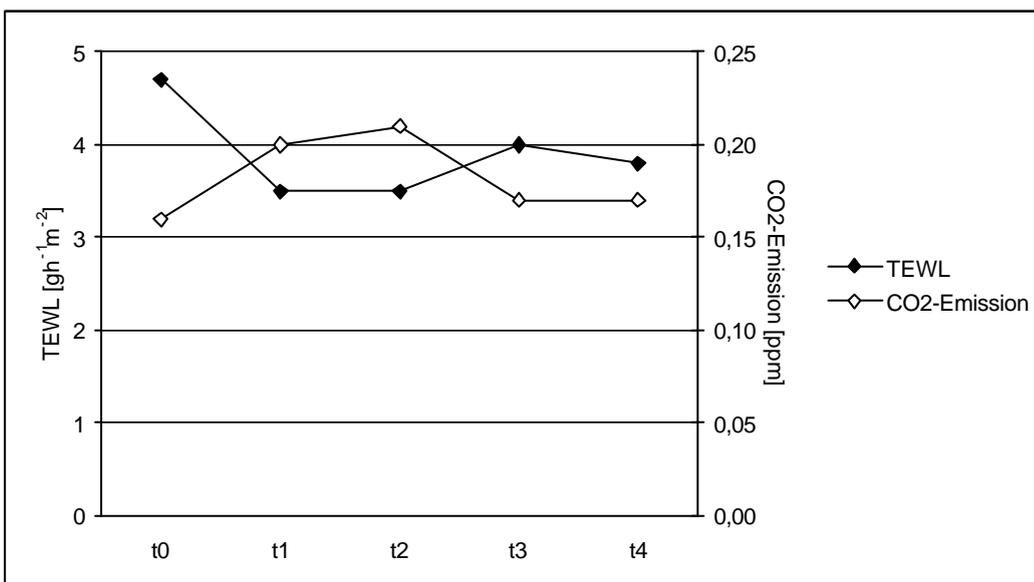


Abb. 57 Zeitlicher Verlauf der TEWL- und CO₂-Werte nach Anwendung eines Lippenpflegestiftes

t1: 5 min nach Behandlung

t2: 30 min nach Behandlung

t3: 1 h nach Behandlung

t4: 2 h nach Behandlung

5.2.6.3 Wirkstoffe

CoQ10

Da gezeigt werden konnte, dass die cutane CO₂-Freisetzung altersabhängig ist (s. 5.2.5.2), wurde nunmehr untersucht, inwiefern topische Applikation des „Antifalten“-Wirkstoffs CoQ10 die CO₂-Emission der Haut beeinflusst. Gearbeitet wurde mit zwei Alterskollektiven, zehn jungen (unter 25 Jahre alt) und neun älteren (über 70 Jahre alt) Probanden. Über einen Zeitraum von insgesamt vier Wochen wurde je ein Unterarmareal zweimal täglich mit einer 0,3% CoQ10 enthaltenden O/W-Emulsion bzw. dem entsprechenden Placebo behandelt. Ein weiteres Unterarmareal blieb unbehandelt. Vor Behandlungsbeginn sowie nach einer, zwei und vier Wochen Produktanwendung wurde die CO₂-Emission der Haut bestimmt. An den Messtagen wurde jeweils nicht gecremt. Sowohl bei dem jungen als auch bei dem älteren Probandenkollektiv war zu keinem der Zeitpunkte t1 bis t3 ein signifikanter Unterschied zwischen Placebo und Verum nachweisbar. Es fiel jedoch auf, dass bei den jungen Probanden das Verum im Vergleich zum Placebo zu sämtlichen Messzeitpunkten eine Reduktion der CO₂-Emission der Haut bewirkte. Beim älteren Probandenkollektiv dagegen war an allen Messtagen eine Erhöhung der CO₂-Werte durch Behandlung mit dem Verum zu verzeichnen (s. Abb. 58).

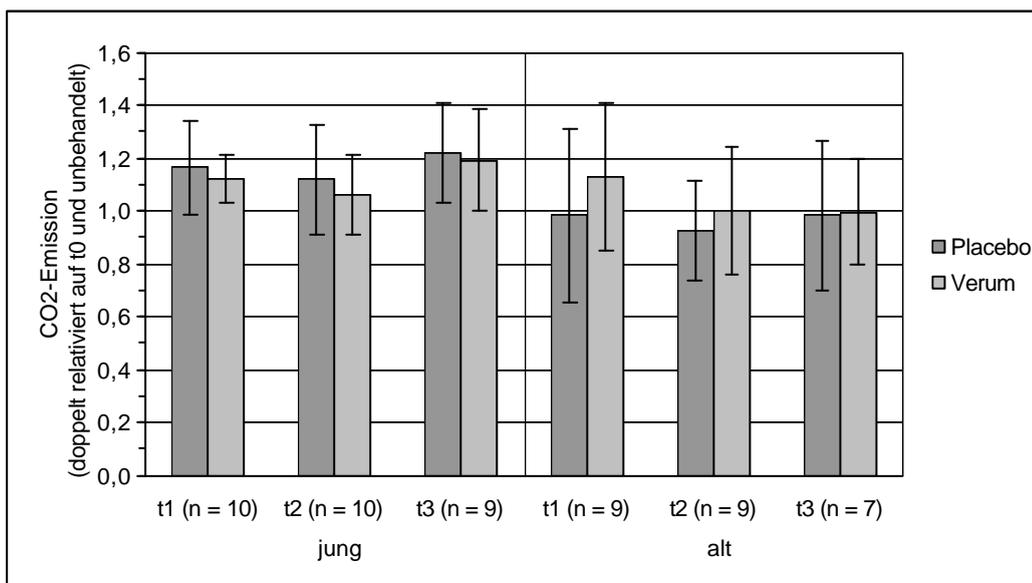


Abb. 58 Altersabhängigkeit des Einflusses von CoQ10 auf die CO₂-Emission der Haut

t1: nach einer Woche Behandlung

t2: nach zwei Wochen Behandlung

t3: nach drei Wochen Behandlung

Vitamin C

In 5.1.6.2 war gezeigt worden, dass topisch appliziertes Vitamin C die NO-Konzentration auf der Haut erhöht. Da bekannt ist, dass NO die Zellatmung hemmt, wurde in dieser Studie der Einfluss von Vitamin C auf die CO₂-Emission der Haut untersucht. Hierzu wurden die Unterarme von 16 Probanden über einen Zeitraum von einer Woche zweimal täglich mit einer 3% Vitamin C enthaltenden Creme bzw. dem entsprechenden Placebo behandelt; ein Messareal blieb unbehandelt. Vorher, 1½ h nach einmaliger Applikation von je 50 µl Produkt sowie nach einer Woche Produktanwendung (mit Ausnahme des Messtages) wurden die Hautfeuchte und die CO₂-Emission der Haut gemessen. Abb. 59 zeigt, dass die Corneometer-Werte durch Produktapplikation kaum beeinflusst wurden: Zum Zeitpunkt t1 war kein Unterschied zwischen Placebo und Verum feststellbar ($p = 0,632$). Nach einer Woche Behandlung ergab sich ein wahrscheinlicher Unterschied ($p = 0,095$), wobei das Verum etwas weniger hautbefeuchtend wirkte als das Placebo. Bei den CO₂-Werten war bereits nach einmaliger Behandlung ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Testprodukten zu verzeichnen: Während das Placebo die CO₂-Emission der Haut nicht veränderte, führte das Vitamin-C-haltige Produkt zu einer Verringerung der Werte um 11% ($p = 0,021$). Zum Zeitpunkt t2 erwies sich dieser Unterschied sogar als hochsignifikant ($p = 0,003$).

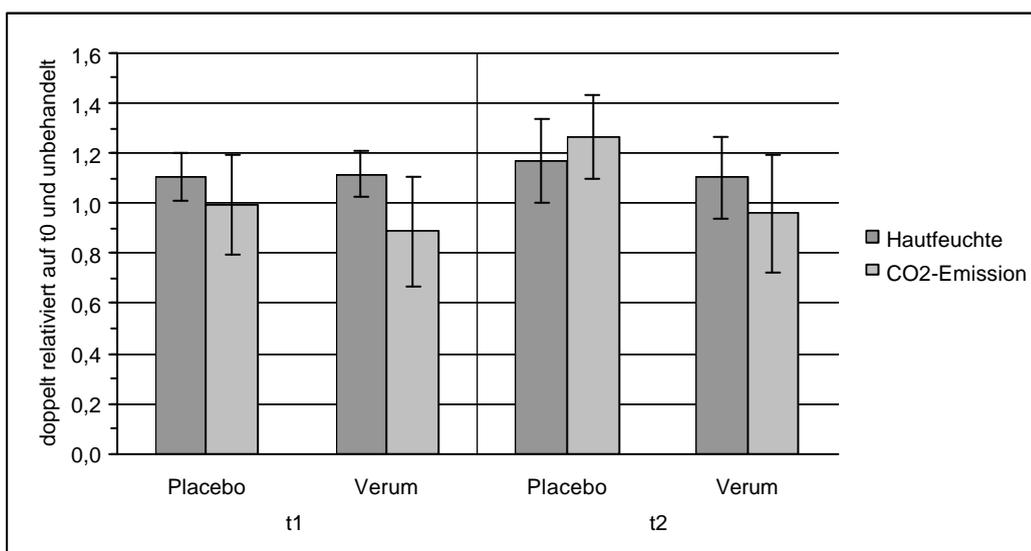


Abb. 59 Einfluss von 3% Vitamin C auf Hautfeuchte und CO₂-Emission der Haut (n = 16)

t1: 1½ Stunden nach einmaliger Behandlung

t2: nach einer Woche Behandlung

6 Diskussion

6.1 Methoden

6.1.1 NO-Messung

Neben der Chemilumineszenzmessung existieren weitere physikalisch-chemische Methoden zur NO-Bestimmung:

- Fluorimetrie: NO wird in Form seiner stabilen Abbauprodukte Nitrit und Nitrat bestimmt, indem zunächst Nitrat durch Nitratreduktase zu Nitrit reduziert und dieses dann mit 2,3-Diaminonaphtalin (DAN) zum fluoreszierenden 1-(H)-Naphthotriazol umgesetzt wird (MARZINZIG et al., 1997).
- Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR): Hierbei wird mit Spinfallen, z. B. Hämoglobin oder Nitrosoverbindungen, gearbeitet, die beim Kontakt mit NO „zuzschnappen“ und das Radikal in irgendeiner Form festhalten (WEBER, 1999).
- Oxyhämoglobin-Methode: NO reagiert mit Oxyhämoglobin zu Nitrat und Methämoglobin, wobei letzteres spektralphotometrisch bestimmt wird (FEELISCH et al., 1996).
- Mikroelektroden: NO wird je nach Beschichtung der Elektrode bei unterschiedlichem Potential entweder zu Nitrit oder zu Nitrat oxidiert und dann amperometrisch bestimmt (MALINSKI und CZUCHAJOWSKI, 1996).

Im Gegensatz zur Chemilumineszenzmessung haben diese Methoden jedoch den Nachteil, dass NO entweder nur indirekt bestimmt wird und/oder dass es nicht möglich ist, auf menschlicher Haut *in vivo* zu messen.

WELLER et al. (1996) führten Steady-State-Chemilumineszenzmessungen wahlweise an der Hand oder am Arm durch. Im Falle der Hand wurde diese in ein 800-ml-Glasgefäß eingeführt, das am Handgelenk mittels einer gasdichten Gummimanschette verschlossen wurde. Die NO-Messungen am Arm erfolgten in einem 45 cm langen Polypropylen-Schlauch (Innendurchmesser: 10 cm) mit Gummimembranen an Handgelenk und Oberarm.

Für die Trap-Technik verwendeten WELLER und ORMEROD (1997) ein Plastikgefäß mit einem Volumen von 11 ml, das auf die Haut geklebt wurde. Sie führten damit jedoch nur Messungen an durch Stripping geschädigter Haut durch. Um empfindlicher und damit auch auf Haut mit intakter Barriere messen zu können, wurden die eigenen Untersuchungen auf Unterarmarealen mit größtmöglichem Durchmesser (4 cm) durchgeführt, wodurch sich das Volumen der Probennahmegefäße auf ca. 25 ml erhöhte. Um die Haut der Probanden zu schonen und um die Probennahmegefäße – ohne aufwendiges Säubern – mehrmals verwenden zu können, wurden diese nicht aufgeklebt, sondern per Stretchband auf der Haut befestigt.

6.1.2 CO₂-Messung

Die IR-Analyse ist die am häufigsten verwendete Methode zur Quantifizierung von CO₂ auf der Hautoberfläche. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, CO₂ massenspektrometrisch oder gaschromatographisch zu bestimmen (DELPY et al., 1979).

Bereits THIELE und VAN KEMPEN arbeiteten 1979 mit der Steady-State-Technik zur IR-Analyse von CO₂ auf Hautarealen mit einer Fläche von ca. 10 cm². Allerdings waren Versuchsaufbau und -durchführung damals entschieden komplizierter, da z. B. Flaschengas verwendet wurde.

6.2 Ergebnisse

6.2.1 Untersuchung potentieller NO-Einflussfaktoren

6.2.1.1 Beeinflussung der exogenen NO-Synthese

Es wurde beobachtet, dass Schwitzen einen deutlichen Anstieg der NO-Werte bewirkt. Nach WELLER et al. (1996) beruht dieses Phänomen auf der Reduktion des im Schweiß enthaltenen Nitrats (ca. 40 μM). DÖHLE (1999) wiederum stellte eine Zunahme der Nitrat-Konzentration auf der Hautoberfläche durch Schwitzen fest. Dementsprechend führte Antitranspiransbehandlung der Haut zu einer Abnahme der NO-Werte, denn Antitranspirantien hemmen die Schweißsekretion, indem sie mit Proteinen und Schleimstoffen der Hautoberfläche Niederschläge bilden und so die Ausgangskanäle der ekkrinen Schweißdrüsen verengen (FINKEL, 1995a).

Im Rahmen der Untersuchung des Einflusses der cutanen Bakterienflora auf die NO-Emission der Haut zeigte sich, dass die mikrobiologischen Daten recht gut mit den ermittelten NO-Werten korrelierten. Nach Behandlung der Haut wurde mit der Messung jeweils 30 min gewartet, um Lösungsmittelreste verdampfen zu lassen. Dass auch nach Desinfektion noch NO messbar war, beweist, dass mit der Methode nicht nur auf der Hautoberfläche, sondern auch endogen (ohne Beteiligung der Hautbakterien) gebildetes NO erfasst wird.

Da die menschliche Haut einen Säuremantel von pH 4 – 6 trägt (OHMAN und VAHLQUIST, 1994) und Nitrit im Sauren zu NO zersetzt wird (s. Gl. 17 – 19), hatte topische Applikation einer nitrithaltigen Emulsion eine starke Zunahme der NO-Werte zur Folge. Das gleiche Resultat erzielten auch WELLER et al. (1996). Der zu verzeichnende UPE-Anstieg ist sicherlich auf die durch NO bzw. Peroxynitrit erhöhten Peroxidationsraten zurückzuführen.



(WEITZBERG und LUNDBERG, 1998)

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen pH-Wert der Hautoberfläche und NO-Emission der Haut ergab bei pH 5 deutlich höhere NO-Werte als bei pH 9, zurückzuführen auf die Reduktion von auf der Hautoberfläche befindlichem Nitrit unter sauren Bedingungen. Dieses Ergebnis korreliert gut mit WELLER et al. (1996), die ebenfalls NO-Chemilumineszenzmessungen auf Haut bei unterschiedlichen pH-Werten durchführten, sowie DÖHLE (1999), der im sauren Milieu eine Abnahme der Nitrit-Konzentration auf der Hautoberfläche feststellte.

6.2.1.2 Beeinflussung der endogenen NO-Synthese

Wider Erwarten war nach topischer Applikation von L-Arginin keine Steigerung der NO-Emission der Haut messbar, d. h. es erfolgte keine Stimulierung der NOS. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass es sich bei L-Arginin um eine semi-essentielle Aminosäure handelt, der Bedarf also in der Regel über die Nahrung gedeckt wird. Im Falle von Stress (Wachstum, Schwangerschaft, Alter, Krankheit) kann es allerdings zu Defiziten an L-Arginin kommen (BARBUL, 1986). DÖHLE (1999) untersuchte den Einfluss von L-Arginin auf die Nitrit-Konzentration auf der Hautoberfläche an älteren Probanden, erzielte jedoch auch kein eindeutiges Ergebnis. Es stellt sich daher die Frage, ob auf die Haut aufgebrachtes L-Arginin überhaupt tief genug penetriert, um die NO-Synthese beeinflussen zu können.

DELICONSTANTINOS et al. (1997) war es zwar gelungen, durch topische Applikation von NOS-Inhibitoren (1% L-NA + 1% L-NMMA) das Ausmaß UV-B-induzierter Erytheme zu reduzieren, die eigenen Untersuchungen ergaben nach Behandlung mit 1% L-NA jedoch keine Veränderung in der NO-Emission der Haut. Vielleicht würde eine höhere L-NA-Konzentration oder Kombination mit L-NMMA zu einem anderen Resultat führen.

Bei Untersuchung des Einflusses der Durchblutung auf die NO-Emission der Haut zeigte sich nach topischer Applikation von Methylnicotinat (zum Zeitpunkt maximaler Hautrötung) ein Anstieg der NO-Werte. COFFMAN (1994) beobachtete in diesem Zusammenhang eine Reduktion des Blutflusses durch Infusion des NOS-Hemmstoffs L-NMMA.

Ein Bestrahlungseffekt auf die NO-Emission der Haut konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Auch die Untersuchung des Einflusses von UV-Bestrahlung auf die Nitrit-Konzentration auf der Hautoberfläche von DÖHLE (1999) lieferte kein eindeutiges Ergebnis. DELICONSTANTINOS et al. (1996) stellten bei UV-B-bestrahlten Keratinozyten zwar eine Zunahme der NOS-Aktivität fest, ermittelten zudem jedoch eine starke Erhöhung des Pegels an Superoxid sowie Peroxynitrit. Daher liegt die Vermutung nahe, dass ein Großteil des durch UV-Bestrahlung gebildeten NOs mit Superoxid zu Peroxynitrit weiterreagiert (s. 3.2.1, Gl. 6).

6.2.1.3 Physikalische Einflussfaktoren

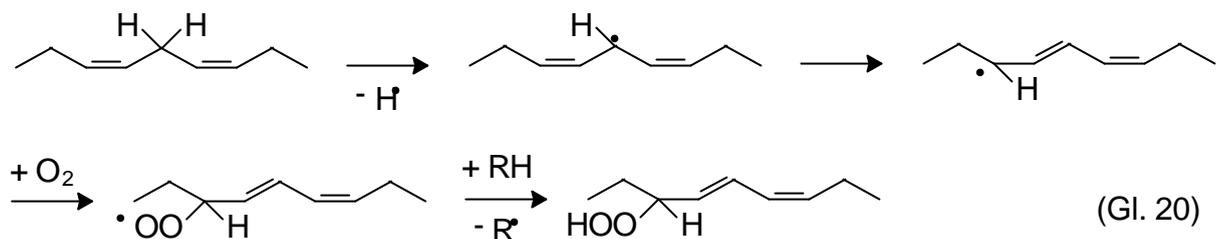
Erwartungsgemäß führten sowohl Temperaturerhöhung als auch Schädigung der Hautbarriere zu einem Anstieg der NO-Werte. Verschiedene Forschergruppen stellten bereits fest, dass NO maßgeblich an der durch Erwärmung der Haut hervorgerufenen Vasodilatation beteiligt ist (KELLOGG et al., 1999; SHASTRY et al., 1998). Dass der Effekt des Blasenziehens relativ gering ausfiel, hängt sicherlich mit dem im Vergleich zum Messareal äußerst geringen Durchmesser des Suction-Blister-Areals zusammen. Die hohen Standardabweichungen bei Rasur und Aceton-Behandlung zeigen, dass es schwierig ist, ein so großes Hautareal mit diesen Methoden „definiert“ zu schädigen.

6.2.1.4 Chemische Einflussfaktoren

Anhand der TEWL-Werte der entzündeten Haut ist erkennbar, dass durch Behandlung mit SDS eine recht starke Hautschädigung verursacht worden war. So lässt sich auch die Zunahme der NO-Emission der Haut erklären (s. 5.1.3.2). Daneben spielt möglicherweise die von ORMEROD et al. (1997) bei durch SDS irritierter Haut festgestellte signifikant erhöhte iNOS-Aktivität eine Rolle.

Für den Anstieg der NO-Werte nach topischer Applikation von Wasserstoffperoxid könnte zum einen NO-Freisetzung aus S-Nitrosoglutathion (GSNO) verantwortlich sein (SINGH et al., 1999). Zum anderen stellten SHIMIZU et al. (1997) sowie BHARADWAJ und PRASAD (1995) aber auch H₂O₂-induzierte NO-Produktion in Endothelzellen bzw. damit verbundene Gefäßrelaxation fest.

Die UPE-Erhöhung nach Behandlung mit H₂O₂ ist wahrscheinlich auf durch Peroxynitrit sowie Wasserstoffperoxid direkt ausgelöste Peroxidationen, z. B. Lipidperoxidation (s. Gl. 20), zurückzuführen (ALBRECHT et al., 1996).



6.2.1.5 Einfluss individueller Disposition

Das bei Vergleich der NO-Emission von Unterarm und Handteller erzielte Ergebnis deckt sich mit dem von WELLER et al. (1996), die ebenfalls an der Hand höhere NO-Werte ermittelten als am Arm und dies auf die große Schweißdrüsendichte auf dem Handteller zurückführten.

KOLB-BACHOFEN et al. (1994) konnten in Keratinozyten von Psoriasis-Herden iNOS-Induktion nachweisen, und WELLER et al. (1997) detektierten auf der Haut von Psoriasis-Kranken höhere NO-Werte als bei Hautgesunden. Dies wurde durch die eigenen Untersuchungen weitgehend bestätigt. Die hohe Standardabweichung bei den Psoriatikern ist auf die sehr unterschiedliche Ausprägung des Krankheitsbildes zurückzuführen.

Für den Akuteffekt des Rauchens, der sich in einer Abnahme der NO-Werte nach Rauchen einer Zigarette äußerte, sind möglicherweise im Zigarettenrauch enthaltene freie Radikale (z. B. kleine Alkyl- und Alkoxy-Radikale; CHURCH und PRYOR, 1985) verantwortlich, die lt. HEITZER et al. (2000) zerstörend auf das BH_4 wirken und so die NOS dazu veranlassen, statt NO Superoxid zu produzieren (NOS-Entkopplung). Für das leichte Absinken der UPE-Werte gibt es z. Z. noch keine Erklärung. Die im Vergleich zu dem Nichtraucherkollektiv signifikant erhöhte basale NO-Emission der Raucherhaut könnte einmal auf eine Stimulierung der iNOS durch Zigarettenrauchbestandteile oder aber auch auf eine Speicherung von NO aus dem Zigarettenrauch, z. B. in Form von RSNO-Verbindungen (STAMLER et al., 1997), zurückzuführen sein.

Dass „Passivrauchen“, also direkter Kontakt von Zigarettenrauch mit der Haut, einen so starken Anstieg der NO-Werte zur Folge hatte, hängt sicherlich mit der hohen NO-Konzentration im Zigarettenrauch (75 – 1000 ppm) zusammen (CHAMBERS et al., 1998). Da dieser Anstieg deutlich ausgeprägter war als bei dem entsprechenden Kontrollexperiment auf Glas, ist anzunehmen, dass durch Reaktion von Zigarettenrauch mit Haut zusätzlich NO freigesetzt wurde. EGAWA et al. (1997) beobachteten, dass die freien Radikale im Zigarettenrauch auf der Haut oxidativen Stress (Lipidperoxidation; s. 6.2.1.4, Gl. 20) verursachen, der sich wiederum in erhöhten UPE-Werten niederschlägt.

Die Untersuchung des Einflusses von Nicotin, das dem Körper per Nicotin-Pflaster zugeführt wurde, auf die NO-Emission der Haut ergab im Mittel zwar eine Reduktion der NO-Werte, die sich aber nicht als statistisch signifikant erwies. MILLER et al. (1997) beschäftigten sich mit der Wirkung von Nicotin-Spray auf die NO-Konzentration im Blutplasma, konnten hierbei jedoch auch keinen deutlichen Effekt feststellen.

6.2.1.6 Einfluss kosmetischer Mittel

Die Zunahme der NO-Emission der Haut durch topische Applikation von Vitamin C bzw. AGR im Langzeittest ist wahrscheinlich auf deren Radikalfängereigenschaften zurückzuführen, denn sie schützen NO vor Reaktion mit dem Superoxidradikal (JACKSON et al., 1998). Da jedoch sowohl Vitamin E als auch AGR ganz im Gegensatz zu Vitamin C im Kurzzeittest keinen Effekt zeigten, musste hierfür eine andere Erklärung gefunden werden. Folgende Mechanismen wurden in Erwägung gezogen:

1. Reduktion von Nitrit (MAY, 2000)
2. Freisetzung von NO aus RSNO-Verbindungen, wie z. B. GSNO (KASHIBAIWATSUKI et al., 1997; SMITH und DASGUPTA, 2000)
3. Stimulierung der NO-Synthese durch Erhöhung der BH_4 -Verfügbarkeit (HUANG et al., 2000)

Das anschließende Experiment zeigte, dass der Vitamin-C-Effekt – wenngleich mit veränderter Kinetik – auch *ex vivo* (auf Schweinehaut) zu verzeichnen war. Daher wurden Möglichkeit 1 und 3 aufgrund der Instabilität von Nitrit sowie der *ex vivo* nur noch eingeschränkt ablaufenden physiologischen Prozesse als weniger relevant angesehen.

Für Verwirrung sorgten dann jedoch die *in-vitro*-Untersuchungen, die unmittelbar nach Vitamin-C-Applikation zwar noch keinen Effekt, 2 h später aber analog zu den *in-* und *ex-vivo*-Studien stark erhöhte und sogar über längere Zeit auf diesem Niveau verbleibende NO-Werte zeigten. Dieses Phänomen war unabhängig vom Material, auf das appliziert wurde, und weder das Spül- bzw. Trägergas noch die Produktmatrix hatten einen Einfluss; ausschlaggebend war allein über einen gewissen Zeitraum anhaltender Raumluftkontakt der Probe. Die Untersuchung der Bedeutung der reduzierenden Eigenschaften von Ascorbinsäure für den Vitamin-C-Effekt ergab bei Ascorbinsäure im Vergleich zu einer gleich konzentrierten Kaliumiodidlösung deutlich höhere NO-Werte. Anzumerken ist jedoch, dass es sich bei Ascorbinsäure mit einem Standardpotential von $E^\circ = -0,06 \text{ V}$ (bei pH 7) auch um ein stärkeres Reduktionsmittel handelt als bei Iodid mit $E^\circ = +0,54 \text{ V}$ (LARSON, 1997).

Zusammenfassend ist also festzustellen, dass es sich bei dem starken Anstieg der NO-Werte ca. 2 h nach einmaliger Vitamin-C-Applikation in erster Linie um einen Oberflächeneffekt handelt, basierend auf dem Zusammentreffen des starken Reduktionsmittels Vitamin C und (evtl. O₂⁻-haltiger) Raumluft. Dass auf Haut *in vivo* auch bereits unmittelbar nach Behandlung mit Vitamin C ein Effekt zu verzeichnen war, ist dagegen vermutlich auf die drei vorgenannten Mechanismen zurückzuführen.

6.2.2 Untersuchung potentieller CO₂-Einflussfaktoren

6.2.2.1 Physikalisch-chemische Einflussfaktoren

Bereits THIELE und VAN KEMPEN (1972) untersuchten den Einfluss der Hauttemperatur auf die CO₂-Emission der Haut und stellten einen Anstieg der CO₂-Werte mit zunehmender Temperatur fest.

Mit der Untersuchung des Einflusses von Hautbefeuchtung auf die CO₂-Emission der Haut beschäftigten sich FRAME et al. (1972). Auch sie beobachteten nach einem Wasserbad deutlich erhöhte CO₂-Werte und führten dies auf die durch die Befeuchtung verbesserte Durchlässigkeit der Haut für das sehr gut wasserlösliche CO₂ zurück.

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen pH-Wert der Hautoberfläche und CO₂-Emission der Haut hatte sich mit steigendem pH-Wert eine Abnahme der CO₂-Werte gezeigt. Dieses Ergebnis korreliert gut mit den Vorstellungen von SHUTTER (1968), der die Kapazität der Haut, Alkalien zu neutralisieren, auf die cutane CO₂-Freisetzung zurückführte.

CUNICO et al. erklärten 1977, dass die CO₂-Emission der Haut – ebenso wie der TEWL – ein Maß für die Effizienz der Hautbarriere darstelle. Dies konnte bestätigt werden: Schädigung der Hautbarriere durch tesa[®]-Stripping oder Rasur hatte einen Anstieg der CO₂-Werte zur Folge.

6.2.2.2 Einfluss der Durchblutung

Mechanische und chemische Durchblutungsförderung führten zu entgegengesetzten Ergebnissen: Reibung bewirkte eine Zunahme der CO₂-Emission der Haut, topische Applikation von Methylnicotinat dagegen eine Abnahme. Die Ursache des Anstiegs der CO₂-Werte durch Reibung liegt möglicherweise in der damit verbundenen Wärmeentwicklung, da Temperaturerhöhung nachgewiesenermaßen die CO₂-Emission der Haut verstärkt (s. 5.2.1.1).

6.2.2.3 Einfluss von UV-Strahlung

Das Ergebnis der UV-Bestrahlung mit 1,3 MED deckt sich mit dem der Durchblutungsförderung mittels Nicotinsäureester (s. 5.2.2.2): In beiden Fällen wurde eine Hautrötung verursacht und eine Abnahme der CO₂-Emission der Haut beobachtet. Die Ursache hierfür liegt möglicherweise darin, dass aufgrund der verstärkten Durchblutung ein größerer Anteil des in der Haut produzierten CO₂s mit dem Blut abtransportiert wurde, statt in die Atmosphäre zu diffundieren. Der leichte Anstieg der CO₂-Werte unmittelbar nach einmaliger UV-A-Bestrahlung ist wahrscheinlich auf die starke Wärmeabstrahlung des UV-A-Strahlers zurückzuführen (s. 5.2.1.1).

6.2.2.4 Einfluss der Hautbakterien

Die zweite CO₂-Messung erfolgte erst 30 min nach Behandlung der Hautoberfläche mit Sterillium[®] Virugard, um das Desinfektionsmittel verdampfen zu lassen. Da Sterillium[®] Virugard zu 95% aus Ethanol besteht und gezeigt werden konnte, dass die Hautfeuchte einen starken Einfluss auf die CO₂-Emission der Haut hat (s. 5.2.1.2), ist nicht ganz klar, ob die Reduktion der CO₂-Werte tatsächlich auf die Abtötung der Bakterien oder evtl. auf die austrocknende Wirkung des Ethanols zurückzuführen ist.

6.2.2.5 Einfluss individueller Disposition

Die im Vergleich zum Unterarm geringere CO₂-Emission der Wade ist sicherlich darauf zurückzuführen, dass es sich bei der Wade um das trockenere Hautareal handelt (s. 5.2.1.2).

Da im Rahmen der Untersuchung der Altersabhängigkeit der CO₂-Emission der Haut auch die Hautfeuchte gemessen wurde und bei den älteren Probanden trotz feuchterer Haut niedrigere CO₂-Werte festzustellen waren als bei den jungen, konnte nachgewiesen werden, dass die CO₂-Emission der Haut und damit vermutlich die Atmungsaktivität der Zellen mit zunehmendem Alter nachlässt.

Verschieden pigmentierte Menschenrassen unterscheiden sich sowohl in der Produktion als auch im Abbau von Melanosomen (MÖLLER und MATTHIES, 1995). WILSON et al. (1988) verglichen außerdem die Barrierefunktion der Hornschicht von schwarzer und weißer Haut, wobei bei den Schwarzen höhere TEWL-Werte ermittelt wurden als bei den Weißen. Hier könnte auch die Ursache für die im Vergleich zu den Kaukasiern erhöhten CO₂-Werte der Schwarzafrikaner liegen (s. 5.2.1.4).

6.2.2.6 Einfluss kosmetischer Mittel

Da es sich bei CO₂ um ein hydrophiles Molekül handelt, führte topische Applikation diverser Öle im Mittel zu einer deutlichen Reduktion der CO₂-Emission der Haut.

Ebenfalls erwartungsgemäß verlief die Untersuchung des Einflusses topischer Applikation einer Hautpflegecreme auf die CO₂-Emission der Haut: Der Anstieg der CO₂-Werte ist sicherlich auf die mit der Produktanwendung verbundene statistisch hochsignifikante Erhöhung der Hautfeuchte zurückzuführen (s. 5.2.1.2). Dass im Kurzzeittest ein deutlicherer Unterschied zwischen unbehandeltem und behandeltem Hautareal zu verzeichnen war als im Langzeittest, ist wahrscheinlich eine Folge des kleineren Zeitintervalls zwischen (letzter) Behandlung und t₁-Messung.

Ein etwas überraschendes Ergebnis lieferte dagegen das Lippenpflegestift-Experiment. Da es sich bei Lippenpflegestiften um äußerst lipophile Produkte handelt, wäre ein ähnliches Resultat wie bei der topischen Applikation der Öle zu erwarten gewesen. Stattdessen führte die Lippenpflegestift-Anwendung zwar zu einer Reduktion der TEWL-Werte, ließ die CO₂-Emission der Haut jedoch ansteigen. Die Erklärung hierfür liegt möglicherweise darin, dass das Lippenpflegeprodukt (vielleicht wegen seiner Konsistenz oder aufgrund der Inhaltsstoffe) kaum einzieht, sondern okklusiv auf der Hautoberfläche verbleibt, so dass es unterhalb dieser Wachsschicht zu einer Ansammlung von Wasser (und damit auch CO₂) kommt. Aufgrund der im Vergleich zum Wasser geringeren Hydrophilie gelingt es jedoch nur dem CO₂, die Wachsschicht zu durchdringen.

Es wird davon ausgegangen, dass ROS für den Alterungsprozess verantwortlich sind. Auf die Haut aufgebrachtes CoQ soll die Zellen in ihrem Kampf gegen oxidativen Stress unterstützen, nachdem es durch zelluläre Reduktasen in seine antioxidativ wirksame Form umgewandelt wurde (LENAZ et al., 2000). Da gezeigt werden konnte, dass mit zunehmendem Lebensalter weniger CO₂ über die Haut emittiert wird (s. 5.2.5.2), wurde anhand eines jungen und eines älteren Probandenkollektivs untersucht, inwiefern topische Applikation des „Antifalten“-Wirkstoffs CoQ10 die CO₂-Emission der Haut beeinflusst. Bei den älteren Probanden war nach Anwendung des CoQ10-haltigen Produkts tatsächlich ein (jedoch statistisch nicht signifikanter) Anstieg der CO₂-Werte zu verzeichnen, wobei der Unterschied zwischen Placebo und Verum mit zunehmender Behandlungsdauer geringer wurde, also eine Art „Sättigung“ eintrat.

Topische Applikation von Vitamin C führte dagegen sowohl im Kurz- als auch im Langzeittest zu einer Reduktion der CO₂-Emission der Haut. Die Erklärung hierfür liegt vermutlich darin, dass Vitamin C einen Anstieg der NO-Konzentration bewirkt (s. 5.1.6.2) und NO bzw. Peroxynitrit nachgewiesenermaßen die Zellatmung hemmt (BROWN, 1999).

7 Zusammenfassung / Summary

Zunächst wurden Methoden zur direkten Erfassung von cutan gebildetem NO und CO₂ *in vivo* entwickelt. Für NO ergaben sich zwei Arten der Probennahme, die Steady-State- und die Trap-Technik. Im Falle der Steady-State-Technik wurde der gesamte Unterarm über einen Zeitraum von 5 min kontinuierlich vermessen, während bei der Trap-Technik das von der Haut diffundierende NO über einer Fläche von 12,5 cm² 20 min lang gesammelt wurde. Zur Messung der CO₂-Emission bot sich die Steady-State-Technik an, da die Haut so viel CO₂ freisetzt, dass auch auf einem kleinen Areal kontinuierlich gemessen werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methoden reproduzierbare Ergebnisse lieferten.

Die entwickelten Methoden wurden angewendet, indem potentielle NO- bzw. CO₂-Einflussgrößen untersucht wurden. Hierbei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Es gelang, die exogene NO-Synthese zu beeinflussen und damit das Modell der NO-Produktion auf der Hautoberfläche zu bestätigen, indem nachgewiesen wurde, dass verstärkte Schweißsekretion, topische Applikation von Nitrit sowie Erniedrigung des Haut-pH-Wertes zu einem Anstieg der NO-Konzentration führen, während Desinfektion der Hautoberfläche eine Reduktion der NO-Werte zur Folge hatte. Die Beeinflussung der endogenen, NOS-katalysierten NO-Synthese aus L-Arginin erwies sich dagegen als weitaus schwieriger, denn weder L-Arginin noch der NOS-Inhibitor L-NA veränderten nach topischer Anwendung die NO-Freisetzung der Haut, und auch UV-Bestrahlung mit MED bewirkte keine messbare Erhöhung der NO-Werte. Lediglich Durchblutungsförderung mittels Nicotinsäureester führte zu einer Steigerung der NO-Emission. Physikalische Einflussfaktoren wie Temperaturerhöhung und Schädigung der Hautbarriere hatten ebenso eine Zunahme der NO-Freisetzung zur Folge wie chemische Entzündungsinduktion mittels SDS oder Wasserstoffperoxid. Ferner stellte sich heraus, dass die NO-Emission der Haut sowohl im Laufe des Tages als auch mit zunehmendem Lebensalter sinkt. Psoriatiker wiesen höhere NO-Werte auf als Hautgesunde, was vermutlich auf iNOS-Ausschüttung zurückzuführen ist. Der Akuteffekt des Rauchens äußerte sich in einer Abnahme der NO-Konzentration auf der Haut, während sich als chronischer Effekt erhöhte NO-Werte ergaben. Schließlich konnte gezeigt werden, dass auf die Haut

aufgebrachte Antioxidantien langfristig zu einem Anstieg der NO-Emission der Haut führen, da sie NO vor Reaktion mit Superoxid schützen.

Auch die CO₂-Emission der Haut war durch physikalisch-chemische Faktoren beeinflussbar. So bewirkten Temperaturerhöhung, Hautbefeuchtung und Schädigung der Hautbarriere erwartungsgemäß eine Zunahme, Erhöhung des Haut-pH-Wertes dagegen eine Abnahme der CO₂-Werte. Außerdem zeigte sich anhand von UV-Bestrahlung mit MED sowie topischer Applikation von Nicotinat, dass Hautrötungen grundsätzlich mit einer Reduktion der CO₂-Freisetzung verbunden sind. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die CO₂-Emission der Haut mit zunehmendem Lebensalter abnimmt und dass Schwarzafrikaner höhere CO₂-Werte aufweisen als Kaukasier. Auf die Haut aufgebrachte Öle führten zu einer Abnahme der CO₂-Freisetzung, während Coenzym Q10 – zumindest bei älteren Probanden – eher einen Anstieg der CO₂-Werte bewirkte. Topische Applikation von Vitamin C hatte eine Reduktion der CO₂-Emission der Haut zur Folge. Ursache hierfür ist wahrscheinlich, dass Vitamin C die NO-Konzentration in der Haut erhöht und NO wiederum die Zellatmung hemmt.

Methods for the direct *in vivo* detection of NO and CO₂ formed by the skin were first developed. For NO, two types of sampling techniques were developed, the steady-state and the trap technique. With the steady-state technique the whole forearm was continuously measured over a period of 5 min, whereas with the trap technique the NO diffusing from the skin over a surface of 12.5 cm² was collected for 20 min. For measurement of CO₂ emission, the steady-state technique was the sampling method of choice because the skin releases so much CO₂ that it can be measured continuously even on a small area. It could be shown that these methods give reproducible results.

The methods developed were used to study potential NO and CO₂ influencing factors. The following results were obtained:

It was possible to influence exogenous NO synthesis and therefore to confirm the model for NO production on the skin surface by demonstrating that heavy sweating, topical application of nitrite and a decrease in the skin pH lead to an increase in the NO concentration, whereas disinfection of the skin surface results in a reduction of the NO values. Demonstrating the influence of endogenous NOS-catalyzed NO synthesis from L-arginine proved to be much more difficult, as neither L-arginine nor the NOS inhibitor L-NA changed the NO release by the skin after topical application. UV irradiation with the MED likewise led to no measurable increase in the NO values. Only the blood flow-enhancing nicotinate led to an increase in NO emission. Physical factors like a temperature increase and damage to the skin barrier also resulted in an increase in NO release as did chemically induced inflammation by SDS or hydrogen peroxide. Moreover, it became apparent that NO emission by the skin decreases in the course of a day as well as with increasing age. Psoriasis patients showed higher NO values than persons with healthy skin, which is probably attributable to iNOS release. The acute effect of smoking was manifested in a decrease in the NO concentration on the skin, whereas increased NO values proved to be the chronic effect. Finally, it could be shown that long-term application of antioxidants to the skin results in an increase in NO emission by the skin, because this protects NO against reaction with superoxide.

The CO₂ emission of the skin was influenced by physicochemical factors as well. For instance, increasing the temperature, skin moisturization and damage to the skin barrier led to an increase, as would be expected, but increasing the skin pH produced a decrease in the CO₂ value. In addition, it could be shown on the basis of UV irradiation with the MED and topical application of nicotinate that reddening of the skin is always associated with a reduction in CO₂ release. Other studies showed that the CO₂ emission of the skin decreases with increasing age and that black Africans have higher CO₂ values than Caucasians. Oils applied to the skin lead to a decrease in CO₂ release, whereas coenzyme Q10 – at least in older subjects – tends to produce an increase in the CO₂ values. Topical application of vitamin C resulted in a reduction of CO₂ emission by the skin. The probable cause is that vitamin C increases the NO concentration in the skin and NO in turn inhibits cell respiration.

8 Anhang

8.1 Originaldaten

Sofern nichts anderes angegeben ist, stellen die Zahlenwerte die NO- bzw. CO₂-Emission der Haut in ppb bzw. ppm dar.

8.1.1 Methoden

8.1.1.1 NO-Messung

Tab. 4 Druck

Proband	wenig Druck	viel Druck
1	5,8	5,8
2	4,4	4,4
3	3,3	4,0

Tab. 5 Reproduzierbarkeit (zu Abb. 7)

Messwert	Steady-State-Technik	Trap-Technik
1	3,6	1,6
2	3,2	1,5
3	3,0	1,8
4	3,5	1,8
5	2,9	1,6

Tab. 6 Sammlungsdauer (zu Abb. 8)

Proband	Sammlungsdauer [min]		
	10	20	30
1	1,8	3,6	6,9
2	1,8	3,8	5,1

8.1.1.2 CO₂-Messung

Tab. 7 Reproduzierbarkeit (zu Abb. 11)

Messwert	Stahl	Haut
1	0,02	0,20
2	0,02	0,19
3	0,02	0,19
4	0,02	0,20
5	0,02	0,18

8.1.2 Ergebnisse

8.1.2.1 Untersuchung potentieller NO-Einflussfaktoren

Tab. 8 Schweiß (zu Abb. 12)

Proband	t0		t1	
	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt
1	7,2	9,2	8,9	7,1
2	5,4	4,9	5,1	4,2
3	4,4	3,5	7,3	4,2
4	2,5	1,6	3,5	1,3
5	3,3	1,9	5,9	1,3

Tab. 9 Bakterien (zu Abb. 13 und 14)

Proband	cfu / ml			NO-Emission [ppb]		
	unbehandelt	Wasser	Desinf.	unbehandelt	Wasser	Desinf.
1	$6,70 \cdot 10^2$	$2,35 \cdot 10^2$	0	2,8	2,5	2,2
2	$1,24 \cdot 10^4$	$9,67 \cdot 10^2$	0	2,7	2,4	1,4
3	$4,33 \cdot 10^2$	$2,33 \cdot 10^2$	0	3,1	1,5	1,5
4	$3,11 \cdot 10^3$	$1,19 \cdot 10^3$	0	3,2	3,3	2,3

Tab. 10 Nitrit (zu Abb. 15)

Proband	NO-Emission [ppb]		UPE [counts / 96 s]			
	Placebo	Verum	t0		t1	
			Placebo	Verum	Placebo	Verum
1	0,3	68,3	904	1168	1381	1404
2	0,6	25,5	1326	893	1514	1401
3	0,6	35,8	780	562	605	909
4	—	—	477	723	541	784
5	—	—	792	1087	999	811
6	—	—	1024	887	1116	1130
7	—	—	825	939	627	774
8	—	—	942	834	313	716
9	—	—	524	525	502	815
10	—	—	374	431	560	736
11	—	—	272	371	417	578
12	—	—	250	279	272	496
13	—	—	689	402	576	1319
14	—	—	275	215	215	339
15	—	—	276	205	287	296

Tab. 11 pH-Wert (zu Abb. 16)

Proband	unbehandelt	pH 5	pH 9
1	2,0	3,6	2,2
2	1,6	2,3	1,2
3	2,9	3,6	3,4

Tab. 12 L-Arginin (zu Abb. 17)

Proband	Kurzzeittest				Langzeittest			
	t0		t1		t0		t1	
	Placebo	Verum	Placebo	Verum	Placebo	Verum	Placebo	Verum
1	3,4	3,0	3,1	3,3	1,7	2,1	2,7	3,0
2	4,2	3,6	3,2	3,4	2,0	2,4	2,6	2,6
3	3,6	3,2	3,2	2,9	1,3	2,1	2,4	3,1
4	—	—	—	—	1,7	1,6	2,6	2,3
5	—	—	—	—	3,5	2,8	3,1	3,6
6	—	—	—	—	2,8	2,5	1,5	1,8
7	—	—	—	—	3,2	2,8	2,7	3,1
8	—	—	—	—	2,7	2,6	2,7	2,6
9	—	—	—	—	1,6	1,7	1,8	1,7
10	—	—	—	—	2,1	2,3	1,7	1,6

Tab. 13 L-NA

Proband	t0		t1	
	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt
1	2,8	3,5	4,6	4,6
2	3,3	2,6	4,4	4,5
3	3,6	3,5	3,6	3,2
4	4,2	4,1	4,2	4,4
5	2,8	3,1	3,5	3,5

Tab. 14 Durchblutung (zu Abb. 18)

Proband	Placebo	Verum
1	2,4	2,8
2	1,6	2,0
3	1,7	1,9

Tab. 15 UV-A-Strahlung (zu Abb. 19)

Messwert / Prob.	t0		t1	
	Stahl	Haut	Stahl	Haut
1	0,4	0,7	0,9	2,4
2	—	0,8	—	0,8
3	—	0,7	—	1,1

Tab. 16 Sonnensimulator (zu Abb. 20)

Proband	t0	t1	t2	t3	t4
1	2,2	2,0	2,2	2,1	2,4
2	1,8	1,7	2,1	2,0	2,0
3	2,2	2,1	1,7	1,9	1,9
4	2,0	2,2	2,2	2,4	1,9
5	2,3	2,0	1,7	2,0	2,0

Tab. 17 Temperatur (zu Abb. 21)

Proband	RT	erwärmt
1	1,9	4,0
2	4,6	6,0
3	1,6	2,5

Tab. 18 Hautbarriere (zu Abb. 22)

Proband	Rasur		Aceton		Suction Blister	
	t0	t1	t0	t1	t0	t1
1	0,6	1,5	0,9	0,9	1,4	1,4
2	0,5	0,7	1,9	4,4	1,3	1,6
3	0,5	0,8	4,1	4,7	1,7	2,3

Tab. 19 SDS (zu Abb. 23)

Proband	TEWL [$\text{gh}^{-1}\text{m}^{-2}$]		NO-Emission [ppb]	
	t0	t1	t0	t1
1	7,1	12,8	2,5	2,6
2	7,4	22,1	2,4	2,8
3	4,0	8,6	1,8	2,6

Tab. 20 Wasserstoffperoxid (zu Abb. 24)

Proband	NO-Emission [ppb]		UPE [counts / 113 s]	
	t0	t1	t0	t1
1	2,6	3,4	1499	9492
2	2,1	2,6	—	—
3	1,7	2,9	—	—
4	1,1	2,5	—	—

Tab. 21 Tageszeit (zu Abb. 25)

Proband	morgens	mittags	abends
1	0,7	0,2	0,1
2	1,3	0,3	0,4
3	0,5	0,5	0,3
4	0,4	0,3	0,2

Tab. 22 Körperregion (zu Abb. 26)

Proband	Unterarm	Handteller
1	1,8	2,4
2	2,2	2,9
3	1,6	2,0

Tab. 23 Alter (zu Abb. 27)

Proband	jung	alt
1	0,8	0,5
2	0,4	0,7
3	0,4	0,4
4	0,7	0,7
5	0,8	0,4
6	0,8	1,0
7	1,1	—

Tab. 24 Psoriasis (zu Abb. 28)

Proband	gesund	krank
1	1,1	1,0
2	0,5	1,3
3	0,9	0,5
4	1,0	0,9
5	0,8	3,2
6	0,7	0,5
7	0,9	0,9
8	—	1,6

Tab. 25 Aktivrauchen, NO-Emission (zu Abb. 29)

Proband	t0		t1	
	Nichtraucher	Raucher	Nichtraucher	Raucher
1	17,1	14,3	14,4	18,2
2	13,9	17,5	7,1	19,8
3	9,3	13,9	9,6	10,1
4	14,6	3,2	7,6	3,0
5	3,7	4,2	3,2	5,1
6	2,0	2,5	2,9	3,0
7	7,5	13,0	7,4	7,0
8	4,8	8,3	3,1	11,0
9	5,0	16,9	5,3	12,3
10	6,5	19,9	6,4	21,8
11	15,7	22,8	15,2	15,5
12	7,8	11,1	13,3	8,9
13	13,8	19,1	11,7	12,5
14	17,5	12,8	17,4	9,7
15	4,9	11,7	9,6	12,0
16	6,9	9,3	4,1	9,6
17	5,7	28,5	11,7	22,7
18	6,8	—	10,0	—
19	5,0	—	5,6	—
20	2,5	—	2,7	—

Tab. 26 Aktivrauchen, UPE [counts / 156 s] (zu Abb. 30)

Proband	t0	t1
1	690	693
2	1162	641
3	1321	1098
4	505	450
5	700	965
6	806	978
7	1791	1333
8	1308	964
9	928	789
10	2288	2206
11	711	587
12	1520	1673
13	1318	1189
14	875	798
15	775	822
16	603	643
17	1455	1136
18	656	662
19	834	942
20	653	523
21	1038	851
22	1634	1624

Tab. 27 Passivrauchen (zu Abb. 31)

Messwert / Prob.	t0		t1	
	Glas	Haut	Glas	Haut
1	0,8	2,8	15,5	52,8
2	1,3	3,5	45,9	121,6
3	—	2,4	—	118,3

Tab. 28 Nicotin (zu Abb. 33)

Proband	t0	t1
1	1,3	0,8
2	0,7	0,7
3	0,3	0,6
4	2,0	1,2
5	1,0	0,6

Tab. 29 Hautpflegeprodukte

Proband	Kurzeittest		Langzeittest	
	t0	t1	t0	t1
1	1,5	1,5	1,7	2,7
2	3,2	2,9	2,0	2,6
3	3,9	3,1	1,3	2,4
4	2,0	2,3	1,7	2,6
5	3,3	4,4	3,5	3,1
6	—	—	2,8	1,5
7	—	—	3,2	2,7
8	—	—	2,7	2,7
9	—	—	1,6	1,8
10	—	—	2,1	1,7

Tab. 30 Wirkstoffe, *in vivo*, Kurzeittest (zu Abb. 34)

Prob.	Vitamin E				Vitamin C				AGR			
	t0		t1		t0		t1		t0		t1	
	P	V	P	V	P	V	P	V	P	V	P	V
1	0,9	0,8	1,6	1,3	0,7	1,0	0,9	4,2	1,4	1,2	1,8	2,1
2	1,6	1,0	1,4	1,2	1,5	1,0	1,6	4,6	2,1	1,8	1,4	1,8
3	1,9	2,1	2,2	2,4	0,9	1,3	0,7	6,0	0,5	0,9	1,0	0,7
4	3,3	2,3	2,3	1,8	2,1	1,5	2,0	7,2	1,0	0,8	0,6	0,9
5	1,2	1,7	1,1	0,8	1,1	1,6	0,7	5,0	0,8	1,0	1,1	0,9
6	—	—	—	—	1,1	1,2	1,1	9,0	1,2	0,6	0,9	1,0
7	—	—	—	—	1,4	1,2	1,5	8,1	0,7	1,2	0,5	1,0
8	—	—	—	—	0,5	0,4	0,8	3,0	1,3	1,1	1,3	1,4
9	—	—	—	—	1,4	1,6	1,1	4,7	0,9	1,0	0,9	1,2
10	—	—	—	—	—	—	—	—	0,8	0,8	0,9	0,7

Tab. 31 Wirkstoffe, *in vivo*, Langzeittest (zu Abb. 35)

Prob.	Vitamin C				AGR			
	t0		t1		t0		t1	
	Placebo	Verum	Placebo	Verum	Placebo	Verum	Placebo	Verum
1	0,7	1,0	0,4	2,3	1,4	1,2	1,4	1,3
2	1,5	1,0	0,5	0,8	2,1	1,8	1,6	1,3
3	0,9	1,3	0,8	1,6	0,5	0,9	0,5	0,7
4	2,1	1,5	0,8	0,2	1,0	0,8	0,9	1,0
5	1,1	1,6	0,5	0,4	0,8	1,0	1,1	1,6
6	1,1	1,2	0,2	0,7	1,2	0,6	0,8	1,1
7	1,4	1,2	2,0	0,8	0,7	1,2	0,3	1,0
8	0,5	0,4	0,5	1,3	1,3	1,1	1,3	1,3
9	1,4	1,6	1,4	1,5	0,9	1,0	0,5	1,0
10	—	—	—	—	0,8	0,8	0,9	1,0

Tab. 32 Wirkstoffe, *in / ex vivo*, Kinetik (zu Abb. 36)

t0		t1		t2		t3		t4		t5	
<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>										
0,1	0,2	1,9	0,5	3,1	1,1	2,9	1,4	0,6	3,5	0,6	2,9

Tab. 33 Wirkstoffe, *in vitro*, Material

Stahl				Glas			
t1		t2		t1		t2	
Placebo	Verum	Placebo	Verum	Placebo	Verum	Placebo	Verum
1,1	0,9	1,1	9,4	2,7	2,9	1,0	6,9

Tab. 34 Wirkstoffe, *in vitro*, Kinetik (zu Abb. 37)

Messwert	t1		t2		t3	
	Placebo	Verum	Placebo	Verum	Placebo	Verum
1	2,7	2,9	1,0	6,9	0,6	3,8
2	2,6	4,0	1,2	7,0	1,0	7,2

Tab. 35 Wirkstoffe, *in vitro*, Spül- / Trägergas

gefilterte Raumluft		N ₂	
Placebo	Verum	Placebo	Verum
1,0	6,9	0,9	5,9

Tab. 36 Wirkstoffe, *in vitro*, Lageratmosphäre (zu Abb. 38)

Raumluft		gefilterte Raumluft		Stickstoff		Argon	
Placebo	Verum	Placebo	Verum	Placebo	Verum	Placebo	Verum
1,0	6,9	0,4	1,6	0,6	1,9	0,6	1,5

Tab. 37 Wirkstoffe, *in vitro*, Reduktionsmittel (zu Abb. 39)

Messwert	unbehandelt	Vitamin C	Kaliumiodid
1	0,5	1,2	0,6
2	0,8	2,6	1,1

8.1.2.2 Untersuchung potentieller CO₂-Einflussfaktoren

Tab. 38 Temperatur (zu Abb. 40)

Proband	RT	erwärmt
1	0,23	0,33
2	0,28	0,44
3	0,21	0,29

Tab. 39 Feuchtigkeit (zu Abb. 41)

Hautfeuchte				CO ₂ -Emission [ppm]			
t0	t1	t2	t3	t0	t1	t2	t3
33	50	30	31	0,23	0,41	0,30	0,26

Tab. 40 pH-Wert (zu Abb. 42)

Proband	Haut-pH		CO ₂ -Emission [ppm]			
	pH-5-Creme	pH-9-Creme	t0		t1	
			pH-5-Creme	pH-9-Creme	pH-5-Creme	pH-9-Creme
1	5,2	6,4	0,19	0,19	0,22	0,17
2	5,2	6,7	0,21	0,20	0,24	0,20
3	5,2	6,2	0,25	0,27	0,26	0,23

Tab. 41 tesa[®]-Stripping (zu Abb. 43)

Proband	t0	t1
1	0,20	0,22
2	0,16	0,17
3	0,18	0,20
4	0,16	0,26

Tab. 42 Rasur (zu Abb. 44)

Proband	TEWL [$\text{gh}^{-1}\text{m}^{-2}$]			CO ₂ -Emission [ppm]		
	t0	t1	t2	t0	t1	t2
1	6,0	9,0	10,0	0,20	0,32	0,22
2	5,0	13,0	11,0	0,14	0,25	0,22
3	5,0	13,0	10,8	0,26	0,38	0,31

Tab. 43 Reibung (zu Abb. 45)

Proband	t0	t1
1	0,12	0,15
2	0,16	0,18
3	0,22	0,23

Tab. 44 Nicotinsäureester (zu Abb. 46)

Proband	Hautfeuchte				CO ₂ -Emission [ppm]			
	t0		t1		t0		t1	
	Placebo	Verum	Placebo	Verum	Placebo	Verum	Placebo	Verum
1	26	25	28	29	0,21	0,19	0,56	0,44
2	34	33	35	39	0,19	0,20	0,24	0,22
3	40	39	43	41	0,19	0,17	0,30	0,25

Tab. 45 UV-A-Strahlung (zu Abb. 47)

Proband	t0	t1
1	0,17	0,22
2	0,25	0,27
3	0,25	0,26

Tab. 46 UV-A-Strahlung, repetitiv

Proband	t0		t1	
	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt
1	0,16	0,17	0,15	0,14
2	0,16	0,18	0,16	0,17
3	0,15	0,16	0,19	0,19
4	0,18	0,16	0,16	0,20
5	0,14	0,14	0,22	0,19
6	0,10	0,12	0,13	0,14
7	0,21	0,18	0,19	0,19

Tab. 47 Sonnensimulator (zu Abb. 48)

Prob.	t0		t1		t2		t3		t4	
	unbest.	best.								
1	0,23	0,20	0,19	0,15	0,20	0,14	0,22	0,16	0,20	0,16
2	0,32	0,30	0,25	0,23	0,23	0,28	0,23	0,26	0,26	0,28
3	0,36	0,31	0,31	0,28	0,33	0,26	0,28	0,25	0,34	0,25
4	0,15	0,27	0,15	0,19	0,16	0,18	0,17	0,18	0,15	0,14
5	0,38	0,39	0,19	0,28	0,29	0,35	0,23	0,27	0,26	0,31
6	0,25	0,28	0,19	0,20	0,22	0,23	0,22	0,20	0,22	0,25
7	0,20	0,17	0,21	0,13	0,17	0,17	0,18	0,14	0,18	0,16

Tab. 48 Hautbakterien (zu Abb. 49)

Proband	t0	t1
1	0,21	0,15
2	0,35	0,25
3	0,41	0,31
4	0,24	0,19

Tab. 49 Körperregion (zu Abb. 50)

Proband	Arm	Wade
1	0,21	0,20
2	0,29	0,25
3	0,27	0,26
4	0,16	0,13

Tab. 50 Alter (zu Abb. 51)

Proband	Hautfeuchte		CO ₂ -Emission [ppm]	
	jung	alt	jung	alt
1	39	46	0,30	0,22
2	35	38	0,31	0,30
3	32	42	0,34	0,24
4	38	59	0,43	0,23
5	31	44	0,21	0,26
6	33	36	0,23	0,25
7	42	46	0,34	0,27
8	29	38	0,29	0,23
9	43	59	0,29	0,24
10	34	—	0,31	—

Tab. 51 Ethnische Herkunft (zu Abb. 52)

Proband	Kaukasier	Asiaten	Schwarzafrikaner
1	0,24	0,15	0,21
2	0,20	0,22	0,34
3	0,22	0,25	0,26
4	0,29	0,27	0,22
5	0,16	0,20	0,25
6	0,18	0,20	0,26
7	0,26	0,23	0,31
8	0,17	—	0,23
9	0,24	—	—
10	0,22	—	—

Tab. 52 Öle (zu Abb. 53)

Proband	t0			t1		
	Gelb	Mandel	Sonne	Gelb	Mandel	Sonne
1	0,25	0,22	0,27	0,25	0,17	0,22
2	0,12	0,17	0,13	0,12	0,11	0,07
3	0,16	0,17	0,18	0,12	0,12	0,11

Tab. 53 Hautpflegecreme, Kurzzeittest (zu Abb. 54)

Proband	Hautfeuchte				CO ₂ -Emission [ppm]			
	t0		t1		t0		t1	
	unbeh.	beh.	unbeh.	beh.	unbeh.	beh.	unbeh.	beh.
1	40	32	43	41	0,21	0,17	0,16	0,19
2	45	46	43	58	0,21	0,26	0,19	0,22
3	40	32	39	39	0,16	0,19	0,14	0,21
4	30	34	35	51	0,39	0,30	0,31	0,25
5	33	34	34	41	0,21	0,15	0,18	0,17

Tab. 54 Hautpflegecreme, Langzeittest (zu Abb. 55)

Proband	Hautfeuchte				CO ₂ -Emission [ppm]			
	t0		t1		t0		t1	
	unbeh.	beh.	unbeh.	beh.	unbeh.	beh.	unbeh.	beh.
1	43	45	41	47	0,18	0,20	0,20	0,23
2	31	26	28	34	0,22	0,20	0,25	0,24
3	42	37	35	42	0,22	0,24	0,28	0,37
4	48	45	49	55	0,24	0,22	0,28	0,36
5	30	32	29	48	0,35	0,31	0,45	0,41
6	28	27	26	39	0,17	0,17	0,33	0,35
7	40	39	40	52	—	—	—	—
8	43	47	46	57	0,20	0,16	0,42	0,53
9	41	41	38	40	0,19	0,22	0,42	0,34

Tab. 55 Lippenpflegestift (zu Abb. 56)

Proband	TEWL [gh ⁻¹ m ⁻²]		CO ₂ -Emission [ppm]	
	t0	t1	t0	t1
1	4,5	3,3	0,14	0,19
2	6,9	6,3	0,16	0,22
3	4,0	3,5	0,17	0,20

Tab. 56 Lippenpflegestift, Kinetik (zu Abb. 57)

TEWL [gh ⁻¹ m ⁻²]					CO ₂ -Emission [ppm]				
t0	t1	t2	t3	t4	t0	t1	t2	t3	t4
4,7	3,5	3,5	4,0	3,8	0,16	0,20	0,21	0,17	0,17

Tab. 57 CoQ10, junges Probandenkollektiv (zu Abb. 58)

Prob.	t0			t1			t2			t3		
	unb.	P	V									
1	0,32	0,28	0,30	0,34	0,35	0,37	0,26	0,31	0,26	0,24	0,27	0,27
2	0,32	0,30	0,31	0,29	0,33	0,28	0,25	0,31	0,27	—	—	—
3	0,36	0,32	0,35	0,26	0,26	0,26	0,21	0,24	0,26	0,22	0,26	0,23
4	0,40	0,44	0,45	0,32	0,40	0,44	0,28	0,33	0,31	0,26	0,27	0,34
5	0,22	0,22	0,20	0,23	0,22	0,21	0,15	0,14	0,15	0,17	0,17	0,19
6	0,22	0,19	0,29	0,21	0,22	0,22	0,21	0,19	0,18	0,15	0,17	0,19
7	0,36	0,34	0,31	0,32	0,39	0,36	0,28	0,28	0,35	0,22	0,32	0,29
8	0,27	0,32	0,28	0,21	0,29	0,31	0,22	0,26	0,21	0,14	0,21	0,20
9	0,30	0,27	0,29	0,21	0,23	0,24	0,22	0,20	0,21	0,26	0,24	0,24
10	0,32	0,29	0,32	0,29	0,30	0,32	0,23	0,23	0,24	0,24	0,28	0,30

Tab. 58 CoQ10, altes Probandenkollektiv (zu Abb. 58)

Prob.	t0			t1			t2			t3		
	unb.	P	V									
1	0,22	0,22	0,21	0,23	0,23	0,23	0,18	0,17	0,18	0,14	0,16	0,16
2	0,29	0,33	0,29	0,26	0,32	0,34	0,23	0,25	0,24	0,25	0,27	0,26
3	0,27	0,22	0,27	0,26	0,23	0,33	0,17	0,19	0,18	—	—	—
4	0,23	0,24	0,23	0,19	0,24	0,26	0,18	0,20	0,18	0,16	0,20	0,20
5	0,23	0,25	0,23	0,21	0,19	0,17	0,16	0,18	0,14	0,23	0,22	0,20
6	0,18	0,31	0,18	0,30	0,17	0,31	0,21	0,17	0,28	—	—	—
7	0,24	0,30	0,24	0,20	0,33	0,30	0,19	0,20	0,26	0,23	0,22	0,23
8	0,22	0,24	0,22	0,26	0,27	0,30	0,19	0,18	0,18	0,17	0,22	0,20
9	0,23	0,24	0,23	0,28	0,30	0,28	0,21	0,17	0,18	0,27	0,21	0,18

Tab. 59 Vitamin C, Hautfeuchte (zu Abb. 59)

Proband	t0			t1			t2		
	unbeh.	Placebo	Verum	unbeh.	Placebo	Verum	unbeh.	Placebo	Verum
1	30	29	30	31	31	37	29	37	37
2	29	28	34	38	34	43	41	41	38
3	46	40	41	52	54	56	45	44	45
4	31	37	34	36	45	41	37	52	40
5	27	24	26	28	27	28	27	29	25
6	42	46	47	48	52	52	49	60	59
7	27	28	28	31	36	35	25	43	35
8	47	52	51	48	58	57	52	54	53
9	29	33	30	30	38	37	31	44	43
10	50	48	47	53	50	54	54	51	53
11	40	43	44	41	54	57	44	59	51
12	30	30	29	31	38	36	30	37	37
13	42	36	41	40	41	42	41	41	40
14	34	35	33	36	42	40	41	44	46
15	41	41	45	40	50	53	47	55	52
16	36	36	30	39	44	36	43	45	45

Tab. 60 Vitamin C, CO₂-Emission (zu Abb. 59)

Proband	t0			t1			t2		
	unbeh.	Placebo	Verum	unbeh.	Placebo	Verum	unbeh.	Placebo	Verum
1	0,17	0,15	0,15	0,15	0,13	0,12	0,18	0,25	0,18
2	0,25	0,34	0,25	0,25	0,33	0,24	0,26	0,30	0,30
3	0,24	0,21	0,20	0,18	0,21	0,19	0,24	0,24	0,32
4	0,12	0,13	0,14	0,16	0,11	0,08	0,16	0,23	0,20
5	0,14	0,11	0,14	0,21	0,12	0,18	0,17	0,19	0,34
6	0,15	0,15	0,15	0,13	0,16	0,15	0,17	0,24	0,23
7	0,43	0,23	0,27	0,34	0,16	0,09	0,39	0,26	0,22
8	0,30	0,24	0,33	0,31	0,25	0,30	0,34	0,35	0,37
9	0,18	0,19	0,23	0,19	0,15	0,20	0,21	0,29	0,32
10	0,15	0,14	0,14	0,16	0,15	0,15	0,23	0,26	0,23
11	0,14	0,13	0,14	0,13	0,14	0,14	0,14	0,18	0,17
12	0,38	0,31	0,25	0,32	0,21	0,20	—	—	—
13	0,32	0,39	0,41	0,33	0,40	0,36	0,31	0,45	0,37
14	0,24	0,25	0,23	0,25	0,30	0,18	0,19	0,25	0,22
15	0,17	0,21	0,19	0,17	0,24	0,16	0,17	0,25	0,22
16	0,26	0,28	0,27	0,18	0,23	0,19	0,19	0,24	0,20

8.2 Geräte und Chemikalien

8.2.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
41C CO ₂ Analyzer	Thermo Environmental Instruments
42C NO-NO ₂ -NO _x Analyzer, Trace Level	Thermo Environmental Instruments
Automatic Spiral Plater	Whitley
Brutschrank	Heraeus
Sauna	Knüllwald
Skin-pH-Meter PH 900	Courage + Khazaka
Sonnensimulator Sol 3	Dr. Hönle
Suction-Blister-Pumpe	Beiersdorf (Eigenbau)
Tewameter / Corneometer TC 350	Courage + Khazaka
UPE-Messgerät	Beiersdorf (Eigenbau)
UV-A-Strahler Dermalight 2020	Dr. Hönle

8.2.2 Chemikalien und anderes Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller	Gefahrensymbol	R- und S-Sätze
Aceton	Merck	F	R: 11 S: 9-16-23.2-33
api Coryne	bioMérieux	—	—
L-Arginin	Sigma	—	—
Argon	Linde	—	—
L(+)-Ascorbinsäure	Merck	—	—
Caseinpepton	Merck	—	—
CASO-Bouillon	Merck	—	—
Columbia-Agar	Merck	—	—
Einmalrasierer	Wilkinson	—	—
Filterpatrone mit Oxidationsmasse	MCZ	F C Xn	—
Gelböl	Shell	—	—
D(+)-Glucose	Merck	—	—
Hefeextrakt	Merck	—	—

Bezeichnung	Hersteller	Gefahrensymbol	R- und S-Sätze
L-Histidin	Merck	—	—
ID 32 Staph	bioMérieux	—	—
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	—	—
<i>d</i> -Kaliumhydrogenphosphat	Merck	—	—
Kaliumiodid	Sigma	Xn	R: 36/38-42/43-61 S: 26-36/37/39-45
Mandelöl	Henry Lamotte	—	—
Natriumchlorid	Merck	—	—
<i>d</i> -Natriumhydrogenphosphat	Merck	—	—
Natriumlaurylsulfat	Sigma	Xn	R: 22-36/38 S: 26-36
Natriumnitrit	Sigma	O T	R: 8-20-25-36/37/38-40 S: 17-26-36/37/39-45
Nicotinell 3	Novartis	—	—
Nicotinsäuremethylester	Fluka	Xi	R: 36/37/38 S: 26-36
N _ω -Nitro-L-arginin	Fluka	—	S: 22-24/25
Sojamehlpepton	Merck	—	—
Sonnenblumenöl	Henry Lamotte	—	—
Sterillium Virugard	Bode	F	—
Stickstoff 5.0	Linde	—	—
tesafilm, Breite: 5 cm	tesa	—	—
Triton X-100 (Octylphenol-decaethylenglycolether)	Merck	Xn	R: 22-41 S: 24-26-39
Tween 80 (Polyoxyethylen-sorbitanmonooleat)	Merck	—	—
Wasserstoffperoxid, 30%	Aldrich	C	R: 8-34 S: 3-28.2-36/39-45
Zigaretten mit Filter	Gauloises	—	—
Zirkonal L435G (Aluminium-zirkonium-tetrachlorhydroxyglycin, 35%)	Giulini	—	—

8.2.3 Pufferlösungen und Nährmedien

Abspülpuffer

Lösung A: 5,1 g KH_2PO_4 / 500 ml aq. dest.

Lösung B: 6,7 g Na_2HPO_4 / 500 ml aq. dest.

Abspülpuffer (pH 7,9 – 8,0): 5 ml Lösung A + 75 ml Lösung B + 0,08 ml Triton X-100

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

Caseinpepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
aq. dest.	ad 1000 ml

Enthemmungsmedium

Tween 80	2,40 g
Sojalecithin	0,24 g
Histidin	0,08 g
LB-Medium	ad 80 ml

CASO-Spezialbouillon

Caseinpepton	17,0 g
Sojamehlpepton	3,0 g
NaCl	5,0 g
K_2HPO_4	2,5 g
Glucose	2,5 g
Tween 80	1,0 g
aq. dest.	ad 1000 ml

Coryne-Spezialagar

Columbia-Agar	43,0 g
Hefeextrakt	3,2 g
Glucose	2,1 g
Tween 80	10,0 g
aq. dest.	ad 1000 ml

9 Literaturverzeichnis

Albrecht, S., Brandl, H., Zimmermann, T.: Chemilumineszenz, Hüthig, Heidelberg 1996.

Amman, E. C. B., Galvin, R. D.: Problems associated with the determination of carbon dioxide by infra-red absorption, *J. Appl. Physiol.*, 25, 33-37 (1968).

Andrew, P. J., Mayer, B.: Enzymatic function of nitric oxide synthases, *Cardiovasc. Res.*, 43, 521-531 (1999).

Änggård, E.: Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine, *Lancet*, 343, 1199-1206 (1994).

Archer, S.: Measurement of nitric oxide in biological models, *FASEB J.*, 7, 349-360 (1993).

Barbul, A.: Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications, *J. Parenter. Enteral Nutr.*, 10, 227-238 (1986).

Barel, A. O., Clarys, P., Wessels, B., de Romsee, A.: Non-invasive electrical measurements for evaluating the water content of the horny layer: comparison between capacitance and conductance measurements. In: Scott, R. C., Guy, R. H., Hadgraft, J., Boode, H. E.: Prediction of percutaneous penetration: methods, measurements, modelling, IBC, London 1991.

Baumgart, J.: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, 3. Aufl., Behr's, Hamburg 1993.

Beckman, J. S.: The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. In: Lancaster, J.: Nitric oxide: principles and actions, Academic Press, San Diego 1996.

Berardesca, E., Maibach, H.: Transcutaneous CO₂ and O₂ diffusion, *Skin Pharmacol.*, 6, 3-9 (1993).

Betteridge, D. J.: What is oxidative stress?, *Metabolism*, 49, 3-8 (2000).

Bharadwaj, L., Prasad, K.: Mediation of H₂O₂-induced vascular relaxation by endothelium-derived relaxing factor, *Mol. Cell. Biochem.*, 149-150, 267-270 (1995).

Brookes, P. S., Bolaños, J. P., Heales, S. J. R.: The assumption that nitric oxide inhibits mitochondrial ATP synthesis is correct, *FEBS Lett.*, 446, 261-263 (1999).

Brown, G. C.: Nitric oxide and mitochondrial respiration, *Biochim. Biophys. Acta*, 1411, 351-369 (1999).

Bruch-Gerharz, D., Ruzicka, T., Kolb-Bachofen, V.: Nitric oxide in human skin: current status and future prospects, *J. Invest. Dermatol.*, 110, 1-7 (1998).

Busch, P., Müller, R., Pittermann, W.: Uses and limitations of the porcine skin model in cosmetic research, *Parfuem. Kosmet.*, 77, 20-27 (1996).

Butler, A. R., Flitney, F. W., Williams, D. L. H.: NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective, *Trends Pharmacol. Sci.*, 16, 18-22 (1995).

Chambers, D. C., Tunnicliffe, W. S., Ayres, J. G.: Acute inhalation of cigarette smoke increases lower respiratory tract nitric oxide concentrations, *Thorax*, 53, 677-679 (1998).

Church, D. F., Pryor, W. A.: Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications, *Environ. Health Perspect.*, 64, 111-126 (1985).

Coffman, J. D.: Effects of endothelium-derived nitric oxide on skin and digital blood flow in humans, *Am. J. Physiol.*, 267, H2087-H2090 (1994).

Courage, W.: Hardware and measuring principle: Corneometer. In: Elsner, P., Berardesca, E., Maibach, H. I.: *Bioengineering of the skin: water and the stratum corneum*, CRC, Boca Raton 1994.

Courage, W., Khazaka, R.: Information und Gebrauchsanweisung zum Tewameter, Köln 1998.

Culotta, E., Koshland, D. E.: NO news is good news, *Science*, 258, 1862-1865 (1992).

Cunico, R. L., Maibach, H. I., Khan, H., Bloom, E.: Skin barrier properties in the newborn, *Biol. Neonate*, 32, 177-182 (1977).

Deliconstantinos, G., Villiotou, V., Stavrides, J. C.: Increase of particulate nitric oxide synthase activity and peroxy-nitrite synthesis in UVB-irradiated keratinocyte membranes, *Biochem. J.*, 320, 997-1003 (1996).

Deliconstantinos, G., Villiotou, V., Stavrides, J. C.: Inhibition of ultraviolet B-induced skin erythema by N-nitro-L-arginine and N-monomethyl-L-arginine, *J. Dermatol. Science*, 15, 23-35 (1997).

Delpy, D., Parker, D., Reynolds, E., Wilbite, W.: Transcutaneous blood gas analysis by mass spectrometry and gas chromatography, *Birth Defects*, 15, 91-101 (1979).

Derwort, C.: Nachweis und Differenzierung von Bakterien der Hautflora mit molekularbiologischen, biochemischen und kulturellen Methoden, Diplomarbeit, Fachhochschule Hamburg 2000.

Döhle, M.: Untersuchung der Einflussgrößen des körpereigenen Botenstoffs „Stickstoffmonoxid“ in vivo mit verschiedenen Messverfahren, Dissertation, Universität Hamburg 1999.

Duchstein, H.-J., Riederer, S., Erbach, C.: Aktive Stickstoffspezies – Ein neues Forschungsgebiet für die Pharmazeutische Chemie, *Pharm. Unserer Zeit*, 28, 197-207 (1999).

du Vivier, A.: Klinische Dermatologie, Ullstein Mosby, Berlin 1996.

Egawa, M., Yamashita, T., Kohno, Y., Sakamoto, T., Ito, K., Kumano, Y.: Cigarette smoke induced lipid peroxidation and its oxidative effect on the skin, 3rd ASCS Conference (Taipei), 271-277 (1997).

Falbe, J., Regitz, M.: Römpp-Lexikon Chemie, 10. Aufl., Thieme, Stuttgart 1997.

Feelisch, M., Kubitzek, D., Werringloer, J.: The oxyhemoglobin assay. In: Feelisch, M., Stamler, J. S.: Methods in nitric oxide research, Wiley, Chichester 1996.

Feldman, P. L., Griffith, O. W., Hong, H., Stühr, D. J.: Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-N^G-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation, J. Med. Chem, 36, 491-496 (1993).

Finkel, P.: Antitranspirantien. In: Umbach, W.: Kosmetik, 2. Aufl., Thieme, Stuttgart 1995a.

Finkel, P.: Lichtschutzmittel. In: Umbach, W.: Kosmetik, 2. Aufl., Thieme, Stuttgart 1995b.

Förster, T., Meister, J., Möller, H., Ortanderl, S., Schlotmann, K.: Protecting the skin against exogenous noxes, Cosmet. Toiletries, 114, 71-80 (1999).

Frame, G. W., Strauss, W. G., Maibach, H. I.: Carbon dioxide emission of the human arm and hand, J. Invest. Dermatol., 59, 155-159 (1972).

Frey, T. G., Mannella, C. A.: The internal structure of mitochondria, Trends Biol. Sci., 25, 319-324 (2000).

Furchgott, R. F.: Der relaxierende Faktor aus Endothelzellen: Entdeckung, frühe Untersuchungen und Identifizierung als Stickstoffmonoxid, Angew. Chem., 111, 1990-2000 (1999).

Furfine, E. S., Harmon, M. F., Paith, J. E., Garvey, E. P.: Selective inhibition of constitutive nitric oxide synthase by L-N^G-nitroarginine, *Biochemistry*, 32, 8512-8517 (1993).

Galla, H.-J.: Stickstoffmonoxid: Ein pluripotenter Vorläufer redoxaktivierter Transmitter, *GIT Fachz. Lab.*, 11, 1209-1213 (1994).

Gawkrodger, D. J.: *Dermatologie*, G. Fischer, Stuttgart 1995.

Gerlach, J. V.: Über das Hautatmen, *Arch. Anat. Physiol.*, 1, 431-455 (1851).

Goldsmith, P. C., Leslie, T. A., Hayes, N. A., Levell, N. J., Cowd, P. M., Foreman, J. C.: Inhibitors of nitric oxide synthase in human skin, *J. Invest. Dermatol.*, 106, 113-118 (1996).

HAMPL, V., Walters, C. L., Archer, S. L.: Determination of nitric oxide by the chemiluminescence reaction with ozone. In: Feilisch, M., Stamler, J. S.: *Methods in nitric oxide research*, Wiley, Chichester 1996.

Heitzer, T., Brockhoff, C., Mayer, B., Warnholtz, A., Mollnau, H., Henne, S., Meinertz, T., Münzel, T.: Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers, *Circ. Res.*, 86, e36-e41 (2000).

Howlett, R.: Nobel award stirs up debate on nitric oxide breakthrough, *Nature*, 395, 625-626 (1998).

Huang, A., Vita, J. A., Venema, R. C., Keaney, J. F.: Ascorbic acid enhances endothelial nitric-oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin, *J. Biol. Chem.*, 275, 17399-17406 (2000).

Ignarro, L. J.: Nitric oxide. In: Dulbecco, R.: *Encyclopedia of Human Biology*, 2. Aufl., Academic Press, San Diego 1997.

Ignarro, L. J.: Stickstoffmonoxid: ein einzigartiges endogenes Signalmolekül in der Gefäßbiologie, *Angew. Chem.*, 111, 2002-2013 (1999).

Kashiba-Iwatsuki, M., Kitoh, K., Kasahara, E., Yu, H., Nisikawa, M., Matsuo, M., Inoue, M.: Ascorbic acid and reducing agents regulate the fates and functions of S-nitrosothiols, *J. Biochem.*, 122, 1208-1214 (1997).

Klatt, P., Schmidt, K., Mayer, B.: Brain nitric oxide synthase is a haemoprotein, *Biochem. J.*, 288, 15-17 (1992).

Jackson, T. S., Xu, A., Vita, J. A., Keaney, J. F.: Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations, *Circ. Res.*, 83, 916-922 (1998).

Jung, E. G.: *Dermatologie*, 3. Aufl., Hippokrates, Stuttgart 1995.

Karlsun, P., Doenecke, D., Koolman, J.: *Biochemie*, 14. Aufl., Thieme, Stuttgart 1994.

Kellogg, D. L., Liu, Y., Kosiba, I. F., O'Donnell, D.: Role of nitric oxide in the vascular effects of local warming of the skin in humans, *J. Appl. Physiol.*, 86, 1185-1190 (1999).

Kindl, G., Raab, W.: *Licht und Haut*, 3. Aufl., Govi, Frankfurt 1993.

Kolb-Bachofen, V., Fehsel, K., Michel, G., Ruzicka, T.: Epidermal keratinocyte expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of psoriasis vulgaris, *Lancet*, 344, 139 (1994).

Koolman, J., Röhm, K.-H.: *Taschenatlas der Biochemie*, Thieme, Stuttgart 1994.

Koppenol, W. H.: The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxyxynitrite, *Free Radical Biol. Med.*, 25, 385-391 (1998).

Larson, R. A.: Naturally occurring antioxidants, Lewis Publishers, Boca Raton 1997.

Lenaz, G., D'Aurelio, M., Merlo Pich, M., Genova, M. L., Ventura, B., Bovina, C., Formiggini, G., Parenti Castelli, G.: Mitochondrial bioenergetics in aging, *Biochim. Biophys. Acta*, 1459, 397-404 (2000).

LMBG in der Fassung der Bekanntmachung vom 9.9.1997, Textsammlung Lebensmittelrecht, Beck, München 1998.

Malinski, T., Czuchajowski, L.: Nitric oxide measurement by electrochemical methods. In: Feelisch, M., Stamler, J. S.: *Methods in nitric oxide research*, Wiley, Chichester 1996.

Marzinzig, M., Nussler, A. K., Stadler, J., Marzinzig, E., Barthlen, W., Nussler, N. C., Beger, H. G., Morris, S. M., Brückner, U. B.: Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and S-nitrosothiols, *Nitric Oxide*, 1, 177-189 (1997).

May, J. M.: How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction, *Free Radical Biol. Med.*, 28, 1421-1429 (2000).

Mei, W.: About the nature of biophotons, *J. Biol. Sys.*, 2, 25-42 (1994).

Mei, W.: Biophotons of human skin triggered by UVR. In: Holick, M. F., Jung, E. G.: *Biologic effects of light 1995*, Walter de Gruyter, Berlin 1996.

Meyer, W.: *Die Haut des Schweines*, Schlütersche, Hannover 1986.

Möller, H., Matthies, W.: *Die Haut*. In: Umbach, W.: *Kosmetik*, 2. Aufl., Thieme, Stuttgart 1995.

Miller, V. M., Lewis, D. A., Rud, K. S., Offord, K. P., Croghan, I. T., Hurt, R. D.: Plasma nitric oxide before and after smoking cessation with nicotine nasal spray, *J. Clin. Pharmacol.*, 38, 22-27 (1997).

Misko, T. P., Moore, W. M., Kasten, T. P., Nickols, G. A., Corbett, J. A., Tilton, R. G., McDaniel, M. L., Williamson, J. R., Currie, M. G.: Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine, *Eur. J. Pharmacol.*, 233, 572-575 (1993).

Motitschke, L.: Gesichts-Make-up, Augen-, Lippen- und Nagelpflegemittel. In: Umbach, W.: Kosmetik, 2. Aufl., Thieme, Stuttgart 1995.

Müller, K.: Aktive Sauerstoffspezies, *Pharm. Unserer Zeit*, 17, 71-80 (1988).

Murad, F.: Die Entdeckung einiger biologischer Wirkungen von Stickstoffmonoxid und seiner Rolle für die Zellkommunikation, *Angew. Chem.*, 111, 1976-1989 (1999).

Mutschler, E.: Arzneimittelwirkungen, 8. Aufl., Wissenschaftl. Verl.ges., Stuttgart 2001.

Ohman, H., Vahlquist, A.: In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis, *Acta Derm. Venereol.*, 74, 375-379 (1994).

Ormerod, A. D., Dwyer, C. M., Reid, A., Copeland, P., Thompson, W. D.: Inducible nitric oxide synthase demonstrated in allergic and irritant contact dermatitis, *Acta Derm. Venereol.*, 77, 436-440 (1997).

Palmer, R. M., Ferrige, A. G., Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature*, 327, 524-526 (1987).

Qureshi, A. A., Lerner, L. H., Lerner, E. A.: From bedside to the bench and back: nitric oxide and the cutis, *Arch. Dermatol.*, 132, 889-893 (1996).

Rennie, P. J., Gower, D. B., Holland, K. T.: In vitro and in vivo studies of human axillary odour and the cutaneous microflora, *Br. J. Dermatol.*, 124, 596-602 (1991).

Robbins, C. R.: Skin, In: Dulbecco, R.: *Encyclopedia of Human Biology*, 2. Aufl., Academic Press, San Diego 1997.

Rothman, S.: Physiology and biochemistry of the skin, Chicago Press, Chicago 1957.

Sauermann, G., Mei, W., Hoppe, U., Stäb, F.: Ultraweak photon emission of human skin in vivo, *Methods Enzymol.*, 300, 419-428 (1999).

Schneider, G., Wittern, K.-P.: Hautpflegemittel. In: Umbach, W.: Kosmetik, 2. Aufl., Thieme, Stuttgart 1995.

Shastry, S., Dietz, N. M., Halliwill, J. R., Reed, A. S., Joyner, M. J.: Effects of nitric oxide synthase inhibition on cutaneous vasodilation during body heating in humans, *J. Appl. Physiol.*, 85, 830-834 (1998).

Shaw, L. A., Messer, A. C., Weiss, S.: Cutaneous respiration in man. Factors affecting the rate of carbon dioxide elimination and oxygen absorption, *Am. J. Physiol.*, 90, 107-108 (1929).

Shimizu, S., Ishii, M., Yamamoto, T., Momose, K.: Mechanism of nitric oxide production induced by H₂O₂ in cultured endothelial cells, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 95, 227-239 (1997).

Shutter, K.: The alkalineutralization capacity of human skin in vivo. In: 13th Congr. Int. Dermatol., Springer, Berlin 1968.

Singh, R. J., Hogg, N., Antholine, W. E., Kalyanaraman, B.: Mechanism of superoxide dismutase/H₂O₂-mediated nitric oxide release from S-nitrosoglutathione, *Arch. Biochem. Biophys.*, 372, 8-15 (1999).

Smith, J. N., Dasgupta, T. P.: Kinetics and mechanism of the decomposition of S-nitrosoglutathione by L-ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide, *Nitric Oxide*, 4, 57-66 (2000).

Smolle, J.: Grundlagen der Dermatologie. In: Czarnetzki, B., Kerl, H., Sterry, W.: Dermatologie und Venerologie, de Gruyter, Berlin 1992.

Stamler, J. S., Jia, L., Eu, J. P., McMahon, T. J., Demchenko, I. T., Bonaventura, J., Gernert, K., Piantadosi, C. A.: Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient, *Science*, 276, 2034-2037 (1997).

Steigleder, G. K.: *Dermatologie und Venerologie*, 5. Aufl., Thieme, Stuttgart 1987.

Stryer, L.: *Biochemie*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg 1994.

Stühr, D. J., Kwon, N. S., Nathan, C. F., Griffith, O. W., Feldman, P. L., Wiseman, J.: N^ω-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine, *J. Biol. Chem.*, 266, 6259-6263 (1991).

Thermo Instruments GmbH: *Bedienungsanleitung Trace Level Gas Filter Correlation CO₂-Analysator Modell TE41C*, Dortmund 1996.

Thermo Instruments GmbH: *Bedienungsanleitung Trace Level NO-NO_x-NO₂-Analysator Modell TE42C TL*, Dortmund 1997.

Thiele, F. A. J., van Kempen, L. H. J.: A micro method for measuring the carbon dioxide release by small skin areas, *Br. J. Dermatol.*, 86, 463-471 (1972).

Umbach, W.: *Kosmetische Wirkstoffe: Wirkung und Wirksamkeit – Ein allgemeiner Überblick*. In: Umbach, W.: *Kosmetik*, 2. Aufl., Thieme, Stuttgart 1995.

Weber, H.: Spin-Fallen zum Nachweis von Stickstoffmonoxid (NO), *Pharm. Unserer Zeit*, 28, 138-146 (1999).

Weitzberg, E., Lundberg, J. O. N.: Nonenzymatic nitric oxide production in humans, *Nitric Oxide*, 2, 1-7 (1998).

Weller, R.: Nitric oxide - a newly discovered chemical transmitter in human skin, *Br. J. Dermatol.*, 137, 665-672 (1997).

Weller, R.: Nitric oxide, skin growth and differentiation: more questions than answers?, *Clin. Exp. Dermatol.*, 24, 388-391 (1999).

Weller, R., Dykhuizen, R., Leifert, C., Ormerod, A.: Nitric oxide release accounts for the reduced incidence of cutaneous infections in psoriasis, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 36, 281-282 (1997).

Weller, R., Ormerod, A.: Increased expression of inducible nitric oxide (NO) synthase, *Br. J. Dermatol.*, 136, 132-137 (1997).

Weller, R., Pattullo, S., Smith, L., Golden, M., Ormerod, A., Benjamin, N.: Nitric oxide is generated on the skin surface by reduction of sweat nitrate, *J. Invest. Dermatol.*, 107, 327-331 (1996).

Wilson, D., Berardesca, E., Maibach, H. I.: In vitro transepidermal water loss: differences between black and white human skin, *Br. J. Dermatol.*, 119, 647-652 (1988).

Xie, Q. W., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Ding, A., Troso, T., Nathan, C.: Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages, *Science*, 256, 4705-4708 (1992).

Yan, X.: Detection by ozone-induced chemiluminescence in chromatography, *J. Chromatogr. A*, 842, 267-308 (1999).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ilka Vogel
Geburtsdatum, -ort	15.01.1973, Hamburg
Familienstand	ledig, keine Kinder

Schulbildung

1979 – 1992	Grundschule und Gymnasium in Hamburg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
-------------	--

Hochschulbildung

10/1992 – 04/1997	Lebensmittelchemie-Studium an der Universität Hamburg Abschluss: Erste lebensmittelchemische Staatsprüfung und Diplom
05/1997 – 10/1997	Praktische Ausbildung am Institut für Qualitätssicherung und -prüfung im Lebensmittelhandel GmbH in Hamburg
11/1997 – 04/1998	Lebensmittelchemisches Praktikum im Hygiene Institut Hamburg
08/1998	Zweite lebensmittelchemische Staatsprüfung
09/1998 – 08/2001	Dissertation an der Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, in Kooperation mit der Beiersdorf AG Hamburg, Abteilung Analytische Forschung