

Die Beurteilung
potentieller photoinduzierter Schäden
anhand quantitativer Bestimmungen
von reaktiven Sauerstoffspezies
und die Entwicklung
eines ESR-spektroskopischen Nachweises
von Sauerstoffradikalen
in humanem Kapillarblut

Anwendung für dermatologische und kosmetische
Fragestellungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der Universität Hamburg
Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften

vorgelegt von

Anke Klack
Hamburg 2008

Die vorliegende Arbeit entstand in den Monaten von Mai 2005 bis Oktober 2008 in der Forschungsabteilung für Biophysik der Beiersdorf AG Hamburg und am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. H.-J. Duchstein

Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Duchstein

Prof. Dr. K.-P. Wittern

Eingereicht am 13.10.2008

Mündliche Prüfung (Disputation) am: 14.11.2008

Druckjahr: 2008

Es gibt Dinge, die so ernst sind, daß man nur Witze darüber machen kann.

Niels Bohr 1885-1962, über seine schärfste Waffe, den Humor

Meinen Eltern in tiefer Dankbarkeit

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. H.- J. Duchstein bedanke ich mich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, die fachliche Betreuung, sowie das Vertrauen in meine Selbstständigkeit, und die Anregungen und Motivation in Zeiten der Unsicherheit.

Herrn Prof. Dr. K.-P. Wittern danke ich für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Großer Dank bezüglich der Möglichkeit der Durchführung meiner Experimente und der Betreuung, sowie fachlicher Unterstützung bei der Beiersdorf AG Hamburg gilt den Dres. H. Wenck, V. Schreiner, W.-P. Mei, T. Sokolowski, D. Emeis, N. Peters, sowie spezieller Dank für die Unterstützung in technischen Fragestellungen den Dipl. Ingres. R. Hagens, I. Grimm und A. Ring

Besonderer Dank gilt Frau S. Jaeger für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft sowohl auf fachlicher, als auch auf persönlicher Ebene, sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Für letzteres danke ich ebenfalls Herrn Dr. G. Schmeinck und meiner Mutter U. Klack.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Dr. T. Lemcke und Herrn Prof. J. B. Mielck für die fachlichen Diskussionen und die moralische Unterstützung.

Von Herzen danken möchte ich auch dem A. K. Duchstein, Frau C. Bostedt, Herrn Dr. A. Sakmann, Frau Dr. K. Wehner, Frau Dr. I. Schonn, Herrn Dr. C. Prühs, Herrn R. Nohr- Jürgens, Frau P. Voss, Herrn Y. Farag, Herrn S. Kruggel und allen anderen, mit denen ich am Institut für Pharmazie viel und laut gelacht habe, sowie R. Klaesson, B. Berger, M. Jeismann, S. Stephaniak und S. Viedebant, mit denen ich auch sonst viel und laut gelacht habe.

Mein größtes Dankeschön gilt meinen Eltern Ulla und Horst, meinen Geschwistern Gunnar und Gertje sowie ferner Markus, Svenja, Björn, Malte, Steffi, Gunnar S. und Axel für die immer währende Unterstützung und das Verständnis, die mir entgegenkamen und kommen.

Ihr seid die Besten, von Norden nach Süden, von Osten nach Westen!

Danke!

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 0.1: Verwendete Abkürzungen

Abkürzung	Ausführliche Formulierung
Asc^-	Ascorbat
$Asc\cdot$	Ascorbylradikal
\bar{x}	Mittelwert
S_x	Standardabweichung
8-OH-G	8-Hydroxyguanin
Abs.	Absorption
AMG	Arzneimittelgesetz
Amp.	Amplitude
AU	Area Unit (Flächeneinheit)
BMI	Body Mass Index
BPO	Benzoylperoxid
BSS	Buffered Standard Saline
CPH	1-Hydroxy-3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinhydrochlorid
CPO	1-Hydroxy-3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxyl
cps	Counts per second
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPP \cdot	Diphenylpicrylhydrazylradikal
DPPH	Diphenylpicrylhydrazin
dROMS	Detection of reactive oxygen metabolites
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
ESR	Elektronenspinresonanz
feki	Freiburger Ethikkommission
FORM	Free Oxygen Radical Monitor
FORT	Free Oxygen Radical Test
FORT-U	FORT-Unit (Einheit)
FRAS	Free Radical Analytical System
GMP	Good Manufacturing Practice

Tabelle 0.2: Verwendete Abkürzungen

Abkürzung	Ausführliche Formulierung
GSH	Glutathion
GSHPx	Glutathionperoxidase
HDMVEC	Humane Dermale Mikrovasculäre Endothelzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Horm.	Hormone
Int.	Intensität
IR	Infrarot
LAF	Laminar Airflow
LFBG	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
Li-Hep.	Lithiumheparin
LMR	Laser Magnetresonanz
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NNEIPPDA	N-Ethyl-N-isopropyl-p-phenylendiamin
NR	Neutralrot
PBS	Phosphate Buffered Saline
Prob.	Proband
QSS	Quasi-Steady-State
ROI	Region of Interest
ROM	Reactive Oxygen Metabolite
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RROS	radikalische Reaktive Sauerstoffspezies
Sign. Amp.	Signalamplitude
SOD	Superoxiddismutase
SR-Verhältnis	Signal-Rausch-Verhältnis
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl
TNS	Trypsin Neutralizing Solution
U	Unit
U-Carr.	Carratelli-Unit
UPE	ultraschwache Photonenemission
UPE _{UVA}	UV-A-induzierte UPE
UV	Ultraviolet

Inhaltsverzeichnis

I	Hauptteil	1
1	Einleitung	2
1.1	Sauerstoff	2
1.2	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	3
1.2.1	Biochemie reaktiver Sauerstoffspezies	4
1.3	Antioxidantien	11
1.3.1	Enzyme	13
1.3.2	Nicht-enzymatische Antioxidantien	14
1.4	Oxidativer Stress	16
1.4.1	Pathobiochemie reaktiver Sauerstoffspezies	18
1.4.2	Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies	21
1.5	Beziehungen zwischen der Haut und dem basolateralen Kompartiment	23
1.6	Bedeutung von UV-Licht und reaktiven Sauerstoffspezies für die Haut	25
1.6.1	Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies in biologischer Matrix	28
1.6.2	Kommerziell erhältliche Testsysteme zur Bestimmung von oxidativem Stress aus Kapillarblut	29
2	Zielsetzung	31
3	FORT-Test	33
3.1	Das FORT-System	33
3.2	Prinzip der Farbreaktion	34
3.3	Methode	35
3.4	Methodenursprung und Einheit	37
3.5	Durchführung einer Bestimmung am Probanden	38

3.5.1	Probennahme	39
3.5.2	Probenbereitung und Messung	40
3.6	Überprüfung der Mechanismen	40
3.6.1	Zusammensetzung des Testsystems	40
3.6.2	Analyse des Puffers	41
3.6.3	Analyse des Farbreagenzes	46
3.6.4	Zugabe von Eisenionen	49
3.6.5	Zugabe von Natrium-EDTA	53
3.6.6	Einfluss von Antioxidanzzugabe	55
3.7	Untersuchung des farbgebenden Prinzips	57
3.7.1	Analytik freier Radikale	58
3.7.2	Nachweis des farbigen Radikalkations	59
3.8	Probandenstudie	65
3.8.1	Ultraschwache Photonenemission	70
3.8.2	Ergebnisse	79
3.8.3	Schlussfolgerungen	81
3.9	Validität und Qualifizierung des Fertigtestsystems	84
3.9.1	Toxizitätsuntersuchungen an humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen	85
3.9.2	Einfluss von Hormonpräparaten auf den FORT-Wert	89
3.10	Abschließende Betrachtung zum FORT-Test	95
4	Entwicklung des ESR-Ascorbyl-Assays	99
4.1	Anforderungen an ein Testsystem mit der gewünschten Aussagekraft	99
4.1.1	Praktische Durchführbarkeit	100
4.1.2	Analytische Arbeitsweise	100
4.1.3	Einheiten	101
4.1.4	Wahl des analytischen Systems	102
4.2	Elektronenspinresonanzspektroskopie	106
4.2.1	Prinzip der ESR-Spektroskopie	106
4.2.2	Grundlagen der ESR-Spektroskopie	109
4.2.3	ESR-Spektren	115
4.3	Spintrapping, Spinlabelling und Standardsubstanzen	124
4.4	Das Ascorbylradikal	128

4.5	ESR-Spektroskopische Bestimmung des Ascorbylradikals	134
4.5.1	Standardisierung und Integritätsprüfung des Spektrometers . .	134
4.5.2	Nachweis des Ascorbylradikals in 50 μ L ESR-Kapillaren . . .	136
4.5.3	Erhöhung der Empfindlichkeit	140
4.5.4	Qualitativer Nachweis des Ascorbylradikals in Flachzellen . . .	150
4.5.5	Technische Entwicklung des Assays	153
4.5.6	Quantitative Bestimmung des Ascorbylradikals	158
4.6	Bestimmung des Ascorbatspiegels in Kapillarblut	169
4.6.1	Problematik der Quantifizierung von Ascorbat	170
4.6.2	Methoden zur Ascorbatbestimmung	172
4.6.3	Enzymatische Bestimmung von Ascorbat	174
4.6.4	Oxygraphische Verfolgung der Enzymreaktion	175
4.6.5	Durchführung der enzymatischen Ascorbatbestimmung	179
4.6.6	Kalibrierung	182
4.6.7	Bestimmung der Präzision	183
4.6.8	Transformation zur Berechnung des Quotienten	183
5	ESR-Untersuchungen zur systemischen Photoschädigung	184
5.1	Probandenstudie	184
5.1.1	Studiendesign	184
5.1.2	Ergebnisse	188
5.2	Abschließende Betrachtungen zum Ascorbyl-Assay	195
5.2.1	Entwicklung	195
5.2.2	Anwendung	198
6	Diskussion und Ausblick	202
7	Zusammenfassung	205
8	Summary	208
9	Literaturverzeichnis	210
II	Appendix	227

A	Experimenteller Teil	228
A.1	Material zur Durchführung eines FORT-Tests	228
A.2	Durchführung einer Bestimmung am Probanden	229
A.3	Zusammensetzung des Testsystems 3.6	230
A.3.1	Analyse des Puffers 3.6.2	230
A.3.2	Analyse des Farbreagenzes 3.6.3	236
A.3.3	Zugabe von Eisen 3.6.4	238
A.3.4	Zugabe von Natrium-EDTA, und Einfluss von Antioxidantien- zugabe 3.6.5 und 3.6.6	240
A.4	Untersuchung des farbgebenden Prinzips 3.7	241
A.4.1	Nachweis des farbigen Radikalkations 3.7.2	241
A.4.2	Bestimmung von Feldmitte, Linienbreite und g-Wert	242
A.5	Probandenstudie unter Anwendung des FORT-Testsystems zur Un- tersuchung der Wechselwirkungen zwischen Haut und systemischem Kompartiment 3.8	245
A.6	Validität und Qualifizierung des Fertigttestsystems 3.9	252
A.6.1	Toxizitätsuntersuchungen an humanen dermalen mikrovasku- lären Endothelzellen 3.9.1	252
A.6.2	Einfluss von Hormonpräparaten auf den FORT-Wert 3.9.2	254
A.7	Entwicklung des ESR-Ascorbyl-Assays	257
A.7.1	Standardisierung und Integritätsprüfung des Spektrometers 4.5.1	257
A.7.2	Erhöhung der Empfindlichkeit 4.5.3	261
A.7.3	Qualitativer Nachweis des Ascorbylradikals in Flachzellen 4.5.4	262
A.7.4	Technische Entwicklung des Assays 4.5.5	264
A.7.5	Quantitative Bestimmung des Ascorbylradikals 4.5.6	265
A.8	Bestimmung des Ascorbatspiegels aus Kapillarblut 4.6	269
A.8.1	Durchführung der enzymatischen Ascorbinsäurebestimmung 4.6.5	269
A.8.2	Externe Kalibrierung des Microx TX3 4.6.6	270
A.8.3	Bestimmung der Präzision 4.6.7	271
A.9	Probandenstudie 5.1	272
A.9.1	Ergebnisse 5.1.2	273
B	Anlagen nach Promotionsordnung	278
B.1	§4 Abs. 3: Gefahrstoffverzeichnis	278

B.2 §3 Abs.2 S.b: Versicherung an Eides statt	279
B.3 Curriculum vitae	280

Teil I
Hauptteil

1 Einleitung

1.1 Sauerstoff

Das Element Sauerstoff stellt einen erheblichen Teil der Lebewesen auf diesem Planeten vor einen großen Widerspruch. Mit seinem Anteil in der Atemluft und im Wasser wird die für aerobe, heterotrophe Organismen notwendige Zufuhr an Sauerstoff gedeckt, die dem lebensnotwendigen Energiegewinn durch die Oxidation organischer Substrate dient. Das homodimere Biradikal O_2 , welches die gasförmige elementare Form des Sauerstoffes darstellt, wird während dieses Prozesses in den Mitochondrien durch sukzessive Elektronenübertragung bis zur Oxidationsstufe des Wassers reduziert [1].

Jedoch stellt dasselbe Molekül eine unter bestimmten Bedingungen sehr reaktive, brandfördernde und toxische Verbindung dar. Höhere Partialdrücke, als in der Atemluft üblich, führen zu bisweil erheblichen neuronalen und pulmonalen Schädigungen [2, 3]. Der Grund dafür, dass aerobes Leben in einer Atmosphäre, wie der unseren überhaupt möglich ist, besteht in dem besonderen chemischen Bau des Sauerstoffmoleküls. Molekularer Sauerstoff besitzt im Grundzustand zwei ungepaarte Valenzelektronen, welche einzeln zwei entartete π -Orbitale besetzen. Diese verleihen dem Molekül einen natürlichen Triplettzustand mit der Spinnultiplizität von $s=1$. Mit dieser Konfiguration von Valenzelektronen stellt der Sauerstoff zwischen den meisten organischen Verbindungen mit einer geraden Anzahl von Valenzelektronen im Grundzustand eine absolute Ausnahme dar. Üblicherweise befinden sich diese in einem Singulettzustand mit einem Gesamtspin von $s=0$, also mit gepaarten Elektronen und unterliegen somit einer Spinbarriere in Bezug auf die Reaktion mit dem Sauerstoffmolekül [4].

1.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Wird die Spinbarriere, derer molekularer Sauerstoff unterliegt, durch die Übertragung einzelner Elektronen überwunden, resultieren Spezies des Sauerstoffes. Diese werden aufgrund ihrer im Vergleich zu molekularem Sauerstoff hohen Bereitschaft chemische Reaktionen einzugehen, häufig als reaktive Sauerstoffspezies (ROS)¹ bezeichnet. Den einzelnen Reduktionsschritten entsprechend der Übertragung eines, zweier und dreier einzelner Elektronen entstehen verschiedene Spezies: das Superoxidradikalanion, Wasserstoffperoxid und das hochreaktive Hydroxylradikal.

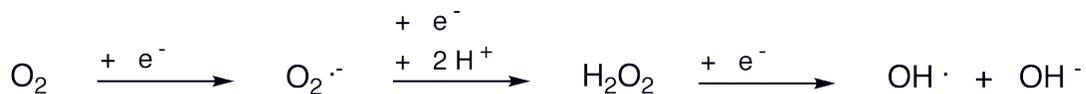


Abbildung 1.1: Sukzessive Reduktion von molekularem Sauerstoff über das Superoxidradikalanion und Wasserstoffperoxid bis zur Stufe des Hydroxylradikals

Die resultierenden Spezies sind an mannigfaltigen Reaktionen mit Biomolekülen beteiligt, die Oxidationsreaktionen im klassischen Sinne nach Lavoisier darstellen. Durch die oxidative Veränderung von Biomolekülen, welche häufig strukturabhängig sehr spezifische Funktionen erfüllen, verlieren diese ihre für die fehlerfreie Arbeitsweise des Organismus notwendige Integrität. Dies kann potentiell zur Schädigung des Organismus führen².

Weitere Verbindungen, die unter der Bezeichnung ROS beschrieben werden, sind sauerstoffzentrierte Radikale in der Gestalt von Alkyl- oder Peroxylradikalen und deren häufige Muttersubstanzen: wie organische Peroxide und Hydroperoxide. Ferner zählen zu ihnen der aus dem Triplett-Grundzustand des molekularen Sauerstoffes durch Anregung erzeugte Singulett-Sauerstoff, sowie Stickstoffmonoxid, Hypochlorit und Peroxynitrit. Stickstoffmonoxid, Wasserstoffperoxid, organische Peroxide und Hydroperoxide sind nur teilweise selbst sehr reaktionsfreudig. Sie sind jedoch an der Bildung hochreaktiver Spezies beteiligt und werden daher unter den reaktiven Sauerstoffspezies in der folgenden Abbildung mit angeführt [5].

¹ Reactive oxygen species

² Siehe oxidativer Stress weiter unten

$O_2^{\bullet-}$	Superoxidradikalanion
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
OH^\bullet	Hydroxylradikal
RO^\bullet	Alkoxyradikal
ROO^\bullet	Peroxyradikal
ROOR	Alkylperoxid
ROOH	Alkylhydroperoxid
1O_2	Singulett-Sauerstoff
NO^\bullet	Stickstoffmonoxid
OCl^-	Hypochlorit
$ONOO^-$	Peroxynitrit

Abbildung 1.2: Übersicht über reaktive Sauerstoffspezies

1.2.1 Biochemie reaktiver Sauerstoffspezies

Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies in biologischen Systemen kann auf sehr unterschiedlichen Wegen von geschehen. Dabei sind einige Mechanismen für die Generierung bestimmter ROS prädestiniert, wie zum Beispiel die Bildung von Alkoxy- und Peroxyradikalen im Zuge der Lipidperoxidation. Jedoch ist diese nicht der einzige Mechanismus, der zu einer Bildung eben dieser Spezies führt. Sowohl enzymkatalysierte als auch chemisch und physikalisch induzierte Mechanismen zur Bildung von ROS sind bekannt [5].

Das Superoxidradikalanion

Für die Bildung des Superoxidradikalanions aus molekularem Sauerstoff ist eine Ein-Elektronenübertragung notwendig. Zahlreiche Enzymsysteme sind dazu in der Lage, diese Art Reaktion zu katalysieren. In aeroben Zellen ist die mitochondriale Atmungskette eine der Hauptquellen für diese Sauerstoffspezies. Die Ursache hierfür ist die unvollständige Reduktion des molekularen Sauerstoffes zu Wasser unter anderem am Komplex IV- der Cytochrom-c-Oxidase. Auch das am DNA-Baustein-Abbau beteiligte Xanthinoxidase-System sowie die Reaktion der NADPH-Oxidase, der Cyclooxygenasen und der Lipoxygenase führen zur Bildung des Superoxidradikalanions [6, 7, 8]. In wässriger Lösung disproportionieren Superoxidradikalanionen pH-abhängig zu Wasserstoffperoxid [9].

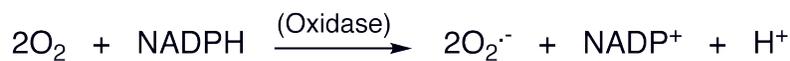


Abbildung 1.3: Enzymatisch katalysierte Reaktion zur Bildung von Superoxidradikalanion mittels NADPH-Oxidase

Wasserstoffperoxid

Die Reaktion zweier Superoxidradikalanionen miteinander zu Wasserstoffperoxid läuft in wässrigen Lösungen freiwillig und pH-abhängig ab. Unter physiologischen Bedingungen beträgt die Reaktionskonstante der spontanen Disproportionierung $2 \cdot 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) - einer Oxidoreduktase von der verschiedene Isoformen existieren - wird die Reaktion um den Faktor 10^4 auf $2 \cdot 10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ beschleunigt [10].



Abbildung 1.4: Reaktionsgleichung der durch Superoxiddismutase vermittelten Bildung von Wasserstoffperoxid

Auch das bereits erwähnte Xanthinoxidase-System generiert durch die Übertragung von zwei Elektronen Wasserstoffperoxid [8]. Das ungeladene Molekül besitzt, verglichen mit den meisten anderen reaktiven Sauerstoffspezies, die Möglichkeit über Biomembranen zu diffundieren und ist daher prinzipiell in jedem Kompartiment der Zelle anzutreffen. Auch die Reaktivität des Wasserstoffperoxides weicht, verglichen mit vielen anderen ROS, vom üblichen Verhalten ab. Verglichen mit der Aktivität des Singulett-Sauerstoffes oder der des Hydroxylradikals ist Wasserstoffperoxid relativ reaktionsträge. Das aus einer Spaltungsreaktion der Bindung zwischen den zwei Sauerstoffatomen des Wasserstoffperoxids hervorgehende Hydroxylradikal ist ausgesprochen reaktiv, und in vielen Fällen der Grund für schädigende Einflüsse des Wasserstoffperoxides [11].

Das Hydroxylradikal

Das Hydroxylradikal stellt unter den bisher erwähnten reaktiven Sauerstoffspezies die reaktivste Verbindung dar. Es reagiert augenblicklich mit jedwedem Biomolekül in seiner Umgebung und kann daher in seinen Reaktionen als diffusionskontrolliert beschrieben werden. Seinen Hauptursprung findet das Hydroxylradikal in Reaktionen nach dem Mechanismus der Fenton-Reaktion. Im Rahmen dieser wird im klassischen Sinne mittels Wasserstoffperoxid und zweiwertigem Eisen aus Weinsäure Dihydroxymaleinsäure gebildet [12, 13].

1934 postulierten Haber und Weiss, dass bei der Spaltung von Wasserstoffperoxid unter katalytischer Beteiligung von zweiwertigem Eisen das Hydroxylradikal gebildet wird. Sie beschrieben einen Mechanismus, bei dem Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel für Eisen fungiert [14]. Mit diesem Mechanismus wurde die von Fenton beschriebene Reaktion zur Oxidation der Weinsäure anschaulich erklärbar.

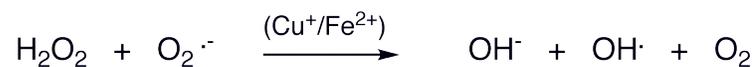


Abbildung 1.5: Haber-Weiss Reaktion zur Bildung des Hydroxylradikals in Gegenwart katalytischer Mengen von Eisen oder Kupfer und stöchiometrischer Mengen von Superoxidradikalanion

Übergangsmetallionen kommen in einer Zelle nahezu ubiquitär vor. Aufgrund seiner Befähigung zur Diffusion und seiner relativ hohen Lebensdauer besteht für das Wasserstoffperoxidmolekül nahezu überall in einer Zelle die Möglichkeit mit Übergangsmetallionen in Kontakt zu treten und das hochreaktive Hydroxylradikal zu generieren. Viele Biomoleküle besitzen zudem komplex assoziierte Übergangsmetallionen, wie Fe^{2+} oder Cu^+ so dass das Hydroxylradikal in unmittelbarer Nähe seiner Reaktionspartner gebildet werden kann [10].

Organische Hydroperoxide, Alkoxy- und Peroxylradikale

Die meisten Reaktionen des Hydroxylradikals mit weiteren Biomolekülen erfolgen unter Abstraktion eines Wasserstoffatoms des Reaktionspartners. Dies resultiert meist in der Bildung C-zentrierter Radikale, die unter aeroben Bedingungen mit Geschwindigkeitskonstanten von häufig $>10^9 M^{-1} s^{-1}$ mit molekularem Sauerstoff reagieren. Die Produkte dieser Reaktionen sind Peroxylradikale, die aufgrund ihrer Reaktivität dazu in der Lage sind, Wasserstoffatome von weiteren Biomolekülen zu abstrahieren. Die entstehenden Hydroperoxide zerfallen häufig unter Übergangsmetallkatalyse oder unter UV-Einfluss zu Alkoxyradikalen oder C-zentrierten Alkylradikalen, aus denen ein neuer, gemäß der beschriebenen Wege ablaufender Reaktionszyklus hervorgehen kann [15].

Ein klassischer, nach diesem Schema ablaufender Mechanismus, der für die vorliegende Arbeit von Belang sein sollte, ist die Lipidperoxidation. Die entscheidenden Reaktionsschritte der Lipidperoxidation sind daher am Beispiel der Autoxidation der Linolensäure dargestellt. Die intermediär auftretenden Peroxylradikale können zudem durch bestimmte Zerfallsmechanismen zu angeregten Carbonylverbindungen führen, welche für die vorliegende Arbeit neben den reaktiven Sauerstoffspezies von Bedeutung waren.

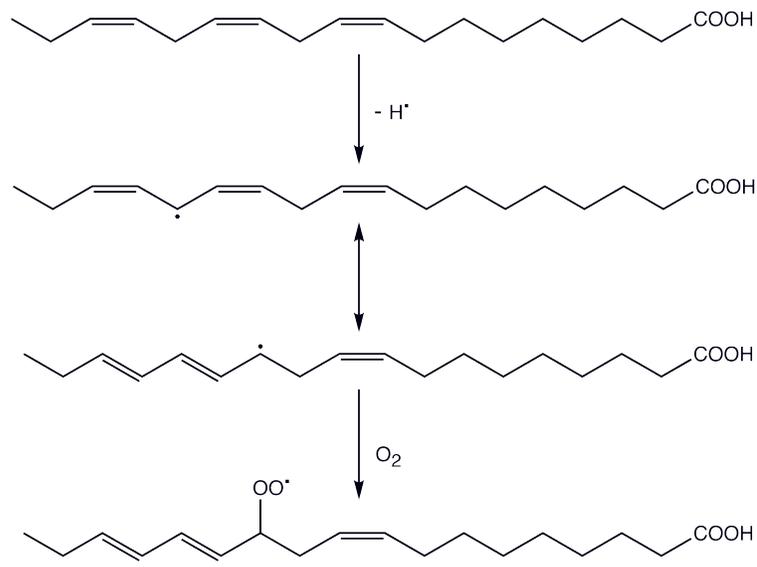
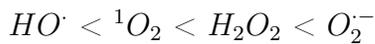


Abbildung 1.6: Bildung von Lipidperoxiden aus Linolensäure

Singulett-Sauerstoff

Eine reaktive Sauerstoffspezies, die ebenfalls zu den erwähnten angeregten Carbonylverbindungen führen kann und zu den hochreaktiven Sauerstoffspezies zählt, ist der Singulett-Sauerstoff. Beim Vergleich der Reaktivität reiht sich diese Spezies zwischen dem Hydroxylradikal und dem Superoxidradikalanion noch vor Wasserstoffperoxid ein



Wie die Terminologie zur Benennung dieser Spezies verrät, handelt es sich um einen Zustand des molekularen Sauerstoffes, der aus der Anregung der ungepaarten Elektronen des Triplett-Sauerstoffes hervorgeht.

Hierbei wird unter Spinumkehr eines dieser Elektronen in ein energiereicheres Orbital angehoben. Diese Modulation der Valenzelektronen verleiht dem Sauerstoffmolekül diamagnetische Eigenschaften und hebt somit die kinetische Spinbarriere auf, welche das Biradikal im Grundzustand an der Reaktion mit anderen Molekülen im Singulettzustand hindert. So kann Singulett-Sauerstoff an einer klassischen Diels-Alder Reaktion beteiligt sein und eine große Zahl chemischer Reaktionen mit Biomolekülen eingehen [16].

Am Beispiel des Singulett-Sauerstoff lässt sich verdeutlichen, dass identische ROS auf unterschiedlichen Wegen gebildet werden können. Im Rahmen der Photosynthese der Pflanzen wird Singulett-Sauerstoff als Nebenprodukt von durch Licht angeregtem Chlorophyll gebildet. Nach dem selben Prinzip -also der Photoexzitation- geschieht dies vermittelt über Porphyrinstrukturen als Photosensibilisatoren beispielsweise in der Haut [17]. Ein anderer Weg zur Bildung von Singulett-Sauerstoff erfolgt in eukaryontischen Zellen in einer lichtunabhängigen Reaktion über die durch das Enzym Myeloperoxidase (MPO) katalysierte Reaktion beispielsweise in den Phagozyten unter Umsetzung von Hypochlorit und Wasserstoffperoxid [10].

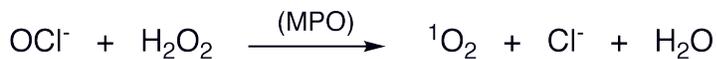


Abbildung 1.7: Durch Myeloperoxidase vermittelte Reaktion zur Bildung von Singulett-Sauerstoff

Auch innerhalb der Prostaglandinbiosynthese kommt es zur Bildung von Singulett-Sauerstoff. Die Möglichkeit der Singulett-Sauerstoffbildung vermittelt über Cytochromoxidasen wird ebenfalls diskutiert [11].

Hypochlorit

Im Rahmen des respiratorischen Ausbruches produzieren aktivierte Phagozyten eine Reihe reaktiver Sauerstoffspezies, die bei der Immunreaktion eine toxische Wirkung gegenüber infizierenden Erregern entwickeln. Das Haemprotein Myeloperoxidase generiert unter anderem aus Cl^- -Ionen hypochlorige Säure, welche bei der Bildung des Singulett-Sauerstoffes eine Rolle spielt. Doch auch hypochlorige Säure beziehungsweise Hypochlorit selbst ist ein stark wirksames Baktrizid und wirkt direkt auf potentiell infektiöse Mikroorganismen [18].



Abbildung 1.8: Durch Myeloperoxidase vermittelte Reaktion zur Bildung von Hypochlorit aus Wasserstoffperoxid

Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit

Obwohl es in Bezug auf chemische Reaktionen mit anderen Biomolekülen als verhältnismässig träge einzustufen ist, stellt Stickstoffmonoxid mit seinen paramagnetischen Eigenschaften ein potentes Agens für die Reaktion mit anderen freien Radikalen dar. Durch die Reaktion mit dem ebenfalls paramagnetischen Superoxidradikalanion entsteht das sehr reaktive Peroxynitrit.



Abbildung 1.9: Reaktion zur Bildung von Peroxynitrit aus Stickstoffmonoxid und Superoxidradikalanion

Das gebildete Peroxynitrit besitzt keine paramagnetischen Eigenschaften mehr, jedoch zeigt es eine Reaktivität gegenüber Biomolekülen, die dem Profil des Hydroxylradikals sehr ähnlich ist.

Die genauen Mechanismen, die dem Peroxynitrit diese besonders hohe Aktivität verleihen, werden in verschiedenen Arbeiten diskutiert. In sauren Kompartimenten kommt es durch Protonierung des anionischen Peroxynitrits wahrscheinlich zur Bildung der Peroxysalpetersäure, was bereits eine erhebliche Steigerung der Reaktivität zur Folge hat. Jedoch konnte die Annahme, dass aus der freien Säure das Hydroxylradikal freigesetzt wird, bislang nicht bestätigt werden [19].

1.3 Antioxidantien

Der Begriff eines Antioxidans oder Oxidationshemmers wird auf unterschiedlichen Gebieten der Wissenschaft verschieden verwendet. Streng an der Definition einer Oxidation als einer Elektronenabgabe orientiert ist jede Komponente in einem System, die das Potential entsprechend der elektrochemischen Spannungsreihe besitzt einem anderen Systembestandteil mindestens ein Elektron zu entreissen für den entsprechenden Bestandteil als Antioxidans anzusehen. Dementsprechend läge die Vermutung nahe, jedes Antioxidans sei im klassischen Sinne ein Reduktionsmittel.

Für viele Antioxidantien, die in biologischen Systemen wirksam sind, lassen sich die antioxidativen Eigenschaften durchaus anhand dieser Argumentationskette beschreiben. Die Grenzen der Begründung von dieser thermodynamischen Seite sind jedoch erreicht, wenn es darum geht, die antioxidativen Fähigkeiten komplex strukturierter Enzyme und Proteine zu erklären, da die entsprechenden Halbzellenreaktionen nicht ohne Weiteres formuliert werden können. In Bezug auf biologische Systeme wurde eine weitreichend zutreffende Definition durch Halliwell geprägt. Hiernach ist ein Antioxidans . . . , any substance that, when present at low concentrations compared with those of any oxidizable substrate, significantly delays or prevents oxidation of the substrate“ [10].

Die Definition auf Seite 11 vernachlässigt die mechanistische Seite einer Oxidation und erreicht die Kategorisierung einer als antioxidativ wirksam einzustufenden Materie von der Seite des Effektes, den diese auf ein entsprechendes System hat. Daher ist die Definition eines Antioxidans im Sinne von Halliwell für die Betrachtung von biologischen Systemen als zutreffend anzusehen und soll von hier an als geltend betrachtet werden. Entsprechend dieser Begriffsbestimmung lassen sich die antioxidativ wirksamen Prinzipien im biologischen System einteilen, in nicht-enzymatische Systeme und solche, an denen Enzymreaktionen beteiligt sind [10]. Die nichtenzymatischen Antioxidantien lassen sich ein weiteres Mal untergliedern in:

- **Gruppe I**
Chelatoren für Übergangsmetalle wie Kupfer und zweiwertiges Eisen.
- **Gruppe II**
Substanzen, die ROS-generierende Systeme inhibieren oder die Bildungsrate von ROS aus denselben herabsetzen.
- **Gruppe III**
Protektiv wirkende Proteine, die als Interzeptoren für ROS die oxidative Veränderung von anderen Biomolekülen verhindern.
- **Gruppe IV**
Niedermolekulare Einzelstrukturen, denen ein direktes antioxidatives Wirken gegenüber ROS möglich ist.

Häufig werden in der Literatur auch Spurenelemente wie Mangan und Selen zu den Antioxidantien gezählt. Sie werden hier gesondert besprochen.

1.3.1 Enzyme

Zu den wichtigsten enzymatischen Antioxidantien zählt die Superoxiddismutase (SOD), welche in drei unterschiedlichen Isoformen bekannt ist, das Enzym Katalase, sowie verschiedene Peroxidasen, von denen die Glutathionperoxidase (GSHPx) mit ihrer GSH-regenerierenden³ Wirkung die bedeutendste darstellt. Jedes dieser Enzyme bedingt den katalytischen Abbau reaktiver Sauerstoffspezies und fällt damit unter die von Halliwell gegebene Definition eines Antioxidans [7, 9, 10].

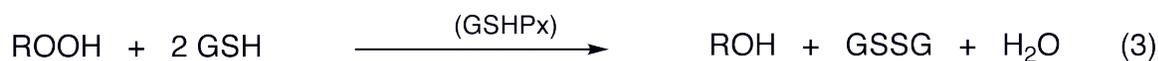
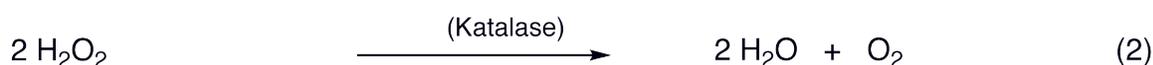


Abbildung 1.10: Reaktionen enzymatischer Antioxidantien: (1) Abbau von Superoxidradikalanion, (2) Katalasereaktion zur Dismutation von Wasserstoffperoxid, (3) Reduktion von Hydroperoxiden mittels Glutathionperoxidase

Die Abbildung 1.10 gibt die Nettoreaktionen der drei Enzymsysteme wieder. Diese sind teilweise in kompliziertere Einzelschritte differenziert. So setzt sich die Reaktion der Katalase beispielsweise aus mehreren Einzelreaktionen zusammen, bei denen Wasserstoffperoxid einerseits als Oxidationsmittel und andererseits als Reduktionsmittel betrachtet werden kann [16].

³ GSH steht für das Peptid Glutathion

1.3.2 Nicht-enzymatische Antioxidantien

Gruppe I

Unter dieser und der folgenden Gruppe werden nicht-enzymatische Verbindungen, die dafür sorgen, dass durch ihre Präsenz die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies im Vorfeld gegenüber dem Zustand ihrer Abwesenheit vermindert wird, zusammengefasst. Bei den in Gruppe I beschriebenen Antioxidantien handelt es sich um Strukturen, welche die häufig an Reaktionen zur ROS Bildung beteiligten Übergangsmetallionen wie Fe^{2+} an der Zugänglichkeit für diese Reaktionen hindern. Dies kann durch die Bildung stabiler Chelatkomplexe mit Chelatoren wie zum Beispiel Desferoxamin realisiert werden. Im menschlichen Körper sind zahlreiche Biomoleküle zur Bildung von Chelatkomplexen befähigt und können daher prinzipiell als Antioxidantien verstanden werden. Hierzu zählen Kohlenhydrate, organische Säureanionen, wie Citrat, und selbst DNA. Jedoch werden diesen Chelatkomplexen aber auch katalytische Fähigkeiten in Bezug auf die Lipidperoxidation zugeschrieben [10].

Gruppe II

Substanzen, die die Aktivität ROS-generierender Systeme verringern, bilden die hier eingeteilte Gruppe II der Antioxidantien. Unter den weiter oben aufgeführten ROS befinden sich zahlreiche Verbindungen, die unter der Beteiligung von Enzymen gebildet werden. Die am Arachidonsäurestoffwechsel beteiligte 12/15-Lipoxygenase wird als ROS-vermittelter Co-Initiator für neurodegenerative Erkrankungen wie den Morbi Parkinson und Alzheimer diskutiert. Inhibitoren dieses Enzymes verringern die Rate der Neurodegeneration und werden daher in diesem Zusammenhang als Antioxidantien diskutiert [20, 21]. Weitere Beispiele dieser Art finden sich im Arzneischatz, wie die nicht-steroidalen Antirheumatika Acetylsalicylsäure und Ibuprofen, sowie der Xanthinoxidas-Hemmstoff Allopurinol. Die Beteiligung der entsprechenden ROS macht jeweils nur einen Teil des häufig inflammatorischen Geschehens zur pathogenese der Erkrankungen aus, bei denen die genannten Arzneistoffe eingesetzt werden. Daher werden diese selten als Antioxidantien bezeichnet.

Gruppe III

Für diese Gruppe werden die Proteine der akuten Phase, wie das C-reaktive Protein und die Hitzeschockproteine diskutiert. Physiologische Studien deuten darauf hin, dass besagte Eiweiße unter Bedingungen erhöhter Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in verminderter Menge vorliegen, was auf eine oxidative Depletion hindeutet [22, 23].

Gruppe IV

Die große Gruppe der niedermolekularen Verbindungen mit direkter antioxidativer Wirkung lässt sich erneut unterteilen, in solche, die im Organismus selbst gebildet werden, und solche, die mit der Nahrung ihren Weg in den Organismus finden. Letztere werden teilweise synthetisch hergestellt und für Mensch und Haustier vielfach als Nahrungsergänzungsmittel angeboten. Die prominentesten unter diesen Verbindungen sind die Vitamine C, A und E, deren Derivate, sowie Polyphenole überwiegend pflanzlicher Herkunft, Carotinoide, Coenzym Q, Thiolverbindungen, Mannitol und Harnsäure. Die Strukturen dieser Substanzen sind sehr speziell auf den Ort der Wirkung und den Mechanismus der Wirkung abgestimmt. Sie unterscheiden sich unter anderem in Hydrophilie, Größe, pH-Wirkoptimum und Wirkmechanismus, so dass ihr Zusammenspiel in verschiedenen Kompartimenten der Zelle und sogar über Biomembranen hinweg möglich ist [10].

Spurenelemente

Ebenfalls als antioxidativ wirksame Nahrungsbestandteile werden Zink, Mangan und Selen erwähnt. Sie sind für den Organismus essentiell und führen durch ihr Fehlen zu Mangelercheinungen. Jedoch wirken die besagten Ionen nicht autark als Antioxidantien, sondern sie sind häufige Cofaktoren für die aufgeführten antioxidativ wirksamen Enzyme. So sind Zink und Mangan in verschiedenen Formen der SOD vertreten und Selen findet sich in der Aminosäure Selenocystein im aktiven Zentrum der Glutathionperoxidase.

Bei dem Spektrum der antioxidativen Prinzipien handelt es sich um ein sehr vielschichtig organisiertes, an vielen Stellen ineinander greifendes Gesamtsystem. Die Zusammensetzung der miteinander wirkenden Komponenten variiert gewebsspezifisch und ist den jeweils vorherrschenden Bedingungen bezüglich der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies angepasst [10].

Aus diesem Zusammenspiel von Antioxidantien ergibt sich ein effektives System um den eingangs erwähnten Reaktionen der reaktiven Sauerstoffspezies mit Biomolekülen, wie Lipiden, Proteinen und der DNA entgegen zu wirken. Dieses komplexe System zum Erhalt der Homöostase liefert somit eine Voraussetzung dafür, dass biologische Organismen den Ausnahmen der kinetischen Hemmung des molekularen Sauerstoff widerstehen und damit in unserer Atmosphäre überleben können.

1.4 Oxidativer Stress

Unter homöostatischen Bedingungen werden durch die generierenden Systeme ROS gebildet und durch die ineinander greifenden Mechanismen des antioxidativen Systems abgebaut. Es resultiert der dynamische Gleichgewichtszustand, innerhalb dessen die Konzentration der Intermediate (ROS) von der Lage des Gleichgewichtes entsprechend der Bildung oder dem Zerfall derselben abhängig ist.

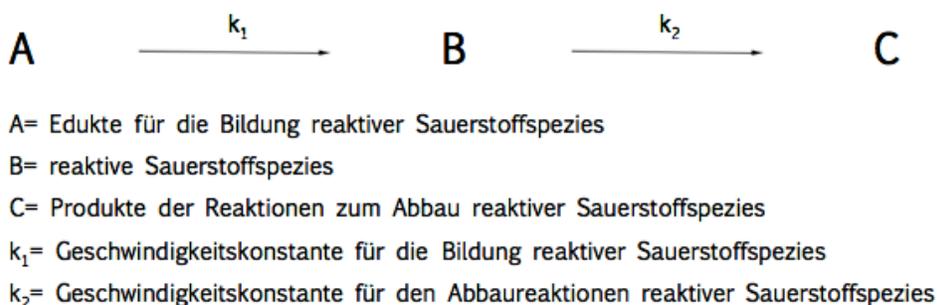


Abbildung 1.11: Bildung und Abbau reaktiver Sauerstoffspezies

Die in Abbildung 1.11 zusammengefassten Konzentrationen und Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten stellen stark vereinfachte Summen der Einzelkonzentrationen und Einzelprozesse dar. Die Mannigfaltigkeit der an diesem Geschehen teilhabenden Reaktionen, sowie deren Interdependenz und mechanistische Vielfalt machen eine Beschreibung der genauen Zusammensetzung des Systems aus kinetischer Sicht schwierig. Hinzu kommt, dass die meisten Intermediate (B) aufgrund ihrer hohen Reaktivität sehr kurzlebig sind, so dass sich Aussagen zu Geschwindigkeitskonstanten einzelner Reaktionen anhand von Konzentrationsbestimmungen ausserordentlich schwer treffen lassen.

Eine in den Bereichen stochastisch-chemischer Kinetik gängig angewandte Methode der Vereinfachung bedient sich der Annahme eines Quasi-Steady-State (QSS) zur Beschreibung kontinuierlicher Bioprozesse [24]. Auch zur Beschreibung des prooxidativ-antioxidativen Gleichgewichtes kann diese Beschreibung verwendet werden [5]. Unter der hier getroffenen Annahme der Bodenstein'schen Quasistationarität resultiert für die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies als Intermediate mit $[B] \rightarrow const$ eine Konzentrationsänderung von $\frac{d[B]}{dt} \rightarrow 0$. Durch diese Vereinfachung liesse sich ein Teil des Systems durch die Konzentration der gebildeten Produkte (C) beschreiben, da die Intermediatkonzentration unverändert bleibt.

Die antioxidativen Systeme in der eukaryontischen Zelle sind so effektiv wie komplex. Jedoch sind sie nicht dazu in der Lage, einen Quasi-Steady-State aufrecht zu erhalten, in dem die intermediär gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies quantitativ durch antioxidative Systeme abgebaut werden. Es kommt zu den bereits erwähnten Reaktionen mit Biomolekülen, wie Lipiden, Proteinen, Kohlenhydraten und der DNA. In weiten Grenzen kann eine Zelle auf die durch oxidative Veränderungen häufig nicht mehr funktionsfähigen Biomoleküle durch Adaptionenmechanismen, Reparatur oder schlimmstenfalls durch den programmierten Zelltod reagieren [10]. Verändert sich die Lage des prooxidativ-antioxidativen Gleichgewichtes jedoch zugunsten der ROS generierenden Systeme, erhöht sich die Inzidenz der potentiell zu Zellschäden führenden Reaktionen reaktiver Sauerstoffspezies mit Biomolekülen.

Die Geschwindigkeitskonstante der den Abbau reaktiver Intermediate beschreibenden Prozesse k_2 stellt eine vereinfachte Zusammenfassung aller Geschwindigkeitskonstanten antioxidativer Prozesse und aller Geschwindigkeitskonstanten aller Reaktionen der reaktiven Intermediate mit Biomolekülen dar. Dementsprechend verkörpert auch der Term (C) zur Beschreibung der Konzentration der Produkte eine Summe aller aus Oxidationsreaktionen hervorgehenden Produkte. Diese beinhaltet die Summe der oxidierten Formen der Antioxidantien, sowie die Summe oxidativ veränderter Biomoleküle. Kommt es zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichtes auf die Seite der Bildung der Intermediate, verändert sich das Verhältnis innerhalb der Summe der durch Oxidationsreaktionen gebildeten Produkte. Aufgrund der hohen Reaktivität der Intermediate gilt weiterhin die Annahme eines QSS so dass davon ausgegangen werden kann, dass im Verhältnis zur Ausgangs- Gleichgewichtslage vermehrt oxidierte Biomoleküle vorliegen. Eine solche Verschiebung kann entweder durch die vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, oder auf eine verminderte Verfügbarkeit antioxidativer Mechanismen zurückgeführt werden.

Die Bezeichnung der Verschiebung des prooxidativ-antioxidativen Gleichgewichtes mit den beschriebenen Konsequenzen zieht Sies, einer der führenden Wissenschaftler auf dem Gebiet der Biochemie reaktiver Sauerstoffspezies, für seine vielfach zitierte Definition des pathobiochemischen Phänomens des oxidativen Stresses heran. Er definiert diesen als „... a disturbance in the prooxidant-antioxidant balance in favour of the former, leading to potential damage.“[25].

1.4.1 Pathobiochemie reaktiver Sauerstoffspezies

Reaktionen von reaktiven Sauerstoffspezies mit Biomolekülen können potentiellen Schaden in einer Zelle und dementsprechend im Zellverband eines Gewebes anrichten. Zahlreiche Erkrankungen werden mit dem Phänomen des oxidativen Stresses assoziiert. So wird ein erheblicher Anteil am Verlauf chronisch inflammatorischer Krankheiten wie der rheumatoiden Arthritis der Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies zugeschrieben. Weitere Erkrankungen, die im Verdacht stehen mit dem Phänomen des oxidativen Stresses verbunden zu sein, sind Erkrankungen des Gefäßsystems wie Artherosklerose, sowie die Entstehung des Diabetes Mellitus, die Can-

cerogenese und zahlreiche neurodegenerative Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer oder die Parkinson'sche Krankheit. Auch Lebensgewohnheiten und Prädisposition können die Lage des prooxidativ-antioxidativen Gleichgewichtes beeinflussen. Block et al. zeigten in einer Studie mit 298 Teilnehmern anhand der Bestimmung von Biomarkern für oxidativen Stress, dass das Ausmaß der individuellen Dysbalance des prooxidativ-antioxidativen Gleichgewichtes von zahlreichen Faktoren beeinflusst wird. Rauchen, zunehmendes Alter, weibliches Geschlecht, Cholesterolkonzentration im Plasma sowie Ascorbinsäurekonzentration im Plasma sind einige dieser Faktoren [26].

Mechanismen der Schädigung zellulärer Strukturen betreffen hauptsächlich Veränderungen an der DNA, an Proteinen und an Lipiden. Die hierbei greifenden Mechanismen und gebildeten Produkte sind so vielfältig wie die Reaktionsmöglichkeiten der gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies [27].

Schädigung der DNA

Veränderungen an der DNA können durch reaktive Sauerstoffspezies sowohl an Purin- und Pyrimidinbasen als auch an den Zuckersubstituenten eintreten. Die häufigsten Schädigungen treten hierbei durch das Einwirken des Hydroxylradikals auf, welches zu einer Reihe von Produkten führt [28]. Addition an die erstgenannten Molekülbau- steine, sowie Öffnungen der Imidazolringe der Purinbasen haben Strangbrüche und Quervernetzungen des Makromoleküls zur Folge, welche zu Mutationen und damit zur Cancerogenese beitragen können. Singulett-sauerstoff, sowie der Lipidperoxidati- on entstammende Alkoxyradikale zeigen bei ihren Reaktionen mit der DNA Präfe- renzen für die Reaktion mit Guanin. Ein hieraus resultierendes Produkt stellt das 8-Hydroxyguanin (8-OH-G) dar, welches durch die Reaktion mit Singulett-sauerstoff entsteht.

Die Wirkung von Wasserstoffperoxid auf die DNA bezieht sich auf dessen indirek- te Eigenschaften als Muttersubstanz für das Hydroxylradikal, welches durch die schon beschriebenen Mechanismen unter katalytischem Mitwirken von Übergangs- metallen oder durch Homolyse unter Einwirken von UV Licht freigesetzt werden kann.

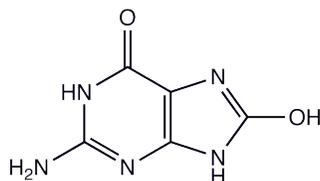


Abbildung 1.12: 8-Hydroxyguanin (8-OH-G)

Schädigung von Proteinen

Proteine entfalten ihre Wirkung häufig abhängig von einer genau determinierten Primärstruktur. Die Veränderung von einzelnen Aminosäureresten kann einen vollständigen Funktionsverlust eines Proteins mit sich bringen. Häufige Veränderungen entstehen durch Additionsreaktionen von Hydroxylradikalen an aromatischen Kernen von Phenylalanin und durch unspezifische Oxidation von Histidin, Tryptophan, Tyrosin, Methionin und von Thiolgruppen in Cysteinresten sowie aufgrund der Bildung von Carbonylen durch unspezifische Desaminierungsreaktionen [10].

Schädigung von Lipiden

Der bereits beschriebene Ablauf der Lipidperoxidation stellt den wichtigsten Mechanismus im Zusammenhang mit der oxidativen Veränderung von Lipiden dar. Hierbei sind sowohl Membranlipide als auch in Lipoproteinen enthaltene freie Fettsäuren und Triglyceride betroffen. Die Lipidperoxidation ist ein vielstufiger Prozess, der zu einer Reihe von Produkten führt, bei denen es sich häufig um kurzkettige Aldehyde handelt, welche selbst schädigende Reaktionen eingehen können. Ein Hauptabbauprodukt des oxidativen Abbaus von Lipiden ist das ebenfalls schädliche Malondialdehyd. Durch die Veränderung von Membranlipiden besteht die Gefahr eines partiellen Integritätsverlustes der Zellkompartimentierung und somit eine existentielle Gefahr für die Zelle. Die Gefährdung für die Zelle beruht auf der Veränderung der flüssig-kristallinen Eigenschaften der Lipiddoppelschicht durch die Zusammensetzung der Lipidmuster. Die Veränderung der Lipidmuster und -strukturen in den Plasmalipoproteinen wird ferner als kardinaler Auslöser und Promotor für die Geschehnisse bei der arteriosklerotischen Gefäßkrankheit angesehen [29].

1.4.2 Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies *in vivo* ist ebenso schwierig, wie das Unterfangen anhand des Nachweises reaktiver Sauerstoffspezies eine qualitative Aussage bezüglich der Lage des prooxidativ-antioxidativen Gleichgewichtes zu tätigen. Dies ist einerseits begründet in der nahezu unüberschaubaren Komplexität des Zusammenspiels der Prozesse, die zum antioxidativen System beitragen, andererseits ist die technische Verwirklichung von Analysemethoden zum direkten Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies wegen ihrer häufig sehr kurzen Lebensdauer sehr kompliziert. Es bestehen zwei verschiedene Ansätze zur Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies:

Auf der einen Seite steht der direkte Nachweis der ROS, welcher sich wie beschrieben kompliziert darstellt. Demgegenüber besteht die Möglichkeit nicht die Konzentration der Intermediate im QSS zu erfassen, sondern die Menge der durch Reaktion mit Biomolekülen gebildeten Produkte zu bestimmen. Dieses Vorgehen wird „Fingerprinting“ genannt. Eine Voraussetzung für diese Form der Analyse ist, dass die gewählten Analyten für Reaktionen, die mit oxidativem Stress assoziiert sind, spezifisch sind [10].

Direkter Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies

Der direkte Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies *in vivo* erfolgt bestenfalls anhand von physikochemischen Eigenschaften, welche für erst genannte spezifisch sind und sie in biologischer Matrix selektiv nachweisbar machen. Viele der reaktiven Sauerstoffspezies besitzen Radikalcharakter und können daher unter bestimmten Bedingungen mittels ESR-spektroskopischer Methoden nachgewiesen werden. Andere Methoden zum Nachweis für reaktive Sauerstoffspezies bedienen sich derer oxidativer und häufig elektrophiler Eigenschaften, sowie die Beteiligung einiger Verbindungen an Chemilumineszenzvorgängen. Sie sind verglichen mit ESR-Methoden jedoch häufig weniger spezifisch für eine einzelne Spezies [10].

Indirekter Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies

Entsprechend der hauptsächlichen Schäden, die reaktive Sauerstoffspezies an Biomolekülen anrichten können, werden zum „Fingerprinting“ Produkte aus den Reaktionen mit DNA, Proteinen und Lipiden herangezogen. Zeitweilig wird auch die Depletion der Antioxidantien der Gruppen I-IV zu den „Fingerprintmethoden“ hinzugerechnet und als antioxidative Kapazität einer Probe bestimmt. Aus bereits erwähnten Gründen der Komplexität auf dieser Seite des Gleichgewichtes wird diese Zuordnung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht verwendet. Schädigungen an der DNA treten durch Strangbrüche, Veränderungen der Desoxyribose und der Basen in Erscheinung wobei sowohl Strangbrüche, als auch Zuckerveränderungen nicht spezifisch für die Veränderung durch reaktive Sauerstoffspezies sind [10]. Als Surrogate für die Analytik werden daher vielfach veränderte DNA-Basen herangezogen. Für die Quantifizierung *in vivo* dienen vornehmlich mit dem Urin ausgeschiedene Verbindungen, die über HPLC-Analytik bestimmbar sind [30].

Da die Lipidperoxidation auf vielen Ebenen und zahlreiche unterschiedliche Lipide betreffend abläuft, kann eine immense Menge unterschiedlicher Zwischenprodukte des Prozesses als „Fingerprint-Molekül“ herangezogen werden. Dementsprechend vielfältig sind die Möglichkeiten zum Nachweis von Strukturen, die als Surrogate für die Veränderungen an Membranlipiden, Lipoproteinen und Fettsäuren dienen. Die Veränderung des Fettsäuremusters eines Gewebes beziehungsweise einer Probe, welche mittels Gaschromatographie oder HPLC bestimmt wird, kann zur Aussage herangezogen werden. Ferner existieren verschiedene Methoden zum Nachweis von Lipidperoxiden und Lipidhydroperoxiden, F_2 -Isoprostanen, die der Cyclooxygenasereaktion entstammen, sowie niedermolekularen Aldehyden, vornehmlich Malondialdehyd als terminalem Abbauprodukt der Kettenreaktion.

Die Quantifizierung von Proteinschäden durch reaktive Sauerstoffspezies ist wie die Bestimmung von Lipidschäden aufgrund der Substratvielseitigkeit ein weites Gebiet. Drei unterschiedliche Hauptansätze bestehen für die Nachweise:

Die Bestimmung speziell veränderter Aminosäurereste⁴, der Nachweis von nicht-amidischen Carbonylfunktionen und der Nachweis von Proteinperoxiden [10]. Letztgenannte zwei Methoden ähneln den Vorgehensweisen zum Nachweis von Lipidperoxiden. Eine auch in der Arzneistoffanalytik angewandte Methode beruht auf der Freisetzung elementaren Iods aus Iodid durch die Oxidation an den zu bestimmenden Peroxiden [31].

Generell gilt für alle Methoden zur Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies, dass eine Aussage zum Ausmaß des oxidativen Stresses anhand der Bestimmung einer einzelnen Spezies beziehungsweise eines einzelnen Analyten lediglich einen sehr geringen Ausschnitt des komplexen Geschehens zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und daraus resultierender Reaktionen wiedergeben kann. Selbst die direkte Quantifizierung mittels ESR-Spektroskopie kann nur den Anteil reaktiver Sauerstoffspezies mit Radikalcharakter und somit nur das auf diesen Spezies beruhende Ausmaß an Verschiebung des prooxidativ-antioxidativen Gleichgewichtes widerspiegeln [32].

1.5 Beziehungen zwischen der Haut und dem basolateralen Kompartiment

Die Haut stellt mit bis zu 1,5 m^2 Fläche und bis zu 10 kg Gewicht das größte und schwerste Organ des menschlichen Körpers dar. Zusätzlich zu ihrer Hauptaufgabe, der Abgrenzung des Innenraumes des Organismus gegen die Aussenwelt, besitzt sie zahlreiche weitere Aufgaben. Durch ihren komplexen Aufbau und die aufeinander abgestimmt arbeitenden Kommunikations- und Stoffwechselsysteme leistet sie wesentliche Beiträge zu Wasser- und Wärmehaushalt, Metabolisierung, Exkretion, sowie sowohl humoraler, als auch zellulärer Immunabwehr. Auch an Teilen der Synthesen

⁴ Durch Addition von Hydroxylradikalen an Phenylalanin entstehen zum Beispiel Tyrosin-Stellungsisomere, o- und m- Tyrosin

systemisch essentieller Substanzen wie dem weiblichen Geschlechtshormon Estrogen, oder von Apolipoproteinen ist das Unterhautfettgewebe beteiligt [33].

Die Haut lässt sich grob in die drei Schichten der Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis), und das Unterhautfettgewebe (Subcutis) einteilen. Diese Schichten variieren in ihrer anteiligen Dicke und exakten Gewebszusammensetzung individuell je nach Lokalisation über den Körper [34].

Epidermis und Dermis sind durch die Basalmembran getrennt von der aus Keratinocyten während ihres Differenzierungsprozesses und der Wanderung in epidermaler Richtung zu nicht mehr teilungsfähigen Korneozyten umgewandelt werden.

Die Grenze zwischen der Dermis und der Epidermis verläuft mäanderförmig und bildet papilläre Einstülpungen seitens der Dermis in die Epidermis. In diesen Papillen befinden sich Kapillarschleifen des Gefäßsystems, welche zur Versorgung der Epidermis mit Nährstoffen und Sauerstoff dienen. Hier treten die Nährstoffe über die Kapillarwände in das Gewebe aus und diffundieren in Richtung der Basalmembran, wo die Stoffwechselaktivität der Keratinocyten, Basalzellen und Schweißdrüsen am größten ist. Die Dermis enthält ausser dem Gefäßsystem eine hohe Dichte an Lymphgefäßen, welche aus dem Gefäßsystem austretende Flüssigkeit über die herznahen Venen wieder dem Blutkreislauf zuführen [33, 35].

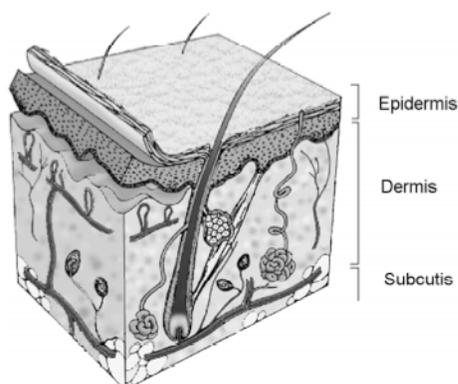


Abbildung 1.13: Schematischer Querschnitt durch die menschliche Haut mit Epidermis, Dermis und Subcutis. Abbildung von Galderma Laboratories <http://www.galderma.com/skin/yourskin.html>

Über die Desquamation von Korneozyten und den mit ihnen assoziierten Stoffwechselprodukten, die Sekretion der Drüsen und den Verlust von Haaren, sowie den auf diesen haftenden Lipidfilm gibt die Haut ständig organisches Material an die Umgebung ab. Heymann zieht aus diesem Grund den Vergleich der Haut mit einer überdimensionierten Drüse [33]. Von Aussen können dem systemischen Kompartiment über die Haut trotz einer nahezu undurchdringlichen Korneozytenschicht unter besonderen Voraussetzungen ebenfalls Substanzen zugeführt werden. Diese Möglichkeiten werden unter anderem bei der Anwendung transdermaler therapeutischer Systeme für pharmazeutische Zwecke genutzt [36].

1.6 Bedeutung von UV-Licht und reaktiven Sauerstoffspezies für die Haut

Für die Haut gelten für die Genese reaktiver Sauerstoffspezies, sowie deren Abbau und Pathobiochemie die oben beschriebenen Mechanismen. Zum antioxidativen System der Haut gehören unter anderem SOD, Katalase, GSHPx, und GSH-Reduktase sowie α - und γ -Tocopherol (Vitamin E), Ascorbinsäure (Vitamin C), Harnsäure und Glutathion [35, 37, 38]. Da die Haut als äussere Barriere ständig im Kontakt mit der uns umgebenden Atmosphäre steht, wirken permanent zusätzliche zu den zellulären Mechanismen Umwelteinflüsse, die zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies beitragen können auf sie ein. Im Vordergrund für die vorliegende Arbeit stand die durch elektromagnetische Strahlung im UV-Bereich begünstigte Bildung von ROS. Elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 100-400 nm bezeichnet man als UV-Strahlung. Zur Abgrenzung photobiologischer Einflüsse wird eine weitere, wellenlängenabhängige Unterteilung in UV-A, UV-B und UV-C-Strahlung vorgenommen.⁵ Für den Einfluss auf die Haut von Bedeutung ist der Spektralbereich ab 290 nm, da die energiereicheren Frequenzen durch die Ozonschicht in der Stratosphäre abgefangen werden [39]. Neben der bereits besprochenen mechanischen Schutzfunktion der Haut hat diese die Aufgabe einer optischen Barriere. Durch Reflexion und Streuung werden ca. 5% der auftreffenden Strahlung an dem Eindringen in die Epidermis gehindert. Der verbleibende Anteil dringt abhängig von der Wellenlänge bis in die

⁵ UV-A: $\lambda=380-315$ nm, UV-B: $\lambda=315-280$ nm, UV-C: $\lambda=280-100$ nm

Dermis vor, wobei sich die Eindringtiefe und der Energieinhalt der Strahlung umgekehrt proportional zueinander verhalten. Kurzwellige UV-B-Strahlung wird zum größten Teil in Bereichen der oberen Epidermis absorbiert. In der Dermis befinden sich Melanocyten, welche unter UV-Induktion aus der Aminosäure Tyrosin Melanin bilden. Melanin dient als natürliches Pigment der Absorption und somit dem Schutz vor eindringender langwelliger UV-A-Strahlung [40, 41]. Die Haut schützt sich ausserdem bei Einwirken von UV-Licht durch Adaptionenmechanismen, wie die Bildung der so genannten Lichtschwiele⁶ und durch Anpassung der antioxidativen und reparativen Systeme gegen die folgend beschriebenen Schäden [42].

Die Sonnenexposition hat auf die Haut bei Überbelastung der natürlichen Schutzmechanismen erhebliche Schädigung. Sie ist beteiligt an der malignen Veränderung von Hautzellen und ruft das Bild der Photoalterung hervor. Letzteres zeichnet sich aus durch grobe und feine Faltenbildung sowie Erschlaffung und den optischen Eindruck der Gerbung [43]. Die Beteiligung des UV-Lichtes an der Ausbildung von Hautkrebs wird hauptsächlich auf Mutationen durch Veränderungen an der DNA zurückgeführt. Durch direkte Absorption von Licht im UV-B-Bereich durch das DNA-Molekül kommt es zu Dimerisierungen vornehmlich an Pyrimidinbasen, zu Quervernetzungen und Strangbrüchen [44, 45].

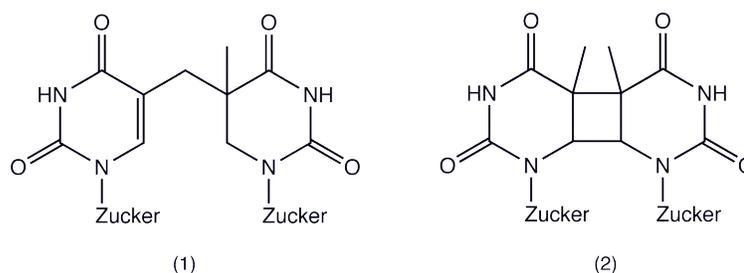


Abbildung 1.14: Zwei typische Photodimere aus Thyminbausteinen: (1) 4,6-Photoaddukt, (2) Cyclobutandimer

⁶ Einer Verdickung der Epidermis

Der mutagene Einfluss von Licht im UV-A-Bereich wurde lange Zeit unterschätzt. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass auch der energieärmere Anteil des UV-Spektrums an der Ausbildung von Hautkrebs beteiligt ist [17, 46]. Dies geschieht indirekt durch den oxidativen Angriff reaktiver Sauerstoffspezies, welche unter UV-A- Bestrahlung vermehrt gebildet werden. Verantwortlich hierfür ist die Absorption des UV-A-Lichtes durch in der Haut vorhandene Photosensibilisatoren, wie Riboflavin (1), unterschiedliche Porphyrinstrukturen und -vorstufen (2)⁷, sowie verschiedene Aminosäurekonjugate [17, 41].

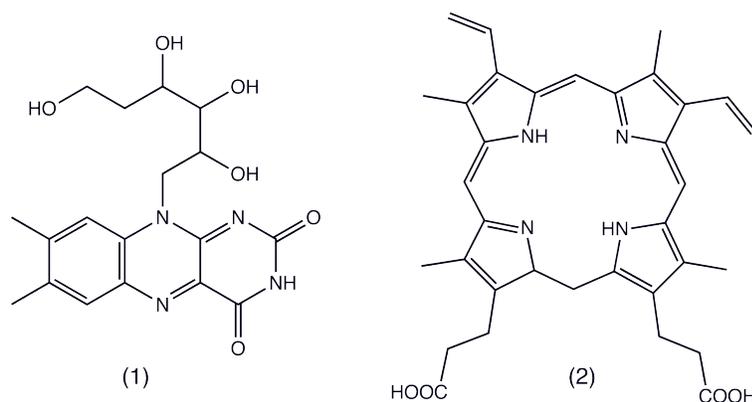


Abbildung 1.15: Zwei Beispiele für hauteigene Photosensibilisatoren für Licht im UV-A-Bereich. (1) Riboflavin und (2) Protoporphyrin IX

Durch die Wechselwirkung der UV-A-Strahlung mit der Haut kann es zur homolytischen Spaltung von Wasserstoffperoxid kommen, welche die Bildung des hochreaktiven Hydroxylradikals mit den bekannten Folgeschäden mit sich bringt. Ferner wird die Bildung von Singulett-Sauerstoff sowie die Lipidperoxidation durch die Bestrahlung mit UV-A-Licht verstärkt.

Auch über UV-B-Wechselwirkungen können indirekt ROS generiert werden. Diese Prozesse basieren auf dem Einfluss der Strahlung auf das Immunsystem während der Sonnenbrandsymptomatik und der Aktivierung von verschiedenen Interleukinen. Letztere sorgen unter anderem für die Freisetzung von Arachidonsäure aus Zellmembranen von Keratinocyten in der Epidermis und der Dermis, welche als Substrat der Cyclooxygenasen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies beiträgt [47].

⁷ Hier Protoporphyrin IX

Das Gros der Prozesse, die zum so genannten „Photoaging“ beitragen, ist auf die Schädigung von Strukturen in der Dermis zurückzuführen. Durch oxidative Veränderungen an den Strukturproteinen Kollagen und Elastin verlieren diese ihre Integrität und damit werden die Stabilität beziehungsweise die Elastizität der Haut vermindert. Die dauerhafte Beanspruchung der Melanozyten und damit die Biosynthese von Melanin führt zum Eindruck der Gegerbtheit und zur Hyperpigmentierung im Sinne von Altersflecken [48, 49].

1.6.1 Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies in biologischer Matrix

Wie bereits erwähnt, gestaltet sich die Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies in biologischen Proben speziell *in vivo* kompliziert. Die zur Analysenmethode gehörenden Faktoren müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllen: Sie sollen die am prooxidativ-antioxidativen Gleichgewicht beteiligten Reaktionen im Sinne einer prooxidativen oder antioxidativen Wirkung nicht beeinflussen, sie müssen sowohl schnell genug sein, um die hochreaktiven Intermediate und teilweise instabilen Produkte erfassen zu können, als auch in den komplexen Matrices eine ausreichende Selektivität sowie Spezifität besitzen.

Haut als Matrix zur ROS-Bestimmung

Für die Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies in der Haut bestehen drei verschiedene Ansätze.

1. Bestimmungen *ex vivo* an Biopsien und Biopsiehomogenisaten
2. Bestimmungen an Eluaten aus Epidermisextraktionen
3. Bestimmungen *in vivo*

Mit Ausnahme des letzten Punktes bedient man sich beim Vorgehen nach (1) und (2) hauptsächlich der „Fingerprinting-Methoden“ zur Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies. Für die Gewinnung von Eluaten aus der Epidermis werden abgegrenzte Hautareale von Testpersonen mit Lösemitteln nach standardisierten Vorschriften gewaschen und die Eluat-Fractionen gesammelt. Nach dem Vereinen der Lösemittelfractionen werden die quantitativen Bestimmungen aus den erhaltenen Probenflüssigkeiten durchgeführt. Auch „Spintrapping“ und „Spinlabelling-Methoden“ zur Bestimmung mittels ESR-Spektroskopie finden hier Einsatz. Eine genauere Beschreibung dieser Begriffe erfolgt im Kapitel „Elektronenresonanzspektroskopie“. Der Einsatz von Spintraps und „Spinlabel-Substanzen“ *in vivo* wird von einigen Arbeitsgruppen im Tiermodell beschrieben. Die Möglichkeit der Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies auf der Haut *in vivo* wird im Laufe der Arbeit im Kapitel über ultraschwache Photonenemission (UPE) erläutert.

1.6.2 Kommerziell erhältliche Testsysteme zur Bestimmung von oxidativem Stress aus Kapillarblut

Die Aufmerksamkeit für die Gesundheit, für Alterung und Wohlbefinden im Zusammenhang mit oxidativer Belastung hat sich in den vergangenen nunmehr fast vier Jahrzehnten seit der Publikation der Entdeckung der SOD durch Fridovich und Mc Cord 1969 und den Lehren der orthomolekularen Ernährung durch Pauling bedeutend ausgeweitet. Die Begriffe „freie Radikale“, „Antioxidantien“ und „oxidativer Stress“ fanden Einzug in die allopathische Medizin, die Ernährungslehre und damit in die einschlägig fachlichen sowie massentauglichen Medien und das Bewusstsein von Naturwissenschaftlern, Ärzten, Patienten und Verbrauchern. Im Zuge dessen haben verschiedene Hersteller unterschiedliche Messsysteme zur Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies im Kapillarblut entwickelt, die es labordiagnostisch orientierten Praxen, Patienten und interessierten Verbrauchern ermöglichen sollen, einen Einblick in die systemischen Ereignisse bezüglich der prooxidativ-antioxidativen-Gleichgewichtslage zu ermöglichen. Viele dieser analytischen Methoden basieren auf zwei unterschiedlichen Grundsätzen:

1. Bestimmung der antioxidativen Kapazität
2. Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Bestimmung der antioxidativen Kapazität einer Probe kann, wie bereits erwähnt wurde, als eine Variante des „Fingerprintings“ zur Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies angesehen werden. Die auftretenden Probleme bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität und einer Zahl hierzu verwendeter Methoden wurde im Rahmen einer Dissertationsarbeit in unserem Arbeitskreis kritisch betrachtet und untersucht [50]. In der Literatur werden Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von SOD und Katalase, Konzentrationsbestimmungen von Ascorbinsäure, Tocopherol und Glutathion beschrieben [51, 52].

Zur Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies in humanem Kapillarblut stehen die dem „Fingerprinting“ und der Anwendung von Spintrap- und Spinlabelsubstanzen zugänglichen Strukturen zur Verfügung. Im pharmazeutischen Umgang hat sich die quantitative Bestimmung von Lipidperoxiden und Hydroperoxiden nach dem im Kapitel FORT-Test beschriebenen Prinzip als kommerziell zugängliches Testprinzip etabliert.

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine biophysikalische Messmethode zu finden und zu etablieren, mit der die wechselseitige Beeinflussung von Haut und systemischem Kompartiment in Bezug auf die Gegenwart und die Menge durch UV-A-Bestrahlung der Haut gebildeter reaktiver Sauerstoffspezies im Rahmen kosmetischer Studien untersucht werden kann. Die Etablierung eines solchen Systems sollte auf verschiedenen Stufen geschehen. Auf der ersten Stufe der Entwicklung sollten die Arbeitsweise der Messgeräte und Methoden auf die Anwendbarkeit an Probanden sowie deren Validität überprüft werden. Im nächsten Schritt sollte im Zuge einer Probandenstudie unter der Verwendung von unbedenklichen Substanzen mit bekannter Wirkung auf die Messgrößen die Anwendungsmöglichkeit des Systems geprüft werden. Auf der dritten Stufe der Entwicklung stand der Einsatz des Systems zur Testung neuer Substanzen und Formulierungen, die auf der Ebene der wechselseitigen Beeinflussung von Haut und systemischem Kompartiment Aussagen liefern sollten. Sowohl topisch, als auch systemisch applizierbare Substanzen standen im Blickfeld des Interesses.

Die Anwendung eines kommerziell erhältlichen Systems zur Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies im systemischen Kompartiment führten nach einem Versagen des Systems auf der zweiten Stufe der Entwicklung zu einer kritischen Neubetrachtung der Arbeitsweise gängiger Methoden zur Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies auf der basolateralen Seite¹. Es sollte ein neues, verbessertes System zur Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies gefunden und mindestens bis zur ersten Stufe der Entwicklung etabliert werden.

¹ Die Untersuchung war im Abgleich mit einer etablierten und validierten Methode zur Messung oxidativer Vorgänge auf der humanen Haut *in vivo*, welche in unserem Arbeitskreis in Kooperation mit der Firma Beiersdorf untersucht und für die Anwendung in Bezug auf UV-Belastung validiert wurde [53, 54], durchgeführt worden

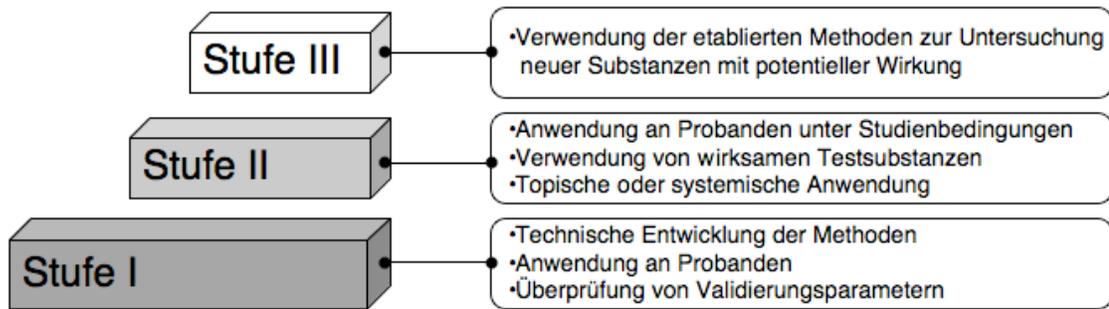


Abbildung 2.1: Stufen der Planung zur Methodenentwicklung

Die Entscheidung für die Wahl der Art der Substanz und der Formulierung bei der Testung der Methoden auf der Stufe zwei kann je nachdem erfolgen ob ein topischer oder ein systemischer Wirknachweis geliefert werden soll. Je nach gewünschter Beweisführung, Prüfung des antioxidativen Potentials einer topisch applizierten Substanz oder Prüfung der topischen Auswirkungen einer systemisch applizierten Substanz, kann sich wahlweise für die eine oder die andere Art der Applikation entschieden werden. Gleiches gilt für das Bestreben Aussagen über das jeweilige analytische System zu treffen.

3 FORT-Test

3.1 Das FORT-System

Seit Ende der neunziger Jahre wird in der Literatur ein Prinzip zur Bestimmung von Hydroperoxiden mittels kolorimetrischer Indizierung beschrieben [55, 56] welches als kommerzielles Fertigkit -unter Anderem- hergestellt von der Firma Callegari (Parma, Italien), in Deutschland von der Firma Incomat (Glashütten) beziehungsweise der Firma Micro-Medical (Königstein), unter dem Namen FORM-Test¹ vertrieben wird. Es soll eine Möglichkeit darstellen, in kurzer Zeit mit geringem Probenaufwand eine Bestimmung der Menge an Lipidhydroperoxiden und Lipidperoxiden im Kapillarblut durchzuführen und somit eine stellvertretende Aussage zum Ausmaß der Lipidperoxidation im Körper der Testperson zu erlauben. Somit ließe sich das im Folgenden beschriebene System für die gewünschte Anwendung im Rahmen der Zielsetzung qualifizieren, da die Lipidperoxidation als ein Indikator für die Lage des in Dysbalance geratenen Redoxgleichgewichtes im Falle von oxidativer Stressbelastung gilt [10].

¹ FORM steht für Free Oxygen Radical Monitor und bezeichnet das für die Methode verwendete Photometer. Zur Beschreibung des Gesamttests wird vom Hersteller auch die Abkürzung FORT-Test verwendet, wobei T für Test steht und somit der Ausdruck FORT-Test einen Pleonasmus darstellt. Für den Verlauf dieser Arbeit wurde diese Terminologie dennoch vom Hersteller übernommen

3.2 Prinzip der Farbreaktion

Die zugrunde liegende Farbreaktion basiert auf der Generierung eines relativ stabilen Radikalkations, welches durch Einelektronenübertragung auf ein aromatisches Diaminderivat, das als chromogene Komponente fungiert, realisiert wird [57].

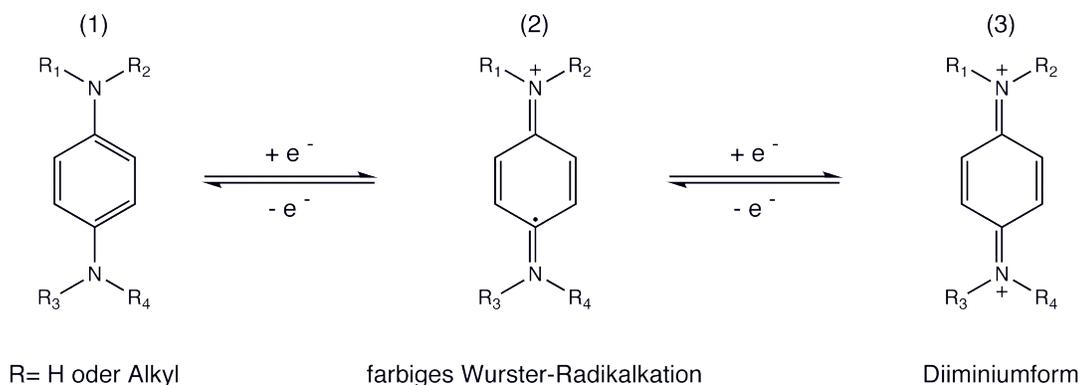


Abbildung 3.1: Entstehung eines Wurster-Farbstoffes (2) mit anschließender Abbaureaktion zur instabilen Diiminiumstufe (3)

Die gefärbten Radikalkationen (2) sind unter der Familie der so genannten Wurster-Salze oder Wurster-Farbstoffe zusammengefasst, welche merichinoide, organische Farbstoffe mit Radikalcharakter der in Abbildung 3.1 allgemein dargestellten Form beschreibt [58]. Die intensiv gefärbten Produkte besitzen aufgrund der durch ihre induktiven Effekte stabilisierend wirkenden Alkylsubstituenten an den Stickstoffzentren eine für Radikale relativ hohe Lebensdauer, die mehrere Tage erreichen kann und sind der photometrischen Detektion im sichtbaren Wellenlängenbereich zugänglich. Das Wurstersalz des N,N,N,N-Tetramethyl-p-phenylendiamins (R₁, R₂, R₃, R₄=Methyl) ist beispielsweise tief blau gefärbt und besitzt in wässriger Lösung Absorptionsmaxima bei bei 560 und 606 nm [59].

Im Falle der im FORT-Test verwendeten Methode treten an die Stelle des Wasserstoffperoxids innerhalb einer Fenton Reaktion im Kapillarblut enthaltene Lipidperoxide und Hydroperoxide. Diese können aufgrund ihres Reduktionspotentials prinzipiell Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel ersetzen [10]. Dem FORT-Kit zugehörig ist eine Pufferlösung (pH=4,8), in der die entnommene Probe geschüttelt werden soll. Hierbei sollen, bedingt durch den sauren pH, Eisenionen aus den in der Probe befindlichen Plasmaproteinen freigesetzt werden. Diese sollen zusammen mit den zuvor genannten Lipidperoxiden und Hydroperoxiden zur Generierung radikalischer Spezies in Form von Alkoxy- und Peroxyradikalen im Sinne einer Fenton-ähnlichen Reaktion in der Lage sein.

Sowohl Alkoxy-, als auch Peroxyradikale können formal ihr ungepaartes Elektron auf das entsprechende chromogene Alchilamin durch das Abstrahieren eines Wasserstoffatoms übertragen und eine farbige Komponente nach dem Mechanismus der Wurster-Salz-Bildung generieren. Es wird angenommen, dass das Ausmaß der Bildung des postulierten Wurster-Derivates mit der Menge an im Kapillarblut vorhandenen Lipidperoxiden und Hydroperoxiden korreliert [60, 61, 62]

3.3 Methode

Im Verlauf der experimentellen Arbeiten wurden verschiedene Matrices mittels beschriebenen Analysensystem untersucht. Zu den verwendeten Flüssigkeiten zählten unter anderem Kapillarblut, Plasma und verschiedene Puffer sowie unterschiedlich zusammengesetzte Reagenzlösungen. Wird im Folgenden bei Formulierungen die Methode betreffend auf die jeweilige Probenlösung Bezug genommen, so wird allgemein von Testflüssigkeit gesprochen. Die jeweils zu untersuchende Testflüssigkeit wird mit einer 20 μ L Glaskapillare genau dosiert und in ein 1,5 mL Eppendorf-Microvial mit Pufferlösung überführt. Anschließend wird der Inhalt des Vials quantitativ unter Zurücklassen der Glaskapillare in die vorbereitete Kunststoffküvette pipettiert, die das Chromogen enthält und kurz geschüttelt. Letzteres geschieht, um den Vorgang der Chromogensolubulisation und Distribution in der Probenlösung zu beschleunigen.

Darauf wird bei Raumtemperatur eine Minute lang bei $1000 \cdot g$ zentrifugiert². Die fertig bereitete Probeneinheit wird in die Küvettenhalterung des Photometers eingebracht und die Messung gestartet. Die Küvette wird anschliessend für drei Minuten in der beheizten Halterung auf 37°C gebracht. Die Ermittlung des FORT-Wertes erfolgt anhand einer kinetischen Bestimmung aus zwei im Abstand von drei Minuten aufeinander folgenden Einzelmessungen, bei denen jeweils bei 505 nm die Absorption der Lösung mit einer Schichtdicke von 1 cm bestimmt wird. Aus der Differenz der beiden Werte werden Rückschlüsse auf die Menge der in der Testlösung befindlichen Peroxid-äquivalenten gezogen. Das Ergebnis wird in FORT-Einheiten angegeben, die entsprechenden Mengen an Wasserstoffperoxid äquivalent sein sollen³.

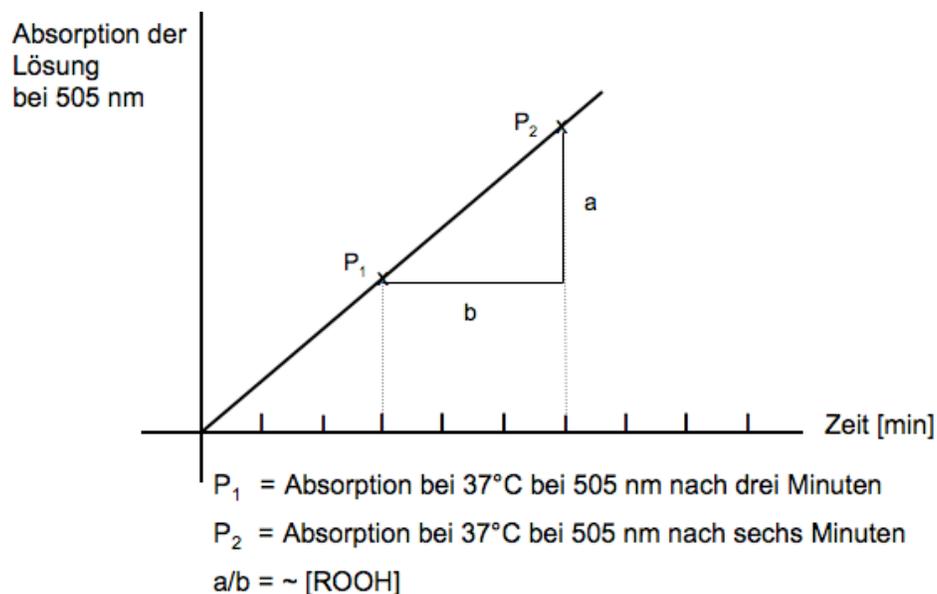


Abbildung 3.2: Prinzip zur kinetischen Ermittlung des FORT-Wertes

² Dieser Schritt dient dem Zweck der Erythrocytenabtrennung bei dem Umgang mit Testlösungen, die Kapillarblut enthalten, sowie der weiteren Lösung und Verteilung des Chromogens in der Testlösung

³ Siehe Methodenursprung und Einheit

Es stellte sich als zweckmäßig heraus, vor jeder Messung eine Blindprobe durchzuführen, da das Chromogen scheinbar allein durch die Gegenwart von Luftsauerstoff bereits einer Oxidation zum entsprechenden Wurster-Salz unterliegt. Eine an der Luft stehengelassene Lösung färbte sich mit der Zeit von leicht rosa über tiefrot bis braun-violett. Durchgeführte Blindwertexperimente bei denen die Testlösung aus Phosphatgepufferter-Salinlösung (PBS) bestand, lieferten im Mittel einen Blindwert von 38 FORT-Units⁴.

3.4 Methodenursprung und Einheit

Die Methode, auf welcher der FORT-Test basiert, ähnelt dem so genannten dROMS-Test⁵. Diese Methode beschreibt die Verwendung von N,N-Diethyl-p-phenylendiamin als Chromophor für die Quantifizierung von Hydroperoxiden und Alkoxyperoxiden unter Fenton-Bedingungen durch Verwendung von Serum als Testlösung als ein applikables System zur Bestimmung der Belastung gesunder Testpersonen mit oben genannten reaktiven Sauerstoffspezies [63].

Für die Einstufung der Höhe der Belastung der jeweiligen Testperson wird hier als Alternative zur externen Kalibrierung mit der Standardsubstanz Tert-Butylhydroperoxid ein Einheitensystem für die Anwendung an humanen Serumproben eingeführt. Die so entstandene Einheit U/Carr⁶ stammt aus der Auswertung von über 4000 Serumproben gesunder Testpersonen, mit denen die oben genannte Reaktion durchgeführt wurde. Bestimmt wurde wiederum die Zunahme der Absorption der Testlösung bei 505 nm pro Minute.

Die Werte zwischen $0,023 \frac{A_{505}}{min}$ und $0,031 \frac{A_{505}}{min}$ wurden als „normales“ Intervall herangezogen und aus Simplifizierungsgründen mit dem numerischen Wert 10000 multipliziert. Dieser Zahlenwert wird in der entsprechenden Publikation als K-Faktor bezeichnet [63]. Das Intervall für eine „normale“ Belastung des Serums liegt laut den Autoren somit bei 230 bis 310 Carratelli-Units.

⁴ Siehe Ergebnisteil

⁵ dROM: detection of reactive oxygen metabolites

⁶ Caratelli-Units

Die für den FORT-Test verwendeten Einheiten FORT-Units stammen aus einer externen Kalibrierung mit Wasserstoffperoxid [64]. Der Hersteller setzt die Höhe der Werte gleich mit einer Äquivalentmenge an Wasserstoffperoxid von 1 FORT-U = $0,26 \frac{mg}{L} H_2O_2$ beziehungsweise $1 \text{ FORT-U} = 7,6 \frac{\mu mol}{L}$. Die Angaben darüber, welche Höhe an FORT-Wert als Norm anzusehen ist, sind jedoch nicht einheitlich. So finden sich in den Systemhandbüchern verschiedene Angaben für Richtwerte, teilweise uneinheitlich in ein und demselben Handbuch siehe Tabelle 4.4 und Tabelle 3.2, sowie seit 2007 die Aussage, dass Werte bis zu einer Höhe von 310 [U] als normal angesehen werden können.

Tabelle 3.1: Herstellerangaben zum FORT-Test im Handbuch von 2004 I [65]

FORT-Wert in [U]	Aussage des FORT-Wertes
bis 230	gut
230-310	grenzwertig bis normal
310-400	Stress
ab 400	starker Stress

Tabelle 3.2: Herstellerangaben zum FORT-Test im Handbuch von 2004 II [66]

FORT-Wert in [U]	Aussage des FORT-Wertes
230-310	normal
311-340	leicht erhöht
341-400	Stress
401-500	starker Stress
über 500	sehr starker Stress

3.5 Durchführung einer Bestimmung am Probanden

Alle Bestimmungen von FORT-Werten wurden zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse unter Standardbedingungen⁷ in klimatisierten Räumen durchgeführt.

⁷21°C ± 1°C und 45% ± 5% relative Luftfeuchtigkeit

3.5.1 Probennahme

Die Testperson sollte sich bei der Probennahme möglichst in ausgeruhter und entspannter Verfassung befinden. Hierdurch sollte der mögliche Einfluss von zirkulierenden Monoaminen auf das Ergebnis durch sympathische Aktivität vermindert werden. Die Probengewinnung begann mit der Vorbereitung der Entnahmestelle. Aus Gründen der Reproduzierbarkeit wurde während der Datenerhebung ausnahmslos die distale Phalanx eines Fingers⁸ als Ort der Probennahme gewählt. Prinzipiell wäre eine Entnahme von Kapillarblut auch aus dem Ohrläppchen oder dem Unterarm denkbar. Eine leichte Massage der Entnahmestelle sollte eine ausreichende Durchblutung gewährleisten. Dies ist von Vorteil, damit nach der Punktion der oberen Hautschichten auf ein bei zu geringer Durchblutung notwendiges Anlegen von Druck verzichtet werden kann. Durch die Scherbelastung der Probenmatrix an der Austrittsstelle könnte es bei zu starkem Drücken zu Hämolyseerscheinungen kommen. Durch das hierbei vorzeitige Freisetzen von Eisenionen könnten eventuell Vorgänge nach Fenton-ähnlichen Reaktionen initiiert werden, die zur Verfälschung des Analysenergebnisses führen könnten. Die Fingerbeere wurde mit einem dermatologisch unbedenklichen Desinfektionsmittel gereinigt. Hierbei musste, um einen störenden Einfluss zu vermeiden, auf die Abwesenheit von Peroxiden in der Desinfektionslösung geachtet werden. Dies wurde mit entsprechenden Merckoquant Peroxid-Teststreifen von der Firma Merck (Darmstadt) gewährleistet. Nach dem Trocknen der desinfizierten Einstichstelle wurden mit einer Einmal-Lanzette⁹ die oberen Hautschichten der Fingerbeere punktiert. Der erste, spontan austretende Blutstropfen wurde abgewischt, da dieser bedingt durch die Punktion Gewebewasser mitführen kann. Dies kann verfälschende Verdünnungseffekte mit sich bringen und war daher unerwünscht. Von dem nachfolgend austretenden Kapillarblut wurden mit einer volumengeeichten Glaskapillare genau 20 μL Kapillarblut abgenommen, um anschließend der weiteren Probenbereitung zugeführt zu werden.

⁸ Fingerbeere

⁹ Easy-let II, Nadeldurchmesser: 0,375 mm, Eindringtiefe: 1,8 mm, Du Yee Care Inc. Kyungki-Do, Korea

3.5.2 Probenbereitung und Messung

Der Vorgang zur Durchführung einer Messung mit Probanden unterscheidet sich nicht von der Summe der Einzelprozesse, die unter 3.2 beschrieben wurde.

3.6 Überprüfung der Mechanismen

In der Literatur wird das Prinzip des FORT-Tests kontrovers diskutiert. Daher sollte zunächst die Einsetzbarkeit des Systems getestet werden.

Bevor das FORT-Testsystem also im Zuge einer umfangreicheren Probandenstudie zum Einsatz kommen sollte, wurden die zugrunde liegenden Mechanismen untersucht um festzustellen, ob die Arbeitsweise des Testsystems den Ansprüchen einer Studie, bei der der Einfluss von UVA-Exposition auf die Menge an detektierbaren reaktiven Sauerstoffspezies im Kapillarblut untersucht werden sollte, genügt.

3.6.1 Zusammensetzung des Testsystems

Die zugänglichen Informationen über den qualitativen und quantitativen Inhalt des Testkits sind nicht eindeutig. Es sollten Untersuchungen zur Zusammensetzung des Reagenziensatzes angestellt werden, um einen Einblick in das tatsächliche Geschehen während der Farbreaktion innerhalb des FORT-Fertigkits zu bekommen. Auf eine vollständige Aufklärung wurde aus Gründen des Patentschutzes verzichtet. Die Untersuchungen wurden so konzipiert dass trotz des Ausbleibens gewisser Analysen eine Aussage zur Qualifizierung des Testsystems möglich war. Die durchgeführten Untersuchungen erstreckten sich auf die Identifizierung der jeweiligen Hauptkomponenten in Puffer und Chromogenkit sowie auf die Überprüfung der Gegenwart von Eisenionen.

Die Analytik bezüglich der Anwesenheit von Eisenionen wurde durchgeführt, da wie unter 3.1 angeführt aufgrund des sauren pH-Wertes des Puffers Eisenionen aus in der Probe befindlichen Plasmaproteinen freigesetzt werden sollen. Ferner kann ein geringer Einfluss von durch Haemolyse freigesetzten Eisenionen nicht ausgeschlossen

werden. Da die Konzentration an Eisenionen einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Bildung des detektierten Wurster-Farbstoffes haben konnte und es sich um eine kinetische Messung handelt, war eine Verfälschung des Analyseergebnisses durch schwankende Eisenmengen in der Testlösung nicht auszuschließen. Laut Hersteller stellt der Haematokritwert keine Einflussgröße für das Ergebnis des FORT-Wertes dar. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Plasmaspiegel anderer eisenführender Proteine, wie zum Beispiel Transferrin [67] oder Ferritin [68] einen Einfluss auf das Ergebnis des FORT-Tests ausüben konnten.

Ein Einfluss durch mit der Probe in die Analyse eingetragene Eisenionen konnte nahezu ausgeschlossen werden, wenn sich in dem Reagenziensatz selbst Eisenionen befanden, deren Konzentration in Pufferlösung oder Chromogenbehälter, oder in ihrer Summe hinreichend groß war, so dass man davon ausgehen konnte, dass alle an einer Reaktion vom Typ der Fenton-Reaktion teilnehmenden Peroxid- oder Hydroperoxidäquivalente von der Menge an Eisenäquivalenten weit übertroffen wurden [69].

Aus diesen Gründen wurde sowohl in der Pufferlösung, als auch in der vorgefertigten Chromogenküvette auf die Gegenwart von zweiwertigen und dreiwertigen Eisenionen geprüft. Aus Gründen des Patentschutzes wurden die zu dieser Fragestellung durchgeführten Versuche auf halbquantitative Aussagen beschränkt.

3.6.2 Analyse des Puffers

Die Herstellerangaben zu der Pufferkomponente des FORT-Testsystems belaufen sich auf die Angabe des pH-Wertes (4,8 laut Hersteller) und die qualitative Angabe, dass die Pufferlösung mit allen ausreichenden Stabilisatoren und Konservierungsmitteln versehen sei. Das Protokoll des nah verwandten dROM-Tests schreibt die Verwendung einer Acetat-Pufferlösung zur Bestimmung der Hydroperoxid und Alkylperoxidmenge vor. Ferner zeigte die Pufferlösung den charakteristischen Geruch der Essigsäure. Basierend auf diesen Kenntnissen, erweitert um die Frage der Anwesenheit von Eisenionen wurden die folgend beschriebenen Untersuchungen an der Pufferlösung durchgeführt. Vor Beginn der Analyse, wurde eine Volumenmessung

durchgeführt. Aus einer Dreifachbestimmung mit einer volumenvariablen Kolbenhubpipette ergab sich ein Puffervolumen von 1,15 ml Pufferlösung pro Eppendorf Microvial.

Nachweisreaktionen auf Acetationen

Um die Annahme der Verwendung eines Acetatpuffers zu verifizieren, wurde eine für die pharmazeutische Analytik klassische, nasschemische Nachweisreaktion herangezogen. Die verwendete Methode wurde dem allgemeinen Teil des Europäischen Arzneibuches entnommen [31]. Bei dem Vergleich einer einprozentigen Natriumacetatlösung mit der Pufferlösung färbten sich beide Lösungen entsprechend einem positiven Nachweis auf Acetationen. Eine Blindlösung, welche eine äquimolare Natriumchloridlösung enthielt, zeigte keine Färbung. Bei der auf pH=9-11 gepufferten Reaktion von Acetat mit Lanthannitrat und Iod entsteht eine tiefblaue Färbung bedingt durch Adsorption von Iod an basisches Lanthanacetat, ähnlich dem Modell einer Iod-Stärke Einschlussverbindung.

pH-Wert der Pufferlösung

Der pH-Wert der Pufferlösung wird vom Hersteller mit pH=4,8 angegeben. Die Genauigkeit der Angabe des pH Wertes wurde unter Verwendung einer Glaselektrode potentiometrisch [70] ebenfalls nach Arzneibuchvorschrift [31] überprüft. Drei aufeinander folgende Messungen ergaben einen durchschnittlichen pH-Wert von pH=4,82.

Herstellung einer Referenzpufferlösung

Aufgrund der bis zu diesem Zeitpunkt erlangten Informationen wurde eine Referenzpufferlösung unter der Annahme hergestellt, dass es sich bei dem FORT-Puffer um ein Puffersystem bestehend aus Natriumacetat und Essigsäure handelt. Für die folgenden instrumentellen Analytikschritte wurden Volumenäquivalente der Referenzpufferlösung zur Bereitung von Referenzproben verwendet, um die Analysesubstanz und die Referenz unter gleichen Analysenbedingungen zu behandeln.

IR-spektroskopische Untersuchung

In diesem Versuch wurde der Inhalt eines Microvials mit vorbereiteter Pufferlösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft und anschließend ein IR-Spektrum aufgenommen. Das Spektrum wurde verglichen mit dem des nach gleicher Vorschrift behandelten Referenzpuffers. Beide Spektren wurden aus Kaliumbromidpresslingen generiert wobei die unter 2.2.24 des Europäischen Arzneibuches aufgeführten Vorschriften beachtet wurden [31].

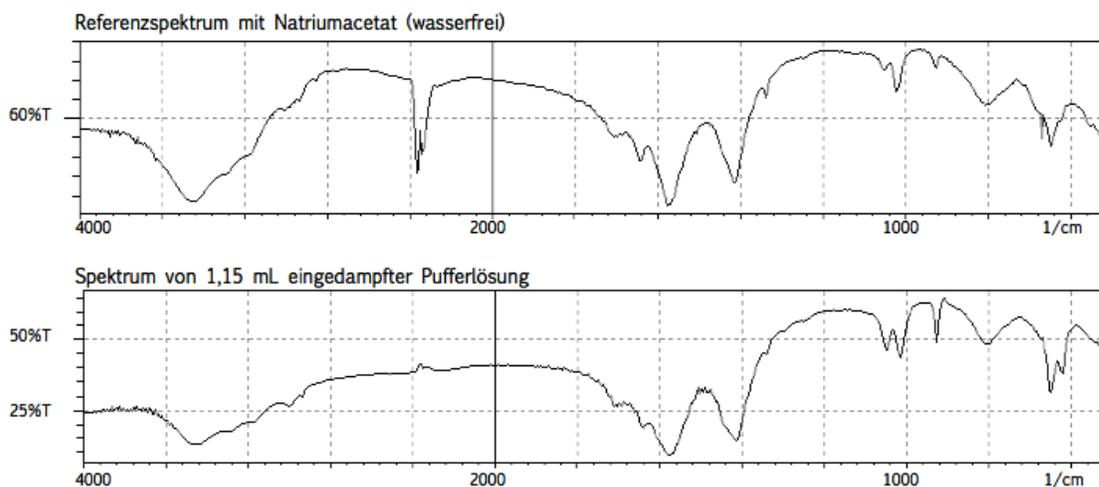


Abbildung 3.3: IR-Spektren zum Vergleich der Pufferlösungen

Die Spektren der beiden Puffergemische stimmen, wie in Abbildung 3.3 zu sehen ist, bis in den Fingerprintbereich überein. Es war daher davon auszugehen, dass sich in der FORT-Pufferlösung keine weiteren organischen Substanzen, oder IR-aktiven Anionen, wie Phosphat oder Sulfat befanden. Bei dem im FORT-Puffer fehlenden Peak bei 2380 cm^{-1} handelt es sich um die charakteristische CO_2 Doppelbande [71, 72].

Osmolarität der Pufferlösung

Da scheinbar keine weiteren organischen Verbindungen, die mit den verwendeten Methoden detektierbar wären in der FORT-Pufferlösung vorlagen, wurde mittels kryoskopischer Untersuchung die Osmolarität der Pufferlösung analysiert. Möglicherweise

in der Lösung enthaltene anorganische Komponenten würden durch ihren zahlmäßigen Anteil die kolligativen Eigenschaften der Pufferlösung beeinflussen [31]. Die Bestimmung erfolgte sowohl mit dem FORT-Puffer, als auch mit der Referenzpufferlösung jeweils in einer Dreifachbestimmung. Auch für diese Methode wurden die Vorschriften für die Messung und die Kalibrierung dem Europäischen Arzneibuch entnommen [31]. Für die Bestimmung wurden je drei Microvials FORT-Pufferlösung vereint. Im Mittel ergab sich für den FORT-Puffer eine Osmolarität von $441,3 \frac{mOsmol}{kg}$ für den Referenzpuffer jedoch lediglich eine Osmolarität von $151,3 \frac{mOsmol}{kg}$. Diese Differenz von $290 \frac{mOsmol}{kg}$ deutete auf das Vorhandensein weiterer, zumindest die kolligativen Eigenschaften des Puffers beeinflussende, Komponenten innerhalb des FORT-Puffersystems hin.

Untersuchung auf die Gegenwart von Eisenionen

Zur Untersuchung der Pufferlösung auf die Gegenwart von Eisenionen wurden Nachweisreaktionen auf zweiwertige und dreiwertige Eisenionen durchgeführt. Die Nachweise wurden wiederum den Vorschriften des allgemeinen Teils des Europäischen Arzneibuches entliehen [31]. Der Nachweis auf zweiwertige Eisenionen erfolgte durch die Reaktion mit Kaliumhexacyanoferrat-III¹⁰ als blauer Niederschlag¹¹, der Nachweis auf dreiwertige Eisenionen mit Kaliumhexacyanoferrat-II¹² ebenfalls als blauer Niederschlag¹³. Als Referenz diente eine jeweils $10 \frac{mmol}{L}$ Lösung von Eisen-II sulfat beziehungsweise Eisen-III-chlorid in Referenzpuffer. Ein Blindwert wurde mit eisenfreier Referenzpufferlösung durchgeführt. Alle Reagenzien wurden vor der Untersuchung frisch hergestellt. Die Konzentration der jeweiligen Referenzlösung sollte zu einem halbquantitativen Nachweis entsprechend der Grenzwertprüfungen im Arzneibuch reichen.

¹⁰ Rotes Blutlaugensalz

¹¹ Turnbells Bblau

¹² Gelbes Blutlaugensalz

¹³ Berliner Blau

In der Pufferlösung konnten mit der angewandeten Methode weder zweiwertige, noch dreiwertige Eisenionen nachgewiesen werden. Wie aus Abbildung 3.4 ersichtlich wird, unterschieden sich die Färbungen der mit Fällungsreagenz und verdünnter Salzsäure R versetzten FORT-Pufferlösungen (2) und (5) nicht von der ebenfalls mit allen Reagenzien versetzten Blindprobe (1) und (4). Die Referenzlösungen mit Eisen-III-chlorid (3) und Eisen-II-sulfat (6) besaßen hingegen die typische Färbung der jeweiligen farbigen Komplexe, die auch in verdünnter Salzsäure Stabilität zeigen.



Abbildung 3.4: Nachweisreaktionen zur semiquantitativen Analyse auf Eisen-II-Ionen und Eisen-III-Ionen: (1)Blindprobe, (2)FORT-Puffer, (3)Fe-II-Lösung, (4)Blindprobe, (5)FORT-Puffer, (6)Fe-III-Lösung

Ergebnisse der Pufferanalyse

Bei dem FORT-Puffer schien es sich um einen Acetatpuffer zu handeln. Die IR-spektroskopische Analyse liess das Vorhandensein von weiteren organischen Anionen ausschliessen. Aufgrund der Osmolaritätsuntersuchungen war davon auszugehen, dass sich weitere anorganische Bestandteile in der Lösung befanden, welche Einfluss auf die kolligativen Eigenschaften des Puffers nahmen. Hierbei konnte jedoch die Beteiligung von Eisen sowohl in zwei- als auch in dreiwertiger Form ausgeschlossen werden. Möglicherweise wurde der genaue pH-Wert von 4,8 bei der Herstellung durch die Zugabe von Natronlauge, oder HCl eingestellt, was zu einer höheren Ionenkonzentration geführt haben könnte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass

die Osmolarität einen Einfluss auf die Bildungskinetik des farbigen Radikalkations hat. Auf eine weitere Analyse wurde jedoch aus bereits genannten Gründen verzichtet.

3.6.3 Analyse des Farbreagenzes

Die Angaben zu der Natur des im Reagenziensatz lyophilisiert vorliegenden Chromogens sind in der Literatur nicht einheitlich. Einerseits wird das im Protokoll des dROM-Tests beschriebene p-Phenylendiaminderivat N,N-Diethyl-p-phenylendiamin (2) Abbildung erwähnt [65], an anderer Stelle findet sich jedoch die Aussage, dass es sich bei dem im FORT-Test enthaltene Chromogen um das Hydrochlorid des N-Ethyl-N-isopropyl-p-phenylendiamins handelt [73]. Da sich der Hersteller mit Angaben hierzu möglicherweise aus Gründen des Patentschutzes zurückhält, wurden eigene Untersuchungen zur Identität der Wurster-Salz-Vorstufe angestellt.

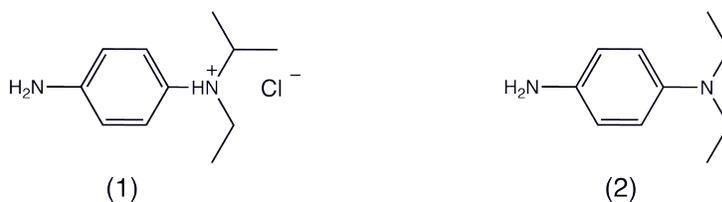


Abbildung 3.5: Diskutierte, chromogene Aminkomponenten für das FORT-System: (1) N-Ethyl-N-isopropyl-p-phenylendiaminhydrochlorid (NNEIPPDA-HCl), (2) N,N-Diethyl-p-phenylendiamin

IR-spektroskopische Untersuchung

Zum direkten Vergleich wurden Spektren von dem im FORT-Test Reagenziensatz enthaltenen Chromogen und N-Ethyl-N-isopropyl-p-phenylendiaminhydrochlorid miteinander verglichen. Die hohe Übereinstimmung der Spektren liess darauf schließen, dass es sich bei dem Chromogen im FORT-Test tatsächlich um das NNEIPPDA-HCl handelte. Lediglich die in der Analysensubstanz auftretende Bande bei 1697 nm^{-1} ,

fehlt im Spektrum der Referenzsubstanz. Da jedoch im sehr charakteristischen Fingerprintbereich keine Unterschiede bestehen, könnte dies ein Hinweis auf das Vorliegen einer weiteren organischen Komponente im Reagenziensatz des FORT-Systems sein. Da die Analysesubstanz mit hohem mechanischen Aufwand aus der Fertigküvette gewonnen wurde, könnte es sich hierbei um Bestandteile aus dem Kunststoffmaterial der Küvette handeln.

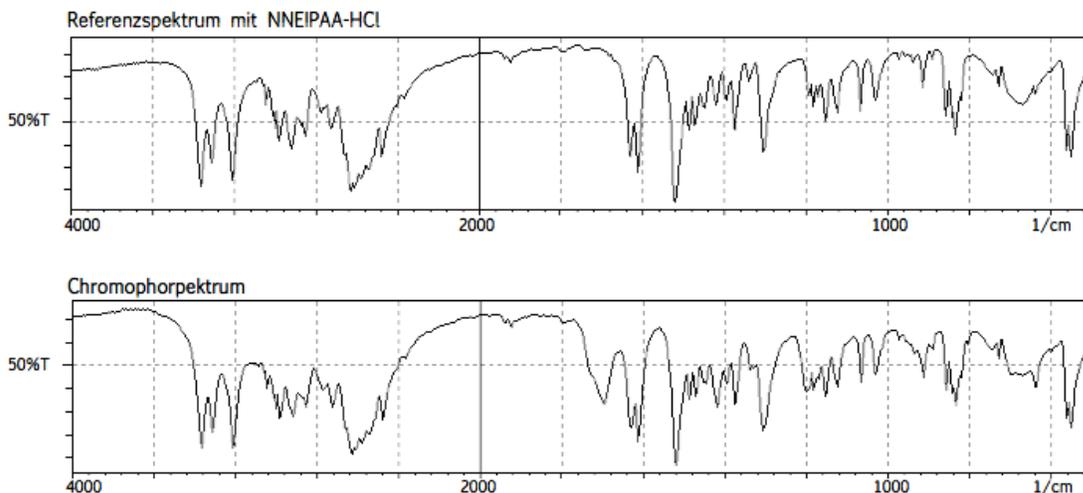


Abbildung 3.6: IR-Spektren zum Vergleich der Chromogenkomponente mit der Referenzsubstanz NNEIPDA-HCl

Untersuchung auf die Gegenwart von Eisenionen

Die qualitative Analyse bezüglich der Gegenwart von Eisenionen in der mit Chromogen beschichteten Küvette wurde analog zu den Untersuchungen der Pufferlösung auf Eisenionen unter Verwendung von $10 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ Eisenlösungen durchgeführt. Hierzu wurde das Chromogen mittels Referenzpuffer aus der Fertigküvette gelöst und mit Reagenzlösung versetzt (2) und (5). Als Positivprobe diente eine Lösung von NNEIPDA-HCl und Eisensalz in Referenzpuffer (3) und (6). Als Negativprobe wurde eine eisenfreie Lösung von NNEIPDA-HCl in Referenzpuffer (1) und (4) verwendet.



Abbildung 3.7: Nachweisreaktionen zur Analyse auf Eisen-II-Ionen und Eisen III-Ionen in der Chromogenküvette. (1)Blindprobe, (2)FORT-Chromogen in Referenzpuffer, (3)Fe-II-Lösung, (4)Blindprobe, (5)FORT-Chromogen in Referenzpuffer, (6)Fe-III-Lösung

Die Chromogenlösungen zeigten die Färbung der Referenzlösungen sowohl für zweiwertige, als auch für dreiwertige Eisenionen. Beide Färbungen waren auch nach Zugabe von verdünnter Salzsäure *R* stabil (Abbildung 3.7). Die Lösungen waren nicht tiefer gefärbt, als die Referenzlösungen, womit die Konzentration für sowohl zweiwertige, als auch dreiwertige Eisenionen auf eine Konzentration unterhalb von $10 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ begrenzt werden konnte.

Ergebnisse der Chromogenanalyse

Es handelt sich bei der chromogenen Aminkomponente um das N-Ethyl-N-isopropyl-p-phenylendiamin. Zusätzlich befinden sich Eisenionen in dem Fertigreagenz. Es war folglich nicht auszuschließen, dass Eisenionen die Reaktionskinetik zur Bildung des Wurster-Salzes beeinflussen. Auf die quantitative Untersuchung wurde aus den schon mehrfach genannten Gründen dennoch verzichtet.

3.6.4 Zugabe von Eisenionen

Der tatsächliche Einfluss von zusätzlichen Eisenionen wurde sowohl *in vitro* durch die Zugabe von Eisensulfatlösung als Testlösung, als auch *in vivo* anhand einer kleinen Probandenstudie verifiziert, in der die Probanden ein Eisenpräparat einnahmen und der FORT-Wert über 80 Minuten verfolgt wurde. Zu Beginn wurde die Methodenpräzision ermittelt. Hierzu wurde zunächst von Blindproben mit EDTA-freier PBS-Testlösung eine Sechsfachbestimmung durchgeführt. Diese führte zu einem Mittelwert von 38 FORT-Einheiten, für deren Bestimmung sich eine Standardabweichung von 1 FORT-Einheit ergab.

Die Proben zur Bestimmung der Methodenpräzision für die Analyse von Kapillarblut wurden im Abstand von 15 Minuten von jeweils unterschiedlichen Fingerbeeren einer weiblichen, gesunden Probandin (25 J.), die keinerlei Medikamente zu sich nahm entnommen. Da zu diesem Zeitpunkt keine Informationen über den möglichen Einfluss von Nahrungsaufnahme bestanden, wurde Nüchternheit als Kriterium für die Teilnahme zu dieser Bestimmung vorgeschrieben.

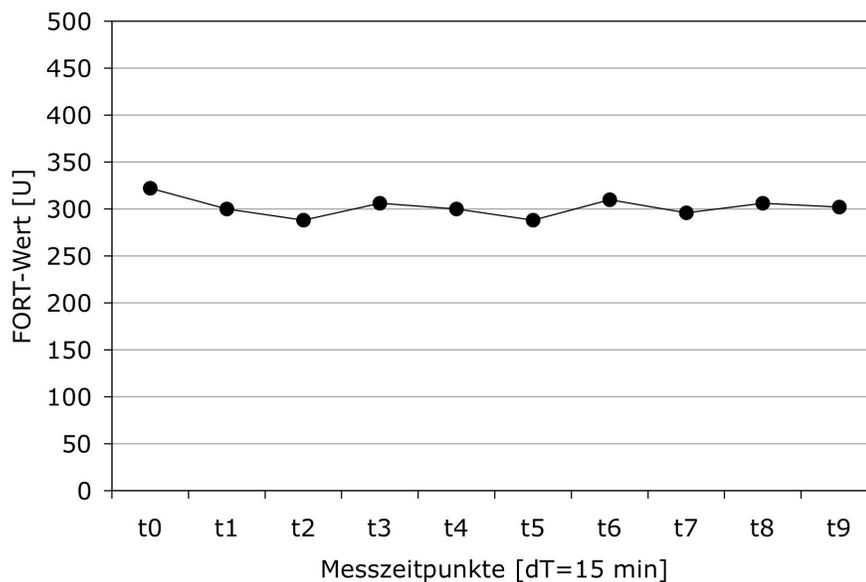


Abbildung 3.8: Verfolgung des FORT-Wertes über 150 Minuten

Der FORT-Wert erwies sich über den beobachteten Zeitraum mit einer Standardabweichung von 10 FORT-Units als sehr stabil. Die relative Standardabweichung für die Methodenpräzision betrug für diesen Zeitraum nur 3% und war damit für die Verwendung biologischer Analytmatrix beachtenswert niedrig.

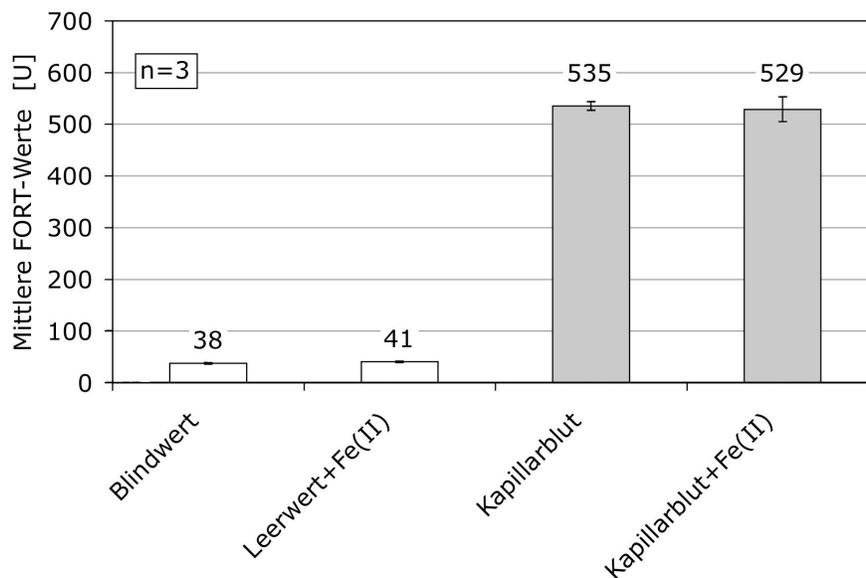


Abbildung 3.9: Vergleich eisenfreier und Fe^{2+} -haltiger Testansätze

Einfluss von Eisen(II)-Ionen

Abbildung 3.9 zeigt den Vergleich von der Zugabe von $20 \mu L$ einer Testlösung mit einer Konzentration von zweiwertigen Eisenionen von $10 \frac{mmol}{L}$ im Vergleich zum Blindwert. Ebenfalls abgebildet ist die Zugabe von der gleichen Eisenlösung zu einem Reaktionsansatz, der Kapillarblut als Testlösung enthielt im Vergleich zu einem Ansatz, in dem nur Kapillarblut als Testlösung enthalten war. Bei der Messreihe, in deren Verlauf zusätzlich zum Kapillarblut Eisenlösung zum Einsatz kam, wurde mittels Dosierkapillaren vor der Zugabe der Testlösung aus dem Pufferlösung beinhaltenen Microvial $20 \mu L$ Lösung abgenommen, um einen Volumenfehler zu verhindern. Das Kapillarblut für die entsprechende Bestimmung stammte von einer gesunden Probandin (25 J.), die orale Kontrazeptiva zu sich nahm. Für jede Reihe wurde eine Drei-

fachbestimmung durchgeführt. Nach vorausgegangenem F-Test für beide Versuche, nach welchem sich die Standardabweichungen der jeweils verglichenen Messreihen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % nicht signifikant unterschieden, ergab der t-Test für beide Versuche bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von ebenfalls 5 % keine signifikanten Unterschiede für die Bestimmung der FORT-Werte mit und ohne Zusatz von zweiwertigen Eisenionen.

Die Konzentration der Eisenlösung und damit die effektive Menge an Eisenionen, die der Probe zugesetzt wurden war, sehr gering. Jedoch lag sie um das etwa Fünffache höher, als die Menge an Eisenionen, die durch den Zusatz einer physiologischen Probe, wie Blut, eingetragen werden konnten [74].

Einfluss von oral applizierten Eisen(II)-Ionen

Eisenionen werden aus dem Gastrointestinaltrakt dem Körperbedarf angepasst von einem Eisen-Transportsystem hauptsächlich aus dem Duodenum und dem oberen Jejunum resorbiert. Hierbei handelt es sich fast ausschließlich um zweiwertige Eisenionen. Für den Transport im Plasma wird Eisen in der dreiwertigen Form an das Glycoprotein Transferrin gebunden [75]. Dieses an Transferrin gebundene Eisen wäre als von den Ernährungsgewohnheiten abhängige Variable möglicherweise eine Quelle für probandenabhängige Schwankungen bezüglich der in der Testlösung vorhandenen Eisenmenge. Um den Einfluss von dreiwertigem Eisen auf den FORT-Wert zu überprüfen, wurde an sechs gesunden Probanden im Alter zwischen 24 und 42 über einen Zeitraum von einer Stunde und 20 Minuten nach der oralen Applikation von 50 mg Eisen(II)-sulfat Monohydrat¹⁴ auf nüchternen Magen im Abstand von jeweils zwanzig Minuten ein FORT-Wert ermittelt. Für die Dauer der Messungen durften die Probanden keine Nahrung zu sich nehmen, Gemüsesaft, Kaffee oder Tee trinken, um einen möglichen Anstieg von Antioxidantien in der Probe auszuschließen.

Die Probanden durften aufgrund des Reizungspotentials von Eisen nicht unter Magen oder Darmbeschwerden, sowie Malabsorptionssyndrom leiden und nicht rauchen. Um zu beurteilen, ob sich durch die orale Applikation des Eisensulfates ei-

¹⁴ Eisentabletten-Ratiopharm®

ne signifikante Veränderung des FORT-Wertes eingestellt hatte, wurden die aus der Methodenpräzisionsbestimmung ermittelten Werte herangezogen. Zur Auswertung diente der F-Test zum Vergleich der Varianzen der Messreihen. Abbildung 3.10 zeigt die Standardabweichung der Methodenpräzisionsbestimmung im Vergleich zu den Standardabweichungen für die einzelnen Probanden nach der Präparateinnahme.

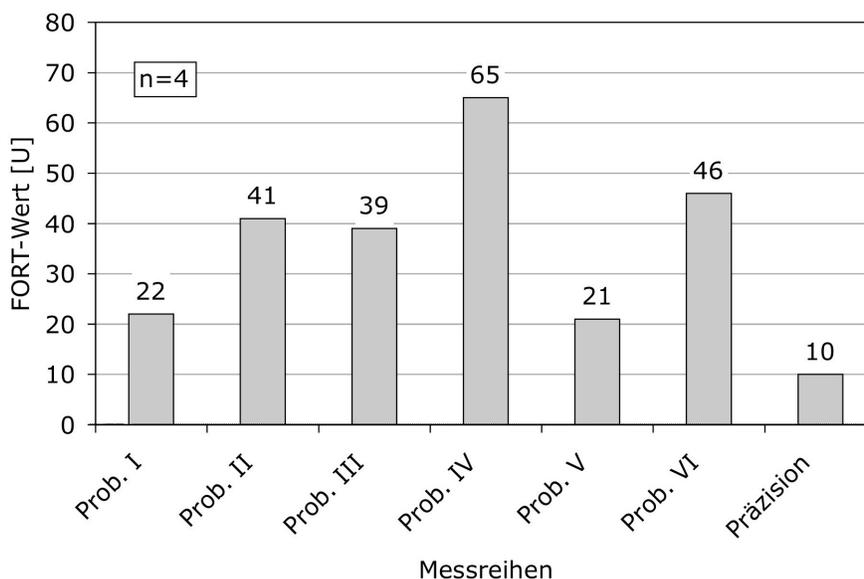


Abbildung 3.10: Vergleich von Standardabweichungen nach oraler Gabe von 50 mg Eisen-(II)-sulfat Monohydrat gegen Eisenfreiheit (Präzision)

Für die Probanden II, III, IV, und VI ergaben sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % nach der Durchführung des F-Tests signifikante Unterschiede in den Standardabweichungen gegenüber dem im Rahmen der Messpräzision bestimmten Wert. Es konnte somit also nicht eindeutig ausgeschlossen werden, dass schwankende Eisenwerte den FORT-Wert unbeeinflusst lassen. Jedoch zeigten zwei der sechs Probanden keine signifikanten Unterschiede. Ferner sollte beachtet werden, dass die individuellen Niveaus der Werte von Proband zu Proband sehr unterschiedlich waren. Auch die Betrachtung der einzelnen Werte über die Versuchszeit zeigte keinen eindeutigen Trend, so dass aufgrund der gemachte Beobachtungen keine eindeutige Aussage möglich war.

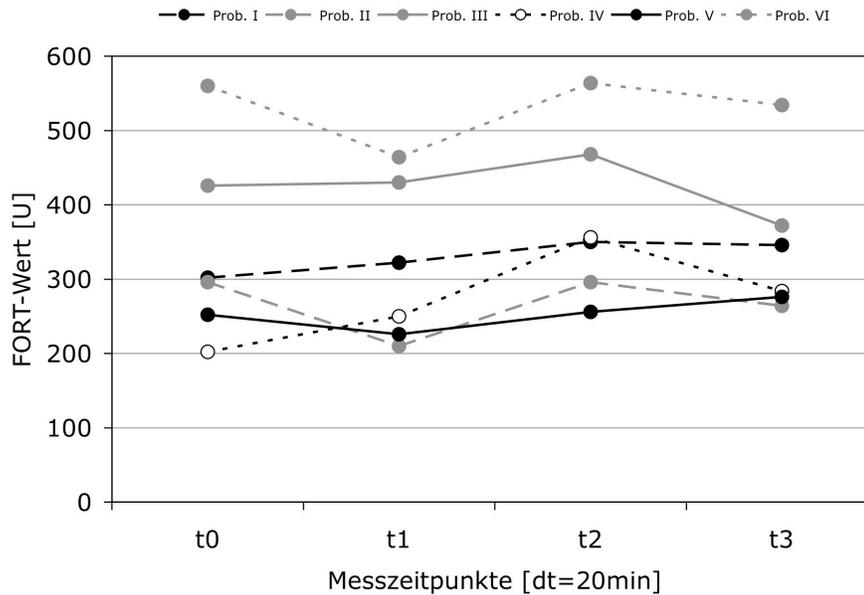


Abbildung 3.11: Zeitlicher Verlauf der FORT-Werte. Die Einnahme des Präparates erfolgte zum Zeitpunkt t_0

Die im Vergleich zu der unter 3.6.3 bestimmten Standardabweichung höher erscheinenden relativen Schwankungen unter Einnahme des Eisenpräparates könnten ebenfalls auf den deutlich geringeren Stichprobenumfang und die größeren Pausen zwischen den Bestimmungen zurückzuführen sein.

3.6.5 Zugabe von Natrium-EDTA

Nach den Untersuchungen zum Einfluss einer möglicherweise gesteigerten Eisenkonzentration in der Probe sollte in dem folgend beschriebenen Testansatz überprüft werden, inwiefern das System auf die Abwesenheit beziehungsweise auf das komplezierte Vorliegen der enthaltenen Eisenionen reagierte. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die Anwesenheit von EDTA zusätzlich zu gegenwärtigen Übergangsmetallionen den Ablauf einer Fenton-Reaktion nicht notwendigerweise unterbindet, sondern dass dies im Gegenteil zu einer Begünstigung der ablaufenden Mechanismen führt [76, 77]. Für die Untersuchung dieses Einflusses wurden zwei Testreihen miteinander verglichen.

Ein Testansatz enthielt als Testlösung das Kapillarblut einer nicht rauchenden, gesunden, weiblichen Testperson (25 J.). Dem Vergleichstestansatz wurden $20 \mu\text{L}$ einer $c=10 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ Natrium-EDTA-Lösung in PBS zugesetzt. Vor Zugabe der EDTA-Lösung und der Blutprobe wurde ein Aliquot von $20 \mu\text{L}$ Puffervolumen entfernt, um einen Verdünnungsfehler durch das zusätzliche Volumen der EDTA-Lösung zu vermeiden. Anschließend wurde erst der Komplexbildner zugefügt und dann eine Wertbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse beider Testansätze wurden in einer Dreifachbestimmung erhalten. Um die Vergleichbarkeit der Einzelwerte zu gewährleisten wurde darauf geachtet, die Bestimmungen in einer maximalen Gesamtversuchsdauer von 60 Minuten durchzuführen, da aus den vorausgegangenen Versuchen Daten über die Schwankungen der FORT-Werte einer Testperson für dieses Zeitfenster vorlagen. Die Ergebnisse sind zusammen mit den Daten aus dem folgenden Versuch in Abbildung 3.12 dargestellt.

EDTA besaß einen signifikant mindernden Einfluss auf den FORT-Wert. Bei der Anwendung von F- und t-Test bei jeweils bei 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit konnte dies eindeutig gezeigt werden. Die komplexierenden Eigenschaften des EDTA schienen in diesem System den Verlauf der Bildung des farbigen Wurster-Radikals zu verlangsamen. Dies spricht für den postulierten Mechanismus im Sinne einer Fenton-Reaktion, die durch die Gegenwart von Übergangsmetallionen katalysiert wird und durch das Komplexieren letzterer gemindert werden kann.

Der beobachtete mittlere FORT-Wert von 128 [U] kann auf verschiedenen Wegen interpretiert werden. Da nicht auszuschließen war, dass auch andere, oxidative Mechanismen an der Bildung des Wurster-Salzes beteiligt sind, ist möglicherweise nicht ausschließlich Eisen hierfür notwendig. Es könnte sich um andere, prooxidative Bestandteile im Plasma handeln, welche das Chromophor in seine farbige Oxidationsstufe umwandeln. Ferner könnten auch die in der Literatur vielfach diskutierten prooxidativen Eigenschaften des EDTA verantwortlich sein. Diese beruhen auf der durch EDTA geförderten Bildung von Hydroxylradikal und könnten ebenfalls zur Oxidation des Chromogens führen.

3.6.6 Einfluss von Antioxidanzugabe

In dem folgend beschriebenen Experiment wurde zusätzlich zur Testlösung¹⁵ für die Bestimmung des FORT-Wertes eine $5 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ ¹⁶ Lösung Natriumascorbat in PBS zugesetzt, um den Einfluss eines potenten Antioxidans auf die postulierte FORT-Reaktion zu beobachten. Die hintergründige Überlegung zielte darauf ab zu überprüfen, ob es sich bei dem Mechanismus des farbgebenden Prinzips tatsächlich -wie beschrieben- um einen oxidativen Prozess handelte. Die Wahl der L-Ascorbinsäure als exemplarisches Antioxidans rührte von dem vergleichsweise niedrigen Standard-Reduktionspotential der Ascorbinsäure im Vergleich zu anderen, gängigen Antioxidantien [78], sowie von weiteren, für die Versuchsbedingungen günstigen, physikochemischen Eigenschaften, zum Beispiel die Solubilität in wässrigen Lösungen. Diese stellte ein nicht unerhebliches Kriterium dar, da PBS als Medium für die Vitamin C Lösung verwendet werden sollte. Die Löslichkeit von Natrium-L(+)-Ascorbat in Wasser¹⁷ ist im Vergleich zu dem relativ hydrophilen Vitamin E-Derivat Trolox [79] deutlich erhöht¹⁸.

Als Folge der Zugabe eines Antioxidans zum Farbreaktionsansatz sollte die Bildung des gefärbten Wurster-Farbstoffes durch Oxidation im Vergleich zu einer Probe ohne Antioxidans, herabgesetzt werden. Durchgeführt wurde jeweils eine Dreifachbestimmung unter der Verwendung des Kapillarblutes einer gesunden, weiblichen Testperson (25 J.) nach Bestimmung und Subtraktion eines Blindwertes. Die Bestimmungen wurden innerhalb von 60 Minuten durchgeführt, um die Vergleichbarkeit der Werte untereinander zu gewährleisten. Zugegeben wurde ein Volumen von $20 \mu\text{L}$ Natrium-L(+)-Ascorbatlösung. Um einen eventuell entstandenen Verdünnungsfehler auszugleichen, wurde vor der Zugabe von Testlösung und Antioxidans ein Volumen von $20 \mu\text{L}$ Pufferlösung aus dem Testansatz analog zu den vorausgegangenen Versuch entfernt und erst darauf das Antioxidans und anschließend die Probe hinzugegeben.

¹⁵ Kapillarblut

¹⁶ Entspricht etwa der 10-fachen Menge im Plasma

¹⁷ 600 g in 1 L H₂O

¹⁸ Weniger als 1 g in 1 L Ethanol und Methanol

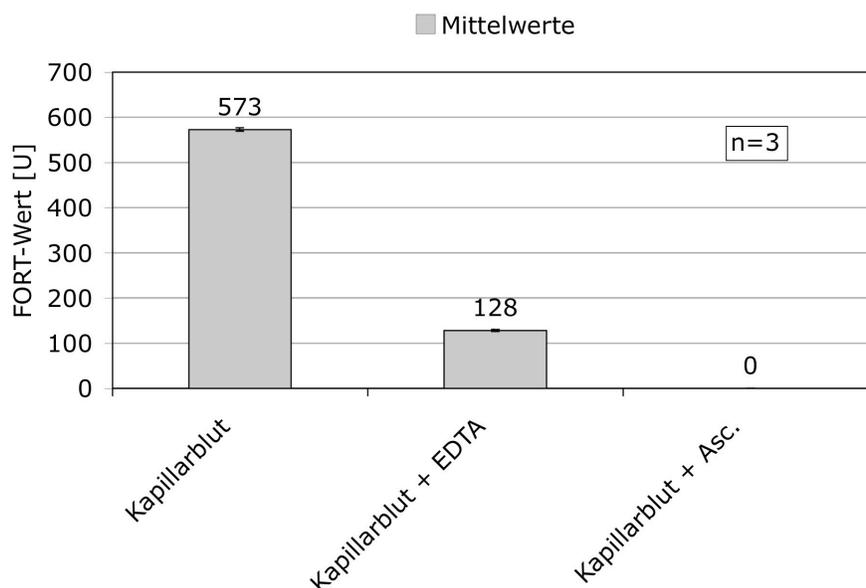


Abbildung 3.12: Ergebnisse der Zugabe von $10 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ Natrium-EDTA-Lösung und $5 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ Na-L(+)-Ascorbatlösung zur FORT-Wert Bestimmungen mit Kapillarblut

Abbildung 3.12 zeigt die erhaltenen Ergebnisse im Direktvergleich, sowie die Ergebnisse aus Versuch 3.6.4. Durch die Zugabe von $20 \mu\text{L}$ $5 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ Natrium-L(+)-Ascorbatlösung wurde die Bildung des indizierenden Farbstoffes nicht nur gemindert, sondern sie unterblieb vollständig. Aufgrund der Eindeutigkeit wurde auf eine statistische Auswertung der Dreifachbestimmung verzichtet. Dieses Ergebnis liess die Unterstützung der Aussage seitens des Herstellers zu, dass es sich bei der Ausbildung der Rotfärbung im Zuge der Durchführung des FORT-Testes um einen oxidativen Prozess handelt. Jedoch konnte zu diesem Zeitpunkt nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob tatsächlich das postulierte farbgebende Prinzip in Gestalt eines Radikals in Erscheinung tritt.

3.7 Untersuchung des farbgebenden Prinzips

Wie unter der Nummer 3.1 beschrieben wurde beruht das System zur Bestimmung der FORT-Werte auf einer Verfolgung der Geschwindigkeit der Absorptionzunahme bei 505 nm des Reaktionsansatzes. Die Absorption der Lösung bei besagter Wellenlänge wird der Bildung des zum in 3.6.2 besprochenen, p-Phenylendiaminderivat (NNEIPPDA-HCl) korrespondierenden Alchilaminradikalkations zugeschrieben.

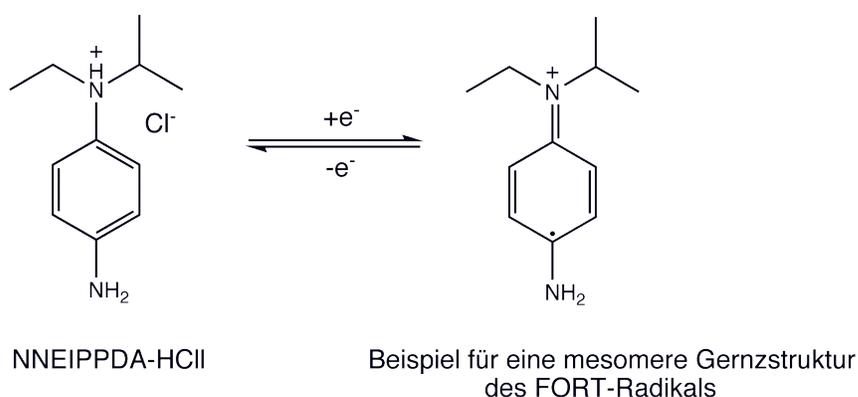


Abbildung 3.13: Bildung des farbigen Wurster-Salzes aus NNEIPPDA-HCl bei pH=4,8 (FORT-Radikal)

Nach der näherungsweise Aufdeckung der Zusammensetzung und der Untersuchung eklatanter, möglicher Stör- und Einflussfaktoren innerhalb des FORT-Systems sollte folgend die Annahme über den farbgebenden Mechanismus untersucht werden, der wie schon mehrfach erwähnt für den Ausfall der Höhe des FORT-Wertes sein soll. Hierzu wurde mittels ESR-Spektroskopie die Gegenwart einer radikalischen Spezies qualitativ untersucht und die erhaltenen Ergebnisse mit den photometrisch erhaltenen FORT-Daten verglichen.

3.7.1 Analytik freier Radikale

Für den Nachweis von freien Radikalen sind in der Literatur zahlreiche Methoden beschrieben. Paneth und Hofeditz beschrieben 1929 als erste den Nachweis und die Bestimmung der Lebensdauer des Methylradikals [80]. Seitdem sind unterschiedlichste Techniken beschrieben worden, um freie Radikale nachzuweisen und zu identifizieren. Die Methoden reichen von Laser-Magnetresonanzspektroskopie (LMR) [81], über laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie [82] und kohärente anti-Stokes Raman Spektroskopie [83], bis zur spektralphotometrischen Analyse. Die Wahl der Methode richtet sich jeweils nach der voraussichtlichen Lebensdauer, der Art des Zentrums, an dem sich das ungepaarte Elektron formal aufhält¹⁹ und der Phase, in welcher die entsprechenden Verbindungen analysiert werden sollen. Eine klassische Möglichkeit zur Untersuchung radikalischer Spezies in wässriger Lösung stellt die nachfolgend beschriebene UV-Vis-photometrisch gestützte Methode dar.

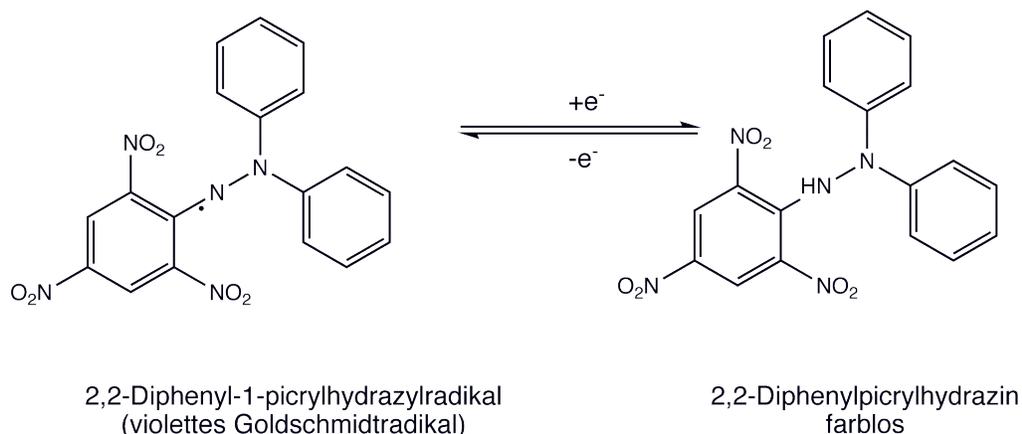


Abbildung 3.14: Entfärbung des 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl-Radikals

Der Verlust der Farbe des intensiv violett gefärbten²⁰ und stabilen 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl-Radikals (*DPP*[•] oder Goldschmidts-Radikal [84]) lässt sich als Indikator für die Gegenwart weiterer Radikale heranziehen. Durch eine für Radikale

¹⁹ N, O oder C-zentrierte Radikale

²⁰ $\lambda = 517$

typische Kombinationsreaktion, beziehungsweise durch Reduktion zum Hydrazinderivat verliert die Verbindung ihre paramagnetischen Eigenschaften und mit diesen seine Färbung. Die hypochrome Veränderung lässt sich bequem mittels spektralphotometrischer Überwachung des Absorptionsmaximums bei 517 nm verfolgen [85].

Restriktionen für die Anwendbarkeit in Bezug auf das FORT-System bestehen jedoch aufgrund der Struktur des stabilen 2,2-Diphenyl-1-pikryl-hydrazyl-Radikals. Durch die räumliche Orientierung der Verbindung ergeben sich sterische Behinderungen für potentiell koppelnde, ebenfalls voluminös ausfallende Radikalverbindungen, deren Nachweis angestrebt wird. Da das mutmaßliche Radikalkation des N-Ethyl-N-isopropyl-p-phenylendiamin durchaus ebenfalls als raumgreifend bezeichnet werden kann, erschien eine Kopplung mit dem Goldschmidt-Radikal zwar nicht ausgeschlossen, jedoch nicht optimal als Bestimmungsmethode für die Determinierung der Aussagekraft des farbgebenden Prinzips der FORT-Reaktion.

Eine instrumentelle Methode zum Nachweis und zur Identifizierung freier Radikale, die heutzutage mit geringem Aufwand durchgeführt werden kann stellt die Elektronenspinresonanzspektroskopie dar.

Diese wird, da die Methode im Verlaufe des praktischen Teils dieser Arbeit intensiv verwendet wurde, gesondert besprochen und erläutert unter Kapitel 4.1.4. An dieser Stelle wird lediglich der in Bezug auf das FORT-System ESR-Spektroskopisch durchgeführte Versuch zu qualitativen Aussagen über das FORT-Kit herangezogen.

3.7.2 Nachweis des farbigen Radikalkations

Viele strukturell mit dem Chromogen verwandte Radikalkationen verschiedener substituierter p-Phenylendiaminderivate sind in ihrem Verhalten teilweise sehr intensiv elektrochemisch und auch absorptionsspektroskopisch beforscht, aufgeklärt und erklärt²¹. Für das im dROM Test beschriebene NNEIPPDA-HCl bestehen diesbezüglich teilweise noch Blanketten [63].

²¹ Siehe Literaturangaben unter 3.1

Es existieren jedoch Untersuchungen, die mittels Spektrensimulation und mathematischer Unterstützung die erhaltenen ESR-Spektren dieser Verbindung erklären können. Diese orientieren sich an der Art und dem Ausmaß des Einflusses homologer Alkylsubstituenten auf das Redoxverhalten unterschiedlich N-substituierter p-Phenylendiaminderivate [86]. Da für das im FORT-Test enthaltene Chromogen keine vergleichbaren Angaben in dieser Form zugänglich waren²², wurde ein entsprechender Versuch zum Nachweis des Radikalkations des NNEIPPDA-HCl unternommen.

Mittels ESR-spektroskopisch gestützter Versuche sollte geklärt werden, ob es sich bei dem Mechanismus der Farbgebung tatsächlich um einen Prozess²³ unter Radikalbeteiligung handelt.

Qualitativer Nachweis eines Radikals

Um zu überprüfen, ob sich im Zuge der Farbvertiefung innerhalb des Testansatzes des FORT-Kits ein Radikal bildete, wurde ein FORT-Test an einer humanen Kapillarblutprobe durchgeführt. Nach dem Zentrifugieren wurden von dem Ansatz 50 μL Lösung entnommen und in einer ESR-kompatiblen Rundkapillare bei einer Amplitudenmodulation von 0,6 G über einen Zeitraum von neun Minuten ESR-Spektren der Lösung aufgezeichnet. Bereits nach einer Minute wurde ein sich herausbildendes Resonanzsignal erkennbar. Dieses entwickelte sich zu einem Spektrum mit der Feldmitte bei 3388,54 G, einem g-Wert von $g=2,28$ und einer mittleren Linienbreite von 4,85 mT²⁴.

²² Ausgenommen Herstellerangaben

²³ An dieser Stelle wurde bewusst die Formulierung Prozess anstelle des Ausdruckes Reaktion verwendet, da allein durch die vielfachen Möglichkeiten der Beteiligung unterschiedlicher oxidierender Agenzien nicht davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei den Ereignissen, die zur Entstehung der roten Farbe führen um eine einzelne Reaktion handelt.

²⁴ Die Daten für die Berechnung der Feldmitte, des g-Wertes und der mittleren Linienbreite wurden innerhalb einer gesonderten Messreihe ermittelt, für die entsprechende Rohdaten im Anhang zu finden sind.

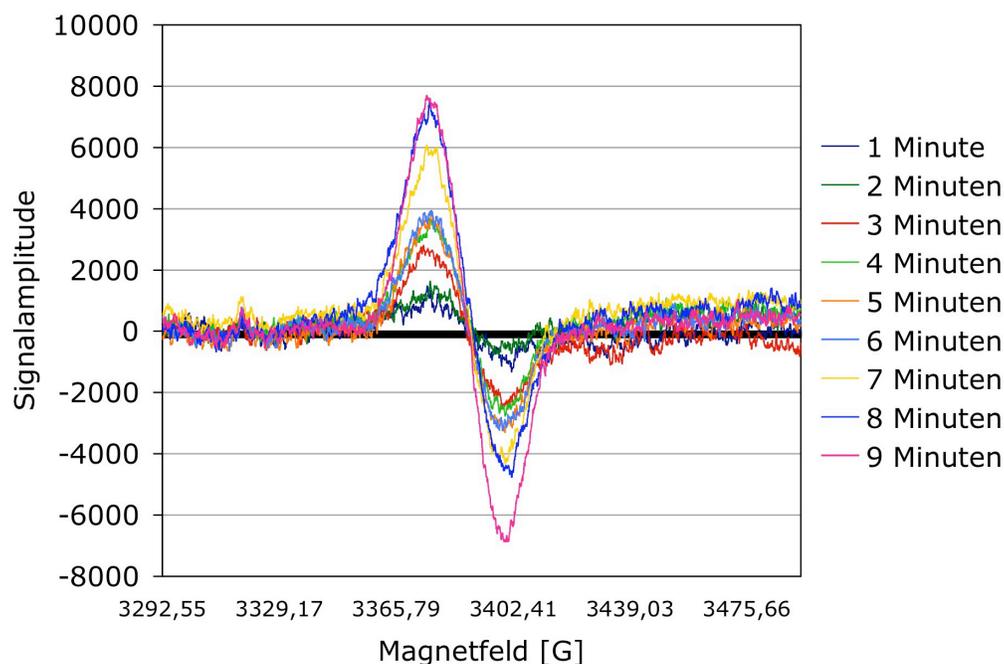


Abbildung 3.15: Während der bathochromen Veränderung der FORT-Lösung beobachtetes ESR-Signal

Unter der verwendeten verhältnismäßig hohen Amplitudenmodulation von 0,6 G war es nicht möglich, eine Hyperfeinstruktur zu erkennen. Aus denselben Gründen ist auch das Heranziehen des ermittelten Landé Faktors zu qualitativen Vergleichen nur unter Vorbehalt zu betrachten, da eine hohe Amplitudenmodulation einen Signaldrift initiieren kann, der ein im Sinne der Validierung richtiges Bestimmen des g -Wertes nicht mit voller Sicherheit zulässt. Die so erhaltenen Daten entsprechen jedoch näherungsweise den für die strukturverwandten Alchilamine veröffentlichten Daten [86].

Wie hier von Grampp und Mitarbeitern gezeigt, erfahren die entsprechenden N -substituierten Verbindungen durch unterschiedliche Substituenten der homologen Reihe der Alkane entsprechend keine nennenswerte Beeinflussung bezüglich der Linibreite und der Kopplungskonstanten. Das in der vorliegenden Arbeit betrachtete Amin unterscheidet sich von dem gut untersuchten Wurster-Kation des NNEIPDA-HCl lediglich durch eine Umwandlung einer N -Methyl-gruppe in eine Methylengrup-

pe und des zweiten N-Methylsubstituenten in einen N-Isopropyl-substituenten. Aufgrund dieser Daten lag die Vermutung nahe, dass auch für das FORT-Chromogen ähnliche Bedingungen gelten und hiermit die erhaltenen Daten als Hinweis für das Vorliegen des entsprechenden Radikalkations gelten konnte. Es kann angenommen werden, dass es sich bei der formierten, paramagnetischen Verbindung um ein zumindest der postulierten Radikalstruktur ähnliches Radikal handelte.

Korrelation von FORT-Werten und ESR-Signal

Mit dem im Folgenden beschriebenen Experiment sollte untersucht werden, inwiefern das vom entsprechenden Radikalkation herrührende ESR-Signal mit der Höhe des FORT-Wertes korrelierte. Gleichzeitig wurde diese Messanordnung verwendet, um die lineare Arbeitsweise des FORT-Systems zu untersuchen.

Hierzu wurden zur Bestimmung des FORT-Wertes als Testlösung Wasserstoffperoxidverdünnungen in PBS auf acht unterschiedlichen Konzentrationsniveaus im Bereich von $0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ bis $7 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ verwendet. Die Lösungen wurden unabhängig voneinander, frisch vor der jeweiligen Messung hergestellt. Für die Bestimmungen wurden jeweils $20 \mu\text{L}$ Wasserstoffperoxidlösung als Testlösung eingesetzt und eine FORT-Wert Bestimmung durchgeführt. Anschließend wurde direkt nach Erklingen des Zeitsignals, welches die Beendigung der FORT-Wert Bestimmung anzeigt, eine Probe von $50 \mu\text{L}$ aus dem Reaktionsgefäß entnommen und in einer Glaskapillare der ESR-Untersuchung zugeführt. Die Intensität der ESR-Absorption wurde anhand der Signalamplitude ermittelt. Die Feldmodulation betrug $0,6 \text{ G}$. Es wurde für jede Konzentration eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Abbildung 3.16 zeigt die lineare Regressionsgerade für die Mittelwerte der FORT-Wert-Ermittlung. Die Auswertung der Linearitätsanalysen erfolgte mit der Analytik-Software Dintest®. Danach ergab sich eine lineare Regression mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9985.

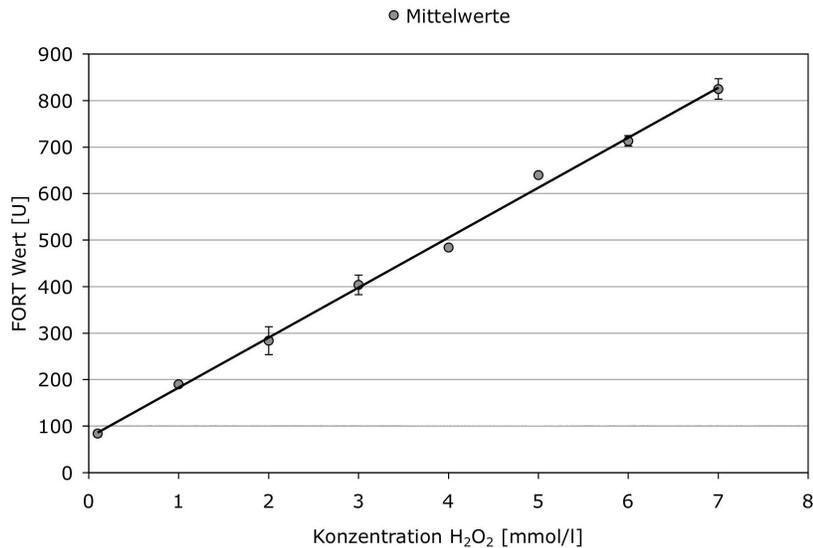


Abbildung 3.16: Konzentrationsreihe für H₂O₂, mit dem FORT-Test bestimmt $r=0,9985$

Das Ergebnis für die Ausgleichsgerade der Konzentrationsbestimmung des gebildeten Radikals lieferte eine vergleichbare Aussage in Bezug auf den linearen Korrelationskoeffizienten. Die resultierende Ausgleichsgerade ist in Abbildung 3.17 dargestellt und beschreibt die lineare Regression für die ESR-Bestimmung mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9939.

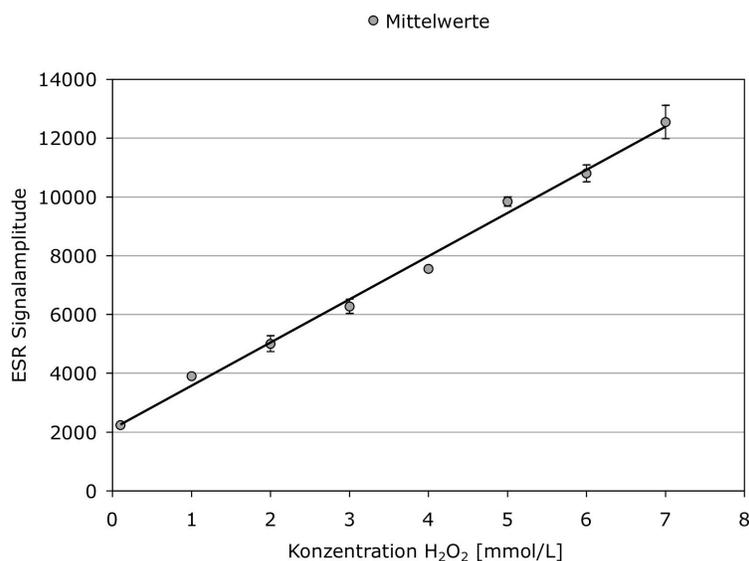


Abbildung 3.17: Konzentrationsreihe für H₂O₂, mit ESR bestimmt $r=0,9939$

Zur graphischen Beweisführung, dass die Höhe des FORT-Wertes mit der Bildung der detektierten, radikalischen Spezies korrelierte, wurden die ermittelten Werte gegeneinander aufgetragen. Das Ergebnis wies die erhaltenen Daten für FORT-Werte und ESR-Signalamplitude mit einem Bestimmtheitsmaß der linearen Korrelation von 0,9976 als voneinander abhängige Größen aus. Somit war der Beweis erbracht, dass an den Prozessen, die innerhalb des FORT-Testsystems mittels Oxidation durch Wasserstoffperoxid zu einer Farbvertiefung führen, eine Spezies mit Radikalcharakter beteiligt ist. Wie die Untersuchungen mit unterschiedlichen Konzentrationen beweisen, arbeitet das System für Wasserstoffperoxid unter den gewählten Bedingungen linear.

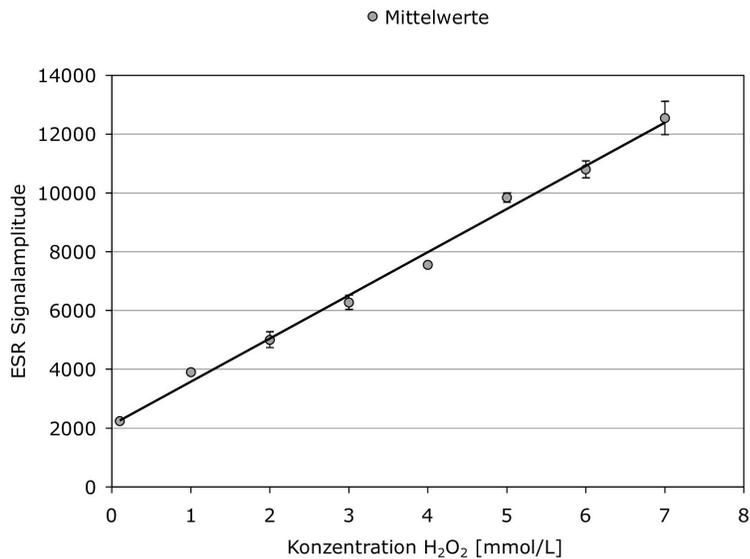


Abbildung 3.18: Korrelation der FORT-Test-Ergebnisse für die H₂O₂-Analyse mit den entsprechenden Ergebnissen der ESR-spektroskopischen Untersuchung

3.8 Probandenstudie

Ziel dieser Arbeit war es, ein analytisches System zu finden, welches in kosmetischen Studien dazu genutzt werden kann, an freiwilligen Probanden eine Aussage zum potentiell schädigenden Einfluss von UV-Irradiation der Haut auf das basolaterale Kompartiment zu tätigen. Die Formulierung „potentielle“ Schäden ist hier im Zusammenhang mit der von Sies verwendeten Definition des Begriffes oxidativer Stress zu sehen. Hiernach wird dieser betrachtet als „Störung im prooxidativ-antioxidativen Gleichgewicht zugunsten Erstgenanntens, mit der Folge potentieller Schädigungen“ [25]²⁵.

Oxidative Prozesse auf der Haut

Um eine Aussage über die Inzidenz und das Ausmaß oxidativer Prozesse innerhalb des systemischen Kompartimentes zu treffen, kann es als durchaus wichtig an-

²⁵ „... disturbance in the prooxidant-antioxidant balance in favor of the former leading to potential damage“

gesehen werden, die oxidativen Prozesse, welche sich topisch abspielen zusätzlich zur Menge an reaktiven Sauerstoffspezies im Blut zu bestimmen. Insbesondere bei der Untersuchung der Einflüsse von Sonnenexposition der Haut, oder wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Exposition gegenüber UVA-Strahlung, ist dies der Fall.

Wie schon eingangs erwähnt, bieten sich unterschiedliche Möglichkeiten, oxidative Vorgänge auf der Haut beziehungsweise in der Haut zu überwachen. Sollen diese jedoch auf Probanden innerhalb kosmetischer Studien angewendet werden, scheiden die meisten dieser Methoden aus. Methoden, wie die HPLC-Analyse erfordern viel Zeit und hohen Probenaufwand, andere Methoden bedürfen der Verwendung von Chemikalien und deren Anwendung in gesonderten Laborräumen. Sowohl technische, als auch logistische Differenzen sind überwiegend nicht mit einer Anwendung am Probanden vereinbar. Eine Methode, die unkompliziert für die benannte Bestimmung verwendet werden kann, ist die Messung kutaner Chemilumineszenzerscheinungen anhand der Bestimmung der ultraschwachen Photonenemission (UPE) [87, 88] deren Grundlagen und Prinzip unter 3.8 erläutert werden.

Orale Antioxidantien

Von zentralem Interesse ist für die kosmetische Anwendung der FORT-Test-Methode nicht nur die unilaterale Betrachtung des Einflusses prooxidativer Strahlung auf das systemische Kompartiment. Die Einflüsse systemisch in Erscheinung tretender ROS für die Haut werden als ebenso interessant für den Zustand derselben angesehen. Aus Vorstudien ging hervor, dass durch die Einnahme von Ascorbinsäure als Antioxidans über einen Zeitraum von zwei Wochen sowohl der FORT-Wert, als auch das UPE Signal positiv im Sinne einer Senkung beeinflusst werden können²⁶.

²⁶ Bislang unveröffentlichte Forschungsergebnisse

Es war also anzunehmen, dass durch die orale Zufuhr von antioxidativ wirksamen Substanzen der oxidative Status der Haut positiv im Sinne einer Verschiebung des prooxidativ- antioxidativen Gleichgewichtes in Richtung der Antioxidantien maßgeblich beeinflusst werden und dieser Einfluss über die verwendeten Methoden nachgewiesen werden konnte.

Im Zusammenhang mit protektiven und detoxifizierenden Eigenschaften gegenüber oxidativem Stress wird vielfach die Applikation der phenolischen Inhaltsstoffe des grünen Tees (*Camellia sinensis*) beschrieben [89]. Zahlreiche Studien belegen signifikante Zusammenhänge unter anderem mit carcinogenese-assoziierten Vorgängen [90, 91, 92] , dem Schutz von Melanocyten bei der Genese der Vitiligo²⁷ oder mit der Verbesserung der Hautbarrierefunktion [94]. Auch photoprotektive Eigenschaften werden dem komplexen Gemisch sekundärer Pflanzenstoffe zugeschrieben [95, 96].

(Nativer) Grüntee-Extrakt ist reich an monomeren Flavanderivaten, insbesondere Epicatechin, Epigallocatechin und deren 3-O-Gallaten. In geringeren Mengen kommen Gallussäureester vor, die sich aus Proanthocyanidinen, Epigallocatechin-, Epicatechin- und Catechin- Einheiten zusammensetzen, sowie einfache Gallotanine [97]. Die Summe der Grünteeextrakt-Inhaltsstoffe abzüglich Coffein wird für den Einsatz als Arzneistoff auch als Polyphenon E bezeichnet [98]. Ein synergistischer Wirkmechanismus in Bezug auf die antioxidativen Kapazitäten zwischen den Inhaltsstoffe des grünen Tees und Vitamin E wird ausserdem diskutiert [99, 100].

²⁷ Seit einiger Zeit mit hohen Wasserstoffperoxidkonzentrationen in Verbindung gerbachte Depigmentierungserkrankung[93]

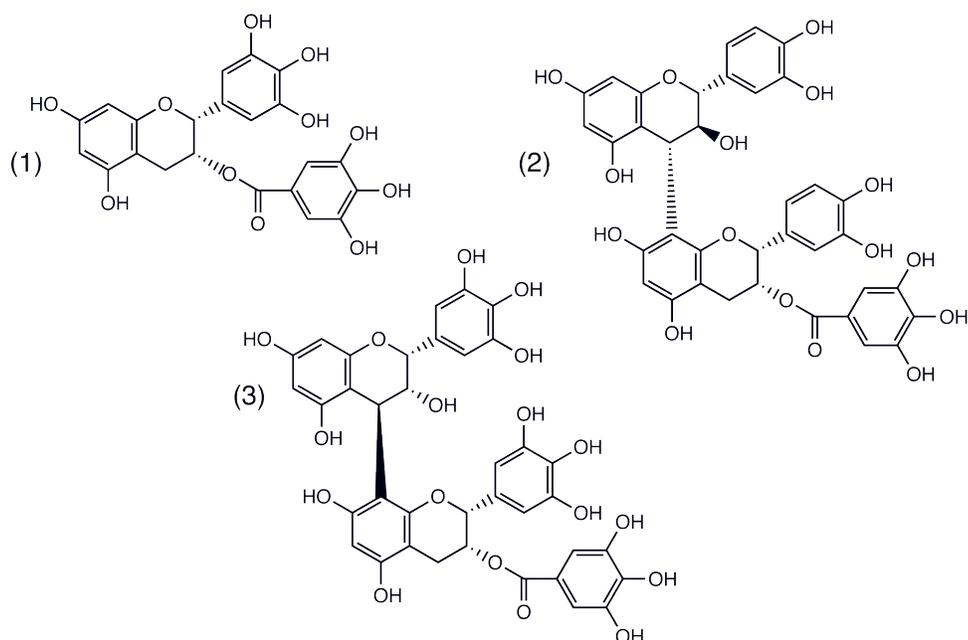


Abbildung 3.19: Polyphenolische Verbindungen aus grünem Tee [97]
 (1) Epigallocatechin-*O*-gallat (2) Procyanidin B₄-3'-*O*-gallat (3) Prodelphinidin B₂-3'-*O*-gallat

Ein im Zusammenhang mit antioxidativen Fähigkeiten ebenfalls untersuchtes komplexes Gemisch an sekundären Pflanzenstoffen stellt Rotwein, beziehungsweise ethanolfreier Rotweinxtrakt dar. Die für die antioxidative Wirkung verantwortlichen Verbindungen sind jedoch nicht zweifelsfrei identifiziert - eine große Anzahl von Verbindungen aus der Gruppe der Polyphenole wird diskutiert. Die wahrscheinlich prominenteste Verbindung unter den mutmaßlich aktiven Rotweininhaltsstoffen ist das Stilbenderivat Resveratrol [101]. Ihm werden unter anderem chemoprotektive Eigenschaften in Bezug auf Karzinogenese [102] und kardiovaskuläre Erkrankungen zugeschrieben [103].

Weitere polyphenolische Verbindungen, deren Gehalt im alkoholfreien Extrakt sowohl von der Weinsorte, als auch vom Anbauggebiet und der Zubereitungsart abhängen sind, wie im grünen Tee monomere Flavanderivate und deren 3-*O*-Gallate sowie verschiedene Proanthocyanidine und phenolische Säuren, wie Chlorogensäure und Gallussäure.

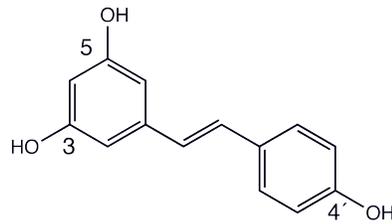


Abbildung 3.20: 3,5,4'-Trihydroxystilben ((trans)-Resveratrol)[104]

Für Untersuchungen an Testpersonen zu kosmetischen Zwecken gestaltet sich der Einsatz von systemisch wirksamen Substanzen kompliziert, da die rechtlichen Grenzen zwischen Lebensmittel²⁸, Nahrungsergänzungsmittel²⁹ und Arzneimittel³⁰ umständlich abgesteckt sind und für die jeweilige Deklaration individuell teils sehr hohe Anforderungen bezüglich Qualität, Sicherheit und Wirksamkeit gestellt werden. Auch für die Anwendung an Testpersonen im Zuge von Studien gelten strenge Regeln und Anforderungen [105], die sich für die Anwendung an Probanden zu kosmetischen Zwecken am besten durch die Verwendung von wirksamen Stoffen aus dem Bereich der Nahrungsmittel realisieren lassen [106].

Vor diesem Hintergrund wurden ernährungsphysiologische Untersuchungen angestellt, im Zuge derer Probanden entsprechende Zubereitungen mit Extrakten aus grünem Tee oder Rotwein in Form von Kapseln oral applizierten. Die Wahl fiel auf die beschriebenen Extrakte, da diese vielfach auf ihre antioxidativen Fähigkeiten untersucht und in der Literatur beschrieben sind. Ferner wird sowohl grüner Tee, als auch Rotwein als Nahrungsmittel mannigfaltig verzehrt, so dass die entsprechenden (alkoholfreien) Extrakte unter die rechtlichen Regularien für Nahrungsmittel fallen und ohne Probleme innerhalb einer kosmetischen Studie an Probanden zum Einsatz kommen können. Parallel wurden die Effekte auf den FORT-Wert und auf die Haut beziehungsweise die UPE der Probandenhaut als Surrogatparameter beobachtet.

²⁸ LFGB 2 Abs. 2

²⁹ NemV. Anhang 1

³⁰ AMG 2 Abs. 1

3.8.1 Ultraschwache Photonenemission

Da es sich bei der Verwendung chemilumineszenzbasierter Analysemethoden um eine relativ junge Erscheinung handelt [70], deren Anwendung für die klassische, pharmazeutische Analytik eher aussergewöhnlich ist, sollen an dieser Stelle das Messprinzip und die angewendete UPE-Methode kurz erläutert werden.

Prinzip der UPE

Wie aus dem quantenelektrodynamischen Terminus Photonenemission abzuleiten ist, handelt es sich bei diesem Phänomen um eine Lumineszenzerscheinung. Definitionsgemäß beschreibt diese freiwerdende elektromagnetische Strahlung, welche bei der Deaktivierung eines angeregten Zustandes emittiert wird. Im Fall der UPE fällt die Quantenausbeute besagter Übergänge sehr gering aus (UPE-Quantenausbeute 10^{-14} - 10^{-10}). Somit lässt sie sich, obgleich sie in vielen biologischen Systemen beobachtet wird, von dem Phänomen der Biolumineszenz abgrenzen [107]³¹. Letztere beinhaltet ferner die Verwendung von lichtverstärkenden Systemen. Auch im Tierreich verbreitete Beispiele hierfür sind Luminol oder Lucigenin zur Erhöhung der Lumineszenzquantenausbeute, wie zum Beispiel im System der Luciferin-Luciferasereaktion bei dem in Europa beheimateten Glühwürmchen oder der südamerikanischen Feuerfliege [108].

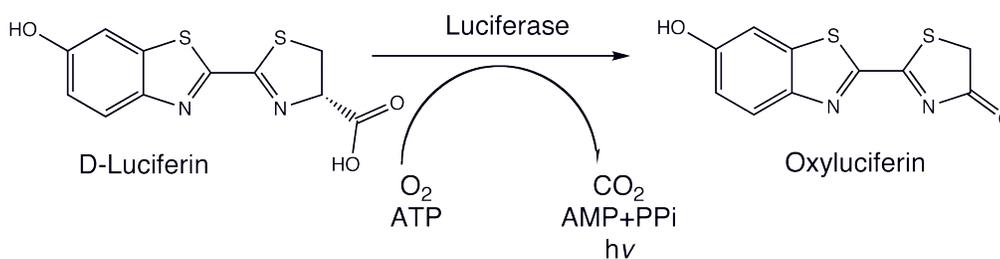


Abbildung 3.21: Bei der oxidativen Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin mittels Luciferase findet eine Chemilumineszenz-Emission im Bereich von 530 nm bis 635 nm statt

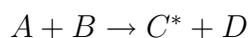
³¹ Quantenausbeute der Biolumineszenz 0,01-1

In der Fachliteratur tauchen für die beschriebenen Phänomene ferner die Begriffe Low-Level Luminescence [109], Low-Level-Chemiluminescence [110], low-intensity photon emission [111] oder Biophotonen auf. Diese werden jedoch teilweise missverständlich verwendet, da die genauen Ursachen der UPE bislang keinen definierten Reaktionsmechanismen zugeordnet werden können [112]. Neuere Daten deuten darauf hin, dass es sich bei den Prozessen der UPE auf humaner Haut um einen Zusammenhang mit oxidativen Vorgängen an Proteinen handelt. Hierbei scheint Tryptophan als eine Art Energietransmitter für die Relaxation angeregter Zustände anderer Aminosäuren zu fungieren [54].

Grundlagen der UPE

Es handelt sich bei der ultraschwachen Photonenemission, beziehungsweise bei deren spektroskopischer Beobachtung um Relaxationsvorgänge angeregter Zustände im Zuge derer Photonen auf niedrigem Energieniveau frei werden. Die Strahlungsintensität beträgt nicht mehr als $0,01 - 10^4 \frac{h \cdot \nu}{sec}$

Die UPE kann anhand des Verhaltens der Emission unterschieden werden in spontane Emissionserscheinungen, die ohne äußere Anregung konstitutiv auftreten, und in die induzierte UPE, die nach Applikation exzitatorischer Noxen beobachtet werden kann. Die Strahlungsintensität der induzierten UPE fällt im Vergleich zu der spontanen UPE höher aus [112]. Als Ursache werden Chemilumineszenzvorgänge aufgrund angeregter Spezies angenommen, welche allgemein durch die Beziehung



beschrieben werden können³².

³² A: Edukt₁, B: Edukt₂, C*: Produkt₁ im angeregten Zustand, D: Produkt₂, C: Produkt₁ im Grundzustand, $h \cdot \nu$: emittierte Strahlung [70]

Als Induktoren erweisen sich unter anderem Ozon, organische Peroxide, wie Benzoylperoxid (BPO), Exposition gegenüber Fenton-Bedingungen und UV-A-Strahlung [54, 113].

In den UPE gestützten Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich UVA-induzierte UPE-Untersuchungen ausgeführt. Daher wird an dieser Stelle für die übrigen Induktionsnoxen, sowie die Theorie der Ursachen der spontanen UPE auf die Fachliteratur verwiesen [112]. Eine zentrale Position nehmen bei der Entstehung der induzierten UPE angeregte Carbonylverbindungen ein, welche eine Emission im Bereich von 380-460 nm³³ zeigen [108]. Eine gesonderte Rolle kommt in diesem Zusammenhang, wie bereits erwähnt der Aminosäure Tryptophan zu. Angeregte Zustände von Carbonylverbindungen können allgemein auf verschiedenen Wegen gebildet werden. In Abbildung 3.22 sind einige dieser Reaktionen, die in Zusammenhang mit oxidativen Prozessen stehen beispielhaft aufgeführt.

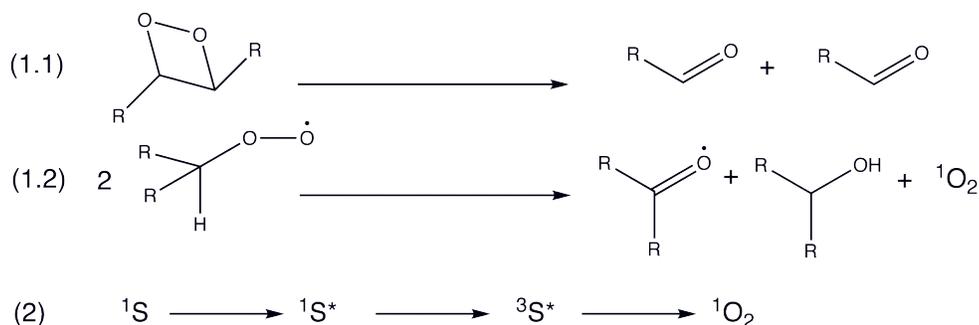


Abbildung 3.22: (1.1) und (1.2) Bildung angeregter Spezies über unterschiedliche Wege des Abbaus von Peroxiden: 1.1: Zerfall von 1,2-Dioxetanen, 1.2: Russell Reaktion zur Disproportionierung von Peroxyradikalen. (2) Photosensibilisierte Bildung von Singulett-Sauerstoff [4, 108, 114]

Messung der UPE

Für die Aufnahme eines UPE-Spektrums sind spezielle räumliche Gegebenheiten notwendig. Jedwedes den Detektor erreichendes Streu- oder Umgebungslicht stört die hochsensible Messung der Emission.

³³ Empfindlicher Bereich für gängige UPE-Systeme

Daher sind Dunkelräume oder Dunkelkammern unter Ausschluss Möglichkeit jeglichen Lichteinfalls die Umgebung der Wahl für eine UPE-Messung. Das Herzstück eines UPE-Spektrometers bildet ein Photomultiplier, der als Lichtdetektor für die Signalaufnahme zuständig ist. Das aufgenommene Signal des Photomultipliers wird in einen elektrischen Strom umgerechnet und als Funktion der Zeit registriert. Für die Realisierung der UV-induzierten UPE wird eine Strahlungsquelle in Form einer UV-Lampe benötigt. Aus Sicherheitsgründen befindet sich diese, ebenso wie eine noch zu erwähnende Online-Kopplung und eine Steuereinheit im verwendeten Aufbau außerhalb des Dunkelraumes und ist mit der Probe beziehungsweise mit der Detektoreinheit über Lichtleiter verbunden. Ein weiterer wichtiger Bestandteil zur Gewährleistung eines validen UPE-Ergebnisses sind für den verwendeten Versuchsaufbau piezozuggesteuerte Blendenschiebereinrichtungen (Shutter), die in einer Sequenz von Bestrahlung und Detektion den sensiblen Photomultiplier vor Überbelichtung durch die Lichtquelle schützen. Sowohl der Strahlungsquelle, als auch dem Photomultiplier ist ein Shutter zugeordnet. Eine korrekte Abfolge von Shuttern, die sich öffnen und schließen, die Bestrahlung, die Detektion und die Spektrenregistrierung werden gewährleistet und kontrolliert durch die Kopplung des Systems mit einer computer-gesteuerten Kontrolleinheit, sowie der entsprechenden Software, die die genaue Sequenz der einzelnen Vorgänge festlegt. Abbildung 3.23 zeigt den prinzipiellen Aufbau, wie er bei den unternommenen Messungen realisiert wurde.

Ein typischer Messablauf setzt sich zusammen aus dem sequentiellen Ablauf der folgenden Schritte:

- Öffnen des Anregungsshutters zwischen Lampe und Probe für die Dauer der Anregung
- Schließen des Anregungsshutters
- Karenzphase von 0,5 Sekunden (Delay)
- Öffnen des Detektionsshutters
- Registrieren des verstärkten UPE-Signals über einen definierten Zeitraum

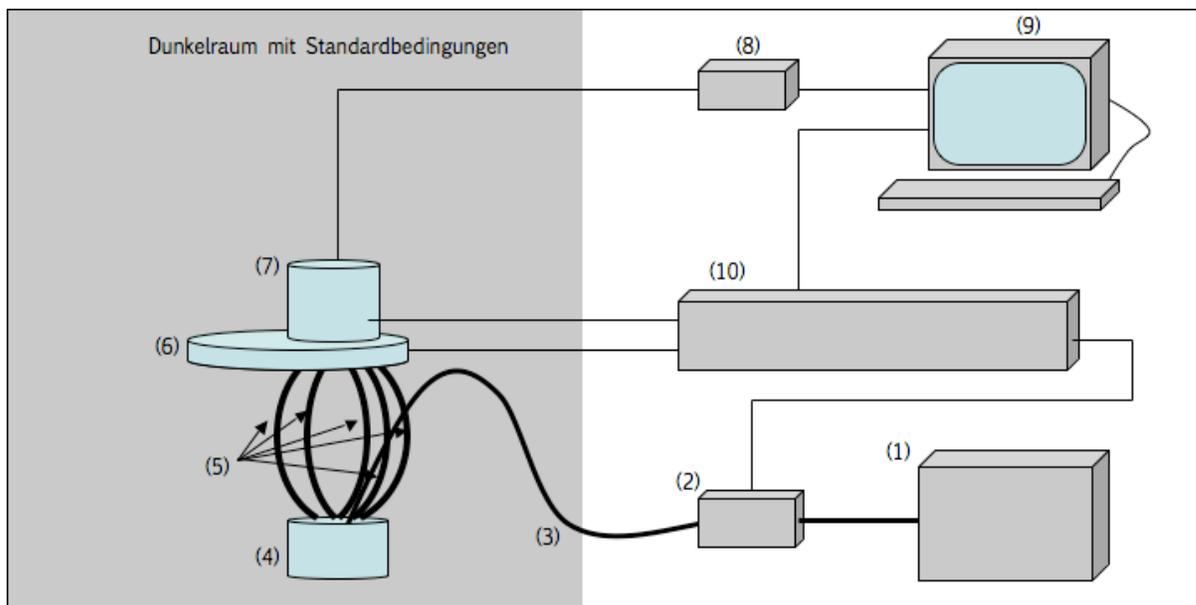


Abbildung 3.23: Aufbau des verwendeten UPE-Systems: (1) Lichtquelle, (2) Anregungsshutter, (3) Anregungslichtleiter, (4) Messkopf, (5) Detektionslichtleiter, (6) Filtrerrad für spektral aufgelöste (im Rahmen dieser Arbeit nicht angewendet) UPE/ Detektionsshutter, (7) Photomultiplier mit integrierter Kühlung, (8) Online-Kopplung, (9) Computer, (10) Kontrolleinheit mit Steuerungseinfluss auf die Shutter (2) und (6), sowie die Kühlung in (7)

UPE-Spektren

Aus der Reihenfolge der Einzelschritte im Ablauf einer UPE-Messung ergibt sich das charakteristische Aussehen des Spektrums. Das Signal wird als eine Abklingkurve registriert und in der Zeitdomäne aufgenommen. Sowohl die Höhe des Signals, als auch die Fläche unterhalb der Kurve werden zur Auswertung herangezogen. Es gibt Anzeichen dafür, daß diskreten Bereichen der Abklingkurve bestimmte, am Geschehen der UPE-beteiligte Prozesse zugeordnet werden können [113].

Für die praktische Anwendung der UPE-Messung wird korrespondierend zu den gewünschten Informationen eine „ROI“ (region of interest) definiert. Diese gibt ein Zeitintervall innerhalb der Abklingphase des UPE-Signals an, über dessen Dauer die erhaltenen UPE-Werte summiert werden. Der resultierende Zahlenwert für die diskrete Summe innerhalb der Integralgrenzen wird als Ergebnis ausgewertet.

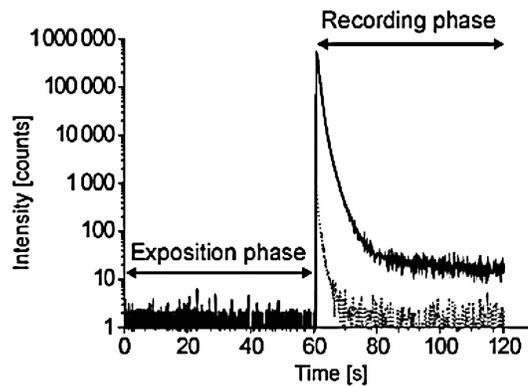


Abbildung 3.24: Typische Abklingkurve eines induzierten UPE-Signals nach 60 s UV-A-Exposition von Schweinehaut. Die Kurve nähert sich über die Zeit der Abklingphase dem Wert der Dunkelzählrate (Expositionsphase) [113]

Für die Bestimmung der UV-A-induzierten UPE im Rahmen dieser Arbeit wurde die UPE nach einer Expositionsphase von 8,0 s über 60 s aufgezeichnet und als ROI die Gesamtemission über 25 s als diskrete Summe bestimmt.

Studienart

Die Studie wurde konzipiert als eine monozentrische, randomisierte, verblindete Wirksamkeitsstudie bei der zwei nahrungsergänzende Präparate gegen ein Placebo verglichen wurden. Analog hierzu wurden drei Kollektive eingeteilt.

Probanden

Durchgeführt wurden die Untersuchungen an freiwilligen Versuchspersonen (Probanden), die vor dem Studienbeginn schriftlich über den Ablauf der Studie unterrichtet wurden und erst nach schriftlicher Vorlage einer Einwilligungserklärung zur Teilnahme berechtigt waren. Rekrutiert wurden gesunde Männer und Frauen im Alter zwischen 28 und 65 Jahren mit einem BMI (Body Mass Index) von 20-30 von denen pro Kollektiv maximal 50 % Raucher sein sollten.

Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme waren:

- Jünger als 28 und älter als 65
- Schwangerschaft oder Stillzeit
- Hauterkrankungen, Wunden, Sonnenbrand, Narben, Behaarung, Tätowierungen, Pigmentierungen oder Muttermale in den Testarealen, so dass die Untersuchung beeinträchtigt sein könnte.
- Einnahme oder Applikation antiallergischer, antibakterieller oder immunsuppressiver Medikamente innerhalb der vorausgegangenen vier Wochen
- Schwere Immunsystemkrankheit wie HIV-Infektion oder Hepatitis
- Allgemeinerkrankung wie Diabetes Mellitus, Herz-Kreislaufkrankungen, Bluthochdruck oder Krebs
- Alkoholkonsum vor Untersuchungsbeginn
- Teilnahme an klinischen Prüfungen innerhalb der vorausgegangenen vier Wochen
- gleichzeitige Teilnahme an anderen, kosmetischen Studien
- Dauerhafte Einnahme von Medikamenten ausser oraler Kontrazeptiva
- Blutgerinnungsstörungen
- Akute Krankheit
- Leistungssportler, die mehr als vier Mal pro Woche intensiv trainierten
- Bekannte Allergie gegen einen der Wirkstoffe

Studiendurchführung

Nach einer zweiwöchigen Präkonditionierung, während derer die Probanden besondere Auflagen bezüglich des Lebenswandels erhielten (siehe Tabelle 5.1.1) wurde zu einem Zeitpunkt t_0 eine basale Messung vorgenommen³⁴.

³⁴ Alle UPE-Messungen wurden unter Standardklimabedingungen in den Räumen der Firma Beiersdorf nach einer fünfzehnminütigen Vorkonditionierung der Haut unter Dunkelraumbedingungen durchgeführt bei $21^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}$, $45\% \pm 5\%$ Luftfeuchtigkeit.

Bestimmt wurden der FORT-Wert und die UV-A-induzierte UPE-Intensität. Als Messareal für die UPE wurde der obere Rücken ausgewählt. Diese Region hatte sich in Vorstudien hierzu als optimal herausgestellt³⁵. Als Überwachungsparameter für Lebenswandel, Ernährungsgewohnheiten und Compliance wurden die Probanden gewogen und bekamen ein Ernährungstagebuch ausgehändigt. Die Messungen wurden nach vier Wochen (t_1) und nach acht Wochen (t_2) wiederholt. Jeweils drei Tage vor den Messterminen und am Messtag selbst sollten die Probanden keine ölhaltigen Reinigungs- und Pflegeprodukte im Bereich der Messareale verwenden und ebenso auf Schwimmbad- und Saunabesuche verzichten. Zu den jeweiligen Messtagen t_1 und t_2 sollten die Prüfmuster wie gewohnt eingenommen werden, wobei darauf geachtet werden sollte, dass zwischen Einnahme und Messung mindestens zwei Stunden lagen.

Tabelle 3.3: Vorschriften für die Vorkonditionierung

Ernährungsvorschrift
keine Vitaminpräparate
keine vitaminangereicherten Bonbons oder Brausetabletten
keine Nahrungsergänzungsmittel
keine starke Sonnenexposition am ganzen Körper
kein Konsum von grünem Tee
kein Konsum von weißem Tee
max. zwei Tassen Kaffee pro Tag
max. zwei Tassen schwarzer Tee pro Tag
max. zwei Gläser Fruchtsaft pro Tag
max. zwei Gläser Wein pro Tag

³⁵ Aus einer Studie mit 10 gesunden Probandinnen im Alter zwischen 24 und 55, bei denen von jeweils vier Arealen auf den Unterarmen und dem Rücken die UV-A-induzierte UPE gemessen wurde, zeigte sich das UPE-Signal auf dem Rücken über die vier Areale als homogener. Die relative Standardabweichung über die vier Areale fiel auf dem Rücken geringer aus, als auf den Unterarmen. Die Ergebnisse sind im experimentellen Teil der Vollständigkeit halber aufgeführt.

Studienziel

Der Antrag an die Freiburger-Ethik-Kommission (feki) beinhaltete die weiter unten erörterte Zielsetzung der Studie. Es wurden drei Ziele in Bezug auf die zwei zu bestimmenden Parameter UPE und FORT-Wert gesetzt:

- **Primäres UPE-Ziel**

Zwischen den Differenzen der UPE-Werte zwischen Zeitpunkten t_2 und t_0 sollte ein signifikanter Unterschied in der Gesamtemission mit Berücksichtigung des Ausgangswertes nachgewiesen werden.

- **Sekundäres UPE-Ziel**

Das Sekundäre Ziel beinhaltete die Vergleiche zwischen den drei Behandlungen (Grünteeextrakt, Rotweineextrakt, Placebo) zum Zeitpunkt t_1 sowie signifikante Unterschiede in der Gesamtemission zum Zeitpunkt t_2 jeweils im Vergleich mit dem Ausgangswert.

- **FORT-Ziel**

Mit dem FORT-Test sollten ebenfalls Unterschiede zwischen den drei Behandlungen (Grünteeextrakt, Rotweineextrakt, Placebo) zu den Messzeitpunkten t_1 und t_2 und signifikante Unterschiede in Bezug auf den Ausgangswert nachgewiesen werden.

Ernährungstagebuch

Während der gesamten Studiendauer sollten die Probanden besondere Ernährungsrichtlinien beziehungsweise Verhaltensrichtlinien einhalten. Diese entsprachen den Vorschriften für die Vorkonditionierung und wurden lediglich um die Einschränkung des Zigarettenkonsums auf maximal 20 pro Tag erweitert.

In Bezug auf die Studienteilnahme galten diese Vorschriften bei nicht Einhalten als Ausschlusskriterien. Die Probanden waren dazu angehalten Ihre Ernährungsgewohnheiten in einem entsprechend vorbereiteten Tagebuch festzuhalten und Abweichungen vom üblichen Lebenswandel, Medikamenteneinnahme, sportliche Aktivitäten, die Einnahme der Testpräparate und besondere Bemerkungen zu dokumentieren.

Präparate

Die Prüfmuster wurden in Form von Weichgelatine kapseln³⁶ an die Probanden ausgehändigt. Die Kapseln enthielten 250 mg eines auf 20% Gesamtcatechine und 2-5% Coffein standardisierten Grünteeextraktes beziehungsweise 200 mg Rotweineextrakt. Letzterer war laut Zertifikat deklariert mit 95% Gesamtpolyphenolen bestimmt bei 280 nm bezogen auf die getrocknete Substanz. Da grüner Tee im Verdacht stand, den Folsäurestoffwechsel in Sinne einer Minderversorgung zu beeinflussen, enthielten alle Präparate inklusive Placebo³⁷ 0,115 mg Folsäure. Ergebnisse, die diesen Verdacht bestätigen wurden kurz nach der Durchführung der Studie veröffentlicht [115]. Täglich sollten zwei Kapseln nach dem Frühstück mit einem Glas Wasser appliziert werden.

3.8.2 Ergebnisse

Vorgesehen waren drei gleich starke Probandenkollektive mit je 50 Teilnehmenden. Nach Suspendierungen aus Gründen der Erfüllung von Ausschlusskriterien oder Verletzung von Studienregeln ergaben sich für die Datenerhebung folgende Konstellationen der Kollektive:

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der Kollektive

Kenngroße	Placebo	Rotwein-Extrakt	Grüntee-Extrakt
Kollektivgröße	49	38	40
Frauen	42	23	30
Männer	7	15	10
Altersspanne	30 bis 65	28 bis 65	31 bis 66
Mittleres Alter	43	44	46
Raucheranteil in %	31	24	37,5
Mittleres Gewicht in kg	72	76	71

³⁶ Für die genaue Formulierung siehe experimenteller Teil

³⁷ Aus Gründen der Vergleichbarkeit

Auswertung

Die drei Kollektive wurden vor den Auswertungen der einzelnen Messzeitpunkte auf ihre Vergleichbarkeit hinsichtlich der Basalwerte von UPE, FORT-Wert und Durchschnittsgewicht der Probanden zum Zeitpunkt t_0 untersucht. Nach der Prüfung der Werte auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilks-Test wurde durch Varianzanalyse die Homogenität der drei Kollektive in Bezug auf die genannten Parameter sichergestellt.

Nachweis der antioxidativen Wirksamkeit

Weder über einen Vorher-Nachher-Vergleich noch über den direkten Verum-Placebo-Vergleich konnte die antioxidative Wirkung der gewählten Extraktformulierungen mit den beschriebenen Methoden anhand der beschriebenen Studie festgestellt werden. Keiner der Parameter UV-A-induzierte Gesamt-UPE und FORT-Wert zeigte einen signifikanten Abfall der Messwerte gegenüber dem Basalwert, der zum Zeitpunkt t_0 erhoben wurde. Keines der drei in der Studienplanung formulierten Ziele konnte somit mit den gewählten Bedingungen erreicht werden. Da für die Realisierung der experimentellen Entwicklung dieser Arbeit die qualitative Aussage über den Ausgang der beschriebenen Studie entscheidend war, wird an dieser Stelle auf die graphische Darstellung der Ergebnisse verzichtet. Sie befindet sich aus Gründen der Vollständigkeit im experimentellen Teil.

Vergleich verschiedener Subkollektive

Im Verlauf der Studie ergab sich eine interessante Entwicklung. Es wurde beobachtet, dass einige Probandinnen besonders hohe FORT-Werte von > 500 [U] zeigten. Wie sich herausstellte, bestand eine Koinzidenz zwischen erhöhten FORT-Werten und der Einnahme oraler Kontrazeptiva und Hormonersatztherapeutika. In einer Studie, an der 15 gesunde Probanden im Alter von 24 bis 54 teilnahmen, wurden die FORT-Werte von Männern ($n=5$) mit denen von Frauen, die keine Medikamente zu sich nahmen ($n=5$) und denen von Frauen, welche regelmäßig orale Kontrazeptiva

applizierten (n=5) verglichen. Die Messungen wurden nach den beschriebenen Bedingungen mit dem Kriterium der Nüchternheit durchgeführt. Ferner wurde darauf geachtet, dass die weiblichen Testpersonen, die ein Hormonpräparat einnahmen sich in einer Einnahmephase, und nicht in einer Pause befanden.

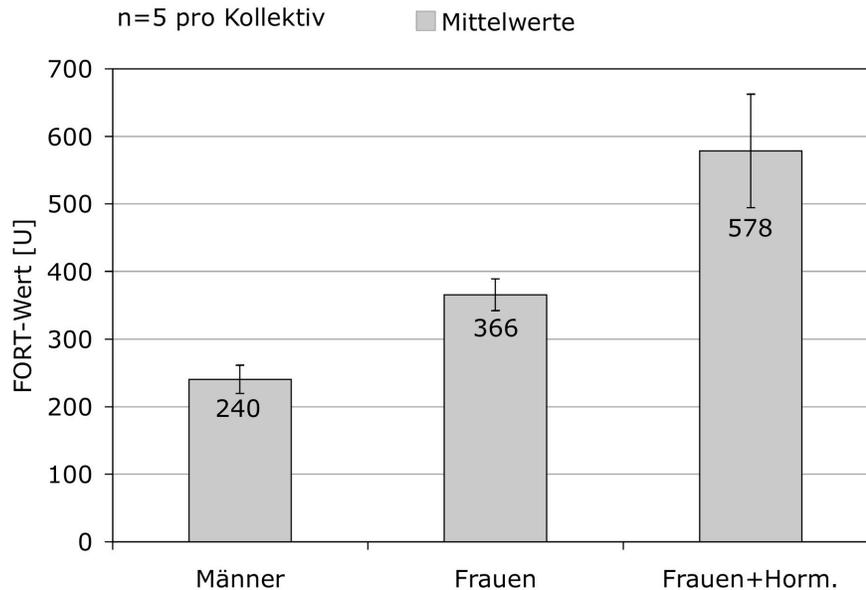


Abbildung 3.25: Vergleich der FORT-Werte von Männern, Frauen, und Frauen, die regelmäßig orale Kontrazeptiva applizieren

Die erhaltenen Daten wurden in einer Varianzanalyse bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % verglichen. Wie aus der Abbildung 3.25 und den im Anhang abgebildeten Einzeldaten ersichtlich wird, unterscheiden sich die gemittelten Werte trotz hoher Standardabweichungen³⁸ für die drei Kollektive signifikant.

3.8.3 Schlussfolgerungen

Die innerhalb der Studie gewählten Methoden führten nicht zu einem zufriedenstellenden Ergebnis. Die Gründe hierfür können von beiden Seiten, den gewählten Studienbedingungen und den vorhandenen Analysenbedingungen begründet werden.

³⁸ Verglichen mit der unter der Methodenpräzision bestimmten Standardabweichung

Studienparameter

In Hinblick auf die Probandenzahl, sowie die anteilmässigen Verhältnisse von Männern zu Frauen, Rauchern zu Nichtrauchern und auch im mittleren Gewicht unterschieden sich die Kollektive. Es wäre möglich, dass diese Unterschiede die Vergleichbarkeit der Ergebnisse für die einzelnen Kollektive einschränkten. Wie sich im Nachhinein herausstellte, war die Probandeninformation, sowie die Transparenz der mitgeteilten Daten seitens zahlreicher Probanden nicht ausreichend. Zahlreiche Studienteilnehmer litten beispielsweise unter Bluthochdruck und nahmen regelmäßig Medikamente ein, bezeichneten sich selbst jedoch als gesund, da sie keine akuten Symptome an sich feststellten. Weitere behandelte Erkrankungen unter den Probanden betrafen Schilddrüsen Über- und Unterfunktion, Diabetes und Asthma. Hieraus resultierten zahlreichen Studienausschlüsse und führten somit teilweise zu den erwähnten, zahlenmässigen Unterschieden. In einigen Fällen musste ausserdem die Authentizität der Ernährungstagebücher und somit der Wahrheitsgehalt und die Disziplin, mit der die Studienregeln eingehalten wurden angezweifelt werden. Dies stellt ein generelles Problem in kosmetischen Studien dar, bei denen Probanden die Prüfmuster unter eigener Verantwortung unbeaufsichtigt applizieren.

Ein weiterer möglicher Grund für das Versagen bezüglich der Zielsetzung innerhalb der Studie stellte die Menge der wirksamen Pflanzenextrakte dar. Mit 500 mg des Grünteeextraktes und 400 mg Rotweineextrakt als tägliche Dosis ergab sich bei den auf den Zertifikaten angegebenen Polyphenolinhalten eine tägliche Einnahmemenge von 100 mg Catechin aus dem Grüntee- und 380 mg Gesamtpolyphenole aus dem Rotweinepräparat. Das Verhältnis der eingesetzten Catechinmengen unterscheidet sich im Vergleich mit einer anderen publizierten Wirksamkeitsstudie zur Untersuchung kutaner Attribute, in der Flavanolzubereitungen eingesetzt wurden, nicht nennenswert [116]. Hier wird eine hohe, flavanolhaltige Dosis (326 mg pro Tag) mit einer niedrigen Dosis (27 mg pro Tag) verglichen. Die Applikationsform unterscheidet sich jedoch stark von der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten. Es handelte sich in der entsprechenden Studie um wässrige Dispersionen von Kakaopulver wodurch ein Freisetzungsschritt der wirksamen Extraktbestandteile nicht erfolgen musste. Dies war jedoch der Fall für die eingesetzten Weichgelatine kapseln. Die Verwendung einer pa-

stösen, lipophilen Zubereitung als Kapselinhalt wie in der vorgelegten Arbeit wird für die Freisetzung im Gastrointestinaltrakt als ungünstig und hinderlich beschrieben [117]. Möglicherweise war die Freisetzung der wirksamen Bestandteile durch die ungünstig gewählte Formulierung derart beeinträchtigt, dass die für eine messbare Wirkung notwendige Plasmakonzentration der Wirkstoffe nicht erreicht werden konnte. Ein weiterer Faktor könnte eine zu kurze Einnahmedauer der Präparate sein. Verglichen mit der bereits erwähnten Studie war die Studiendauer der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie um ein Drittel kürzer, als der zitierte Studienablauf.

Analytikparameter

Auf analytischer Seite stehen die gewählten Methoden möglicherweise als insuffiziente Einflussgrößen. Die Methode der UPE wird routinemässig als Methode zur Beurteilung mit oxidativem Stress assoziierter Prozesse auf der Haut eingesetzt. Sie wird in Bezug auf UV-A-Induktion und zur Beurteilung antioxidativer Effektivität als valide beschrieben [113]. In Bezug auf die Applikation systemisch wirksamer Antioxidantien bestehen hinsichtlich der UPE derzeit noch keine publizierten Daten, so dass an dieser Stelle noch nicht von der Qualifizierung des Systems für die gewünschte Anwendung ausgegangen werden konnte. Da das System während der Studie zuverlässig arbeitete, müsste für den Fall der Annahme, dass die unter den Studienparametern diskutierten Punkte ausgeschlossen werden können, an dieser Stelle davon ausgegangen werden, dass in Bezug auf die UPE-Effekte in Assoziation mit der systemischen Lage des prooxidativ-antioxidativen Gleichgewichtes nicht messbar sind. Die fehlenden positiven Resultate auf der Seite der FORT-Werte indizieren die Insuffizienz des Systems unter den gegebenen Bedingungen einen antioxidativen Effekt anzuzeigen. Diese Aufgabe stellt jedoch einen der Arbeitsbereiche dar, für den der FORT-Test qualifiziert sein soll. Ferner wurde die Sensibilität des Systems gegenüber Antioxidantien durch die Zugabe von Natriumascorbat als Beispielantioxidans belegt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die unter dem Punkt der Studienparameter aufgeführten Einflüsse die ausschlaggebenden Faktoren für die Erfolglosigkeit der durchgeführten Studie darstellten.

Die Tatsache, dass das FORT-System für die in 3.8.2 eingeteilten Kollektive signifikant unterschiedliche Werte lieferte, wird in der publizierten Literatur erwähnt [73]. In dem Artikel von Eckert et al. wird der FORT-Wert mit im Urin gefundenen Werten für 8-iso-PGF2- α der entsprechenden Kollektive verglichen und generell erhöhte Werte für oxidativen Stress für weibliche Testpersonen postuliert. Auch im Benutzerhandbuch des FORT-Tests werden für Frauen, und für Frauen, die Hormone applizieren, höhere oxidative Belastungen beschrieben. Eine eindeutige Erklärung für die besonders hohen FORT-Werte bei Frauen, die weibliche Geschlechtshormone applizieren bleibt offen.

3.9 Validität und Qualifizierung des Fertigttestsystems

Die Ergebnisse der Probandenstudie führten zu der erneuten Betrachtung der bisherigen bekannten Validierungsparameter für den FORT-Test. Anstelle einer weiteren Probandenstudie unter Bestrahlung der Haut wurde das Funktionsprinzip des FORT-Tests eingehender betrachtet. Die Untersuchungen zu Methodenpräzision und Linearität lieferten befriedigende Ergebnisse im Rahmen der Ansprüche, die im gewünschten Rahmen an die Methoden gestellt werden. Die Ergebnisse, die sich aus den Geschlechtervergleichen ergaben, stimmen zwar mit publizierten Daten überein, rechnet man jedoch die erhaltenen Durchschnittswerte anhand des vom Hersteller vorgeschlagenen Faktors in Wasserstoffperoxidäquivalente um, erscheinen die Werte für die erhaltenen Kapillarblutkonzentrationen an Wasserstoffperoxid sehr hoch:

Tabelle 3.5: Wasserstoffperoxidkonzentrationen für die untersuchten Subkollektive

Kollektiv	Wasserstoffperoxidkonzentration in $\frac{mmol}{L}$
Männer	1,83
Frauen	2,78
Frauen unter Hormonbehandlung	4,40

Halliwell et al. zeigten, dass sich Wasserstoffperoxidkonzentration ab bereits $50 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$ auf eine Reihe von humanen Zellen als cytotoxisch erweisen [118]. Demgegenüber steht die Annahme, dass Endothelzellen dazu in der Lage sind, aufgrund von Anpassungsmechanismen höheren Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies zu widerstehen. Diese werden über Signaltransduktionswege, an denen ROS selbst beteiligt sind, gesteuert [119]. Anhand der Untersuchung der Widerstandsfähigkeit von Zellen, die aus der direkten Umgebung der Probennahme, also aus der terminalen Strombahn stammten, sollten die cytotoxischen Auswirkungen von Wasserstoffperoxidkonzentrationen, die den gefundenen Mengen entsprachen festgestellt werden.

3.9.1 Toxizitätsuntersuchungen an humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen

Um zu überprüfen, ob sich die durch den FORT-Test erhaltenen Werte für die mittleren Wasserstoffperoxidkonzentrationen der unterschiedlichen Probandengruppen in realistischen Dimensionen bewegten, wurde ein Modellversuch zur Toxizität entsprechender Wasserstoffperoxidkonzentrationen an humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMVEC³⁹) durchgeführt. Zur Überprüfung der Toxizität der ermittelten Wasserstoffperoxidkonzentrationen wurde an zwei Zelllinien parallel eine Neutralrot Vitalitätsfärbung durchgeführt. Der Neutralrottest basiert darauf, dass in Zellen mit intakter Membranfunktion der bei $pH = 3 - 7,5$ ladungsfreie Phenazinfarbstoff durch Diffusion in das sauren Kompartiment der Lysosomen aufgenommen wird. Durch den dort herrschenden, niedrigen pH von $pH=4,5-5$ wird das Neutralrotmolekül protoniert und kann durch die entstehende Ladung die Membran nicht mehr durch Rückdiffusion in das Cytosol passieren. Dieser Ionenfallenmechanismus führt dazu, dass Zellen, die intakte Lysosomenmembranen besitzen angefärbt werden können wohingegen abiotische Zellen nach dem Fixieren weniger intensiv gefärbt erscheinen [120]. Die Vitalität von Zellen kann so photometrisch durch Absorptionsmessung am Maximum von Neutralrot bei 540 nm bestimmt werden [121].

³⁹ Human microvascular endothelial cells

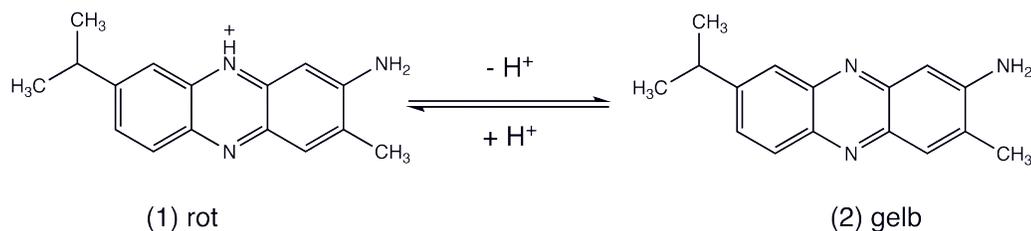


Abbildung 3.26: Neutralrot in der protonierten Form bei $\text{pH} < 4,5$ (1) und in der neutralen Form $\text{pH} > 5$ (2)

Kultivierung humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen (HDMVC)

Die Arbeiten zur kontaminationsfreien Aufzucht der Zellen fanden unter sterilen Bedingungen durch Arbeiten unter dem Laminar Airflow (LAF) statt. Die Zellen wurden in 75 cm^2 -Zellkulturflaschen in Endothelzell-Kulturmedium kultiviert und nach Erreichen neunzigprozentiger Konfluenz passagiert. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt, und die adhärennten Zellen mit 5 ml HEPES/BSS⁴⁰ gewaschen. Im nächsten Schritt wurde mit 5 mL Trypsin/EDTA bei 37° und 7 % CO_2 für fünf bis zehn Minuten inkubiert, bis alle Zellen von der Flaschenwand abgelöst waren. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 5 mL TNS-Lösung (TNS: Trypsin Neutralizing Solution) beendet und die Zellsuspension in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wurde für 10 Minuten bei $1200 \frac{\text{U}}{\text{min}}$ zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in ca. 15-20 mL Kulturmedium suspendiert und in die nächst größere Kulturflasche überführt. Die Zellzahlbestimmung vor Aussaat zur Testung erfolgte nach Anfärben mit Trypanblau in einer Neugebauerzählkammer.

⁴⁰ Eine Standard-Pufferlösung (BSS: Basal-Salt-Solution) aus HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

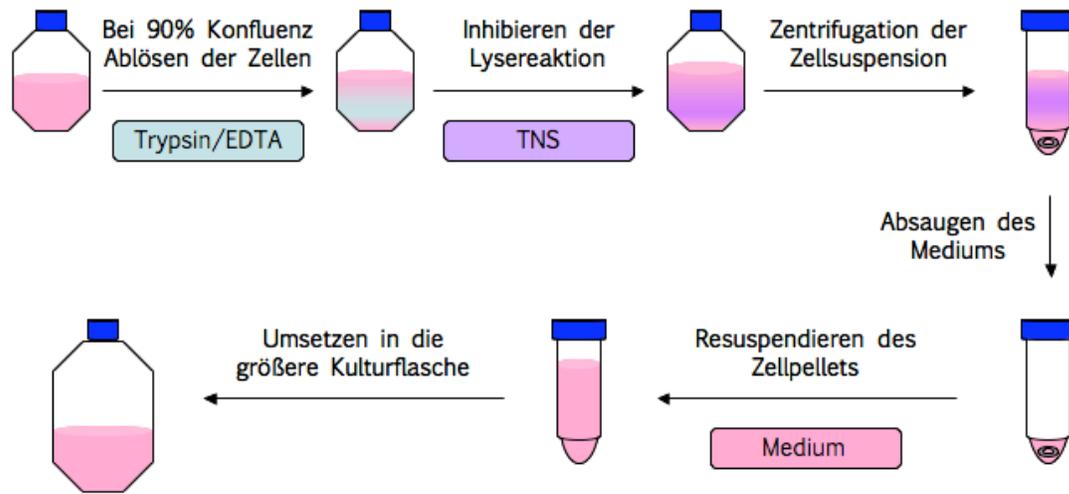


Abbildung 3.27: Schema zum Passagieren während der Zellaufzucht von HDMVC-Linien

Toxizitätsuntersuchungen

Für die Untersuchungen der Toxizität der aus den voraus gegangenen Versuchen erhaltenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen gegenüber HDMV-Zellen wurden $1 \cdot 10^4$ Zellen pro Kavität auf kollagenbeschichteten 96-Loch-Platten in Kulturmedium ausgesät und über Nacht bei 37° und 7 % CO_2 kultiviert. Die Zellen wurden mit $100 \mu\text{L}$ PBS gewaschen und im Anschluss für 30 min mit $100 \mu\text{L}$ der jeweiligen Wasserstoffperoxidlösung⁴¹ bei Raumtemperatur inkubiert. Um ein Überdampfen auf die unbehandelte Kontrollkultur⁴² auf derselben Platte zu verhindern, wurden die Platten mit Schutzfolien abgeklebt. Nach dem Ausschlagen erfolgte die Zugabe von $100 \mu\text{L}$ Neutralsrotlösung mit anschließender Inkubation bei 37°C für 2,5 Stunden. Die Färbelösung wurde durch Ausschlagen entfernt und die Zellen dreimal mit jeweils $150 \mu\text{L}$ PBS gewaschen. Im Anschluss wurde durch Versetzen der Zellen mit $150 \mu\text{L}$ essigsaurer Alkohollösung, 10 minütiges Schütteln und 15 minütiges Inkubieren bei Raumtemperatur fixiert und die Absorption der Kavitäten bei 540 nm spektralphotometrisch bestimmt.

⁴¹ Alle Wasserstoffperoxidlösungen wurden durch Verdünnen mit PBS anstelle von Kulturmedium hergestellt um die Oxidation von Mediumbestandteilen zu verhindern.

⁴² Anstelle der Wasserstoffperoxidlösungen wurden die unbehandelten Zellen mit $100 \mu\text{L}$ PBS versetzt.

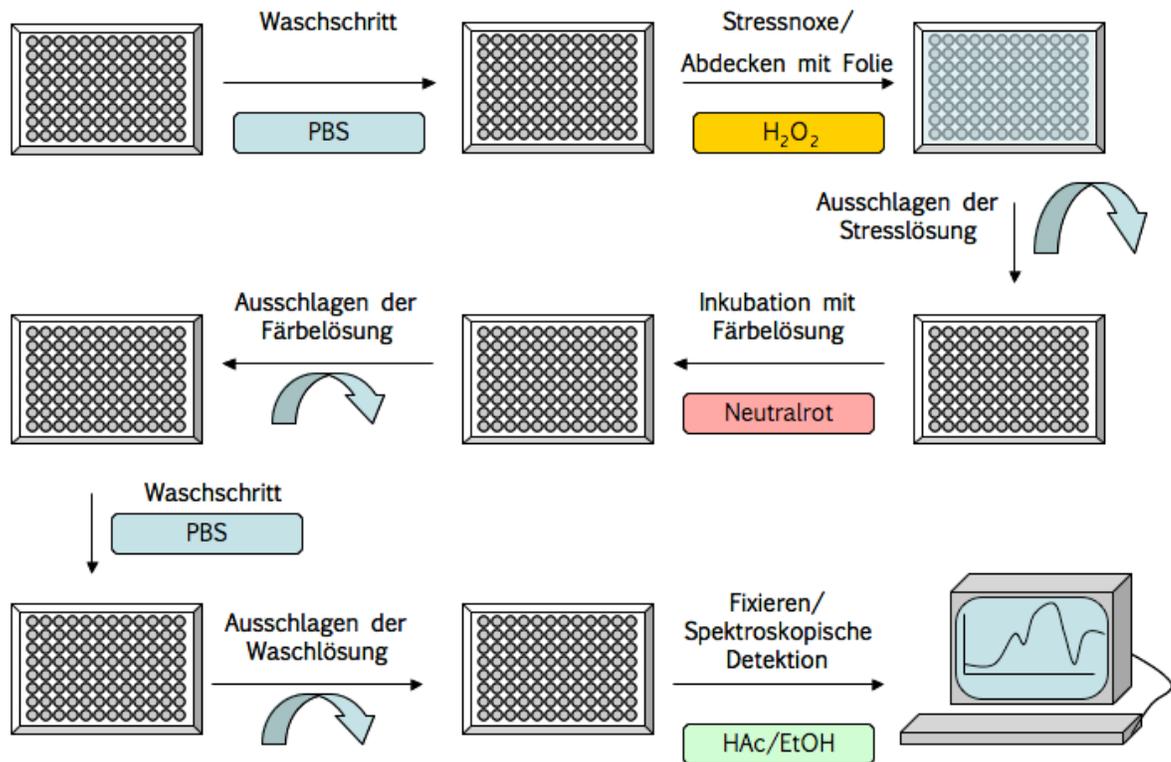


Abbildung 3.28: Schema zur Neutralrot-Vitalitätsfärbung nach der Behandlung der HDMV-Zellen auf kollagenbeschichteten 96-Loch-Platten mit Wasserstoffperoxid

Abbildung 3.29 zeigt die Ergebnisse für die Behandlung der zwei Zellreihen mit drei verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen. Letztere orientierten sich an den Werten, die für die mittlere Wasserstoffperoxidkonzentration aus den Mittelwerten für die drei verschiedenen Kollektive aus 3.8.2 ermittelt wurden. Zum Einsatz kamen die Lösungen A, B und C mit $c_A = 1,5 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$, $c_B = 2,5 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ und $c_C = 4,0 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ H_2O_2 in PBS. Aus diesen Vergleichen ging hervor, dass die verwendeten Konzentrationen an Wasserstoffperoxid die Vitalität der HDMV-Zellen konzentrationsabhängig innerhalb von 30 Minuten um einen Faktor von bis zu 75 % (Spender I Konzentration C) herabsetzten. Spender II widerstand in den durchgeführten Versuchen der Belastung durch Wasserstoffperoxid augenscheinlich besser, als Spender I.

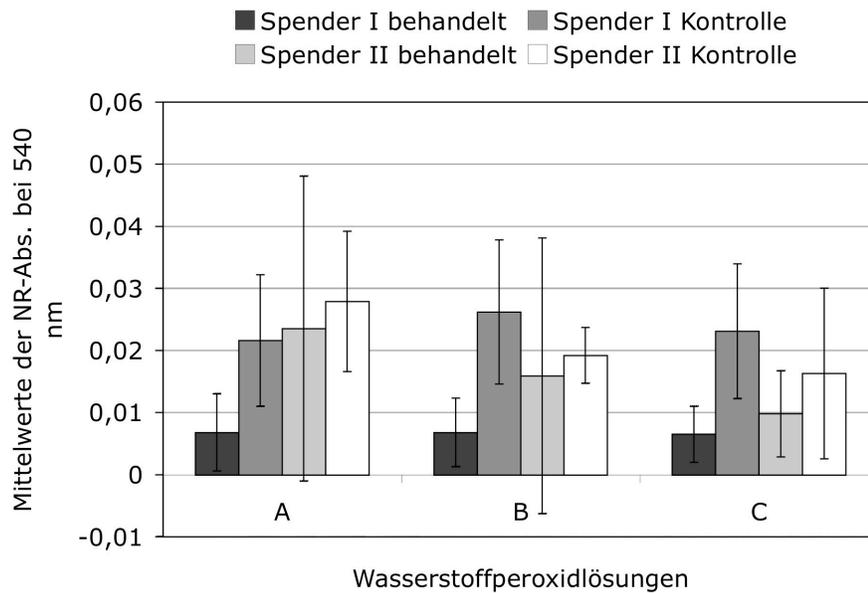


Abbildung 3.29: Vergleich der Vitalität von H_2O_2 -gestressten HDMV-Zellen mit einer unbehandelten Kontrolle bei den Konzentrationen A, B und C entsprechend 1,5; 2,5 und 4,0 $\frac{mmol}{L}$ H_2O_2

Jedoch zeigte sich auch innerhalb dieser Zelllinie eine konzentrationsabhängige Senkung der Zellvitalität von 16-40 % je nach verwendeter Stressorlösung. Die Ergebnisse entsprechen somit den bereits erwähnten Befunden bezüglich der Höhe der schädlichen Wirkung von Wasserstoffperoxid auf humane Zellen [118].

3.9.2 Einfluss von Hormonpräparaten auf den FORT-Wert

Einfluss unterschiedlicher hormonhaltiger Fertigarzneimittel

Um den Einfluss von Hormonpräparaten auf die Höhe des FORT-Wertes zu klären, wurden verschiedene gängige Präparate mit unterschiedlichen Estrogen-Gestagen Kombinationen in wässriger PBS-Lösung als Testlösung verwendet.

Die Auswahl fiel anhand der in der Probandenstudie von Probanden erwähnten, verwendeten fünf Fertigarzneimittel auf Valette®[®], Diane 35®[®], Bella Hexal 35®[®], Climopax®[®] und Petibelle®[®]. Hierzu wurde ein Dragee beziehungsweise eine überzogene Tablette des jeweiligen Präparates in PBS zu 100,0 mL gelöst. Von diesen Lösungen wurden 20 μ L als Testlösung verwendet. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Entgegen der üblichen Vorgehensweise in Bezug auf die Auswertung von FORT-Test-Daten wurde für die Darstellung der gewonnenen Daten kein Blindwert abgezogen, sondern die gemessenen Werte dem Blindwert gegenübergestellt. Für den Blindwert wurde wiederum PBS als Testlösung verwendet.

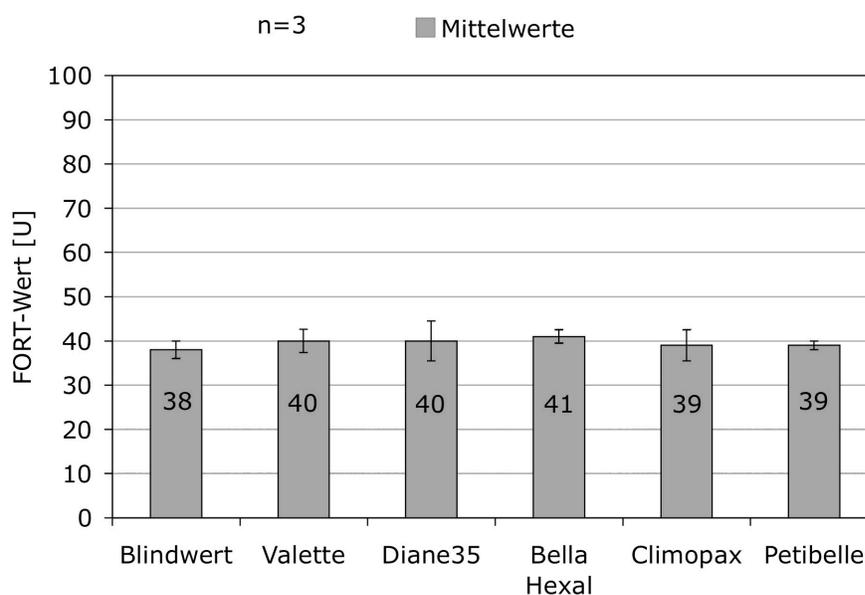


Abbildung 3.30: Vergleich des Einflusses verschiedener Hormonpräparate in wässriger PBS-Lösung auf den FORT-Wert

Für keines der zugesetzten Hormonpräparate konnte in den eingesetzten Lösungen ein signifikanter Einfluss auf den FORT-Wert nachgewiesen werden.

Langzeitversuche zur Untersuchung hormoneller Einflüsse

Da kein Einfluss durch eine wässrige Lösung eines, hormonellen Fertigpräparates auf die Höhe des FORT-Wertes nachweisbar war, wurde der Einfluss der Hormonapplikation über längere Zeit *in vivo* untersucht.

Hierzu wurde von einer gesunden Probandin, die ein Präparat zur oralen Kontrazeption⁴³ schon über mehrere Jahre einnahm über einen Zeitraum von 12 Wochen mindestens dreimal wöchentlich ein FORT-Wert aufgenommen. In der 13. Woche wurde die Medikation abgesetzt und nach einer dreimonatigen Auswaschphase erneut mindestens dreimal wöchentlich ein FORT-Wert bestimmt. Während der gesamten Dauer der Studie wurden keine Nahrungsergänzungsmittel, sowie vitamin-angereicherte Lebensmittel konsumiert und keine Umstellung im Lebenswandel bezüglich Ernährung⁴⁴, sportlicher Betätigung⁴⁵ und Zigaretten sowie Alkoholkonsum⁴⁶ vorgenommen. Krankheit und Menstruation wurden dokumentiert. Abbildung 3.31 zeigt den Verlauf der FORT-Werte über die Studiendauer.

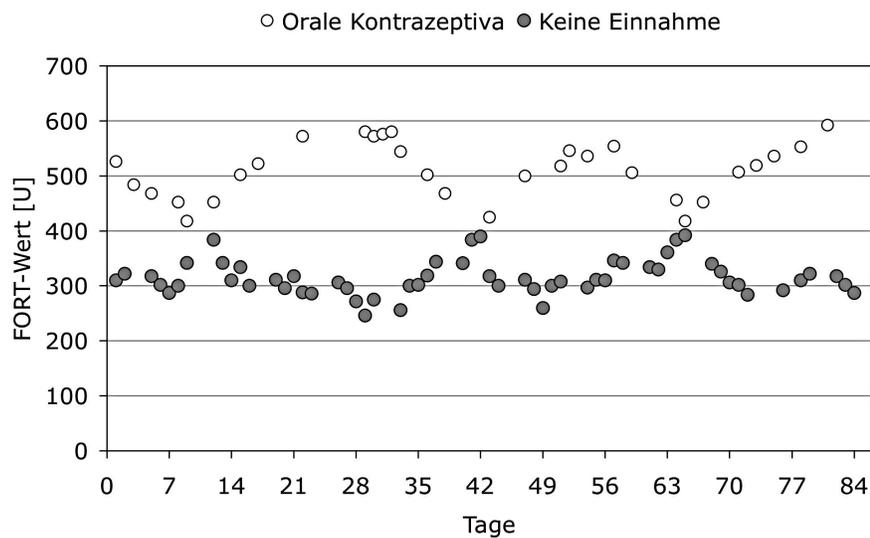


Abbildung 3.31: Beobachtung der FORT-Werte über einen Zeitraum von 12 Wochen unter Applikation von 3 mg Drospirenon in Kombination mit 0,03 mg Ethinylestradiol und ohne Medikation.

⁴³ Petibelle®

⁴⁴ Keine besonders balanzierten Ernährungsprogramme im Sinne einer Diät.

⁴⁵ Regelmäßiges, leichtes Training zweimal wöchentlich. Es wurde kein intensiviertes Training betrieben.

⁴⁶ Kein regelmäßiger Konsum

Der erste Messtag beider 12-Wochen-Messzyklen begann mit dem ersten Tag des Zyklus. Die turnusmäßig auftretenden Abfälle der FORT-Werte beziehungsweise die nahezu exakt antizyklischen Anstiege derselben während der Einnahmepausen des Hormonpräparates zeigen eine starke Abhängigkeit zwischen FORT-Wert und der Einnahme des Kontrazeptivums. Es ergab sich für die FORT-Werte unter Einnahmebedingungen ein Mittelwert von $\bar{x}=511$ gegenüber einem Mittelwert von $\bar{x}=316$ im medikationsfreien Messzeitraum.

Da für die Datenerhebung lediglich eine einzelne Testperson zur Verfügung stand, wurde zur Verifizierung der unter Hormoneinfluss durchgeführten Langzeitmessung die Einnahme des Präparates wieder aufgenommen, und das Verhalten des FORT-Wertes wiederum über sechs Wochen beobachtet. Auch für diesen Zeitraum galten die bereits genannten Umstände für den Lebenswandel der Probandin.

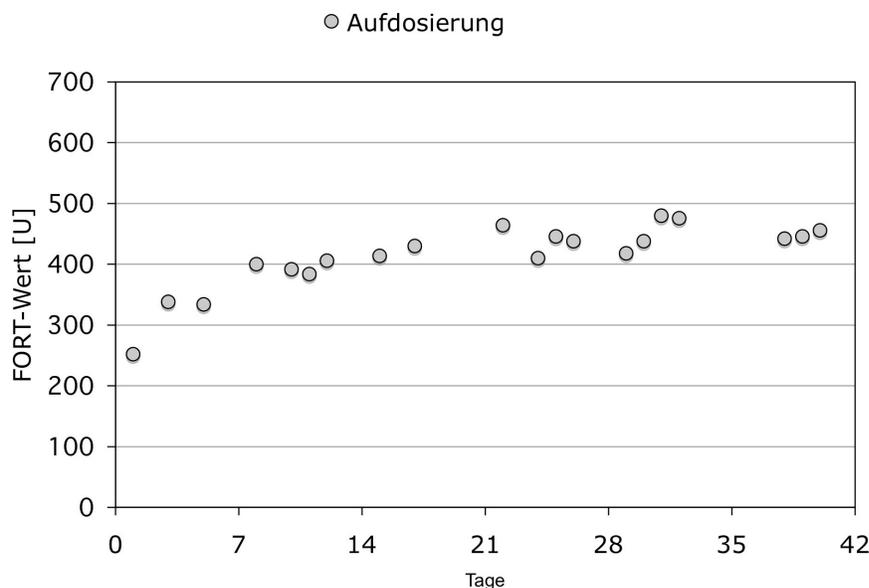


Abbildung 3.32: Beobachtung der FORT-Werte über einen Zeitraum von 6 Wochen unter Applikation von 3 mg Drospirenon in Kombination mit 0,03 mg Ethinylestradiol.

Wie aus Abbildung 3.32 eindrucksvoll hervorgeht, stiegen die FORT-Werte über den Zeitraum der sechswöchigen Einnahme des Präparates Petibelle® wieder auf einen Wert von 456 [U] gegenüber einem Ausgangswert von 252 [U] an.

Enzymatische Einflüsse

Die Ergebnisse der Untersuchung zum Einfluss des weiblichen Hormonzyklus auf den FORT-Wert führten über die Suche nach physiologischen Plasmabestandteilen, die mit weiblichen Geschlechtshormonen assoziierten Plasmaspiegelschwankungen unterliegen, zu der näheren Betrachtung des Caeruloplasmins.

Caeruloplasmin ist am Kupfermetabolismus beteiligt und gehört zur α_2 -Globulinfraktion. Es wird hauptsächlich von der Leber gebildet und in das Plasma sezerniert. Weitere Orte der Biosynthese sind die Lunge und das Gehirn [122]. Die Hauptaufgabe des Caeruloplasmins besteht in der Versorgung kupferbedürftiger Zellen. Es trägt bis zu sieben Kupferionen mit sich, die durch Bindung an einen Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle teilweise durch endocytotische Vorgänge übertragen werden. Ferner besitzt Caeruloplasmin zahlreiche, enzymatische Aktivitäten. Aufgrund seiner Eigenschaften als multipotente Oxidase für verschiedene Substrate wird das Protein auch unter der Bezeichnung Ferroxidase im Zusammenhang mit dem Eisenstoffwechsel erwähnt. Weitere Aktivitäten, die Caeruloplasmin zugeschrieben werden betreffen die Oxidation von Ascorbinsäure, von verschiedenen organischen Substraten und Stickstoffmonoxid, sowie die Betätigung als enzymatisches Antioxidanz [123, 124, 125, 126].

Durchschnittliche Plasmaspiegel betragen für Caeruloplasmin durchschnittlich 200-300 $\frac{mg}{L}$. Diese können aufgrund der Zugehörigkeit des Proteins zu den Eiweißen der akuten Phase unter Entzündungsbedingungen, Gewebsverletzung oder Leberstoffwechselstörungen ansteigen. Auch in der Schwangerschaft, sowie unter der Einnahme oraler Kontrazeptiva werden teilweise sehr stark erhöhte Caeruloplasminspiegel beobachtet [127, 128, 129]. Weitere Enzyme, die im Zusammenhang mit weiblichen Sexualhormonen beschrieben und in Korrelation mit dem FORT-Wert sogar teilweise untersucht sind, sind unter anderem Superoxiddismutase (SOD) und Katalase.

In dem folgend beschriebenen Experiment wurden die Enzyme Caeruloplasmin, sowie SOD und Katalase hinsichtlich ihres Einflusses auf die FORT-Reaktion überprüft. Untersucht wurde der Einfluss der genannten Enzyme in verschiedenen Konzentrationen. Für die Herstellung der Testlösungen wurden entsprechende Lösungen der Enzyme direkt vor der Messung durch Verdünnung einer Stammlösung mit PBS hergestellt.

Die Stammlösungen wurden am Morgen des Messtages jeweils frisch bereitete und über den Tag bei -18°C gelagert. Für jedes Enzym und jede Konzentration wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Weder für SOD, noch für Katalase konnte ein Einfluss auf den FORT-Wert nachgewiesen werden. Der steigende Effekt der Caeruloplasminlösungen ist deutlich zu erkennen. Ein signifikanter Einfluss konnte in dieser Untersuchung ab der Konzentration von $250 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$ nachgewiesen werden.

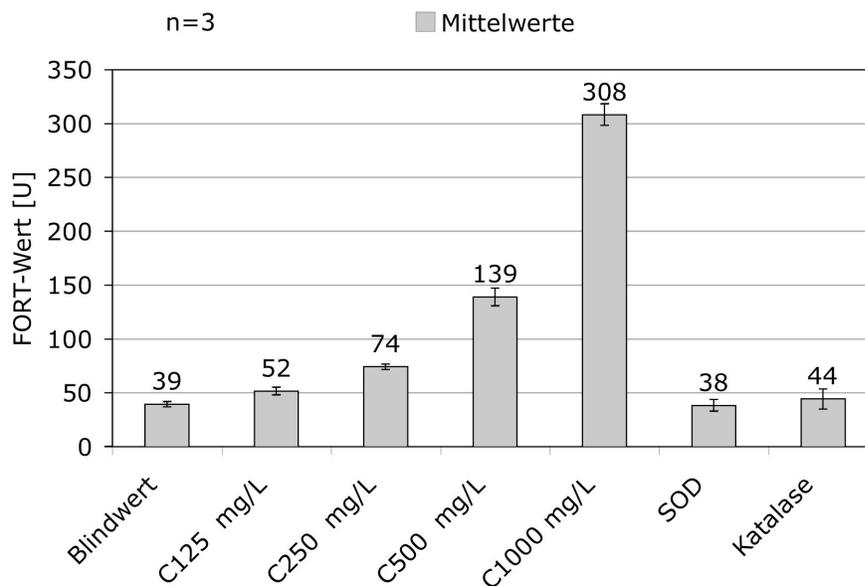


Abbildung 3.33: Einfluss der Enzyme Ferroxidase (Caeruloplasmin), SOD und Katalase auf den FORT-Wert

3.10 Abschließende Betrachtung zum FORT-Test

Die unter der Analyse der Zusammensetzung des Systems und der Überprüfung der farbgebenden Mechanismen erhobenen Daten decken sich mit den vom Hersteller postulierten Daten zur Arbeitsweise der FORT-Reaktion. Die gefundenen Bestandteile in Puffer und Chromogen sind prinzipiell in der Lage, abhängig vom Redoxpotential einer zugesetzten Testlösung eine photometrisch verfolgbare Färbung zu generieren, welche unter Beteiligung einer radikalischen Spezies entsteht. Diese könnte dem postulierten Wurster-Salz aufgrund der Attribute der beobachteten ESR-Spektren durchaus entsprechen.

Die Aussage, dass der Eisengehalt einer Testlösung keinen Einfluss auf das Ergebnis des FORT-Wertes hat, konnte nicht eindeutig belegt werden. Da jedoch in der Chromogenküvette die Gegenwart von Eisenionen nachgewiesen wurde, wäre es denkbar, dass bei einer ausreichend hohen Konzentration derselben das Gleichgewicht der Reaktionen, die zur Bildung der gefärbten Radikalkations führen sollen im Sinne des Prinzips von Le Chatelier auf die Seite der Produkte verschieben, sodass die Geschwindigkeit der ablaufenden Reaktionen lediglich von der Menge der in der Probe enthaltenen Peroxidäquivalente abhinge. Somit wäre die Aussage über einen fehlenden Einfluss des Haematokritwertes gerechtfertigt.

Einen weiteren denkbaren Einflussfaktor auf die Bildungsgeschwindigkeit der farbigen Komponente stellt die bislang nicht geklärt hohe Osmolarität der Pufferlösung dar. Da auch die Ionenstärke eines Lösungsmittels die in ihr ablaufenden Reaktionen beeinflussen kann und diese im Zusammenhang dieser Arbeit nicht untersucht wurden, bleibt ein Teil der tatsächlichen Reaktionsmechanismen ungeklärt.

Die vorläufigen Ergebnisse zu Validierungsparametern in Form von Präzision und Linearität lieferten zufriedenstellende Ergebnisse. Mit dem erhaltenen Korrelationskoeffizienten für die Kalibrierung mit Wasserstoffperoxid und der Präzision im Sinne eines Variationskoeffizienten unter Wiederholbedingungen von 3 % bewegten sich diese Daten in Bereichen der Ansprüche, die im Rahmen der Methodvalidierung nach GMP-Richtlinien an analytische Systeme zur Qualitätssicherung von Arzneistoffen

und Qualitätskontrolle von Arzneimitteln gestellt werden [130]. Auch die Angaben des Herstellers wurden durch diese Messreihen bestätigt.

Das analytische Versagen des Systems innerhalb der Probandenstudie unter gleichzeitiger Verwendung der UPE ist -wie an entsprechender Stelle besprochen- wahrscheinlich hauptsächlich auf ungünstig gewählte Studienbedingungen bezüglich der Probandenkollektive und der Wahl der zu applizierenden Zubereitungen zurückzuführen. Sowohl das Prinzip des dRoms-Tests und die Verwendung von N,N-Diethyl-p-phenylendiamin als chromogene Komponente, als auch der FORT-Test wurden bereits für die erfolgreiche Testung von antioxidativer Aktivität publiziert [131, 132, 133].

Die hinsichtlich der Höhe gefundenen Divergenzen des FORT-Wertes zwischen den Subkollektiven von Männern, Frauen und Frauen, die unter Behandlung mit hormonellen Präparaten stehen, stimmen mit publizierten Literaturdaten überein. Vielfach werden Geschlechterunterschiede im Zusammenhang mit Konzentrationen von Biomarkern für Oxidativen Stress beschrieben, jedoch sind die Aussagen dazu, ob Männer oder Frauen unter einer höheren oxidativen Belastung leiden nicht einheitlich [133, 134, 135]. Speziell für die geschlechtsspezifische Höhe von Hydroperoxid- und Peroxidkonzentrationen im Plasma werden sogar widersprüchliche Aussagen getätigt. So berichten Ahrends et al. von höheren Werten dieser ROS für Proben von weiblichen Testpersonen [136], wohingegen Lacy et al. mittels elektrochemischer Analyse zu gegensätzlichen Ergebnissen kommen [137]. Der in diesem Zusammenhang diskutierte Einfluss des Estrogens wurde bereits an anderer Stelle erwähnt⁴⁷.

Die starken Unterschiede zwischen den einzelnen Kollektiven zeigen, dass die Auswertung der FORT-Werte gemischter Kollektive nicht ohne detaillierte Betrachtung der Studienteilnehmer erfolgen sollte. Aus den Langzeitversuchen zur Beobachtung des individuellen FORT-Wertes über mehrere Wochen geht ausserdem hervor, dass zumindest für weibliche Probanden teilweise starke individuelle Schwankungen zu berücksichtigen sind, welche bei nicht Beachtung zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen bezüglich des FORT-Wertes führen können.

⁴⁷ Siehe enzymatische Einflüsse auf die FORT Reaktion

Seit 2007 wird im Benutzerhandbuch des Herstellers zum FORT-Test angegeben, dass dieser nicht als Absolutwert angesehen werden kann, sondern lediglich in Bezug zu einem individuellen Vergleichswert gesehen werden sollte. Trotz dieser Aussage bleibt dennoch die Frage offen, welche Höhe von Werten als Normalwerte angesehen werden können, da nach wie vor Vergleichswerte und Intervalle zur Einstufung der Stress-Niveaus anhand von Zahlenwerten angegeben werden.

Da allein durch die Oxidation aufgrund in der Testflüssigkeit gelösten Sauerstoffes beziehungsweise durch Autoxidation der Chromogensubstanz NNEIPPDA-HCl ein Blindwert von 38 [U] erreicht wird, muss davon ausgegangen werden, dass die Substanz nicht selektiv geschweige denn spezifisch von ROS oxidiert wird, die aus Hydroperoxiden und Peroxiden durch die Umsetzung unter Fenton-Bedingungen hervorgehen. Vielmehr ist anzunehmen, dass an der Oxidation zum gefärbten Wurster-Farbstoff unspezifische Oxidationsmechanismen jeglicher Art beteiligt sind. Somit ist die Aussage, dass durch das beschriebene Testsystem der Hydroperoxid- beziehungsweise Peroxidspiegel im menschlichen Blut bestimmt werden fraglich, wenn nicht sogar unhaltbar. Auch die Anwendbarkeit der externen Kalibrierung über Wasserstoffperoxid als Stellvertreter für die Gesamtheit der oxidativen Mechanismen, die zur Bildung der gefärbten Verbindung führen ist dementsprechend fraglich.

Der nachgewiesene Einfluss von Caeruloplasmin auf die FORT-Reaktion deckt sich mit der von Harma veröffentlichten Arbeit zu der Thematik, dass das Chromogen NNEIPPDA-HCl als aromatisches Amin ein Substrat für die Aminoxidaseaktivität des Caeruloplasmins darstellt [138]. Die als Basis für Entwicklung des FORT-Test verwendeten Mechanismen des dROM-Testes fußen auf der Verwendung des N,N-Diethyl-p-phenylendiamins, welches hier aufgrund der Bildung des klassischen Wurster-Kations aus N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin zum Einsatz kam. Dieses wiederum stellt ein ausgewiesenes Substrat für Caeruloplasmin dar [139] und kann bei sauren pH-Werten, die dem Bereich der FORT-Reaktion entsprechen, sogar zur photometrischen Aktivitätsbestimmung des Enzyms herangezogen werden [140]. Durch die Reaktion mit Caeruloplasmin könnte demnach aus NNEIPPDA-HCl die farbgebende Struktur gebildet werden und dadurch einen zu hohen Wert für die Lage des oxidativen Gleichgewichtes suggerieren.

An dieser Stelle muss in Betracht gezogen werden, dass die Bestimmung eines einzelnen Wertes für eine repräsentierende „Fingerprint-Substanz“ aus einem komplexen Gleichgewicht, wie es die Gesamtheit aller Prozesse, die zum prooxidativ-antioxidativen Gleichgewicht Beitrag leisten, nicht optimal ist. Wie an dem Beispiel des Einflusses von Caeruloplasmin ersichtlich wird, kann es als kritisch angesehen werden anhand eines einzelnen Wertes eine Aussage über die Lage des Gleichgewichtes zu machen, da die Höhe der Konzentration der „Fingerprint-Substanz“ im Quasi-Steady-State von der individuellen Konstellation der übrigen am kinetischen Geschehen beteiligten Einzelsysteme abhängig ist.

4 Entwicklung des ESR-Ascorbyl-Assays

4.1 Anforderungen an ein Testsystem mit der gewünschten Aussagekraft

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit dem FORT-Testsystem führten zu einer grundlegenden Neuerwägung der gewünschten Arbeitsweise und Aussagekraft eines Systems zur Bestimmung von ROS in menschlichem Kapillarblut. In diesem Zusammenhang wurde es als entscheidender Nachteil angesehen, zur Aussage über den potentiell schädigenden Einfluss einer UV-A-Bestrahlung auf das systemische Kompartiment an dem eingangs beschriebenen Gleichgewichtsgeschehen lediglich eine einzelne quantitative Bestimmung durchzuführen. Es wurden Überlegungen angestellt, mit dem Ziel ein analytisches System zu konstruieren, welches möglichst nah am Optimum der gewünschten Eigenschaften arbeitet. Die unterschiedlichen Anforderungen ergaben sich aus den verschiedenen Blickwinkeln, aus denen Ansprüche an das System erhoben werden können. Hierzu wurden drei Bereiche festgelegt, in denen Erwartungen an ein zu entwickelndes Testsystem formuliert wurden. So sollten möglichst günstige Eigenschaften für folgende Bereiche erzielt werden:

- praktische Durchführbarkeit
- analytische Arbeitsweise
- Aussagekraft

Aus diesen Anspruchsfeldern ergaben sich konkrete Forderungen:

4.1.1 Praktische Durchführbarkeit

Damit die Anwendung eines Testsystems unter dem Einsatz humanen Blutes durch nicht-medizinisches Personal¹ an Probanden zum Einsatz kommen konnte, war es notwendig, dass Kapillarblut als Probe eingesetzt wurde. Die Entnahme von venösem Vollblut im Umfang größerer Aliquote ist lediglich speziell geschultem Personal gestattet, da dieser Eingriff der Blutgewinnung unter das Transfusionsgesetz fällt. Ein entscheidender limitierender Faktor bei der Entwicklung eines Analysensystems zur Anwendung am Probanden im Rahmen kosmetischer Studien stellte also die Art der Probennahme² und die hiermit zusammenhängende maximale Probenmenge dar. Letztere wird begrenzt durch die Viskosität des Blutes, beziehungsweise durch den Öffnungsgrad der Anastomosen an der Entnahmestelle, sowie die Geschwindigkeit der Blutgerinnung und des Wundverschlusses nach der Punktion [141]. Die Anwendung von Kapillarblut ist ausserdem von Vorteil, da ohne hohen Leidensdruck für den Probanden leicht Mehrfachentnahmen möglich sind.

4.1.2 Analytische Arbeitsweise

Aus analytischer Sicht ist es günstig eine Untersuchung so nah am Quasi-Steady-State-Geschehen anzustellen, wie möglich. Dies gilt sowohl für die Zeitnähe der Bestimmung, als auch für die Genuinität in Bezug auf den Analyten. Diese Punkte sind insbesondere von großer Bedeutung für die Beurteilung eines komplexen Geschehens wie die Verschiebung des Fließgleichgewichtes im Rahmen prooxidativer und antioxidativer Vorgänge in einem vitalen Organismus. Besonders wenn im Rahmen des Gleichgewichtsgeschehens die zu großen Teilen für die resultierenden Schädigungen verantwortlichen Intermediate³ mitunter eine sehr kurze Lebensdauer und hohe Reaktivität aufweisen. Daher sollten bei der Entwicklung eines Assays Derivatisierungen, vorgelagerte oder nachgeschaltete Indikatorreaktionen, sowie aufwändige Probenaufbereitung vermieden werden. Gesucht wurde nach einer Möglichkeit einen Marker zu identifizieren, der selektiv, spezifisch und im Optimalfall direkt, also ohne umfassende Aufbereitung aus der Probenmatrix bestimmt werden konnte.

¹ Studiendurchführende

² Minimalinvasiv

³ ROS

4.1.3 Einheiten

Wie schon weiter oben erwähnt wurde ist es nicht einfach, eine valide Aussage über den Status der Lage des oxidativen Gleichgewichtes anhand eines einzelnen Wertes zu treffen oder sogar Normwerte oder Referenzintervalle für diesen einzelnen Wert festzulegen. Die zur Verbesserung dieses Umstandes angestellte Überlegung zielte darauf ab, dass eine Aussage bezüglich einer Einzelbestimmung innerhalb des angenommenen Quasi-Steady-State (QSS) -Geschehens einen höheren Aussagewert erhalten könnte, wenn der durch einwirkendes, prooxidatives Geschehen entstandene Analyt im Verhältnis zu der Menge seiner reduziert vorliegenden Muttersubstanz betrachtet werden könnte.

Das Argument innerhalb eines Fließgleichgewichtes durch eine einzelne Konzentrationsmessung keine Aussage über die individuelle Lage des Gleichgewichtes machen zu können besteht zwar weiterhin, jedoch wäre anhand eines Vergleiches dieser Art eine Abschätzung möglich, inwieweit antioxidative Systeme durch das Auftreten oxidativer Vorgänge im Augenblick der Probennahme beeinflusst vorliegen. Die Betrachtung des QSS-Geschehens fände somit sowohl auf der Seite der Antioxidantien, als auch im Bereich der Intermediate durch eine einzelne Messung statt.

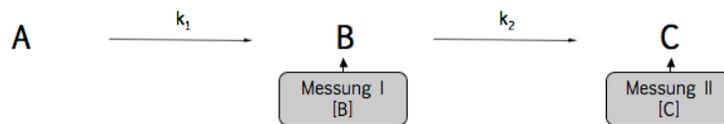


Abbildung 4.1: Die Messung zweier Parameter führt zu den Konzentrationen der reaktiven Intermediate und der am Abbau von B beteiligten Muttersubstanz C.

Durch zwei Messungen, zwischen denen ein Ereignis liegt, durch welches prooxidative Mechanismen innerhalb des Fließgleichgewichtes promoviert werden können, wäre eine Aussage bezüglich der an der Generierung des Analyten beteiligten prooxidativen Vorgänge beziehungsweise deren Abhängigkeit von der zwischen den Messungen induzierten Noxe möglich. Das Ergebnis einer entsprechenden Messung wäre der durch die zuvor beschriebene Messabfolge zu bilden mögliche Quotient $Q = \frac{\text{Analyt}}{\text{Muttersubstanz}}$, auf die Gleichung in Abbildung 4.1 angewandt $Q = \frac{[B]}{[C]}$, oder $Q = \frac{[Ox]}{[Red]}$ dessen Größe, beziehungsweise dessen numerische Veränderung nach einer einwirkenden, prooxidativen Noxe, eine Aussage darüber möglich macht, in welchem Ausmaß oxidative Veränderungen eingetreten sind.

Die Genauigkeit, mit der eine entsprechende, prooxidative Reaktion determiniert werden kann hinge davon ab, wie komplex sich das Geschehen zur Bildung des Analyten zusammensetzt. Wünschenswert wäre ein Analyt entsprechend einem Redoxsystem, in dem die Oxidation von einer möglichst diskreten Menge oder Art oxidativ wirkender Agentien verursacht wird.

4.1.4 Wahl des analytischen Systems

Die Wahl für das zu entwickelnde Testsystem fiel auf die quantitative Bestimmung des aus Ascorbinsäure durch Einelektronenübertragung oxidativ entstehende Ascorbylradikal mittels Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR⁴).

Im Folgenden sollen zunächst die Gründe für die Wahl der Methode erläutert werden. Da es sich bei der ESR-Spektroskopie - wie schon bei der UPE - um ein für die klassische pharmazeutische Analytik im Rahmen der Arzneibücher eher untypisches Analysenverfahren handelt, werden die grundlegenden Prinzipien, sowie die Arbeitsweise gesondert und ausführlich im Anschluss besprochen.

Praktische Durchführbarkeit einer ESR-Messung

Die ESR-Spektroskopie stellt eine Methode dar, mit der freie Radikale direkt nachgewiesen werden können, wenn diese eine ausreichende Lebensdauer besitzen.

⁴ Engl. EPR für Electron Paramagnetic Resonance

ESR-Bestimmungen hängen nicht von den optischen Eigenschaften der Probe ab⁵. Direkte Messungen sind für Proben jeglichen Aggregatzustandes - auch komplexer Systeme - also auch der flüssige Zustand einer Suspension wie Blut, möglich. Daher bedarf es prinzipiell bei der Verwendung von Blut keiner hohen Probenaufbereitung, vorausgesetzt eine ausreichende Konzentration an Analyt in der Probe liegt vor. Die ESR-spektroskopische Bestimmung des Ascorbylradikals ist von zahlreichen Arbeitsgruppen publiziert worden [142, 143]. Bors und Buettner beschreiben eine Anwendung von Ascorbylradikal als möglichen Marker für die Bestimmung von oxidativem Stress aus venösem Blut [144].

Analytische Arbeitsweise der ESR

An den prooxidativen Voränderungen an Biomolekülen innerhalb des QSS sind radikalische reaktive Sauerstoffspezies (RROS) direkt beteiligt. Aufgrund ihrer teils sehr hohen Reaktivität ist es mit den derzeit verfügbaren Analysemethoden sehr schwierig aus der Blutmatrix direkte Bestimmungen an den radikalischen Oxidantien durchzuführen.

Es besteht unter besonderen Bedingungen für die ESR-Spektroskopie jedoch die Möglichkeit auch sehr kurzlebige Radikale, wie zum Beispiel das Hydroxylradikal einer Bestimmung zuzuführen. Durch besondere Abfangreagenzien können die radikalischen Eigenschaften von RROS auf erstgenannte übertragen und auf der Basis der Abfangreagenzstruktur stabilisiert werden⁶. Definitionsgemäß handelt es sich hierbei um potentielle Antioxidantien. Am antioxidativen Geschehen im menschlichen Körper sind Verbindungen beteiligt, die die beschriebenen Funktionen der Abfangreagenzien besitzen. Beispielsweise ist das Vitamin E-Molekül in der Lage aufgrund seiner phenolischen Struktur im Zuge der Lipidperoxidation entstehende Radikale zu reduzieren und das einzelne Elektron zu stabilisieren. Das entstehende Tocopherylradikal ist sehr stabil [10].

Aus Tabelle 4.1 geht hervor, dass L-Ascorbinsäure eine weitere physiologische Verbindung darstellt, die zu eben beschriebener Funktion in der Lage ist.

⁵ Wie zum Beispiel die Spektralphotometrie von Einflüssen durch Streulicht oder Trübung

⁶ Siehe „Spintrapping“ und Standardsubstanzen 4.2.3

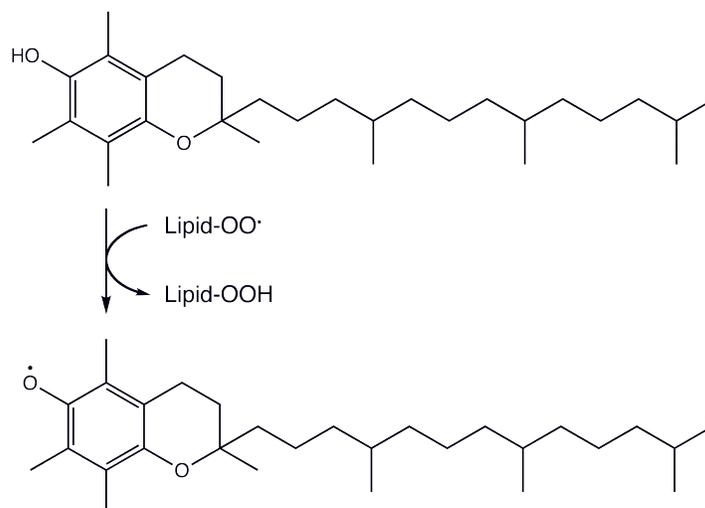


Abbildung 4.2: Detoxifikation von Peroxylradikalen durch Tocopherol (Vitamin E)

Tabelle 4.1: Auszug aus „The pecking order“ [78]

Redoxpaar (Einelektronenreduktion)	Reduktionspotential E° in mV
$HO^\bullet, H^+ / H_2O$	+2310
$RO^\bullet, H^+ / ROH$ (aliphatisches Alkoxyradikal)	+1600
$ROO^\bullet, H^+ / RROH$ (Alkylperoxyradikal)	+1000
GS^\bullet / GS^- (Glutathion)	+920
$PUFA^\bullet, H^+ / PUFA - H$	+600
$TO^\bullet, H^+ / TO - H$ (Tocopherol)	+480
$H_2O_2, H^+ / H_2O, HO^\bullet$	+320
$Asc^-, H^+ / AscH^-$ (Ascorbat)	+282

Ascorbinsäure fungiert als endogenes Abfangreagenz für im Zuge prooxidativer Vorgänge gebildete freie Radikale. Wegen seines niedrigen Reduktionspotentials ist Ascorbat dazu in der Lage das aus dem Tocopherol gebildete Tocopherylradikal zu regenerieren. Aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit und einer langen Lebensdauer stellt das Ascorbylradikal einen direkt nachweisbaren Analyten in humanem Kapillarblut dar, der dazu aufgrund seines direkten Einflusses auf das Fließgleichgewicht des Redoxgeschehens im Zustand des QSS in der Rolle eines Antioxidans, als „nah am Geschehen beteiligt“, bezeichnet werden kann. Die Abbildung 4.3 zeigt an dem Beispiel der oxidativen Membranlipidschädigung das synergistische Zusammenspiel von Vitamin E und Vitamin C bei ihrer Wirkung als Antioxidantien:

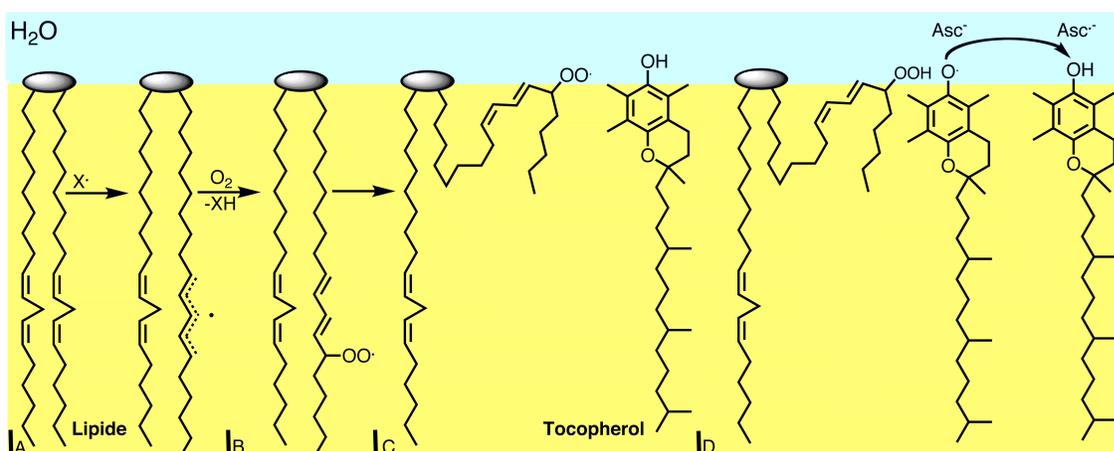


Abbildung 4.3: Synergistisches Zusammenwirken von Vitamin E und Vitamin C nach [78]

Durch den Mechanismus der Autoxidation entstehen Lipidperoxide (A). Aufgrund der höheren Hydrophilie durch die Peroxidstruktur erfährt die Kohlenwasserstoffkette des oxidierten Lipids eine Konformationsänderung, welche sich in die Richtung der hydrophilen Phase orientiert (B). In der lipophilen Membranregion lokalisiertes Vitamin E übernimmt das freie Elektron des Peroxids unter Abgabe eines Wasserstoffatoms (C). Bedingt durch sein niedriges Reduktionspotential regeneriert das Ascorbatanion die phenolische Struktur des Vitamin E. Hierbei übernimmt es formal unter Abgabe eines Wasserstoffatoms das ungepaarte Elektron des Tocopherylradikals. Es resultiert die Monodehydroascorbinsäure beziehungsweise das Ascorbylradikal (D).

Aufgrund seines Ursprunges in der Ascorbinsäure, welche bestens erforscht ist und für die bereits zahlreiche Möglichkeiten des quantitativen Nachweises auch aus biologischen Proben bestehen, kann für das Ascorbylradikal eine Relativierung auf seine Muttersubstanz vorgenommen werden. Die hierzu verwendeten Analysemethoden und Überlegungen werden an entsprechender Stelle genauer behandelt.

4.2 Elektronenspinresonanzspektroskopie

4.2.1 Prinzip der ESR-Spektroskopie

Spin, Elektronenspin und das magnetische Moment

Das moderne Konzept zum Bau der Atome beziehungsweise deren Wechselwirkung mit elektromagnetischer Strahlung, also einem großen Anteil dessen, was wir derzeit unter Licht verstehen, erwuchs aus zahlreichen Versuchen und mathematischen Postulaten, die ineinandergreifend das theoretische Fundament liefern, auf das sich die allgemeine spektroskopische Analytik stützt. Hierbei handelt es sich definitionsgemäß um die Beobachtung der Effekte, die beim Aufeinandertreffen von Licht und Materie auftreten. Besagte, mögliche Wechselwirkungen sind abhängig von den durch Quantenbedingungen festgelegten Energieniveaus, deren statistisch spezifische Zustände die materie-aufbauenden Atome und Moleküle in sich vereinen. Dieser Umstand ist der Grund dafür, dass Wechselwirkungen in Form von Übergängen zwischen den beschriebenen Energieniveaus nur bei diskreten Frequenzen elektromagnetischer Strahlung stattfinden, bei denen die Energiedifferenz zwischen voneinander verschiedenen Niveaus oder Zuständen in Form von absorbierter oder emittierter Strahlung wirkt⁷. Diese folgt der Gesetzmäßigkeit:

$$h \cdot \nu = E_1 - E_2 = \Delta E$$

h : Planck'sches Wirkungsquantum ($6,62606896(33) \cdot 10^{-34} J s$)

ν : Frequenz

E_1 : Energieniveau 1

E_2 : Energieniveau 2

ΔE : Energiedifferenz zwischen den Niveaus E_1 und E_2 [145]

⁷ Als Wirkung ist in klassisch physikalischem Sinne das Integral der Arbeit über die Zeit definiert. Auch in der Quantenphysik ist die Wirkung von großer Bedeutung. In diesem Zusammenhang stellt das Planck'sche Wirkungsquantum eine grundlegende Größe dar: es zeigt sich, dass im Zuge der wechselwirkenden Vorgänge von Licht und Materie, wobei die Energie der elektromagnetischen Transversalwellen mit $E = h \cdot \nu$ beschrieben werden kann, die Wirkung selbiger als diskontinuierliche, gequantelte Größe auftritt und ausnahmslos ganzzahlige Vielfache von h annimmt.

Der Zustand eines Systems in quantenmechanischem Sinn oder auch der einzelner Elementarteilchen, wie Elektronen oder Kerne, lässt sich näherungsweise durch deren zugehörige Wellenfunktion beschreiben, die als eine Lösung der Schrödinger-Gleichung erhalten wird.

Ein Teil der vollständigen Wellenfunktion, beschreibt den Eigendrehimpuls, mit dem ein fiktives Korpuskel mit endlicher Ausdehnung um die eigene Achse rotiert. Obwohl dieses klassische Bild von Elektronen und anderen Elementarteilchen als rotierende Körper mit definierter, räumlicher Symmetrie nach heutiger Erkenntnis nicht mehr zutreffend ist, wird es aus Verständnisgründen dennoch verwendet. Diese Eigenrotation eines Elementarteilchens wird mit der Spinquantenzahl S beziehungsweise der magnetischen Spinquantenzahl S_z beschrieben. Sie kann als Eigenwert diskrete Werte von $2S + 1$ in Bezug auf S_z annehmen [146].

Für das Atommodell nach Bohr lassen sich Eigenrotationen für Elektronen und Kerne beschreiben. Die hieraus resultierenden Eigendrehimpulse bezeichnet man als Kernspin beziehungsweise als Elektronenspin. Der Kernspin I stellt einen Gesamtspin dar und setzt sich aus den Spins der im Kern vorhandenen Protonen und Neutronen zusammen⁸. Kerne mit geraden Massen- und Ordnungszahlen besitzen einen Spin mit dem Zahlenwert $I=0$. Der Elektronenspin kann, wie schon erwähnt, im quantenmechanischen Modell ganzzahlige oder halbzahlige Werte annehmen. Für sie gilt:

$$S_z \hbar = -\frac{1}{2} \hbar \text{ beziehungsweise } S_z \hbar = +\frac{1}{2} \hbar$$

S_z : magnetische Spinquantenzahl

\hbar : reduziertes Planck'sches Wirkungsquantum $(\frac{h}{2\pi})$ [146]

⁸ Um für den Bahndrehimpuls einen magnetischen Beitrag zu leisten, muss ein Elementarteilchen elektrische Ladung tragen. Dagegen ist der Spinmagnetismus frei von Ladungseinflüssen. Alle Elementarteilchen mit persistentem Spin haben ein magnetisches Moment für das gilt: $S \neq 0$. Selbiges gilt auch für ein ungepaartes Neutron. Für den Kernspin gilt: $I \in \{0, \frac{1}{2}, 1, \dots, 6\frac{1}{2}, 7\}$

Die somit resultierenden Eigenzustände beziehungsweise Energieniveaus zweier Elektronen stimmen in den übrigen drei Quantenzahlen überein. Sie unterscheiden sich daher in Ihrer Spinquantenzahl S nur in ihrem Vorzeichen. Sie sind betragsmäßig identisch, also im Grundzustand entartet. Die Spins gepaarter Elektronen kompensieren sich, da nach Pauli zwei Elektronen innerhalb eines Orbitals nicht in allen vier Quantenzahlen übereinstimmen dürfen, ebenfalls zu $S = 0$ [146].

Sowohl der Kernspin, als auch der Elektronenspin induzieren ein magnetisches Moment. Dieses ist abhängig vom Eigendrehimpuls der jeweiligen Elementarteilchen. Ist der Gesamtspin von Kern oder Valenzelektronenwolke jedoch aufgrund der Kernkonstitution oder der vollständigen Orbitalbesetzung einem Wert $S = 0$ gleichzusetzen, wird ein gesamt magnetisches Moment nicht beobachtet. Demgegenüber besitzen Kerne, bei denen Ordnungs- oder Massenzahl oder beide ungerade sind, einen vom Wert null verschiedenen Wert für den Kernspin und dementsprechend ein permanentes, vom Kern ausgehendes magnetisches Moment. Diese Kerne wie zum Beispiel 1H , ^{13}C oder ^{14}N [147] sind den spektroskopischen Untersuchungsmethoden der Kernspinresonanzspektroskopie zugänglich, welche an dieser Stelle jedoch nicht tiefgreifender besprochen werden sollen.

Für den Elektronenspin ergibt sich eine vergleichbare Situation, wenn die Anzahl der Valenzelektronen ungerade ausfällt und somit einen von einer ganzen Zahl oder von Null verschiedener Elektronenspin verursacht wird. Dies ist die Ursache dafür, dass eine Substanz aufgrund des durch den Elektronenspin induzierten magnetischen Momentes paramagnetische Eigenschaften besitzt. Der Paramagnetismus einer Substanz stellt ein notwendiges Kriterium der Zugänglichkeit für die Elektronenspinresonanzspektroskopie dar.

4.2.2 Grundlagen der ESR-Spektroskopie

Verhalten von Elektronen im Magnetfeld

Zwei grundlegenden Entdeckungen, die schliesslich zur Entwicklung der Elektronenspinresonanzspektroskopie führen sollten, waren der 1915 von Einstein und de-Haas entdeckte Zusammenhang zwischen Elektronenspin und Bahnendrehimpuls [148], sowie das 1922 von Stern und Gerlach durchgeführte Experiment zum Nachweis der entgegengesetzten Orientierung von Elektronenspins und deren Verhalten im Magnetfeld [149]. Aufgrund dieser entscheidenden Befunde lassen sich folgend beschriebene Aussagen über das Verhalten von einzelnen Elektronen in einem statischen Magnetfeld machen. Wie schon unter 4.2 beschrieben, lassen sich zwei Elektronenspins, welche sich lediglich durch ihr Vorzeichen voneinander unterscheiden, anhand der zwei Energieniveaus E_1 und E_2 , nicht voneinander differenzieren. Erst wenn die entsprechenden Spins einem statischen Magnetfeld ausgesetzt werden, wird die Entartung durch die lokalen Wechselwirkungen der induzierten magnetischen Momente mit dem äußeren Magnetfeld aufgehoben. Dieser Effekt wird Zeeman-Effekt genannt.

Energieniveaus ungepaarter Valenzelektronen

Paramagnetische Teilchen mit dem Spin S , der von einer ungeraden Anzahl von Valenzelektronen herrührt, können insgesamt $2S + 1$ verschiedene Orientierungen relativ zur Richtung eines extern angelegten Magnetfeldes einnehmen. Diese beiden örtlichen Ausrichtungen können auch durch die magnetischen Quantenzahlen $S_z = +\frac{1}{2}$ und $S_z = -\frac{1}{2}$ beschrieben werden. Sie entsprechen zwei diskreten Wechselwirkungsenergien zwischen der Magnetfeldstärke B des externen Magnetfeldes und dem magnetischen Moment μ des Spins.

Abbildung 4.4 zeigt den beschriebenen Zeeman-Effekt und soll die bisher getroffenen Aussagen verdeutlichen:

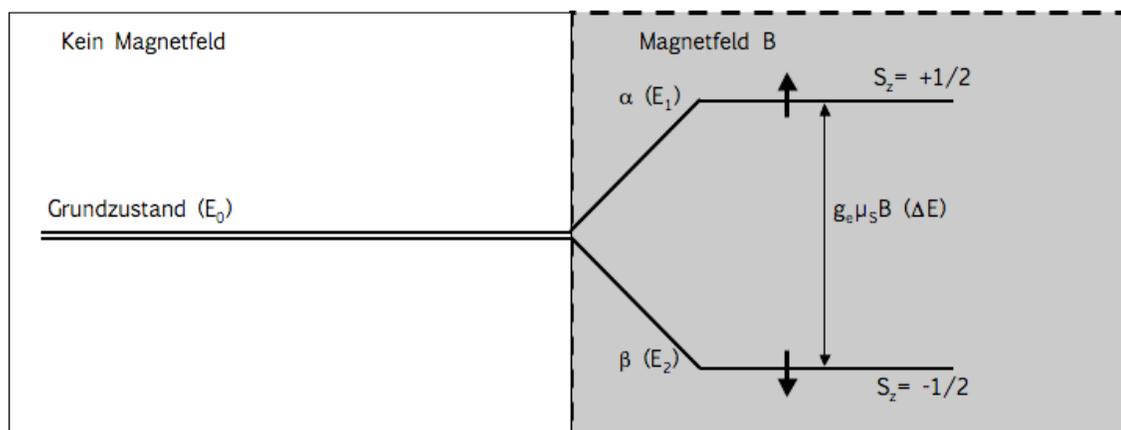


Abbildung 4.4: Zeeman-Energieniveaus von Elektronenspins in einem statischen Magnetfeld [150]

Je nach dem Vorzeichen der magnetischen Quantenzahl S_z verstärkt oder dezimiert μ_s - das mit S_z assoziierte magnetische Moment - die örtlich gebundene Wirkung des externen Magnetfeldes B . Die Anzahl von Spins, die innerhalb einer Substanz die Orientierung $S_z = +\frac{1}{2}$ beziehungsweise $S_z = -\frac{1}{2}$ einnehmen folgt einer statistischen Verteilung und wird analog zur Bezeichnung in der Kernspinresonanz als Besetzungsunterschied bezeichnet.

Innerhalb eines solchen Spinsystems, also einem Kollektiv von Teilchen mit paramagnetischen Eigenschaften, können unter der Einwirkung eines statischen Magnetfeldes Übergänge zwischen benachbarten Energieniveaus induziert werden. Hierbei sind prinzipiell Übergänge in beiden Richtungen gleich wahrscheinlich, also der Übergang eines Elektronenspins aus dem α - in den β -Zustand und umgekehrt. Die entsprechenden Vorgänge werden induzierte Emission beziehungsweise induzierte Absorption genannt. Der Betrag der Energiedifferenz kann analog zur Gleichung auf Seite 106 berechnet werden, wobei für E_1 und E_2 entsprechende Werte für E_α und E_β gelten. Die Übergänge zwischen den Energieniveaus α und β werden durch ein hochfrequentes elektromagnetisches Wechselfeld genau dann angeregt, wenn sich das Spinsystem innerhalb eines Strahlungsfeldes befindet, dessen auf die Spins wirkender Energiebetrag genau der Differenz ΔE zwischen den beiden Energieniveaus α und β entspricht. In diesem speziellen Fall tritt Resonanz zwischen dem von außen angelegten Wechselfeld und dem Spinsystem ein [150].

Resonanz und Relaxation

Die für eine Messanordnung spezifischen Resonanzbedingungen ergeben sich aus der Gleichung

$$\Delta E = h\nu = S_z \cdot g \cdot \mu_B \cdot B$$

S_z : Magnetische Spinquantenzahl des Elektrons ($\pm \frac{1}{2}$)

g : g-Faktor

μ_B : Bohrsches Magneton ($\mu_B = 9,2740154 \cdot 10^{-24} \text{ JT}^{-1}$)

B : Magnetische Feldstärke [T]

Aus der Gleichung ist ebenfalls ersichtlich, dass sich die Resonanzfrequenz ν abhängig von der gewählten magnetischen Feldstärke B des angelegten Magnetfeldes verändert. Sie ist also keine für das jeweilige Spinsystem spezifische Konstante, sondern sie hängt entscheidend von den Versuchsbedingungen ab.

Der weiter oben bereits kurz angesprochene Besetzungsunterschied zwischen zwei Energieniveaus ist abhängig von der Größe der Energiedifferenzen ΔE_α und ΔE_β , also der jeweiligen Energiedifferenz zwischen dem einzelnen Energieniveau und dem Grundzustand E_0 .

Je größer der Wert für ΔE ist, desto weniger dicht fällt die Besetzung der jeweiligen Energieniveaus aus. Liegen beide jedoch energetisch nah beieinander, sind im thermodynamischen Gleichgewicht beide Zustände nahezu gleich dicht besetzt. Die Energieniveaus des Grundzustandes und der Zeeman-Niveaus liegen sowohl für Kerne, als auch für Elektronen sehr nah beieinander. Die Besetzungsdichten fallen fast identisch aus: dementsprechend niedrig gestaltet sich ein Besetzungsunterschied. Beispielsweise befinden sich bei einem externen Magnetfeld B von 1,4 Tesla von insgesamt 2 Millionen im Feld befindlicher Wasserstoffkerne nur 10 mehr als die Hälfte im energieärmeren Zustand [147]. Nur diese zehn Kerne sind der Kernspinresonanz zugänglich. Die Situation für Elektronen in einem Spinsystem mit ungepaarten Valenzelektronen ist vergleichbar.

Kommt es zu Resonanzbedingungen, nimmt das Spinsystem durch Absorption die durch die Gleichung auf Seite 111 beschriebene diskrete Energiemenge aus dem eingestrahlten Wechselfeld ($h \cdot \nu$) auf. Bedingt durch den sehr geringen Besetzungsunterschiedes kann es zu sogenannten „Spinsättigungsphänomenen“ kommen: aufgrund der Absorption durch das Spinsystem wird der geringe Besetzungsunterschied der Elektronen in den einzelnen Energieniveaus aufgehoben und das Resonanzsignal verschwindet. Die Erklärung, weshalb trotz der Aufhebung des Besetzungsunterschied der einzelnen Energieniveaus durch kontinuierliche Radiation ein Resonanzsignal gemessen werden kann, findet sich in den während eintretender Resonanzbedingungen ablaufender Relaxationsprozessen: hierunter fallen Spin-Spin Wechselwirkungen während derer zum Beispiel zwei Spins gleichzeitig die Energieniveaus tauschen, aber auch Interaktionen einzelner Spins mit der Umgebung, bei denen strahlungslos Energieaustauschvorgänge ablaufen. Ein Resonanzsignal bleibt messbar, solange die vom Spinsystem absorbierte Energiemenge geringer ist, als die Summe, der bei Relaxationsprozessen abgegebene Energie [146, 150, 151].

Messung der Elektronenspinresonanz

Die erste elektronenspinresonanz-spektroskopische Messung, nach dem gleichen Prinzip, wie sie heutzutage durchgeführt wird, wurde 1944 von Zavoyski an der Universität Kasan in Russland durchgeführt [152].

Allgemein formuliert, folgt die ESR-Spektroskopie dem prinzipiellen Ablauf aller anderen absorptionsspektroskopischen Methoden: eine Strahlungsquelle liefert elektromagnetische Strahlung der Intensität I_0 ; eine Probe tritt (unter Resonanzbedingungen) durch Absorption eines Teils der zugeführten elektromagnetischen Strahlung mit dieser in Wechselwirkung [145].

Die nach Absorption verbleibend resultierende Strahlungsintensität I wird detektiert und aus ihr im Verhältnis zur eingestrahlten Intensität I_0 können je nach angewandtem spektroskopischen Verfahren Rückschlüsse auf die Art beziehungsweise die Eigenschaften der bestrahlten Probe gezogen werden [70]. Die Besonderheit der ESR-Spektroskopie liegt darin, dass der für die Messung erforderliche Zustand der Probe, und zwar die für die Resonanzzeugung notwendige Aufhebung der entartet vorliegenden Spin-Energieniveaus, durch das Anlegen eines Magnetfeldes erzeugt

werden muss. Zu der oben gegebenen Beschreibung hinzu kommt also die Präsenz eines Magnetfeldes, welches die schon mehrfach beschriebene Aufspaltung in Zeeman-Energieniveaus verursacht.

Detektiert wird die Absorption elektromagnetischer Strahlung in Abhängigkeit von dem angelegten Magnetfeld B . Als Probenbehältnis dienen in der Regel Quarzglaselemente unterschiedlicher Geometrie und Größe, die je nach Applikation und Versuchsdurchführung, den entsprechenden Gegebenheiten angepasst werden. Häufig handelt es sich um Sonderanfertigungen, die den Küvetten speziell auf die Versuchsbedingungen abgestimmte Attribute verleihen, wie zum Beispiel variierende Fassungsvermögen, Durchflusseinrichtungen, Kühlmöglichkeiten, Dichtungen und Septen.

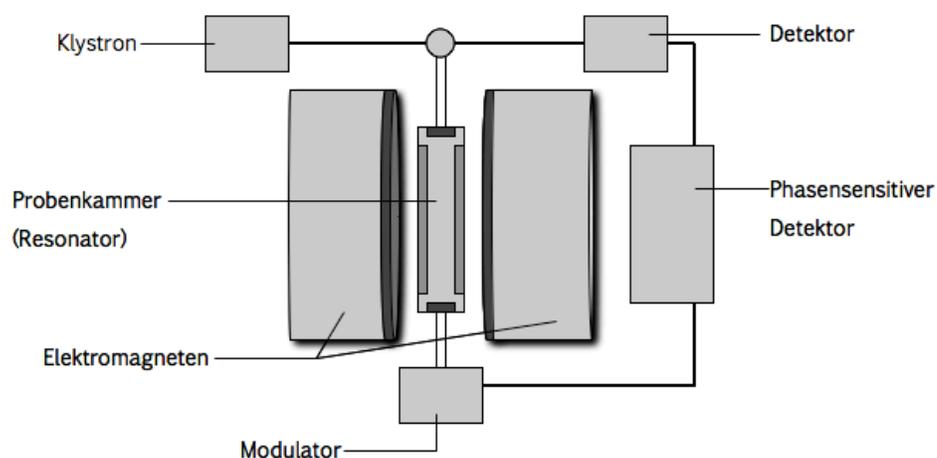


Abbildung 4.5: Schematischer Aufbau eines ESR-Spektrometers

Als Strahlungsquelle für das zur Absorption unter Resonanzbedingungen notwendige Wechselfeld dient häufig ein Klystron, also eine Mikrowellenquelle. Gängige Frequenzen zur Resonanzerzeugung sind der Bereich zwischen 8-12 GHz (klassischerweise 9,5 GHz) für die X-Band ESR⁹. Die Probenkammer, auch als Resonator bezeichnet, befindet sich innerhalb eines Elektromagneten, der das externe Magnetfeld B generiert.

⁹ Abhängig von der Verwendung der Wechselfeldfrequenz beziehungsweise der verwendeten Wellenlänge wird die ESR-Spektroskopie je nach Lage des Anregungsfrequenzbandes in X-Band (8-12 GHz) K-Band (18-27 GHz), L-Band (40-60 GHz) und sogar M-Band (60-100 GHz) eingeteilt [150, 153]

Ein phasenempfindlicher Detektor für elektromagnetische Strahlung im Mikrowellenbereich komplettiert den Aufbau eines ESR-Spektrometers.

Um Resonanz zu beobachten und die Absorption zu verfolgen, ist es generell möglich entweder die zur Anregung verwendete Mikrowellenstrahlung oder das Magnetfeld zu variieren. Verbreitet ist die Methode des „Continuous-wave“ (CV) oder auch „Field-Sweep“-Verfahrens, bei dem die angelegte Mikrowellenfrequenz ν konstant gehalten wird, während die externe Magnetfeldstärke B_0 variiert.

Das vom Detektor aufgenommene Signal ergibt sich aus der Messung der Absorption der eingestrahlten Mikrowellenintensität in Abhängigkeit von dem äußeren Magnetfeld B . Durch die spezielle Bauweise der Resonatoreinheit, die auch als Kavität bezeichnet wird, kann die Absorption der eingetragenen Mikrowellenstrahlung als Reflexionserscheinung gemessen werden [153]. Dem Hohlraumresonator kommt in Bezug auf die Probenplatzierung und die Empfindlichkeit der ESR-Messung eine besondere Rolle zu. Aus diesem Grund wird dieses Bauteil an entsprechender Stelle unter der Ziffer 4.5.2 gesondert in Bezug auf diese Punkte besprochen.

Im Allgemeinen wird aus Gründen der verbesserten Empfindlichkeit die so genannte phasensensitive Detektion angewendet. Hierbei wird die Feldstärke B des Magnetfeldes sinusförmig mit einer Modulationsfrequenz ν_{mod} moduliert. Wenn es durch Resonanz in der Probe zu einem Absorptionssignal in Form eines durch die Kavität reflektierten Mikrowellenfeldes kommt, so tritt diese amplitudenmoduliert mit gleicher Frequenz auf. Dem ESR-Resonanzsignal ist in diesem Fall eine Sinusmodulation überlagert.

Das gemessene Signal ist proportional zur Steigung beziehungsweise zur Ableitung des Absorptionssignals (a). Aus diesem Grund wird das ESR-Signal als erste Ableitung der Absorption in Abhängigkeit von der Magnetfeldstärke B dargestellt (b).

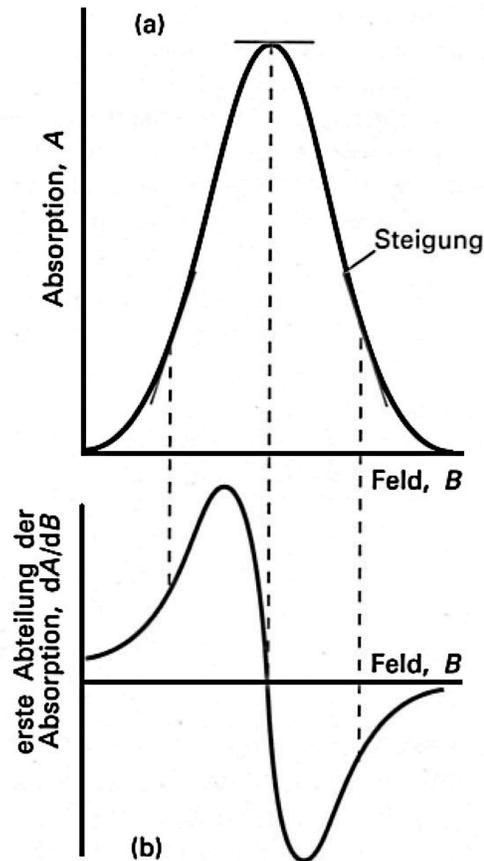


Abbildung 4.6: Phasensensitive Detektion einer Resonanzabsorption

4.2.3 ESR-Spektren

In einem phasensensitiv registrierten ESR-Spektrum (Abb. 4.6 (b)) ist auf der Abszisse die Stärke des extern angelegten Magnetfeldes B aufgetragen. An der Ordinate kann die erste Ableitung einer der Resonanzabsorption proportionalen Steigung der ursprünglichen Absorptionskurve abgelesen werden.

Für die Interpretation und dementsprechend für die Auswertung und die analytische Verwendung eines ESR-Spektrums sind drei Freiheitsgrade von Bedeutung, welche entscheidenden Einfluss auf das Aussehen des Spektrums besitzen. Es sind dies:

- Der Landé- Faktor g
- Die Hyperfeinstruktur
- Die Integrationskurve

Der Landé-Faktor g

Der g -Wert oder Landé-Faktor (auch gyromagnetischer Faktor)¹⁰ stellt für die Beschreibung eines Elektrons im Magnetfeld eine Proportionalitätskonstante dar, mit welcher der Energiebeitrag des Spinmagnetmomentes an der Gesamtenergie resultierend aus dem Gesamtmagnetmoment, also als magnetischer Anteil des Einzelspins an der Spin-Bahn-Kopplung beschrieben werden kann [154].

Das durch einen Drehimpuls \vec{L} induzierte magnetische Moment μ eines Teilchens X der Masse m und der Ladung q trägt im Magnetfeld \vec{B} zur Energie durch den Anteil

$$E_x = \mu \cdot \frac{\vec{L}}{\hbar} \cdot \vec{B} \text{ bei.}$$

E_x : Energie

μ : Magneton des Teilchens mit $\mu = \frac{q \cdot \hbar}{2mc}$

\vec{L} : Drehimpuls des Teilchens

\hbar : Reduziertes Planck'sches Wirkungsquantum

\vec{B} : Magnetfeld

q : Ladung des Teilchens

m : Masse des Teilchens

c : Lichtgeschwindigkeit

¹⁰ Nicht zu verwechseln mit dem gyromagnetischen Verhältnis γ , welches in der Kernresonanzspektroskopie Verwendung findet und in der Larmorgleichung zur Berechnung der Kernresonanzenergie auftaucht [147].

Analog lässt sich für ein spezifisches Teilchen dessen Energiebeitrag am Magnetfeld bestimmen; so auch für ein einzelnes Elektron. In diesem Spezialfall tritt an die Stelle des magnetischen Momentes der Wert des Bohr'schen Magnetons μ_B und an die Stelle des Rotationsimpulses \vec{L} der Spin-Impuls des Elektrons \vec{S} . Der empirische Wahrheitsgehalt dieser Gleichung wird jedoch erst durch das Einsetzen des g-Wertes komplettiert. Der Energiebeitrag eines ungepaarten Elektrons an der Gesamtenergie wird dann beschrieben durch die Gleichung

$$E = g \cdot \mu \frac{\vec{S}}{\hbar} \cdot \vec{B} \text{ beziehungsweise } E = g \cdot \mu_B \cdot \vec{B}$$

g : Landé- Faktor

μ_B : Bohrsches Magneton ($\mu_B = 9,2740154 \cdot 10^{-24} \text{ JT}^{-1}$)

\vec{S} : Spinimpuls

Die letzte Gleichung ist in einem anderen Zusammenhang bereits erwähnt worden und zwar lässt sich mit eben dieser Abhängigkeit die Resonanzbedingung des einzelnen Elektrons im Magnetfeld abhängig von dem anliegenden Magnetfeld \vec{B} beschreiben¹¹.

Für das ESR-Spektrum stellt der g-Faktor eine wichtige Größe dar, da der Zahlenwert für jedes Teilchen von seinem umgebenden elektrischen Feld abhängig ist. Für freie Elektronen beträgt der empirisch ermittelte Zahlenwert des g-Wertes $g = 2,0023193043622(2)$ ¹². Dieser Wert ist veränderlich je nachdem, ob sich das freie Elektron in einem festen Kristallgittergefüge oder in Lösung befindet, da das magnetische Moment des Elektrons innerhalb eines Festkörpers durch Wechselwirkungen mit dem elektrischen Kristallfeld beeinflusst wird. Ebenso ist die chemische Umgebung innerhalb eines organischen Moleküls, welches ein ungepaartes Elektron trägt, eine Einflussgröße für das magnetische Moment des Elektrons. Die Konstitution eines Moleküls kann einen entscheidenden Beitrag am gesamt magnetischen Moment

¹¹ Vergleiche Seite 111

¹² eine theoretische Bestimmung des g-Wertes ist aus der quantenmechanischen Beschreibung des Elektrons mathematisch möglich. Der auf diese Weise erhaltene Zahlenwert beläuft sich auf 2,00023193048(8). Die Übereinstimmung mit dem empirisch ermittelten Wert ist beachtlich und gilt als die am genauesten theoretisch vorausgesagte bekannte Naturkonstante [146, 150]

eines Elektrons leisten [146, 153]. Dementsprechend ist der g-Faktor für ein Molekül eine sehr charakteristische Größe durch die Aussagen zur Identität und auch zur chemischen Umgebung innerhalb des submolekularen Gefüges gemacht werden können [151].

Innerhalb des ESR-Spektrums ist der g-Wert verantwortlich für die Lage des Spektrums bezüglich der Abszisse, also dem magnetischen Feld. Der Magnetfeldwert am Mittelpunkt eines ESR-Signals kann zur Bestimmung des g-Wertes herangezogen werden. Im ESR-Experiment werden die Frequenz des Wechselfeldes ν und das Magnetfeld B gleichzeitig gemessen. Da die Werte für h beziehungsweise \hbar und μ_B Konstanten bekannter Größe darstellen, kann nach der Gleichung für die Resonanzenergie auf Seite 111 und Seite 117 für $E = h \cdot \nu$ nach g aufgelöst werden.

$$g = \frac{h \cdot \nu}{\mu_B \cdot B_0}$$

Sowohl im Zähler, als auch im Nenner des Bruches entstehen durch mathematische Transformation Terme, die Energien beschreiben und sich somit zu einem einheitsfreien Zahlenwert kürzen, der für das entsprechende Teilchen (hier ein Elektron) charakteristisch ist.

Kopplung und Hyperfeinstruktur

Im vorangegangenen Abschnitt wurde beschrieben, wie die räumliche Umgebung eines resonanz erzeugenden Elektrons bezüglich dessen elektromagnetischer Beschaffenheit als eine für den g-Wert also für die Lage des ESR-Signals im Absorptionsspektrum charakteristische Einflussgröße wirkt. Ausserdem wird auch das Aussehen eines ESR-Spektrums von dessen magnetischer Umgebung beeinflusst. Wie bereits erwähnt, besitzen auch Kerne ein magnetisches Moment bedingt durch einen Kernspin $I \neq 0$.

Dieses kernmagnetische Moment kann mit dem magnetischen Moment μ eines ungepaarten Elektrons in Wechselwirkung treten. Es bewirkt dann eine lokale Verstärkung des elektronen-umgebenden Magnetfeldes. Das zur Resonanzanalyse bestimmte Elektron wird somit tangiert von einem Magnetfeld, dessen Gesamtbetrag sich aus

dem extern angelegten Magnetfeld des ESR-Spektrometernagneten und dem kernmagnetischen Moment, beziehungsweise aus den kernmagnetischen Momenten seiner umgebenden Bindungspartner additiv zusammensetzt.

Für das magnetische Moment eines Kerns mit dem Spin I bestehen $2I + 1$ Möglichkeiten, sich in einem externen Magnetfeld auszurichten. Hieraus ergibt sich eine ebenso große Anzahl von unterschiedlichen Möglichkeiten mit dem lokalen Feld in der unmittelbaren Umgebung eines Elektrons in Wechselwirkung zu treten. Für jede Orientierungsmöglichkeit des Kernspins im Magnetfeld ist ein Übergang des Elektronenspins denkbar. Somit ergeben sich für das betrachtete Elektron $2I + 1$ unterschiedliche Zeeman-Niveaus, bei denen eine Resonanzabsorption erfolgen kann. Für jedes Energieniveau ergibt sich im ESR-Spektrum eine eigene Linie.

Durch die Kopplung der magnetischen Wechselwirkung mit einem Protonenkernmoment mit $I = \frac{1}{2}$ entstehen durch $2I + 1$ zwei Energieniveaus. Das Signal für die Gesamtabsorption durch die Probe bei Resonanzbedingungen wird aufgespalten in ein Dublett. Im Spektrum sichtbar werden zwei flächengleiche Signale.

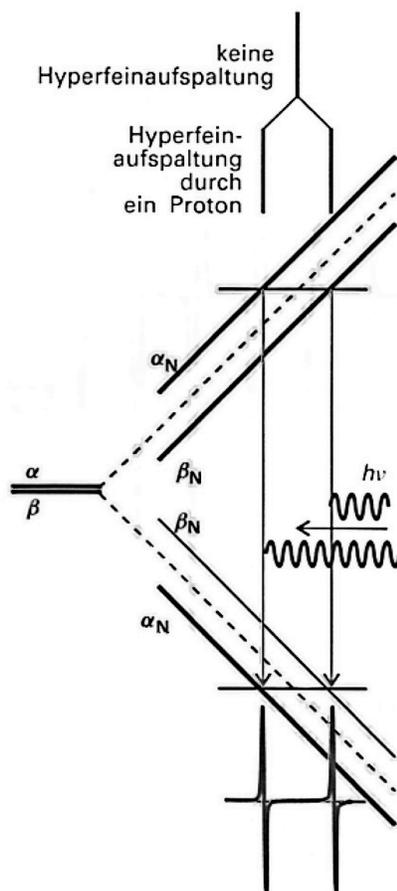


Abbildung 4.7: Hyperfeinaufspaltung durch ein Proton

Diese Linienaufspaltung des ESR-Signals im Spektrum, bedingt durch die Kopplung des magnetischen Moments des Elektrons mit dem eines oder mehrerer benachbarter Kerne, wird Hyperfeinaufspaltung oder Hyperfeinstruktur genannt. Diese ist charakteristisch für die jeweilige chemisch-strukturelle Umgebung eines ungepaarten Elektrons- also für die Struktur eines organischen Radikals [155].

Zur Analyse der Hyperfeinstruktur kann die Hyperfeinkopplungskonstante A herangezogen werden. Diese ergibt sich als Abstand zwischen zusammengehörigen Signalen und kann aus der Gleichung

$$h \cdot \nu = g \cdot \nu_B \cdot (B + A_1)$$

berechnet werden. Der Term $(B + A_1)$ bezeichnet hierbei das gesamt magnetische

Feld, welches auf das koppelnde Elektron wirkt. Der Summand A_1 stellt den Anteil des magnetischen Momentes dar, der durch den koppelnden Kern beigetragen wird und stellt die Kopplungskonstante dar. Sie hat die Einheit eines Magnetfeldes, da sie wie B als magnetisches Moment angegeben wird. Aus der Kopplungskonstante A können aufgrund der mannigfaltigen Faktoren, von denen ein kernmagnetisches Moment abhängig ist, eine ganze Reihe an Informationen über die Umgebung der resonanten Elektronen gezogen werden. So ist es unter anderem möglich, Aussagen über die Art der chemischen Bindungen (σ oder π), den Abstand zwischen Kernen und ungepaarten Elektronen und - wie bereits erwähnt - qualitativ Voraussagen zur strukturellen Beschaffenheit einer Verbindung zu treffen.

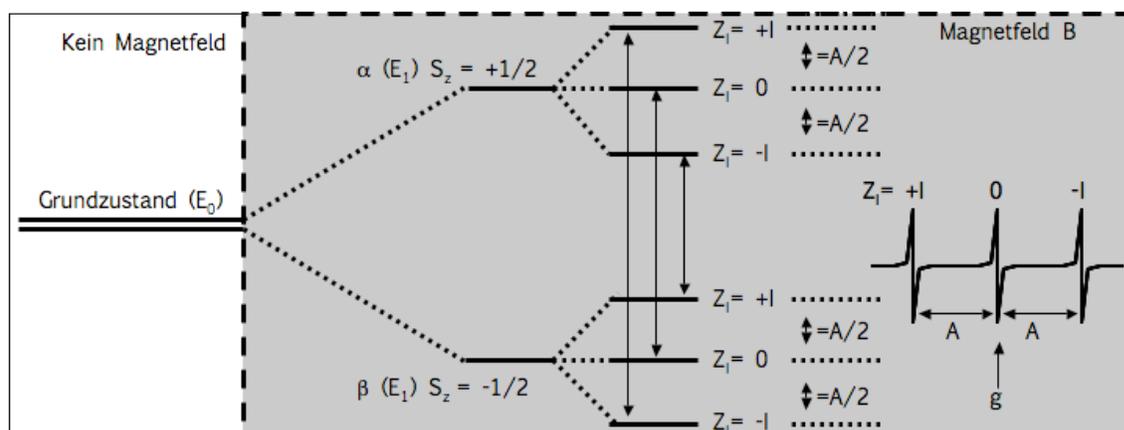


Abbildung 4.8: Hyperfeinaufspaltung durch Kopplung mit einem Stickstoffkern

Für den magnetischen Stickstoffkern sind wie beschrieben $2I + 1$ Energieniveaus möglich ($Z_I = -I, \dots, 0, \dots, +I$). Für jede Kerneinstellung (Z_I) ist der Elektronenübergang ($S_z = -\frac{1}{2} \rightarrow +\frac{1}{2}$) möglich. Aus der Kopplung mit einem Stickstoffkern ^{14}N ($I = 1$) ergibt sich ein Signal in der Form eines Triplets.

Durch die Kopplung mehrerer Kerne mit dem magnetischen Moment eines ungepaarten Elektrons kommt es zu einer Mehrfachaufspaltung des ESR-Signals. Allgemein ausgedrückt erzeugen äquivalente Kerne mit $I = \frac{1}{2}$ nach den eben besprochenen Regeln Multiplets, deren Intensitäten einer Binominalverteilung folgen.

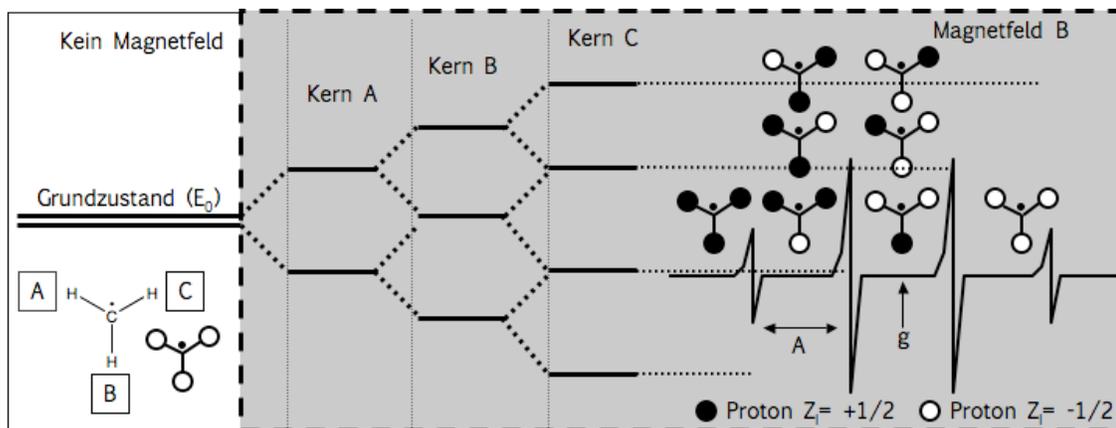


Abbildung 4.9: Hyperfeinaufspaltung des Methylradikals

Abbildung 4.9 zeigt die idealisierte Darstellung des Methylradikals. In diesem Beispiel findet eine Kopplung mit den drei äquivalenten Kernen der Protonen A, B und C statt. Für I ergibt sich ein Wert von $I = 3 \cdot \frac{1}{2}$. Mit $2I + 1$ ergeben sich vier Signale im Verhältnis 1:3:3:1.

Die Integrationskurve

Unter Vermeidung von Spinsättigungsphänomenen¹³ verhält sich die Fläche unter dem Absorptionssignal eines ESR-Spektrums proportional zur Anzahl resonanter Elektronen¹⁴ in einer Probe. Da im ESR-Spektrum die erste Ableitung der Resonanzabsorptionskurve dargestellt wird (A), bedarf es einer doppelten mathematischen Transformation, um die Fläche unterhalb des Signals zu erhalten. Die erste Integration liefert die Absorption des Wechselfeldes unter Resonanzbedingungen (B). Eine weitere Integration liefert eine sigmoidale Darstellung durch deren Stufenhöhe die Fläche unter der Absorptionskurve beschrieben wird (C).

¹³ siehe Nummer 4.2.1 Seite 112

¹⁴ Spinzahl

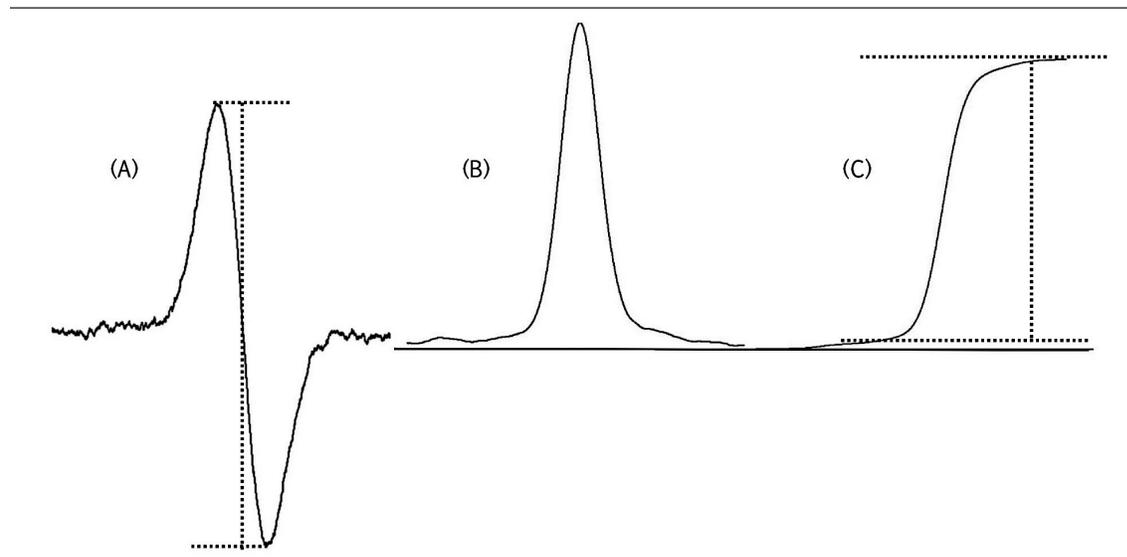


Abbildung 4.10: Auswertung über die Peakhöhen (A) und (C) und Peakfläche (B)

Für ein aufgespaltenes Signal gelten dieselben Bedingungen, jedoch ergibt sich hier die Anzahl resonanter Elektronenspins aus der Proportionalität der Gesamtsignalfäche. Die entsprechenden Werte müssen also nach der Einzelflächenbestimmung addiert werden. Unter der besonderen Bedingung, dass die Konzentration einer Probe lediglich in Relation zu einer anderen Konzentration derselben Verbindung unter identischen Versuchsbedingungen beurteilt werden soll, kann anstelle der Fläche auch die Höhe des Signals herangezogen werden¹⁵. Allerdings ist in diesem Fall darauf zu achten, dass für den Fall eines Signals mit Hyperfeinaufspaltung immer dieselben Signale miteinander verglichen werden.

¹⁵ Signal (A) in Abbildung 4.10

4.3 Spintrapping, Spinlabelling und Standardsubstanzen

Spintrapping

Unter besonderen Bedingungen können selbst sehr kurzlebige Radikale der Detektion durch die ESR zugeführt werden. Die Problematik der Detektierbarkeit sehr reaktiver Radikale besteht darin, dass durch ihre schnelle Reaktion mit anderen Molekülen die momentane Konzentration erst genannter in der Regel zu gering ausfällt, um mit der ESR erfasst zu werden¹⁶ obwohl die ESR-Spektroskopie ein Analysenverfahren mit sehr niedriger Detektionsgrenze bis zu $10^{-10}M$ darstellt [153]. Diese Problematik lässt sich jedoch durch einen eleganten Kunstgriff überwinden. Durch den Zusatz eines diamagnetischen Abfangreagenzes kann nach der Reaktion mit der entsprechenden radikalischen Spezies ein langlebiges, stabiles Radikal erzeugt werden, welches der ESR-Spektroskopie zugänglich ist. Die paramagnetischen Eigenschaften eines intermediär auftretenden Radikals werden sozusagen auf ein für das freie Elektron stabileres Strukturgerüst übertragen. Häufig handelt es sich hierbei um Kopplungsreaktionen, deren resultierende Addukte, bedingt durch die Struktur des koppelnden Radikals, charakteristische Hyperfeinstrukturen besitzen. Die diamagnetische Komponente bezeichnet man als Spinfalle oder Spintrap, das persistente, paramagnetische Produkt wird häufig Spin-Addukt genannt.

Typisch für die Verwendung als Spintrap-Reagenz sind zyklische, teilweise aromatische C-Nitroso- oder -Nitronverbindungen, deren Spin-Addukte stabile Nitroxide darstellen¹⁷. Die Stabilität der resultierenden paramagnetischen Addukte ist durch die Möglichkeit der Delokalisierung des freien Elektrons begründet, die häufig durch induktive Effekte weiterer Liganden begünstigt wird.

¹⁶ Ausser unter speziellen Bedingungen, die unter anderem extrem niedrige Temperaturen beinhalten [10]

¹⁷ siehe Abbildung 4.11 DMPO-OH Addukt: Produkt aus der Abfangreaktion eines DMPO-Spintraps mit einem Hydroxylradikal

Tabelle 4.2: Auswahl in biologischen Systemen verwendeter Spintraps

Verbindung	Abkürzung
<i>tert.</i> -Nitrosobutan	tNB
α -Phenyl- <i>tert.</i> -butylnitron	PBN
5,5-Dimethylpyrroline-N-oxid	DMPO
<i>tert.</i> -Butylnitrosobenzen	BNB
α -(4-Pyridyl-1-oxid)- <i>N</i> - <i>tert.</i> -butylnitron	POBN
3,5,-Dibromo-4-nitroso-benzensulfonsäure	DBNBS

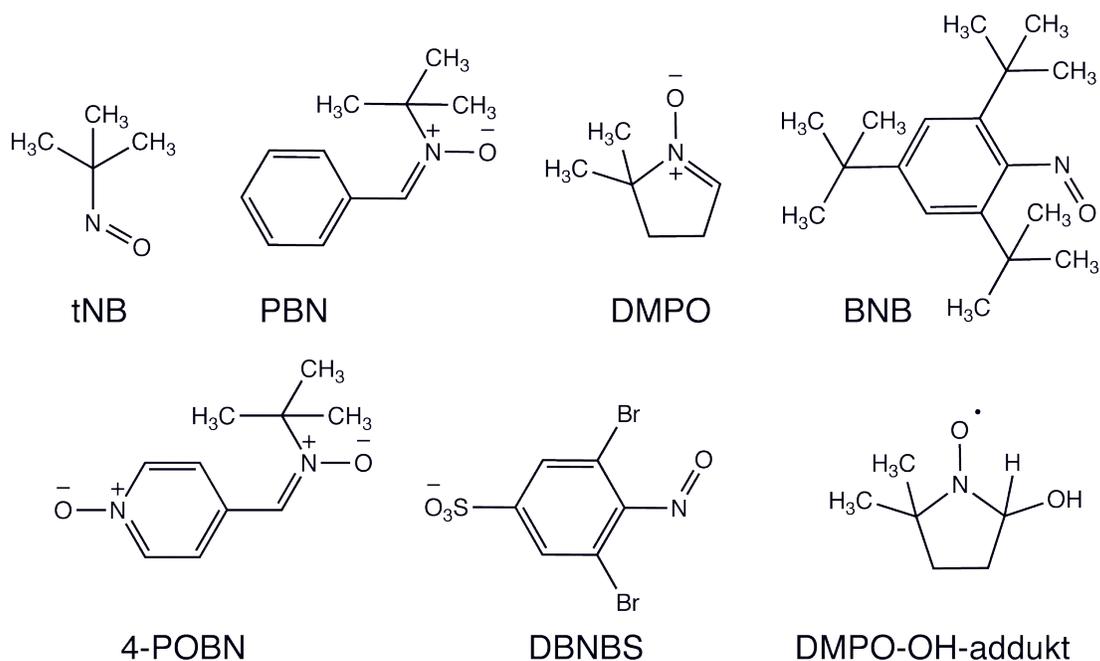


Abbildung 4.11: Strukturen der in Tabelle 4.2 beschriebenen Spintraps

Spinlabelling

Ferner ist es möglich, eine diamagnetische Substanz durch Kopplung mit einem paramagnetischen Reagenz der Detektion durch die ESR zugänglich zu machen. Die entsprechenden radikalischen Strukturen gehören ebenfalls typischerweise zu den Nitrylradikalverbindungen und werden „Spinlabel“ genannt. Bei der Verwendung von „Spinlabels“, die keine kovalente Bindung mit der Zielstruktur eingehen, wird in der Literatur zeitweilig der Ausdruck Spin-Probe verwendet.

Einige cyclische Spinlabel-Substanzen¹⁸, die der Gruppe der Nitroxide angehören, besitzen aufgrund der Hyperfeinwechselwirkung des ungepaarten Elektrons mit dem benachbarten Stickstoffatom typischerweise ein sehr stabiles Triplet (1: 1: 1) Signal¹⁹. Deshalb eignen sich diese Verbindungen exzellent als Standards für externe Kalibrierungen und Integritätsprüfungen. Frei auftretende organische Strukturen dieses Typs wurden von Rogers, der die Lösung dieser Verbindungen untersuchte, 1956 erstmalig beschrieben und finden seither breite Anwendung auf dem Gebiet der ESR-Spektroskopie [156]. Für die Untersuchungen im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden die Spinlabels 2,2,6,6,-Tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) und 3-Carboxy-2,2,5,5,-tetramethyl-1-pyrrolidin-1-oxyl (CPO), sowie das Hydrochlorid des zum CPO korrespondierenden Spintraps 1-Hydroxy-3-carboxy-2,2,5,5,-tetramethylpyrrolidin (CPH) verwendet.

¹⁸ und aus einer „Trapping-Reaktion“ resultierende Addukte mit Nitroxidstruktur

¹⁹ Vergleiche Abbildung 4.8 auf Seite 121

Tabelle 4.3: Auswahl in biologischen Systemen verwendete Spinlables

Verbindung	Abkürzung
2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl	TEMPO
4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl	TEMPOL
4-Keto-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl	TEMPON
4-Amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl	TEMPAMIN
3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl	CMPO
3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl	CPO
1-Hydroxy-3-carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin	CPH

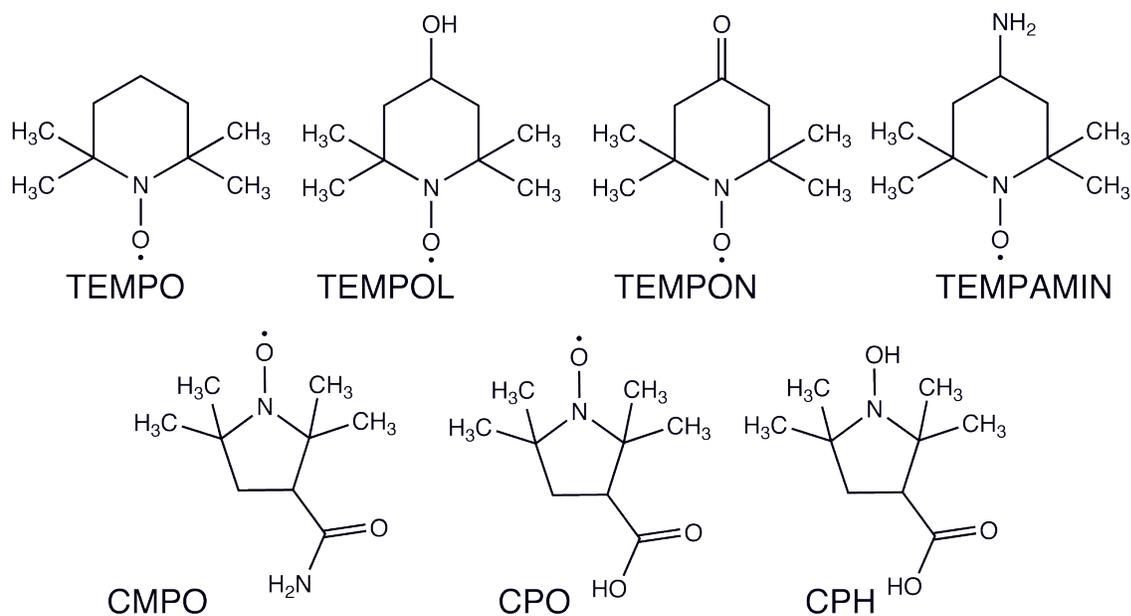


Abbildung 4.12: Strukturen der in Tabelle 4.3 beschriebenen Spinlables

In vivo Anwendung von Spintraps und Spinlabels

Die *in vivo*-Anwendung von Spintraps und Spinlabels wird für das Tiermodell von zahlreichen Arbeitsgruppen beschrieben [157, 158, 159]. Auch die Anwendung auf der Haut am Menschen wurde, sogar im Zusammenhang mit der Bestimmung oxidativen Stresses in humaner Haut, von Fuchs et al. publiziert [160]. Da es sich bei den stabilen Nitroxidradikalen um relativ junge Verbindungen handelt, ist über die Auswirkungen einer langfristigen Exposition wenig bekannt. Einige wenige Publikationen existieren zu dem Einfluss bekannter Nitroxidradikale im Rahmen der Durchführung des Ames-Test an *Salmonella typhimorium*. Hierbei wurden keine cyto- und genotoxischen Einflüsse verschiedener Nitroxide festgestellt [161, 162]. Aufgrund ihres Reizpotentials und der teilweisen Einstufung als umweltschädliche Substanzen wurden die Nitrone als Spinlabel- beziehungsweise als Spintraps-substanzen für die Anwendung im Rahmen der vorliegenden Arbeit als zu risikobehaftet angesehen und fanden daher keine Anwendung.

4.4 Das Ascorbylradikal

Wird in einem System die Menge reaktiver Radikale durch die Verwendung von Spintraps quantitativ als Summe erfasst, wird in der Literatur gelegentlich von „Spin-counting“ gesprochen. Voraussetzung hierfür ist die tatsächliche Interzeption aller im System intermediär auftretenden Radikale. Dieser Anspruch, in einem biologischen System alle radikalischen Spezies zu bestimmen, ist aufgrund der Komplexität des Systems und der zahllosen Möglichkeit von Nebenreaktionen mit einem Assay nicht zu verwirklichen. Es ist jedoch anzunehmen, dass bei dem Vorliegen eines Spintraps mit ausreichend niedrigem Reduktionspotential ein Großteil der intermediär in der Umgebung des Spintraps auftretenden Radikale zum entsprechenden Addukt reagieren beziehungsweise ihre paramagnetischen Eigenschaften in Form eines formal einzelnen Elektrons auf das jeweilige Reduktionsmittel übertragen. Eine solche Annahme führte Kleschyov et al. bei der Entwicklung eines ESR-Assays zur direkten Bestimmung biologischen Stickstoffmonoxides zu der Verwendung stabiler, paramagnetischer NO-Addukte als Markersubstanzen für NO \cdot und zu der Prägung des Begriffes des „Intrinsischen Spintraps [163].

Bildung und Eigenschaften des Ascorbylradikals

Die wohl prominenteste Verbindung im menschlichen Organismus, die unter die Definition eines Spintraps fallen kann, ist die L-Ascorbinsäure. Das bei physiologischem pH-Wert von pH=7,4 aufgrund des pK_s -Wertes für die erste Deprotonierung²⁰ zu 99,95 % vorliegende Ascorbatanion kann durch Einelektronenübertragung in die radikalische L-Semidehydroascorbinsäure überführt werden. Formal wird in der Literatur auch die Bereitstellung eines Wasserstoffatoms (H^\cdot oder $H^+ + e^-$) für ein entsprechendes Radikal erwähnt, woher für das Ascorbylradikal auch die Bezeichnung eines Donor-Antioxidans stammt [144].

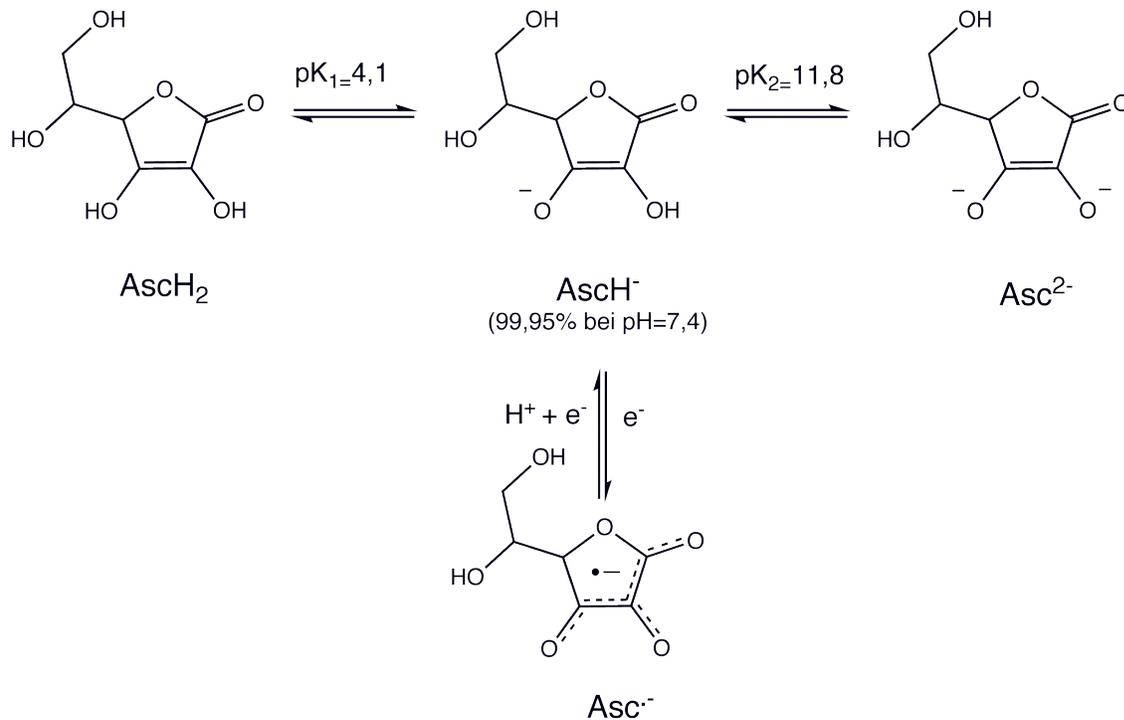


Abbildung 4.13: Bildung des Ascorbylradikals aus Ascorbat

Für das resultierende Redoxpaar aus Ascorbylradikal und Ascorbat lässt sich ein Standard Einelektronen-Reduktionspotential formulieren, welches die Ascorbinsäure mit 282 mV zum (relativ) stärksten, endogenen, wasserlöslichen Antioxidans im menschlichen Blutplasma werden lässt²¹ [78].

²⁰ $pK_{s1}=4,17$

²¹ Vergleiche Tabelle 4.1 auf Seite 104

Tabelle 4.4: Kinetische Kenngrößen einiger Reaktionen von Ascorbat vom Typ $AscH^- + R \rightarrow Asc^- + RH$ nach [166]

Radikal	k_{obs} in $M^{-1}s^{-1}$ für pH=7,4
HO·	$1,1 \cdot 10^{10}$
RO·	$1,6 \cdot 10^9$
ROO·	$1-2 \cdot 10^6$
GS· (Glutathylradikal)	$6 \cdot 10^8$
TO· (Tocopherylradikal)	$2 \cdot 10^5$
Asc ⁻ (Dismutation)	$2 \cdot 10^5$

Ascorbat ist in der Lage innerhalb der Einelektronenübertragung eine große Bandbreite oxidierender freier Radikale, die mit den Folgen von oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden, mit beachtlichen Geschwindigkeitskonstanten zu reduzieren. Sowohl für das Superoxidradikal, Peroxylradikale, das Hydroxylradikal, als auch für reaktive Stickstoffspezies werden entsprechende Eigenschaften beschrieben [164, 165].

Aufgrund der strukturellen Besonderheiten der Ascorbinsäure, die nach der ersten Deprotonierung zu einem Enolat-Ion führen, kann sich das aus diesem entstehende Radikal sowohl über die Elektronenwolken der Enolat-Sauerstoffe, als auch über die Doppelbindungen bis hin zur Carbonylfunktion stabilisieren. Buettner und Schäfer verwenden in diesem Zusammenhang die Nomenklatur „resonance-stabilized tricarbonyl ascorbate free radical“ [167]. Diese Formulierung erscheint als sehr passend, da das ungepaarte Elektron des Ascorbylradikals sich wahrscheinlich²² hauptsächlich in den Bereichen der π -Elektronen aufhält, die durch die Deprotonierung auf drei formal entartete carbonyl- π -Elektronenzustände delokalisiert sind. Dieser π -Charakter des Ascorbylradikals ist der Grund dafür, daß keine Peroxylradikale durch die Reaktion mit molekularem Sauerstoff gebildet werden.

Das Zusammenspiel dieser ausgedehnten mesomeren Effekte ist verantwortlich für die Tatsache, dass das Ascorbylradikal bei Raumtemperatur eine hohe Lebensdauer besitzt und in wässriger Lösung einer ESR-Messung direkt zugänglich ist [142, 168].

²² Im Sinne der Quantentheorie

ESR-Signal des Ascorbylradikals

Das Ascorbylradikal besitzt einige charakteristische Eigenschaften, anhand derer es im Spektrum eindeutig und einfach identifiziert werden kann. Bei X-Band ESR-Voraussetzungen wird klassischerweise ein Dublett mit einem g-Faktor von 2,0052 und einer Hyperfeinkopplungskonstanten von 1,8 G erhalten [142]. Diese resultiert aus der Wechselwirkung des Einzelelektronenspins mit dem kernmagnetischen Moment des Wasserstoffatoms mit der Position 4 des Ascorbylradikals in Abbildung 4.14.

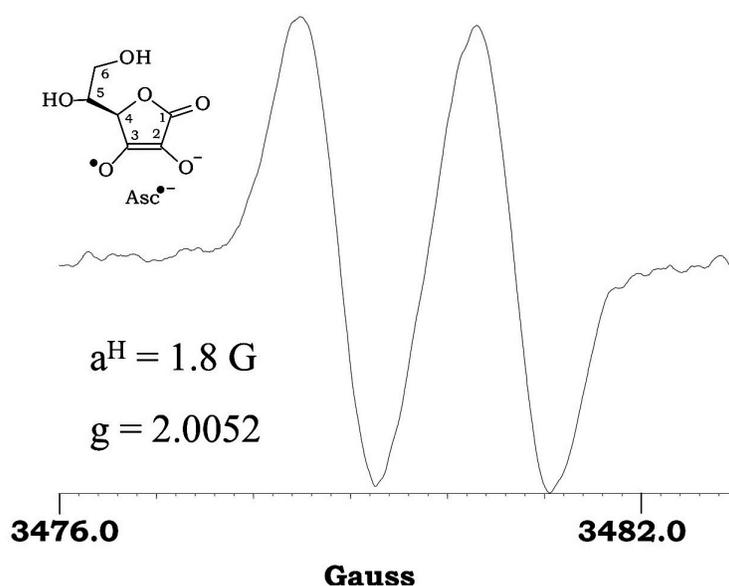


Abbildung 4.14: Typisches Dublett des Ascorbylradikal-ESR-Signals

Unter höherer Auflösung wird unter dem Dublett die weitere, in Abbildung 4.15 gezeigte Feinstruktur, die ein Triplett des Dubletts darstellt, erkennbar. Für die Wechselwirkungen mit den Kernen der Wasserstoffatome an Position 5 im Furanonring (hier mit der Nummer 4 beziffert)²³ und denen des 1,2-Dihydroxyethyl-Substituenten²⁴ können drei Hyperfeinkopplungskonstanten angegeben werden [167].

²³ $a_5^H = 1,76 \text{ G (1)}$

²⁴ $a_1^H = 00,07 \text{ (1)}; a_2^H = 0,19 \text{ G (2)}$

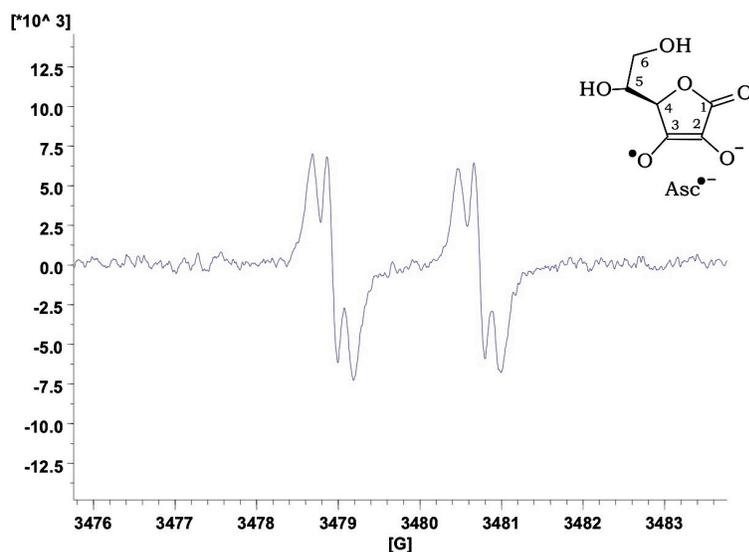


Abbildung 4.15: Feinaufgelöstes ESR-Signal des Ascorbylradikals

Elimination des Ascorbylradikals

Der physiologische Hauptweg zur Elimination des Ascorbylradikals verläuft über die Dismutation zweier Radikalmoleküle zu Ascorbat und Dihydroxyascorbinsäure [169]. *In vitro* wird für diese Reaktion eine Geschwindigkeitskonstante von $k_{obs} = 1,4 \cdot 10^5 M^{-1} \cdot s^{-1}$ bei einem pH-Wert von pH=7,4 postuliert. Unter Simulation physiologischer Bedingungen in Gegenwart von Phosphationen wird diese jedoch etwa um das Zehnfache gesteigert [142, 168].

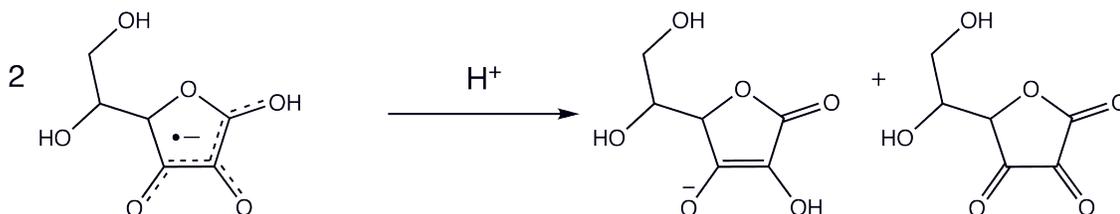


Abbildung 4.16: Dismutationsreaktion zur Elimination des Ascorbylradikals unter physiologischen Bedingungen

Das durch die Abbaureaktion entstandene Ascorbat wird im Körper wieder in den Ascorbat-Pool eingeschleust und unterliegt den physiologischen Regenerations- und Abbau-Prozessen. Dehydroascorbat wird hauptsächlich abgebaut oder zu einem ge-

ringen Anteil über einen nicht-enzymatischen Weg über Glutathion und Liponsäure ebenfalls wieder in den Ascorbat-Pool eingebracht [170]. Weitere Mechanismen, die *in vivo* für die Metabolisierung des Ascorbylradikals diskutiert werden, beinhalten die Beteiligung reduzierender Enzymsysteme, die an der Regenerierung von Substraten aus einelektron-übertragenden Systemen beteiligt sind [171, 172].

Das Ascorbylradikal als Marker für Oxidativen Stress

Untersuchungen zu den Zusammenhängen zwischen der Bildung des Ascorbylradikals und dem Auftreten verstärkter oxidativer Bedingungen werden vielfach beschrieben. Dabei sind die Aussagen bezüglich der Höhe des Ascorbylradikalspiegels in biologischen Proben, wie Rattenblut nach Reperfusion²⁵, humanem Plasma [142, 173, 174], oder auch in verschiedenen Gewebehomogenisaten [168], nicht einheitlich. Generell bestehen hier zwei unterschiedliche Ansichten. So wird in einigen Studien ein hoher Ascorbylradikalspiegel als Anzeichen für eine hohe Belastung mit ROS radikalischer Natur angesehen, die durch Ascorbat detoxifiziert wurden, und somit zu einer Regenerierung an Ascorbylradikal geführt haben. Dem gegenüber steht die Ansicht anderer Studien, die einen niedrigen Ascorbylradikalspiegel als Anzeichen für eine unter der Inzidenz prooxidativer Prozesse eintretende Depletion an Ascorbinsäure interpretieren. Buettner und Jurkiewicz weisen darauf hin, dass bei jeglichem Experiment zur Bestimmung des Ascorbylradikalspiegels beachtet werden muss, dass abgesehen von den Reaktionen zur Reduktion einer radikalischen Spezies durch Ascorbat in biologischen Systemen stets eine „Hintergrundoxidation“ von Ascorbat stattfindet, welche per se zu einer basalen Menge an Ascorbylradikal führt [142]. Dieser basale Spiegel an Ascorbylradikal ist von zahlreichen Faktoren, wie dem pH-Wert, der Konzentration katalytischer Übergangsmetallionen, sowie der Sauerstoffkonzentration und auch von der Ascorbatmenge im Plasma abhängig. Insbesondere letzt genannter Einflussfaktor kann schon aus geschlechtsspezifischen Gründen bei Probanden variieren und zu interindividuellen Schwankungen führen [175].

Um diese Problematik zu überwinden wird vorgeschlagen, wie auch schon in Zusammenhang mit dem FORT-Test System diskutiert und als Verbesserungsvoraussetzung für einen neuen Kapillarblutassay formuliert, Aussagen zur oxidativen Lage in bio-

²⁵ einer gängigen Simulation für ischämische Zustände in denen vermehrt ROS gebildet werden

logischen Proben anhand der Bestimmung des Ascorbylradikals nie als Absolutwert sondern stets im Zusammenhang mit dem aktuellen Ascorbatspiegel zu betrachten. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Beurteilung der Lage des prooxidativ-antioxidativen Gleichgewichtes wurde daher eine Methode entwickelt, mit der mittels ESR-Spektroskopie das Ascorbylradikal quantifiziert und aus ein und derselben Probe der Ascorbatspiegel bestimmt werden kann. Die verwendeten und entwickelten Methoden werden an entsprechender Stelle vorgestellt²⁶.

4.5 ESR-Spektroskopische Bestimmung des Ascorbylradikals

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden durchgeführt an einem X-Band ESR-Gerät der Firma Magnettech vom Typ Miniscope MS 200 unter den bereits auf Seite 38 beschriebenen, standardisierten Bedingungen. Als Probengefäß wurden zunächst 50 μL Rundkapillaren aus Glas verwendet, deren Unterseite nach Befüllung mit einem Wachspfropf verschlossen wurde. Diese stellten sich jedoch für die geplante Anwendung von möglichst wenig vorbehandeltem Kapillarblut als ungünstig heraus und konnten durch einige, technische Variationen ersetzt werden, wie in diesem Kapitel näher erläutert werden soll.

4.5.1 Standardisierung und Integritätsprüfung des Spektrometers

Um die Aussagekraft der am Miniscope-200 gewonnenen Messwerte zu sichern, wurde eine wässrige Lösung des stabilen Nitroxidradikals TEMPO mit einer Konzentration von 0,1 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ als Standardlösung eingesetzt. Diese wurde täglich aus einer 1 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ wässrigen TEMPO-Lösung durch Verdünnen mit Wasser hergestellt. Die Stammlösung wurde lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

²⁶ Siehe auch 4.6.1 Seite 172 ff.

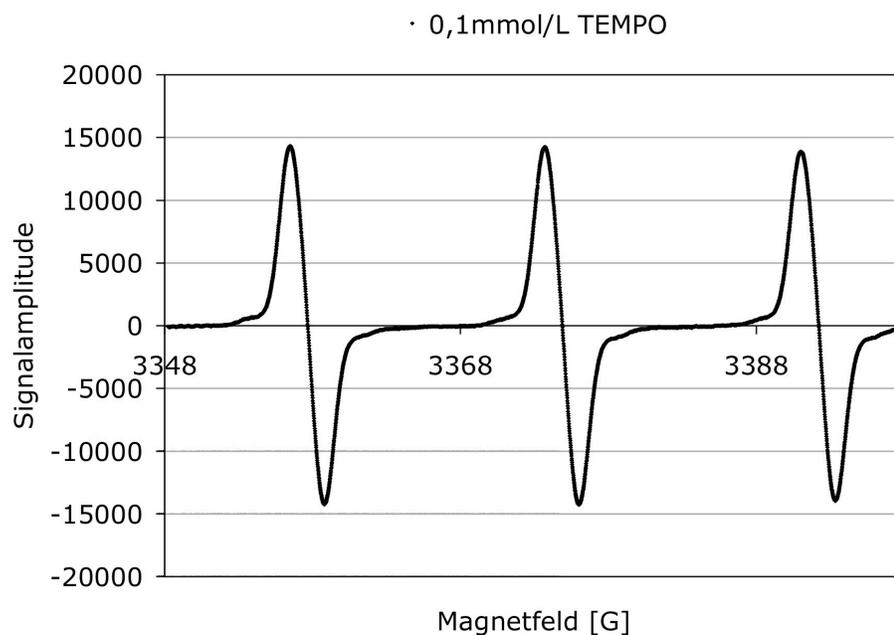


Abbildung 4.17: Signal der TEMPO-Standardlösung $0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$

Das TEMPO-Signal einer am Morgen frisch hergestellten $0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ Lösung wurde über 10 Messtage²⁷ dreimal täglich aufgezeichnet, um die Stabilität der Stammlösung zu verfolgen. Da es sich um den qualitativen Vergleich verschiedener Messbedingungen für dieselbe Substanz in identischen Konzentrationen handelte, konnte für die Auswertung auf die zweifache Integration des Signals zur Flächenermittlung verzichtet werden. Anstelle dessen wurde zur Auswertung die Signalintensität des mittleren Peaks, sowie dessen Erscheinen bei einer Magnetfeld von 3373 G herangezogen. Für die Messungen ergab sich ein Variationskoeffizient von 1,98 % über den beobachteten Zeitraum. Aus den erhaltenen Daten ging somit hervor, dass die wässrige Lösung des TEMPO-Radikals eine sehr hohe Stabilität bezüglich ihrer paramagnetischen Eigenschaften besaß. Da die Stabilität der Stammlösung für zwei Wochen bewiesen war, wurde diese zweimal monatlich, wie im experimentellen Teil beschrieben hergestellt, und hieraus täglich frische $0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ -Lösung durch Verdünnen mit Wasser bereitet. Diese wurde vor Beginn der Messungen, sowie im Laufe der Messungen und am Ende des Messtages zur Kontrolle vermessen, um eventuelle Schwankungen in der Arbeitsweise der ESR aufdecken zu können.

²⁷ Zwei Zeitwochen

Die jeweiligen Ergebnisse wurden als valide angesehen, wenn die Standardmessungen über den Tag verteilt innerhalb festgelegter Grenzen lagen. Diese wurden in Anlehnung an die Vorgaben zur statistischen Prozessregelung berechnet [176].

4.5.2 Nachweis des Ascorbylradikals in 50 μL ESR-Kapillaren

Zunächst sollte eine qualitative Detektion und die Optimierung der Messparameter für das Ascorbylradikal vorgenommen werden. Hierzu wurde das Ascorbylradikal aus einer PBS- Lösung von Natriumascorbat unter der Verwendung von Fentons-Reagenz erzeugt und im Anschluss Untersuchungen an Kapillarblut durchgeführt.

Generierung des Ascorbylradikals *in situ*

Aus einer PBS-gepufferten $0,25 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ Natriumascorbatlösung (1 mL) wurde durch Zugabe von jeweils $20 \mu\text{L}$ $0,5 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ Mohr'schen Salzes in PBS und 30 % Wasserstoffperoxidlösung ein ESR-Spektrum aufgenommen und die Parameter für die Detektion des erscheinenden Dubletts optimiert. Als Standard zur Überprüfung der Integrität des Spektrometers diente, wie schon in vorausgegangenen Versuchen unter Verwendung der ESR, eine frisch bereitete $0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ Lösung des stabilen Nitroxidradikals TEMPO. Das charakteristische Spektrum wurde bei einer Feldstärke von 3380 G, Feldbreite 100 G über 30 s mit einer Modulationsamplitude von 1 G aufgenommen.

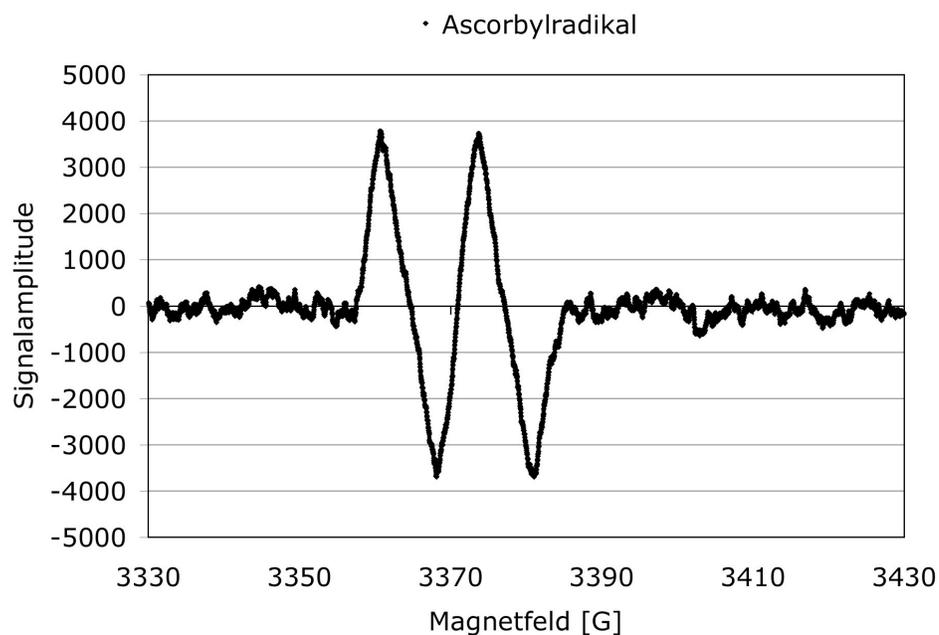


Abbildung 4.18: ESR-Signal des Ascorbylradikals aus $0,25 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ Natriumascorbatlösung. $B = 3380 \text{ G}$, Modulation 1 G .

Eine weitere Messung direkt im Anschluss aus derselben Lösung lieferte kein Signal mehr. Es war anzunehmen, dass eine rasche Elimination des Ascorbylradikals einerseits durch Dismutation aufgrund der hohen Konzentration an Phosphationen und andererseits ein eventuell oxidativer Abbau des Grundkörpers der Ascorbinsäure durch Hydroxylradikale, welche durch die Fenton-Bedingungen gebildet worden sein könnten.

Qualitative Nachweise aus Kapillarblut

Im nächsten Schritt sollte der Versuch unternommen werden, das Ascorbylradikal aus einer durch Punktion der Fingerbeere gewonnenen Kapillarblutprobe nachzuweisen²⁸. Aufgrund des geringen Probenvolumens wurden zunächst $50 \mu\text{L}$ Glaskapillaren als Probenbehältnisse verwendet. Es wurden Untersuchungen an kapillärem Vollblut,

²⁸Alle Proben stammten von einer gesunden Probandin (25 J.)

Serum²⁹ und Plasma³⁰ unter den unter 3.4 genannten Bedingungen durchgeführt. Die Probengewinnung erfolgte analog zur Beschreibung der Probennahme unter 3.4, Jedoch zeigte keine der genannten Proben Resonanz.

Die Konzentration des Ascorbylradikals im Blut gesunder Probanden ist von Natur aus sehr niedrig (Publizierte Konzentrationen schwanken zwischen $50 \frac{nmol}{L}$ [177] und $450 \frac{nmol}{L}$ [178]). Da die bekannten Daten für die Bestimmung ausnahmslos größeren als den im Rahmen der Zielsetzung anwendbaren Probenvolumina stammen, lag der Schluss nahe, dass es sich bei den Ursachen für das Ausbleiben eines Signals um Probleme hinsichtlich der Analytkonzentration handelte. In einer von Pietri et al. veröffentlichten Studie [143] wird vorgeschlagen, die quantitative Oxidation von Ascorbat zu Ascorbylradikal durch die Zugabe von DMSO zu einer Plasmaprobe zu erreichen. DMSO wird in unterschiedlichen Zusammenhängen innerhalb der Radikalchemie erwähnt. Unter anderem wird ihm ein stabilisierender Einfluss gegenüber radikalischen Strukturen mit Semichinonverwandtschaft zugesprochen [179]. Diese Eigenschaft spräche für den Einsatz von DMSO zur Unterstützung der Bildung von Ascorbylradikal in entsprechenden Kapillarblutproben.

Qualitative Nachweise unter Verwendung von DMSO

Entsprechend der von Pietri vorgeschlagenen Methode wurde die Ascorbylradikalbestimmung wie auf Seite 137 beschrieben, nach Zusatz von DMSO in variierenden Ansatzverhältnissen bei gleichen Bedingungen durchgeführt. Zusätzlich wurden in gleichem Umfang der Mischungsverhältnisse von Probe und DMSO $0,25 \frac{mol}{L}$ Natriumascorbat in PBS nach der Zugabe von Eisenionen ($20 \mu L$ $0,5 \frac{mol}{L}$ Mohr'sches Salz in PBS) und Wasserstoffperoxidlösung ($20 \mu L$ 30% H_2O_2) einer Untersuchung mittels ESR unterzogen. Auch hier diente TEMPO als Standardsubstanz zur Überprüfung der Messwerte. Wie in den vorausgegangenen Versuchsreihen zeigten weder kapillares Vollblut, noch Serum und Plasma Resonanz im ESR-Spektrum.

²⁹ Einminütiges Zentrifugieren in einem $0,5$ mL Eppendorf-Safelock-Vial bei $1000 \cdot g$ und Raumtemperatur

³⁰ Einminütiges Zentrifugieren in einer Lithium-Heparin Microvette bei Raumtemperatur und $1000 \cdot g$

Lediglich die unter Fenton-Bedingungen oxidierte Probe der Ascorbatlösung zeigte nach Zugabe von DMSO eine Resonanzaktivität unter starker Schaumentwicklung. Jedoch konnte anhand des Spektrums nicht auf das Ascorbylradikal geschlossen werden.

Möglicherweise wurde das Natriumascorbat in Verbindung mit DMSO mit einer Geschwindigkeit zu Ascorbylradikal oxidiert, die so groß war, dass die Eliminierung des Radikals ebenfalls zu einem Maß gesteigert wurde, die eine Detektion unmöglich macht. Das bei den für das Ascorbylradikal optimierten Parametern beobachtete, diffuse Signal könnte von einem intermediär auftretenden DMSO-Radikal-Kation herrühren, wie es von Petzold et al. [180] beschrieben wird. Auch ein aufgrund der hohen Modulation verfremdetes Spektrum des Methylradikals, welches durch die Gegenwart von Hydroxylradikalen aus DMSO dargestellt werden kann, wäre denkbar [181].

4.5.3 Erhöhung der Empfindlichkeit

Unter den bis hierhin gegebenen Bedingungen und Ansprüchen an das Testsystem schien die Konzentration an Ascorbylradikal in der zur Verfügung stehenden Probe nicht ausreichend groß, um ein Resonanzsignal zu detektieren. Die Zugabe von DMSO als unterstützendes Agens für die Bildung des Ascorbylradikals stellte einen Kompromiss gegenüber der gewünschten Nativität der Probe dar, welcher allerdings ebenfalls nicht zu der erhofften Detektierbarkeit des Ascorbylradikals führte. Der Versuch, die Konzentration des Analyten in der Probe zu erhöhen stellte somit nicht nur das Fallenlassen eines Anspruches an das Testsystem in der Entwicklung des Assays dar, er führte ausserdem nicht zum Ziel. Als Alternative für die Erhöhung der Konzentration des Analyten in der Probe blieb die Erhöhung der Empfindlichkeit des Analysensystems. Für die ESR kann dies durch die Verwendung eines Probengefäßes mit größerem Probenvolumen erreicht werden. Für das verbesserte Verständnis der hieraus resultierenden Vorteile, als auch der Probleme, sowie aus Gründen der Vollständigkeit wird an dieser Stelle ein Exkurs auf das Gebiet des technischen Aufbaus des Resonators und die Probenplatzierung im selben unternommen.

Aufbau des Resonators und Probenplatzierung

Wie unter 4.2.1 auf Seite 114 erwähnt, stellt die Resonatoreinheit innerhalb eines ESR-Spektrometers einen der Kernbausteine dar, durch dessen Aufbau und Eigenschaften, wie zum Beispiel die Geometrie des Hohlraumes, die analytischen Fähigkeiten der Methode maßgeblich beeinflusst werden [153]. An dieser Stelle sollen Zweck und Arbeitsweise der Resonatoreinheit kurz beschrieben werden. Prinzipiell ist die Mikrowellenabsorption einer Probe, ganz gleich welcher Natur, viel zu gering, um direkt als Transmission detektiert zu werden. Durch die Verwendung eines Hohlraumresonators, der als Probenkammer das eigentliche Spinsystem umgibt, kann dies anhand der Verwendung spezieller Keramikmaterialien jedoch möglich gemacht werden. Durch das Anlegen des Mikrowellenfeldes über einen Hohlleiter wird im Inneren des Resonators eine stehende Welle erzeugt. Innerhalb des mikrowellen-transportierenden Hohlleiters befinden sich die magnetische Komponente \vec{B} und die elektrische Komponente \vec{E} in Phase. Unter diesen Bedingungen wird Leistung transportiert. Dagegen besitzt das elektrische Feld der stehenden Mikrowelle im Resonatorinneren

einen Knoten lokalisiert an einem Ort, der von der Abmessung des Resonators abhängt, sowie bei selben Koordinaten ein Maximum für die magnetische Komponente der stehenden Mikrowelle. Die beiden Felder liegen innerhalb des Resonators um 90° ausser Phase, so dass keine Leistung transportiert wird [153].

In dem verwendeten ESR-Gerät Miniscope-200 der Firma Magnettech befindet sich eine Resonatoreinheit vom Typ TE_{102} [182]. Die Indices geben Anhaltspunkte zur Resonatorgeometrie, die die geometrischen Eigenschaften in Bezug auf die elektrische Komponente (TE_{102}) des Mikrowellenfeldes wie aus Abbildung 4.19 entnommen werden kann beschreiben. Aus der Grafik wird ausserdem die oben beschriebene Lokalisierung von Knoten und Maximum des elektrischen- (\vec{E}) und magnetischen Feldes (\vec{B}) ersichtlich. Diese befinden sich im Zentrum der Kavität, so ausgerichtet, dass sich das Maximum des magnetischen Feldes des Resonators in orthogonaler Orientierung zum von außen angelegten Magnetfeld B verhält.

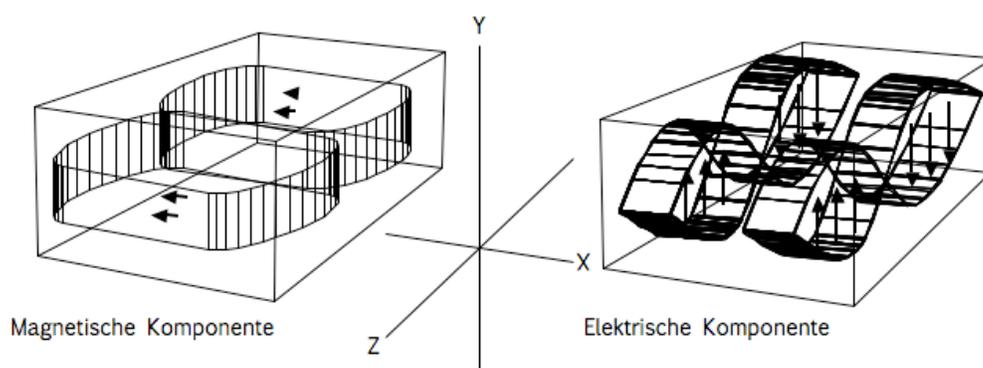


Abbildung 4.19: Feldausbreitung im Resonator des Typs TE_{102} bei stationärem Mikrowellenfeld

An der Kontaktfläche zwischen Mikrowellenleiter und Hohlresonator entsteht somit bezüglich des Energietransportes eine Grenzfläche. Wird nun durch die Anpassung des äusseren Magnetfeldes Resonanzabsorption in einer Probe erzeugt, und Mikrowellenenergie absorbiert, so entsteht eine Interferenz an der Grenzfläche zwischen Hohlleiter und Resonator und es kann durch die Entkopplung ein Signal gemessen werden. Die Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass sich die Probe des resonanten Spinsystems, beziehungsweise das ausserphasische Magnetfeld des Resonators, im 90° Winkel zum äusseren Magnetfeld befindet.

Für die optimale Platzierung der Spinsystemprobe ergeben sich zwei weitere prinzipielle Voraussetzungen. Aufgrund des günstigeren Signal-Rausch-Verhältnisses (SR-Verhältnis), sollte sich die Probe innerhalb des Resonators an einem Ort mit maximaler magnetischer Komponente \vec{B}_1 befinden³¹. Ferner sollte die elektrische Komponente \vec{E} innerhalb des Resonators am Ort der Probenplatzierung möglichst gering sein, da der dielektrische Energieverlust³² dort am niedrigsten ausfällt. Abbildung 4.19 lässt erkennen, daß sich die ideale Positionierung für eine Probe im Zentrum der Resonatorhöhle befindet, da hier prinzipiell alle drei Bedingungen erfüllt werden können [153].

Solange es sich bei der Spinprobe um eine Lösung oder eine Flüssigkeit handelt, die sich in einem zylindrischen Probengefäß befindet, hat aufgrund der Küvettensymmetrie die Ausrichtung innerhalb des Resonators keine Auswirkungen auf das Signal. Werden jedoch Küvetten anderer Geometrie verwendet, muss darauf geachtet werden, dass die Positionierung im Resonator der magnetischen Komponente der stehenden Mikrowelle im Resonator angeglichen, in perpendikularer Ausrichtung zum äußeren Magnetfeld erfolgt.

Empfindlichkeit der ESR-Messung in Abhängigkeit vom Probengefäß

Wie bereits erwähnt, lässt sich die Empfindlichkeit einer ESR-Messung durch den Einsatz eines Probenbehälters mit modifizierter Geometrie leicht beeinflussen. Zur Verfügung standen verschiedene zylindrisch geformte Glaskapillaren unterschiedlichen Innendurchmessers, sowie die Anwendung einer Flachzelle. Flachzellen zeichnen sich gegenüber den Rundkapillaren durch eine Flachsektion aus, deren Befüllung weniger Probenvolumen benötigt, als die ausreichende Füllung einer entsprechenden Rundkapillare.

Da die Probenmenge durch die vorausgesetzte Anwendung von Kapillarblut aus der Fingerbeere einen limitierenden Faktor darstellte, fiel die Wahl auf die Anwendung einer Flachzelle. Bei geringer Probenvolumenvergrößerung kann bei der Ver-

³¹ Unterhalb vollständiger Resonanz ist die von der Probe absorbierte Energiemenge proportional abhängig von $(\vec{B}_1)^2$ und je größer B_1 , desto größer das SR-Verhältnis

³² Dieser hat einen mindernden Einfluss auf das SR-Verhältnis.

wendung einer geeigneten Flachzelle die Sensitivität einer ESR-Messung erheblich gesteigert werden, da in der Detektionsebene, in der die weiter oben genannten magnetischen und elektrischen Bedingungen innerhalb des Mikrowellenfeldes gelten, im Vergleich zu einer Rundkapillare mehr potentiell resonante Spins zur Verfügung stehen.

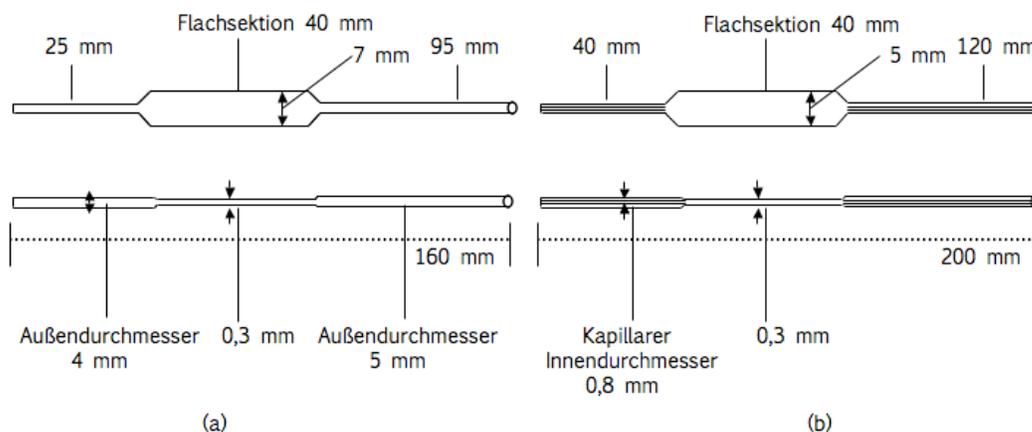


Abbildung 4.20: Flachzellen zur ESR-Messung: (a):Typ FZ-160 Magnettech, Berlin, (b) FZK-200 Magnettech, Berlin

Probleme bei der Verwendung von Flachzellen

In Hinblick auf die Verwendung von Kapillarblut, möglicherweise sogar daraus gewonnenem Plasma oder Serum als Probensubstanz, stellte das zur vollständigen Füllung der Flachsektion notwendige minimale Probenvolumen eine kritische Größe im Prozess der Assay-Entwicklung dar. Die für die Ascorbylradikalbestimmung ausgewählte Flachzelle (FZ-160) wurde in einer modifizierten Form eingesetzt (FZK-200), so dass sich oberhalb und unterhalb der Flachsektion ein Innendurchmesser kapillaren Ausmaßes von 0,8 mm ergab. Hierdurch konnte das zum vollständigen Befüllen der Küvette notwendige Totvolumen unterhalb der Flachsektion auf ein Minimum begrenzt werden.

Zum Befüllen der Flachsektion wurden Tuberkulinspritzen mit 0,4 x 40 mm Sterican Dentalkanülenaufsatz verwendet, mit denen ein durch die Abdichtung mit

Parafilm entstehendes Septum durchstoßen wurde. Hierdurch konnte gewährleistet werden, dass eine Probe direkt in den Zwischenraum der Flachsektion eingebracht werden konnte, ohne einen Probenverlust durch Totvolumen einzubüßen. Durch die ausreichend große Kapillarkraftwirkung innerhalb der Bereiche ober- und unterhalb der Probe, wurde das Auslaufen der Probe in senkrechter Haltung erschwert. Nach erneutem Abdichten des durchstochenen Septums mit einem weiteren Streifen Parafilm konnte eine Probe in senkrechter Lage im Spektrometer platziert werden, ohne dass Veränderungen bezüglich des Probenspiegels in der Küvette auftraten.

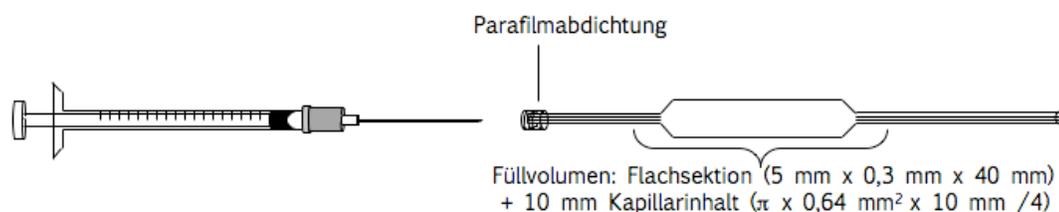


Abbildung 4.21: Befüllen und Abdichten der Flachzelle

Aufgrund der besonderen Bedingungen, die für die Resonanzzeugung innerhalb des Resonators herrschen müssen, war es notwendig, dass die Ausrichtung der verwendeten Flachzelle im Resonator mit der Resonanzebene in der Mitte des Resonators übereinstimmte. Die Küvettenhalterung am Probeneinlass des Miniscope-200 ESR-Spektrometers erlaubte den Austausch und die Verwendung unterschiedlicher Halterungen, die jedoch die freie Drehung der Probenröhrchen und Küvetten um die eigene Achse ermöglichen. Bei der Verwendung einer Kapillare oder eines Probenröhrchens hat dies keinen Einfluss auf die Bestimmung. Wird jedoch eine Flachzelle verwendet, hat schon die geringste Abweichung von der 90° Ausrichtung der Flachsektion gegenüber dem eingestrahlten Magnetfeld Auswirkungen auf die Detektion. Die Präzision der Bestimmungen ist ausserordentlich niedrig, wie aus dem weiter unten beschriebenen Versuch zum Vergleich der unterschiedlichen Bauweisen der in Abbildung 4.20 abgebildeten Flachzellen deutlich wird.

Der Abgleich von Mikrowelle, Elektromagnet und Detektor kann von dem Miniskope-200 automatisch oder manuell durch den Versuchsdurchführenden geregelt werden. Da der manuelle Abgleich bedeutend höheren Zeitaufwand bedeutet und in vielen

Fällen die kurze Lebensdauer von radikalischen Spezies den großzügigen Umgang mit Zeit im Rahmen eines ESR-Experimentes nicht zulässt, wurde in der gesamten Versuchsdurchführung auf den manuellen Abgleich verzichtet, und die automatische Justierung der entsprechenden Parameter zugelassen. Dieses Vorgehen birgt jedoch den Nachteil, dass das Gerät bei ungenauer Ausrichtung der Probe im Resonator die benötigte Justierung nicht ausführen kann. Eine Korrektur der Position ist in einem solchen Fall häufig notwendig und aufwendig, da sich die Küvette nach dem Einführen in den Probeneinlass der Sicht des Experimentierenden entzieht.

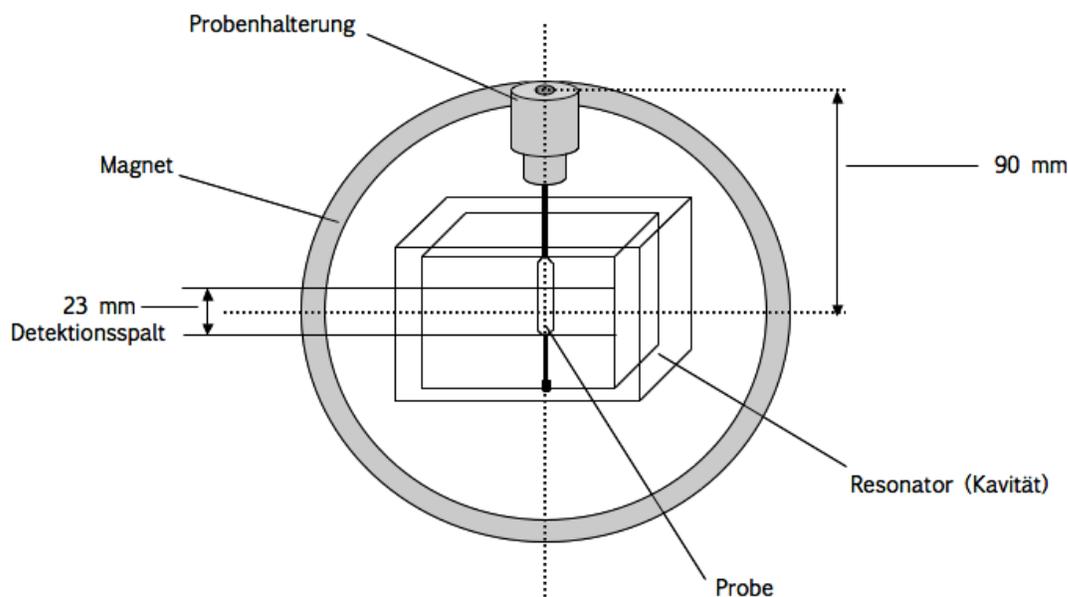


Abbildung 4.22: Probenpositionierung im ESR-Spektrometer

Um die Problematik der reproduzierbaren 90°-Ausrichtung der Flachzelle zu umgehen, wurde von der Firma Magnetech eine spezielle Halterung mit entsprechendem Passung an der Küvette entwickelt, die es ermöglichte, die Flachzelle reproduzierbar in der entsprechenden räumlichen Ausrichtung im Resonator zu positionieren.

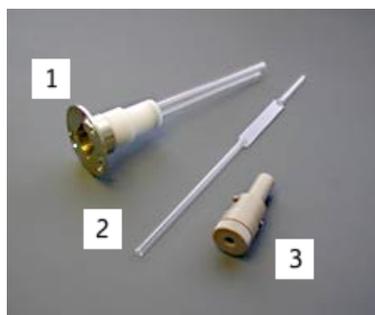


Abbildung 4.23: (1): Probenhalterung mit Aussparung für die Küvetten-Passung, (2:) Flachzell-Küvette Typ FZ-160, (3): Küvetten-Passung für die reproduzierbare Platzierung in (1)³³.

In einem Vergleichsexperiment sollten Messungen mit den zwei verschiedenen Flachzellen FZ-160 und FZK-200 beide von der Firma Magnettech, Berlin, durchgeführt werden. Hierbei wurde die Küvette vom Typ FZ-160 frei drehbar im Resonator platziert und die Küvette vom Typ FZK-200 kam unter der Verwendung einer entsprechenden Halterung mit Passung zum Einsatz. Verglichen werden sollten die Methodenpräzisionen unter der Verwendung der zwei verschiedenen Küvetten. Hierzu wurde die unter 4.5 beschriebene wässrige $0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ -Lösung des stabilen Nitroxidradikals TEMPO aus der ebenfalls unter diesem Punkt beschriebenen Stammlösung hergestellt. Diese wurde mit Wasser im Verhältnis 4:6 verdünnt. Die entstehende Standardlösung besaß eine TEMPO-Konzentration von $0,04 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$.

Für die Verwendung der FZ-160 Küvette werden keine Werte gegenüber sechs Werten von der FZK-200 Küvette angegeben, da aufgrund der oben genannten Schwierigkeiten bei der Justierung nach der Platzierung der Probe im Resonator selbst nach drei aufeinanderfolgenden Tagen kein Spektrum erhalten werden konnte. Das Experiment wurde nach dieser Dauer abgebrochen, und die Entscheidung für die Küvette FZK-200 gefällt. Hieraus lässt sich deutlich der Vorteil des Einsatzes der Probenhalterung erkennen. Nach dem Einsetzen der Probe in dieselbe konnte nach der automatischen Justierdauer von bis zu maximal einer 30 Sekunden sofort gemessen werden.

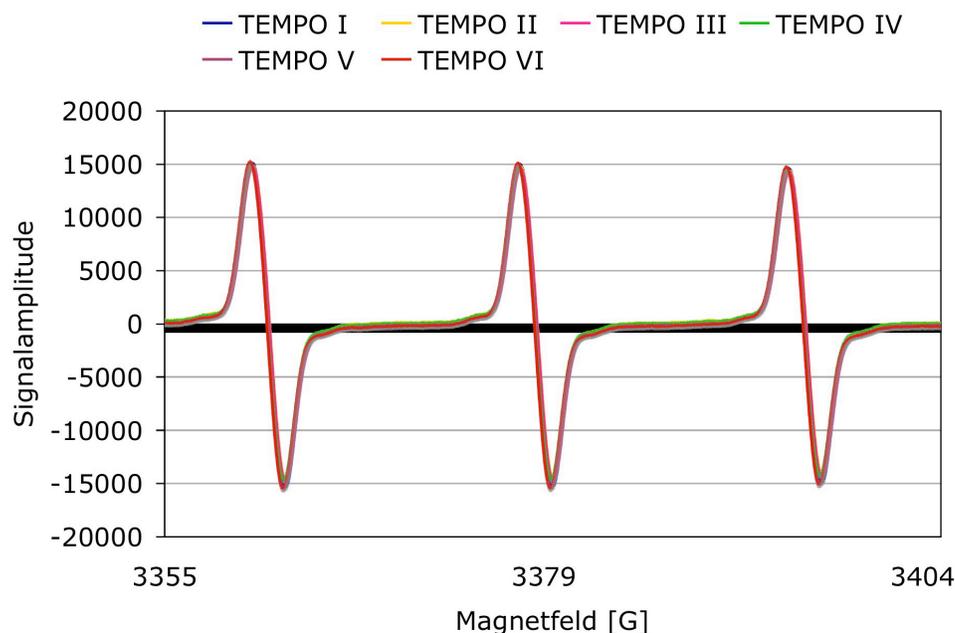


Abbildung 4.24: Bestimmung der Präzision unter Verwendung der FZK-200 Küvette

Die Signalauswertung erfolgte mittels zweifacher Integration des Gesamtsignals durch die Software Analysis 2.0. Es ergab sich eine mittlere Signalintensität von 74 Flächeneinheiten (AU) mit einer Standardabweichung von 3 AU und einem Variationskoeffizienten von 4,27 % für die beschriebene Bestimmung.

Vergleich der Empfindlichkeit unter Verwendung von Flachzellen und Kapillaren

Zur Ermittlung der Empfindlichkeitssteigerung durch die Verwendung der Flachzelle wurde ein Versuch zum Vergleich mit der Anwendung von Rundkapillaren durchgeführt. Hierzu wurden aus einer $0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ TEMPO-Lösung durch Verdünnen mit Wasser zehn unterschiedliche Konzentrationsniveaus hergestellt und sowohl in $50 \mu\text{L}$ Kapillaren, als auch in der Flachzelle FZK-200 mit Halterung und Passung jeweils dreimal vermessen und die Werte gemittelt. Die Lösungen wurden im Kühlschrank aufbewahrt und vor der Messung zehn Minuten bei Raumtemperatur gelagert, um eine vergleichbare Proben­temperatur zu erreichen.

Die Auswertung erfolgte, wie bei der Bestimmung der Präzision anhand der Gesamtfläche des TEMPO-Spektrums nach Doppelintegration durch das Programm Analysis. Aus den Steigungen der hieraus erhaltenen Kalibriergeraden lässt sich die Empfindlichkeit der Methode für die jeweilig verwendete Küvette ermitteln.

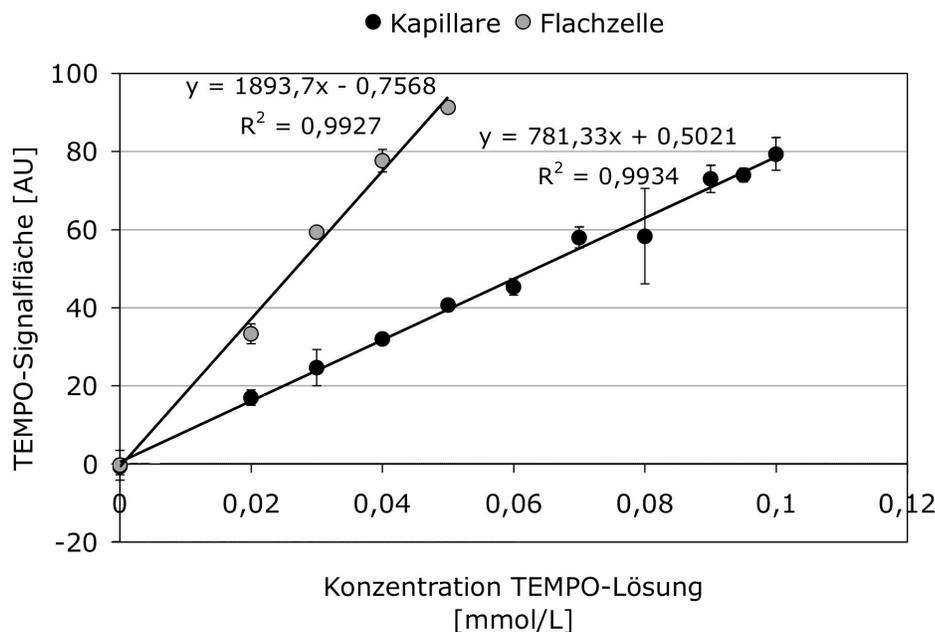


Abbildung 4.25: Verdünnungsreihe einer wässrigen TEMPO-Lösung bestimmt in $50\mu\text{L}$ Kapillaren im Vergleich zur Bestimmung in einer Flachzelle vom Typ FZK-200

Für die mit $50\mu\text{L}$ Kapillaren bestimmte Gerade ergab sich ein linearer Korrelationskoeffizient von 0,9992. Die ermittelte Steigung betrug $789,59 \frac{\text{AU}}{\frac{\text{mmol}}{\text{L}}}$. Die Bestimmung in der Flachzelle war erst ab einer Verdünnung von 1:1 der Standardlösung, also einer Konzentration von $0,05 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ möglich, da die Signalhöhen bei höheren Konzentrationen ausserhalb des Detektionsbereiches lagen. Für die verbleibenden Konzentrationen ergab sich eine Gerade mit der Steigung $1923,33 \frac{\text{AU}}{\frac{\text{mmol}}{\text{L}}}$ und einem linearen Regressionskoeffizienten von 0,9898.

Aus den Werten wird ersichtlich, dass durch die Verwendung der Flachzelle eine Steigerung der Empfindlichkeit um den Faktor 2,4 erreicht werden konnte. Durch die Anwendung der Flachzelle konnte im Spektrum eines *in situ* erzeugten Ascor-

bylradikals bei der Verwendung einer Modulation von 600 mG sogar teilweise die deutlichere Hyperfeinstruktur des Ascorbylradikal-Signals andeutungsweise sichtbar gemacht werden.

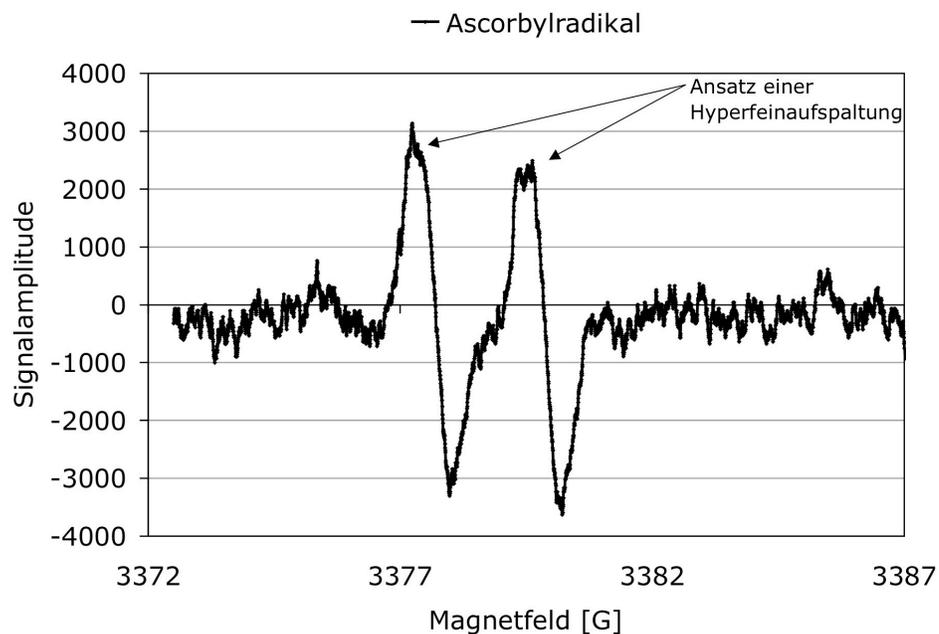


Abbildung 4.26: Signal eines *in situ* erzeugten Ascorbylradikals aufgenommen in einer Flachzelle vom Typ FZK-200. $B=3380$ G, Modulation 600 mG, Feldbreite=15 G.

Für die weiteren Versuche unter Verwendung der Flachzelle wurde analog zur Standardisierung für die Verwendung der Kapillare eine Vorschrift zur Überprüfung der ESR-Messung anhand eines TEMPO-Standards festgelegt. Hierzu kam die Lösung VIII ($c=0,04 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$) aus dem vorausgegangenen Empfindlichkeitsversuch zum Einsatz. Zur Überprüfung des ESR-Spektrometers wurde diese Standardlösung frisch aus der TEMPO-Stammlösung durch Verdünnen mit Wasser hergestellt und vor Messbeginn, sowie mehrmals täglich und am Ende eines Messtages in der Flachzelle vermessen.

4.5.4 Qualitativer Nachweis des Ascorbylradikals in Flachzellen

Aus den Untersuchungen zur Veränderung der Methodenattribute durch den Wechsel des Probenbehältnisses ging hervor, daß dieser Schritt die erwünschte Empfindlichkeitssteigerung der Methode herbeiführte. Aufgrund der somit erreichten Versuchsbedingungen für den Nachweis des Ascorbylradikals wurden die Experimente zum qualitativen Nachweis der gesuchten Spezies in den biologischen Proben Kapillarblut und den hieraus gewonnenen Untersuchungslösungen Serum und Plasma analog zu den Versuchen in 50 μL - Kapillaren wiederholt. Als Standard dienten die bereits beschriebene TEMPO-Lösung.

Die Befüllung der Küvette erfolgte, wie bereits beschrieben, mittels Tuberkulin-Einmalspritzen und Dentalkanülen nach Durchstechen eines provisorischen Septums aus Parafilm wobei besonders auf eine blasenfreie Injektion geachtet werden musste. Nach jeder Messung wurde die Küvette mehrfach in einer festgelegten sequenziellen Abfolge mit verschiedenen Lösemitteln gespült, um die vollständige Entfernung der jeweiligen biologischen Probe zu gewährleisten. Dabei war besonders darauf zu achten, dass die Reihenfolge der Lösemittel genau eingehalten wurde, da es ansonsten leicht zu Proteinfällungen in der Küvette kommen konnte, die die Benutzung derselben durch die Dauer eines langwierigen Reinigungsprozesses verzögerten. Die Küvette wurde in der Reihenfolge mit PBS, Natronlauge, HCl, Isopropanol, Ethanol, Druckluft gereinigt. Lauge und Säure dienten hier der Entfernung eventueller Proteinreste, die organischen Lösemittel mit niedrigerem Dampfdruck dienten der erleichterten, vollständigen Flüssigkeitsentfernung durch Druckluft. Wie schon in den vorausgegangenen Versuchen unter Verwendung von Kapillaren als Probenbehältnisse, wurde unter den gewählten Bedingungen kein Ascorbylradikal detektiert.

Tabelle 4.5: Lösemittel und Schritte zur Reinigung der Flachzelle

Lösemittel	Beschreibung
PBS	Calciumfrei, magnesiumfrei
Natronlauge	0,1 $\frac{mol}{L}$
Salzsäure	0,1 $\frac{mol}{L}$
Isopropanol	70 %
Ethanol	96 %
Druckluft	zum Trocknen

Zusatz von DMSO in einer Flachzelle

Korrespondierend zu den unter 4.5.2 beschriebenen Messungen wurde die möglicherweise konzentrationssteigernde Wirkung von DMSO auf die analog zu 4.5.3 gewonnenen Proben untersucht. Der Erfolg in Bezug auf die Detektion des Ascorbylradikals blieb aus. Die Zugabe von DMSO zu Vollblut erbrachte Haemolyseerscheinungen und die Zugabe zu Serum, als auch zu Plasma, verursachte eine Proteinfällung, so dass die Probe nicht in die Küvette injiziert werden konnte.

Die Verwendung von Vollblut als Probenmatrix wurde in diesem Versuchsansatz als Testflüssigkeit disqualifiziert, da die anschließende Reinigung der Flachzelle einen Umfang einnahm, der das Einwirken einer verdünnten Schwefelsäurelösung über Nacht beinhaltete, und somit nicht mit dem angelegten Kriterium der technischen Anwendbarkeit an einem Kollektiv mehrerer Probanden vereinbar war. Ferner konnte eine Beeinflussung der Ergebnisse durch interindividuell schwankende Haematokritwerte nicht ausgeschlossen werden. Dieser Einfluss entfiel bei der Entfernung der Erythrocyten durch Zentrifugation. Für die folgenden Versuche wurde Plasma als Testflüssigkeit ausgewählt, da es aufgrund aller vorhandenen Gerinnungsfaktoren und der Nähe zur Interstitialflüssigkeit, die *In vivo*-Situation besser modellhaft widerspiegelt, als das von Gerinnungsfaktoren befreite Serum [74].

Variation der Probengewinnungsbedingungen

Die Überlegung, dass das Ascorbylradikal während des Zentrifugationsprozesses eventuell schon durch Eliminationsreaktionen der Detektion entzogen werden könnte,

fürte zu einer Variation der Probenbereitungsbedingungen. Die besprochenen Eliminationsmechanismen des Ascorbylradikals sind durch pH-Wert und Temperatur, sowie die Ionenstärke der Lösung beeinflussbar. Für die enzymatischen Wege wird dies durch die enzyspezifischen Optimalbedingungen deutlich [171, 183].

Der Haupteliminationsweg des Ascorbylradikals über den Disproportionierungsmechanismus ist sehr stark vom pH-Wert abhängig. Da ein Verdünnungseffekt aufgrund der per se niedrigen Konzentration des Ascorbylradikals vermieden werden sollte, wurde eine etwaige Verschiebung des pH-Wertes durch die Zugabe eines Puffers um eine Stabilisierung des Ascorbylradikals während des Zentrifugationsprozesses herbeizuführen, jedoch im Vorfeld ausgeschlossen.

Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante lässt sich mit der Anwendung der Arrheniusgleichung durch

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_A}{R \cdot T}}$$

beschreiben.

k : Geschwindigkeitskonstante der Dismutationsreaktion

A : Kollisionskonstante

E_A : Aktivierungsenergie der Reaktion

R : Ideale Gaskonstante

T : Absolute Temperatur

Hieraus wird deutlich, dass die Geschwindigkeit der Reaktion von der Häufigkeit der Kollisionen der an der Reaktion beteiligten Moleküle, und damit von der Temperatur abhängt.

Wenn durch die erhöhte Inzidenz an Zusammenstößen einzelner Ascorbylradikale in der Zentrifugationslösung die Geschwindigkeit der Eliminierung des Radikals erhöht wurde, und final zu einer fehlenden Resonanz im ESR-Spektrum führte, konnte die Kühlung der Probe während des Zentrifugationsprozesses dies verhindern, oder

zumindest verlangsamen, so dass es möglich werden würde, ein Signal des Ascorbylradikals zu erhalten.

Die Verwendung einer Kühlzentrifuge³⁴ erbrachte nach Zentrifugation von 150 μL Kapillarblut in lithiumheparinisierten Microvetten bei 4° den gewünschten Erfolg. Das Ascorbylradikal wurde als leichte Welle im Spektrum bei 3372 G detektiert. Es erfolgte eine Parameteranpassung zur Optimierung des erhaltenen Spektrums, welche in Tabelle 4.6 dargestellt sind.

Tabelle 4.6: Methodenparameter für die Bestimmung des Ascorbylradikals aus humanem Kapillarblut

Parameter	Einstellung am Miniscope MS 200
Magnetfeld	3371 G
Feldbreite	15G
Scandauer	12 s
Scanzahl	4
Datenpunkte	4096
Modulation	600 mG
Verstärkung	900

Wie in den vorausgegangenen Versuchen diente die wässrige $0,04 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ TEMPO-Lösung als Standard zur Überprüfung des Spektrometers.

4.5.5 Technische Entwicklung des Assays

Nach dem qualitativen Nachweis des Ascorbylradikals aus kapillarblutbasiertem Plasma folgte die technische Umsetzung, welche die Anwendung des Systems an Probanden ermöglichen sollte. Das Hauptproblem in der Umsetzung lag bei dem für die Bestimmung notwendigen Probenvolumen. Als Hauptkriterium für die Anwendung an Probanden innerhalb kosmetischer Studien bestand nach wie vor die Verwendung einer mikroinvasiven Probengewinnung, also der Verwendung von sehr geringen Volumina an Blut. Diese Forderung steht in direktem Konflikt mit a) der Verwendung einer Flachzelle zur Aufnahme des Spektrums, da für die reproduzierbare Füllung der Flachsektion mindestens 75 μL Probenflüssigkeit benötigt wurden und b) der Verwendung von Plasma als Testflüssigkeit, bei der etwas weniger als die Hälfte

³⁴ Eppendorf 5417 R, Eppendorf AG, Hamburg

des Probenvolumens³⁵ durch das Abtrennen der Erythrocyten für die Befüllung der Flachzelle nicht zur Verfügung steht [184].

Ein weiteres Kriterium zur Anwendung des Testsystems beinhaltete eine möglichst kurze Zentrifugationsdauer, da die Probe nach Möglichkeit wenig belastet werden sollte, um einen möglichst realen Wert, nah an der Situation *in vivo* zu liefern. Dies wiederum stellte dieselbe Konfliktsituation, wie die oben beschriebene Verwendung möglichst geringer Probenvolumina.

Sowohl die Probengewinnung, als auch die Probenbereitung stellten somit die Forderung eines Kompromisses mit der Art und der Anwendung der Testflüssigkeit.

Entwicklung des Probenzugs

Für die Umsetzung der Bedingungen für die Probengewinnung wurden weitere Anforderungen formuliert, um eine möglichst optimale und schnelle Messung zu gewährleisten. Das Hauptproblem bestand in der Gewinnung einer ausreichenden Probenmenge, die nach der Zentrifugation zu einem Probenvolumen von 75 μL Plasma in der Flachzelle führen sollte. In Kapitel 3.4 wurde bereits die Problematik einer durch Scherbelastung möglicherweise veränderten Kapillarblutprobe erwähnt. Es sollte aus denselben Gründen auch für die Bestimmung des Ascorbylradikals bei der Gewinnung der Probe möglichst geringer Druck von aussen auf die Punktionsstelle einwirken. Da für die Gewinnung von etwa 80 μL Plasma³⁶ etwa 150 μL kapillares Vollblut benötigt wurden, war dies jedoch nahezu unvereinbar mit der Forderung keinen Druck von aussen anzulegen.

Die kapillare Strombahn im menschlichen Blutkreislauf dient, wie schon eingangs erwähnt, der Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen und dem Gasaustausch zwischen Herz und Lungenkreislauf. Weitere, wichtige Aufgaben kommen diesem Kreislauf ausserdem bei der Thermoregulation und der Aufrechterhaltung des Gesamtblutdruckes zu. Dementsprechend kann die Nutzung des kapillaren Strombettes den vorherrschenden Bedingungen und den Bedürfnissen des Körpers angepasst werden [33, 74].

³⁵ Zwischen 42% und 47%

³⁶ Hier wurde mit einem etwaigen Verlustzuschlag von 5 μL Probenvolumen kalkuliert

Zwei entscheidende Regulatoren in diesem Zusammenhang stellen die arteriovenösen Anastomosen³⁷ und der Sphincter precapillaris³⁸ [185] dar.

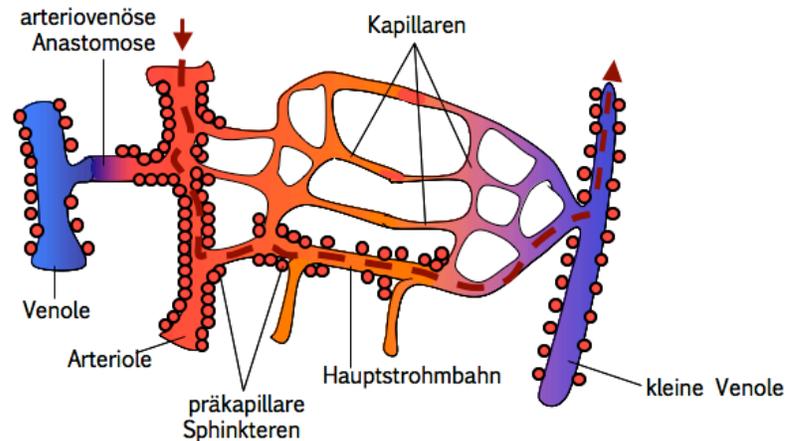


Abbildung 4.27: Schematische Übersicht über die humane kapillare Strombahn

Bei erhöhtem Blutdruck und gesteigerten Temperaturen werden die Zuflüsse zu den Kapillaren für den Blutstrom geöffnet. Die Überbrückung der Kapillaren durch die Anastomosen wird durch das Schliessen dieser herunterreguliert wohingegen auf der Seite der Arteriolen eine Öffnung der Sphinkteren zum selben Resultat führt.

Vor dem Hintergrund dieser Tatsachen wurde der Probenahme von Probanden eine Sequenz von gymnastischen Übungen in Kombination mit Wärmebehandlung der Finger vorangesetzt. Innerhalb der Akklimatisierungszeit von zehn Minuten unter den bekannten Standardbedingungen erfolgte die Wärmebehandlung der Hände durch fünfminütiges Halten eines Natriumacetat-Latentwärmespeichers in Kissenform, mit einer Temperatur von 48-52°C, sowie die Erhöhung des Blutdruckes in den Akren der Hände durch schnelles, aufeinander folgendes Ballen der Fäuste und Strecken der Finger für 30 Sekunden. Nach der, wie unter 3.4 beschriebenen Desinfektion der Einstichstelle, erfolgte die Punktion der Haut mit einer Einmallinganzette größeren Nadeldurchmessers und weiterer Eindringtiefe im Vergleich zu den im Rahmen des FORT-Tests verwendeten Einmallinganzetten³⁹.

³⁷ Shunt-Verbindungen zwischen kleinen Blutgefäßen, wie Arteriolen und Venolen, die die nachgeschaltete Strombahn bei Öffnung überbrücken

³⁸ In der Gefäßmedia lokalisierte, glattmuskuläre Struktur, die dazu in der Lage ist, bei Kontraktion die Arteriolen vollständig zu verschließen

³⁹ Unistik 2 extra, Nadeldurchmesser: 0,8 mm, Eindringtiefe: 3 mm, Owen Mumford

Um einen etwaigen Probenverlust zu verhindern, sollte das entnommene Vollblutvolumen direkt der Zentrifugation zuführbar sein. Hierzu wurden Microvetten der Firma Sarstedt verwendet, die speziell für die Probennahme kapillarvaskulärer Aliquote bestimmt sind und die entsprechenden Gerinnungshemmer zur Gewinnung von Plasmaproben als Beschichtung bereits mitführen⁴⁰. Die Probennahme gestaltete sich jedoch kompliziert, da häufig Verluste durch unruhiges Verhalten der Probanden zu verzeichnen waren.

Um diese Problematik zu überwinden, wurde eine Probenzugseinheit entwickelt, welche aus der Kombination einer Tuberkulinspritze, welcher die Luer-Lock-Spitze abgeschnitten wurde, mit der entsprechenden Microvette bestand. Diese konnte gewährleisten, dass der austretende Tropfen Kapillarblut kontinuierlich abgenommen werden konnte, ohne den während der Blutentnahme festgehaltenen Probandenfinger loszulassen. Aufgrund dieser Eigenschaften und aus Gründen der Einfachheit wurde der Kapillarblutentnahmehilfe der Name „Nosferatu“ verliehen.

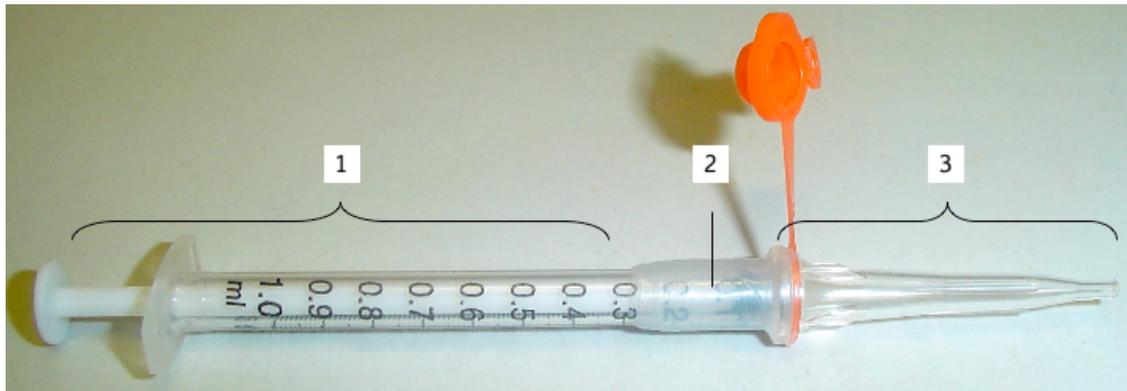


Abbildung 4.28: „Nosferatu“-Probenzugseinheit: (1): Tuberkulinspritze, (2): Parafilmabdichtung, (3): Microvettenaufsatz ohne Verschlusskappe

Durch die beschriebenen Maßnahmen konnte problemlos ein Volumen von $150 \mu\text{L}$ Kapillarblut entnommen werden, ohne Druck an die Punktionsstelle anzulegen. Die Prozedur wurde lediglich, wenn notwendig, durch eine leichte Massage im Bereich der Mittelhandwurzelknochen der entsprechenden Finger unterstützt.

⁴⁰ Microvette CB-300, Sarstedt AG Co, Nümbrecht

Bestimmung der optimalen Zentrifugationsdauer

Die Zentrifugationsdauer sollte so gering wie möglich gehalten werden. Die Nativität und die Eliminationsgeschwindigkeit des Ascorbylradikals stellen die analytische Komponente unter den Forderungen für die zeitliche Minimierung dieses Schrittes. Ein technisches Argument stellt die Einschränkung der Gesamtdauer der Testdurchführung dar. Je zeitintensiver sich die Untersuchung darstellt, desto weniger Probanden pro Tag können untersucht werden. Da es aus Gründen sowohl der Vergleichbarkeit, als auch der Reproduzierbarkeit günstig ist, möglichst alle Experimente unter denselben Bedingungen durchzuführen, wurde dies als Kriterium für einen optimalen Testablauf bei der Entwicklung vorausgesetzt.

Die größte Schwierigkeit bei der Entwicklung stellte, wie schon mehrfach erwähnt, die vollständige und reproduzierbar blasenfreie Befüllung der Flachzelle mit einer ausreichenden Menge Plasma dar. Demgegenüber stand die beschriebene Forderung nach einer möglichst geringen Zentrifugationsdauer. Es wurde daher ein Versuch zur Ermittlung der minimal notwendigen Zentrifugationsdauer durchgeführt. Hierfür wurde fünf Tage in Folge mit der Nosferatu-Kapillarblutentnahmehilfe Kapillarblut einer Testperson entnommen, für verschiedene Dauer zentrifugiert und anschließend in die Flachzelle injiziert. Hierbei wurde mit einer Minute Zentrifugationszeit begonnen, und die darauffolgende Probe für eine Dauer im Intervall von einer zusätzlichen Minute behandelt. Um zu vermeiden, dass sich ein Trainingseffekt bei der Befüllung der Küvette einstellte, wurden an jedem Tag alle Zentrifugationszeiten verwendet. Als optimale minimale Dauer wurde die Zentrifugationszeit bei 4°C angenommen, bei der an allen fünf Tagen die Küvette blasenfrei und ohne Erythrocyteneintrag befüllt werden konnte. Als maximal akzeptable Zentrifugationszeit wurden acht Minuten festgelegt⁴¹.

Es stellte sich heraus, dass nach einer Zentrifugation von vier Minuten eines durchschnittlichen Probenvolumens von 150 μL die Erythrocytensedimentation bereits fortgeschritten genug war, um die Küvette problemlos zu befüllen, so dass diese Zeit als Zentrifugationsdauer für die folgenden Untersuchungen festgelegt wurde.

⁴¹ Da sich für dieses Experiment lediglich eine einzelne Person bereit erklärte, sollten nicht mehr, als acht unterschiedliche Proben an einem Tag genommen werden, um sicherzustellen, dass zwei Finger unpunktiert belassen werden konnten.

Tabelle 4.7: Optimierung der Zentrifugationsdauer

Zeit [min]	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
1	-	-	-	halb	-
2	halb	halb	Blasen	halb	-
3	Blasen	Blasen	blasenfrei	blasenfrei	Blasen
4	blasenfrei	blasenfrei	blasenfrei	blasenfrei	blasenfrei
5	blasenfrei	blasenfrei	blasenfrei	blasenfrei	blasenfrei
6	blasenfrei	blasenfrei	blasenfrei	blasenfrei	blasenfrei
7	blasenfrei	blasenfrei	blasenfrei	blasenfrei	blasenfrei
8	blasenfrei	blasenfrei	blasenfrei	blasenfrei	blasenfrei

Als Nächstes sollten ein passendes Antikoagulationsmittel für die Plasmagewinnung sowie eine günstige Zentrifugationstemperatur festgelegt werden. Da die Ergebnisse dieser Untersuchungen durch eine Aussage über die Signalintensität erhalten werden sollten, also über die Menge des von der Zentrifugationstemperatur beziehungsweise des verwendeten Antikoagulans abhängigen, in der Probe enthaltenen Ascorbylradikals, war es notwendig, selbiges einer quantitativen Bestimmung zugänglich zu machen. Die Konzentrationsbestimmung des Ascorbylradikals gestaltet sich relativ aufwändig und soll daher in einem eigenen Kapitel beschrieben werden.

4.5.6 Quantitative Bestimmung des Ascorbylradikals

Da das Ascorbylradikal nicht quantitativ aus einer Ascorbinsäurelösung erzeugt werden kann, ist es nicht möglich eine Kalibrierung mittels einer chemisch identischen Referenzsubstanz vorzunehmen. Die Bestimmung ist also ausschließlich über Standardsubstanzen möglich. An eine solche Standardsubstanz werden zahlreiche Anforderungskriterien angelegt. So sollte eine ausgewählte Verbindung ein ESR-Spektrum liefern, welches dem der zu untersuchenden Substanz in Bezug auf die Lage im Magnetfeld ähnlich war. Voraussetzung hierfür ist eine gewisse chemische Ähnlichkeit der Strukturen, sowie eine ähnliche Spinlokalisierung innerhalb des Moleküls. Ferner musste ausgeschlossen werden können, dass die Standardsubstanz in der zu untersuchenden Analyse vor der Zugabe der Standardlösung zugegen war, da ansonsten keine richtigen Ergebnisse erhalten werden können [147].

Als Standards für die ESR-Spektroskopie kommen Verbindungen in Frage, deren Spinanzahl definiert und über die Zeit stabil ist. Ferner müssen sie sich in geeignetem Volumenumfang im Konzentrationsbereich der Probe dosieren lassen können und im Optimalfall ist es möglich, beide Substanzen bei identischen Messparametern zu bestimmen. Solange sich die Resonanzbedingungen für die Elektronenspins der Probe von denen der Standardsubstanz genügend unterscheiden, und es somit im Spektrum nicht zu Überlagerungen kommt, kann eine Standardsubstanz der Probe als interner Standard zugesetzt werden.

Die Konzentration des Ascorbylradikals im menschlichen Blutplasma bewegt sich, wie bereits erwähnt, im nanomolaren Bereich. Die publizierten Werte liegen bereits sehr nah an der Nachweisgrenze der ESR-spektroskopischen Methode. Die Einbußen bezüglich der Detektierbarkeit durch Verdünnungseffekte bei der Zugabe einer Standardlösung waren zu groß, um diese Vorgehensweise realisieren zu können. Es blieb daher nur die Möglichkeit einer externen Kalibrierung über eine dem Ascorbylradikal ähnliche Substanz, die möglichst weitgehend die oben beschriebenen Kriterien erfüllte.

Externe Kalibrierung

Eine Verbindung, welche die angelegten Kriterien für eine externe Eichung sehr gut erfüllt, ist das zu den stabilen Nitroxylradikalen zählende 3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidin-1-oxyl (3-Carboxy-PROXYL, oder CPO) [142]. Das CPO liefert aufgrund eines günstigen Signal-Rausch-Verhältnisses und einer gegenüber den Sechsringnitroxylradikalen, wie TEMPO und TEMPOL niedrigeren Linienbreite ein gutes Referenzspektrum für das Ascorbylradikal, welches sogar bei denselben Messparametern erhalten wird.

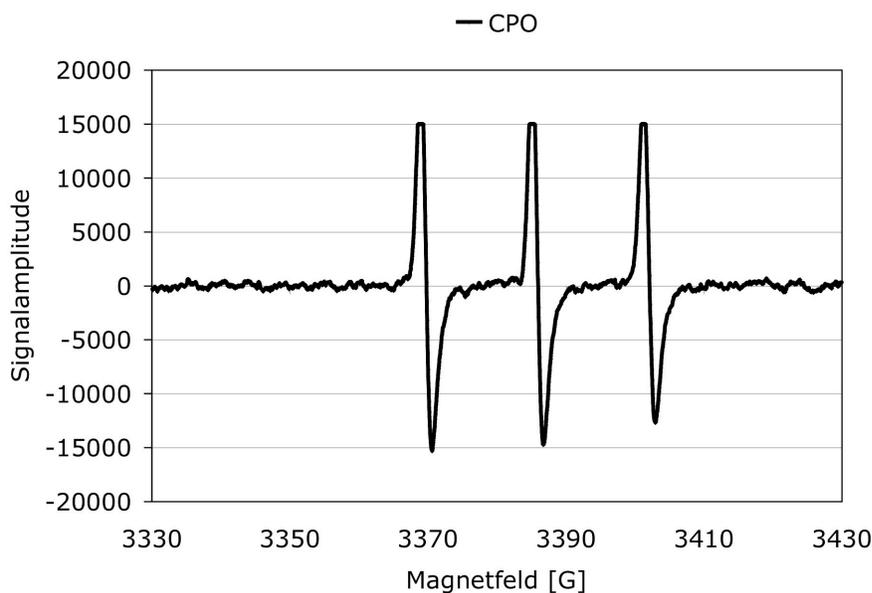


Abbildung 4.29: ESR-Signal einer Lösung von CPO in PBS $c=5 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$ $B=3380 \text{ G}$,
 Feldbreite=100 G, Modulation=1000 mG

Die Fläche des Absorptionssignals einer Probe verhält sich proportional zu der Anzahl der resonanten Spins in derselben, solange es nicht zu Spinsättigungsphänomenen kommt. Bei identischer Spektrenaufspaltung, Linienbreite und identischen Messparametern wäre eine Absolutbestimmung der Ascorbylradikalmenge anhand der Signalamplitude denkbar. Jedoch unterscheiden sich die Spektren des CPO und des Ascorbylradikals in der Hyperfeinaufspaltung, so dass eine Auswertung der Kalibrierung und die Gehaltsbestimmung des Ascorbylradikals über die Fläche unter der Kurve und unter Berücksichtigung eines Formfaktors erfolgen muss.

Für den Fall ausbleibender Spinsättigung gilt für die Eichung folgende Beziehung:

$$S_{\text{Probe}} = S_{\text{Standard}} \cdot \frac{A_{\text{Probe}}}{A_{\text{Standard}}}$$

S : Spinzahl

A : Fläche

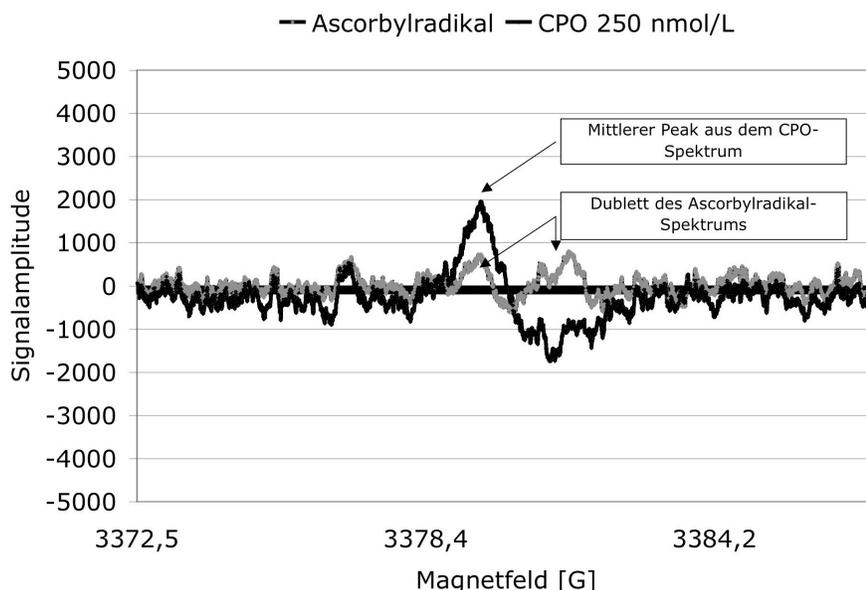


Abbildung 4.30: Überlagerte Signale einer Lösung von CPO in PBS $c=250 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$ und einer humanen Plasmaprobe bei den für das Ascorbylradikal optimierten Parametern $B=3380 \text{ G}$, Feldbreite=15 G, Modulation= 600 mG

Für die Gehaltsbestimmung wurde die Fläche des mittleren CPO-Peaks (vergleiche Abbildung 4.29) mit der Fläche des ersten Peaks im Dublett des Ascorbylradikals verglichen. Die Wahl fiel auf diese Signale, da beide bei identischen Messbedingungen bei einem ähnlich starken Magnetfeld B im Spektrum erscheinen (siehe Abbildung 4.30). Ausserdem gestaltet sich das Spektrum des CPO für den mittleren Peak am geringsten durch Anisotropieeffekte innerhalb der Hyperfeinwechselwirkungen beeinflusst. Da hierbei ein Teilsignal eines Dubletts mit dem Teilsignal eines Triplets verglichen wurde, sich die Spinzahl jedoch proportional zu der Gesamtfläche verhält, musste die Anzahl der Peaks bei der Berechnung der Ascorbylradikalkonzentration mit einbezogen werden. Die Auswertung erfolgte durch die Relativierung der dimensionslosen Flächenäquivalente auf die jeweilige Konzentration der Standardlösung mit einer definierten Konzentration an CPO. Die Konzentrationen für die Aufnahme der Kalibriergeraden lagen auf neun verschiedenen Konzentrationsniveaus⁴². CPO besitzt eine relative molare Masse von $187,24 \frac{\text{g}}{\text{Mol}}$. Aus diesem Grund war es notwendig, die

⁴² Zwischen 0 und $2500 \frac{\text{nmol}}{\text{L}}$

einzelnen Konzentrationsniveaus für die Kalibriergerade durch Verdünnen aus einer Stammlösung herzustellen, da die Mengen für eine direkte Einwaage unverhältnismässig größere Fehler hervorgerufen hätten.

Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen jedes Konzentrationsniveaus durchgeführt, wobei für jede Bestimmung eine frische CPO-Lösung durch Verdünnen mit PBS zur Verwendung kam. Die Methode zur Aufnahme der Spektren entsprach den Methodenparametern für die Messung des Ascorbylradikal-Signals. Als Standard für die Überprüfung der Spektrometerintegrität diente die auf Seite 153 angegebene TEMPO-Lösung. Nach den jeweiligen Bestimmungen wurde die Flachzelle mit PBS gespült und anschließend zur Trocknung mit Ethanol und Druckluft behandelt.

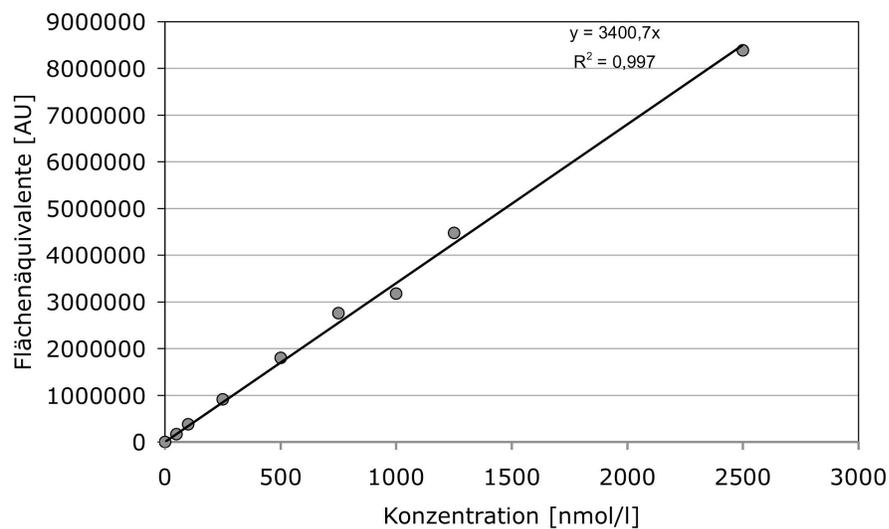


Abbildung 4.31: Kalibriergerade zur externen Kalibrierung mit CPO

Für die Kalibrierung ergab sich ein linearer Regressionskoeffizient von 0,9988. Die Konzentration des Ascorbylradikals kann nach der externen Kalibrierung nach der Formel $S_{Probe} = S_{Standard} \cdot \frac{A_{Probe}}{A_{Standard}} \cdot F$

S : Spinzahl

A : Fläches

F : Formfaktor (für das Ascorbylradikal/CPO Kalibratorpaar $\frac{2}{3}$)

bestimmt werden.

Einfluss verschiedener Antikoagulantien

Im nächsten Schritt wurde vor der Bestimmung der optimalen Zentrifugationstemperatur ein passendes Antikoagulans ausgewählt. Aus Vorversuchen entstammte die Erkenntnis, dass die Flachzelle bei einer vierminütigen Zentrifugation bei Temperaturen niedriger, als -4°C unabhängig von der verwendeten Antikoagulantienbeschichtung der Nosferatu-Microvette nicht mehr reproduzierbar und blasenfrei befüllt werden konnte. Die zum Antikoagulantienvergleich angestellten Untersuchungen wurden daher in einem Temperaturbereich von 0°C bis -4°C durchgeführt. Wie bereits besprochen, schien die Temperatur bei der Zentrifugation eine entscheidende Rolle für die Signalhöhe zu spielen. Es wäre jedoch ebenfalls denkbar, dass der Einfluss auf die beschleunigte Elimination des Ascorbylradikals bei Zentrifugation unter Raumtemperatur darin begründet war, dass bei den vorliegenden Bedingungen die Bildung des Ascorbylradikals durch den Zentrifugationsprozess aus dem nichtradikalischen, im Plasma vorliegenden Ascorbat induziert wurde. Hierdurch würde sich die Konzentration des Ascorbylradikals zusätzlich zur gesteigerten Inzidenz an Molekülkollisionen möglicherweise erhöhen, und dadurch zusätzlichen Einfluss auf die vorzeitige Elimination des Ascorbylradikals aus der Plasmaprobe nehmen.

Ziel des im Folgenden beschriebenen Versuches war zu überprüfen, ob durch den Zentrifugationsprozess möglicherweise Radikale gebildet wurden und ob diese etwaige Radikalgenerierung vom verwendeten Antikoagulationsmittel auf den Microvettenoberflächen abhängig war. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Konzentrationsniveaus zwischen $100 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$ und $1 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ des zum CPO korrespondierenden

Spinlables CPH in PBS hergestellt. Diese wurden in einer jeweiligen Dreifachbestimmung für vier Minuten bei -4°C , -3°C , -2°C , -1°C und bei 0°C sowohl in kalium-EDTA-, als auch in lithiumheparinat-beschichteten Microvetten zentrifugiert und der einfacheren Handhabung wegen in $50\ \mu\text{L}$ Rundkapillaren der ESR-Messung zugeführt. Da es sich lediglich um einen relativen Vergleich, und nicht um eine Absolutbestimmung im Verhältnis zu den vorausgegangenen Bestimmungen oder einer quantitativen Aussage unter Verwendung der Eichgeraden handelte, war die Wahl des Probenbehältnisses für dieses Ergebnis unerheblich. Durch die Oxidation des cyclischen Hydroxylamins entsteht aus CPH das CPO-Radikal, welches das bereits bekannte Triplett-Spektrum liefert. Die Auswertung der relativen CPO-Entstehung erfolgte anhand des Vergleichs der Gesamtsignalfächen nach Doppelintegration durch die Software Analysis.

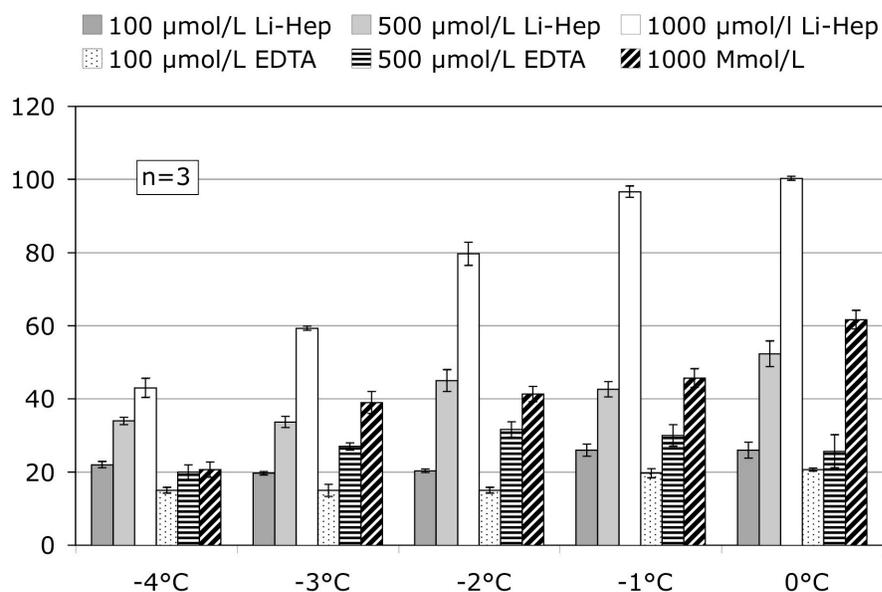


Abbildung 4.32: Vergleich der Antikoagulantien Li-Heparin und K-EDTA

In Abbildung 4.32 sind die Ergebnisse für die unterschiedlichen Zentrifugationsbedingungen abgebildet. Hieraus lässt sich erkennen, dass durch die Verwendung von Kalium-EDTA bis zu 50 % weniger Radikal gebildet wurde, als bei der Verwendung von Li-Heparin als Antikoagulans. Ferner ist ersichtlich, dass die Zentrifugation bei niedrigen Temperaturen zu niedrigeren Standardabweichungen, also zu präziseren

Ergebnissen führt, als die Zentrifugation bei höheren Temperaturen. Für die weitere Entwicklung des Assays wurden EDTA-beschichtete Microvetten zur Herstellung der Nosferatu-Einheiten verwendet, da angenommen wurde, dass durch die Verwendung dieses Antikoagulans weniger Radikal durch den Zentrifugationsprozess in der Probe generiert würde.

Bestimmung der optimalen Zentrifugationstemperatur

Mit der nach externer Eichung vorhandenen Möglichkeit der quantitativen Bestimmung des Ascorbylradikals war im nächsten Schritt die für das angestrebte Testsystem günstigste Zentrifugationstemperatur zu ermitteln. Hierzu wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils eine Kapillarblutprobe einer freiwilligen, nüchternen Testperson⁴³ mit einem Nosferatu entnommen, und bei -4°C , 0°C oder bei 4°C für vier Minuten zentrifugiert sod ass sich für jede Zentrifugationstemperatur eine Dreifachbestimmung ergab. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde über sechs Stunden das ESR-Signal aufgezeichnet, und der Gehalt der Probe über die Zeit ermittelt. Als günstigste Zentrifugationstemperatur wurde diejenige eingestuft, bei der bei geringster relativer Standardabweichung aus den drei Messungen der im Mittel höchste Gehalt an Ascorbylradikal detektiert wurde. Die Auswertung erfolgte anhand der Flächenvergleiche durch die im Rahmen der externen Kalibrierung bestimmten Umrechnungsformel.

Entgegen der Erwartung zerfiel das Ascorbylradikal in dem beobachteten Zeitabschnitt scheinbar dem Mechanismus einer linearen Kinetik folgend. Ähnliche Resultate werden in Zusammenhang mit der Bestimmung der Ascorbylradikalkonzentration in venösem, humanen Blut beschrieben [177]. Es schien sich also nicht um einen Fehler in der Versuchsdurchführung zu handeln. Es wäre durchaus denkbar, dass sich nach längerer Versuchsdauer eine Kinetik erster Ordnung als passendes Modell für den Zerfall herausstellt. Da für die Bestimmung der Ascorbylradikalkonzentration im Rahmen der Zielsetzung jedoch die reproduzierbare Bestimmung zeitnah nach der Probennahme im Vordergrund stand, wurde an dieser Stelle auf ein Langzeitexperiment, sowie auf die Bestimmung der Halbwertszeit verzichtet.

⁴³ Es handelte sich bei allen Bestimmungen um dieselbe, gesunde, weibliche Testperson (25 J.), die während der Untersuchungen keine Arznei- oder Nahrungsergänzungsmittel zu sich nahm.

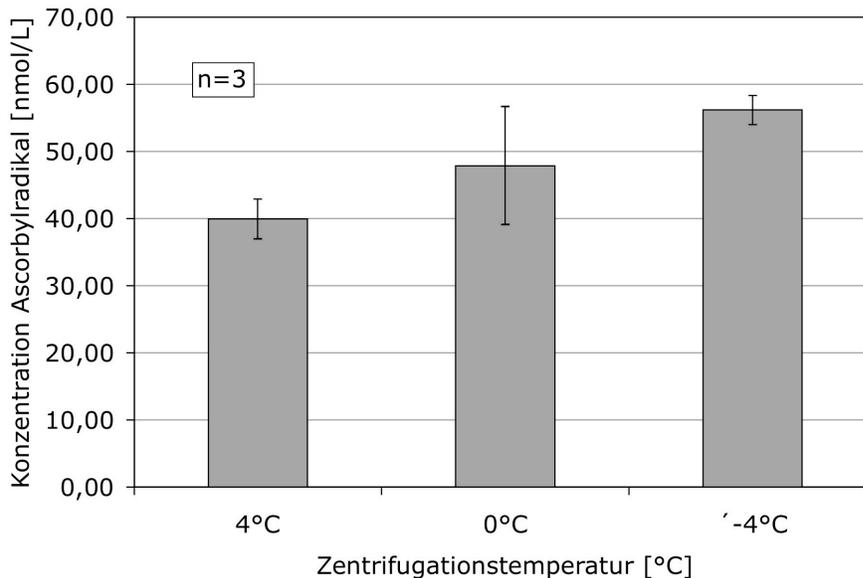


Abbildung 4.33: Vergleich der mittleren Gehälter an Ascorbylradikal bei unterschiedlichen Zentrifugationstemperaturen

Wie aus der Abbildung der Zerfallskinetiken für das Ascorbylradikal, sowie aus der Vergleichsdarstellung der mittleren Gehalte in Abbildung 4.33 entommen werden kann, stellte sich die Zentrifugation der Kapillarblutprobe bei -4°C als optimale Bedingung heraus. Die Zerfallsgeschwindigkeit in der ersten Stunde war zwar für die Zentrifugation bei 0°C am geringsten, jedoch zeigte die Zentrifugation bei -4°C sowohl geringere Schwankungen in diesem Zeitrahmen, als auch höhere Konzentrationen an Ascorbylradikal.

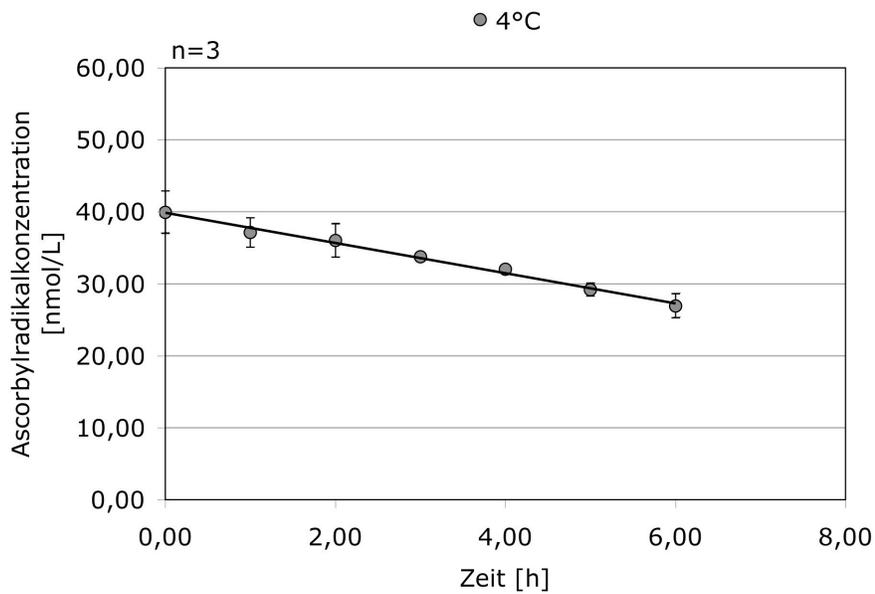


Abbildung 4.34: Zerfall des Ascorbylradikals nach Zentrifugation bei 4°C

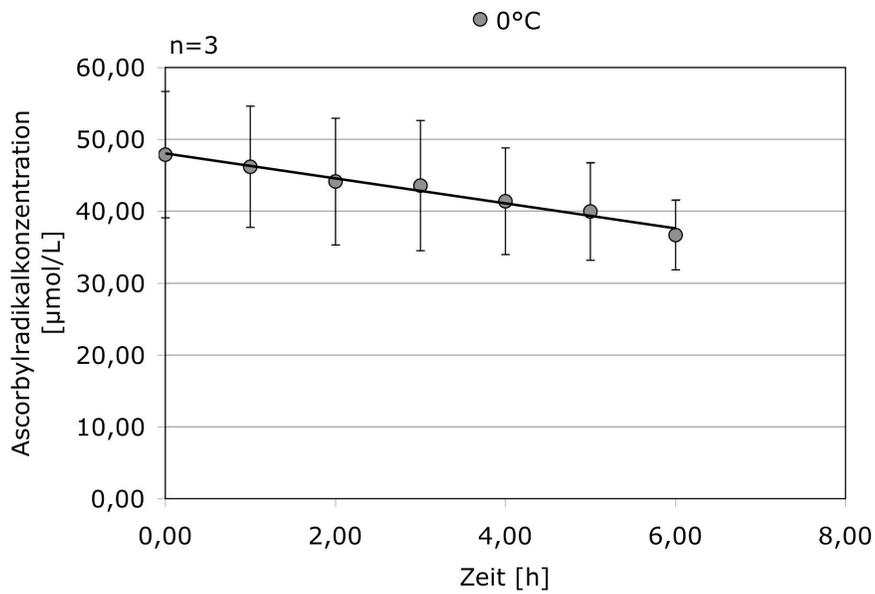


Abbildung 4.35: Zerfall des Ascorbylradikals nach Zentrifugation bei 0°C

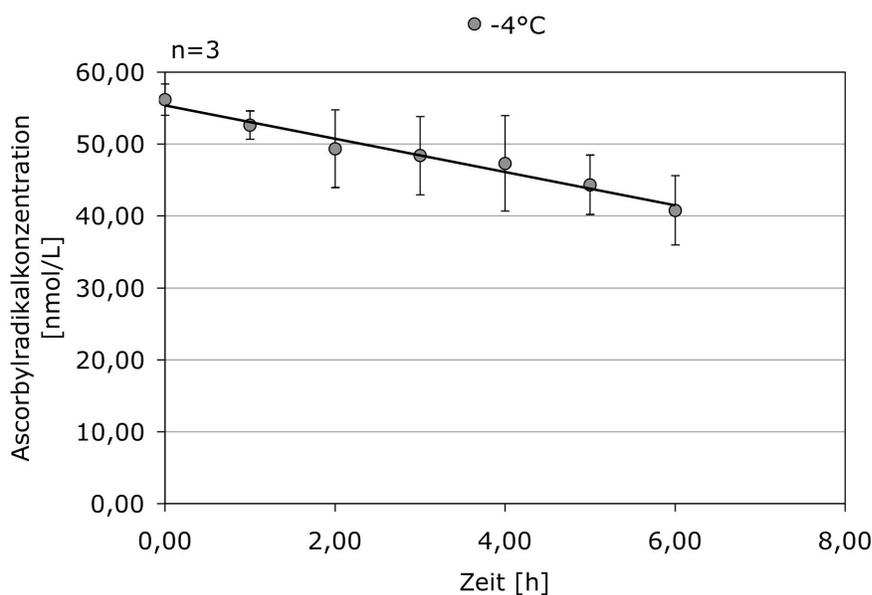


Abbildung 4.36: Zerfall des Ascorbylradikals nach Zentrifugation bei -4°C

Bestimmung der Präzision

Um eine Präzision für die Bestimmung des Ascorbylradikals aus humanem Plasma zu ermitteln, wurden innerhalb eines Zeitraumes von drei Stunden einer nüchternen, freiwilligen Testperson (weiblich, 25 J.) sechs Kapillarblutproben im Abstand von je 30 Minuten abgenommen und der Gehalt an Ascorbylradikal ermittelt.

Es ergab sich für die Bestimmung ein mittlerer Ascorbylradikalgehalt von $52,82 \frac{\text{nmol}}{\text{L}}$. Dieser Wert liegt im Bereich der bereits mehrfach zitierten publizierten Werte für den Ascorbylradikalspiegel. Mit einer relativen Standardabweichung von 25 % bewegt sich das Verfahren zwar an der oberen Grenze, dennoch für die Analyse biologischer Proben im Bereich akzeptabler Schwankungen [73].

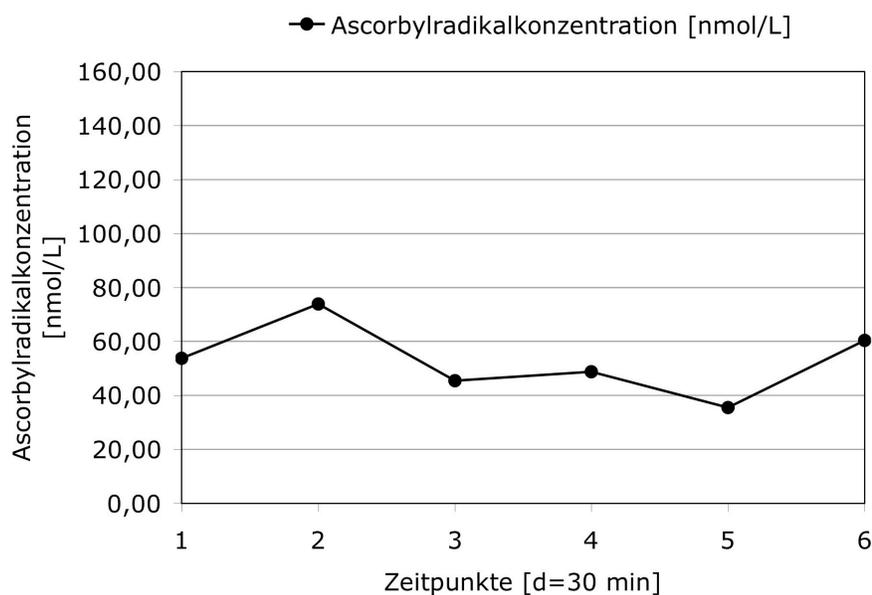


Abbildung 4.37: Bestimmung der Präzision für die Quantifizierung des Ascorbylradikals

4.6 Bestimmung des Ascorbatspiegels in Kapillarblut

Das Wissen um die Höhe des Ascorbatspiegels in der Probe, aus welcher der Gehalt an Ascorbylradikal bestimmt wird, stellt einen wichtigen Eckpfeiler in dem Vorhaben der Entwicklung einer verbesserten Aussagequalität des Assays gegenüber den derzeit gängigen Methoden dar. Als Anforderung für das Erreichen einer hohen Aussagekraft bei der Anwendung innerhalb breiter angelegter Studien wurde die Bedingung gestellt, den Ascorbatspiegel für einen Probanden aus derselben Probe zu bestimmen, aus der die Höhe des Ascorbylradikalspiegels bestimmt wurde. Das bedeutet für die Bereitstellung der Probe, dass die Bestimmung des Ascorbates entweder an Ort und Stelle in der Flachzelle selbst, oder nach Überführen eines definierten Aliquots der Plasmaprobe aus der Flachzelle in ein separates Probengefäß zu erfolgen hatte. Hierbei war wiederum das geringe Probenvolumen der ESR-Bestimmung von $75 \mu\text{L}$ zu berücksichtigen. Eine etwaige Methode zur Bestimmung des Ascorbates musste folglich einer Reihe von Ansprüchen genügen. Sie sollte in Bezug auf den

geplanten Einsatzbereich:

- selektiv in der Probenmatrix Plasma arbeiten
- spezifisch für Ascorbat sein
- eine dem physiologischen Ascorbatspiegel entsprechende Bestimmungsgrenze besitzen
- reproduzierbare Ergebnisse liefern
- richtige Ergebnisse liefern
- in dem entsprechenden, kleinen Probenvolumen durchführbar sein
- schnell durchführbar sein
- im technisch Umfang den Anforderungen zur Durchführung kosmetischer Studien entsprechen⁴⁴
- eine einfache Handhabung versprechen
- kostengünstig durchführbar sein

4.6.1 Problematik der Quantifizierung von Ascorbat

Die quantitative Bestimmung von Ascorbat beziehungsweise Ascorbinsäure gestaltet sich bereits ohne die genannten, anwendungsspezifischen Anforderungen kompliziert. Die Hauptproblempunkte lassen sich wie folgend unterteilen:

- Instabilität des Analyten
- Interkonversionsprobleme
- Interferenzen
- Empfindlichkeit

⁴⁴ Siehe auch Anforderungen an ein Testsystem Kapitel 4

Instabilität des Analyten

Da das aufgrund der exzellenten Reduktionsmitteleigenschaften der Ascorbinsäure sehr leicht gebildete Oxidationsprodukt Dehydroascorbinsäure ausserordentlich schnell einer hydrolytischen Ringöffnungsreaktion zur 2,3-Diketogulonsäure unterliegt sind Ascorbinsäurelösungen unter oxidativen Bedingungen relativ instabil.

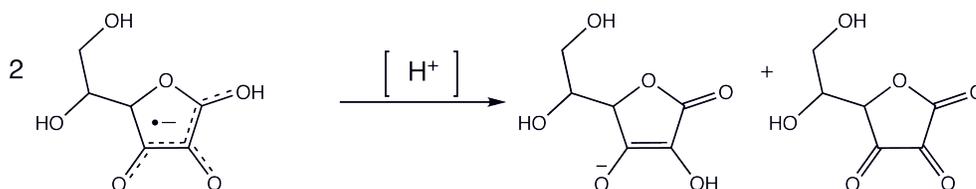


Abbildung 4.38: Hydrolytische Ringspaltung der Dehydroascorbinsäure nach [186]

Faktoren, die Einfluss auf oxidative Depletion der Ascorbinsäure besitzen, sind beispielsweise die Konzentration der Lösung, Temperatur, pH-Wert, Lösemittel und Sauerstoffpartialdruck, sowie Übergangsmetallionen, welche oxidative Reaktionen katalysieren können [187]. Durch die Einflussnahme auf die genannten Faktoren können analytische Matrices zu einem gewissen Grad stabilisiert werden. Im Versuchsaufbau des Ascorbyl-assays wurde dies durch die Verwendung des Antikoagulans Kalium-EDTA in den verwendeten Probenzugsystemen realisiert, welches Chelatbildneresigenschaften besitzt. Hierbei wurde das bei ansonsten notwendigem Volumenzusatz durch stabilisierende Säuren⁴⁵ auftretende Verdünnungsproblem umgangen. Die Vergleichbarkeit der Temperatureinflüsse wurde wiederum durch die Durchführung aller Versuche bei standardisierten Bedingungen gewährleistet.

Interkonversionsprobleme

Aus Ascorbinsäure entsteht im Gleichgewicht ihre oxidierte Form Dehydroascorbinsäure. Wird zur Analyse ein System verwendet, welches auf einer Seite der Gleichgewichtsreaktion basiert, kann die Verlagerung der Gleichgewichtslage zu fehlerhaf-

⁴⁵ Oxalsäure oder Trichloressigsäure

ten Werten führen. Der Gesamtgehalt an Vitamin C bleibt allerdings laut Definition unverändert, da zu dem Begriff Vitamin C alle Verbindungen zusammengefasst werden, die im Körper zu Ascorbinsäure umgesetzt werden können - also auch die Dehydroascorbinsäure. Sollen jedoch, wie gefordert, selektiv Aussagen zur L-(+)-Ascorbinsäure beziehungsweise Ascorbat getroffen werden, kann das angesprochene Problem Relevanz erhalten. Durch die Stabilisierung der Probe, wie zuvor beschrieben, lässt sich diese Schwierigkeit jedoch verhältnismäßig gut aus dem Weg räumen.

Interferenz

Die Spezifität der Ascorbatbestimmung stellt in biologischen Proben, wie dem verwendeten Plasma ein häufiges Problem dar. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Matrix mangelt es vielen Nachweisen an der notwendigen Einflussfreiheit und Abwesenheit von Kreuzreaktionen. Diese führen unweigerlich zur Verfälschung der Ergebnisse.

Empfindlichkeit

Auch an ausreichender Empfindlichkeit fehlt es vielen Nachweismethoden zur Bestimmung von Ascorbat. Die besonders in biologischen Proben⁴⁶ sehr niedrigen Konzentrationen an Ascorbinsäure, wie in humanem Plasma oder Gewebeproben, schränken die Methodenauswahl sehr stark ein. Im Rahmen dieser Arbeit stellt die Anforderung an die ausreichende Empfindlichkeit aufgrund der speziellen Probenmatrix ein sehr wichtiges Kriterium für die analytische Methode dar.

4.6.2 Methoden zur Ascorbatbestimmung

Nach der Erkenntnis über die biochemische Relevanz der Ascorbinsäure durch Szent-Györgyi galt der Bestimmung des Ascorbinsäuregehaltes in Nahrungsmitteln große Aufmerksamkeit [188]. Zu den frühen, verwendeten Methoden zählten hauptsächlich

⁴⁶ Abgesehen sei hier von Nahrungsmitteln und Pflanzen, wie Zitrusfrüchten oder Sauerklee [187]

Verfahren, die auf dem Redoxverhalten der Ascorbinsäure basierten: so wie die klassische Redoxtitration welche auch im Arzneibuch Anwendung findet [31], oder die polarographische, sowie chromatographische Bestimmung. Mit der weitreichenden Verwendung von Ascorbinsäure als Antioxidans zur Konservierung von Nahrungs- und Arzneimitteln, sowie als Nahrungsergänzungs- und Arzneimittel selbst wurden die Verfahren der quantitativen Bestimmung zur Prozessüberwachung und Qualitätskontrolle im Rahmen der Herstellung der ascorbinsäurehaltigen Produkte und auch der synthetischen Darstellung der Ascorbinsäure, umfangreich weiterentwickelt [189]. Mit der Weiterentwicklung der Instrumentierung im Bereich Analytik⁴⁷, der Neuentwicklung von Analysenmethoden wie der Lumineszenzspektroskopie [70], sowie immer empfindlicher werdenden Bestimmungsmöglichkeiten dank EDV-Technik, erhielt die Bestimmung der Ascorbinsäure als medizinischer Parameter Einzug in die medizinische Diagnostik, sowie in die medizinische Forschung.

Einige der praktisch angewandten Methoden beinhalten unter anderem die Möglichkeiten der UV/Vis- oder Fluoreszenz-spektroskopischen Bestimmung, welchen aufgrund der Lage des Absorptionsmaximums des Ascorbinsäuremoleküls⁴⁸ oder durch die fehlenden, notwendigen strukturellen Gruppierungen jedoch jeweils eine Derivatisierungsreaktion vorausgesetzt wird. Weitere Möglichkeiten der Bestimmung basieren auf der elektrochemischen Analyse mittels Polarographie oder der Quantifizierung nach chromatographischer Trennung [190, 191]. Letztere stellen sich aufgrund des hohen technischen Aufwandes und der Bestimmungszeiten, jedoch für kosmetische Studien nicht applikabel dar. Der Nachteil in den bei spektralphotometrischen und lumineszenzspektroskopischen Bestimmungen häufig benötigten chromogenen Reagenzien liegt in der häufig fehlenden Spezifität der Kopplungs- und Derivatisierungsreaktionen beim Einsatz in komplexen Matrices wie humanem Plasma. Eine Möglichkeit Ascorbinsäure auch in biologischen Proben komplexer Matrices selektiv und spezifisch nachzuweisen, ergibt sich aus der Verwendung einer enzymatischen Reaktion [192].

⁴⁷ Neue Säulenmaterialien im Chromatographiebereich, Verfeinerung massenspektrometrischer Detektion etc.

⁴⁸ 265 nm bei pH=7 bei der auch viele weitere in Plasma vorhandene Substanzen absorbieren

4.6.3 Enzymatische Bestimmung von Ascorbat

Bei der Verwendung von Enzymen zur Bestimmung einer Substanz wird die häufig sehr spezifische Funktion eines Enzyms für ein spezielles Substrat ausgenutzt. Hierbei wird das zu bestimmende Substrat entweder direkt enzymatisch umgesetzt und die Reaktion verfolgt, oder es wird der Einfluss der jeweiligen Substanz auf eine enzymkatalysierte Reaktion beobachtet [193]. Für die enzymatische Bestimmung der Ascorbinsäure beziehungsweise von Ascorbat kommen verschiedene Enzyme zum Einsatz. Beispielsweise werden Methoden unter Verwendung unterschiedlicher Peroxidasen, sowie Glutathiondehydrogenase und Ascorbatoxidase beschrieben [194]. Das Enzym Ascorbatoxidase⁴⁹ gehört zu den Multidomänen-Kupfer-Oxidoreduktasen und arbeitet mit einer sehr hohen Effizienz spezifisch für das Substrat Ascorbat [195]. Das Enzym besteht aus einem Dimer mit jeweils drei Kupferdomänen pro Monomer. Bei der Umsetzung des Substrates wird mittels intraenzymatischen Mehrelektronentransfers über die unterschiedlichen Kupferzentren molekularer Sauerstoff unter Umsetzung von Ascorbinsäure zu Wasser reduziert.

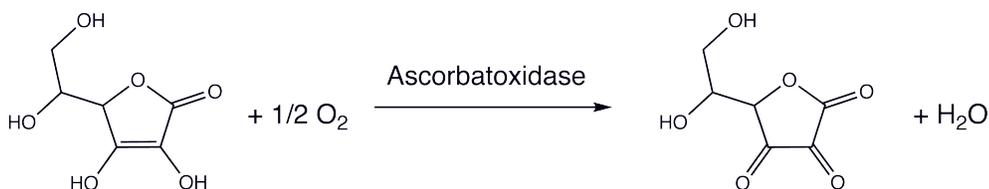


Abbildung 4.39: Oxidation von Ascorbinsäure mittels Ascorbatoxidase

Hierbei wird pro zwei Moleküle Ascorbat ein Molekül O₂ umgesetzt [196]. Aus dem Verlauf der enzymatischen Umsetzung der Ascorbinsäure lassen sich Schlüsse auf die Ascorbatkonzentration in der jeweiligen Untersuchungslösung ziehen.

Die Verfolgung der Ascorbatoxidaserreaktion ist auf verschiedenen Wegen möglich. So können sowohl die Konzentrationen während der Reaktion gebildeter, als auch konsumierter Verbindungen als Indikatoren für den Reaktionsablauf verwendet werden. Beschrieben wird die Detektion mittels photometrisch indizierter Beendigung der Dehydroascorbinsäurebildung nach Reaktion mit einem Farbreagenz [197] sowie die klassi-

⁴⁹ EC Nummer 1.10.3.3

che Anwendung des optischen Tests nach Warburg [198]. Im Zuge des letztgenannten wird die Zunahme der Konzentration des Co-Faktors NADH beobachtet. Demgegenüber kann auch der Verbrauch von gelöstem Sauerstoff in der Untersuchungslösung herangezogen werden. Die häufig elektrochemische Indizierung dieser oxygraphischen Variante findet hierbei sowohl in polarographischen Aufbauten, als auch jüngst bei der Realisierung von Micro-Biosensoren mit immobilisierter Ascorbatoxidase unter Verwendung amperometrischer Methoden Anwendung [199].

4.6.4 Oxygraphische Verfolgung der Enzymreaktion

Eine elegante Methode zur Verfolgung des Sauerstoffverbrauches der Enzymreaktion mit dem Vorteil, dass bei der Bestimmung kein Sauerstoff konsumiert wird, wie dies zum Beispiel bei der Polarographie der Fall ist, stellt die Verwendung von Micro-Sauerstoffsensoren dar. Da sich auch diese Methode für die klassische, pharmazeutische Analytik recht ungewöhnlich darstellt, soll das Prinzip dieser Analysenmethode kurz veranschaulicht werden.

Theoretische Grundlagen

Bei dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Sauerstoffsensor der Bauart Microx TX3 handelt es sich um ein faseroptisches Sensorsystem basierend auf dem Prinzip der dynamischen Lumineszenzlöschung durch molekularen Sauerstoff. Hierbei werden durch eine Lichtquelle angeregte Lumineszenzfarbstoffe, welche in einen Lichtleiter inkorporiert sind, um den bei einer Kollision mit molekularem Sauerstoff strahlungslos auf letzteren übertragenen Energiebetrag in ihrer Lumineszenzintensität gemindert. Hierbei wird der Quencher, also Sauerstoff von seinem Grundzustand, dem Triplettzustand in den angeregten Singulettzustand überführt. Dieser Vorgang wird kollisionale, dynamische Lumineszenzminderung oder Lumineszenzlöschung genannt und ist abhängig von der Konzentration an molekularem Sauerstoff in der Umgebung des dotierten Lichtleiters.

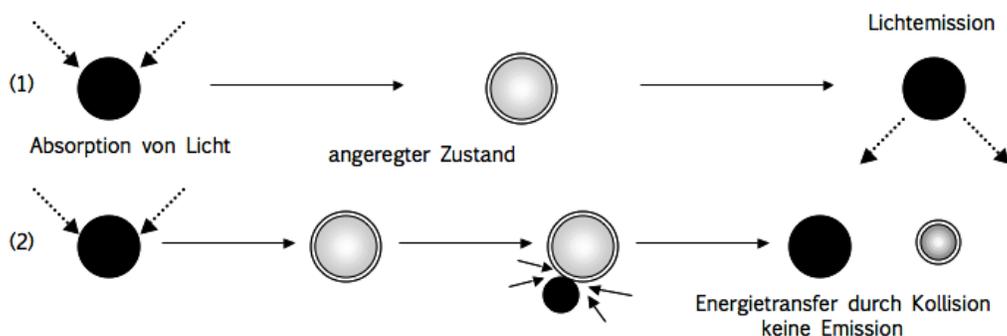


Abbildung 4.40: Prinzip der dynamischen Lumineszenzlöschung (1) Lumineszenzprozess in Abwesenheit eines Quenchers, (2) Deaktivierung des angeregten Lumineszenzfarbstoffes durch molekularen Sauerstoff

Sowohl die Messung der Lumineszenzintensität der angeregten Luminophore, als auch deren Lumineszenzdauer können aufgrund der von Stern und Volmer beschriebenen Zusammenhänge als Indikationsgrößen für die Sauerstoffkonzentration verwendet werden [200].

Aus der Gleichung geht hervor, dass sowohl die Lumineszenzintensität, als auch die Lumineszenzdauer als Funktion der Sauerstoffkonzentration⁵⁰ ausgedrückt werden kann.

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{sv} \cdot [O_2]$$

I : Lumineszenzintensität in Gegenwart von Sauerstoff

I_0 : Lumineszenzintensität in Abwesenheit von Sauerstoff

τ : Lumineszenzabklingdauer in Gegenwart von Sauerstoff

τ_0 : Lumineszenzabklingdauer in Abwesenheit von Sauerstoff

K_{sv} : Stern-Volmer Konstante

$[O_2]$: Sauerstoffkonzentration

Indikatorfluorophore Farbstoffe, die durch die Kollision mit Sauerstoff einen Lumineszenzverlust oder eine Minderung erleiden sind einige polycyclische aromatische Koh-

⁵⁰ Im Microx TX3 als Sauerstoffpartialdruck wiedergegeben

lenwasserstoffe sowie phosphoreszierende Porphyrinstrukturen, welche Pt^{2+} , Os^{2+} oder Rh^{2+} als Zentralatom besitzen [201].

Aufbau des Microx TX3

Die Hauptkomponenten eines faseroptischen Sensorsystems werden von folgenden technischen Bestandteilen gebildet

- Eine Lichtquelle, realisiert durch Laser, Dioden oder Lampen um den Sensor anzuregen,
- Eine optisch leitende Faser, wie Fiberglas
- Ein Photodetektor, der die Lumineszenzemission der Luminophore überwacht
- Ein lumineszierender Sensorfarbstoff, beispielsweise immobilisiert in einer festen Matrix

Durch den Abgleich zwischen der Emissionsintensität der Lichtquelle und der Emissionsintensität des Fluoreszenzfarbstoffes wird die Minderung der Lumineszenzquantenausbeute bestimmt und somit Rückschlüsse auf die Sauerstoffkonzentration gezogen.

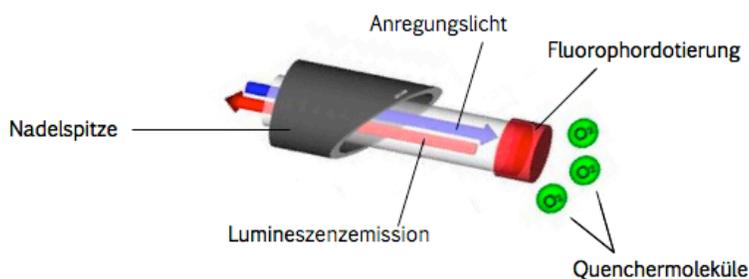


Abbildung 4.41: Aufbau des Sauerstoffsensors nach [201]

Die Lichtquelle und der Photodetektor befinden sich innerhalb des Gehäuses zur Online-Kopplung des Microx TX3, an welches der Sensor angeschlossen werden kann.

Für die Anpassung der Messung an individuelle Versuchsanforderungen sind für die Sauerstoffbestimmung mit dem Microx TX3 System Sensoren mit unterschiedlichem Aufbau erhältlich. Zur Durchführung der Basalwertbestimmung für Ascorbinsäure in humanem Plasma wurde ein Sensor vom Nadel-Typ⁵¹ mit konischer Spitze verwendet, da dieser die höchste Auflösung der Messung, sowie die geringste „Response-time“ besitzt [201]. Da die Probe in dem vorgesehenen Aufbau aufgrund des geringen Volumens nicht gerührt werden konnte, und die Durchmischung von Analysen- und Enzymlösung lediglich auf den Moment der Zusammenführung beider und die darauffolgenden Diffusionsvorgänge beschränkt war, wurden die beschriebenen Eigenschaften des Nadelsensors als günstige Voraussetzungen zur Kompensation der suboptimalen Versuchsvoraussetzungen bezüglich der Durchmischung angesehen.

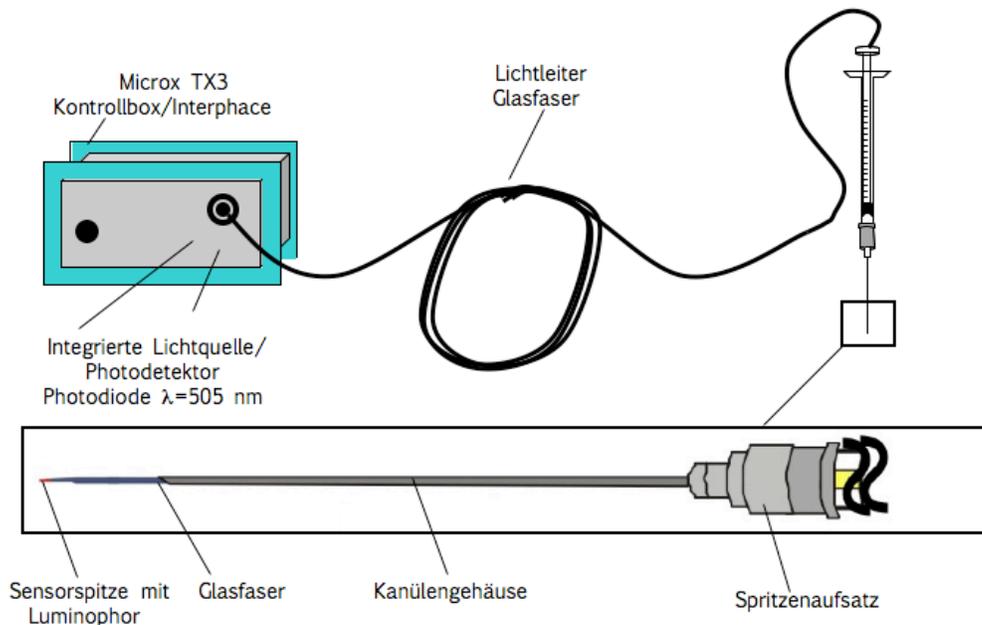


Abbildung 4.42: Aufbau der oxygraphischen Messanordnung

⁵¹ Needle-type housing (NTH), PreSens, Regensburg

Auswertung

Die Werte für die Sauerstoffsättigung der zu untersuchenden Lösungen wurde von der entsprechenden Software, OxyView-B2-V5.2,2003, in der Zeitdomäne aufgezeichnet. Durch die Injektion der Analyse zu der vorgelegten Enzymlösung wurde die Umsetzung der Ascorbinsäure initiiert. Der folglich sinkende Sauerstoffpartialdruck in der Lösung erreichte ein Minimum in Abhängigkeit von der Konzentration an Ascorbinsäure in der Probe. Die Werte für die Differenz der Sauerstoffsättigung der Enzymlösung vor der Zugabe der Probe und dem Minimalwert nach Beendigung der Umsetzungsreaktion wurden zur Ermittlung der Ascorbatkonzentration verwendet.

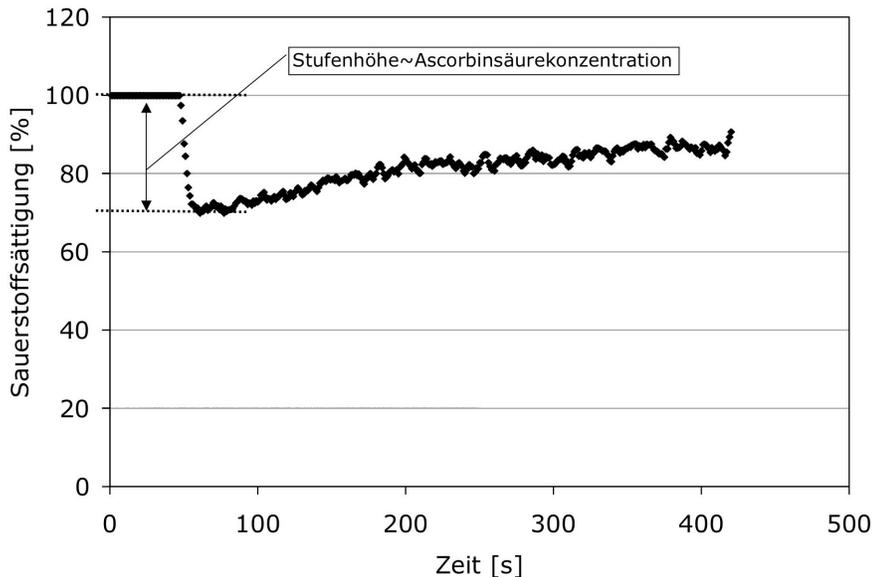


Abbildung 4.43: Auswertung der Sauerstoffsättigungskurve

4.6.5 Durchführung der enzymatischen Ascorbatbestimmung

Für die Bestimmung des Ascorbates wurden $70 \mu\text{L}$ einer Ascorbatoxidaselösung entsprechend 7 U in $250 \mu\text{L}$ Mikrotiterplatten mit separierbaren Reiheneinsätzen pi-

pettiert und die Probe wurde luftdicht mit Parafilm verschlossen. Dies sollte ein Nachdiffundieren von Luftsauerstoff in die Probenlösung während der Bestimmung verhindern. Die Enzymlösung wurde vor jeder Bestimmung aus einer auf Eis gelagerten Stammlösung durch Verdünnen mit PBS hergestellt. Nach Platzierung des Sensors unter der Oberfläche der Enzymlösung erfolgte mittels Tuberkulinspritze und Dentalkanülenaufsatz die Überführung der Plasmaprobe aus der ESR-Flachzelle in das Reaktionsgefäß und die Sauerstoffsättigung wurde in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet.

Nullpunkteinstellung

Die Nullpunkteinstellung zur Kalibrierung des Messgerätes erfolgte täglich durch die Bestimmung des Sauerstoffpartialdruckes in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre in einem luftdicht verschlossenen Duranglas über einem mit Aqua bidest. getränkten Wattebausch⁵², sowie in einer sauerstofffreien Lösung von 1 g Natriumsulfit in 100 ml Aqua bidest⁵³. Durch die Reaktion von Natriumsulfit mit dem im Wasser gelösten Sauerstoff wird Sulfat gebildet und der gelöste Sauerstoff aus der Flüssigkeit entfernt. Die Bestimmungen wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt [201].

Messung

Die Bestimmung der Ascorbinsäurekonzentration in der Analysenlösung wurde mit der Aufzeichnung des Sauerstoffpartialdruckes in der vorgelegten Enzymlösung über 60 Sekunden begonnen. Nach dem Durchstechen der Parafilmabdichtung mit der Probenspritze wurde abgewartet, bis sich die Sauerstoffsättigung nach einem etwaigen Sauerstoffeintrag durch die Nadel der Probenspritze wieder auf das vorherige Signal normalisiert hatte. Anschließend wurde zügig, aber blasenfrei injiziert um eine möglichst hohen Durchmischungsgrad von Enzymlösung und Probe zu gewährleisten. Die Sauerstoffsättigung der Analysenlösung wurde bis zum Durchschreiten eines Minimums aufgezeichnet.

⁵² Einstellung des Maximalwertes

⁵³ Einstellung des Nullwertes

Nach dem Durchschreiten des Minimums konnte bei längerer Aufzeichnung der Sauerstoffsättigung ein Wiederanstieg der Werte beobachtet werden.

Zum Zeitpunkt der Registrierung des deszendierenden Teils der Kurve wird durch die Umsetzung von Ascorbinsäure durch die Ascorbatoxidase Sauerstoff verbraucht. Mit Abnahme der Ascorbatkonzentration verringert sich die Geschwindigkeit der Reaktion⁵⁴, bis sie die gleiche Geschwindigkeit besitzt, wie die Diffusion von Sauerstoff aus der Tiefe der Analysenlösung [7]. Ist die enzymatische Reaktion beendet, wird kein weiterer Sauerstoff durch Ascorbatoxidase verbraucht und die Sauerstoffkonzentration in Sensornähe beginnt durch das Nachdiffundieren von Sauerstoff wieder zu steigen.

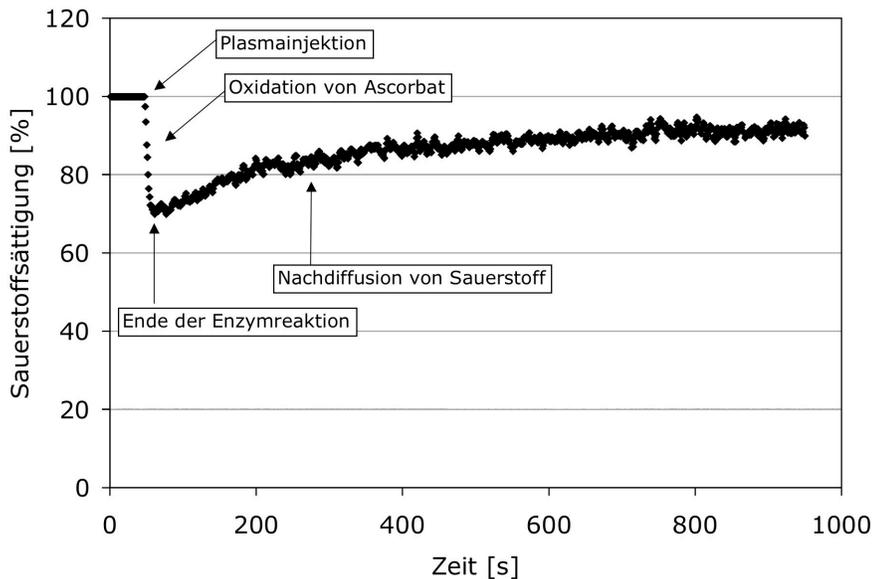


Abbildung 4.44: Verfolgung der Sauerstoffsättigung über 16 Minuten

Da bei Zutreffen dieser Annahme die Dauer der Enzymreaktion bis zur Beendigung unter anderem beeinflusst wäre durch die Plasmaviskosität, welche von Proband zu Proband zum Beispiel in Abhängigkeit von der Plasmaproteinkonzentration stark schwanken kann, wurde die Stufenhöhe zur Auswertung anstelle der Reaktionsgeschwindigkeit herangezogen.

⁵⁴ entsprechend der Michaelis-Menten-Kinetik

4.6.6 Kalibrierung

Aus den unter 4.5.5 genannten Gründen, die auch für die Bestimmung der Ascorbatkonzentration zutreffen, wurde eine externe Kalibrierung mittels dreizehn unterschiedlicher Konzentrationsniveaus der Lösung von Natriumascorbat in PBS durchgeführt. Die Bestimmungen erfolgten gemäß der beschriebenen Durchführung der Bestimmung von Ascorbat aus humanem Plasma in einer Dreifachbestimmung.

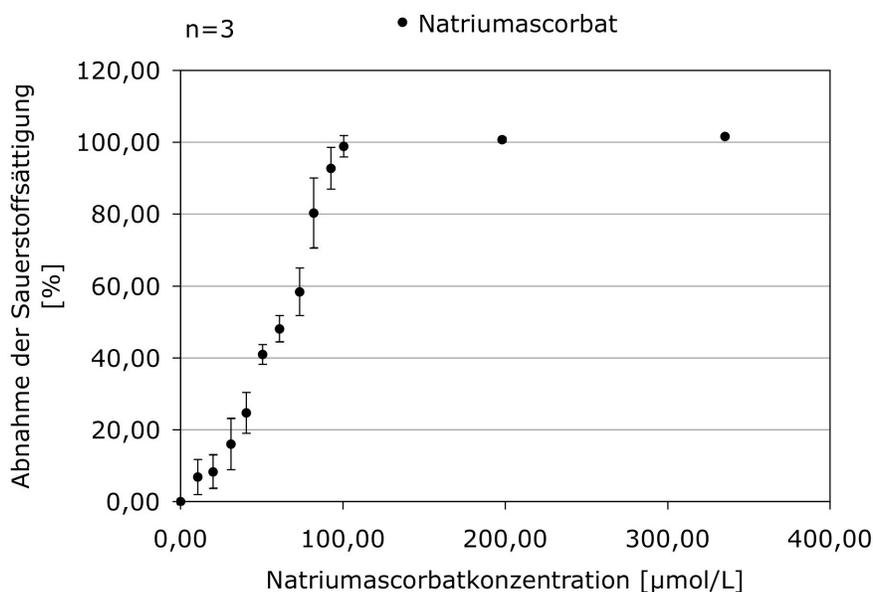


Abbildung 4.45: Kalibrierung der oxygraphischen Ascorbatbestimmung

Ab einer mittleren Ascorbatkonzentration von $100,58 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$ sank die Sauerstoffsättigung der Analysenlösung innerhalb des Aufnahmezeitraumes zweier Datenpunkte auf 0%. Zur Auswertung der Ascorbatspiegel in humanem Plasma wurden dementsprechend die Kalibratorkonzentrationen von 0 - $100 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$ herangezogen. Die Analyse mittels Dintest® ergab für diesen Konzentrationsbereich als optimales Regressionsmodell einen quadratischen Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9955.

4.6.7 Bestimmung der Präzision

Für die Bestimmung der Präzision der Ascorbatquantifizierung wurde eine $50 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$ Natriumascorbat-Lösung in PBS jeweils frisch durch Verdünnen einer $1 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ Stammlösung hergestellt und die Reaktion mit Ascorbatoxidase oxygraphisch verfolgt. Für eine mittlere Sauerstoffsättigungssenkung von 41,28% ergab sich ein Variationskoeffizient von 6,02 %.

4.6.8 Transformation zur Berechnung des Quotienten

Da die Bestimmung zur Lage des prooxidativ-antioxidativen Gleichgewichtes keine zwangsweise Angabe eines prozentualen Verhältnisses von Ascorbylradikal zu Ascorbat voraussetzte, wurden die Werte für die molare Konzentration des Ascorbylradikals aus Gründen der Übersichtlichkeit mit dem numerischen Faktor 1000 multipliziert. Auf diese Weise wurden Werte >1 erhalten.

5 ESR-Untersuchungen zur systemischen Photoschädigung

5.1 Probandenstudie

Zur Überprüfung der aufgestellten Thesen über die Einsatzmöglichkeiten mikroinvasiver Testsysteme wurde eine Probandenstudie zur Beurteilung der schädlichen Auswirkungen von UV-Exposition der Haut auf das systemische Kompartiment des menschlichen Körpers durchgeführt. Ziel dieser Studie war es festzustellen, ob die entwickelten Methoden im Rahmen einer kosmetischen Studie technisch einsetzbar sind. Ferner wurde nach einem Hinweis darauf gesucht, ob unter Verwendung einer UV-protectiven Formulierung die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ausgedrückt über den $\frac{Asc^{\cdot}}{Asc^{-}}$ -Quotienten) bei UV-A-Belichtung gegenüber ungeschützter Bestrahlung nachgewiesen werden kann.

5.1.1 Studiendesign

Studienart

Die Studie wurde monozentrisch als Wirksamkeitsstudie zur Methodenetablierung in den Räumen der Firma Beiersdorf durchgeführt.

Probanden

Die Untersuchungen wurden an freiwilligen Versuchspersonen (Probanden) durchgeführt, die vor dem Studienbeginn schriftlich über den Ablauf der Studie unterrichtet

wurden und erst nach schriftlicher Vorlage einer Einwilligungserklärung zur Teilnahme zugelassen waren. Rekrutiert wurden gesunde Männer und Frauen im Alter zwischen 24 und 65 Jahren. Das Kollektiv bestand aus acht Männern und acht Frauen, von denen vier regelmäßig Kontrazeptiva applizierten. Die Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme glichen den Teilnahmebedingungen der unter 3.8 beschriebenen Probandenstudie.

Studiendurchführung

Die Probanden erhielten für einen zweiwöchigen Vorkonditionierungszeitraum die in Tabelle auf Seite 185 aufgeführten Auflagen zur Vorbereitung auf die Studie. Zu einem Zeitpunkt t_{0A} wurden unter Einhaltung der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Vorschriften die für den $\frac{Asc'}{Asc^-}$ -Quotienten notwendigen Parameter aus einer an der linken Hand entnommenen Probe bestimmt. Zusätzlich erfolgte zur Überwachung vegetativer Einflüsse vor der Probennahme eine Blutdruckmessung am Handgelenk in Herzhöhe, sowie die Bestimmung des Blutzuckers. Im Anschluss erhielten die Probanden am Unterarm eine UV-A-Bestrahlung. Die Hand der jeweiligen Testperson wurde während der Bestrahlung ausserhalb der Hauptstrahlung auf einer Unterlage abgelegt und vor UV-Einwirkung durch einen Baumwollhandschuh geschützt um sicherzustellen, dass keine Bestrahlung an der Entnahmestelle der Blutprobe erfolgte. Nach erneuter Blutdruck- und Blutzuckerbestimmung wurden die Ascorbylradikal- und Ascorbat-Parameter erneut für den Zeitpunkt t_{0B} erhoben. Nach einer Regenerationsphase von sieben Tagen wurden die Bestimmungen erneut durchgeführt und so die Zeitpunkte t_{1A} und t_{1B} erhalten. Vor der Bestimmung für den Zeitpunkt t_{1B} wurde den Probanden auf dem Bestrahlungsareal eine UV-Schutz-Formulierung mit Sofortwirkung mit einem angegebenen Lichtschutzfaktor >50 mit ausgewogener UV-A-UV-B-Balance flächendeckend appliziert.

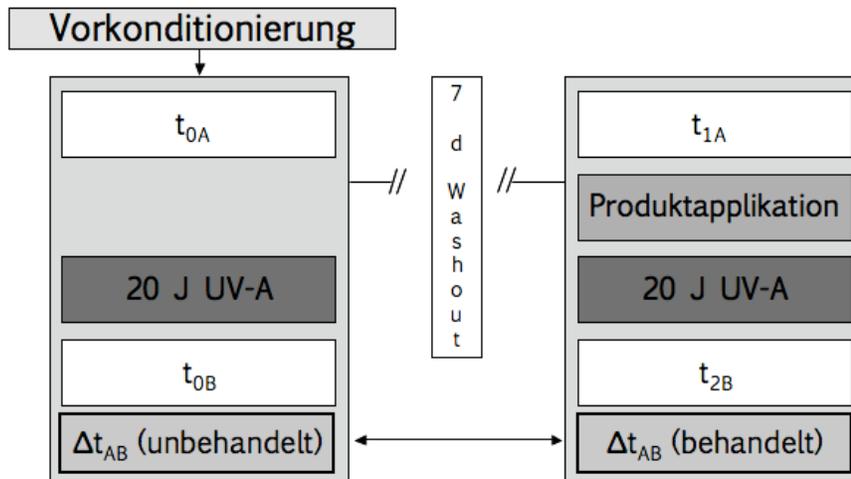


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Studienablaufes und der Datenverwertung

Ernährungstagebuch

Die Probanden wurden dazu angehalten ihre Ernährungsgewohnheiten, betriebene Sporteinheiten und etwaige Medikamenteneinnahmen in einem als Tagebuch angelegten Fragebogen zu protokollieren. Hiermit sollte sowohl sichergestellt werden, dass Ausreisser unter den erhaltenen Werten - falls notwendig - zurückverfolgt werden konnten, als auch eine Selbstkontrolle der Probanden gegenüber ihrem regelkonformen Verhalten sichergestellt werden sollte. Nach Möglichkeit sollte der übliche Tagesablauf nicht verändert werden. Ferner bestanden folgende Richtlinien bezüglich der Ernährung und dem Genussmittelkonsum, sowie Sonnenexposition während der Durchführung der Studie:

- Keine Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln¹
- Maximal 20 Zigaretten pro Tag
- Kein Solarium oder starke Sonneneinstrahlung

¹ Ausgenommen magnesium-, zink- oder calciumhaltige Präparate solange Vitamine abwesend waren

Präparat

Bei der UV-Schutz-Formulierung handelte es sich um eine wasserfeste O/W-Emulsion mit über 90 % UV-A-Filterungseigenschaften gemäß australischem Standard. Die Formulierung wurde während des Nichtgebrauches bei 4°C im Kühlschrank gelagert und vor Messbeginn über Nacht durch Lagerung unter Studienbedingungen auf 20°C gebracht. Die Applikation auf das Testareal erfolgte durch den Studiendurchführenden unter der Verwendung von Einmalhandschuhen. Überschüssiges Präparat wurde mit einem Kosmetiktuch durch Abtupfen vor der Bestrahlung entfernt.

Parameter

Für die UV-A-Bestrahlung wurden zwei Strahler frontal senkrecht zueinander aufgestellt, so dass bei der Platzierung des unbedeckten Testareals auf einer bereitgestellten Unterarmablage die gesamte Unterarmbreite bestrahlt werden konnte. Die Probanden saßen hierbei auf einem höhenverstellbaren Hocker, so dass das Bestrahlungsareal unabhängig von der Oberkörperlänge der einzelnen Probanden in reproduzierbarer Höhe zwischen den Strahlern positioniert werden konnte.

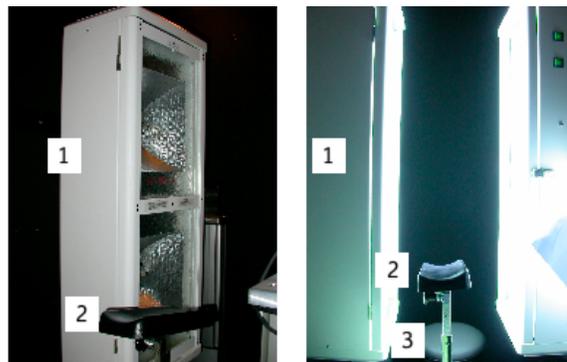


Abbildung 5.2: Versuchsaufbau zur Bestrahlung der Testareale (1): Strahler Psoriasis 900, Dr. Höhnle Medizintechnik, Planegg, (2) Armablage, (3), Sitzgelegenheit (Höhenverstellbarer Hocker)

Kühlung erfolgte mittels eines Ventilators, so dass eine Gesamtstrahlendosis von 20 J UV-A von den Probanden weitestgehend nicht als unangenehm empfunden wurde.

Während der gesamten Bestrahlung trugen die Testpersonen eine Schutzbrille mit Filterfunktion für UV-Strahlung. Der UV-B-Anteil der Strahlungsquelle wurde zu Beginn jeden Messtages mit einem Radiometer vom Typ IL 1700 überprüft und mit den Herstellerangaben verglichen, um die Integrität der Lampen und die Sicherheit der Probanden zu gewährleisten. Die Blutzuckerbestimmung mit einem Accu-Check compact Plus, (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) erfolgte aus derselben Punktionswunde wie die übrigen Kapillarblutentnahmen. Die Methodenparameter für Die ESR-Bestimmung, sowie diejenigen für den Microx TX3 Oxygraphen befinden sich unter den entsprechenden Ziffern im experimentellen Teil.

5.1.2 Ergebnisse

Die technische Durchführung der Messungen gelang an den meisten Probanden problemlos und im vorgegebenen Zeitrahmen von 45 Minuten pro Proband², so dass die prinzipielle Anwendbarkeit der Methoden im Rahmen von kosmetischen Studien an Probanden als umsetzbar betrachtet werden kann.

Verglichen wurden die sich aus den Messungen A und B für beide Zeitpunkte t_0 und t_1 ergebenden Differenzen der jeweiligen Parameter. Im Folgenden werden beide Parameter unabhängig und als Quotient dargestellt. Alle Signifikanzanalysen wurden durchgeführt mit der Software Originpro 7.5 G.

² Inklusive Akklimatisierung

Ascorbylradikalkonzentration

Die mittlere Konzentration des Ascorbylradikals wurde durch die Anwendung des UV-protectiven Präparates auf den ersten Blick positiv im Sinne einer geringeren Radikalbildung beeinflusst. Aufgrund der hohen Schwankungen der Werte war jedoch weder bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %, noch von 10 % ein statistisch signifikanter Unterschied der Mittelwerte nachweisbar. Auch durch die differentielle Betrachtung der individuellen Entwicklung der Werte auf jeden einzelnen Probanden bezogen war keine eindeutig positive Tendenz im Sinne einer geringeren Radikalbildung durch die Anwendung der UV-Filter-Formulierung erkennbar. Einige Probanden zeigten unter der Anwendung des Präparates sogar eine größere Bildung von Ascorbylradikal nach erfolgter Bestrahlung. Eine Aufteilung der Ergebnisse in ein Männer- und ein Frauenkollektiv ergab ebenfalls keine Hinweise auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen Ascorbylradikalkonzentration und UV-A-bestrahlung (Daten nicht abgebildet). Die bestimmten Ascorbylradikalkonzentration schwankten von 47,7 bis 119,29 $\frac{\text{nmol}}{\text{L}}$.

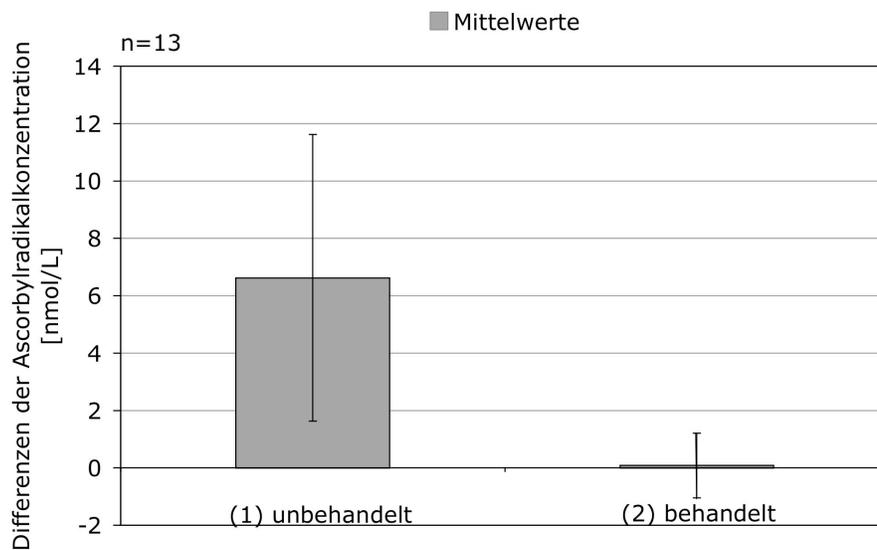


Abbildung 5.3: Veränderung des Ascorbylradikalspiegels nach Bestrahlung ohne appliziertes Produkt (1) und nach Applikation der Formulierung (2)

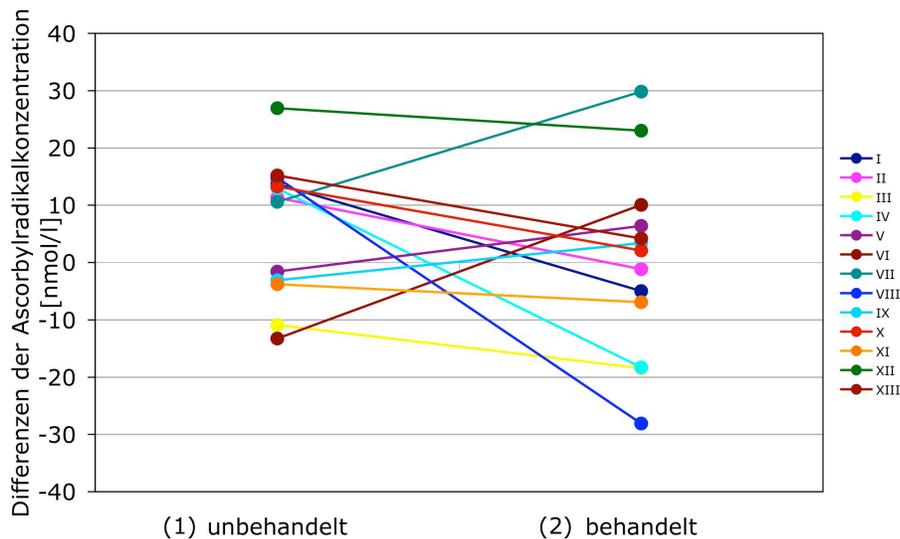


Abbildung 5.4: Individuelle Veränderung des Ascorbylradikalspiegels nach Bestrahlung ohne appliziertes Produkt (1) und nach Applikation der Formulierung (2)

Ascorbatspiegel

Für die Ergebnisse aus der Bestimmung der Ascorbatkonzentration ergab sich ein ähnliches Bild, wie für die Bestimmung des Ascorbylradikals. Für diese Bestimmung konnte beim Vergleich der Mittelwerte weder bei 5 % noch bei 10 % Irrtumswahrscheinlichkeit ein signifikanter Einfluss durch die Verwendung des Lichtschutzpräparates nachgewiesen werden auch wenn es zunächst so aussah, als wäre der Ascorbatspiegel durch die Verwendung der Sonnenschutzproduktes weniger gesunken, als ohne die Anwendung desselben. Dies wiederum spräche für eine verringerte Beanspruchung des antioxidativen Systems durch die Verwendung des Lichtschutzfaktors.

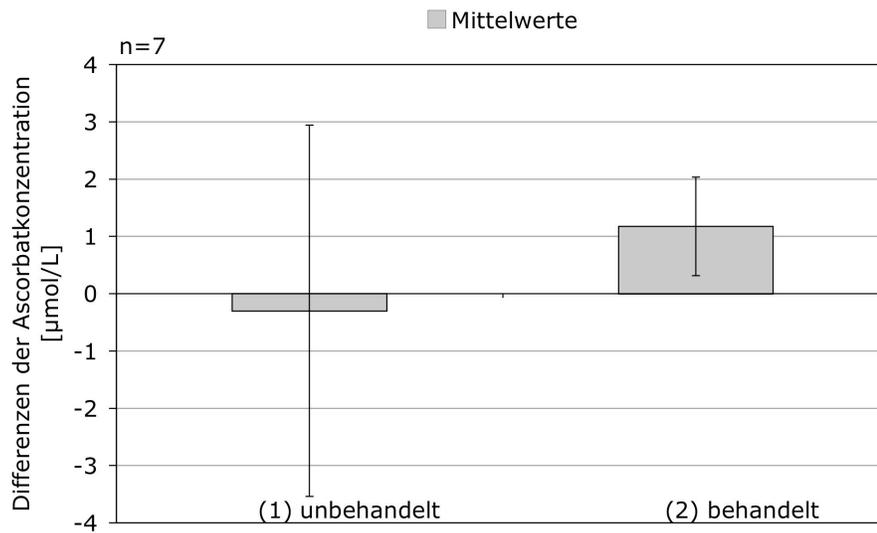


Abbildung 5.5: Veränderung des Ascoratspiegels nach Bestrahlung ohne appliziertes Produkt (1) und nach Applikation der Formulierung (2)

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte für die Senkung des Ascorbatspiegels mit und ohne Behandlung des Testareals. Auch eine detaillierte Darstellung der vorhandenen Probandendaten im Paarvergleich zeigte, wie schon bei der Darstellung des Ascorbylradikalspiegels keine eindeutige Tendenz (Abbildung 5.6).

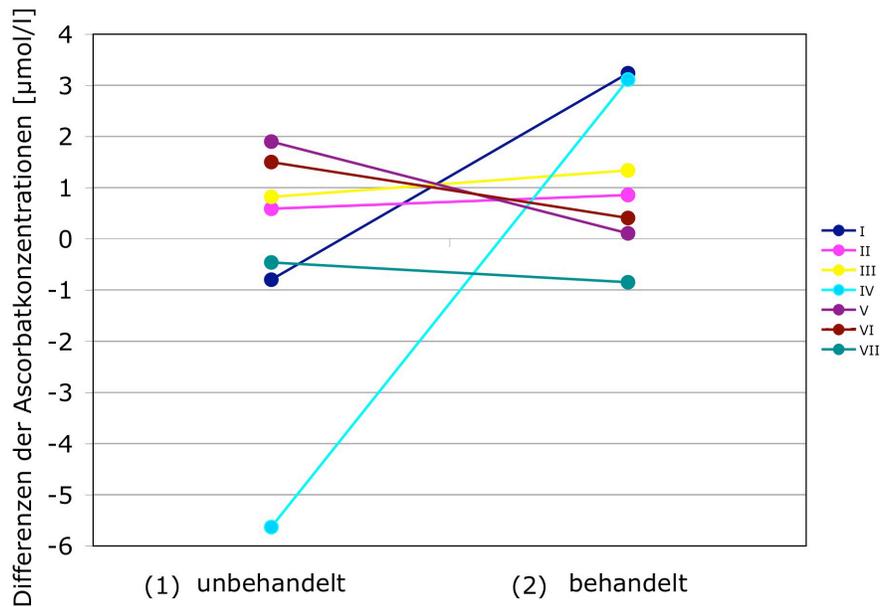


Abbildung 5.6: Individuelle Veränderung des Ascorbatspiegels nach Bestrahlung ohne appliziertes Produkt (1) und nach Applikation der Formulierung (2)

Korrelation von Ascorbylradikalkonzentration und Ascorbatspiegel

Aufgrund der gegenläufigen Annahmen über die Abhängigkeit des Ascorbylradikalspiegels von der vorhandenen Konzentration an Ascorbat³ wurden die vorhandenen Daten für die Ascorbylradikalkonzentration mit den Werten für den Ascorbatspiegel korreliert. Aus den erhaltenen Daten ließ sich kein mathematisches Modell mit einem Korrelationskoeffizienten $> 0,552$ berechnen. Als Modell mit dem größten Korrelationskoeffizienten erwies sich ein exponentieller Zusammenhang nach $y = 72,511e^{0,037x}$.

³ vergleiche ff.

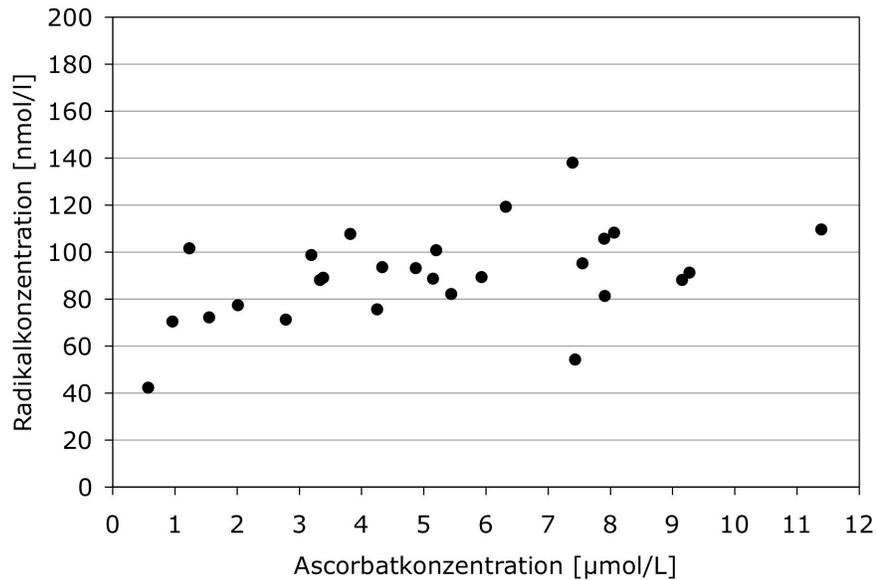


Abbildung 5.7: Korrelation der Werte für den Ascorbylradikalspiegel mit der Ascorbatkonzentration

Quotientenbildung

Zur Überprüfung der aufgestellten These über die Aussagekraft einzelner Messgrößen aus dem prooxidativ-antioxidativen Gleichgewicht wurde der Quotient aus Ascorbylradikalkonzentration und Ascorbatspiegel entsprechend 4.6.7 gebildet. Zunächst zeigte sich die schon aus den vorigen Vergleichen von Parametern hervorgegangene Entwicklung der Ergebnisse: Bei 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit liess sich kein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelter und geschützter UV-A-bestrahlung nachweisen. Jedoch war trotz großer Standardabweichungen und eines geringen Stichprobenumfanges ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte durch den Einfluss der UV-Filter-Formulierung bei einem Signifikanzniveau von 10 % nachweisbar.

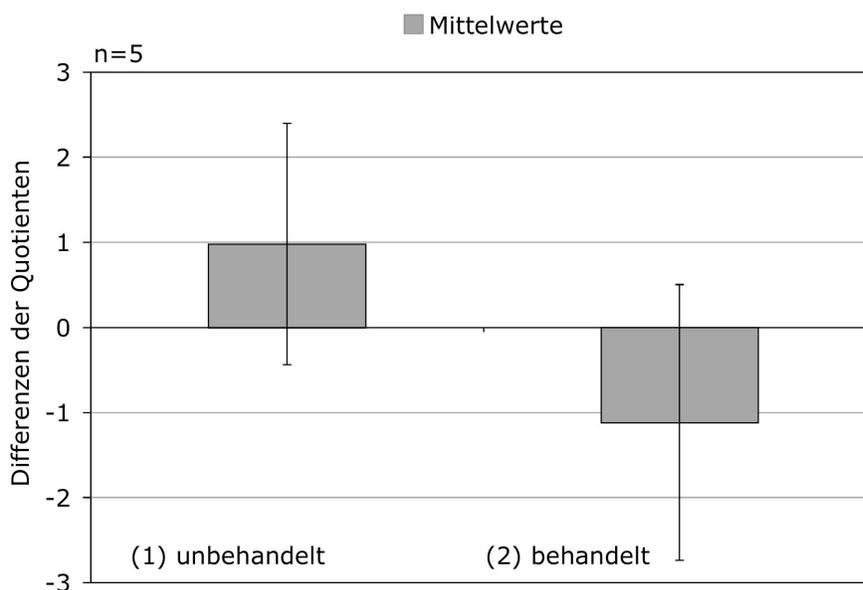


Abbildung 5.8: Veränderung des $\frac{Asc^{\bullet-}}{Asc^-}$ -quotienten nach Bestrahlung ohne appliziertes Produkt (1) und nach Applikation der Formulierung (2)

Die individuelle Betrachtung der Analyseergebnisse im Paarvergleich zeigte, dass bei allen Probanden durch die Anwendung des UV-protectiven Präparates ein niedrigerer Wert für den Quotienten erhalten wurde, als bei der Bestrahlung ohne die Anwendung. Dies bedeutet, dass das Verhältnis von Ascorbylradikal zu Ascorbat im Sinne einer relativen Verminderung der Ascorbylradikalkonzentration im Verhältnis zur vorhandenem freien Ascorbat beeinflusst wurde.

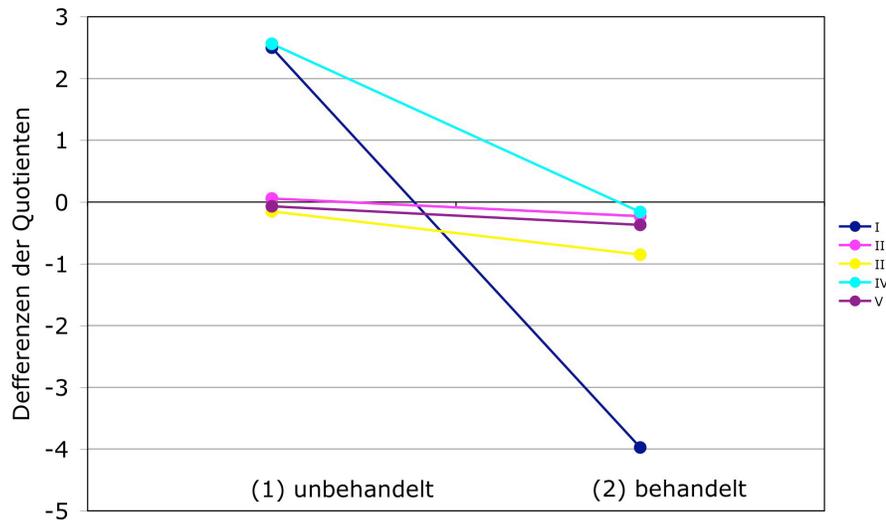


Abbildung 5.9: $\frac{Asc'}{Asc}$ -Quotienten nach Bestrahlung ohne appliziertes Produkt (1) und nach Applikation der Formulierung (2)

5.2 Abschließende Betrachtungen zum Ascorbyl-Assay

5.2.1 Entwicklung

Die im Rahmen der Methodenentwicklung zum Nachweis des Ascorbylradikals aus humanem Kapillarblut verwendeten Parameter stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Versuchsbedingungen überein. Die Tatsache, dass sich das Ascorbylradikal nicht aus einem Volumen von $50 \mu L$ in einer ESR-Glaskapillare nachweisen ließ, deutete auf eine zu niedrige Konzentration des Analyten in dem gewählten Probenvolumen hin. Durch das Versetzen der Probe mit DMSO, wie es von Pietri et al. vorgeschlagen wird [143], konnte diesem Umstand keine Abhilfe geschaffen werden. Durch die Verwendung einer Flachzelle mit kapillärem Innendurchmesser oberhalb und unterhalb der detektionszugänglichen Flachsektion wurde eine ausreichende Erhöhung der Empfindlichkeit der Methode erreicht. Die Problematik der reproduzierbaren und präzisen Probenpositionierung der Flachzelle in einem 90° - Winkel im Verhältnis zu

dem Magnetfeld B wurde durch die Verwendung einer speziellen Probenhalterung mit Passung überwunden. Die Befüllung wurde durch die Verwendung einer Tuberkulinspritze mit einem entsprechend dünnen Dentalkanülenaufsatz ermöglicht. Das Ascorbylradikal wurde erst durch die gekühlte Zentrifugation der Vollblutprobe in gerinnungshemmer-beschichteten Microvetten detektierbar. Es wurde angenommen, dass durch die Zentrifugation bei Raumtemperatur die Elimination der vorhandenen Ascorbylradikalmoleküle durch Disproportionierung in einem so großen Ausmaß verstärkt wurde, dass es zur Unterschreitung der Detektionsgrenze der ESR-Methode kam.

Ein großes Problem im Rahmen der Entwicklung des Ascorbyl-Assays stellte die für die Füllung der Flachzelle benötigte Probenmenge dar. Die vorausgesetzte Verwendung von Kapillarblut und die notwendige Gewinnung von Plasma standen in direktem Konflikt mit der Anwendung des gewünschten Probengefäßes. Die Verwendung der entwickelten Nosferatu-Probenzugseinheit ermöglichte die probandenfreundliche Probennahme einer ausreichenden Menge Kapillarblut, so dass durch die Zentrifugation der als Spitze der Probenzugseinheit dienenden Microvette eine ausreichende Menge Plasma gewonnen werden konnte um die Flachzelle zu befüllen.

Die Gewinnung einer Menge von $75 \mu L$ Plasma aus dem Entnahmevervolumen nach der Punktion einer Fingerbeere stellte einen entscheidenden Entwicklungsschritt im Rahmen der vorliegenden Arbeit dar. Die Verwendung von Tuberkulinspritzen, Parafilm und variabel beschichteten Microvetten als Ausgangsmaterial stellte sich als kostengünstige, sichere und technisch im Umgang mit Probanden gut anwendbare Alternative zu der ausschliesslichen Verwendung von Microvetten dar, da der Probenverlust durch die Verwendung der Probenzugseinheit deutlich geringer ausfiel und ferner zeitsparender gearbeitet werden konnte. Somit empfiehlt sich die Anwendung der entwickelten Probenzughilfe für die Anwendung zur Gewinnung größerer Mengen Kapillarblut durch nicht medizinisch ausgebildetes Personal im Umgang mit Probanden innerhalb kosmetischer Studien.

Die optimale Zentrifugationsdauer für die Probe stellte einen Kompromiss zwischen der minimalen Belastungsdauer des Materials und dem benötigten Probenvolumen dar. Damit aus der Probe möglichst realistisch und zeitnah das Geschehen im syste-

mischen Kompartiment wiedergegeben werden konnte, sollte die Zentrifugationsdauer so gering wie möglich ausfallen. Mit einer Zentrifugationsdauer von vier Minuten lag die Dauer der Probenaufbereitung deutlich unter dem Zeitaufwand, der für die Herstellung einer Untersuchungslösung beispielsweise im Rahmen einer HPLC Analytik notwendig wäre und wurde daher als akzeptable Probenaufbereitungszeit angesehen. Die Überprüfung des mechanischen Einflusses des Zentrifugationsprozesses auf die Analysenlösung anhand der Verwendung des cyclischen Hydroxylamins CPH zeigte, dass höhere Zentrifugationstemperaturen zu einer verstärkten Bildung von Radikalen führten. Dieser Befund unterstützt die These, dass bei höheren Zentrifugationstemperaturen die Bildung des Ascorbylradikals beschleunigt sein könnte. Das Ascorbylradikal zeigte unter den angewandten Bedingungen eine sehr hohe Stabilität und war über sechs Stunden nachweisbar. Dieser Befund entsprach nicht den erwarteten, klassischen Zerfallskinetiken nach exponentiell beschreibbaren Prozessen, jedoch werden vergleichbare kinetische Verhalten beim Zerfall venöser Blutproben beschrieben [177], so dass an dieser Stelle davon ausgegangen wurde, dass es sich nicht um einen Fehler in der Messung handelte.

Möglicherweise liegen in humanem Blut unter bestimmten Bedingungen Faktoren, zum Beispiel Proteine vor, die dazu in der Lage sind, das Ascorbylradikal zu stabilisieren. Die Reproduzierbarkeit der Werte für die Ascorbylradikalbestimmung unter den ermittelten Bedingungen lag mit einem Variationskoeffizienten von 25 % über einen Zeitraum von drei Stunden beobachtet sehr hoch. Jedoch liegt dieser Wert innerhalb akzeptabler Grenzen für die Bestimmung biologischer Proben.

Die Bestimmung des Ascorbinsäurespiegels aus derselben Probe, aus der die Ascorbylradikalkonzentration bestimmt wurde, stellte die Entwicklung des Assays vor ähnliche Probleme, wie der Nachweis des Ascorbylradikals. Ein großes Problem stellten das geringe Probenvolumen, sowie die mangelnde Selektivität zahlreicher Analyseverfahren dar. Diese Problematiken konnten durch die Verwendung des Enzyms Ascorbatoxidase, sowie durch die Verwendung des sauerstoffsensitiven Microx TX3-Sensors umgangen werden. Die Kalibrierung der Ascorbatbestimmung erfolgte mittels PBS gepufferter Natriumascorbatlösungen durch die Reaktion mit derselben Enzymlösung, die auch zur Bestimmung des Ascorbatspiegels in den Plasmaproben zum Einsatz kam. Der gewählte Arbeitsbereich von 0 - 100 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$ für die Erstellung der Kalibriergeraden orientierte sich an Literaturwerten für den mittleren Ascorbatspiegel

gesunder Erwachsener. Die Angaben für diese Werte schwanken jedoch in Abhängigkeit von dem zur Bestimmung der Konzentration verwendeten Analyseverfahren und stellten sich rückwirkend als sehr hoch für die gefundenen Plasmakonzentrationen heraus⁴. Für Messungen in der Zukunft wäre es zu empfehlen, die Kalibrierung bei der Verwendung einer identischen Enzymlösung in einem Bereich zwischen 0 - 20 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$ durchzuführen.

Die Verwendung eines nicht-linearen Regressionsmodelles für die Kalibrierung des Analysensystems zur quantitativen Bestimmung war nicht optimal, jedoch kann die Verwendung eines Enzyms innerhalb des Systems für diesen Zusammenhang verantwortlich gemacht werden, und ließ sich somit nicht vermeiden. Im Rahmen der Zielsetzung wurde das in diesem Zusammenhang erhaltene Ergebnis als hinreichend angesehen, um die folgend besprochenen Studien an Probanden durchzuführen. Die Präzisionsbestimmung lieferte ein ähnliches Bild wie die Ergebnisse für die Kalibrierung⁵. Der erhaltene Variationskoeffizient von 4,02 % für die Präzisionsbestimmung fällt im Vergleich mit anderen in der pharmazeutischen Analytik genutzten Methoden relativ hoch aus. Jedoch wurde auch dieser Wert für die Studie der Prüfung der Anwendbarkeit des Systems auf Probanden in kosmetischen Studien als akzeptabel angesehen.

5.2.2 Anwendung

Die Anwendung der entwickelten Methoden im Rahmen der durchgeführten Pilotstudie gelangen gut bis sehr gut. Die ESR-Küvette konnte unter der Verwendung der Nosferatu-Probenzugseinheit und der Kühlzentrifuge problemlos blasenfrei befüllt werden. Bei den durchgeführten Ascorbatbestimmungen gelang die quantitative Überführung der Probe in das Enzymreaktionsgefäß komplikationslos und die Bestimmung gelang durchgehend.

Anknüpfend an die unter der Verwendung des FORT-Test-Systems erlangten Ergebnisse bezüglich des geschlechtsabhängigen und hormonellen Einflusses auf die Studienergebnisse wurden für die Studie zur Anwendung des Ascorbyl-Assays für den

⁴ Siehe weiter unten

⁵ Linearität

weiblichen Kollektivanteil Probandinnen eingeladen, die unter dem Einfluss einer kontrazeptiven Hormonbehandlung standen.

Die Anzahl der Messwerte für die zur Auswertung herangezogenen Parameter variieren. Für die Ascorbylradikalkonzentration standen 13 Messwertepaare zur Verfügung, da die letzten drei Proben für die Bestimmung des t_{1B} Wertes aufgrund eines Defektes der Flachzelle nicht korrekt aufgenommen werden konnten.

Für die Bestimmung des Ascorbatspiegels konnten lediglich sieben Wertepaare ausgewertet werden. Die Bestimmungen der Ascorbatkonzentration erfolgte für die ersten acht Proben unter der Verwendung eines Nadelsensors mit einer flachen Glasfaser Spitze⁶ anstelle des für die Kalibrierung eingesetzten konisch geformten Sensors. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden diese Werte nicht zur Auswertung herangezogen, da die Geometrie der Sensoroberfläche einen signifikanten Einfluss auf die Empfindlichkeit der Methode besitzt [201].

Die erste Messung unter Verwendung des korrekten Sensortyps wurde ausgeschlossen, da die Sensorspitze im Zuge der Nadelplatzierung mit dem Reaktionsgefäß in Berührung kam und die Fluoreszenzfarbstoffbeschichtung der Sensorspitze beschädigt wurde⁷.

Zur vollständigen Ergebnisbetrachtung unter Verwendung aller vier Einzelwerte gelangten fünf vollständige Probandendatensätze, die zur Auswertung der Quotientenbildung herangezogen wurden. Weder die einzelne Betrachtung des Verhaltens des Ascorbylradikalspiegels noch das der Ascorbatkonzentration der Probanden lieferten einen Hinweis auf den signifikanten Einfluss der UV-A-Bestrahlung auf das prooxidativ-antioxidative Gleichgewicht innerhalb des systemischen Kompartimentes, gemessen an diesen Parametern im Kapillarblut entstammendem Plasma.

Die von Buettner et al. *in vitro* nachgewiesene Korrelation der Höhe des Ascorbylradikalspiegels mit der Ascorbatkonzentration [142] konnte in der durchgeführten Studie *in vivo* nicht zufriedenstellend nachgewiesen werden. Der ermittelte exponentielle Zusammenhang lieferte keinen eindeutigen Hinweis auf einen derartigen Zusammenhang.

⁶ Siehe Abbildung 4.41 auf Seite 177

⁷ Durch ein pulsierendes Aufblinken der Sensorspitze wurde das Anregungslicht des Microx TX3 sichtbar. Dies deutete auf eine Beschädigung hin.

Der Umstand, dass der Einfluss einer oxidativen Noxe nicht für alle Probanden zu einem einheitlichen Ergebnis bezüglich der relativen Veränderung des Ascorbatspiegels und der Ascorbylradikalkonzentration führte legt den Schluss nahe, dass weder die Depletion noch die Steigerung eines Einzelnen dieser Parameter als Marker für die Lage des prooxidativ-antioxidativen Gleichgewichts herangezogen werden sollte. Für die Probanden, die durch die Stresseinwirkung ein Absinken des Ascorbylradikalspiegels erfuhren, liesse sich die These anwenden, dass durch erhöhte oxidative Belastung weniger Ascorbinsäure zur Verfügung stand und daher die Bildung des Radikals vermindert wurde. Demgegenüber wäre ein Anstieg der Konzentration des Ascorbylradikals nach dem Einwirken einer Stressnoxe durch die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies mit Radikalcharakter erklärbar, die dementsprechend vermehrt durch Ascorbat reduziert wurden, was zur Bildung des Ascorbylradikals führte. Auf der Seite des Ascorbatspiegels bestand eine vergleichbare Ergebnislage bezüglich der Tendenz der Ascorbatspiegelschwankungen durch die Einwirkung der UV-A-Strahlung. Eine verminderte Ascorbatkonzentration nach dem Einwirken der Stressnoxe liesse sich im klassischen Sinne des „Fingerprintings“ mit der Depletion des antioxidativen Materials begründen.

Ein Anstieg des Ascorbatspiegels wiederum wäre erklärbar durch die bei oxidativem Stress ausgelöste Freisetzung von Ascorbat aus den glatten Endothelmuskelzellen und von an Erythrocytenoberflächen adsorbierten Speichern [202].

Die Ergebnisse für das Verhalten des Quotienten aus Ascorbylradikal und Ascorbatkonzentration zeigten eine einheitliche und signifikante Entwicklung und Beeinflussung der Werte durch die Bestrahlung mit UV-A-Licht. Für alle zur Auswertung gelangten Probandendatensätze liess sich die im Verhältnis zur gemessenen Ascorbatkonzentration verringerte Bildung von Ascorbylradikal unter der Verwendung des Lichtschutzpräparates nachweisen.

Die im Rahmen der Probandenstudie gefundenen Werte für die Ascorbylradikalkonzentration lagen zwischen 47,7 und 119,29 $\frac{nmol}{L}$ und stimmen somit mit den für venöses Blut publizierten und erwarteten Werten überein [177, 178].

Die gefundenen Plasmakonzentrationen an Ascorbat fielen, verglichen mit publizierten Plasmawerten, geringer aus. Sie lagen zwischen 0,91 und 11,83 $\frac{\mu mol}{L}$. Die in der Literatur beschriebenen Werte variieren jedoch sehr stark in Abhängigkeit von der

Bestimmungsmethode. So beschreibt Stefan mittels HPLC-Analytik ermittelte Werte zwischen 0,57 und 113,55 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$ [203], gegenüber 46 bis 97 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$, die Peter et al. spektralphotometrisch bestimmten [204]. Daher wurden auch die bestimmten Ascorbatspiegel als aussagekräftig erachtet und die enzymatische Umsetzung unter oxygraphischer Verfolgung der Reaktion zur Bestimmung als gut anwendbare, schnelle und probenvolumen-sparende Methode zur Bestimmung des Ascorbatspiegels angesehen.

6 Diskussion und Ausblick

Bedingt durch den Entwicklungscharakter der vorliegenden Arbeit wurden viele Aspekte bereits in Zusammenhang mit den Erkenntnissen, die aus den Ergebnissen hervorgingen und zu den folgenden Schritten in der Entwicklung des Assays, führten im Ergebnisteil sowie in den abschließenden Betrachtungen erörtert und diskutiert.

Das FORT-System zeigte *in vitro* eine annehmbare Arbeitsweise in Bezug auf die Anforderungen an ein analytisches System im Rahmen der Zielsetzung. Durch die Anwendung an dem breit angelegten Experiment der Probandenstudie wurde jedoch die Notwendigkeit deutlich, die Bestimmung der Lage des prooxidativ-antioxidativen Gleichgewichts nicht von einem einzeln bestimmten Zahlenwert für einen Surrogatparameter zur Inzidenz von oxidativem Stress abhängig zu machen. Das FORT-System arbeitet zwar sensibel gegenüber oxidativen Einflüssen, jedoch arbeitet es weder spezifisch für Hydroperoxide, wie vom Hersteller postuliert, noch arbeitet es selektiv für den Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies im allgemeinen. Das FORT-System kann aufgrund des Ansprechens auf die Gegenwart des Plasmaproteins Caeruloplasmin und die daraus entstehenden hohen Werte nicht für eine zuverlässige Aussage über den Zustand des prooxidativ-antioxidativen Gleichgewichtes auf der systemischen Seite durch eine Einzelmessung herangezogen werden.

Für das Heranziehen dieses Systems zu den gewünschten Aussagen wäre bei weiblichen Testpersonen die Anagabe einer etwaigen Medikation mit hormonellen Präparaten, sowie die Angabe des Zyklustages notwendig. Aufgrund der Lokalisation der Biosynthese des Hauptanteils des zirkulierenden Caeruloplasmins muss auch in Erwägung gezogen werden, eine Angabe über die Leberfunktion beziehungsweise bestehende Lebererkrankungen einzuholen. Aufgrund der Höhe einiger Werte, die sich auch durch das Ansprechen des Systems auf Caeruloplasmin nicht erklären lassen sowie den

nicht widerlegten Einfluss von Eisenionen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das FORT-System auf weitere Probenbestandteile sensibel reagiert.

Aus den Ergebnissen der Anwendung des Ascorbyl-assays im Rahmen einer Pilotstudie für die Anwendung an Probanden lässt sich die Einsetzbarkeit des entwickelten Testsystems belegen. Durch die Entwicklung und die Verwendung der optimierten Probenzugbedingungen war es möglich von den Probanden eine ausreichende Menge an Kapillarblut zu entnehmen, so dass die aufeinanderfolgende Bestimmung des Ascorbylradikals und der Ascorbatkonzentration aus einem Volumen von $75 \mu\text{L}$ Plasma ermöglicht wurde.

Die Bestimmung und Relativierung beider Parameter aufeinander stellt einen deutlichen Vorteil gegenüber den üblichen „Fingerprintingmethoden“ zur Auskunft über das prooxidativ-antioxidative Gleichgewicht dar. Durch die Verwendung der beschriebenen Methoden werden Auskünfte über das Quasi-Steady-State-Geschehen auf zwei Seiten des Konzentrationsgleichgewichtes einsichtig anstelle auf einer einzelnen Seite, wie dies durch die Bestimmung eines einzelnen Surrogatparameters wie Markern der Lipidperoxidation oder der DNA-Beschädigung der Fall ist. Ein weiterer Vorteil der entwickelten Methoden besteht in ihrer Anwendbarkeit zur Überprüfung kurzfristiger Einflüsse, wie die Bestrahlung mit UV-Licht, wie durch die Signifikanz in den Ergebnissen der Pilotstudie verdeutlicht wurde. Aufgrund der technischen Misslichkeiten zu Beginn und zum Ende der Studie konnten keine Aussagen - wie ursprünglich geplant - zu den Einflüssen des Probandengeschlechtes oder zum Einfluss der Applikation oraler Kontrazeptiva getätigt werden. Für im Anschluss an die vorliegende Arbeit folgende Versuche wäre es von Interesse zu prüfen, in wieweit sich der hormonelle Einfluss, wie bei der Anwendung der FORT-Test-Systems, auch auf den entwickelten Ascorbyl-Assay auswirkt. Eine intensivere Erhebung von Validierungsdaten für die beschriebenen Methoden im Sinne von Wiederfindungsexperimenten durch den Einsatz ascorbatbefreiter Plasmaproben, sowie der bereits beschriebenen Kalibrierung des Systems zur Ascorbatbestimmung in einem niedriger konzentrierten Bereich wäre wünschenswert.

Für die Zukunft ergibt sich die Einsatzmöglichkeit des analytischen Systems für die Untersuchung systemisch verfügbarer Substanzen mit antioxidativen Eigenschaften im Abgleich mit dem prooxidativ-antioxidativen Gleichgewichtszustand der Haut

durch die Bestimmung der UPE, wie auch die Untersuchung der Beeinflussung potentiell schädlicher Einflüsse durch die topische Applikation protektiv wirkender Substanzen.

Der große Vorteil der Methode, die Bestimmung der am prooxidativ-antioxidativen Gleichgewicht beteiligten radikalischen Spezies anhand des ESR-Experimentes, erschliesst aufgrund des akuten Auftretens dieser ROS nach oxidativen Einflüssen die Möglichkeit nicht nur den langfristigen Einfluss einer Noxe oder den einer Lebensgewohnheit über einen längeren Zeitraum zu untersuchen: wie aus der Pilotstudie hervorgeht lässt sich sogar der kurzzeitige Einfluss einer einmaligen Bestrahlung der Haut mit dem aufgestellten System untersuchen. Von Interesse wären unter diesem Gesichtspunkt die Bestimmung des kurzfristigen Einflusses von systemischer Belastung wie das Rauchen einer Zigarette oder eine sportliche Trainingseinheit und die kurzfristigen Auswirkungen topischer Noxen wie eine kurzzeitige Ozon-Exposition oder die Applikation erythemauslösender Substanzen, wie Natriumdodecylsulfat oder Benzoylperoxid. Dennoch wäre es für die Zukunft nicht minder von Interesse die nicht kurzfristigen bekannten Einflüsse auf das prooxidativ-antioxidative Gleichgewicht wie Alter, Rauchen, Geschlecht (siehe oben) Ernährungsgewohnheiten und Sportgewohnheiten durch die Anwendung des Ascorbyl-Assays zu untersuchen und mit den Ergebnissen der bekannten Methoden zur Bestimmung des oxidativen Status zu vergleichen.

7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung einer Methode zur Beurteilung der schadhafte Auswirkung von UV-A-Strahlung auf den menschlichen Körper durch die Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies im Kapillarblut. Es wurde zunächst ein kommerziell erhältliches Testsystem auf photometrischer Basis auf seine Arbeitsweise und dessen Anwendbarkeit im Rahmen kosmetischer Studien untersucht. Das besagte System basiert auf der acetat-gepufferten Reaktion organischer Hydroperoxide mit einem N,N-dialkylierten p-Phenylendiamin in der Gegenwart katalytischer Mengen von Übergangsmetallionen.

Die Reaktion führt zur oxidativen Bildung eines intensiv gefärbten Radikalkations dessen Bildungsgeschwindigkeit von der Konzentration der anwesenden Hydroperoxide in der Probe abhängig ist. Die Menge organischer Hydroperoxide in biologischen Proben gilt als Indikator für die Inzidenz schädigender Prozesse durch oxidativen Stress speziell der Lipidperoxidation. Die Untersuchung der Zusammensetzung, der Arbeitsweise des Systems hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und der Linearität sowie die Überprüfung des farbgebenden Prinzips mittels ESR-Spektroskopie führten zu dem Einsatz des Systems in einer kosmetischen Probandenstudie mit 127 freiwilligen Testpersonen.

Zur Beurteilung des wechselseitigen Einflusses zwischen Haut und systemischem Kompartiment wurden den Probanden pflanzliche Extrakte mit belegter antioxidativer Wirksamkeit verabreicht, für die ein photoprotektives Potential diskutiert wird. Der Einfluss der in Kapselform applizierten Extrakte aus *Camellia sinensis* und *Vitis vinifera* wurde gegenüber einem Placebo über insgesamt acht Wochen durch zwei Messungen (t_1 nach vier Wochen und t_2 nach acht Wochen) beobachtet. Als Surrogatparameter für die Lage des prooxidativ-antioxidativen Gleichgewichtes und somit für den Belastungszustand durch oxidative Prozesse wurde die UV-A-induzierte ultraschwache Photonenemission (UPE) der Probanden auf dem oberen Rücken im

Ableich mit der Menge an organischen Hydroperoxiden im Kapillarblut bestimmt. Es konnte weder zum Zeitpunkt t_1 noch zum Zeitpunkt t_2 ein signifikanter Einfluss der Pflanzenextrakte in den applizierten Mengen nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich eine geschlechterspezifische Abhängigkeit der photometrisch bestimmten Hydroperoxidkonzentration.

Die bestimmten Werte fielen besonders hoch aus für Frauen, die weibliche Geschlechtshormone applizierten. In einem Langzeit-Experiment über insgesamt zwölf Monate konnte ein Zusammenhang mit der Applikation oraler Kontrazeptiva nachgewiesen werden. Es stellte sich heraus, dass das Testsystem nicht spezifisch für Hydroperoxide arbeitet. Als mit dem hormonellen System assoziierter Blutbestandteil mit einem signifikanten Einfluss auf den gemessenen Wert konnte das Plasmaprotein Caeruloplasmin identifiziert werden.

Anhand der festgestellten Mängel des untersuchten Systems wurde eine Neuerwägung der Anforderungen an ein Testsystem mit dem in der Zielsetzung formulierten Einsatzbereich angestellt. Diese führte zu der neuen Zielsetzung eine Bestimmung mit dem genannten Aussagewert unter der Quantifizierung einer Markersubstanz für oxidativen Stress auf der Basis eines ESR-Assays zu entwickeln.

Die ESR-Spektroskopie ermöglicht die direkte Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies mit Radikalcharakter ohne eine vorausgehende Indikatorreaktion. Als weiteres Kriterium für die Entwicklung der neuen Bestimmungsmethode wurde die Quantifizierung der Markersubstanz in Relation zu ihrem Edukt angelegt. Unter der Annahme eines Quasi-Steady-State-Modells für die Beschreibung des prooxidativ-antioxidativen Gleichgewichtes sollte so eine verbesserte Aussage zu der Verschiebung der Gleichgewichtslage auf die Seite der prooxidativen Prozesse ermöglicht werden. Die Voraussetzungen für die Entwicklung waren die Anwendbarkeit des Systems auf Probanden im Zuge kosmetischer Studien, sowie die Durchführung beider quantifizierender Messungen (Markersubstanz und deren Edukt) aus derselben Probe. Es wurde ein System zum spezifischen Nachweis der radikalischen Semidehydroascorbinsäure im Verhältnis zu ihrem Edukt Ascorbinsäure (Ascorbat) etabliert. Die Besonderheit des Systems liegt in der Verwendung von maximal $75 \mu\text{L}$ Plasma als Probenmatrix, aus welcher beide Bestimmungen nacheinander durchgeführt werden können. Für die schmerzarme Gewinnung eines entsprechenden Aliquotes an kapillarem Vollblut wur-

de ein spezielles Probenzugsystem entwickelt. Das Signal der radikalischen Semidehydroascorbinsäure wurde als charakteristisches Dublett im ESR-Spektrum nachgewiesen und die im Probenvolumen enthaltene Ascorbinsäure durch eine oxygraphisch verfolgte Reaktion mit dem Enzym Ascorbatoxidase quantifiziert.

In einer Studie mit 16 Testpersonen zeigten sich die entwickelten Methoden als für Probanden im Rahmen kosmetischer Studien anwendbar. Zur Beurteilung der Aussagekraft des Systems im Sinne der Zielsetzung erhielten die Probanden zu zwei Messterminen im Abstand einer Woche eine Bestrahlung von 20 J UV-A am Unterarm wobei zu einem der Messtermine vor der Bestrahlung eine Formulierung mit UV-A-Filter topisch appliziert wurde. Anhand der einzelnen Messgrößen Semidehydroascorbinsäure ($n=13, p \geq 0,1$) und deren Edukt Ascorbinsäure ($n=7, p \geq 0,1$) konnte mit den etablierten Methoden kein Einfluss der UV-protectiven Formulierung nachgewiesen werden. Durch die Betrachtung des Radikals im Verhältnis zu seinem Edukt konnte dieser Nachweis (die Verminderung der Bildung des Radikals) erbracht werden ($n=5, p \geq 0,1$).

8 Summary

The main purpose of this work was the development and establishment of a method capable to assess the damaging effects of UV-A-irradiation to the human system by quantifying reactive oxygen species in capillary blood. A commercialized colorimetric test system was used in a cosmetic trial after the examination of the suitability of the test principle. The assay is based on the oxidative conversion of a N,N-disubstituted-p-phenylenediamine derivative at an acidic pH by organic hydroperoxides in the presence of transition metals. The formation of a deeply coloured radical-cation is a function of the amount of hydroperoxides in the sample which are commonly used as a marker for the incidence of oxidative stress. 127 volunteers participated in the trial, that included the administration of capsules containing herbal extracts with well known antioxidant potential to serve as an indicator for the influence on the systemic prooxidant-antioxidant balance.

The influence of standardized extracts from *Camellia sinensis* and *Vitis vinifera* were observed and compared with a placebo group over eight weeks. UV-A- induced ultraweak photon emission (UPE) of the skin in the upper back area was used as a surrogate for skin oxidative stress status. Significant influence could neither be assessed after a period of four weeks nor after eight weeks of extract-administration. The examined hydroperoxide levels showed a significant gender dependence and were found to be especially high in women who were administering female sexual hormones. The photometric test system was shown not to be working specific for hydroperoxides but to be affected by ceruloplasmine levels thus not being a suitable analytical device for the assessment of UV-induced reactive oxygen species formation. Regarding the examined disadvantages a new approach towards the quantification of reactive oxygen species including EPR-spectroscopy in regard to the main aim was made. Another criterion for the new test system was to be able to quantify an oxidative-stress marker-substance in relation to the educt that it is rising from. The quasi-steady-state-

assumption was used for an improved statement about the prooxidant-antioxidant balance shift towards prooxidative processes should be made. Preconditions for the development of the assay further than the application of EPR-spectroscopic methods were the applicability of the methods to cosmetic trials as well as the quantification on both analytes (marker-substance and educt) from the same sample volume. A system for the specific determination of ascorbyl free radical put into perspective towards ascorbate base levels was designed. The innovative aspect about the new system was the use of not more than $75 \mu\text{L}$ plasma sample volume obtained from capillary blood for both ascorbyl free radical and ascorbate quantification. A customized sampling device for the rather pain-free collection of blood aliquotes from the fingertip was developed. The characteristic dublett signal of the ascorbyl free radical was measured by X-band EPR and ascorbate base levels were quantified by oxygraphic tracing of the specific oxidation of ascorbate by ascorbate oxidase. A pilot study with 16 volunteers proved the applicability of the developed methods within cosmetic trial study-designs. For the assessment of the test-systems force of expression in regard to the main aim volunteers obtained a 20 J UV-A-irradiation of the forearm before and after a one week „washout-phase“. The first irradiation treatment was performed without the use of sunscreen whereas during the second irradiation UV-A-protection was used. Values for ascorbyl free radical and ascorbate were obtained before and after irradiation. Single regard of both parameters ascorbyl free radical ($n=13$, $p \geq 0,1$) and its educt ascorbate ($n=7$, $p \geq 0,1$) did not reveal any protective influence of the sunscreen formulation on reactive oxygen species formation. However by regarding the quotient of the ascorbyl free radical and ascorbate base levels a significantly lower extend of ascorbyl free radical production under the use of UV-A-protection was observed ($n=5$, $p \geq 0,1$).

9 Literaturverzeichnis

- [1] WH Koppenol. NO nomenclature? *Nitric Oxide*, 6:96–100, 2002.
- [2] B Halliwell und JMC Gutteridge. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*, 219:1–14, 1984.
- [3] A Bornstein und AM Stroink. Über Sauerstoffvergiftung. *Dtsch Med Wochenschr*, 38:1495–1497, 1912.
- [4] HJ Duchstein und HJ Gurka. Activated species of oxygen: A challenge to modern pharmaceutical chemistry. *Arch Pharm (Weinheim)*, 325:129–146, 1992.
- [5] H Sies. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 82:291–294, 1997.
- [6] MH Shin, YJ Moon, JE Seo, Y Lee, KH Kim und JH Chung. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression. *Free Radical Biol Med*, 44:635–645, 2008.
- [7] A Lehninger, D Nelson und M Cox. *Prinzipien der Biochemie*. Spektrum, 1998.
- [8] I Fridovich. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem*, 245:4053–4057, 1970.
- [9] I Fridovich. Superoxide anion radical, superoxide dismutases and related matters. *J Biol Chem*, 272:18515–18517, 1997.
- [10] B Halliwell und JMC Gutteridge. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 1999.
- [11] K Müller. Aktive Sauerstoffspezies. *Pharm Unserer Zeit*, 17:71–80, 1988.
- [12] H Fenton. Oxidation of tartic acid in the presence of iron. *J Chem Soc*, 65:899–910, 1894.

- [13] H Fenton. Oxidation of certain organic acids in the presence of ferrous salts. *Proc Chem Soc*, 15:224–228, 1899.
- [14] F Haber und JJ Weiss. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc London Ser B*, A147:332–351, 1934.
- [15] WA Pryor, JP Stanley und E Blair. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: a suggested mechanism for the formation of tba-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids*, 11:380–390, 1976.
- [16] EF Elstner. *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. Bibliographisches Institut F.A Brockhaus, 1990.
- [17] GT Wondrak, M Jacobson und EL Jacobson. Endogenous uva-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem Photobiol Sci*, 5:215–237, 2005.
- [18] S Weiss, M Lampert und S Test. Long-lived oxidants generated by human neutrophils: characterization and bioavailability. *Science*, 222:625–628, 1983.
- [19] JS Beckman und WH Koppenol. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good the bad and the ugly. *Am J Physiol*, 271:1424–1437, 1996.
- [20] K van Leyen, K Arai, V Kenyon, B Gerstner, PA Rosenberg, TR Holman und EH Lo. Novel lipoxygenase inhibitors as neuroprotective reagents. *J Neurosci Res*, 86:904–909, 2008.
- [21] H Wang, J Li, PL Follett, Y Zhang, DA Cotanche, FE Jensen, JJ Volpe und PA Rosenberg. 12-Lipoxygenase plays a key role in cell death caused by glutathione depletion and arachidonic acid in rat oligodendrocytes. *Eur J Neurosci*, 20:2049–2058, 2004.
- [22] F Armutcu, M Atayamen, H Atmaca und H Gurel. Oxidative stress markers, C-reactive protein and heat shock protein 70 levels in subjects with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med*, 46:785–90, 2008.
- [23] G Banfi, A Malavazos, E Iorio, A Dolci, L Doneda, R. Verna und MM Corsi. Plasma oxidative stress biomarkers, nitric oxide and heat shock protein 70 in trained elite soccer players. *Eur J Appl Physiol*, 96:483–486, 2006.
- [24] S Weijers und M Weiss. Quasi-steady state assumptions in the modelling of

- bioreactors: model reduction and validation. In *Proc Am Control Conf*, pages 1588–1592. Technical University of Eindhoven, 1999.
- [25] H Sies. *Oxidants and Antioxidants: Oxidative Stress*. Academic Press, 1991.
- [26] G Block, M Dietrich, EP Norkus, JD Morrow, M. Hudes, B Caan und L Packer. Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol*, 156:274–285, 2002.
- [27] H Sies und H de Groot. Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicol Lett*, 64/65:547–551, 1992.
- [28] AP Breen und JA Murphy. Reactions of oxyl radical with DNA. *Free Radical Biol Med*, 18:1033–1077, 1995.
- [29] L Tesoriere, D D’Arpa, D Butera, AM Pintaudi, M Allegra und MA Livrea. Exposure to malondialdehyde induces an early redox unbalance preceding membrane toxicity in human erythrocytes. *Free Radical Res*, 36:89–97, 2002.
- [30] RA Floyd, JJ Watson, PK Wong, DH Altmiller und RC Rickard. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: Sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Radical Res*, 1:163–172, 1996.
- [31] *Europäisches Arzneibuch Grundwerk 2002*. Deutscher Apotheker Verlag, 2002.
- [32] T Slater. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J*, 222:1–15, 1984.
- [33] E Heymann. *Haar, Haut und Kosmetik eine chemische Wechselwirkung*. Hirzel, 1994.
- [34] J Kanitakis. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*, 12:390–401, 2002.
- [35] R Weller, J Hunter, SA John und M Dahl. *Clinical Dermatology*. Blackwell, 2008.
- [36] K Karzel und RK Liedtke. Mechanismen transkutaner Resorption- Pharmakologische und biochemische Aspekte. *Arzneim Forsch*, 39(11):1487–1491, 1989.
- [37] DS Berson. Natural antioxidants. *J Dermatol*, 7:7–12, 2008.
- [38] R Kohen. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress- new approaches for their evaluation. *Biomed Pharmacother*, 53:181–192, 1999.

- [39] BL Diffey. What is light? *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 18:68–74, 2002.
- [40] WAG Bruls und JC van der Leun. Forward scattering properties of human epidermal layers. *Photochem Photobiol*, 40:231–242, 1984.
- [41] AR Young. Chromophores in human skin. *Phys Med Biol*, 42:789–802, 1997.
- [42] G Kindl und W Raab. *Licht und Haut: Bräunung, Lichtschutz, Pflege: Ein Leitfaden für die Beratung in der Praxis*. Govi, 1988.
- [43] YR Helfrich, DL Sachs und JJ Voorhees. Overview of skin aging and photoaging. *Dermatol Int*, 20:177–183, 2008.
- [44] SE Whitmore, CS Potten, CA Chadwick, PT Strickland und WL Morison. Effect of photoreactive light on uv radiation-induced alterations in human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 17:213–217, 2001.
- [45] DS Goodsell. The molecular perspective: Ultraviolet light and pyrimidine dimers. *Oncologist*, 6:298–299, 2001.
- [46] U Kappes, D Luo, M Potter, K Schulmeister und TM Rüniger. Short- and long-wave uv light (UV-B and UV-A) induce similar mutations in human skin cells. *J Invest Dermatol*, 126:667–675, 2006.
- [47] MF Bennett, MK Robinson, ED Baron und KD Cooper. Skin immune systems and inflammation: protector of the skin or promoter of aging. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 13:15–19, 2008.
- [48] J Uitto. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *J Dermatol*, 7:12–16, 2008.
- [49] LH Klingman. Photoaging. manifestations, prevention and treatment. *Dermatol Clin*, 4:517–528, 1986.
- [50] G Schmeinck. Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Bezug auf einzelne reaktive Sauerstoffspezies unter besonderer Berücksichtigung von Wasserstoffperoxid. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg, 2007.
- [51] H Sies. Total antioxidant capacity: appraisal of a concept. *J Nutr*, 137:1493–1495, 2007.

- [52] WA Pryor. Measurement of oxidative stress status in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2:289–292, 1993.
- [53] F Khabiri. Untersuchung oxidativer Prozesse anhand induzierter ultraschwacher Photonenemission (UPE). Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg, 2005.
- [54] F Khabiri, R Hagens, C Smuda, A Soltau, V Schreiner, H Wenck, KP Wittern, HJ Duchstein und WP Mei. Non-invasive monitoring of oxidative skin stress by ultraweak photon emission (UPE)-measurement.I: mechanisms of UPE of biological materials. *Skin Res Technol*, 14:103–111, 2008.
- [55] C Vassalle, C Boni, P Di Cecco und GC Zucchelli. Automation and validation of a fast method for the assessment of in vivo oxidative stress levels. *Clin Chem Lab Med*, 44:1372–1375, 2006.
- [56] MR Cesarone, G Belcaro, M Carratelli, U Cornelli, MT De Sanctis, L Incandela, A Barsotti, R Terranova und A Nicolaidis. A simple test to monitor oxidative stress. *Int J Angiol*, 18:127–130, 1999.
- [57] C Wurster. Ueber die durch Oxydationsmittel aus Di- und Tetraphenylendiamin entstehenden Farbstoffe. *Chem Ber*, 12:2071–2072, 1879.
- [58] E Weitz und K Fischer. Radikale und Chinhydrone. *Angew Chem*, 38:1110, 1925.
- [59] L Michaelis, M Schubert und S Granick. The free radicals of the type of wursters salts. *J Am Chem Soc*, 61:1981, 1939.
- [60] M Lindschinger und W Wonisch. Pox-act assay and d-roms test-what are the facts. *Clin Chem Lab Med*, 44:121–122, 2006.
- [61] A Pasquini, E Luchetti, V Marchetti, G Cardini und EL Iorio. Analytical performances of d-ROMs test and BAP test in canine plasma. Definition of the normal range in healthy labrador dogs. *Vet Res Commun*, 32:137–143, 2008.
- [62] L Dortet, T Nguyen-Khoa, M Kebede, J Couulloch, Z. Massy und B Lacour. Evaluation of lipidperoxidation in hemodialysis patients with a simple test using the free oxygen radical monitor. *Ann Biol Clin (Paris)*, 62:707–711, 2004.

- [63] A Alberti, L Bolognini, D Macciantelli und M Caratelli. The radical cation of n,n-diethyl-para-phenyldiamine: a possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Res Chem Intermed*, 26:253–267, 2000.
- [64] J Abramson, D Jones, S Ashfag und S Rhodes. The FORT test- a novel oxidative stress marker or a well-known measure of ceruloplasmin oxidase activity? *Atherosclerosis*, 2:443–444, 2006.
- [65] Incomat Medizinische Geräte GmbH, Am Höhenstrauch 3. *FORM Sofort-Testsystem Free Oxygen Radicals Monitor*, Juli 2004.
- [66] H Kurz. Oxidativer Stress- ein Zusammenhang mit stressbedingten Symptomen? *J Orthomol Med*, 12:92–97, 2004.
- [67] P Aisen und I Listowsky. Iron transport and storage proteins. *Annu Rev Biochem*, 49:357–393, 1980.
- [68] X Yang und ND Chasteen. Ferroxidase activity of ferritin: Effects of ph, buffer and Fe(II) and Fe(III) concentrations on Fe(II) autoxidation and ferroxidation. *Biochem J*, 338:615–618, 1999.
- [69] CE Mortimer. *Das Basiswissen der Chemie*. Thieme, 1996.
- [70] DA Skoog und JJ Leary. *Instrumentelle Analytik*. Springer, 1992.
- [71] A Dominik und D Steinhilber. *Instrumentelle Analytik*. Jungjohann, 1996.
- [72] M Hesse, H Meier und B Zeeh. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Thieme, 1995.
- [73] G Eckert, T Wegat, S Schaffer, S Theobald und W Müller. Oxidativer Stress- Apothekenrelevante Messmethoden im Vergleich. *Pharm Ztg*, 5600:20–31, 2006.
- [74] G Thews, E Mutschler und P Vaupel. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1999.
- [75] HK Biesalski und P Grimm. *Taschenatlas der Ernährung*. Thieme, 2007.
- [76] M Engelmann, R Bobier, RT Hiatt und I Cheng. Variability of the Fenton reaction of EDTA, DTP, and citrate complexes or iron. *BioMetals*, 16:519–527, 2003.
- [77] I Snyrychova, P Pospisil und J Naus. The effect of metal chelators on the

- production of hydroxyl radicals in thylakoids. *Photosynth Res*, 88:323–329, 2006.
- [78] GR Buettner. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*, 300:535–543, 1993.
- [79] M Salgo und WA Pryor. Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes. *Arch Biochem Biophys*, 333:482–488, 1996.
- [80] F Paneth und W Hofeditz. Über die Darstellung von freiem Methyl. *Chem Ber*, 62:1335–1357, 1929.
- [81] M Mizushima, KM Evenson, JS Wells und RJ Mahler. Laser magnetic resonance of the NO molecule using 78- 79- and 119- μm H₂O laserlines. *Phys Rev Lett*, 5:2276–2287, 1972.
- [82] JA Silver, WL Dimpfl, JH Brophy und JL Kinsey. Laser induced fluorescence determination of internal-state distribution of OH produced by H+NO₂ in crossed molecular beams. *J Chem Phys*, 65:1811–1822, 1976.
- [83] T Dreier und J Wolfrum. Detection of free NH₂(X₂B₁) radicals by CARS spectroscopy. *Appl Phys B*, 33:213–218, 1984.
- [84] S Goldschmidt und F Graef. Optische Untersuchungen an Chinonen und freien Radikalen. *Chem Ber*, 61 A und B:1858–1869, 1928.
- [85] MS Blois. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181:119–200, 1958.
- [86] G Grampp, A Kelterer, S Landgraf, M Sacher und D Niethammer. ESR and ENDOR investigations on various wursters radical cations in solution. experimental results, theoretical ab initio, and DFT calculations. *Monatsh Chem*, 136:519–536, 2005.
- [87] R Kohen, D Fanberstein, A Zelkowicz, O Tirosh und S Farfour. Noninvasive in vivo evaluation of skin antioxidant activity and oxidation status. *Methods Enzymol*, 300:428–437, 1999.
- [88] G Sauermann, WP Mei, U Hoppe und F Stüb. Ultraweak photon emission of human skin in vivo: Influence of topically applied antioxidants on human skin. *Methods Enzymol*, 300:419–428, 1999.

- [89] Y Hanasaki, S Ogawa und S. Fukui. The correlation between active oxygen scavenging, antioxidative scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol Med*, 16:845–850, 1994.
- [90] S Gupta, B Saha und AK Giri. Comparative antimutagenic and anitclastogenic effects of green tea and black tea. *Mutat Res*, 512:37–65, 2002.
- [91] S Katiyar und H Muktar. Tea in chemoprevention of cancer: epidemiologic and experimental studies. *Int J Oncol*, 8:221–238, 1996.
- [92] L Kohlmeier, GK Weterings, S Steck und FJ Kock. Tea and cancer prevention: An evaluation of the epidemiologic literature. *Nutr Cancer*, 27:1–13, 1997.
- [93] YM Jeong, YG Choi, DS Kim, SH Park und JA Yoon. Cytoprotective effect of green tea extract and quercetin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Arch Pharmacol Res*, 28:1251–1256, 2005.
- [94] F Puch, S Samson-Villeger, D Guyonnet, JL Blachon, A Rawlings und T Lassel. Consumption of functional fermented milk containing borage oil, green tea and vitamin E enhances skin barrier function. *Exp Dermatol*, 17:668–674, 2008.
- [95] P Vayalil, YS Amittal, Y Hara, CA Elmets und SK Katiyar. Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. *J Invest Dermatol*, 122:1480–1487, 2004.
- [96] A Chiu, J Chan und D Kern, S Ohler, W Rehmus, A Kimball und HJ Brody. Double-blinded, placebo-controlled trial of green tea extracts in the clinical and histologic appearance of photoaging skin. *J Dermatol*, 31:2855–860, 2005.
- [97] H Rimpler. *Biogene Arzneistoffe*. Deutscher Apotheker Verlag, 1999.
- [98] HH Sherry Chow, IA Hakim, DR Vining, JA Crowell, J Ranger-Moore, WM Chew, CA Celayt, SR Rodney, Y Hara und DS Alberts. Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res*, 11:4627–4633, 2005.
- [99] F Dai, WF Chen und B Zhou. Antioxidant synergism of green tea polyphenols with alpha-tocopherol and l-ascorbic acid in SDS micells. *Biochimie*, im Druck, 2008.

- [100] B Zhou, L Wu, L Yang und ZL Liu. Evidence for alpha-tocopherol regeneration reaction of green tea polyphenols in SDS micells. *Free Radical Biol Med*, 381:78–84, 2005.
- [101] H Lee, J Seo, BH Lee, KH Chung, und DY Chi. Syntheses and radical scavenging activities of resveratrol derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 14:463–466, 2004.
- [102] M Jang, L Cai, GO Udeani, KV Slowing , CF Thomas, CW Beecher, HH Fong, NR Farnsworth, AD Kinghorna, RG Mehta, RC Moon und JM Pezzuto. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275:218–220, 1997.
- [103] S Brandmante, L Barenghi und A Villa. Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc Drug Rev*, 22:169–188, 2004.
- [104] P Langcake und RJ Pryce. The production of resveratrol by vitis vinifera and other members of the vitaceae as response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol*, 9:77–86, 1976.
- [105] J Schwarz. *Klinische Prüfungen von Arzneimitteln und Medizinprodukten*. Cantor, 2000.
- [106] B Stroemer. Die Abgrenzung von kosmetischen Mitteln und Arzneimitteln nach deutschem Recht. *Parfum Kosmet*, 76:690–697, 1995.
- [107] D Slawinska und J Slawinska. *Clinical and Biochemical Analysis In: Chemi and Bioluminescence*. Dekker, 1985.
- [108] A Campbell. *Chemiluminescence, Principles and Applications in Biology and Medicine*. Horowood, 1988.
- [109] S Cohen und F Popp. Low-level luminescence of the human skin. *Skin Res Technol*, 3:177–180, 2006.
- [110] R Vogel und R Suessmuth. Low level chemiluminescence from liquid culture media. *J Appl Microbiol*, 86:999–1007, 1999.
- [111] R van Wijk und D Schamhart. Regulatory aspects of low intensity photon emission. *Experientia*, 44:586–593, 1988.
- [112] WP Mei. About the nature of biophotons. *J Biol Syst*, 2:25–42, 1994.

- [113] R Hagens, F Khabiri, V Schreiner, H Wenck, KP Wittern, HJ Duchstein und WP Mei. Non-invasive monitoring of oxidative skin stress by ultraweak photon emission (UPE)-measurement.II: biological validation on ultraviolet a-stressed skin. *Skin Res Technol*, 14:112–120, 2008.
- [114] GS Timmins, RE Dos Santos, AC Whitwood, HL Catalani, P Di Mascio, BC Gilbert und EJH Bechara. Lipid peroxidation-dependent chemiluminescence from the cyclization of alkylperoxyl radicals to dioxetane radical intermediates. *Chem Res Toxicol*, 10:1090–1096, 1997.
- [115] NC Almedaroglu, S Wolfram und JP Boissel, E Closs, H Spahn-Langguth und P Langguth. Inhibition of folic acid uptake by catechins and tea extracts in caco-2 cells. *Planta Med*, 73:27–32, 2007.
- [116] U Heinrich, K Neukam, H Tronnier, H Sies und W Stahl. Long-term ingestion of high flavanol cocoa provides photoprotection against uv-induced erythema and improves skin condition in women. *J Nutr*, 136:1565–1569, 2006.
- [117] H Sucker, P Fuchs und P Speiser. *Pharmazeutische Technologie*. Thieme Verlag, 1978.
- [118] B Halliwell, MV Clement und LH Long. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett*, 486, 2000.
- [119] T Suvarova und G Kojda. Antioxidative Effekte von körperlichem Training. *Pharm Ztg*, 150:16–22, 2005.
- [120] H Kölbl. Zum Wert und Reaktions-Mechanismus des Neutralrot-Testes. *Med Microbiol Immunol*, 143:387–396, 1957.
- [121] E Borenfreund und JA Puerner. Toxicity determined in vitro by morphological and neutral red absorption. *Toxicol Lett*, 24:119–124, 1985.
- [122] F Yang, W Friedrichs und L de Graffenried. Cellular expression of caeruloplasmin in baboon and mouse lung during development and inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 14:161–168, 1996.
- [123] ZL Harris, AP Durley, TK Man und JD Gitlin. Targeted gene disruption reveals an essential role for caeruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Nat Acad Sci USA*, 96:10812–10817, 1999.

- [124] E Frieden. Caeruloplasmin: the copper transport protein with essential oxidase activity. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 44:187–236, 1976.
- [125] P Moriel, I Pereira und M Bertolami. Is caeruloplasmin an important catalyst for s-nitrosothiol generation in hypercholesterolemia? *Free Radical Biol Med*, 30:318–326, 2001.
- [126] JM Gutteridge und GJ Quinlan. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. *Biochim Biophys Acta*, 11156:144–150, 1993.
- [127] W Mondorf, M Kollmar, E Halberstadt und J Frey. Untersuchungen über das Verhalten des Coeruloplasmins unter oralen Ovulationshemmern. *J Mol Med*, 46:958–959, 1968.
- [128] M de Visser, J Souverijn, F Rosendaal und R Bertina. The effect of plasma caeruloplasmin levels on the sensitivity for activated protein c. *Br J Haematology*, 118:843–846, 2002.
- [129] M Carruthers, C Hobbes, and L Warren. Raised serum copper and caeruloplasmin levels in subjects taking oral contraceptives. *J Clin Pathol*, 19:498–500, 1966.
- [130] S Kromidas. *Validierung in der Analytik*. Wiley-VCH, 1999.
- [131] U Cornelli, R T, and S Luca. Bioavailability and antioxidant activity of some food supplements in men and women using d-roms test as a marker of oxidative stress. *J Nutr*, 131:3208–3211, 2001.
- [132] V Fogliano, V Verde, G Randazzo und A Ritieni. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity in wines. *J Agric Food Chem*, 47:1035–1040, 1999.
- [133] M Worters. TESC und FORT-Messungen zur Ermittlung der antioxidativen Kapazität vor und nach Antioxidantiensupplementierung. *Dtsch Ges Ernaehr Symp*, 6:70, 2004.
- [134] T Ide. Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22:438–442, 2002.

- [135] M Trevisan. Correlates of marker of oxidative status in the general population. *Am J Epidemiol*, 154:348–356, 2001.
- [136] J Ahrends, A Dossett und B Herrmann. Hydroperoxide levels in blood are higher in women and in cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*, 130:178, 2004.
- [137] F Lacy, M Kailasam, D OConnor, GW Schmidt-Schoenbein und RJ Parmer. Plasma hydrogen peroxide production in human essential hypertension: role of heredity, gender and ethnicity. *Hypertension*, 36:878–884, 2000.
- [138] MI Harma, M Harma und O Erel. The FORT-test—a novel oxidative stress marker or a well-known measure of ceruloplasmin oxidase activity? *Atherosclerosis*, 187:441–442, 2006.
- [139] E Wlaas, R Lovstad und O Wlaas. Interaction of dimethyl-p-phenylendiamine with caeruloplasmin. *Arch Biochem Biophys*, 121:480–490, 1967.
- [140] G Musci, GC Bellendi und L Calabrese. The multifunctional oxidase activity of caeruloplasmin as revealed by anion binding studies. *Eur J Biochem*, 265:589–590, 1999.
- [141] L Aschoff und B Freiburg. Über die arteriovenösen Anastomosen bei Tier und Mensch. *Klin Wochenschr*, 17:103–104, 1038.
- [142] GR Buettner und B Jurkiewicz. Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radical Biol Med*, 14:49–55, 1993.
- [143] S Pietri, R Sehuin, P Darbigny und M Culcasi. Ascorbyl free radical: a noninvasive marker of oxidative stress in human open-heart surgery. *Free Radical Biol Med*, 16:523–528, 1994.
- [144] W Bors und GR Buettner. *The vitamin c radical and its reactions. In: Vitamin C in health and disease.* Marcel Dekker Inc., 1997.
- [145] K Doerffel und R Geyer. *Analytikum: Methoden der analytischen Chemie und ihre theoretischen Grundlagen.* Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 1990.
- [146] H Primas und U Müller-Herold. *Elementare Quantenchemie.* Teubner, 1990.
- [147] G Rücker, M Neugebauer und G Willems. *Instrumentelle pharmazeutische Analytik.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2001.

- [148] H Haken und H Wolf. *Atom- und Quantenphysik: Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen*. Springer, 2004.
- [149] J Mehara und H Rechenberg. *The historical development of quantum theory*. Springer, 1998.
- [150] P Atkins, C Trapp, M Cady und C Giunta. *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH, 2001.
- [151] BC Gilbert, I Goldberg, MJ Davies und KA Mclauchlan. *Chemical analysis by E.P.R.* Royal Society of Chemistry, 2000.
- [152] E Zavoisky. Spin magnetic resonance in paramagnetics. *J Phys USSR*, 9:211–216, 1945.
- [153] C Poole Jr. *Electron spin resonance a comprehensive treatise on experimental techniques*. Wiley-VCH, 1967.
- [154] C Kittel. On the gyromagnetic ratio and spectroscopic splitting factor of ferromagnetic substances. *Phys Rev Sect A*, 76:743–748, 1949.
- [155] B Bleaney. Hyperfine structure in paramagnetic salts and nuclear alignment. *Proc R Soc London A*, 208:143–158, 1951.
- [156] M Rogers. Constitution of the cyclic polyamides isolated from nylon 66 polymer. *Nature*, 177:128–129, 1956.
- [157] R Udassin, Y Haskel und A Samundi. Nitroxide radical attenuates ischaemia and reperfusion injury to the rat small intestine. *Gut*, 42:623–627, 1998.
- [158] G Zeltcer, E Berenshtein, A Samuni und M Chevion. Nitroxide radicals prevent meta-aggravated reperfusion injury in isolated rat heart. *Free Radical Res.*, 27:627–635, 1997.
- [159] A Hoffmann, S Goldsten, A Samuni, JB Borman und H Schwalb. Effect of nitric oxide and nitroxide SOD-mimic on the recovery of isolated rat heart following ischemia and reperfusion. *Biochem Pharmacol*, 66:1279–1286, 2003.
- [160] J Fuchs, N Groth und T Herrling. In vivo measurement of oxidative stress status in human skin. *Methods Enzymol*, 352:333–339, 2002.
- [161] E Damiani, L Greci und P Hrelia. Cyto- and genotoxic effects of novel aromatic nitroxide radicals in vitro. *Free Radical Biol Med*, 28:330–336, 2000.

- [162] V Shulaev und DJ Oliver. Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. new tools for reactive oxygen species research. *Plant Physiol*, 141:367–372, 2006.
- [163] AL Kleschyov, P Wenzel und T Münzel. Electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping of biological nitric oxide. *J Chromatogr*, 851:17–20, 2007.
- [164] A Bendlich, L Machlin, O Scandurra, G Burton und D Wayner. The antioxidant role of vitamin C. *Free Radical Biol Med*, 2:419–444, 1986.
- [165] B Halliwell. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radical Res.*, 25:439–454, 1996.
- [166] GR Buettner und BA Jurkewicz. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Free Radical Res*, 145:532–541, 1996.
- [167] GR Buettner und F Schafer. *Ascorbate as an antioxidant. In Vitamin C: its functions and biochemistry in animals and plants.* BIOS Scientific publishers, 2004.
- [168] VA Roginsky und HB Stegmann. Ascorbyl radical as natural indicator of oxidative stress: quantitative regularities. *Free Radical Biol Med*, 17:93–103, 1994.
- [169] G DiLabo und J Wright. Hemiketalformation of dehydroascorbic acid drives ascorbyl radical anion disproportionation. *Free Radical Biol Med*, 29:480–485, 2000.
- [170] W Wells und C Jung. *Regeneration of vitamin C In: Vitamin C in health and disease.* Marcel Dekker Inc., 1997.
- [171] MA Hossain und K Asada. Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *J Biol Chem*, 260:12920–12926, 1985.
- [172] J May, C Cobb, S Mendiratta, K Hill und RF Burk. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J Biol Chem*, 273:23039–23045, 1998.
- [173] J Lee, E Bobst, Y Wang, M Ashraf und A Bobst. Increased endogenous ascorbyl free radical formation with singlet oxygen scavengers in reperfusion injury: an EPR study and functional recovery study in rat hearts. *Cell Mol Biol*, 46:1383–1395, 2000.

- [174] M Sharma, GR Buettner, K Spencer und R. Kerber. Ascorbyl free radical as a real-time marker of free radical generation in briefly ischemic and reperfused hearts. an electron paramagnetic resonance study. *Circ Res*, 74:650–658, 1994.
- [175] G Bemba, H Dulitz, R Schweizer, P Manns und C Niederau. Laborwerte. Sonderheft, Deutsche Leberhilfe e.V Luxemburgerstr. 150 50937 Köln, 2003.
- [176] E Dietrich und A Schulze. *Statistische Verfahren zur Maschinen- und Prozessqualifikation*. Carl Hanser, 2005.
- [177] E Hauck. Ascorbylradikalbestimmung in humanem Blut mittels Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie. Diplomarbeit, Universität Hohenheim, Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaften, 2003.
- [178] M Schneider, K Diemer, K Engelhart, H Zankl, WE Trommer und HK Biesalski. Protective effects of vitamins C and E on the number of micronuclei in lymphocytes in smokers and their role in ascorbate free radical formation in plasma. *Free Radical Res*, 34:209–219, 2001.
- [179] SFRBM. SFRBM 11th annual meeting: Programm and abstracts. In *Free Radical Biol Med*, volume 37, pages 13–17, 2004.
- [180] J Price, C Petzold, M Byrd und H Kenttämäa. Examination of barrierless hydrogen atom abstraction reactions by organic radical cations. *Int J Mass Spectrom*, 212:455–466, 2001.
- [181] D Stoyanovsky, Z Melnikov und A Cederbaum. ESR and HPLC analysis of the interaction of hydroxyl radical with DMSO: Rapid reduction and quantification of POBN and PBN nitroxides. *Anal Chem*, 71:715–721, 1999.
- [182] A Witte, G Laukien und P Dullenkopf. X-Band Elektronenspinresonanz mit Blochscher Messanordnung. *Appl Phys A*, 2:63–70, 1973.
- [183] D Mustacich und G Powis. Thioredoxin reductase. *Biochem J*, 346:1–8, 2000.
- [184] H Löffler, T Haferlach, J Rastetter und L Heilmeyer. *Atlas der klinischen Hämatologie*. Springer, 2004.
- [185] G Biamino und D Scheinert. *Techniques for peripheral intervention*. Urban und Vogel, 2007.

- [186] R Hänsel und O Sticher. *Sekundäre Pflanzenstoffe in Nahrungsergänzungsmitteln in Pharmakognosie-Phytopharmazie*. Springer, 2007.
- [187] U Wintermeyer. *Vitamin C, Entdeckung, Identifizierung und Synthese- heutige Bedeutung in Medizin und Lebensmitteltechnologie*. Deutscher Apotheker Verlag, 1981.
- [188] I Banga und A Szent-Györgyi. The large scale preparation of ascorbic acid from hungarian pepper (capsicum annuum). *Biochem J*, 28:1625–1628, 1934.
- [189] R Galley, R Strohecker und U Moser. *Ascorbinsäure (Kommentar zur Monographie) DAB 9-Kommentar*. Deutscher Apotheker Verlag, 1986.
- [190] M Okamura. An improved method for determination of l-ascorbic acid and l-dehydroascorbic acid in blood plasma. *Clin Chim Acta*, 103:259–268, 1980.
- [191] M Okamura. A specific method for determination of total ascorbic acids in urine by alpha, alpha-dipyridyl method. *Clin Chim Acta*, 115:393–403, 1981.
- [192] H Manzur-UI-Haque. *Assay of vitamins in pharmaceutical preparations*. Wiley-VCH, 1973.
- [193] W Pilz und I Johann. *Spezielle analytische Methoden für die Biochemie und physiologische Chemie*. Springer, 1964.
- [194] H Beutler. *L-Ascorbate and L-dehydroascorbate. In: Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim Chemie, 1984.
- [195] T Porto, C Porto und M Cavalcanti. Kinetic and thermodynamic investigation on ascorbate oxidase activity and stability of curcubita maxima extract. *Biotechnol Prog*, 22:1637–1642, 2006.
- [196] O Farver und I Pecht. Low activation barriers characterize intramolecular electron transfer in ascorbate oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:8283–8287, 1992.
- [197] T Liu, N Chin und M Kiser. Specific spectrophotometry of ascorbic acid in serum or plasma by use of ascorbate oxidase. *Clin Chem*, 28:2225–2228, 1982.
- [198] OH Warburg. Über Eisen, den sauerstoff-übertragenden Bestandteil des Atmungsfermentes. *Biochem Z*, 152:479–494, 1924.
- [199] N Hampp, C Eppelsheim und J Popp. Design and application of thick-film multisensors. *Sens Actuators A*, 31:144–148, 1992.

- [200] O Stern und M Volmer. Über die Abklingungszeit der Fluoreszenz. *Phys Z*, 20:183–188, 1919.
- [201] C Huber. *Microx TX3- Single Channel Fiber-Optic Oxygen Meter for Microsensors*. PreSens Precision Sensing GmbH, Josef-Engert-Str. 9 D-93053 Regensburg, 2004.
- [202] K Davis, S Samson und K Best. Calcium-mediated ascorbate release from coronary artery endothelial cells. *Br J Pharmacol*, 147:131–139, 2006.
- [203] J Stefan. Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma und Leukozyten mit HPLC/UV und HPLC/EC. 1999.
- [204] CD Badrakhan, F Peter, M Holzhauser und A Fuchs. The methanol method for the quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples. *J Biochem Biophys Methods*, 58:207–208, 2004.

Teil II

Appendix

A Experimenteller Teil

Für alle Versuche, in denen Wasser als Lösemittel mit der Bezeichnung Aqua bi-dest. verwendet wurde gilt, dass dieses Wasser mit der Qualität bidestillierten Wassers aus der Aufbereitung einer Membranfiltrationsanlage (Milli-Q-academic) entspricht.

Wenn nichts anderes angegeben ist, ist unter dem statistischen Mittel der Varianzanalyse die Durchführung von F- und t-Tests zu verstehen.

A.1 Material zur Durchführung eines FORT-Tests

Der Materialsatz zur Durchführung eines FORT-Tests umfasst eine Einmalstechhilfe zur Gewinnung von 20 μL Kapillarblut, 20 μL Glaskapillaren zur genauen Dosierung des Probenvolumens, 1,5 mL Eppendorf Microvials mit 1,15 mL vorgefertigter Pufferlösung, sowie Kunststoffküvetten der Schichtdicke 1 cm mit Schraubdeckel, die bereits das lyophilisierte Chromogen enthalten. Letztere sind versiegelt und zum Einmalgebrauch bestimmt. Ein zur Probenaufarbeitung gehöriger Zentrifugationsschritt wird in einer vom Händler mitgelieferten Zentrifuge der Herstellerfirma mit fester Drehzahl, Winkelrotor Modell Callegari 6000 durchgeführt. Das zur kolorimetrischen Bestimmung verwendete Einstrahlphotometer mit temperierter Küvettenhalterung, integrierter Barcodeerfassung und Druckervorrichtung ist ebenfalls im Lieferumfang enthalten und besitzt die Bezeichnung Catellani FORMplus CR2000. Das Gesamtsystem ist in seiner Zusammenstellung patentgeschützt.

A.2 Durchführung einer Bestimmung am Probanden

Alle Untersuchungen an Probanden wurden durchgeführt in den Räumen der Beiersdorf AG, Hamburg bei folgenden, standardisierten Bedingungen

Tabelle A.1: Standardbedingungen

Parameter	Option
Temperatur	$21^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$
Relative Luftfeuchte	$45\% \pm 5\%$

Verbrauchsmaterialien

- Cutasept®[®], Desinfektionsmittel, Bode Chemie Hamburg GmbH & Co. KG, Hamburg
- Merckoquant®[®], Peroxid Analysestäbchen, Merck KGaA, Darmstadt
- Einmallanzetten, Easy-let II, Nadeldurchmesser: 0,375 mm, Eindringtiefe: 1,8 mm, Du Yee Care Inc. Kyungki-Do, Korea

A.3 Zusammensetzung des Testsystems

3.6

A.3.1 Analyse des Puffers 3.6.2

Nachweisreaktion auf Acetationen

Drei vereinigte Pufferlösungen werden nacheinander mit 0,25 mL Lanthannitratlösung *R*, und 0,1 mL Iodlösung $0,05 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ und 0,05 ml verdünnte Ammoniaklösung *R2* versetzt. Die Mischung wird vorsichtig zum Sieden erhitzt. Innerhalb weniger Minuten entsteht ein blauer Niederschlag oder eine tiefblaue Färbung.

Chemikalien

- FORT-Puffer, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- Aqua bidest.
- Lanthannitratlösung *R* [31]
- Lanthannitrat-Hexahydrat, Merck KGaA, Darmstadt
- Verdünnte Ammoniaklösung *R2* [31]
- Ammoniaklösung 28-30%, Merck KGaA, Darmstadt
- Iod-Lösung $0,05 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ (0,1 N), Merck KGaA, Darmstadt
- Natriumacetattrihydrat, Merck KGaA, Darmstadt

pH-Wert-Bestimmung

Chemikalien

- FORT-Puffer, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- Pufferlösung pH=2,0, Primärpuffer, Carl Roth GmbH u. Co. KG, Karlsruhe
- Pufferlösung pH=7,0, Sekundärpuffer, Carl Roth GmbH u. Co. KG, Karlsruhe
- Pufferlösung pH=4,62, Kontrollpuffer, Carl Roth GmbH u. Co. KG, Karlsruhe
- Aqua bidest.

Geräte

- pH-Meter, Metrohm E512, METROHM GmbH u. Co. KG, Filderstadt
- Glaselektrode¹, Metrohm 6.0202.100, METROHM GmbH u. Co. KG, Filderstadt

Kalibrierung der Glaselektrode

Mit dem Primärpuffer wird der Punkt P_1 bei pH=2,00 festgelegt. Anschließend wird mit dem Sekundärpuffer der Punkt P_2 bei pH=7,00 festgelegt. Der Wert für den Kontrollpuffer darf maximal um 0,05 pH-Einheiten von dem auf dem Gefäß angegebenen pH-Wert für den Kontrollpuffer (pH=4,62) abweichen. Eine Dreifachbestimmung ergibt den Wert für Punkt P_3 .

Tabelle A.2: pH-Wert-Bestimmungen

Messung	Kontrollpuffer pH=4,62, P_3	FORT-Puffer	Referenzpuffer
1	4,60	4,82	4,83
2	4,61	4,83	4,82
3	4,60	4,81	4,82
Mittelwert	4,60	4,82	4,82
S_x	0,006	0,01	0,01

¹ Konditioniert in 3M KCl

Herstellung einer Referenzpufferlösung

Referenzlösung Acetatpuffer pH= 4,82

Die Lösung wird hergestellt durch Mischung der beiden Lösungen A und B.

Lösung A (Natriumacetatlösung $0,1 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$)

13,61 g Natriumacetat x 3 H₂O werden mit destilliertem Wasser ad 1000,0 mL aufgefüllt.

Lösung B (Essigsäurelösung $0,1 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$)

6,01g 99 % Essigsäure werden mit Aqua bidest. zu 1000,0 mL verdünnt.

Für 1L Pufferlösung werden 566 mL Lösung A mit 434 mL Lösung B versetzt und anschließend der pH-Wert überprüft. Die Prüfung des pH-Wertes des Referenzpuffers erfolgt wie unter der „pH-Wert-Bestimmung“ beschrieben potentiometrisch mit den dort angegebenen Geräten und Kalibrierlösungen.

Chemikalien

- Natriumacetat trihydrat, Merck KGaA, Darmstadt
- Essigsäure 99 %, Acros Organics BVBA, New Jersey
- Aqua bidest.

IR-spektroskopische Untersuchung

Die Pufferlösungen werden am Rotationsverdampfer bis zur Trockene einrotiert und über Nacht über Orangegel zusammen mit KBr im Exsikkator getrocknet. Die trockene Substanz wird mit 300 mg trockenem Kaliumbromid fein verrieben und zu einem Pressling verarbeitet.

Chemikalien

- FORT-Puffer, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- Referenzpuffer aus eigener Herstellung
- Kaliumbromid, Merck KGaA, Darmstadt

Geräte und Software

- IR-Spektrometer, FTIR-8300, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg
- Shimadzu IR-solution 1.20, 2004CREON-LAB, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg

Osmolarität der Pufferlösung

Der Nullpunkt des Gerätes wird mit Aqua bidest. eingestellt. Das Gerät wird mit der Referenzlösung $300 \frac{mOsmol}{kg}$ NaCl in Wasser kalibriert. Vor jeder Messung wird die Meßzelle mit der zu untersuchenden Lösung gespült. Mit den Analysenlösungen wird analog verfahren.

Chemikalien und Geräte

- Aqua bidest.
- $300 \frac{mOsmol}{kg}$ NaCl in Wasser, Kalibrierlösung, Gonotec GmbH, Berlin
- FORT-Puffer, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- Referenzpuffer aus eigener Herstellung
- Kryoskop, Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin

Tabelle A.3: Bestimmung der Osmolaität

	Nullpunkt	Kalibrierung	FORT-Puffer	Referenzpuffer
1	$0 \frac{mOsmol}{kg}$	$300 \frac{mOsmol}{kg}$	$449 \frac{mOsmol}{kg}$	$152 \frac{mOsmol}{kg}$
2	$0 \frac{mOsmol}{kg}$	$301 \frac{mOsmol}{kg}$	$435 \frac{mOsmol}{kg}$	$151 \frac{mOsmol}{kg}$
3	$0 \frac{mOsmol}{kg}$	$300 \frac{mOsmol}{kg}$	$440 \frac{mOsmol}{kg}$	$151 \frac{mOsmol}{kg}$
Mittelwert	$0 \frac{mOsmol}{kg}$	$300 \frac{mOsmol}{kg}$	$441 \frac{mOsmol}{kg}$	$151 \frac{mOsmol}{kg}$
S_x	$0 \frac{mOsmol}{kg}$	$1 \frac{mOsmol}{kg}$	$7 \frac{mOsmol}{kg}$	$1 \frac{mOsmol}{kg}$

Untersuchung auf die Gegenwart von Eisenionen

Nachweis auf zweiwertige Eisenionen

1 mL Prüflösung wird mit 1 mL $K_3[Fe(CN)_6](III)$ -Lösung R versetzt. Bei der Gegenwart zweiwertiger Eisenionen entsteht eine blaue Färbung, die sich auch nach Zusatz von 5 mL verdünnte Salzsäure R nicht löst.

Nachweis auf dreiwertige Eisenionen

1 mL Pufferlösung wird mit 1 mL $K_3[Fe(CN)_6](II)$ -Lösung R . Bei der Gegenwart dreiwertiger Eisenionen entsteht eine blaue Färbung, die sich auch nach Zusatz von 5 mL verdünnte Salzsäure R nicht löst.

Chemikalien und Geräte

- Aqua bidest.
- FORT-Puffer, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- Referenzpuffer aus eigener Herstellung
- verdünnte Salzsäure R , [31]
- Salzsäure 37 % (rauchend), Merck KGaA, Darmstadt
- Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat, Sigma-Aldrich GmbH, München
- Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat, Sigma-Aldrich GmbH, München
- $K_3[Fe(CN)_6](III)$ -Lösung R [31]
- $K_4[Fe(CN)_6](II)$ -Lösung R [31]
- $K_3[Fe(CN)_6](III)$, Merck KGaA, Darmstadt
- $K_4[Fe(CN)_6](II)$ -Trihydrat, Merck KGaA, Darmstadt

Ammoniumeisen(II)-sulfat-Lösung $10 \frac{mmol}{L}$

392 mg Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat werden in Referenzpuffer zu 100,0 mL gelöst.

Eisen(III)-chlorid-Lösung $10 \frac{mmol}{L}$

270 mg Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat werden in Referenzpuffer zu 100,0 mL gelöst.

A.3.2 Analyse des Farbreagenzes 3.6.3

IR-spektroskopische Untersuchung

Der Inhalt einer Chromogenküvette wird mit einem Spatel vorsichtig aus dem Reaktionsbehältnis geschabt und über Nacht über Orangegel zusammen getrocknet. Mit KBr und der Referenzsubstanz wird analog vorgegangen. Die trockene Substanz wird mit 300 mg trockenem Kaliumbromid fein verrieben und zu einem Pressling verarbeitet. Für das Referenzspektrum werden 1 - 2 mg der Referenzsubstanz N-Ethyl-N-isopropyl-p-phenylendiaminhydrochlorid mit 300 mg trockenem Kaliumbromid fein verrieben und ebenfalls zu einem Pressling verarbeitet.

Chemikalien

- FORT-Chromogen, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- N-Ethyl-N-isopropyl-p-phenylendiaminhydrochlorid, Fluka, Sigma-Aldrich GmbH, München
- Kaliumbromid, Merck KGaA, Darmstadt

Geräte und Software

- IR-Spektrometer, FTIR-8300, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg
- Shimadzu IR-solution 1.20, 2004CREON-LAB, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg

Untersuchung auf die Gegenwart von Eisenionen

Die Nachweisreaktionen wurden entsprechend der Vorschriften unter Punkt A.3.1 durchgeführt.

Chemikalien und Geräte

- Aqua bidest.
- FORT-Chromogen, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- N-Ethyl-N-isopropyl-p-phenylendiaminhydrochlorid, Fluka, Sigma-Aldrich GmbH, München
- Referenzpuffer aus eigener Herstellung
- verdünnte Salzsäure *R*, [31]
- Salzsäure 37 % (rauchend), Merck KGaA, Darmstadt
- Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat, Sigma-Aldrich GmbH, München
- Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat, Sigma-Aldrich GmbH, München
- $K_3[Fe(CN)_6]$ (III)-Lösung *R* [31]
- $K_4[Fe(CN)_6]$ (II)-Lösung *R* [31]
- $K_3[Fe(CN)_6]$ (III), Merck KGaA, Darmstadt
- $K_4[Fe(CN)_6]$ (II)-Trihydrat, Merck KGaA, Darmstadt

Ammoniumeisen(II)-sulfat-Lösung $10 \frac{mmol}{L}$

392 mg Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat werden in Referenzpuffer zu 100,0 mL gelöst.

Eisen(III)-chlorid-Lösung $10 \frac{mmol}{L}$

270 mg Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat werden in Referenzpuffer zu 100,0 mL gelöst.

Vergleichslösungen

Aus einer quantitativen Voruntersuchung der Chromogenküvetten mittels UV-Vis Spektroskopie ging hervor, dass sich in jeder Testküvette 4,01 mg Chromogen befinden. Es wurde daher 1 mL einer Lösung von 400 mg N-Ethyl-N-isopropyl-p-phenylendiaminhydrochlorid in Referenzpuffer als eisenfreie Referenzlösung verwendet. Für die eisenhaltigen Referenzlösungen wurden je 20 mg Referenzsubstanz in 50,0 ml Eisenlösung gelöst.

A.3.3 Zugabe von Eisen 3.6.4

Bestimmung der Methodenpräzision für die Blindwertbestimmungen, die Kapillarblutbestimmung, Zugabe von Eisenionen

Chemikalien und Geräte

- FORT-Chromogen, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- FORT-Puffer, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- PBS Calcium und Magnesium-frei, PAA laboratories GmbH, Pasching
- Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat, Sigma-Aldrich GmbH, München
- Eisentabletten-ratiopharm, Ratiopharm GmbH, Ulm
- Catellani FORMplus CR2000, Einstrahlphotometer, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- Zentrifuge, Winkelrotor Callegari 6000, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- Einmallingzetten, Easy-let II, Nadeldurchmesser: 0,375 mm, Eindringtiefe: 1,8 mm, Du Yee Care Inc. Kyungki-Do, Korea

Ammoniumeisen(II)-sulfat-Lösung $10 \frac{mmol}{L}$

392 mg Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat werden in Referenzpuffer zu 100,0 mL gelöst.

Tabelle A.4: Bestimmung der Methodenpräzision für Bestimmungen aus Kapillarblut

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	\bar{x}	S_x	$S_{rel} \%$
PBS	38	36	39	36	38	39	--	--	--	--	38	1	4
Blut	322	300	288	306	300	288	310	296	306	302	302	10	3

Einfluss von Eisen(II)-Ionen

Zu einer Blindprobe, sowie zu einer Kapillarblutprobe werden 20 μL der oben beschriebenen Lösung an Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat zugegeben. Vor der Zugabe wird ein äquivalentes Puffervolumen entfernt. Die Werte werden in einer Dreifachbestimmung mit den entsprechenden Proben ohne Eisenzusatz verglichen

Tabelle A.5: Zugabe von Eisen-II-Ionen

	Blindwert	Leerwert + Fe^{2+}	Kapillarblut	Kapillarblut + Fe^{2+}
1	39	42	538	556
2	38	39	526	521
3	36	41	542	510
\bar{x}	38	41	535	529
s_x	2	2	8	24

Einfluss von Eisen(III)-Ionen

Zusammensetzung des Eisen-präparates laut Beipackzettel

151,11-158,29 mg Eisen(II)-sulfat Monohydrat, mikrokristalline Cellulose, vorverkleisterte Stärke, Crospovidon, Saccharosefettsäureester, Siliciumdioxid, Ethylcellulose, Carrageenan, Macrogol, Talkum, Triethylcitrat, Eisenoxid, Eisenhydroxid

Tabelle A.6: Orale Gabe von Eisen-II-Ionen

	t_0	t_1	t_2	t	\bar{x}	S_x	$S_{rel} \%$
Proband I	302	322	350	346	330	22	7
Proband II	296	210	296	264	267	41	15
Proband III	426	430	468	372	424	39	9
Proband IV	202	250	356	284	273	65	24
Proband V	252	226	256	276	253	21	8
Proband VI	560	464	564	534	531	46	9

A.3.4 Zugabe von Natrium-EDTA, und Einfluss von Antioxidanzzugabe 3.6.5 und 3.6.6

Zu einer Kapillarblutprobe werden 20 μL der weiter unten beschriebenen Lösung an Natrium-EDTA beziehungsweise Natriumascorbat zugegeben. Vor der Zugabe wird ein äquivalentes Puffervolumen entfernt. Die Werte werden in einer Dreifachbestimmung mit den entsprechenden Proben ohne Reagenzienzusatz verglichen.

Chemikalien und Geräte

- FORT-Chromogen, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- FORT-Puffer, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- PBS Calcium und Magnesium-frei, PAA laboratories GmbH, Pasching
- Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz-Dihydrat, Merck KGaA, Darmstadt
- Na-L(+)-Ascorbat, AppliChem GmbH, Darmstadt
- Catellani FORMplus CR2000, Einstrahlphotometer, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- Zentrifuge, Winkelrotor Callegari 6000, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- Einmallanzetten, Easy-let II, Nadeldurchmesser: 0,375 mm, Eindringtiefe: 1,8 mm, Du Yee Care Inc. Kyungki-Do, Korea

Natrium-EDTA-Lösung 10 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$

186 mg Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz-Dihydrat werden in PBS zu 50,0 mL gelöst.

Natriumascorbatlösung 5 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$

99 mg Na-L(+)-Ascorbat werden in PBS zu 100,0 mL gelöst.

Tabelle A.7: Zugabe von EDTA und L(+)-Ascorbat

Messung	Kapillarblut	Kapilarblut + EDTA	Kapilarblut + Ascorbat
1	572	126	0
2	577	130	0
3	569	128	0
\bar{x}	573	28	0
S_x	4	2	0

A.4 Untersuchung des farbgebenden Prinzips 3.7

A.4.1 Nachweis des farbigen Radikalkations

3.7.2

Chemikalien, Geräte und Software

- FORT-Chromogen, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- FORT-Puffer, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- Catellani FORMplus CR2000, Einstrahlphotometer, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- Zentrifuge, Winkelrotor Callegari 6000, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- Einmallanzetten, Easy-let II, Nadeldurchmesser: 0,375 mm, Eindringtiefe: 1,8 mm, Du Yee Care Inc. Kyungki-Do, Korea
- ESR-Spektrometer, X-Band ESR Miniscope MS 200, Magnettech GmbH, Berlin
- 50 μ L ESR-Kapillaren, Ringcaps-Micro-Einmal Piptten, Hirschmann Laborgeräte GmbH Co.KG, Eberstadt
- MiniScopeControl v2.5.1, 2003, Magnettech GmbH, Berlin

Tabelle A.8: Einstellungen am Miniscope MS200

Frequenz	Feld	Breite	Zeit	Modulation	Verstärkung	Punkte
9,4 GHz	3390 G	200 G	30 s	6 G	400	512

A.4.2 Bestimmung von Feldmitte, Linienbreite und g-Wert

Für die Ermittlung der Signaleigenschaften wurde bei den oben genannten Einstellungen fünffach eine FORT-Reaktion durchgeführt und über einen Zeitraum von 10 Minuten verfolgt. Aus jedem Reaktionsansatz wurden drei vollständige Datensätze nach drei, sechs und neun Minuten ermittelt. Die resultierenden 15 Datensätze wurden zur Bestimmung der Feldmitte und der Linienbreite verwendet. Der g-Wert wurde nach dem Umstellen der Formel für die Resonanzenergie nach

$$g = \frac{h \cdot \nu}{\nu_B \cdot B_0}$$

berechnet.

Tabelle A.9: Daten zur Bestimmung von Feldmitte, Linienbreite und g-Wert

Feldmitte B_0 in G	Linienbreite in G	g-Wert
3389,71	52,6	2,276590731
3387,62	53,34	2,27518705
3388,79	55,5	2,275972843
3389,79	45,04	2,276644461
3386,15	43,1	2,274199771
3388,94	49,3	2,276073585
3390,33	46,4	2,277007135
3388,02	46,4	2,275455697
3388,1	54,16	2,275509426
3388,29	46,78	2,275637034
3388,29	50,28	2,275637034
3388,6	45,52	2,275845235
3388,31	46,68	2,275650466
3388,12	44,26	2,275522859
3388,96	48,54	2,276087018

Bestimmung der Linearität und der Korrelation der FORT-Werte mit dem ESR-Signal

Chemikalien, Geräte und Software

- FORT-Chromogen, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- FORT-Puffer, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- Aqua bidest.
- Wasserstoffperoxidlösung 30 %, Fluka, Sigma-Aldrich GmbH, München
- Catellani FORMplus CR2000, Einstrahlphotometer, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- Zentrifuge, Winkelrotor Callegari 6000, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- ESR-Spektrometer, X-Band ESR Miniscope MS 200, Magnettech GmbH, Berlin
- 50 μL ESR-Kapillaren, Ringcaps-Micro-Einmal Pipetten, Hirschmann Laborgeräte GmbH Co.KG, Eberstadt
- MiniScopeControl v2.5.1, 2003, Magnettech GmbH, Berlin
- Dintest 2005de, Analytiksoft, Heidelberg

Wasserstoffperoxidlösung 1 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$

11 μL 30 % Wasserstoffperoxidlösung, mit Aqua bidest. auf 100,0 ml aufgefüllt.

Wasserstoffperoxidlösung 2 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$

23 μL 30 % Wasserstoffperoxidlösung, mit Aqua bidest. auf 100,0 ml aufgefüllt.

Wasserstoffperoxidlösung 3 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$

34 μL 30 % Wasserstoffperoxidlösung, mit Aqua bidest. auf 100,0 ml aufgefüllt.

Wasserstoffperoxidlösung 4 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$

45 μL 30 % Wasserstoffperoxidlösung, mit Aqua bidest. auf 100,0 ml aufgefüllt.

Wasserstoffperoxidlösung 5 $\frac{mmol}{L}$

57 μL 30 % Wasserstoffperoxidlösung, mit Aqua bidest. auf 100,0 ml aufgefüllt.

Wasserstoffperoxidlösung 6 $\frac{mmol}{L}$

69 μL 30 % Wasserstoffperoxidlösung, mit Aqua bidest. auf 100,0 ml aufgefüllt.

Wasserstoffperoxidlösung 7 $\frac{mmol}{L}$

80 μL 30 % Wasserstoffperoxidlösung, mit Aqua bidest. auf 100,0 ml aufgefüllt.

Wasserstoffperoxidlösung 0,1 $\frac{mmol}{L}$

5 ml der Wasserstoffperoxidlösung 1 $\frac{mmol}{L}$, mit Aqua bidest. auf 50,0 ml aufgefüllt.

Wasserstoffperoxidlösung 0,5 $\frac{mmol}{L}$

25 ml der Wasserstoffperoxidlösung 1 $\frac{mmol}{L}$, mit Aqua bidest. auf 50,0 ml aufgefüllt.

Tabelle A.10: Daten zur Bestimmung der Linearität

Konzentrationsniveau	\bar{x} FORT-Wert in U	S_x	\bar{x} ESR-Wert	S_x
0,1 $\frac{mmol}{L}$	84	7	2242	15
0,5 $\frac{mmol}{L}$	175	8	3793	161
1 $\frac{mmol}{L}$	190	2	3905	28
2 $\frac{mmol}{L}$	284	30	5006	265
3 $\frac{mmol}{L}$	404	21	6276	249
4 $\frac{mmol}{L}$	484	4	7550	79
5 $\frac{mmol}{L}$	640	2	9841	159
6 $\frac{mmol}{L}$	713	11	10799	290
7 $\frac{mmol}{L}$	582	22	12545	565

Tabelle A.11: Dintest®-Ergebnisse der linearen Regression für den FORT-Wert

Parameter	FORT
Steigung a	107,425
Ordinatenabschnitt b	75,711
Korrelationskoeffizient r	0,9985
Mittelwert \bar{x}	3,513
Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 95 %)	nein
Residuen haben einen Trend (Trendtest nach Neumann, 95 %)	nein
Max. Abweichung ist ein Ausreisser (F-Test 95 %)	nein
Reststandardabweichung S_y	15,256
Verfahrensstandardabweichung S_{x0}	0,142
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0}	,042
Optimales Regressionsmodell	linear
lineare Regression vertretbar	ja

A.5 Probandenstudie unter Anwendung des FORT-Testsystems zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Haut und systemischem Kompartiment 3.8

Chemikalien und Geräte

- FORT-Chromogen, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- FORT-Puffer, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- Catellani FORMplus CR2000, Einstrahlphotometer, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- Zentrifuge, Winkelrotor Callegari 6000, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- UPE-System, SRUPE-UPE, MUT, Wedel
- Photomultiplier, Bialk-Photokathode, 9635 QD,
- Xenonlampe, Oriol, 300 W, LOT-Oriol GmbH Co. KG, Darmstadt, spektrale Bandbreite >250 nm, Intensitätsmaximum zwischen 350 und 475 nm

Tabelle A.12: Dintest®-Ergebnisse der linearen Regression für die ESR Bestimmung

Parameter	ESR
Steigung a	1417,3
Ordinatenabschnitt b	2380,7
Korrelationskoeffizient r	0,9939
Mittelwert \bar{x}	3,178
Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 95 %)	ja
Residuen haben einen Trend (Trendtest nach Neumann, 95 %)	nein
Max. Abweichung ist ein Ausreisser (F-Test 95 %)	nein
Reststandardabweichung S_y	417,12
Verfahrensstandardabweichung S_{x0}	0,294
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0}	9,251
Optimales Regressionsmodell	quadratisch
lineare Regression vertretbar	ja

- Filter, WG 335, Schott AG, Mainz
- Filter, UG 11, Schott AG, Mainz
- Radiometer, IL-1700, International Light, Newburyport
- UPE-Software, Felix, v1.4.1, Photon Technology International, PhotoMed GmbH, Seefeld

Methode

Zur Induktion der UPE wurden die Probanden für die Dauer von acht Sekunden mit einer Intensität von $4 \frac{mW}{cm^2}$ UV-A bestrahlt und nach einer Karenzzeit von 0,5 s wurde die UPE über einen Zeitraum von 60 s aufgenommen. Die Begrenzung auf den UV-A- Bereich wurde durch das Einbringen zweier Kantenfilter (WG 335 und UG 11, Schott AG, Mainz²) in den Strahlengang der Xenonlampe gewährleistet. Die UV-A-Strahlungsintensität, sowie der UV-B Anteil wurden täglich vor Beginn der Messungen mittels eines Radiometers der Serie IL-1700, International Light, Newburyport unter Verwendung spezieller Messsonden überprüft. Ferner wurde anhand

² Von der European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA) vorgeschlagene Kombination für die Testung und Beurteilung von Wirkstoffen und Formulierungen mit UVA-Schutzfunktion.

eines optischen Reflexionsstandards, sowie mit einer graphit-beschichteten Aluminiumplatte die Integrität des Photomultipliers sichergestellt. Zur Auswertung diente die unter 3.8.1 beschriebene „ROI“.

Vorstudie zum Vergleich der Testareale Unterarm vs. Rücken

Von zehn gesunden Probandinnen im Alter zwischen 24 und 55 wurden auf den Unterarmen, sowie auf dem Rücken auf vier Arealen die UPE-Werte nach der oben genannten Methode bestimmt. Die Messungen wurden an drei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt, so dass drei Messreihen vorlagen. Aus der Grafik lässt sich entnehmen, dass der Variationskoeffizient für den UPE-Wert auf dem Rücken an allen drei Tagen niedriger lag, als für die Unterarm-Areale.

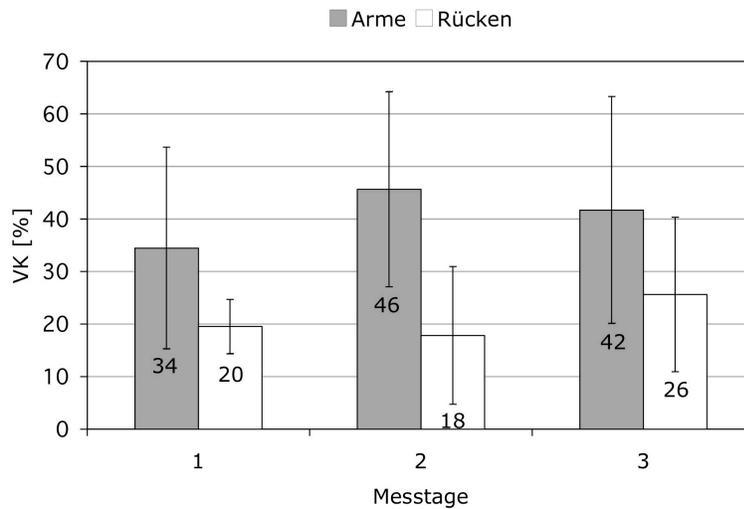


Abbildung A.1: Vergleich der mittleren Variationskoeffizienten des UV-A-induzierten UPE-Signals auf Unterarmen und Rücken von zehn gesunden Probandinnen

Ernährungstagebuch

Datum: 22.2 / 06 : 23 Studenttag

Bitte geben Sie die Uhrzeit der Kapselinnahme an ___:___ Uhr
 Bitte machen Sie einen Strich, wann Sie eine Einheit (siehe Tabelle) folgender Nahrungsmittel zu sich genommen haben bzw. tragen Sie weitere Besonderheiten ein – s. a. Beispiel auf der ersten Seite:

Tageszeit	6 h	7 h	8 h	9 h	10 h	11 h	12 h	13 h	14 h	15 h	16 h	17 h	18 h	19 h	20 h	21 h	22 h	Σ	Summe
Kaffee / Schwarztee (Tassen)																			
Obst (Portion)																			
Gemüse (Portion)																			
Fruchtsaft (Glas)																			
Gemüsesaft (Glas)																			
Weißwein (Glas)																			
Rotwein (Glas)																			
Fleisch / Wurst (Portion)																			
Fisch (Portion)																			
Medikamente*																			
Nahrungsergänzungsmittel*																			
Zigaretten (Stück)																			
Sport (1 Einheit)																			

* Medikamente / Nahrungsergänzungsmittel (genaue Bezeichnung / Name): _____

Bemerkungen: _____

Abbildung A.2: Auszug aus dem an die Probanden ausgegebenen Ernährungstagebuch

Präparate

Zusammensetzung des Placebos (10)

RRR-alpha-Tocopherol-Konzentrat 5 IE., Folsäure Ph. Eur., Hartfett Ph. Eur., Mittelkettige Triglyceride Ph. Eur., Lecitin aus Sojabohnen, Glycerol 85 % Ph. Eur., Gelatine, 160 Bloom Ph. Eur., Titandioxid Ph. Eur., Eisenoxid schwarz, Eisenoxid braun, Eisenoxid gelb.

Zusammensetzung des Rotwein-Präparates (20)

Rotwein-Extrakt Provinols *TM*, RRR-alpha-Tocopherol-Konzentrat 5 IE., Folsäure Ph. Eur., Hartfett Ph. Eur., Mittelkettige Triglyceride Ph. Eur., Lecitin aus Sojabohnen, Glycerol 85 % Ph. Eur., Gelatine, 160 Bloom Ph. Eur., Titandioxid Ph. Eur., Eisenoxid schwarz, Eisenoxid braun, Eisenoxid gelb.

Zusammensetzung des Grüntee-Präparates (30)

Grüntee-Extrakt Plantalin, RRR-alpha-Tocopherol-Konzentrat 5 IE., Folsäure Ph. Eur., Hartfett Ph. Eur., Mittelkettige Triglyceride Ph. Eur., Lecitin aus Sojabohnen, Glycerol 85 % Ph. Eur., Gelatine, 160 Bloom Ph. Eur., Titandioxid Ph. Eur., Eisenoxid schwarz, Eisenoxid braun, Eisenoxid gelb.

Auswertung und statistische Methoden

- Überprüfung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilks-Test
- Beurteilung der Ausgangs-Messbedingungen mittels Varianzanalyse
- Vergleiche zum Ausgangswert mittels Varianzanalyse
- Paarvergleiche mittels Tukey-Test und Wilcoxon-Test

Software

- s. Working Instruction WI 10 STA 110 in der aktuellen Version
- Microsoft Excel Office 2003 und das Software Paket SAS for Windows v9.1
- Originpro v7.5

Auswertung der UPE-Ergebnisse

Das unbehandelte Niveau lag zum Zeitpunkt t_0 bei 1263 Counts. Es konnte kein Unterschied zwischen den drei Behandlungsgruppen nachgewiesen werden. Der Ausgangszustand konnte als homogen betrachtet werden.

Tabelle A.13: Daten zur Auswertung der UPE

Präparat	Stichproben	$\Delta t_1 - t_0$	$\Delta t_2 - t_0$	$\frac{t_1}{t_0} \cdot 100 \%$	$\frac{t_2}{t_0} \cdot 100 \%$
Placebo	48	125	66	114	111
Rotwein	38	213	38	119	107
Grüntee	39	230	243	119	122

Primäres Ziel

Zu dem Zeitpunkt t_2 konnte weder mit dem Rotwein-Präparat (20) noch mit dem

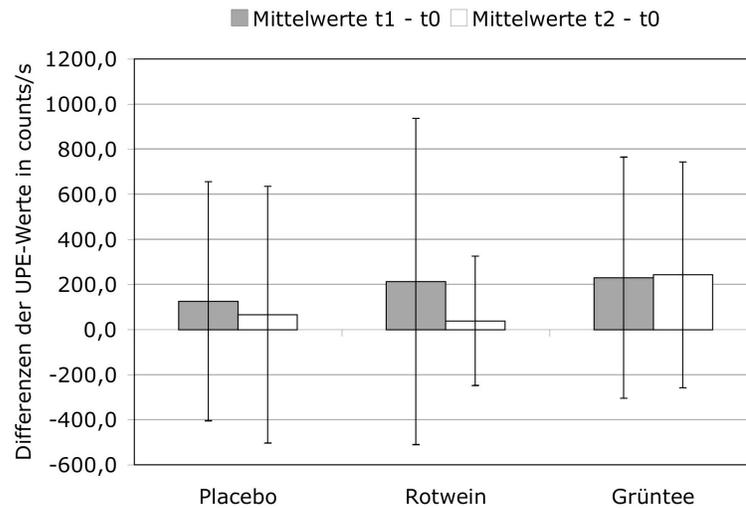


Abbildung A.3: Vergleich der Mittelwerte der Differenzen aus den UPE-Werten zu den Zeitpunkten t_0 , t_1 und t_0 , t_2

Grüntee-Präparat (30) ein signifikanter Behandlungsunterschied zum Placebo (10) nachgewiesen werden. (p-Wert (10-20) = 0.3095 und p-Wert (10-30) = 0.2270)

Sekundäres Ziel

Zu dem Zeitpunkt t_1 konnten keine signifikanten Behandlungsunterschiede nachgewiesen werden (p-Werte ≥ 0.7298). Zu dem Zeitpunkt t_2 konnten beide Veren signifikant differenziert werden: (20) < (30). Im Zeitverlauf konnte für Behandlung (10) folgender signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (<: kleinere Photonenzahl als): $t_0 < t_1$ Im Zeitverlauf konnten für die Behandlungen 20 und 30 keine signifikanten Unterschiede zum Ausgangswert nachgewiesen werden ($0.1616 \leq$ p-Werte ≤ 0.9110).

Auswertung der FORT-Test-Ergebnisse

Das unbehandelte Niveau lag zum Zeitpunkt t_0 bei durchschnittlich 343 Einheiten. Zum Zeitpunkt t_0 konnte kein Unterschied zwischen den drei Behandlungsgruppen

nachgewiesen werden. Der Ausgangszustand konnte als homogen betrachtet werden.

Tabelle A.14: Daten zur Auswertung der FORT-Werte

Präparat	Stichproben	$\Delta t_1 - t_0$	$\Delta t_2 - t_0$	$\frac{t_1}{t_0} \cdot 100 \%$	$\frac{t_2}{t_0} \cdot 100 \%$
Placebo	49	14	23	105	107
Rotwein	38	4	24	102	108
Grüntee	39	24	47	111	118

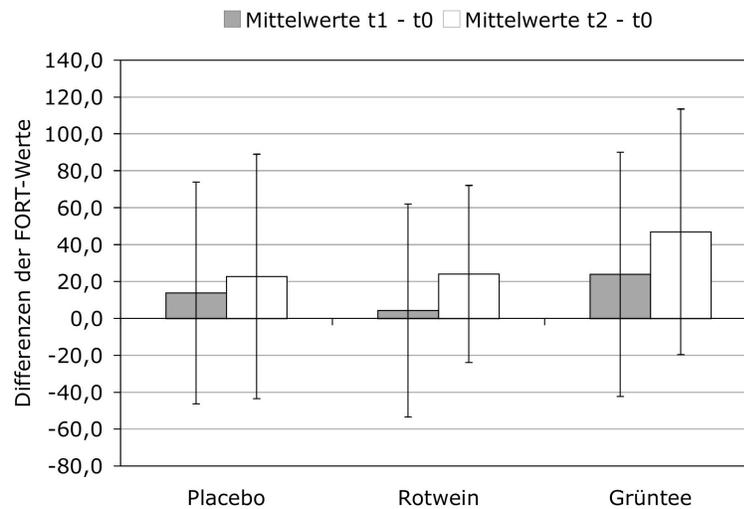


Abbildung A.4: Vergleich der Mittelwerte der Differenzen aus den FORT-Werten zu den Zeitpunkten t_0 , t_1 und t_0 , t_2

Ergebnisse

Zum Zeitpunkt t_2 konnte weder für das Rotwein-Präparat (20) noch für das Grüntee-Präparat (30) ein signifikanter Behandlungsunterschied zum Placebo nachgewiesen werden. (p-Wert (10-20) = 0.7649 und p-Wert (10-30) = 0.0721) Zum Zeitpunkt t_1 konnte zwischen den beiden Präparaten (20) und (30) ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden: $20 < 30$ (<: kleinere Werte als); zu dem Placebo ergaben sich keine Unterschiede.

Tabelle A.15: Vergleich verschiedener Subkollektive

Kollektiv	1	2	3	4	5	\bar{x}	S_x
Männer	206	246	238	260	252	240	21
Frauen	384	380	382	352	330	366	24
Frauen mit Medikation	592	596	692	460	552	578	84

Vergleich verschiedener Subkollektive

A.6 Validität und Qualifizierung des Fertigttestsystems 3.9

A.6.1 Toxizitätsuntersuchungen an humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen 3.9.1

Kultivierung humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen

Alle Lösungen wurden hergestellt in Wasser mit der Qualität bidestillierten Wassers aus der Aufbereitung einer Milli-Q-academic-Anlage.

Chemikalien und Geräte

- Endothelzellmedium (Endothelial Cell Growth Medium MV Low serum PromoCell GmbH, Heidelberg)
- Supplement Mix Endothelial Growth Medium MV PromoCell GmbH, Heidelberg
- HEPES/BSS (Hepes Buff. Sline Sol.) Promocell GmbH, Heidelberg
- Trypsin/EDTA Promocell GmbH, Heidelberg
- TNS (Trypsin Neutralizing Solution) Promocell GmbH, Heidelberg
- Zentrifuge Rotana/RP Hettich, Andreas Hettich GmbH Co.KG, Tuttlingen
- Inkubator HERAcell 150, Heraeus Holding GmbH, Hanau
- Neugebauer Zählkammer, Schreck/Ts FRG, Hofheim

Toxizitätsuntersuchungen

Chemikalien und Geräte

- Trypanblau 0,4%, Fluka, Sigma-Aldrich GmbH, München
- PBS Dulbecco´s PBS PAA laboratories GmbH, Pasching
- DMEM Dulbecco´s PAA 25 mM HEPES gepuffert, PAA laboratories, Pasching
- Neutralrot, Merck KGaA, Darmstadt
- Wasserstoffperoxidlösung 30 %, Fluka, Sigma-Aldrich GmbH, München
- Ethanol 96 % pro analysi, Merck KGaA, Darmstadt
- Essigsäure 99% pro analysi (Eisessig), Merck KGaA, Darmstadt
- Schüttler MTS 4, IKA Werke GmbH Co. KG, Staufen
- Photometer Safire 2. Tecan Group Ltd. AG, Männedorf, Schweiz

Neutralrot-Stammlösung

400 mg Neutralrot werden in 100,0 ml Aqua bidest. gelöst.

Neutralrot-Gebrauchslösung

die Neutralrot-Stammlösung wird vor dem Gebrauch durch einen Membranfilter 0,22 μm filtriert. DMEM wird in der benötigten Menge vorgelegt und die Neutralrot-Lösung zupipettiert, so dass eine Verdünnung im Verhältnis 1:80 entsteht. Für 50 ml Neutralrot-Gebrauchslösung werden 633 μL Neutralrot-Stammlösung benötigt. Die Lösung wird vor dem Gebrauch frisch hergestellt.

Fixierlösung

Fixierlösung: 50 VT Ethanol, 49 VT Aqua bidest., 1 VT Eisessig

Wasserstoffperoxidlösung 1,5 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$

17 μL 30 % Wasserstoffperoxidlösung werden mit PBS auf 100,0 ml aufgefüllt.

Wasserstoffperoxidlösung 2,5 $\frac{mmol}{L}$

28 μL 30 % Wasserstoffperoxidlösung werden mit PBS auf 100,0 ml aufgefüllt.

Wasserstoffperoxidlösung 4,0 $\frac{mmol}{L}$

45 μL 30 % Wasserstoffperoxidlösung werden mit PBS auf 100,0 ml aufgefüllt.

A.6.2 Einfluss von Hormonpräparaten auf den FORT-Wert

3.9.2

Einfluss unterschiedlicher hormonhaltiger Fertigarzneimittel

Chemikalien und Geräte

Es werden die in den vorausgegangenen Versuchen verwendeten Chemikalien, Geräte und Methoden zur Durchführung eines FORT-Tests verwendet.

Lösungen

Jeweils eine einzeln dosierte Arzneiform wird in PBS zu 100,0 ml gelöst.

Inhalt des Fertigarzneimittels Valette®[®], laut Beipackzettel

Jedes Dragee enthält 30 μg Ethinylestradiol, 2 mg Dienogest, 27,97 mg Lactose-Monohydrat, Maisstärke, Maltodextrin, Magnesiumstearat, Saccharose, Glucose-Sirup, Calciumcarbonat, Povidon K25, Macrogol 3500, Carnaubawachs, Titaniumdioxid.

Inhalt des Fertigarzneimittels Diane 35®[®], laut Beipackzettel

Eine überzogene Tablette enthält 2 mg Cyproteronacetat, 0,035 mg Ethinylestradiol, Lactose-Monohydrat, Talkum, Magnesiumstearat, Maisstärke, Povidon 25 000, Povidon 700 000, Glycerol 85 % (E 422), Calciumcarbonat, Macrogol 6000, Titandioxid, Sucrose, Eisen(III)-hydroxid-oxid-Monohydrat, Montanglycolwachs.

Inhalt des Fertigarzneimittels Bella Hexal®[®], laut Beipackzettel

Eine überzogene Tablette enthält 2000 µg Cyproteronacetat, 35 µg Ethinylestradiol, Calciumcarbonat, Glycerol 85 %, Macrogol 6000, Montanglycolwachs, Povidon K 90, Sucrose, Talkum, Titandioxid, Lactose-Monohydrat, Magnesiumstearat, Maisstärke, Povidon K 25, Talkum.

Inhalt des Fertigarzneimittels Climopax®[®], laut Beipackzettel

Ein Dragee enthält 4,088 mg (entspr. 0,625 mg konjugierte Estrogene) Extrakt aus dem Harn trächtiger Stuten (nativ), 2,5 mg/5 mg Medroxyprogesteronacetat, Methylcellulose, Lactose-Monohydrat, Magnesiumstearat, Hydroxylapatit, Macrogol 20 000, Glycerolmonooleate, Schellack, Calciumsulfat, mikrokristalline Cellulose, Saccharose, Povidon, Carnaubawachs, Stearinsäure, Titandioxid Eisen(II,III)-oxid -0,625/2,5 mg, Eisen(III)-oxid, -0,625/5 mg Indigocarmin, Aluminiumsalz.

Inhalt des Fertigarzneimittels Petibelle®[®], laut Beipackzettel

Eine Filmtablette enthält 3 mg Drospirenon, 0,03 mg Ethinylestradiol. Lactose, Maisstärke, modifizierte Maisstärke, Hypromellose, Macrogol 6000, Povidon 2500, Magnesiumstearat, -palmitat, -oleat, Talkum, Titandioxid, Eisenoxide.

Tabelle A.16: Einfluss unterschiedlicher hormonhaltiger Fertigarzneimittel

n	BW	Valette® [®]	Diane 35® [®]	Bella Hexal® [®]	Climopax® [®]	Petibelle® [®]
1	38	41	45	42	35	38
2	40	37	36	41	42	40
3	36	42	40	39	39	39
\bar{x}	38	40	40	41	39	39
S_x	2	3	5	2	4	1

BW: Blindwert

Langzeitversuche zur Untersuchung hormoneller Einflüsse

Chemikalien und Geräte

Es werden die in den vorausgegangenen Versuchen verwendeten Chemikalien, Geräte und Methoden zur Durchführung eines FORT-Tests verwendet.

- PBS Dulbecco´s PBS PAA laboratories GmbH, Pasching
- Caeruloplasmin aus humanem Plasma, Calbiochem, Merck Chemicals Ltd., Darmstadt
- SOD aus boviner Leber, Calbiochem, Merck Chemicals Ltd., Darmstadt
- Katalase aus boviner Leber, Calbiochem, Merck Chemicals Ltd., Darmstadt

Caeruloplasmin-Stammlösung 1 $\frac{mg}{mL}$

1 mg Caeruloplasmin wird in 1 ml PBS gelöst.

Caeruloplasminlösung 125 $\frac{mg}{L}$

125 μL Caeruloplasmin-Stammlösung wird mit 875 μL PBS versetzt.

Caeruloplasminlösung 250 $\frac{mg}{L}$

250 μL Caeruloplasmin-Stammlösung wird mit 750 μL PBS versetzt.

Caeruloplasminlösung 500 $\frac{mg}{L}$

500 μL Caeruloplasmin-Stammlösung wird mit 500 μL PBS versetzt.

SOD-Lösung $\frac{mg}{L}$

2,5 mg SOD mit einer Aktivität von 3000 $\frac{U}{mg}$ werden in 10,0 ml PBS gelöst.

Katalaselösung

2,5 mg Katalase mit einer Aktivität von 2297 $\frac{U}{mg}$ werden in 10,0 ml PBS gelöst.

Tabelle A.17: Einfluss unterschiedlicher hormonhaltiger Fertigarzneimittel

Enzym-Konzentration	1	2	3	\bar{x}	S_x
Blindwert	38	42	38	39	2
Caeruloplasmin					
125 $\frac{mg}{L}$	48	55	52	52	4
250 $\frac{mg}{L}$	77	72	74	74	3
500 $\frac{mg}{L}$	132	148	137	139	8
1000 $\frac{mg}{L}$	312	297	316	308	10
SOD	42	41	32	38	6
Katalase	55	38	40	44	9

A.7 Entwicklung des ESR-Ascorbyl-Assays

A.7.1 Standardisierung und Integritätsprüfung des Spektrometers 4.5.1

Chemikalien und Geräte

- TEMPO, Merck KGaA, Darmstadt
- Aqua bidest.
- ESR-Spektrometer, X-Band ESR Miniscope MS 200, Magnettech GmbH, Berlin
- 50 μL ESR-Kapillaren, Ringcaps-Micro-Einmal Piptten, Hirschmann Laborgeräte GmbH Co. KG, Eberstadt
- MiniScopeControl v2.5.1, 2003, Magnettech GmbH, Berlin

TEMPO-Stammlösung 1 $\frac{mmol}{L}$

Alle TEMPO-Lösungen werden lichtgeschützt bei 4° C aufbewahrt. 15,63 mg TEMPO werden in einem Messkolben im Ultraschallbad zu 100,0 ml in Aqua bidest. gelöst.

TEMPO-Gebrauchslösung 0,1 $\frac{mmol}{L}$

1,0 ml TEMPO-Stammlösung werden mit 9,0 ml Aqua bidest. versetzt und kräftig geschüttelt. Am Morgen der Messung frisch herzustellen.

Tabelle A.18: Einstellungen am Miniscope MS200

Frequenz	Feld	Breite	Zeit	Modulation	Verstärkung	Punkte
9,4 GHz	3373 G	50 G	30 s	500 mG	100	4096

Generierung des Ascorbylradikals *in situ*

Chemikalien und Geräte

- TEMPO, Merck KGaA, Darmstadt
- Na-L(+)-Ascorbat, AppliChem GmbH, Darmstadt
- Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat, Sigma-Aldrich GmbH, München
- Wasserstoffperoxidlösung 30 %, Fluka, Sigma-Aldrich GmbH, München
- PBS Dulbecco´s PBS PAA laboratories GmbH, Pasching
- Aqua bidest.
- ESR-Spektrometer, X-Band ESR Miniscope MS 200, Magnettech GmbH, Berlin
- 50 μL ESR-Kapillaren, Ringcaps-Micro-Einmal Pipetten, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
- MiniScopeControl v2.5.1, 2003, Magnettech GmbH, Berlin

Natriumascorbatlösung $0,25 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$

49,5 mg Natrium-L-Ascorbat werden in 1 mL PBS gelöst.

Ammoniumeisen(II)-sulfat-Lösung $0,5 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$

1,96 g Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat werden in 10,0 mL PBS gelöst.

Zur Generierung des Ascorbylradikals wird 1 mL $0,25 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ Natriumascorbatlösung mit 20 μL AmmoniumeisenII-sulfat-Lösung $0,5 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ und 20 μL Wasserstoffperoxidlösung 30 % versetzt.

Tabelle A.19: Einstellungen am Miniscope MS200

Frequenz	Feld	Breite	Zeit	Modulation	Verstärkung	Punkte
9,4 GHz	3380 G	100 G	30 s	1000 mG	900	4096

Qualitative Nachweise aus Kapillarblut

Chemikalien und Geräte

- TEMPO, Merck KGaA, Darmstadt
- Aqua bidest.
- Microvette CB 300 Lithium-Heparin, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
- Einmallynzetten, Easy-let II, Nadeldurchmesser: 0,375 mm, Eindringtiefe: 1,8 mm, Du Yee Care Inc. Kyungki-Do, Korea
- ESR-Spektrometer, X-Band ESR Miniscope MS 200, Magnettech GmbH, Berlin
- 50 μ L ESR-Kapillaren, Ringcaps-Micro-Einmal Pipetten, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
- Zentrifuge, Winkelrotor Callegari 6000, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- MiniScopeControl v2.5.1, 2003, Magnettech GmbH, Berlin

Tabelle A.20: Einstellungen am Miniscope MS200

Frequenz	Feld	Breite	Zeit	Modulation	Verstärkung	Punkte
9,4 GHz	3380 G	100 G	30 s	1000 mG	900	4096

Qualitative Nachweise unter Verwendung von DMSO

Chemikalien und Geräte

- TEMPO, Merck KGaA, Darmstadt
- Aqua bidest.
- Na-L(+)-Ascorbat, AppliChem GmbH, Darmstadt

- Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat, Sigma-Aldrich GmbH, München
- Wasserstoffperoxidlösung 30 %, Fluka, Sigma-Aldrich GmbH, München
- PBS Dulbecco´s PBS PAA laboratories GmbH, Pasching
- DMSO 99 %, Sigma-Aldrich GmbH, München
- Microvette CB 300 Lithium-Heparin, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
- Einmallanzetten, Easy-let II, Nadeldurchmesser: 0,375 mm, Eindringtiefe: 1,8 mm, Du Yee Care Inc. Kyungki-Do, Korea
- ESR-Spektrometer, X-Band ESR Miniscope MS 200, Magnettech GmbH, Berlin
- 50 μL ESR-Kapillaren, Ringcaps-Micro-Einmal Pipetten, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
- Zentrifuge, Winkelrotor Callegari 6000, Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten
- MiniScopeControl v2.5.1, 2003, Magnettech GmbH, Berlin

Tabelle A.21: Einstellungen am Miniscope MS200

Frequenz	Feld	Breite	Zeit	Modulation	Verstärkung	Punkte
9,4 GHz	3380 G	15 G	30 s	600 mG	900	4096

Natriumascorbatlösung $0,25 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$

49,5 mG Natrium-L-Ascorbat werden in 1 mL PBS gelöst.

AmmoniumeisenII-sulfat-Lösung $0,5 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$

1,96 g Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat werden in 10,0 mL PBS gelöst.

Zur Generierung des Ascorbylradikals wird 1 mL $0,25 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ Natriumascorbatlösung mit 20 μL AmmoniumeisenII-sulfat-Lösung $0,5 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ und 20 μL Wasserstoffperoxidlösung 30 % versetzt.

Tabelle A.22: Pipettierschema zu den auf Ascorbylradikal untersuchten Lösungen

Verhältnis $\frac{Probe}{DMSO}$	Kapillares Vollblut	Serum	Plasma	Ascorbat-Lösung
$\frac{95\mu L}{5\mu L}$	-	-	-	b -
$\frac{90\mu L}{10\mu L}$	-	-	-	b -
$\frac{85\mu L}{15\mu L}$	-	-	-	b -
$\frac{80\mu L}{20\mu L}$	-	-	-	s -
$\frac{75\mu L}{25\mu L}$	-	-	-	s -
$\frac{70\mu L}{30\mu L}$	-	-	-	s d -
$\frac{65\mu L}{35\mu L}$	-	-	-	s d -
$\frac{60\mu L}{40\mu L}$	-	-	-	s d -
$\frac{55\mu L}{45\mu L}$	-	-	-	s d -
$\frac{50\mu L}{50\mu L}$	-	-	-	s d -

- = kein Signal, s= Schaumentwicklung, d= diffuses Signal, b= Bläschenbildung

A.7.2 Erhöhung der Empfindlichkeit 4.5.3

Vergleich der Empfindlichkeit unter Verwendung von Flachzellen und 50 μL Kapillaren

Qualitative Nachweise unter Verwendung von DMSO

Chemikalien und Geräte

- TEMPO, Merck KGaA, Darmstadt
- Aqua bidest.
- ESR-Spektrometer, X-Band ESR Miniscope MS 200, Magnettech GmbH, Berlin
- 50 μL ESR-Kapillaren, Ringcaps-Micro-Einmal Pipetten, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
- Flachzelle, FZK-200, Magnettech GmbH, Berlin
- MiniScopeControl v2.5.1, 2003, Magnettech GmbH, Berlin

Tabelle A.23: Kalibriergerade, 50 μL ESR-Kapillaren

Verhältnis $\frac{\text{TEMPO}}{\text{LM}}$	K1	K2	K3	$\text{K}\bar{x}$	$\text{K}S_x$	F1	F2	F3	$\text{F}\bar{x}$	$\text{F}S_x$
$\frac{10,0}{0}$	76	84	78	79	4	-	-	-	-	-
$\frac{9,5}{5}$	76	73	73	74	2	-	-	-	-	-
$\frac{9,0}{1,0}$	75	69	75	73	3	-	-	-	-	-
$\frac{8,0}{2,0}$	61	69	45	58	12	-	-	-	-	-
$\frac{7,0}{3,0}$	57	61	56	58	3	-	-	-	-	-
$\frac{6,0}{4,0}$	43	46	47	45	2	-	-	-	-	-
$\frac{5,0}{5,0}$	42	39	41	41	2	92	91	91	91	1
$\frac{4,0}{6,0}$	32	31	33	32	1	76	76	81	78	3
$\frac{3,0}{7,0}$	22	30	22	25	5	59	58	61	59	2
$\frac{2,0}{8,0}$	17	19	15	17	2	33	36	31	33	3
$\frac{0}{10,0}$	1	0	-3	-1	2	-2	4	-3	0	4

TEMPO= TEMPO-Lösung 0,1 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$, LM= Lösemittel (Aqua bidest.), K= Kapillare, F= Flachzelle

Tabelle A.24: Einstellungen am Miniscope MS200

Frequenz	Feld	Breite	Zeit	Modulation	Verstärkung	Punkte
9,4 GHz	3373 G	50 G	30 s	2000 mG	500	4096

A.7.3 Qualitativer Nachweis des Ascorbylradikals in Flachzellen 4.5.4

Chemikalien zum Spülen der Küvette FZK-200, Magnettech

- Natronlauge 0,1 $\frac{\text{mol}}{\text{L}}$, Merck KGaA, Darmstadt
- Salzsäure 0,1 $\frac{\text{mol}}{\text{L}}$, Merck KGaA, Darmstadt
- Isopropanol 70 %, Sigma-Aldrich GmbH, München
- Ethanol 96 %, Sigma-Aldrich GmbH, München

Variation der Probengewinnungsbedingungen

Chemikalien und Geräte

- TEMPO, Merck KGaA, Darmstadt

Tabelle A.25: Dintest®-Ergebnisse der linearen Regression für die ESR-Kapillar-Bestimmung

Parameter	ESR
Steigung a	789,589
Ordinatenabschnitt b	0,915
Korrelationskoeffizient r	0,9992
Mittelwert \bar{x}	0,059
Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 99 %)	ja
Residuen haben einen Trend (Trendtest nach Neumann, 99 %)	nein
Max. Abweichung ist ein Ausreisser (F-Test 99 %)	nein
Reststandardabweichung S_y	1,143
Verfahrensstandardabweichung S_{x0}	0,001
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0}	1,695
Optimales Regressionsmodell	linear
lineare Regression vertretbar	ja

- Aqua bidest.
- ESR-Spektrometer, X-Band ESR Miniscope MS 200, Magnettech GmbH, Berlin
- Microvette CB 300 Lithium-Heparin, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
- Einmallanzetten, Easy-let II, Nadeldurchmesser: 0,375 mm, Eindringtiefe: 1,8 mm, Du Yee Care Inc. Kyungki-Do, Korea
- Flachzelle, FZK-200, Magnettech GmbH, Berlin
- Kühlzentrifuge, Eppendorf 5417 R, Eppendorf AG, Hamburg
- MiniScopeControl v2.5.1, 2003, Magnettech GmbH, Berlin

Zentrifugationsparameter

Die vierminütige Zentrifugation erfolgte bei 4 °C und 14 000 g.

Tabelle A.26: Dintest®-Ergebnisse der linearen Regression für die ESR-Flachzell-Bestimmung

Parameter	ESR
Steigung a	1923,33
Ordinatenabschnitt b	-1,900
Korrelationskoeffizient r	0,9898
Mittelwert \bar{x}	0,028
Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 99 %)	zu wenig Werte
Residuen haben einen Trend (Trendtest nach Neumann, 99 %)	zu wenig Werte
Max. Abweichung ist ein Ausreisser (F-Test 99 %)	nein
Reststandardabweichung S_y	3,694
Verfahrensstandardabweichung S_{x0}	0,002
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0}	7,1428
Optimales Regressionsmodell	zu wenig Werte
lineare Regression vertretbar	zu wenig Werte

Tabelle A.27: Einstellungen am Miniscope MS200

Frequenz	Feld	Breite	Zeit	Modulation	Verstärkung	Punkte
9,4 GHz	3371 G	15 G	12 s	600 mG	900	4096

A.7.4 Technische Entwicklung des Assays

4.5.5

Entwicklung des Probenzugs

Material und Geräte

- Natriumacetat-Latentwärmeppeicher in Kissenform, Monoplastik, Karlsfeld
- Einmallanzetten, Unistik extra, Nadeldurchmesser 0,8 mm, Eindringtiefe 3 mm, Owen Mumford GmbH, Großostheim
- Microvetten CB-300, K-EDTA und Lithiumheparin, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Bestimmung der optimalen Zentrifugationsdauer

Material und Geräte

- Einmallanzetten, Unistik extra, Nadeldurchmesser 0,8 mm, Eindringtiefe 3 mm, Owen Mumford GmbH, Großostheim
- Microvetten CB-300, K-EDTA und Lithiumheparin, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
- Kühlzentrifuge, Eppendorf 5417 R, Eppendorf AG, Hamburg

Zentrifugationsparameter

Die Zentrifugation erfolgte bei 14 000 g und 4 °C.

A.7.5 Quantitative Bestimmung des Ascorbylradikals

4.5.6

Externe Kalibrierung

Chemikalien und Geräte

- TEMPO, Merck KGaA, Darmstadt
- Aqua bidest.
- CPO, 3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidin-1-oxyl (CPO), Alexis Biochemicals, AXXORA Deutschland GmbH, Lörrach
- PBS Dulbecco´s PBS PAA laboratories GmbH, Pasching
- ESR-Spektrometer, X-Band ESR Miniscope MS 200, Magnettech GmbH, Berlin
- Flachzelle, FZK-200, Magnettech GmbH, Berlin
- MiniScopeControl v2.5.1, 2003, Magnettech GmbH, Berlin

CPO-Stammlösung 1,01 mmolL

Die vorhandene Menge CPO wird für 12 Stunden bei Raumtemperatur im Vakuum über Orangegel getrocknet und anschließend gewogen. 9,4 mg CPO werden in einem 50 mL Messkolben aus Braunglas überführt, mit PBS bis ca. 2 cm unterhalb der Ringmarke gefüllt und im Ultraschallbad gelöst. Danach wird mit PBS bis zur

Ringmarke aufgefüllt und die Lösung zur Aufbewahrung im Kühlschrank in ein lichtgeschütztes Gefäß umgefüllt.

CPO-Stammlösung und Kalibrierlösungen

Die Kalibrierlösungen werden aus der Stammlösung durch Verdünnen mit PBS hergestellt.

Tabelle A.28: Externe Kalibrierung der Ascorbylradikalbestimmung

Konzentrationsniveau	\bar{x} Flächenäquivalente
Blindwert	0
50 $\frac{\text{nmol}}{\text{L}}$	16459
100 $\frac{\text{nmol}}{\text{L}}$	376423
250 $\frac{\text{nmol}}{\text{L}}$	911138
500 $\frac{\text{nmol}}{\text{L}}$	1798476
750 $\frac{\text{nmol}}{\text{L}}$	2758070
1000 $\frac{\text{nmol}}{\text{L}}$	3179525
1250 $\frac{\text{nmol}}{\text{L}}$	4479739
2500 $\frac{\text{nmol}}{\text{L}}$	8386643

Tabelle A.29: Einstellungen am Miniscope MS200 für die Kalibrierung

Frequenz	Feld	Breite	Zeit	Modulation	Verstärkung	Punkte
9,4 GHz	3373 G	15 G	12 s	600 mG	900	4096

Untersuchung des Einflusses verschiedener Antikoagulantien

Die Zentrifugation erfolgte bei 14 000 g bei den im Ergebnisteil beschriebenen Temperaturen.

Chemikalien und Geräte

- TEMPO, Merck KGaA, Darmstadt
- Aqua bidest.

Tabelle A.30: Dintest®-Ergebnisse der linearen Regression für die externe Kalibrierung

Parameter	ESR
Steigung a	3367,018
Ordinatenabschnitt b	511118,687
Korrelationskoeffizient r	0,9988
Mittelwert \bar{x}	640,05
Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 99 %)	ja
Residuen haben einen Trend (Trendtest nach Neumann, 99 %)	nein
Max. Abweichung ist ein Ausreisser (F-Test 99 %)	nein
Reststandardabweichung S_y	140202,047
Verfahrensstandardabweichung S_{x0}	41,640
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0}	6,51%
Optimales Regressionsmodell	linear
lineare Regression vertretbar	ja

- CPH, 1-Hydroxy-3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinhydrochlorid, Alexis Biochemicals, AXXORA Deutschland GmbH, Lörrach
- PBS Dulbecco´s PBS PAA laboratories GmbH, Pasching
- Microvetten CB-300, K-EDTA und Lithiumheparin, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
- ESR-Spektrometer, X-Band ESR Miniscope MS 200, Magnettech GmbH, Berlin
- Kühlzentrifuge, Eppendorf 5417 R, Eppendorf AG, Hamburg
- 50 μL ESR-Kapillaren, Ringcaps-Micro-Einmal Pipetten, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
- MiniScopeControl v2.5.1, 2003, Magnettech GmbH, Berlin

CPH-Lösung 1 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$

9,3 mg CPH werden mit PBS zu 50,0 mL unter Rühren gelöst. Eventuell ist ein Ultraschallbad zur Unterstützung des Lösungsvorganges zu verwenden.

CPH-Lösung 500 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$

Aus der CPH-Lösung 1 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ wird durch eine 1:1 Verdünnung mit PBS eine Lösung

mit der Konzentration $500 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$ hergestellt.

CPH-Lösung $100 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$

10,0 mL der CPH-Lösung $1 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ werden mit PBS auf 100,0 mL aufgefüllt.

Tabelle A.31: Einstellungen am Miniscope MS200 für die Untersuchung der CPO-Entstehung

Frequenz	Feld	Breite	Zeit	Modulation	Verstärkung	Punkte
9,4 GHz	3373 G	15 G	12 s	600 mG	600	4096

Bestimmung der optimalen Zentrifugationstemperatur

Die Zentrifugation wurde durchgeführt für vier Minuten bei 14 000 g.

Material und Geräte

- Einmallanzetten, Unistik extra, Nadeldurchmesser 0,8 mm, Eindringtiefe 3 mm, Owen Mumford GmbH, Großostheim
- Microvetten CB-300, K-EDTA, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
- ESR-Spektrometer, X-Band ESR Miniscope MS 200, Magnettech GmbH, Berlin
- Kühlzentrifuge, Eppendorf 5417 R, Eppendorf AG, Hamburg

Bestimmung der Präzision

Die in diesem Versuch verwendeten Materialien, Geräte und Parameter entsprachen den unter der Auflistung unter der Beschreibung „Bestimmung der optimalen Zentrifugationstemperatur“.

A.8 Bestimmung des Ascorbatspiegels aus Kapillarblut 4.6

A.8.1 Durchführung der enzymatischen Ascorbinsäurebestimmung 4.6.5

Chemikalien und Geräte

- Aqua bidest.
- Ascorbatoxidase aus Cucurbita species, Genaxxon Bioscience GmbH, Biberach
- PBS Dulbecco´s PBS PAA laboratories GmbH, Pasching
- Microx TX3 Sauerstoffsensor, PreSens GmbH, Regensburg
- OxyView-B2-V5.2,2003, PreSens GmbH, Regensburg
- Sauerstoffsensor, Needle-Type Housing Fiber-Optic Oxygen Microsensor, NTH-PS1-L5-TS5-NS40/0.4-YOP
- Mikrotiterplatten, Rotilabo, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Ascorbatoxidase-Stammlösung $1 \frac{U}{\mu L}$

1000 U lyophilisierter Ascorbatoxidase werden mit 1 mL Aqua bidest. geschüttelt. Die Lösung wird bei - 20°C gelagert und nur bei gebrauch aufgetaut.

Ascorbatoxidase-Arbeitslösung $0,1 \frac{U}{\mu L}$

50 μL Ascorbatoxidase-Stammlösung werden mit 450 μL PBS versetzt. Die Lösung wird täglich frisch hergestellt und während des Messtages auf Eis gelagert. Für die Ascorbatbestimmung werden 70 μL entsprechend 7 U Ascorbatoxidase verwendet.

Nullpunkteinstellung des Microx TX3

Die Kalibrierung des Microx TX3- Sauerstoffsensors erfolgt täglich vor dem Beginn der Messungen. Das Gerät wurde programmiert auf eine Bestimmung bei 1013 mbar

Atmosphärendruck und einer Temperatur von 21°C.

.Chemikalien

- Aqua bidest.
- Natriumsulfit, Merck KGaA, Darmstadt

Kalibrierlösung 0 %- Sauerstoffsättigung

1g Natriumsulfit wird in 100 ml Aqua bidest. gelöst und das Reaktionsgefäß luftdicht mit Parafilm verschlossen.

A.8.2 Externe Kalibrierung des Microx TX3

4.6.6

Chemikalien und Geräte

- Aqua bidest.
- Ascorbatoxidase aus Cucurbita species, Genaxxon Bioscience GmbH, Biberach
- PBS Dulbecco´s PBS PAA laboratories GmbH, Pasching
- Na-L(+)-Ascorbat, AppliChem GmbH, Darmstadt
- Microx TX3 Sauerstoffsensor, PreSens GmbH, Regensburg
- OxyView-B2-V5.2,2003, PreSens GmbH, Regensburg
- Sauerstoffsensor, Needle-Type Housing Fiber-Optic Oxygen Microsensor, NTH-PS1-L5-TS5-NS40/0.4-YOP
- Mikrotiterplatten, Rotilabo, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Nullpunkteinstellung am Microx TX3

Atmosphärendruck: 1013 mbar, Temperatur: 2°C, Phasenwinkel 0 % Sauerstoffsättigung: 57,57°, Phasenwinkel 100 % Sauerstoffsättigung: 28,08°

Ascorbat-Kalibrierlösungen

Für jedes Konzentrationsniveau wird eine Ascorbat-Stammlösung mit der Konzentration $1 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ durch Lösen von 19,81 mg Natrium-L-Ascorbat in PBS zu 100,0 mL

hergestellt. Aus dieser Stammlösung wird das jeweilige Konzentrationsniveau durch Verdünnen mit PBS erhalten. Die Lösungen werden frisch vor jeder Bestimmung in lichtgeschützten Messkolben hergestellt

A.8.3 Bestimmung der Präzision 4.6.7

Chemikalien und Geräte

- Aqua bidest.
- Ascorbatoxidase aus Cucurbita species, Genaxxon Bioscience GmbH, Biberach
- PBS Dulbecco´s PBS PAA laboratories GmbH, Pasching
- Na-L(+)-Ascorbat, AppliChem GmbH, Darmstadt
- Microx TX3 Sauerstoffsensoren, PreSens GmbH, Regensburg
- OxyView-B2-V5.2,2003, PreSens GmbH, Regensburg
- Sauerstoffsensoren, Needle-Type Housing Fiber-Optic Oxygen Microsensor, NTH-PS1-L5-TS5-NS40/0.4-YOP
- Mikrotiterplatten, Rotilabo, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Ascorbatlösung 50 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$ Zur Herstellung der 50 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$ Ascorbat-Gebrauchslösung wurde die zur Herstellung der Kalibrierlösungen beschriebene Stammlösung 1 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ verwendet.

Nullpunkteinstellung am Microx TX3

Atmosphärendruck: 1013 mbar, Temperatur: 21°C, Phasenwinkel 0 % Sauerstoffsättigung: 58,69°, Phasenwinkel 100 % Sauerstoffsättigung: 28,02°

A.9 Probandenstudie 5.1

Fragen, die innerhalb des Ernährungstagebuches beantwortet werden sollten

Haben Sie heute...:

- Obst oder Gemüse gegessen? Was? Wie viel?
- Fruchtsaft oder Wein getrunken? Was? Wie viel?
- Kaffee oder Tee? Was? Wie viel?
- Geraucht? Wie viel?
- Sport getrieben? Welche Art? Wie viel?
- Medikamente genommen? Was? Welche Dosis?

Inhaltsstoffe des Sonnenschutzpräparates laut Deklaration

Aqua, Butylene Glycol Dicaprylate/Dicaprate, C12-15 Alkyl Benzoate, Titanium Dioxide, Glycerin, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Alcohol Denat., Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine, Dicaprylyl Carbonate, Sodium Phenylbenzimidazole Sulfonate, Diethylhexyl Butamido Triazone, Cetearyl Alcohol, Ethylhexyl Triazone, Cetyl Alcohol, C18-36 Acid Triglyceride, Glyceryl Stearate SE | Tocopheryl Acetate, Hydrogenated Coco-Glycerides, VP/Hexadecene Copolymer, Xanthan Gum, PEG-40 Castor Oil, Trisodium EDTA, Sodium Cetearyl Sulfate, Trimethoxycaprylylsilane, Ethylhexylglycerin, Phenoxyethanol, Methylparaben, Propylparaben

Parameter

Die Bestrahlung der Probanden erfolgte mit UV-A-Strahlern vom Typ Psorisan 900, Dr. Höhle Medizintechnik, Planegg, mit einem Emissionsmaximum zwischen 320 und 400 nm mit h1-Filter. Eine Gesamtdosis von 20 J UV-A-Strahlung wurde verwendet.

A.9.1 Ergebnisse 5.1.2

Korrelation von Ascorbylradikalkonzentration und Ascorbatspiegel

Ascorbylradikalkonzentration in $\frac{nmol}{L}$	Ascorbatkonzentration in $\frac{\mu mol}{L}$
93,23	4,87
88,23	3,33
77,39	2,01
71,26	2,78
95,25	7,55
109,63	11,39
91,32	9,27
89,18	3,38
88,64	5,15
98,75	3,19
108,24	8,06
138,05	7,39
82,21	5,44
93,54	4,33
70,46	0,96
42,34	0,57
72,28	1,55
75,71	4,25
105,73	7,90
101,57	1,23
107,74	3,82
100,80	5,20
54,26	7,431
89,42	5,93
119,29	6,32
81,36	7,91
88,16	9,15

Tabelle A.32: Entstehung von CPO aus CPH durch Zentrifugation

CPH-Konzentration Li-Hep.	Messung	-4°C	-3°C	-2°C	-1°C	0°C
$100 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$	1	22	20	21	24	25
	2	21	20	20	26	29
	3	23	19	20	28	24
	\bar{x}	22	20	20	26	26
	S_x	1	0	0	2	2
$500 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$	1	33	35	45	41	49
	2	35	34	2048	45	56
	3	34	32	45	43	52
	\bar{x}	34	34	45	43	52
	S_x	1	2	3	2	4
$1000 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$	1	41	60	82	95	101
	2	42	59	76	98	100
	3	46	59	81	97	100
	\bar{x}	43	59	80	97	100
	S_x	3	1	3	2	1
CPH-Konzentration K-EDTA.	Messung	-4°C	-3°C	-2°C	-1°C	0°C
$100 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$	1	14	13	14	18	21
	2	14	17	16	21	20
	3	16	15	15	20	21
	\bar{x}	15	15	15	20	21
	S_x	1	2	1	1	0
$500 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$	1	22	26	30	33	26
	2	20	28	34	30	30
	3	18	27	31	27	21
	\bar{x}	20	27	32	30	26
	S_x	2	1	2	3	5
$1000 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$	1	23	36	42	46	62
	2	20	42	39	48	59
	3	19	39	43	43	64
	\bar{x}	21	39	41	46	62
	S_x	2	3	2	3	3

Li-Hep= Lithiumheparin, K-EDTA.= Kalium-EDTA

Tabelle A.33: Einstellungen am Miniscope MS200 für die Kalibrierung

Frequenz	Feld	Breite	Zeit	Modulation	Verstärkung	Punkte
9,4 GHz	3380 G	15 G	30 s	600 mG	900	4096

Tabelle A.34: Optimierung der Zentrifugationstemperatur

Temperatur	Messzeitpunkt t	Reihe I	Reihe II	Reihe III	\bar{x}	S_x
4°C	0	40,86	42,31	36,62	39,93	2,96
	1	36,44	39,41	35,54	37,13	2,03
	2	34,91	38,65	34,44	36,00	2,31
	3	33,99	33,64	33,68	33,77	0,19
	4	32,46	31,99	31,55	32,00	0,46
	5	30,22	28,61	28,71	29,18	0,90
	6	28,77	26,45	25,55	26,92	1,66
0°C	0	57,78	44,76	41,06	47,87	8,78
	1	55,84	42,56	40,18	46,19	8,44
	2	54,26	38,39	39,72	44,12	8,80
	3	54,03	37,75	38,94	43,57	9,08
	4	49,84	35,92	38,43	41,40	7,42
	5	47,77	35,56	36,52	39,95	6,79
	6	42,17	33,12	34,76	36,68	4,82
-4°	0	55,64	54,33	58,56	56,18	2,17
	1	54,66	50,76	52,44	52,62	1,96
	2	54,44	49,97	43,64	49,35	5,43
	3	53,52	49,01	42,68	48,40	5,45
	4	53,66	47,85	40,44	47,32	6,63
	5	48,21	44,74	39,98	44,31	4,13
	6	45,32	41,31	35,74	40,79	4,81

$$\Delta t = 1 \text{ h.}$$

Tabelle A.35: Bestimmung der Präzision einer Ascorbylradikalmessung

t_0	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	\bar{x}	S_x
53,78	73,95	45,44	48,74	35,58	60,4	52,82	13,21

Tabelle A.36: Einstellungen am Miniscope MS200 für die Kalibrierung

Frequenz	Feld	Breite	Zeit	Modulation	Verstärkung	Punkte
9,4 GHz	3380 G	15 G	30 s	600 mG	900	4096

Tabelle A.37: Externe Kalibrierung der Ascorbatbestimmung

$c_{kal. I}$	$\Delta P_{O_2 I}$	$c_{kal. II}$	$\Delta P_{O_2 II}$	$c_{kal. III}$	$\Delta P_{O_2 III}$	\bar{x}	S_x
0,00	0,10	0,00	0,01	0,00	0,02	0,04	0,05
10,39	6,53	10,77	2,14	10,71	11,92	6,86	4,90
20,37	12,77	20,23	3,47	19,41	8,62	8,29	4,66
31,28	23,54	29,32	9,43	32,75	14,93	15,97	7,11
40,42	30,84	40,20	19,63	40,70	23,65	24,71	5,68
50,63	38,68	50,05	40,19	50,83	43,96	40,94	2,72
58,20	43,92	63,63	49,53	60,81	50,84	48,10	3,68
76,93	65,96	74,20	55,23	68,79	53,92	58,37	6,61
80,27	79,42	80,24	70,93	85,49	90,42	80,26	9,77
96,94	88,48	88,18	90,40	92,86	99,42	92,77	5,84
100,34	95,64	101,76	99,62	99,64	101,42	98,89	2,96
199,00	101,46	193,13	100,40	202,11	100,30	100,72	0,64
303,91	101,16	398,92	101,96	303,01	101,80	101,64	0,42
383,20	101,75	456,51	102,41	388,27	100,40	101,52	1,02

$c_{kal.}$ = Konzentrationsniveau des Kalibrators in $\frac{\mu mol}{L}$

Tabelle A.38: Dintest®-Ergebnisse der Regressionsanalyse für die externe Kalibrierung des Microx TX3 (quadratische Regression)

Parameter	Microx
Koeffizient A	007
Koeffizient B	0,346
Koeffizient C	0,278
Korrelationskoeffizient	0,9955
Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 99 %)	ja
Residuen haben einen Trend (Trendtest nach Neumann, 99 %)	nein
Reststandardabweichung S_y	3,454
Verfahrensstandardabweichung S_{x0}	3,445
Optimales Regressionsmodell	quadratisch
lineare Regression vertretbar	nein

Tabelle A.39: Bestimmung der Präzision einer Ascorbatquantifizierungsmessung

I	II	III	IV	V	VI	\bar{x}	S_x
38,68	40,19	43,96	40,94	44,68	39,25	41,28	2,49

Tabelle A.40: Einstellungen am Miniscope MS200 für die Studie

Frequenz	Feld	Breite	Zeit	Modulation	Verstärkung	Punkte
9,4 GHz	3380 G	15 G	30 s	600 mG	900	4096

Tabelle A.41: Vergleich der systemischen Auswirkung von UV-A-Bestrahlung unbehandelter und mit Lichtschutz behandelter Haut

Proband	Asc -	Asc +	Ascorbat -	Ascorbat +	Quotient -	Quotient +
1	13,68	-5,00	-0,80	3,24	2,50	-3,98
2	11,32	-1,13	0,59	0,86	0,06	-0,23
3	-10,91	-18,45	0,82	1,34	-0,15	-0,85
4	12,93	-18,31	-5,63	3,11	2,56	-0,16
5	1,56	6,39	1,90	0,11	-0,07	-0,37
6	-13,28	10,06	1,50	0,41	-	-
7	10,61	29,81	-0,46	-0,85	-	-
8	14,77	-28,12	-	-	-	-
9	3,07	3,43	-	-	-	-
10	13,26	2,12	-	-	-	-
11	-3,80	-6,94	-	-	-	-
12	26,93	23,03	-	-	-	-
13	15,22	4,19	-	-	-	-
\bar{x}	6,62	0,08	-0,30	1,17	0,98	-1,12
S_x	11,89	16,16	2,54	1,53	1,42	1,62

- = unbehandelt, + = behandelt

B Anlagen nach Promotionsordnung

B.1 §4 Abs. 3: Gefahrstoffverzeichnis

Stoffname	Symbol	R-Sätze	S-Sätze
Ammoniaklösung 28-30 %	C, N	34-50	26-36/27/39/-45-61
Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat	-	35	26-36/27/39/-45
CPH	Xi	36/37/38	7-36/37
CPO	Xi	36/37/38	26-36
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	C	22-34	26-36/27/39/-45
Essigsäure 99 %	C	10-35	(1/2)-23-26-45
Ethanol 96 %	F	11	(2)-7-16
Dinatrium-EDTA-Dihydrat	Xi	36-52/53	61
FORT-Puffer	-	36/37	26-36
FORT-Chromogen	Xi	36/37/38	26-36
Isopropanol 70 %	F, Xi	11-36-67	(2)-7-16-24/25-26
Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat	-	52/53	50-61
Lanthannitrat-Hexahydrat	O, Xi	8-41	26-39
Natronlauge 0,1 M	Xi	36/37	26-45
N-Ethyl-N-isopropyl-p-phenylendiamin-HCl	Xi	36/37/38	26-36
Salzsäure 0,1M	Xi	36/37/38	(1/2)-26
Salzsäure 37 %	C	34- 37	26-36/37/39-45
TEMPO	C	34	26-36/37/39-45
Trypanblau	T	45	53-45
Wasserstoffperoxidlösung 30 %	Xn	22-41	26-39

CPH=1-Hydroxy-3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinhydrochlorid

CPO=3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidin-1-oxyl

EDTA=Ethylendiamintetraacetat

HCl=Hydrochlorid

TEMPO=2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl

B.2 §3 Abs.2 S.b: Versicherung an Eides statt

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

„Die Beurteilung potentieller photoinduzierter Schäden anhand quantitativer Bestimmungen von reaktiven Sauerstoffspezies und die Entwicklung eines ESR-spektroskopischen Nachweises von Sauerstoffradikalen in humanem Kapillarblut“

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

Hamburg, den 08.10.2008

Anke Klack

B.3 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Anke Klack
Geburtsdatum	24.10.1981
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulausbildung

1988-1992	Grundschule Berne, Hamburg
1992-1998	Gymnasium Meiendorf, Hamburg
1998	Schulwechsel und Überspringen des Vorsemesters
1998-2000	Walddorfer-Gymnasium, Hamburg

Studium

2000-2004	Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg
Nov. 2004- Apr. 2005	Pharmaziepraktikum: Adler-Apotheke Lübeck
Mai 2005- Nov. 2005	Pharmaziepraktikum: Institut für Pharmazie A.K. Duchstein, Universität Hamburg
November 2005	Dritter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung Approbation als Apothekerin

Promotion

2005-2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin Universität Hamburg Institut für Pharmazie Anfertigung einer Dissertation Leitung: Prof. Dr. H.-J. Duchstein
-----------	--