

BESTIMMUNG DER ANTIOXIDATIVEN KAPAZITÄT
VON EXZIDIERTER HUMANHAUT UND
UNTERSUCHUNGEN DER PROTEKTIVEN
EIGENSCHAFTEN VON NITROXYL-RADIKALEN

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Im Fach der Pharmazie

eingereicht im

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

von

Apotheker Julián Gallego Llerena

geboren am 02.08.1974

Gutachter: 1. Univ. Prof. Dr. H.H. Borchert

2. Univ. Prof. Dr. Melzig

Tag der mündlichen Prüfung: 12.November 2010

*„Wenn es nur eine einzige Wahrheit gäbe, könnte man
nicht hundert Bilder über dasselbe Thema malen.“
(Pablo Picasso)*

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie der Freien Universität zu Berlin unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.-H. Borchert, dem ich an dieser Stelle für die Überlassung des interessanten Themas, für sein offenes Ohr und die mir gewährten Freiheiten bei der Bearbeitung der Aufgabenstellung danken möchte.

Mein Dank gilt besonders Herrn Dr. W. Herrmann für seine Unterstützung bei den ESR-Experimenten und deren Auswertung.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. H. Brosig für die Synthese der Spinsonde DHME, für das Korrekturlesen und für seine stete Diskussionsbereitschaft ganz herzlich danken.

Dem gesamten Arbeitskreis möchte ich für die aufschluss- und zahlreichen Mittags-Debatten danken, die halfen Probleme von einem anderen Standpunkt aus zu betrachten.

Dr. Ulrike Hochkirch möchte ich für die sehr hilfreichen Gespräche über ESR-Spektroskopie danken, aus denen immer wieder neue Einfälle für die Entwicklung meiner Arbeit entstanden.

Allen an der Arbeit beteiligten, hier nicht genannten Kollegen, des Instituts für Pharmazie und der Klinik Dr. Meyburg.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Mutter danken, für ihre grenzenlose Unterstützung und allen meinen Freunden für die sehr willkommene Ablenkung. Und zu guter Letzt möchte ich meinem Cariño Inga ganz herzlich danken, die mich in dieser Zeit großartig unterstützt hat und die mir immer neue Kraft zum Durchhalten gegeben hat.

Kurzfassung

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Entwicklung eines Verfahrens zur Quantifizierung der antioxidativen Kapazität von exzidiierter Humanhaut, sowie deren Erhöhung durch neuartige Radikalfänger (Nitroxyl-Radikale). Ein weiteres Anliegen dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Penetrationseigenschaften ausgewählter Nitroxyl-Radikale mit Hilfe der ESR-Spektroskopie und Tomografie. Außerdem sollte das Verhalten der Nitroxide Humanhaut nach UV-Bestrahlung untersucht werden.

Als wichtigste Ergebnisse der Arbeit sind folgende Punkte zu nennen:

- Die antioxidative Kapazität der Epidermis von exzidiierter Humanhaut konnte bestimmt und mit dem stabilen Modell-Radikals Diphenylpicrylhydrazyl, mittels der UV/VIS-Spektroskopie, quantifiziert werden.
- Topisch applizierte Antioxidantien konnten mit diesem Verfahren *in situ* auf ihr reduktives Potential hin getestet werden.
- Die, in dieser Arbeit, topisch applizierten Spinsonden zeigten ein erhöhtes Reduktionsvermögen gegenüber DPPH. Die Nitroxide TEMPOL (4-Hydroxy-2,2,6,6-tertramethylpiperidin-1-oxyl) und DHME (5-Doxylhexansäuremethylester) reduzierten das Modell-Radikal DPPH effektiver als das Standardantioxidans Ascorbinsäurepalmitat.
- Die antioxidative Kapazität von Humanhaut ließ sich mit Thiolgruppen-Hemmstoffen auf ein Minimum reduzieren
- Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an UV-induzierten Sonnenbrandzellen in exzidiierter Humanhaut durch die Substanzen wie Ascorbinsäurepalmitat, TEMPOL und DHME verringert werden konnte
- Es konnte mit Hilfe der ESR-Tomografie die Penetration der Nitroxyl-Radikale TEMPOL und DHME verfolgt werden. Außerdem konnten unterschiedliche Verteilungsprofile der beiden Spinsonden erstellt werden. Dabei war zu beobachten, dass sich TEMPOL vermehrt im mittleren und unteren Bereich der Epidermis und DHME im oberen Bereich der Dermis aufhielt.

-
- Mit Hilfe der Hyperfeinaufspaltung der ESR-Spektren von TEMPOL und DHME konnte ein Polaritätsprofil der unmittelbaren Umgebung der Spinsonden festgestellt werden. Dabei hielt sich das hydrophilere TEMPOL in einer polarerer Umgebung auf als das lipophilere Nitroxid 5-Doxylhensäuremethylester.
 - Mit der Reaktion der Spinsonden, nach Bestrahlung von exzidiierter Haut mit UV-Strahlung (UV A/B und C), zu ESR-stummen Verbindung über die gesamte vermessen Hauttiefe konnte gezeigt werden, dass der Wirkungsbereich von UV-Strahlung über die Eindringtiefe hinausgeht.
 - Es konnte eine verstärkte Reduktion der Spinsonden DHME und TEMPOL, in der Haut, nach UV-Bestrahlung und nach Hemmung des antioxidative Systems durch SH-Reagenzien festgestellt werden. UV-induzierte Folgeprodukte, wie reaktive Sauerstoffspezies, wurden vermehrt durch, in der Haut verteilte, Nitroxide abgefangen.

Abstract

The present thesis was focused on the development of a method to quantify the antioxidant capacity of excised human skin, and increase by novel radical scavengers (nitroxyl radicals). A second aim of this work was to study the penetration properties of selected nitroxyl radicals using EPR spectroscopy and tomography. Finally, the behavior of the nitroxides in human skin after UV irradiation is investigated.

The main results of the investigations are:

- The antioxidant capacity of the epidermis of excised human skin was determined and quantified as equivalent of the stable radical Diphenylpicrylhydrazyl, by means of UV/VIS spectroscopy.
- It was possible to estimate, *in situ*, the reductive potential of topically applied antioxidants.
- The topically applied spin probes showed an increased reducing activity compared to untreated skin. The nitroxides DHME (5-doxyl-hexanoic acid methylester) and TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) reduced the model radical DPPH more effectively than the antioxidants ascorbic acid palmitate (used as standard).
- The antioxidant capacity of human skin could be reduced to a minimum with inhibitors of sulfhydryl-groups
- It was shown that the number of UV-induced sunburn cells in excised human skin could be reduced by substances such as ascorbic acid palmitate, TEMPOL and DHME
- The penetration of the nitroxyl-radicals TEMPOL and DHME could be pursued by means of EPR tomography. Also there could be seen different distribution profiles of the two spin label. It was an increase amount of TEMPOL in the middle and bottom of the epidermis whereas DHME was staying in the top of the dermis.

-
- Also there could be detected a polarity profile of the immediate environment of the spin probes by means of hyperfine splitting of ESR spectra of TEMPOL and DHME. As a hydrophilic spin label TEMPOL remains in polar environment compared to the lipophilic nitroxide 5-doxyyl hexanoic acid methylester.
 - After UV-irradiation (UV A /B and C) of excised skin, the reaction lead to ESR-silent spin probes over the entire measured skin depth. It could be shown that the area of influence of UV radiation goes beyond the penetration depth.
 - There was a greater reduction of the spin probes TEMPOL and DHME, in the skin, after UV-irradiation and inhibition of the antioxidant system by SH-reagents. UV-induced secondary products, like reactive oxygen species, could be scavenged by nitroxides.

Abkürzungen

AO	Antioxidans
Asc.P.	Ascorbinsäurepalmitat
CAT-1	2,2,6,6-Tetramethyl-4-trimethylammoniumpiperidin-1-oxyl-iodid
DHME	5-Doxyl-hexansäuremethylester
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
DPPH-H	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazin
DPS	5-Doxyl-hexadecansäure
EPROM	Erasable-Programmable Read Only Memory, löschbarer Datenträger
ESI	Elektrospray-Ionisierung
ESR	Elektronenspinresonanz
HPLC	High performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
K_{o/w}	n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
MS	Massenspektrometrie
NEM	N-Ethylmaleinimid
OT	Objektträger
PG	Propylenglykol
ROS	Reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
R_F	Retentionsfaktor
TEMPOL	4-Hydroxy-2,2,6,6-tertramethylpiperidin-1-oxyl
TOF	Time of flight, Flugzeit
UV	ultraviolett

Inhaltsverzeichnis

1. Motivation und Zielstellung	1
2. Einleitung	3
2.1 Aufbau und Funktion von Humanhaut	3
2.2 Auswirkungen der UV-Strahlung auf die biologischen Systeme der Haut	6
2.3 Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Humanhaut durch energiereiche Strahlung	8
2.3 Schutzmechanismen der Haut vor UV-Strahlung und ROS	9
2.4 Nitroxyl-Radikale	11
3. Material und Methoden	14
3.1 Materialien	14
3.1.1 Nitroxyl-Radikale	14
3.1.2 Mikroemulsion	16
3.1.3 Stabile Radikale	17
3.1.4 Weitere Chemikalien und Materialien	18
3.1.5 Verwendete Geräte	20
3.2 Analytische und präparative Methoden	21
3.2.1 UV/VIS-Spektroskopie	21
3.2.2 Bestrahlungsquellen	21
3.2.3 ESR-Spektroskopie/Tomografie	23
3.2.4 Quantifizierung des DPPH Standards mit der ESR	29
3.2.5 Humanhaut	31
3.2.5.1 Exzidierte Humanhaut	31
3.2.5.2 Hauthomogenate	33

3.2.6 Sonnenbrandzellen.....	33
3.2.7 Bestimmung der Dicke der Epidermis	35
3.3 Synthese und Charakterisierung des neuen Nitroxyl-Radikals 5- Doxylhexansäuremethylester (DHME)	36
3.4 Statistik und Auswertung	39
4. Entwicklung eines Verfahrens zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität von exzidiierter Humanhaut und Überprüfung des reduktiven Potentials ausgewählter Antioxidantien mit diesem Verfahren	40
4.1 Notwendigkeit eines neuen Verfahrens	43
4.2 Versuchsprinzip	43
4.2.1 Versuchsaufbau.....	46
4.3 Darstellung der Problematik vom Modellradikal DPPH in diesem Verfahren	47
4.3.1 DPPH in wässrigen Lösungen	47
4.3.2 Stabilität der verwendeten DPPH-Lösung	48
4.4 Ergebnisse der Verfahrensentwicklung	49
4.4.1 Stabilität der DPPH-Stammlösung	49
4.4.2 Quantifizierung der DPPH-Konzentration	51
4.4.3 Reaktion der DPPH-Lösung in der Diffusionszelle.....	54
4.4.4 Eindringtiefenbestimmung von DPPH mit ESI-TOF-MS und Dickenbestimmung	58
4.4.4.1 Mikroskopische Dickenbestimmung.....	58
4.4.4.2 Bestimmung der Eindringtiefe von DPPH mit ESI-TOF-MS	59
4.4.5 Temperaturabhängige Reduktion von DPPH	61
4.4.6 Ermittlung der optimalen Reaktionszeit.....	62
4.5 Beschreibung der Vorgänge bei der Reaktion der Haut und dem DPPH während eines Experiments.....	64
4.5.1 Hypothese zur sinkenden DPPH-Konzentration in der Donor-Zelle.....	64
4.6 Ergebnisse zur antioxidativen Kapazität von exzidiierter Humanhaut an dem neu etablierten Verfahren	67

4.6.1 Intraindividuelle Schwankungen einer Spenderhaut	67
4.6.2 Interindividuelle Schwankungen der Spenderhaut	69
4.6.3 Hemmung reduzierender Enzyme durch SH-Reagenzien	71
4.6.4 Einfluss der Mikroemulsion auf das Verfahren	75
4.6.5 Quantifizierung des Reduktionsvermögens	76
4.7 Bewertung von Spinsonden als Radikalfänger	78
4.7.1 Der Standard Ascorbinsäurepalmitat	78
4.7.2 Überprüfung der Spinsonden TEMPOL, DHME, DPS und CAT-1 auf ihr reduktives Potential nach Applikation auf exzidierter Humanhaut	80
4.8 Zusammenfassung und Diskussion	86
5. Weitere Verfahren zur Erfassung von UV-induzierten Schäden in exzidierter Humanhaut und deren Vermeidung durch Protektiva	89
5.1 Sonnenbrandzellen-Methode	89
5.1.1 Untersuchungen von Sonnenbrandzellen an exzidierter Humanhaut	91
5.1.2 Parameterentwicklung	92
5.1.3 Ergebnisse	94
5.2 Untersuchungen an Hauthomogenaten unter Verwendung der ESR-Spektroskopie	98
5.2.1 Versuchsprinzip	99
5.2.2 Ergebnisse	99
5.3 Nachweis von Lipidperoxidationsprodukten in Hauthomogenaten	101
5.3.1 Versuchsaufbau	102
5.3.2 Ergebnisse	103
5.4 Zusammenfassung	104
6. ESR-Tomografie mit exzidierter Humanhaut	106
6.1 Auswahl eines geeigneten Applikationsweges und der -form	108
6.2 Nitroxyl-Radikale in exzidierter Humanhaut nach epikutaner Applikation	110
6.2.1 Entwicklung der Parameter für die Applikation der Nitroxide auf der Haut	110

6.3 Eingesetzte Nitroxide	112
6.4 Auswahl der Nitroxide	113
6.5 Ergebnisse der ESR-Untersuchungen an Nitroxid-beladenen Hautproben	115
6.5.1 Einfluss der Spenderhaut auf die Verteilung und das Ausmaß der Bioreduktion der Nitroxide durch hauteigene Mechanismen	115
6.5.2 Verteilung der Nitroxide DHME und TEMPOL in Humanhaut	118
6.5.3 Quantifizierung der Nitroxyl-Radikale in der Haut	121
6.5.4 Einfluss des DPPH Standards auf die Auswertung der ESR-Tomogramme.....	121
6.6 Zusammenfassung	123
7. Bestrahlungsexperimente.....	125
7.1 Exzidierte Humanhaut als Modellsystem für Bestrahlungs-versuche	126
7.2 Die Nitroxide TEMPOL und DHME.....	126
7.3 Ergebnisse der Bestrahlungsexperimente von Nitroxid-beladener Haut mit unterschiedlichen Strahlungsquellen	127
7.3.1 Bestrahlungen mit einem Sonnensimulator.....	127
7.3.2 Bestrahlung mit einem UVC-Strahler.....	133
7.3.3 Wirkung von UV-Strahlung auf, mit Iodacetamid-gehemmter, Humanhaut.....	137
7.4 Zusammenfassung	139
8. Zusammenfassung, Fazit und Ausblick	142
9. Präsentationen.....	148
Literaturverzeichnis.....	149

Kapitel 1

1. Motivation und Zielstellung

Es besteht inzwischen kein Zweifel mehr, dass das erhöhte Aufkommen von Hautkrebs direkt mit einer hohen Belastung an ultravioletter Strahlung zusammenhängt. Deutlich wird dieser Zusammenhang vor allem in Breitengraden, in denen die UV-Strahlung durch eine dünnere Ozonschicht mit höherer Intensität auf die Erdoberfläche trifft, wie es zum Beispiel in Australien der Fall ist. Dort erkranken pro Jahr deutlich mehr Menschen am malignen Melanom als in Westeuropa (0,03 %: Australien, >0,01 %: Westeuropa) (1). Auch gilt es als sehr wahrscheinlich, dass nicht nur die kurzwellige UVB-Strahlung, sondern auch die längerwellige UVA-Strahlung an kanzerogenen Prozessen beteiligt ist. Dabei stehen die zwischenzeitliche Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies und deren Eindringen in tiefere Hautschichten im Vordergrund. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat inzwischen UV-Licht als humanes Karzinogen eingestuft (2). Außerdem betrachtet man UV-Strahlung als Hauptursache für den sogenannten hellen Hautkrebs (nonmelanoma skin cancer) (3), dem Plattenepithelkarzinom und dem Basalzellkarzinom an dessen Folgen jedes Jahr ca. zwei Millionen Menschen (USA) erkranken (4). Unter diesem Aspekt, ist der in den letzten Jahren gestiegene Gebrauch von Bräunungsröhren, die mit einem vielfachen der Sonnenintensität arbeiten, als sehr kritisch zu bewerten. Das zunehmend veränderte Sozial- und Freizeitverhalten in den Industriestaaten, welcher einen Schönheitstrend zur gebräunten Haut folgt, ist zusätzlich für eine erhöhte Sonnenexposition verantwortlich.

Mit diesen Entwicklungen wuchs die Notwendigkeit an zusätzlichen Schutzsystemen, die angefangen von simplen Abdeckungsmechanismen bis zu komplexeren absorptiven Substanzen, in den meisten Strahlenschutzmitteln zu finden sind. Durch das zunehmend bessere Verständnis der Mechanismen, die in der Haut nach einer Bestrahlung mit

ultraviolettem Licht stattfinden, ist es möglich, diese nach Art des Prozesses zu unterstützen oder zu unterbrechen.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Untersuchung der protektiven Wirkung von stabilen Radikalen mit einer Piperidin oder Oxazolidin-Struktur auf mögliche UV-induzierte Hautschädigung. Diese zum Teil eigens für diese Arbeit und zum ersten Mal synthetisierten Stoffe sollten dabei äußerlich an exzidierte Humanhaut appliziert werden. Von großem Interesse war dabei ob und in welchem Ausmaß die Nitroxyl-Radikale in Humanhaut eindringen. Ebenfalls wurde die Stabilität der Stoffe nach dem Eindringen in die Haut analysiert.

Zusätzlich wurde ein Verfahren etabliert, das eine generelle Einschätzung von topisch applizierten Antioxidantien auf Humanhaut ermöglicht. Ferner wurde dieses Verfahren hinsichtlich seines Potenzials untersucht, die antioxidative Kapazität von Humanhaut zu quantifizieren, da zu Beginn dieser Arbeit keine zufriedenstellende Methode hierfür existierte.

Schlussendlich sollten die gewonnenen Erkenntnisse eine prinzipielle Anwendungsmöglichkeit für die Substanzgruppe der Nitroxyl-Radikale, als Protektiva gegen negative Auswirkungen von ultravioletter Strahlung, erschließen.

Kapitel 2

2. Einleitung

2.1 Aufbau und Funktion von Humanhaut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und hat beim Erwachsenen eine durchschnittliche Größe von etwa 2 m² und ein Gewicht von ungefähr drei bis vier Kilogramm. Eine der wichtigsten Aufgaben der Haut ist ihre Barrierefunktion, die dem Schutz des Körpers vor schädlichen Chemikalien, pathogenen Mikroorganismen und energiereicher Strahlung sowie vor dem Verlust körpereigener Substanzen insbesondere von Wasser dient. Daneben erfüllt dieses Organ eine Reihe weiterer wichtiger Aufgaben, die in einem engen Zusammenhang zur Schutzfunktion stehen. Hierzu gehören der Schutz vor mechanischen Verletzungen, die Sinnesfunktionen (Auslösung von Druck- bzw. Tast-, Wärme-, Kälte- und Schmerzempfindungen), Regulationsfunktionen (Körpertemperatur, Wasserhaushalt und Blutdruck), Stoffwechselfunktionen (Synthese und Metabolismus von Stoffen), Exkretionsfunktion (Ausscheidung von Stoffen über Schweiß- und Talgdrüsen) und Kommunikationsfunktion, die unter anderen Mitteilungen des vegetativen Nervensystems (z. B. Erröten, Erblassen, Haarsträuben) weitergibt, die Erzeugung des Eigengeruchs durch apokrine Schweißdrüsen oder die Kommunikation mit inneren Organen beinhaltet.

Die Haut lässt sich grob in Epidermis, Dermis und Subcutis unterteilen, die je nach regionalen und individuellen Gegebenheiten eine durchschnittliche Gesamtdicke von 1,5 bis 4 mm hat, von denen im Durchschnitt 0,1 mm allein auf die Epidermis entfallen.

Die Epidermis lässt sich lichtmikroskopisch in fünf Schichten einteilen, die nahtlos ineinander übergehen (s. Abbildung 2.1). Die Basalzellschicht (Stratum basale) die auf der Basalmembran die Grenze zur Dermis bildet und mit sogenannten Ankerfibrillen mit dieser in Verbindung steht (5), bildet durch Zellteilung den Rest der epidermalen Hautschichten aus. Die dafür verantwortlichen Keratinoblasten (Stammzellen) bilden Tochterzellen, die dann nach außen wandern und dabei ausdifferenzieren. Beim gesunden Menschen beträgt die Zeit von der Neubildung einer Zelle in der Basalschicht bis zur Abschilferung als verhornte Superficialzelle durchschnittlich 27 Tage (6). Die Basalzellschicht ist auch der Entstehungsort des Basalioms, der häufigsten Art des Hauttumors. Die begünstigten Hautareale sind dabei vor allem sonnenexponierte Bereiche wie Gesicht, Nacken und Kopfhaut. Meistens handelt es sich dabei um eine kumulative Lichteinwirkung, wodurch, das Basaliom erst im späten Lebensalter auftritt (7). Als Hauptursache für den Basalzellenkrebs wird längerwellige UV-Strahlung vermutet, da sie in tiefere Regionen der Haut vordringt als kurzwellige Strahlung (8, 9, 10).

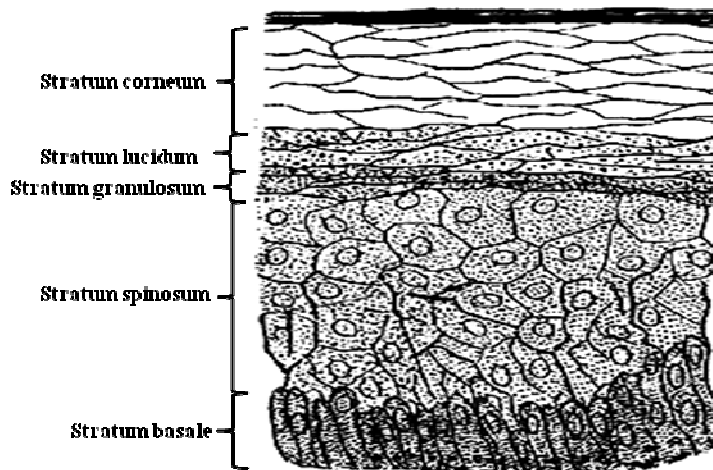


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau der Epidermis mit den fünf, morphologisch voneinander zu unterscheidenden, Schichten.

In der darauf folgenden Stachelzellschicht (Stratum spinosum) beginnen die zuvor säulenförmigen Zellen ihre Form abzuflachen und stachelförmige Fortsätze auszubilden,

die die benachbarten Zellen durch Desmosomen verbinden. Die sich weiterdifferenzierenden Keratinozyten beginnen schon hier mit der Produktion von Keratin, was sich intrazellulär zu Filamentbündeln organisiert. In dieser Zellschicht liegt auch der Ursprung des Plattenepithelkarzinoms, das zwar nicht so häufig wie das Basaliom vorkommt, jedoch deutlich gefährlicher ist, da es zur Metastasenbildung neigt.

Im Anschluss folgt die Granularzellschicht (Stratum granulosum) dann das Stratum lucidum um schließlich zur äußersten Epidermis-Schicht zu kommen, zur Hornschicht (Stratum Corneum). Diese Barriere dient als Grenzfläche sowohl für Fremdstoffe von außen als auch für Wasser und kleine Moleküle von innen nach außen. Somit muss die Hautbarriere den Organismus einerseits vor äußeren invasiven Einflüssen schützen und gleichzeitig reguliert sie den Wasserhaushalt für die lebensnotwendige Homöostase. Die Funktionen übernimmt eine hochkomplex organisierte und äußerst anpassungsfähige, biologisch tote Hornschicht. Das Stratum corneum besteht aus praktisch angeordneten, abgestorbenen und verhornten Keratinozyten, sogenannten Corneozyten, und bildet eine der effizientesten Barrieren im menschlichen Organismus (11).

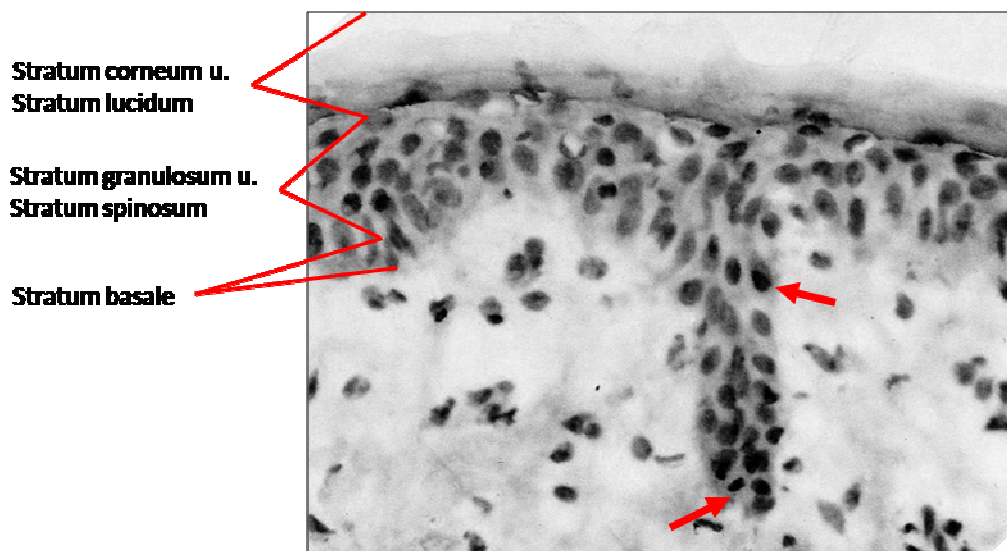


Abbildung 2.2: Querschnitt durch die menschliche Epidermis. Die Pfeile markieren Melanozyten, die neben den Basalzellen eingelagert sind. (Vergrößerung: 200fach, Hämatoxyllin & Eosin gefärbt)

Ebenfalls in der Epidermis vorkommende Zellen sind die Melanozyten, immunologisch aktive dendritische Zellen sowie Mechanorezeptoren (Merkel-Zellen). Sehr wichtig für den Schutz vor UV Strahlenschäden sind vor allem die in der Basalschicht angesiedelten Melanozyten, die durch UV-Strahlung vermehrt zur Melaninbildung angeregt werden (s. Abbildung 2.2). Langerhans-Zellen findet man überwiegend im Stratum spinosum, wo sie wie die Melanozyten mit zahlreichen dendritischen Zellfortsätzen (Desmosomen) mit den umgebenden Keratinozyten in Kontakt stehen.

2.2 Auswirkungen der UV-Strahlung auf die biologischen Systeme der Haut

Ultraviolettes Licht ist definiert als Strahlung in einem Wellenlängenbereich zwischen 100 und 400 nm, wobei eine weitere Unterteilung in drei Wellenlängenbereiche besteht: UVC-Strahlung (100 bis 280 nm), UVB-Strahlung (280 bis 320 nm) und UVA-Strahlung (320 bis 400 nm). Während die UVC-Strahlung vom Sauerstoff in der Atmosphäre (bis 200 nm) und von der Ozonschicht in der Stratosphäre (bis 290 nm) vollständig absorbiert wird, erreichen die UVA- und ein Teil der UVB-Strahlung die Erdoberfläche (12). Durch die sukzessive Zerstörung der Ozonschicht nimmt der UVB-Anteil allerdings ständig zu (13). Ultraviolettes Licht, das auf die Haut trifft, wird größtenteils von der Hornschicht reflektiert, diffus gestreut oder absorbiert (14). Daneben kann abhängig von der Wellenlänge ein erheblicher Teil der Strahlung in unterschiedliche Hautschichten vordringen. Die Eindringtiefe verhält sich dabei proportional zur Wellenlänge der eintreffenden Strahlung.

Tabelle 2.1: Prozentuale Transmission von UV-Strahlung durch eine Standard-Haut (Dicke 70 µm, Stratum corneum, 20 µm, nach Bruls et al. (15))

	UVC (254 nm)	UVB (290 nm)	UVA (365 nm)
Stratum corneum	18	14	64
Lebende Epidermis	0,03	0,27	19

Bruls et al (15) haben, ausgehend von einer durchschnittlichen Epidermisdicke von 70 μm und einer Dicke der Hornschicht von 20 μm , prozentuale Transmissionswerte für unterschiedliche Wellenlängen im UV-Bereich berechnet (s. Tabelle 2.1).

UVA-Strahlung erreicht je nach Dicke der Hornschicht dermales und zum Teil subcutanes Gewebe (16) und wird zu 60 % von der Epidermis absorbiert (17). Dagegen dringt UVB-Strahlung nicht so tief ein, erreicht aber je nach Körperregion auch die teilungsfähigen Keratinozyten der Basalzellschicht und kann diese schädigen. Während die energiereichste UV-Strahlung nahezu vollständig von der Stratosphäre absorbiert wird, ist dennoch der schädigende Einfluss dieser Strahlung nicht ganz ohne Relevanz. Durch den stetigen Abbau der Ozonschicht durch menschlichen Einfluss, steigt auch die Wahrscheinlichkeit, dass kurzwelliges Licht die Erdoberfläche erreicht. Überdies gewinnt die UVC-Bestrahlung bei der Abwasseraufbereitung, die Strahlung dieses Wellenlängenbereichs emittieren, bei der Materialbearbeitung, in der Medizin und in der Weltraumforschung an Bedeutung.

Die Absorption der Lichtenergie (Photonen) in der Haut erfolgt durch die unterschiedlichsten endogenen Systeme (Nukleinsäuren, Lipide, Aminosäuren, Melanin). In dessen Folge können unterschiedlich angeregte Zustände der jeweiligen absorbierenden Struktur entstehen und verschiedene photooxidative Reaktionen ausgelöst werden (18). Das Absorptionsmaximum der DNA beispielsweise liegt zwischen 245 und 290 nm und kann, wenn Licht dieser Wellenlängen auf die Basenpaare trifft, zu Pyrimidindimerbildung führen (19, 20), die zum Funktionsverlust führen kann. Eine immunologische Antwort in Folge starker UV-Strahlung tritt in Form eines UV-Erythems (*Erythema solare*) auf und kann im schlimmen Fällen Verbrennungscharakter haben (19). Die oxidativen Schäden an Membranlipiden können als sogenannte Lipidperoxidation auftreten und werden als direkte Folge radikalischer Mechanismen beschrieben (21, 22). Auf zellulärer Ebene sind die hervorgerufenen Schäden von UVB- und UVA-Strahlung auf unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen. Die kurzwellige UVB-Strahlung hat größtenteils einen direkten Einfluss auf zelluläre Strukturen (chromophore Systeme), dagegen schadet UVA-Strahlung über einen indirekten Weg, indem über radikalische Zwischenstufen reaktive Sauerstoffspezies generiert werden, die dann wiederum andere Strukturen wie DNA und Membranlipide angreifen (23). Die Tatsache, dass die negativen Auswirkungen von UVA-Strahlung nicht sofort zu sehen sind, diese aber 95 % der UV-

Strahlung (auf der Erdoberfläche) ausmacht, ist ein Grund warum UVA-Strahlung so lange zu Unrecht unterschätzt wurde. Der sorglose Umgang mit UVA-Licht in Sonnenstudios beispielsweise, ist damit zu Recht kritisch zu bewerten.

Die sehr kurzwellige UVC-Strahlung kommt auf der Erdoberfläche praktisch nicht vor und dringt falls vorhanden nicht bis in den lebenden Bereich der Epidermis ein. Der Wassergehalt des Stratum corneum könnte trotzdem dazu beitragen, dass hochreaktive Spezies durch die energiereiche Strahlung entstehen und damit Folgereaktionen in tieferen Hautschichten begünstigt werden (24).

In jüngster Zeit wurde auch über die möglichen schädlichen Auswirkungen von Infrarot-Strahlung berichtet. Der Schaden ist aber auf die sogenannte Hautalterung (25) begrenzt, die zwar nicht erwünscht ist, jedoch eher kosmetischer Natur ist, weswegen in dieser Arbeit nicht weiter darauf eingegangen wird.

2.3 Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Humanhaut durch energiereiche Strahlung

Reaktive Sauerstoffspezies sind Atome oder Moleküle, die alle ein oder mehrere Sauerstoffatome in aktivierter Form besitzen aber nicht unbedingt radikalischer Natur sind. Sie zeichnen sich durch eine hohe Reaktivität gegenüber redoxempfindlichen Systemen und durch eine sehr kurze Halbwertszeit aus (s. Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Halbwertszeiten (HWZ) einiger reaktiver Sauerstoffspezies bei 37°C im Vergleich zum Triplett-Sauerstoff (26)

ROS	Formel	HWZ in s
Triplett-Sauerstoff	O_2	$>10^2$
Singulett-Sauerstoff	1O_2	$1 \cdot 10^{-6}$
Superoxidationradikal	$\bullet O_2^-$	$1 \cdot 10^{-6}$
Hydroxylradikal	$\bullet OH^-$	$1 \cdot 10^{-9}$
Peroxyradikal	$ROO\bullet$	$1 \cdot 10^{-2}$
Alkoxyradikal	$RO\bullet$	$1 \cdot 10^{-6}$

Ein freies Radikal kann definiert werden als ein Atom oder Molekül, welches ein oder mehrere ungepaarte Elektronen in den äußeren Orbitalen enthält (27).

Die meisten Radikale zeichnen sich durch extrem kurze Halbwertzeiten und hohe Reaktivität aus. Sie entstehen im Organismus während normaler physiologischer und metabolischer Prozesse des Zellstoffwechsels (26). Das Superoxidationion beispielsweise entsteht unter physiologischen Bedingungen durch die unvollständige Reduktion des Sauerstoffs innerhalb der mitochondrialen Atmungskette. Zum Teil werden solche Reaktionen auch direkt von Immunzellen (phagozytierende Monozyten oder Neutrophile) zur Abwehr eingesetzt (28). Daneben wird die Entstehung von Radikalen auch vermehrt durch äußere Faktoren, wie UV-Strahlung angeregt (29). In dessen Folge kann durch diese reaktiven Sauerstoffverbindungen ein breites Spektrum an oxidativen Schäden sowohl auf zellulärer als auch auf molekularer Ebene erfolgen, was dann mit Veränderung oder dem Verlust der biologischen Funktionalität einhergeht.

2.3 Schutzmechanismen der Haut vor UV-Strahlung und ROS

Infolge von UV-Strahlung gibt es mehrere unterschiedliche Schutzmaßnahmen die von der menschlichen Haut vorgenommen werden. Einen physikalischen Schutz bietet die Ausbildung einer sogenannten Lichtschwiele, dabei kommt es zu einer Verdickung aller Epidermis-Schichten insbesondere der Hornschicht. Dies beruht auf einer Störung der Keratinozytendifferenzierung. Es kommt dabei zu einer verstärkten Proliferation und einer verminderten Abflachung der Keratinozyten. Die so verdickte Epidermis kann bis auf das Doppelte der ursprünglichen Ausdehnung anwachsen und damit ein Großteil der kurzwelligen Strahlung durch schlichte Absorption in den oberen toten Schichten abfangen (30, 31, 32).

Ein weiteres sehr effektives Schutzsystem ist die Absorption von UV-Strahlung durch Melanin, welches von den in der Basalschicht angesiedelten Melanozyten produziert wird. Es ist ein biologisches Polymer was hauptsächlich aus den Vorstufen Tyrosin und 3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa) synthetisiert wird. Es werden grundsätzlich zwei verschiedenen Melanine unterschieden, das schwarzbraune Eumelanin und das gelblich-rötliche Phäomelanin. Ersteres kommt häufiger und in dunkelhäutiger Haut vor und

Phäomelanin eher in hellhäutiger Haut, wobei stets beide Formen beim gesunden Menschen gebildet werden. Das Melanin fungiert dabei als Filter, indem es UVA/B, sichtbares Licht und Infrarot-Strahlung in harmlose Wärme umwandelt, die dann durch das Kapillarsystem oder durch die Hautfollikel nach außen transportiert wird. Zusätzlich ist Melanin in der Lage ROS direkt zu reduzieren, da es in seiner polymeren Struktur zahlreiche Semichinon-ähnliche Strukturen besitzt, die durch energiereiche Strahlung generiert werden (33, 34). Dieser Prozess ist reversibel und wird durch UV-Licht und sichtbares Licht aktiviert (35, 36). Man kann zwei Arten von Pigmentierung durch Melanin unterscheiden, zum einen die sofortige Bräunung (immediate pigment darkening, IPD), die während der Bestrahlung einsetzt und die nur auf einer Oxidation von schon vorhandenem Melanin-Pigment beruht, und zum anderen die verzögerte Bräunung (delayed tanning, DT). Letztere entsteht erst nach einigen Tagen und beruht auf vermehrter Bildung von Melanin in Melanosomen durch die Aktivierung des Enzyms Tyrosinase. Diese langanhaltende Bräunung beginnt erst nach der normalen Zellerneuerung abzublassen.

Neben diesen Schutzmechanismen verfügt die Haut über verschiedene enzymatische Reparatursysteme, die oxidativen bzw. UV-induzierten Veränderungen an der DNA und an anderen Strukturen der Haut effektiv begegnen können (30, 34). Beispielsweise können Zellen bei irreparabler Zellschädigung die Apoptose einleiten und somit potenziell mutagene Zellen entfernen (37). Weiterhin sind Zellen und Gewebe durch unterschiedlich lokalisierte (extra- und intrazelluläre), antioxidative Enzymsysteme vor übermäßiger Schädigung durch ROS geschützt. Dazu gehören als wichtigste Vertreter die Superoxiddismutase, die Glutathionperoxidase und die Katalase (34). Ferner sollten hier auch die sehr effektiven nicht-enzymatischen Antioxidantien (AO) genannt werden. Dabei handelt es sich um zum Teil endogen produzierte als auch exogen zugeführte niedermolekulare Substanzen. Als wichtigste und effektivste Vertreter wären α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Glutathion zu nennen. Diese antioxidativen Verteidigungssysteme arbeiten dabei zusammen, indem einige die schädliche Substanz abfangen und dabei selber oxidiert werden um dann, von anderen Antioxidantien wieder regeneriert zu werden. Diese hier vereinfachte Darstellung folgt in Wirklichkeit einem sehr komplexen Mechanismus, welcher bei *Applegate, Frenk* (38) und *Thiele et al.* (39) zusammengefasst wird. Bei Untersuchungen an UV bestrahlter Säugetierhaut konnte eine Abnahme verschiedener antioxidativer Systeme festgestellt werden (40, 41). Zusätzlich

konnte ein protektiver Effekt nach topischer Applikation von Antioxidantien an bestrahlter Haut von Tieren gezeigt werden (42-45).

Mit diesem Hintergrund war es Ziel in der vorliegenden Arbeit antioxidativ wirksame Substanzen einzusetzen, die diese körpereigenen Schutzmechanismen der Haut ergänzen oder ihre Wirksamkeit verstärken.

2.4 Nitroxyl-Radikale

Die Stoffklasse der Nitroxyl-Radikale (oder auch Nitroxide) geht bis in das letzte Jahrhundert zurück und wurde erstmals 1956 als stabiles organisches Radikal erkannt und als solche bezeichnet (46-49). Die zunächst paradox klingende Bezeichnung eines **stabilen freien Radikals** lässt sich anhand der Molekülstruktur erklären. Die Stabilität der organischen Nitroxyl-Radikale beruht einerseits auf der Delokalisierung des ungepaarten Elektrons zwischen dem Stickstoff- und dem Sauerstoffatom (s. Abbildung 2.3) und andererseits auf der sterischen Abschirmung der radikalischen Struktur.

Welche der beiden Strukturen aus Abbildung 2.3 gerade vorherrscht hängt im Wesentlichen von dem umgebenden Medium ab. Bei steigender Polarität des Lösungsmittels liegt bevorzugt die zwitterionische Form vor, bei steigender Lipophilie die andere. Die sterische Abschirmung des Paramagnetischen Zentrums ist eine Grundvoraussetzung, die alle stabilen Radikale inne haben. Deutlich machen das Untersuchungen von *Bowman et al.* und *Nilse et al.* (50, 51) zur Stabilität von Nitroxiden bei denen am α -Kohlenstoffatom nur eine Methylgruppe durch ein Wasserstoffatom ersetzt wurde. Diese Strukturen neigen zur Disproportionierung zu den korrespondierendem Hydroxylamin und dem Nitron.

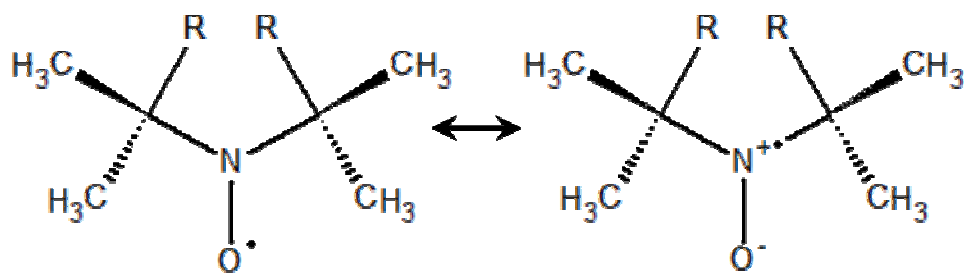


Abbildung 2.3: Mesomeriestabilisierter Übergang des ungepaarten Elektrons zwischen Stickstoff und Sauerstoff, sterische Abschirmung durch vier Methylgruppen

Die außerordentlich hohe Stabilität dieser Stoffklasse in verschiedenen Medien macht sie, kombiniert mit der ESR-Technologie, zu hervorragenden Modellsubstanzen für Untersuchungen verschiedenster Sachverhalte. So kann die Beweglichkeit der Spinsonde¹ beispielsweise Rückschlüsse auf die Viskosität der Umgebung geben, die Hyperfeinkopplungskonstante kann Auskünfte über den Mikro-pH-Wert geben und man kann Verteilungsprofile einer Sonde dazu nutzen Schlussfolgerungen für Arzneistoffe, die von ähnlicher Struktur sind, zu ziehen (52-56). Mit der ESR-Tomografie ist es zudem möglich den räumlichen Aufenthalt des Nitroxids in einem dreidimensionalen Gerüst zu bestimmen.

Zahlreiche Untersuchungen zur Verteilung von Nitroxyl-Radikalen in Humanhaut wurden von *Moll* (52) und *Hochkirch* (57) vorgenommen. Dabei wurden Erkenntnisse zur Polarität der verschiedenen Hautschichten und deren Mikroviskosität gewonnen (52). Zusätzlich konnte anhand von Bestrahlungsversuchen an exzidierte Humanhaut eine strahlungsabhängige Reduktion der Nitroxide in der Haut festgestellt werden (57). Dieser Aspekt sollte in vorliegender Arbeit näher untersucht werden, um damit den antioxidativen Charakter von Nitroxyl-Radikalen in Humanhaut zu zeigen. Die protektiven Eigenschaften von einem Nitroxid gegenüber Strahlung wurden von *Damiani et al.* bei der verminderten Lipidperoxidation von bestrahlten mit Sonde beladenen Liposomen gezeigt (58).

¹ Als Spinsonde werden in der ESR stabile freie Radikale bezeichnet, die als Reportermoleküle bei dieser Technologie eingesetzt werden.

Eine Phase I Studie von topisch appliziertem TEMPOL konnte *in vivo* einen Rückgang der Alopezie bei Strahlen-Therapie von Hirnmetastasen bewirken (136). TEMPOL war dabei nicht im Blut der Probanden zu finden und unerwünschte Wirkungen die auf das Radikal hindeuteten waren auch sehr selten, was zum einen die günstige Verteilung in den oberen Hautschichten verdeutlicht und zum anderen die gute Verträglichkeit dieser Substanz zeigt.

Kapitel 3

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Nitroxyl-Radikale

Die Nitroxyl-Radikale 4-Hydroxy-2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPOL) und 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-benzoat (TEMPOL-Benzoat) wurden von Sigma bzw. Aldrich bezogen. 2,2,6,6-Tetramethyl-4-trimethylammoniumpiperidin-1-oxyl-iodid (CAT-1) stammte vom Institut für organische Chemie der Russischen Akademie der Wissenschaften, Novosibirsk (Russland). Die Spinsonde 5-(4,4-Dimethyl-1,3-oxazolidin-3-oxyl)-hexadecansäure (5-Doxylpalmitinsäure, DPS) und 5-(4,4-Dimethyl-1,3-oxazolidin-3-oxyl)-hexansäuremethylester (DHME) (s. Abbildung 3.1) wurden in der Arbeitsgruppe synthetisiert.

Die verwendeten Nitroxide kann man grob in zwei Stoffklassen unterteilen die einen haben ein Piperidingrundgerüst (TEMPOL, TEMPOL-Benzoat, CAT-1), die anderen ein OxazolidinGrundgerüst (DHME, DPS). Durch ihre unterschiedlichen Substituenten unterscheiden sie sich doch erheblich in ihrer Polarität und Molekülgröße.

Als ein Maß für die Polarität oder besser für die Lipophilie kann der n-Oktanol-Wasser – Verteilungskoeffizient herangezogen werden. Indirekt kann dieser auch für die Membran- und/oder Zellgängigkeit herhalten.

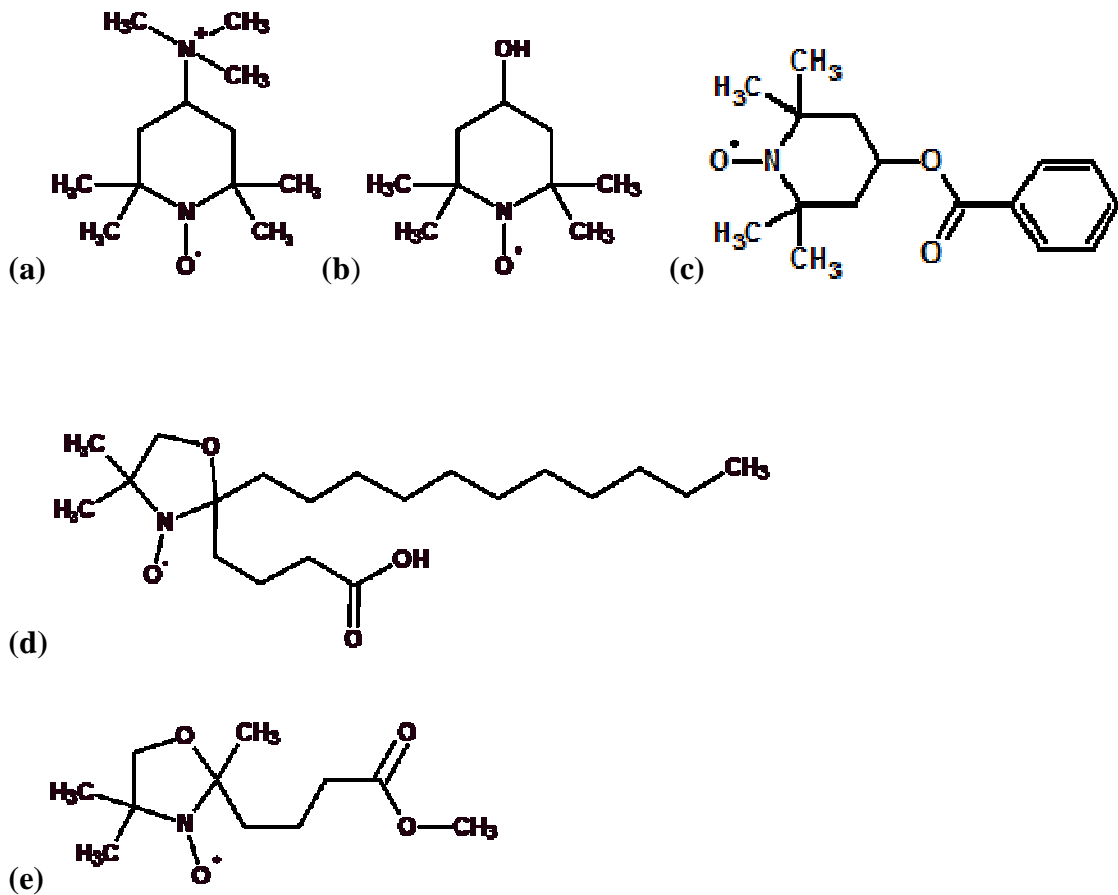


Abbildung 3.1: Strukturformeln der verwendete Nitroxyl-Radikale; (a) CAT-1 $K_{ow} = 0$, (b) TEMPOL $K_{o/w} = 3,7$, (c) TEMPOL-Benzoesat $K_{o/w} \gg 100$ (132), (d) 5-Doxylpalmitinsäure $K_{o/w} \gg 500$ (59), (e) 5-Doxylhexansüremethylester (DHME) $K_{o/w}$ zwischen b und c.

Desweiteren kommt der Molekülform und -größe eine entscheidende Rolle in der Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR) zu. Zum einen erreicht ein großes Molekül nicht so hohe Konzentrationen im Gewebe wie ein kleineres Molekül, zum anderen verursacht ein großes sperriges Molekül durch seine geringere Mobilität ein breiteres Signal als ein kleines mit einer größeren Mobilität. Durch die geringere Konzentration und durch das Verbreitern der Spektren sind die Signale nur schwer vom Grundrauschen zu unterscheiden.

Da Nitroxyl-Radikale vor allem als Modellsubstanzen dienen, wurden die eingesetzten Nitrooxide bewusst mit stark voneinander abweichenden Eigenschaften ausgewählt, um möglichst viele Erkenntnisse in Bezug auf Verteilung, Transport und Stabilität in Humanhaut zu erhalten.

3.1.2 Mikroemulsion

Sogenannte Mikroemulsionen sind kolloidale Lösungen aus miteinander nichtmischbaren Flüssigkeiten und bestehen hauptsächlich aus einer Wasserphase, einer Ölphase und einem hohen Anteil an hydrophilem Tensid und hydrophobem Kotensid. Die in dieser Arbeit verwendete Mikroemulsion wurde von *Jurkovič et al.* (42) entwickelt und zunächst in zwei unterschiedlichen Zusammensetzungen getestet (s. Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der getesteten Mikroemulsionen (dargestellt sind die jeweiligen Komponenten in Gewichtsprozent)

Komponenten	w/o	o/w
Miglyol 812 [®]	24,8	7,5
Labrasol [®]	46,6	37,9
Plurol oleique [®]	12,4	9,6
Destilliertes Wasser	16,2	45

Nach eigenen umfangreichen Voruntersuchungen mit den Nitroxyl-Radikalen wurde die o/w-Emulsion für die weiteren Experimente bevorzugt, da sie ein besseres Penetrationsverhalten zeigte als die w/o-Emulsion. Der Begriff „Emulsion“ ist in diesem Kontext nicht im herkömmlichen Sinne zu verstehen, da es sich bei einer Mikroemulsion nicht um eine Dispersion von feinen Wasser/Öl-Tröpfchen in einer Öl/Wasser-Phase handelt. Vielmehr handelt es sich um einen Zustand in dem Wasser in Öl gelöst ist und umgekehrt. Sie werden deshalb auch als „kritische Lösungen“ bezeichnet (60) und werden

den einphasigen, flüssigen Systemen zugeordnet (61). In diesem Fall steht die Bezeichnung o/w für den höheren Wasseranteil als in der w/o Formulierung.

Das Tensid Capryl-caproylmacrogol-8-glycerid (Labrasol[®]) und das Kotensid Polyglyceryl-6-dioleat (Plurol oleique[®]), wurden von der Firma Gattefossé (Saint-Priest Cedex, Frankreich) bereitgestellt, die Öl-Phase Miglyol 812[®] von der Firma Hüls (Essen, Deutschland).

Die Herstellung der Mikroemulsion erfolgte durch einfaches Mischen der Bestandteile in einem Glasgefäß. Die am Anfang noch trübe Lösung wurde nach kurzem Stehen klar. Die Spinsonden und der Standard (Ascorbinsäurepalmitat) wurden je nach Löslichkeit der Substanz in der jeweiligen Phase vorgelöst und dann mit den restlichen Bestandteilen vermischt.

3.1.3 Stabile Radikale

Das stabile, violett gefärbte Radikal 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) wurde in dieser Arbeit in unterschiedlicher Weise verwendet. Erstens als externer Standard in der ESR-Tomografie, zweitens für die Quantifizierung der Spinsondenkonzentration in exzidierten Humanhaut, drittens als Modellradikal bei der Quantifizierung der antioxidativen Kapazität von Humanhaut und viertens zur Bewertung neuartiger Radikalfänger. Als zweites stabiles Radikal wurde zunächst das gelb gefärbte Galvinoxyl (2,6-Ditert-butyl-4-[(3,5-ditert-butylphenyl-4-oxyl)methyliden]cyclohexa-2,5-dien-1-on, in Betracht gezogen (62, 63), da es wie DPPH prinzipiell für die ESR-Spektroskopie und die UV/VIS-Spektroskopie geeignet schien. Die sehr hohe Lipophilie von Galvinoxyl machte es jedoch unmöglich im wässrigen Medium zu arbeiten, weshalb sich die Substanz als ungeeignet erwies.

Jedes stabile Radikal ist auch im festen Zustand einem Zerfall durch reduzierende oder oxidierende Prozesse ausgesetzt. Deshalb ist es notwendig den wahren Gehalt an DPPH in der Rohsubstanz zu bestimmen. In der Literatur kommt es zu unterschiedlichen Aussagen was die Stabilität in fester Form angeht (64, 65). *Yordanov* (66) konnte zeigen, dass DPPH in kristalliner Form über einen Zeitraum von 30 Jahren stabil bleibt. Der dort experimentell

ermittelte molare Absorptionskoeffizient wurde für Berechnungen in der UV/VIS-Spektroskopie verwendet. Die Reinheitsangabe vom Hersteller (Fluka) lagen bei 85 bis 90 %. Für die verwendete Substanz wurde ein Gehalt von 86 ± 2 % ermittelt.

3.1.4 Weitere Chemikalien und Materialien

Substanz/Material	Hersteller/Herkunft				
Dulbecco's Modified Eagles Medium, Zellzuchtmedium	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,	München,	Deutschland
Streptomycin	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,	München,	Deutschland
Penicillin	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,	München,	Deutschland
Iodacetamid	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,	München,	Deutschland
N-Ethylmaleinimid	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,	München,	Deutschland
Hämatoxyllin nach Mayer	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,	München,	Deutschland
Eosin	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,	München,	Deutschland
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland				
Chloroform	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,	München,	Deutschland
Ascorbinsäurepalmitat	Fluka, Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,	München,	Deutschland
1,1-Diphenylpicrylhydrazin	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,	München,	Deutschland
1,1-Diphenylpicrylhydrazil	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,	München,	Deutschland
Galvinoxyl	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,	München,	Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,	München,	Deutschland

Propylenglykol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Phosphatpuffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Nunc-Zellkultureinsätze aus Polycarbonatmembranen	Thermo Scientific, Thermo Electron LED GmbH, Robert-Bosch Str. 1, D-63505 Langensbold
Humanhaut von kosmetischen Operationen aus dem Brust -, Oberschenkel- oder Bauchbereich	Klinik Meyburg, Berlin, Deutschland
Capryl-caproylmacrogol-8-glycerid (Labrasol[®])	Firma Gattefossé Saint-Priest Cedex, Frankreich
Polyglyceryl-6-dioleat (Plurol oleique[®]),	Firma Gattefossé Saint-Priest Cedex, Frankreich
Miglyol 812[®]	Firma Hüls, Essen, Deutschland
Glutarsäuremonomethylesterchlorid	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dimethylcadmium	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
4-Toluensulfonsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Toluen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Diethylether	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
3-Chlorperbenzoesäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

3.1.5 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
ESR-Spektrometer	X-Band-Spektrometer, ERS 220; ZWG Adlershof, Berlin, DDR
Sonnensimulator	Schnellbelichtungsgerät/ SUNTEST, Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
UVC-Strahler	EPROM-Löscher, Robotron/K 0421, DDR
Diffusionszellen	Side-Bi-Side-Zellen, PermeGear, Hellertown, PA 18055 USA
Mikroskop	Olympus Vanox-T AHT, Deutschland
Gefriermikrotom	Frigocut 2800N, Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland
ESI-TOF-MS	LCQ Deca XP; Thermoquest-Finnigan, San José, CA, USA
Gewebehomogenisator, Potter- Elvehjem-Homogenisator	Potter S-Homogenisator[®], B.Braun Biotech International, Sartorius AG, Weender Landstraße 94-108, 37075 Göttingen, Deutschland
Registrierende UV/VIS Photometer	UVICON, Kontron Instr., Groß- Zimmermann, Deutschland und UV-2191 PC/UV/VIS-Spectrometer, Shimadzu, Japan
Radiometer	UV-Radiometer 211/PRC (UVC), PRC- Krochman, Am Sandwerder 47, 14109 Berlin, Deutschland

3.2 Analytische und präparative Methoden

3.2.1 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Spektroskopie wurde in dieser Arbeit hauptsächlich für die Quantifizierung des stabilen Radikals Diphenylpicrylhydrazyl verwendet. Dazu kam ein Zweistrahlphotometer zum Einsatz. Die Quantifizierung erfolgte anhand von Kalibrierungsgeraden (s. Kapitel 4) oder mit Hilfe des molaren Absorptionskoeffizienten (s. Kapitel 6).

Zur qualitativen Analyse wurde die UV/VIS-Spektroskopie, bei der Umsetzung von Diphenylpicrylhydrazyl zu Diphenylpicrylhydrazin, durch Auswertung von Vergleichsspektren eingesetzt.

3.2.2 Bestrahlungsquellen

Sonnensimulator

Um das Spektrum der natürlichen Sonneneinstrahlung zu imitieren, wurde ein Sonnensimulator verwendet. Die relativen Strahlungsintensitäten für das ausgesandte Spektrum sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Strahlungsintensitäten wurden mit einem Radiometer und den zugehörigen Sensoren (UVB-Bereich, PMA 2101 und UVA-Bereich, PMA 2110, Solar Light, Glenside, Pennsylvania, USA) auf der Höhe des Probenbügels gemessen. Für den UVB-Bereich betrug sie $630 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, für den UVA-Bereich $11,6 \text{ mW}/\text{cm}^2$ und für das gesamte Spektrum $83 \text{ mW}/\text{cm}^2$.

UVC-Strahlungsquelle

Als UVC-Strahler wurde die Lampe aus einem EPROM-Löcher (Erasable-Programmable Read Only Memory) verwendet. Die Lampe hatte eine Emissionswellenlänge von 254 nm

(s. Abbildung 3.2) und die Strahlungsintensität lag nach zehn Minuten Aufwärmphase bei konstanten 22 mW/cm². Gemessen wurde die Intensität mit einem Radiometer (UV-Radiometer 211/PRC) bei 1 cm Abstand von der Lampe, was auch der Probenpositionierung bei den Bestrahlungsexperimenten entsprach.

Spektrale Verteilungen

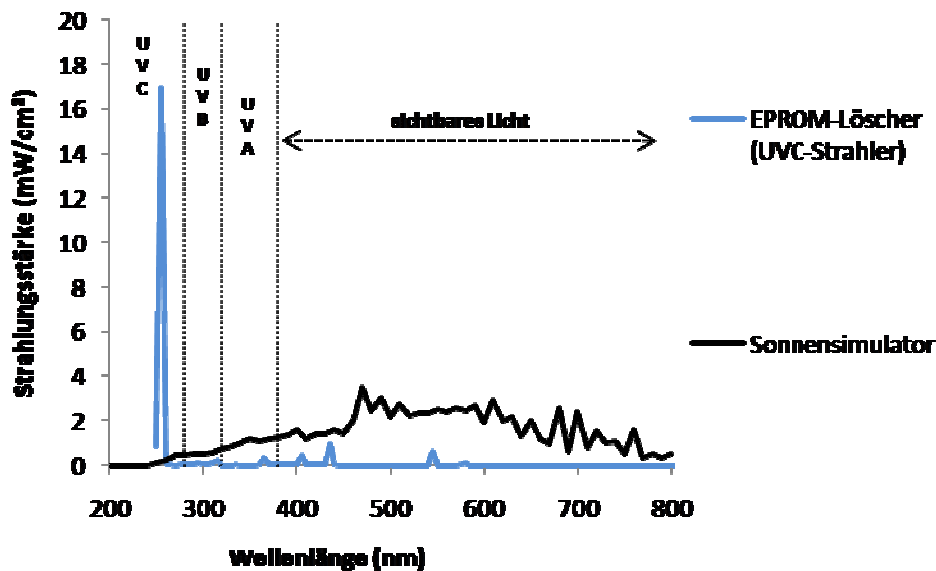


Abbildung 3.2: Wellenlängenspektrum der verwendeten Strahlungsquellen und deren Einteilung.

Versuchsaufbau

Für die Bestrahlungsexperimente mit dem Sonnensimulator wurde die Haut in einer Petrischale mit Nährmedium (s. Kapitel 3.2.5.1) auf einen Kühlblock (10 °C) gelegt. Zusätzlich wurde der Luftstrom, des Kühlungsgebläses der Lampe, um die Hautprobe

geleitet, da sonst eine drastische Austrocknung der Haut stattgefunden hätte. Trotz erheblicher Wärmeentwicklung in dem Sonnensimulator erreichte die Oberflächentemperatur nie einen Wert über 42 °C. Gemessen wurde die Temperatur mit Hilfe eines Infrarot-Thermometers (Braun ThermoScan IRT 4020 Infrarot-Thermometer, Kronberg, Deutschland). Bei der Bestrahlung mit dem EPROM-Löscher trat keine nennenswerte Temperaturerhöhung ein. Trotzdem wurden, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, die Hautproben auf demselben Kühlblock positioniert.

Trotz der Maßnahmen um das Austrocknen zu verhindern, gab es bei längerer Bestrahlung (30 Minuten) Verdunstungseffekte, weshalb nachträglich Medium (1 ml) hinzugefügt wurde.

3.2.3 ESR-Spektroskopie/Tomografie

ESR-Spektroskopie

Die Elektronenspinresonanzspektroskopie gehört zu der Gruppe der magnetischen Resonanzmethoden. Wie bei allen anderen Formen der Spektroskopie, kann nach Absorption eines bestimmten Energiebetrags ein Spektrum aufgenommen werden, der im untersuchten System einen Übergang von einem energetisch niedrigen in einen energetisch höheren Zustand erzeugt. Die absorbierte Energiemenge lässt sich nach

$$\Delta E = h \cdot \nu$$

h: Plancksches Wirkungsquantum

ν : Frequenz

beschreiben (67).

Im Fall der ESR wird die Energie, zum Übergang eines Elektronenspins vom Grundzustand in einen angeregten Zustand, durch die Absorption von Mikrowellen erzeugt. Dieser Übergang ist durch Aufhebung des entarteten Spin-Zustands durch Anlegen eines homogenen Magnetfelds für Elektronen in unvollständig besetzten Orbitalen möglich. Befindet sich ein ungepaartes Elektron in einem äußeren magnetischen Feld, kann der Vektor des magnetischen Moments zwei mögliche Orientierungen

eingehen, die mit den zwei erdenklichen Orientierungen des Spinvektors parallel oder antiparallel zum angelegten magnetischen Feld korrespondieren.

Die Spinquantenzahl S eines Elektrons beträgt $\pm \frac{1}{2}$, folglich ist die Energie eines Elektrons in einem magnetischen Feld entweder mit

$$E_1 = +\frac{1}{2}g \cdot H \cdot \beta$$

oder

$$E_2 = -\frac{1}{2}g \cdot H \cdot \beta$$

zu beschreiben. Diese Energieaufspaltung eines Elektrons durch Anlegen eines magnetischen Feldes bezeichnet man als Zeeman-Aufspaltung. Die Energiedifferenz zwischen den zwei Spin-Zuständen des Elektrons beschreibt

$$\Delta E = E_1 - E_2 = g \cdot \beta \cdot H.$$

β : Bohrsches Magneton

g : g -Wert des freien Elektrons

H : magnetisches Feld

Die Messung dieser Energiedifferenz ist die Grundlage der ESR-Experimente. Das Anlegen eines Mikrowellenfeldes mit Quanten ($h \cdot \nu$) einer Energie gleich $g_e \beta_e H$ in senkrechter Orientierung zum Magnetfeld H bewirkt den Übergang des Elektronenspins zwischen beiden Zuständen (68).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der ESR und der ebenfalls zu den magnetischen Resonanzmethoden gehörenden NMR ist bedingt durch die unterschiedlichen Massen von Kern und Elektron und die damit verbundenen unterschiedlichen magnetischen Momente. Daraus ergeben sich Unterschiede in Bezug auf die zur Anregung erforderlichen Magnetfeld-Frequenz-Kombinationen und auch im Zeitfenster zwischen ESR und NMR. Heute werden in der NMR Frequenzen bis 800 MHz verwendet, während in der ESR der GHz-Bereich dominiert. In den letzten Jahren wurde die ESR-Technologie in zunehmendem Maße im biochemischen Bereich eingesetzt, was eine Verringerung des Frequenzbereichs auf bis zu 500 MHz zur Folge hatte. Aufgrund der größeren

Eindringtiefe dieser Mikrowellen war es möglich Messungen am lebenden Objekt (z. B. Kaninchen und Ratten) durchzuführen.

Daraus resultieren unterschiedliche „Zeitfenster“ und Empfindlichkeiten der Methoden. Die Anwendung der X-Band-ESR mit Frequenzen um 9 GHz gestattet es, Prozesse vom Mikrosekundenbereich bis in den Pikosekundenbereich zeitlich direkt zu verfolgen. Aus den unterschiedlichen Massen und damit unterschiedlichen magnetischen Momenten von Kern und Elektron ergibt sich eine höhere Empfindlichkeit der ESR, da die Besetzungsunterschiede der Niveaus im thermischen Gleichgewicht der Boltzmannverteilung gehorchen. Freie Radikale lassen sich mit der ESR gegebenenfalls noch im nanomolaren Bereich nachweisen (69).

ESR-Tomografie

Die bisher genannten physikalischen Gesetzmäßigkeiten und Grundlagen gelten auch für die ESR-Tomografie. Im Unterschied zur sogenannten „eindimensionalen“ Spektroskopie ist für die räumlich aufgelöste Spektroskopie die Aufnahme von mehreren ortskodierten Projektionen erforderlich. Mit Hilfe von Leistungsverstärkern wird in den zusätzlichen Gradientenspulen ein Magnetfeld erzeugt, das für jede registrierte Projektion eine genau definierte Ortskodierung ergibt.

Bevor man mit den ESR-Messungen beginnt, müssen die Hautproben in ihrer Größe reduziert werden. Der hohe Wassergehalt solcher Proben führt zu hohen dielektrischen Verlusten bei den höheren Frequenzen.

Für die ESR-Messungen wurde eine modifizierte Gewebezelle aus Quarzglas verwendet (s. Abbildung 3.3). Auf der Unterseite der Gewebezelle wurde ein DPPH-Kristall annähernd luftdicht mit einem Deckglas und Klebeband fixiert, um einen stationären Zustand zu erhalten. Dieser diente als relativer Standard und wurde für die Abschätzung der absoluten Spinzahl nach Abschluss aller Messungen separat quantifiziert.

Die Quarzabdeckung der Gewebezelle diente dazu, den Wasserverlust durch Verdunstung möglichst gering zu halten. Ein starker Wasserverlust würde während der Messung zu Transportphänomenen innerhalb der Haut führen und damit die Position und das

Verteilungsprofil der Spinsonde ändern. Hierzu wurde eine Methode von *Moll* übernommen, der eine Gewebezelle als Verdunstungsschutz verwendete um diesem Effekt etwas entgegen zu wirken (52).

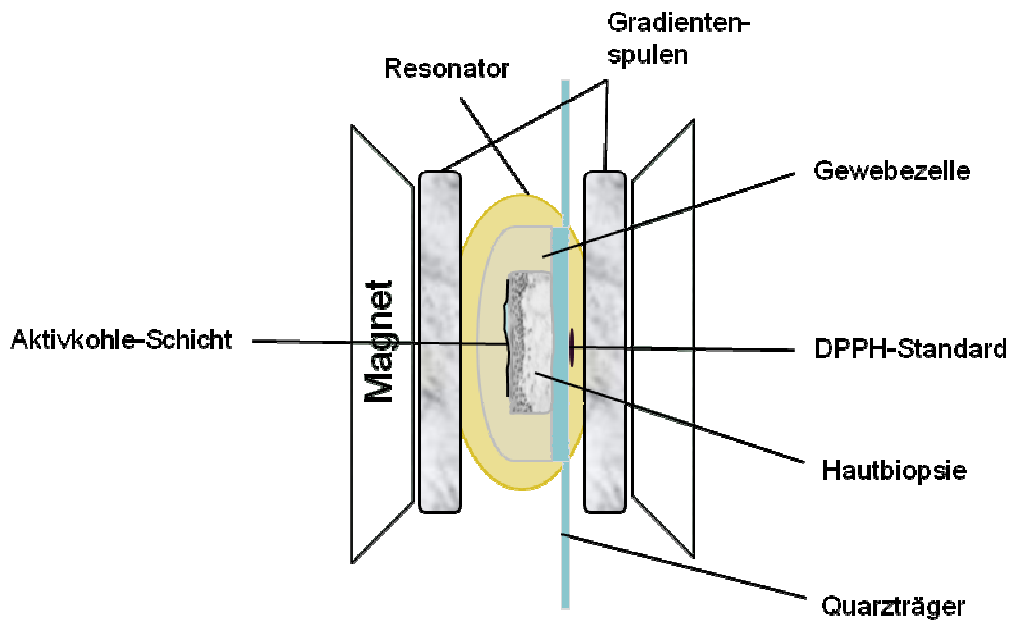


Abbildung 3.3: Modifizierte Gewebezelle für die ESR-Tomografie von humanen Hautbiopsien, auf der Hautoberfläche ist zusätzlich die Kohle-Schicht für die anschließende Dicken-Bestimmung dargestellt

Für die Bestimmung der Hautdicke wurde nach der eigentlichen ESR-Messung, eine zweite Messung durchgeführt. Dafür wurde die Hautoberfläche mit mikronisierter (\varnothing 30 μm , Moll) Aktivkohle markiert. Um einen besonders dünnen Film an Kohle zu erreichen, wurde diese in Aceton suspendiert und auf die Oberfläche getropft. Durch das Verdunsten des Lösemittels blieb eine dünne Schicht Aktivkohle auf der Haut zurück, welche durch ein scharfes 1-Linien-Signal auf dem Tomogramm charakterisiert ist (s. Abbildung 3.4).

Durch Bestimmung des Abstandes zwischen dem Kohle- und dem DPPH-Signal konnte aufgrund der bekannten Ausdehnung des Quarzträgers die Hautdicke ermittelt werden. Die Messung diente der reinen Dickenbestimmung, daher sind mögliche Effekte auf die Nitroxyl-Radikale durch das Aceton oder durch die verstrichene Zeit nicht von Bedeutung.

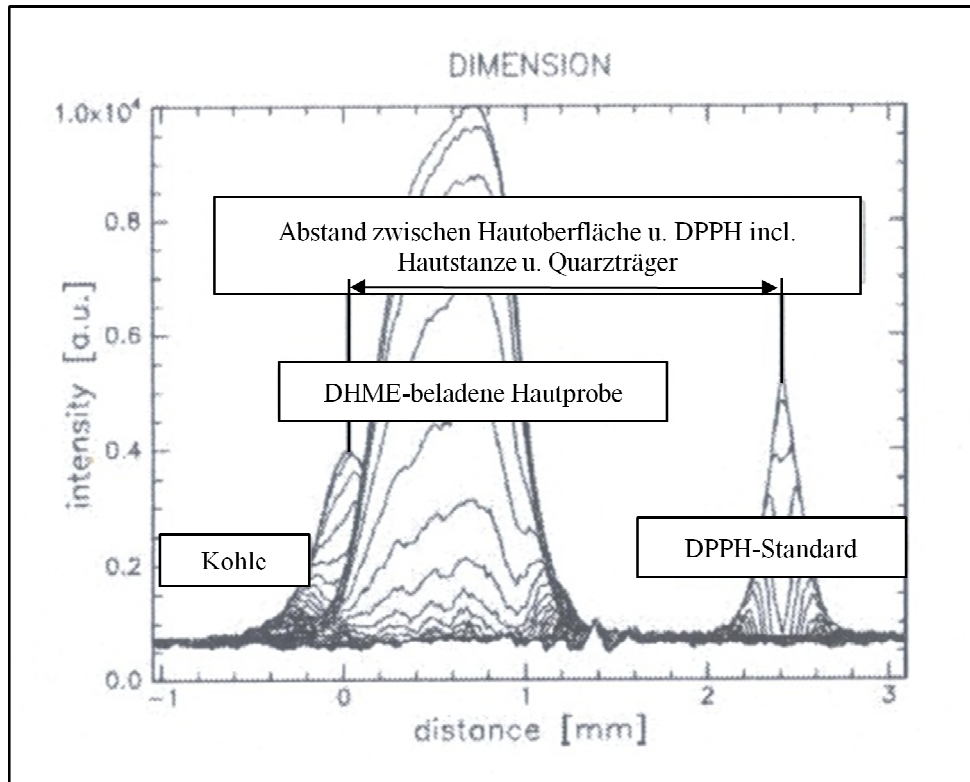


Abbildung 3.4: X-Band-ESR-Tomogramm einer mit Nitroxid (DHME) behandelten Hautprobe, rechts der DPPH-Standard, in der Mitte das Verteilungsprofil der Sonde in der Haut, links das Kohle-Signal, das nachträglich als Begrenzung für die Dickenbestimmung aufgetragen wurde (modifiziert nach 57).

Die ESR-Untersuchungen wurden an einem X-Band-Spektrometer durchgeführt. Als Resonator wurde ein Rechteckresonator TE_{102} verwendet. Um die physiologische Hauttemperatur über die Dauer der Versuche zu gewährleisten wurde der Resonator mit einem Kühlwassersystem auf 32 °C eingestellt.

Für die tomografischen-Messungen wurden folgende Parameter eingestellt: Mikrowellenfrequenz: 9,5 GHz, Mikrowellenleistung: 2 mW, Modulationsfrequenz: 100 kHz, Modulationsamplitude: 0,1 mT; Magnetfeldscan: 8 mT, Scanzeit: 10 s.

Die so erhaltenen Tomogramme zeigten somit ESR-Spektren als Funktion einer räumlichen Koordinate. Ein spektral-räumliches Experiment für ein Objekt mit der Ausdehnung L in räumlicher und ΔH in spektraler Richtung kann nach Gleichung 1 beschrieben werden. Dabei entspricht das ESR-Spektrum bei einem spezifischen Wert des Gradienten einer Ansicht des Objekts aus einem bestimmten Projektionswinkel α . Dieser Winkel ist in Bezug zur spektralen Achse definiert. So entspricht ein Winkel mit $\alpha = 0^\circ$ einem Null-Gradienten und $\alpha = \pm 90^\circ$ jeweils einem unendlich großen Gradienten. Auf diese Weise enthalten alle zwischen diesen Werten liegenden Projektionen eine Kombination von spektraler und räumlicher Information. Die erforderlichen Feldgradienten wurden mittels der Gradientenspulen nach der Formel

$$\mathbf{G}_\alpha = \tan(\alpha) \Delta \mathbf{H} / L \quad (\text{Gl. 1})$$

für die Aufnahme eines kompletten Satzes von Projektionen variiert. Um das Objekt abbilden zu können, musste neben dieser Variation des Feldgradienten aber auch die Sweepweite im Verlauf des Experiments geändert werden. Sie folgte in ihrem Verlauf der Gleichung 2

$$\text{Sweepweite} = \sqrt{2} \Delta \mathbf{H} / \cos(\alpha) \quad (\text{Gl. 2})$$

Da es nicht möglich ist, einen unendlich großen Feldgradienten zu erzeugen, wurde der Maximalstrom durch die entsprechende Spulenkonstruktion limitiert und damit die zur Berechnung eines Tomogramms erforderlichen Projektionen um genau die Zahl verringert (missing projections), deren technische Realisierung aus apparativen Gründen ausgeschlossen ist. Diese fehlenden Projektionen wurden durch den Verlauf der tatsächlich gemessenen Projektionen extrapoliert (138). Für die folgenden beschriebenen Tomogramme wurden jeweils 95 Projektionen (davon 12 missing projections) aufgenommen. Aus diesem Satz von Projektionen wurde mittels gefilterter Rückprojektion eine Matrix von 256 x 256 Punkten berechnet, die dann zur weiteren Auswertung zur Verfügung stand.

3.2.4 Quantifizierung des DPPH Standards mit der ESR

Eine Quantifizierung in der ESR-Technologie erfordert einen Standard und die am häufigsten eingesetzte und wichtigste Substanz ist DPPH. Eine Charakterisierung die ein Standard generell und speziell in der ESR-Spektroskopie erfüllen sollte um eine spätere Quantifizierung durchzuführen hat *Yordanov (76)* zusammengefasst und soll hier kurz erwähnt werden. Ein Referenzstandard sollte,

- **über ein definierte Zeit stabil sein**
- **praktische und einfach zu handhaben sein**
- **sich nicht mit der zu untersuchten Probe überschneiden**

DPPH erfüllt diese Voraussetzungen optimal in allen drei Punkten.

Die Quantifizierung des Referenzstandards DPPH wurde nach einem von *Hochkirch et al. (70)* etablierten Verfahren durchgeführt. Dafür wurde der DPPH-Kristall auf der Gewebezelle (Abbildung 3.5) indirekt photometrisch erfasst. Dafür wurden zwei weitere DPPH-Kristalle (Quantifizierungs-Dots) getrennt voneinander auf der Gewebezelle fixiert (Abbildung 3.5a). Nach der ERS-tomografischen Vermessung aller drei Dots zusammen (Abbildung 3.5b), wurde ein Quantifizierungs-Dot entfernt und photometrisch erfasst (66). Die verbleibenden zwei Kristalle wurden abermals tomografisch vermessen und danach der zweite Quantifizierungs-Dot entfernt und gleichfalls vermessen. Durch die erhaltenen Konzentrationen an DPPH konnte so, zusammen mit den ESR-Messungen, indirekt die Stoffmenge (gleichbedeutend mit der Menge an ungepaarten Elektronen) des verbleibenden Kristalls berechnet werden.

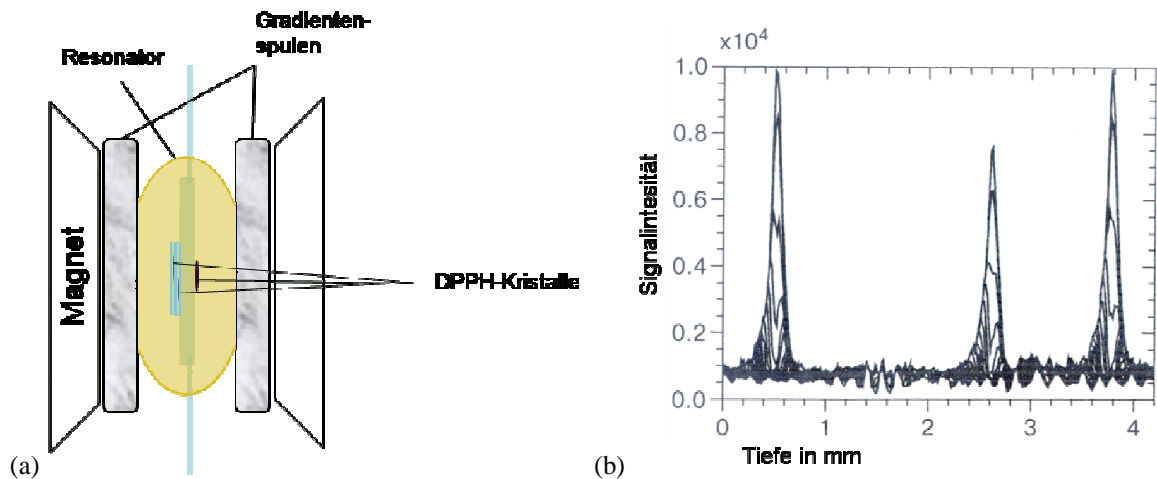


Abbildung 3.5: (a) Anordnung der Gewebezelle mit den drei DPPH-Kristallen im ESR-Spektrometer; (b) ESR-Tomogramm nach der Rückkonstruktion der drei Kristalle, rechts beide Quantifizierungs-Dots (X-Band-Messung)

Der verbleibende DPPH-Kristall diente bei den Hautexperimenten zum einen als fester Standard für die Dickenmessung und zum anderen zur Quantifizierung der Spinsonden in der Haut. Im weiteren Verlauf wurde die ermittelte Stoffmenge des Referenzstandards zur Quantifizierung der Spinsondenkonzentration, in der Haut, verwendet.

Tabelle 3.2: Indirekte Quantifizierung des, auf der Gewebezelle verbleibenden, DPPH-Kristalls (Dot 3). Dot 1 und 2 wurden ESR-spektroskopisch erfasst und photometrisch quantifiziert (Stoffmengen). Der verbleibende DPPH-Kristall (Dot 3) wurde mit Hilfe der bekannten Spin-konzentrationen von Dot 1 und 2 berechnet.

	Absorption bei 520 nm	Konzentration in mmol/l	Stoffmenge in nmol
Dot 1	0,25	0,021	6,4
Dot 2	0,15	0,013	3,9
Dot 3	-	-	7,7

3.2.5 Humanhaut

Für diese Arbeit wurde ausschließlich Humanhaut verwendet, die bei kosmetischen Operationen anfiel. Die untersuchte Haut stammte aus dem Bauch-, Oberschenkel- und Brustbereich von gesunden Frauen im Alter von 27 bis 60 Jahren. Es wurde bewusst auf die Verwendung von kranker Haut (wie z. B. Schuppenflechte, Neurodermitis) oder stark behaarter Haut verzichtet, da es in diesen Fällen zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen kommen kann.

3.2.5.1 Exzidierte Humanhaut

Präparation der Hautproben: Die hier verwendeten Humanhautproben unterlagen einer hohen biologischen Variabilität, deshalb wurde auch bei der Präparation darauf geachtet den Verlauf der Probenpräparation zu standardisieren. Die frisch vom Spender entnommene Haut wurde nach maximal zwei Stunden präpariert. Dazu wurde das Fettgewebe der Subcutis mit Präparierscheren und Pinzetten vorsichtig entfernt noch anhaftendes Blut wurde mit einem Phosphatpuffer (pH = 7) und Zellstoff abgewischt. Um eine konstante Hautoberfläche zu erzielen, wurden aus dem Hautlappen mit einem Locheisen (Ø 20 mm) so viele Hautproben wie möglich ausgestanzt. Dabei wurden Hautpartien mit Narbengewebe, Muttermalen und anderen Unregelmäßigkeiten ausgespart. Die Hautproben wurden auf die Polycarbonatmembran von Nunceinsätzen (Ø 48 mm) gelegt und diese in Zellzuchtplatten eingesetzt, deren sechs Kammern (Ø 50 mm) jeweils mit 1,5 ml Zellzuchtmedium gefüllt wurden. Um eine Quellung der Haut während der Lagerung zu vermeiden, wurde darauf geachtet, dass die Polycarbonatmembran trocken bleibt und sich kein Überschuss an Medium auf der Oberfläche ansammelt. Durch die Bereitstellung von Nährstoffen und die Lagerung bei 4 °C kann die Viabilität der Haut bis zu 8 Tage nach der Entnahme gewährleistet werden. Die Umsetzung von Glucose zu Laktat im Zuge der anaeroben Glykolyse sinkt in den Hautproben innerhalb der ersten 18 h nach der Entnahme jedoch um etwa 70 % ab (71). *Moll* untersuchte die Freisetzung von Laktatdehydrogenase aus abgestorbenen Zellen der Haut und konnte diesen Befund

bestätigen (52). Um reproduzierbare Bedingungen in Bezug auf die Reduktion von Spinsonden in der Haut zu schaffen, wurde auf die Durchführung von Versuchen innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Entnahme der Hautproben verzichtet.

Aufgrund der Dimensionierung des Resonators in der ESR-Anlage und der Problematik des Auftretens dielektrischer Verluste bei wasserhaltigen Proben wurden die Hautstanzen für die ESR-Messungen noch weiter präpariert. Dafür war es erforderlich die Hautproben in ihrer Größe deutlich zu verkleinern. Als bestes Verfahren erwies sich die Methode von *Moll*. Dabei wurde die Hautprobe mit Hilfe einer Lochzange (\varnothing 4,5 mm) in der Mitte nochmals ausgestanzt. Da es durch die biologische Variabilität zu erheblichen unterschieden bei der Dicke der Dermis kommt, war es angebracht die Haut auf eine einheitliche Dicke zu bringen. Diese zeigte nach dem Beschneiden der Dermis mit einer Präparierschere eine Spanne von 1 bis 1,5 mm.

Applikation der Formulierung auf exzidierte Humanhaut: Die Hautstanzen (\varnothing 20 mm) wurden mit der in Punkt 3.1.2 beschriebenen Mikroemulsion epikutan behandelt.

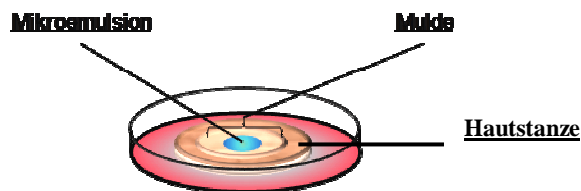


Abbildung 3.6: Hautstanze (\varnothing 20 mm) mit Mikroemulsion in einer Mulde, Glasring unter der Haut (nicht zu sehen).

Um zu verhindern, dass diese niedrigviskose Formulierung nicht über den Hautrand floss und damit unkontrolliert von der Seite eindrang, musste der Versuchsaufbau modifiziert werden. Gelbildnern wie Aerosil[®] oder Xanthan Gummi[®] erhöhen in der beschriebenen Methode die Viskosität, darauf wurde verzichtet da sich dadurch die

Transportgeschwindigkeit der Wirkstoffe erniedrigt. Ein Spreiten der Formulierung wurde verhindert, indem ein Glasring unter die Hautprobe platziert wurde. Die damit entstehende Mulde konnte eine maximale Flüssigkeitsmenge von 100 μl fassen ohne über den Hautrand zu fließen (Abbildung 3.6).

3.2.5.2 Hauthomogenate

Für die Herstellung von Hauthomogenaten wurden verschiedenen Methoden geprüft, wobei sich die Kombination von mehreren Verfahren am günstigsten erwies. Zunächst wurde eine Hautstanze grob mit einer Präparierschere fünf Minuten lang zerkleinert. Anschließend wurde die breiige Masse gewogen und in einen Gewebe-Homogenisator gegeben, je nach gewünschter Dichte des Homogenisats wurde isotonische Kaliumchlorid-Lösung hinzugegeben. In einem Homogenisator nach Potter wurde die Haut weitere zehn Minuten zerrieben, zunächst mit geringer Umdrehungszahl und später mit maximaler Drehzahl von 8000 min^{-1} . Alle Prozesse fanden unter ständiger Kühlung im Eiswasser statt. Die so hergestellten Homogenate hatten ein milchiges Erscheinungsbild und konnten für die ESR-Untersuchungen in eine Kapillare aufgezogen werden. Die Suspension wurde vor jeder Entnahme re-suspendiert.

3.2.6 Sonnenbrandzellen

Frisch exzidierte Humanhaut aus der kosmetischen Chirurgie wurde vom Fettgewebe befreit und wie in 3.3.5.1 weiter verarbeitet. Alle Versuche wurden mit Hautstanzen mit einem Durchmesser von 20 mm und einer durchschnittlichen Hautdicke von 3 bis 4 mm durchgeführt. Die Dickenbestimmung erfolgte nachträglich durch Auswertung der Semidünnschnitte mit einem skalierten Okular. Genau drei Stunden nach der chirurgischen Entnahme wurden die Hautstanzen mit einer wirkstoffbeladenen Mikroemulsion oder wirkstofffreien-Emulsion 30 Minuten lang behandelt

Als Testsubstanzen wurden die Stoffe DHME, TEMPOL, DPS, CAT-1 (Abbildung 1) und Ascorbinsäurepalmitat eingesetzt, wobei letzteres als Standard-Antioxidans fungierte. Die Nitroxyl-Radikale waren in der Mikroemulsion über den Zeitraum der Experimente stabil.

Nach 30 Minuten Inkubationsdauer in einem Brutschrank bei 34 °C wurde die Formulierung entfernt und die Hautstanzen mit einem Sonnensimulator (Strahlungsstärke zwischen 300 und 830 nm; UVA-Anteil: 11,6 mW/cm², UVB-Anteil: 630 µW/cm²) 10, 20 und 30 Minuten lang, oder mit einem UVC-Strahler (Strahlungsstärke bei einer Wellenlänge von 254 nm: 22,4 mW/cm²) 1, 5, 10 Minuten lang bestrahlt.

Anschließend befand sich die Haut für 40 Stunden in einem Brutschrank bei 34 °C. Die Hautstanzen wurden danach bis zum Schneiden mit einem Gefriermikrotom bei -80 °C gelagert.

Die Gefrierblöcke wurden bei -20 °C mit einem Mikrotom in 5 µm dünne Vertikalschnitte abgetragen. Nach dem Antrocknen der Schnitte bei Raumtemperatur für 30 Minuten, wurden diese mit einem Aceton/Chloroform-Gemisch (1:1) für zehn Minuten fixiert. Nach anschließendem Trocknen wurden die Schnitte einer Standard Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen (72, 73). Das Zeitschema für die Färbung wurde leicht modifiziert um ein optimales Ergebnis zu erhalten.

Ablauf:

- 1. fixierte Schnitte werden 2 Minuten in eine Hämatoxylin-Lösung (nach Ehrlich) getaucht**
- 2. zehnminütiges Bläuen der Kerne in fließendem Leitungswasser**
- 3. zehn Minuten Trocknen mit Zellstoff**
- 4. zehn Sekunden mit essigsaurer Eosinlösung gegenfärben**
- 5. zehn Minuten mit demineralisiertem Wasser spülen**
- 6. in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydrieren**
- 7. endfixieren der Schnitte mit Harz und einem Deckglas**

Die Bestimmung der Anzahl der Sonnenbrandzellen erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops bei 200facher Vergrößerung. Dazu wurden nur Zellen aus der

epidermalen Schicht beachtet. Jede Hautprobe wurde auf drei Objektträger verteilt, wobei 10 bis 15 Schnitte auf einem Objektträger (OT) lagen. Gezählt wurden 300 Zellen an unterschiedlichen Stellen auf jedem OT. Dabei wurden zwischen pyknotischer und nicht-pyknotischer Keratinozyten unterschieden. Somit wurden pro Hautprobe 900 Zellen ausgezählt. Unbedingtes Auswahlkriterium für eine Sonnenbrandzelle waren ein kollabiertes, dunkel gefärbtes eosinophiles Zytoplasma und ein großer, einheitlich dunkel gefärbter Nukleus. Zellen, die diese Kriterien nur zum Teil erfüllten fielen aus der Zählung, da sie weder als gesunde noch als Sonnenbrandzelle identifiziert werden konnten. Alle OT's wurden unabhängig voneinander von zwei Personen gezählt.

3.2.7 Bestimmung der Dicke der Epidermis

Die Dicken-Bestimmung der Epidermis erfolgte anhand von mikroskopischen Untersuchungen von Hautschnitten. Die papillenartige Struktur der Epidermis macht es erforderlich, die Schnitte an unterschiedlichen Stellen zu vermessen.

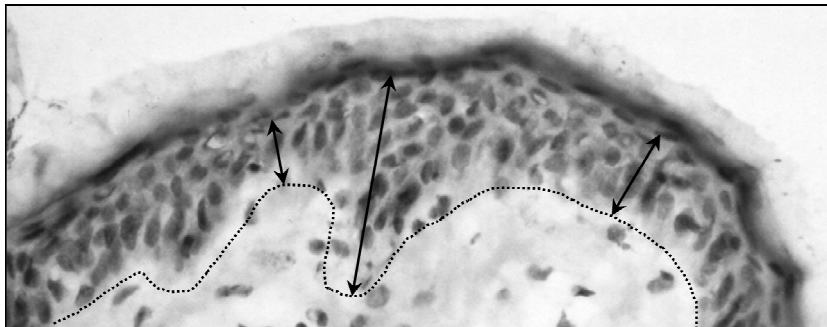


Abbildung 3.7: Hautschnitt, 5 μ m, 200fache Vergrößerung; Grenze zur Dermis mit gestrichelter Linie nachgezeichnet, Abstandsmessung an drei Punkten.

Ein geeigneter Bereich wurde an drei Punkten vermessen, der dünnsten (linker Pfeil), der dicksten (mittlerer Pfeil) und einer ebenen (rechter Pfeil) Stelle (Abbildung 3.7).

Untersucht wurden drei Schnitte je Objektträger und drei je Hautprobe. Insgesamt wurden über einen Zeitraum von drei Jahren zehn Hautproben unterschiedlicher Spender untersucht.

3.3 Synthese und Charakterisierung des neuen Nitroxyl-Radikals 5-Doxylhexansäuremethylester (DHME)

Ziel dieser Synthese war es eine kurzkettigere Doxyl-Fettsäure herzustellen, als die verwendete Doxylpalmitinsäure. Diese hatte sich durch ihre große Molekülgröße und hohe Lipophilie, als nicht geeignet, für die ESR-Messungen herausgestellt. Zusätzlich sollte der amphiphile Charakter aber beibehalten werden. Deshalb wurde, als Orientierung für die Molekülgröße und Ausdehnung, das erfolgreich verwendete Nitroxid-Radikal TEMPOL als Vorbild genutzt. Die 5-Doxylhexansäure schien dabei die aussichtsreichste Substanz zu sein. Um die Lipophilie von der 5-Doxylhexansäure gegenüber TEMPOL etwas zu erhöhen wurde der 5-Doxylhexansäureester synthetisiert.

Vorstufe: 5-Oxohexansäuremethylester

5-Oxohexansäuremethylester wurde nach (74, 75) aus 10 g Glutarsäuremonomethylesterchlorid und Dimethylcadmium synthetisiert. Eine abschließende Destillation im Kugelrohr ($p=0,3$ mbar, Ofentemperatur 100 °C) ergab 5,25 g farbloses Öl.

$C_7H_{12}O_3$ ($M = 144,16$ g/Mol); Retentionsfaktor (R_F) = 0,44 (Hexan:Ethylacetat = 3:1)

Ausbeute: 60,2%; Ausbeute aus (74): 70%

Massenspektroskopische Auswertung der Vorstufe, aufgenommen mit einem EI (electron impact) Massenspektrometer. Nachfolgend eine Auflistung des Molekül-Peaks bei 144 m/z und die häufigsten Bruchstücke.

Massenspektrum [70 eV, m/z, (relative Intensität in %)]: **144 (Molekül-Peak, 2,28)**, 143 (3,35), 129 (15,03), 112 (21,59), 101 (10,39), 85 (14,80), 74 (29,57), 59 (43,09), 43 (100), 42(26)

Zwischenprodukt: 2-(3-Methoxycarbonylpropyl)-2,4,4-trimethyloxazolidin

4,29 g (29,8 mmol) 5-Oxohexansäuremethylester, 13,28 g (150 mmol) 2-Amino-2-methylpropanol und 50 mg 4-Toluensulfonsäure wurden in 150 ml Toluol gelöst und für 42 Stunden am Wasserabscheider erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die organische Phase sechsmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und viermal mit Wasser gewaschen. Es wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Es wurden 3,36 g einer farblosen, leichtbeweglichen Flüssigkeit erhalten. Dieses Roh-Oxazolidin wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Reaktionsschritt verwendet.

Endprodukt: 5-Doxylhexansäuremethylester

Zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 3,36 g Rohoxazolidin in 75 ml Diethylether wurde, innerhalb einer halben Stunde eine Lösung von 2,95 g 3-Chlorperbenzoesäure in 70 ml Ether getropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Lösung weitere 20 h gerührt. Danach wurde die Etherphase viermal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und viermal mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Verdampfen des Ethers unter reduziertem Druck erhält man 3,4 g Rohprodukt.

Eine säulenchromatographische Trennung an Kieselgel 60 (Fließmittel, Hexan:Ethylacetat = 4:1) ergab 780 mg reinen (dünnschichtchromatographisch) Doxylhexansäuremethylester als gelbliches Öl.

$C_{11}H_{20}NO_4$ (M = 230,28 g/Mol); $R_F = 0,40$ (Fließmittel, Hexan:Ethylacetat = 3:1)

Ausbeute (bezogen auf eingesetzten 5-Oxohexansäuremethylester): 11,4%

Massenspektroskopische Auswertung des Endprodukts, aufgenommen mit einem EI-Massenspektrometer. Nachfolgend eine Auflistung des Molekül-Peaks bei 230 m/z und die häufigsten Bruchstücke.

Massenspektrum [70 eV, m/z, (relative Intensität in %)]: **230 (Molekül-Peak, 3,71)**, 199 (3,22), 184 (3,37), 174 (7,00), 145 (17,81), 129 (42,53), 113 (100), 100 (26,29), 85 (51,76), 56 (71,53), 43 (91,96)

Elementaranalyse des Endprodukts (in %):

	Kohlenstoff	Wasserstoff	Stickstoff
<u>berechnet</u>	57,37	8,75	6,08
<u>gefunden</u>	57,30/57,29	8,73/8,70	5,99/6,06

Da die Signale von N-Oxylverbindungen in der NMR (Nuclear-Magnetic Resonance)-Spektroskopie stark verbreiterte Signale ergeben, wurde zur Messlösung ein Microtropfen Phenylhydrazin gegeben, also die frisch erzeugte N-Hydroxyverbindung vermessen.

Auswertung des H-NMR-Spektrums:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,17$ (s, 3H, CH_3); 1,23 (s, 3H, CH_3); 1,33 (s, 3H, CH_3); 1,62 (t, 2H, CH_2 , $^3J_{\text{H,H}} = 8,0$ Hz); 1,74 (m, 2H, CH_2); 2,33 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}$, $^3J_{\text{H,H}} = 7,3$ Hz); 3,45 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$); 3,66 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$).

Anhand der massenspektrometrischen Untersuchungen, der Elementaranalyse und der H-NMR-Spektroskopie konnte das synthetisierte Nitroxyl-Radikale eindeutig identifiziert werden.

3.4 Statistik und Auswertung

Die dargestellten Diagramme wurden mit MS Office 2007 generiert, die Daten wurden als Median \pm Spanne, bei einer Probenanzahl von unter Neun und als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung, bei einer Probenanzahl über Neun, angegeben. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde die Software SPSS 12.0G verwendet.

Statistische Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten wurde mit Hilfe des t-Test unter Verwendung einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,05 ermittelt. Varianzhomogenität und Normalverteilung wurden bei genügend hoher Probenanzahl geprüft.

Kapitel 4

4. Entwicklung eines Verfahrens zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität von exzidiierter Humanhaut und Überprüfung des reduktiven Potentials ausgewählter Antioxidantien mit diesem Verfahren

Die menschliche Haut ist als äußere Begrenzung ständigen, zum Teil schädlichen, Umwelteinflüssen ausgesetzt. Deshalb erscheint es sinnvoll, die hauteigenen Schutzmechanismen durch physikalische, chemische oder biologische Protektiva zu unterstützen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit den schädlichen Auswirkungen von ultravioletter Strahlung auf Humanhaut. Dabei wurde auch Strahlung aus dem UVC-Bereich berücksichtigt, obwohl diese nahezu komplett von der Erdatmosphäre absorbiert wird, aber z. B. in der Entkeimungstechnologie eine wichtige Bedeutung besitzt.

Ultraviolette Strahlung lässt sich in drei Wellenlängenbereiche einteilen:

UVA: Die energieärmste UV-Strahlung bildet zugleich auch mit über 90% den größten Anteil, der auf der Erdoberfläche ankommenden UV-Strahlung. Mit einem Wellenlängenbereich von 320 bis 400 nm, weist UVA-Strahlung auch die größte Eindringtiefe in die Haut auf. Die Strahlung gelangt zu etwa 20 % bis ins Stratum basale, und darüber hinaus durch die Lederhaut bis zur Grenze der Unterhaut oder Subkutis (77).

Die schädliche Wirkung von UVA-Strahlung wurde lange unterschätzt, wird aber inzwischen für eine ganze Reihe Schäden mitverantwortlich gemacht. Die sogenannte lichtbedingte Hautalterung, die auch als solare Elastose bekannt ist, ist eine direkte Folge von UVA-Strahlung. Durch die hohe Eindringtiefe bis hin zu den Bindegewebsproteinen Kollagen und Elastin in der Dermis, werden diese durch Ablagerung abnormer elastischer Fasern zum Teil irreparabel geschädigt (15). Im Vordergrund der Diskussion steht jedoch die, deutlich gefährlichere, Entstehung von kanzerogenem Gewebe, die in erster Linie durch das Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies verursacht werden kann (78, 79). Diese kurzlebigen und zum Teil oxidierend wirkenden Stoffe, sind häufig radikalischer Natur (Superoxid-Anion, Hydroxylradikal), die schnell mit anderen Verbindungen weiterreagieren. Unter anderem sind ROS (*reactive oxygen species*) bei der Bildung von Einzelstrangbrüchen der DNA, bei der Oxidierung der Nukleotidbase Guanin und bei der Quervernetzung von DNA und Proteinen beteiligt (80). Allerdings wird UVA-Strahlung von Melaninvorstufen in einer Photooxidationsreaktion teilweise abgefangen, diese direkte Pigmentierung (*immediate pigment darkening*) verschwindet aber nach spätestens 24 Stunden wieder und bildet daher keinen langanhaltenden Schutz. Näheres zu anderen Schutzmechanismen der Haut siehe Kapitel 2.2.

UVB: Die energiereichere UVB-Strahlung dringt mit einem Wellenlängenbereich von 280 bis 320 nm nur in die Epidermis und je nach Dicke der Hornschicht, bis in die oberen Schichten der Dermis ein. Da das Absorptionsmaximum der DNA im Bereich von 245 bis 290 nm liegt, wird ein Teil der Strahlung direkt von der DNA absorbiert. Bei ausreichender Strahlungsintensität und –dauer kann es zu Dimerisierung von Nukleotidbasen (Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere) kommen. Eine typische Reaktion auf zu starke UVB-Strahlung ist der Sonnenbrand. Beim Sonnenbrand handelt es sich um eine inflammatorische Antwort der Keratinozyten auf eine irreparable Schädigung im genetischen Material. Dabei unterliegen Keratinozyten dem programmierten Zelltod (Apoptose), um Spätfolgen wie Mutationen zu verhindern. Im Gegensatz zur sofortigen und kurzanhaltenden Pigmentierung wie bei der UVA-Strahlung, verursacht UVB-Strahlung eine verzögerte aber langanhaltende Pigmentierung (*persistant pigment darkening*). Melanin wird dabei von Melanozyten in Form von Melanosomen an die umliegenden Keratinozyten abgegeben. Melanin absorbiert die Strahlung und gibt sie in Form von harmloser Wärmeenergie wieder ab (81). Bei den Melanozyten kommt es

dadurch zu einer Vermehrung und zu Aktivierung des Enzyms Tyrosinase, dass die Neubildung von Melanin induziert. Zusätzlich entsteht längerfristig eine Lichtschwiele durch Verdickung des Stratum Corneum, die eine Streuung der Strahlung bewirkt und somit ein tieferes Eindringen verhindert.

UVC: UVC-Strahlung ist durch ihre kürzeren Wellenlängen kaum in der Lage Zellen der lebenden Epidermis zu erreichen, da sie nahezu vollständig reflektiert, diffus gestreut und von den Zellen des Stratum corneum absorbiert wird. Allerdings kann UVC-Strahlung durch die Bildung von hochreaktiven Molekülspezies in der Hornschicht zu Folgereaktionen in tieferen Bereichen der Haut führen (82). So kann bei einer Wellenlänge von 180nm Wasser so stark angeregt werden, dass es zu dem extrem reaktiven Hydroxylradikal (OH•) dissoziiert (83).

UVC-Strahlung findet in der physikalischen Entkeimungstechnik eine technologische Anwendung. Während bei 280 nm (Absorptionsmaximum vieler Proteine) die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin absorbieren, liegt das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei ca. 245nm. Daher werden für die Entkeimung von z. B. Tierseren für die Zellkultur vorhandene Viren und Bakterien mit einer Wellenlänge von 253 nm bestrahlt und damit zerstört.

Aufgrund der Situation, dass immer mehr kurzwellige Strahlung durch die dünner werdende oder schon abgebaute Ozonschicht auf die Erdoberfläche trifft erscheint es sinnvoll die hauteigenen antioxidativen Systeme, deren Aktivität unter dem Einfluss von UV-Strahlen abnimmt, mit der Applikation von Radikalfängern bzw. Antioxidantien zu unterstützen.

Solche Antioxidantien können sowohl innerlich als auch äußerlich angewendet werden, wobei beide Applikationswege Vor- und Nachteile haben. Systemisch aufgenommene Substanzen verteilen sich im gesamten Organismus und belasten diesen zusätzlich. Meistens erreichen sie damit nicht die benötigte Konzentration in den Hautschichten, um eine Schutzwirkung zu entfalten. Eine topische Applikation von Antioxidantien hat den Vorteil, dass diese direkt und in höherer Konzentration an ihren Bestimmungsort gebracht werden können. Diese müssen in der Lage sein die Schutzbarriere der Hornschicht zu durchqueren und im Idealfall im Bereich der Epidermis und oberen Dermis verbleiben.

Substanzen die tiefer eindringen könnten ansonsten in den Blutkreislauf oder in das Lymphsystem im Organismus verteilt werden.

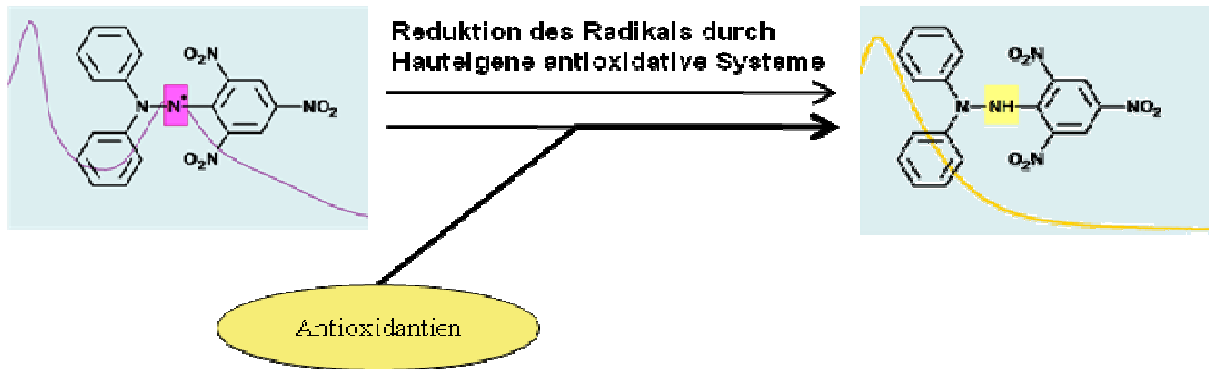
4.1 Notwendigkeit eines neuen Verfahrens

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein einfaches Verfahren entwickelt werden, dass es ermöglicht äußerlich angewendete Antioxidantien an exzidiierter Humanhaut auf ihre antioxidative Potenz zu testen. Dabei war es wichtig, die potenziellen Antioxidantien nicht isoliert zu betrachten, sondern nach der Applikation. Es ist wenig sinnvoll Radikalfänger einzusetzen, die ein hohes Reduktionsvermögen haben, aber in der Haut schnell mit den zahlreichen antioxidativen Systemen der Haut reagieren und somit ihre Fähigkeit ROS abzufangen verlieren. Das Wissen über die Stabilität der Antioxidantien nach der Applikation ist deshalb von entscheidender Bedeutung.

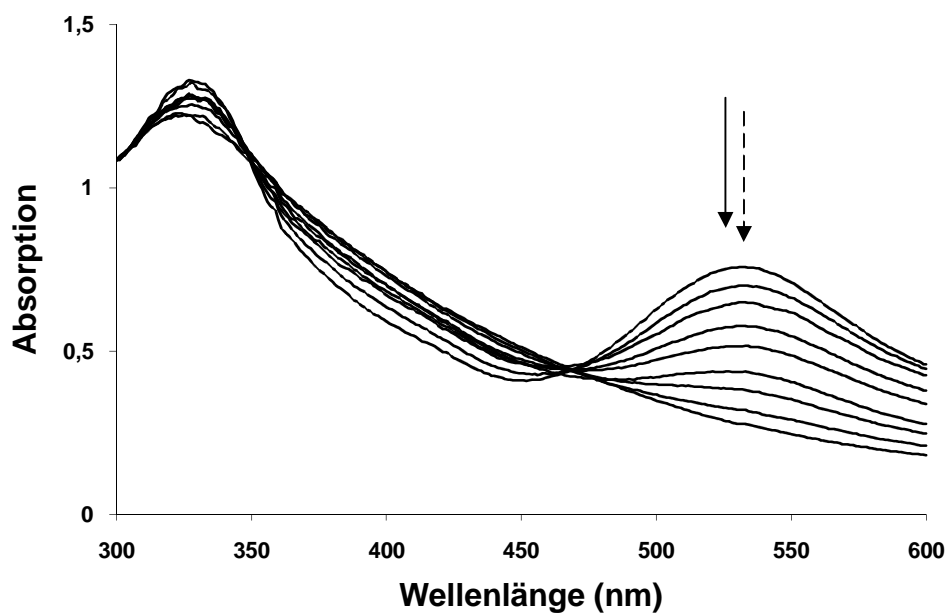
Zweifelslos ist es aber auch angebracht zuerst mit einem geeigneten Verfahren die unbehandelte Haut zu testen, deren antioxidative Kapazität zu quantifizieren und damit einen Null-Wert zu bestimmen, um eine Erhöhung des antioxidativen Potenzials durch vermeintliche Protektiva zu messen. *Shindo et al.* (84) konnten zeigen, dass die Epidermis einen deutlich höheren Anteil an der antioxidativen Kapazität der Haut hat als die Dermis, indem sie die wichtigsten enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien in Humanhaut quantifizierten. Deshalb ist es durchaus sinnvoll, wenn das Verfahren auf die oberen Hautschichten zielt. Ein solches Verfahren ist in dieser Form und mit diesen Ansprüchen noch nicht entwickelt worden, um eine umfassende Beurteilung eines potenziell wirksamen Antioxidans zu ermöglichen, ist eine Methode mit den genannten Eigenschaften aber unerlässlich.

4.2 Versuchsprinzip

Das stabile freie Radikal Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) ist ein gängiges Reagenz, um die antioxidative Potenz eines Stoffes oder Stoffgemisches zu quantifizieren. Das tiefviolett



(a)



(b)

Abb. 4.1: (a) Vor dem dazugehörigen Spektrum ist das tief violett gefärbte Diphenylpicrylhydrazyl dargestellt, das in Gegenwart eines Reduktionsmittels zum gelborange gefärbten Diphenylpicrylhydrazin reagiert; eine stärkere Reaktion mit zusätzlichen Antioxidantien ist durch den dickeren Pfeil dargestellt. (b) Absorptionsspektren einer Verdünnungsreihe von DPPH. Für die Quantifizierung wird die Wellenlänge 520 nm (schwarzer Pfeil) herangezogen, die kurz vor dem Absorptionsmaximum liegt (gestrichelter Pfeil).

gefärbte Radikal reagiert in Gegenwart von geeigneten Reduktionsmitteln zum gelborange gefärbten Diphenylpicrylhydrazin.

Die Abnahme des Absorptionsmaximums bei 515 bis 525 nm (abhängig vom Lösungsmittel) lässt sich UV-spektroskopisch erfassen (s. Abbildung 4.1). Dieses von *Blois* (85) 1958 eingesetzte Radikal reagiert sowohl mit polaren wie Ascorbinsäure, als auch unpolaren Antioxidantien wie Tocopherol und ist damit ideal, um ein breites Spektrum an antioxidativen Systemen zu quantifizieren.

Um die antioxidative Kapazität von Haut zu bestimmen und eine anschließende Bewertung von Antioxidantien zu ermöglichen, sind allerdings einige Modifikationen dieser Methode notwendig.

Ein Zusammenfügen eines antioxidativen Stoffgemisches mit einer DPPH-Lösung wie in dieser Methode beschrieben, ist mit Haut nicht möglich. Es muss ein Kontakt zwischen dem DPPH und den antioxidativen Systemen der Haut gewährleistet sein. Das wäre durch eine Zerkleinerung bzw. Homogenisierung der Haut möglich, allerdings werden durch diesen Vorgang die Hautzellen zum Teil sehr stark beschädigt bzw. zerstört, so dass Bestandteile aus dem Zellinneren mit dem Zelläußeren in Berührung kommen, was zu nicht steuerbaren Reaktionen führt (siehe Kapitel 5.2). Zudem wäre eine Vermessung eines solchen Homogenats auch nicht ohne weiteres im UV-Spektrometer möglich. Das Vermessen von schwach trüben Lösungen ist zwar prinzipiell mit einer Modifikation des Spektrometers möglich, bei einer Suspension, wie es ein Hauthomogenat ist, stößt auch diese Technologie an ihre Grenzen.

Aufgrund oben genannter Schwierigkeiten wurde mit intakter Haut weitergearbeitet. Eine modifizierte Franz-Zelle (Side-Bi-Side-Zelle, s. Abbildung 4.2) erwies sich dafür als geeignete Apparatur um einen ständigen Kontakt mit der Hautoberfläche und einer DPPH-Lösung zu erzeugen.

4.2.1 Versuchsaufbau

Durch den Einsatz einer Diffusionszelle konnten ideale Bedingungen geschaffen werden, um exzidierte Humanhaut für genannte Untersuchungszwecke zu nutzen. Die Bezeichnungen Donor-Zelle und Akzeptor-Zelle wurden der Einfachheit halber übernommen, obwohl sie nicht zutrafen, da DPPH nicht durch die gesamte Haut diffundierte.

Eine Hautstanze wurde zwischen die Zellen gespannt, die Hautoberfläche in Richtung Donor-Zelle die Hautunterseite in Richtung Akzeptor-Zelle (Abbildung 4.2). Anschließend wurde die Donor-Zelle mit einer 0,1 molaren DPPH-Lösung und die Akzeptor-Zelle mit Zellzuchtmedium gefüllt. Die Kontaktfläche von Haut und der DPPH-Lösung betrug bei einem Durchmesser der Zellen von 0,9 mm, $0,64 \text{ cm}^2$. In definierten Zeitabständen wurde aus der Donor-Zelle DPPH-Lösung entnommen, photometrisch vermessen und wieder in die Zelle zurückgegeben. Damit wurde die Menge an DPPH-Lösung in der Donor-Zelle konstant gehalten.

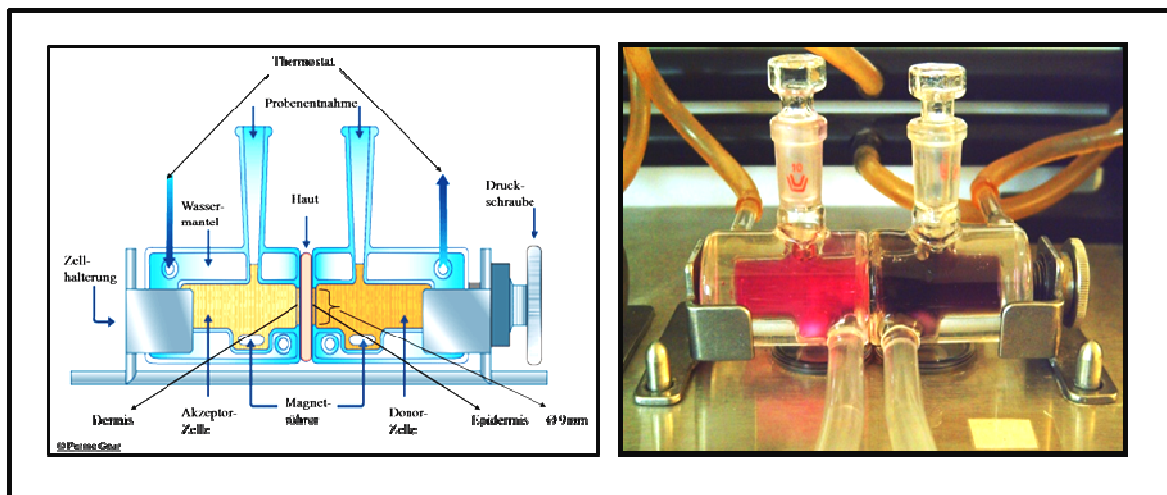


Abbildung. 4.2: „Side Bi Side“-Zelle, Seitenansicht (modifiziert nach *PermeGear*®). Daneben eine Fotografie der tatsächlichen Versuchsanordnung, Akzeptor-Zelle mit Medium gefüllt Donor-Zelle mit DPPH-Lösung

Die Quantifizierung der DPPH-Konzentration erfolgte nachträglich anhand der Vermessung einer entsprechenden Verdünnungsreihe und der dazu gehörenden linearen Kalibrierfunktion. Zusätzlich konnte ein Mengenäquivalent von DPPH errechnet werden, das pro Quadratzentimeter Hautoberfläche reduziert wurde.

4.3 Darstellung der Problematik vom Modellradikal DPPH in diesem Verfahren

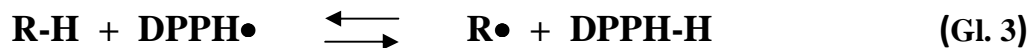
4.3.1 DPPH in wässrigen Lösungen

Aufgrund der sehr schlechten Wasserlöslichkeit in des Radikals Diphenylpicrylhydrazyl wird bei Untersuchungen zu antioxidativen Eigenschaften von Stoffen oder Stoffgemischen hauptsächlich im Nichtwässrigem gearbeitet. Selten wird DPPH auch in Wasser-Alkohol-Gemischen benutzt, wobei ein Zusatz von Stabilisatoren (z. B. EDTA) nötig ist um das Radikal in Lösung zu halten (86). In vorliegenden Untersuchungen mit den Diffusionszellen wurde zunächst mit einem Lösungsmittelgemisch aus Ethanol und Propylenglykol in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander gearbeitet. Dies erwies sich jedoch als ungünstig, da es zur einer Dehydratation der Hautoberfläche kam und das Stratum Corneum sich nach kurzer Zeit ablöste. Die Lösung in der Donor-Zelle wurde nach kurzer Zeit trübe, sodass ein Vermessen erschwert bzw. unmöglich war. Scheinbar wurden aus der Haut Bestandteile durch das hygroskopische Lösungsmittel gelöst.

Die Zusammensetzung für die späteren Versuche setzte sich folgendermaßen zusammen: vier Teile Propylenglykol, zwei Teile Ethanol (98 %) und vier Teile demineralisiertem Wasser. Das Wasser wurde später durch einen Phosphatpuffer (pH = 5,4) aus Stabilitätsgründen ersetzt. Die Gründe hierfür werden im Ergebnisteil dieses Kapitels noch näher erläutert.

4.3.2 Stabilität der verwendeten DPPH-Lösung

Über das Verhalten von DPPH in einer wässrigen Lösung ist bis heute nicht viel bekannt. Somit war es unbedingt notwendig die Stabilität des Radikals in der verwendeten Lösung zu klären. Es ist bekannt, dass DPPH in protischen Lösungsmitteln zu DPPH-H nach folgender Gleichung (3) reduziert wird (87) wobei R-H in diesem Fall das protische Lösungsmittel darstellt.



Die Geschwindigkeit dieser Reaktion, die für die Experimente so klein wie möglich gehalten werden sollte, hängt sehr stark von der Art des Reduktionsmittels R-H ab. *Yordanov et al.* (66) haben sich mit diesem Phänomen näher auseinandergesetzt und einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Reduktion des DPPH-Radikals und dem Lösungsmittel festgestellt. Dabei wurde nicht zwischen Hydrophilie und Lipophilie des Lösungsmittels unterschieden, was hauptsächlich für die Löslichkeit von DPPH entscheidend ist, sondern zwischen protischen und aprotischen Lösungsmitteln. Dies ist durch die Tatsache zu erklären, dass das DPPH-Radikal ein Elektronenmangelmolekül ist und Protonen von funktionellen Gruppen wie -NH₂, -OH, -SH aufnehmen kann. Für die folgenden Versuche ist es also erforderlich ein Lösungsmittel zu benutzen, das eine ausreichende Löslichkeit und eine annehmbare Stabilität für das DPPH bietet. Das in Kapitel 4.2.2 genannte Lösungsmittelgemisch erfüllte diese Eigenschaften und wurde für die nachfolgenden Experimente genutzt.

4.3.4 Nachweis der Eindringtiefe von DPPH in exzidierte Humanhaut

Wie tief DPPH bei diesen Versuchen in die Haut eindringt konnte festgestellt werden, indem die Haut nach vollendetem Experiment aus den Diffusions-Zellen herausgenommen und bei -80 °C eingefroren und danach mit einem Gefriermikrotom horizontal in 5 µm-Schritten abgetragen wurde. Die Schnitte wurden anschließend mit Chloroform extrahiert und der Auszug mittels ESI-TOF-MS (Electro Spray Ionisation-Time Of Flight-Mass Spectra) untersucht (88, 89). Aufgrund der Reduktionsreaktion von DPPH in der Haut wurde der Extrakt nach Diphenylpicrylhydrazin hin untersucht. Der Nachweis von Diphenylpicrylhydrazin erfolgte rein qualitativ. Eine quantitative Analyse wäre zwar prinzipiell mit ESI-TOF-MS möglich, der Aufwand würde den Nutzen übersteigen.

4.4 Ergebnisse der Verfahrensentwicklung

Nachfolgend werden zum einen die Ergebnisse gezeigt, die zur Entwicklung der Methode zur Messung des antioxidativen Potenzials von exzidierte Humanhaut nötig waren (4.4.1-6).und zum anderen deren Anwendung an zahlreichen Hautproben (4.6). Anschließend werden die Ergebnisse zu den getesteten Nitroxiden und dem als Standard-Antioxidans verwendeten Ascorbinsäurepalmitat dargestellt (4.7).

4.4.1 Stabilität der DPPH-Stammlösung

Die für die Quantifizierung erforderlichen Verdünnungsreihen wurden aus einer konzentrierten Stammlösung hergestellt. Die Stabilität von DPPH ist wie schon in Kapitel 4.2.3 erwähnt, vom protischen Charakter der Lösung abhängig, da als Lösungsmittel ein Gemisch aus Propylenglykol und Ethanol gewählt wurde, war es notwendig die Stabilität zu überwachen. Die Stabilität der Stammlösung wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen

dokumentiert. Dafür wurden mehrere Verdünnungsreihen vermessen. In Abbildung 4.3 sind jeweils die Absorptionswerte für eine 0,1 mmolare DPPH-Lösung, nach zwei, fünf und zehn Tagen Lagerung der Stammlösung dargestellt.

Aufgrund der sehr langsamen Lösungsgeschwindigkeit von DPPH in diesem Medium, wurde erst am zweiten Tag gemessen um eine vollständige Auflösung zu gewährleisten. Auf lösungsbeschleunigende Maßnahmen, wie z. B. Erwärmen wurde wegen der schlechten Stabilität von DPPH verzichtet. Einzige Maßnahme war eine Ultraschallbehandlung, durch die eine deutliche Erhöhung der Lösungsgeschwindigkeit erreicht wurde, ohne dass die Stabilität beeinträchtigt wurde (Daten nicht gezeigt).

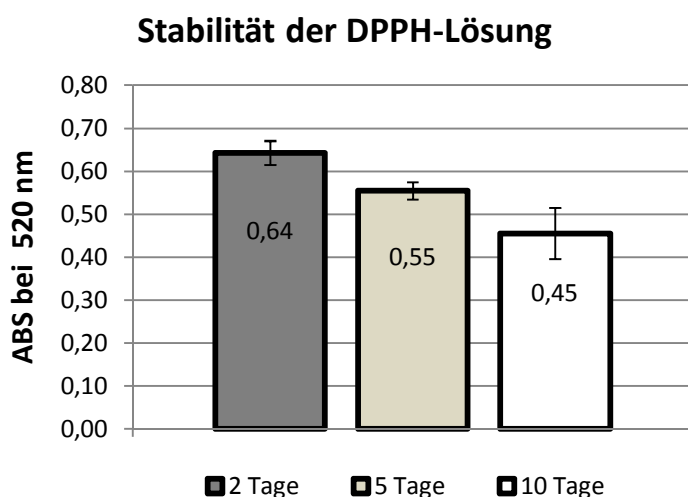


Abbildung 4.3: Absorption einer DPPH-Lösung (0,1 mmolar) bei 520 nm, unter Verwendung von unterschiedlich lang gelagerten Stammlösungen (arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung für $n = 30$).

Die Konzentration des freien Radikals DPPH erreichte nach fünf Tagen nur noch 86 Prozent der Ausgangslösung und nach zehn Tagen sogar nur noch 70 Prozent. Die in der Literatur (85) beschriebenen 2 bis 4 Prozent Abnahme der Aktivität des Radikals pro Woche konnten damit nicht bestätigt werden. Allerdings wurde in dieser Arbeit mit einem anderen Lösungsmittel gearbeitet, was diesen Unterschied erklären könnte. Zur

Kalibrierung wurden daher nur noch maximal drei Tage alte Stammlösungen genutzt. Ursache für diesen Konzentrationsabfall könnte die Reaktion von DPPH mit dem protischen Lösungsmittel nach Gleichung (3) sein (87). Die Reaktion lässt sich zwar verlangsamen, indem man die Lagerungstemperatur senkt, aber ganz verhindern lässt sie sich nicht. Dafür wäre es notwendig DPPH in einem aprotischen Lösungsmittel unter inertem Schutzgas (z. B. Stickstoff) zu lagern (85).

Zur nachfolgenden Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Humanhaut mit den Diffusionszellen, wurde die Stammlösung bis zum fünften Tag verwendet. In dieser Zeit wurde die Stammlösung unter Lichtausschluss und bei 5 °C aufbewahrt.

4.4.2 Quantifizierung der DPPH-Konzentration

Für die Quantifizierung in der UV/VIS-Spektroskopie wird im Normalfall der molare Extinktionskoeffizient ϵ zur Berechnung hinzugezogen (s. Gleichung 4).

Extinktion nach *Lambert-Beer*:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl. 4})$$

E: Extinktion bei einer definierten Wellenlänge λ

c: Konzentration der absorbierenden Substanz im Lösungsmittel (üblicherweise in mol/l)

d: Schichtdicke der durchstrahlten Flüssigkeit

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ

Dieser muss für jedes Lösungsmittel experimentell ermittelt werden. Für das eingesetzte Lösungsmittelgemisch wurde darauf verzichtet, stattdessen erfolgte die Quantifizierung der DPPH-Lösung rein experimentell anhand einer Kalibrierfunktion, die mittels zahlreicher Verdünnungsreihen erstellt wurde (s. Abbildung 4.4).

Die Verdünnungsreihen wurden nicht wie in der Methode bei *Blois* (85) mit einem Gemisch aus DPPH und Cystein hergestellt, sondern mit einem Gemisch aufsteigender

Konzentrationen an DPPH und gleichzeitig sinkender Konzentration an DPPH-H. Damit wird der Einfluss des entstehenden Hydrazins auf das Absorptionsmaximum simuliert.

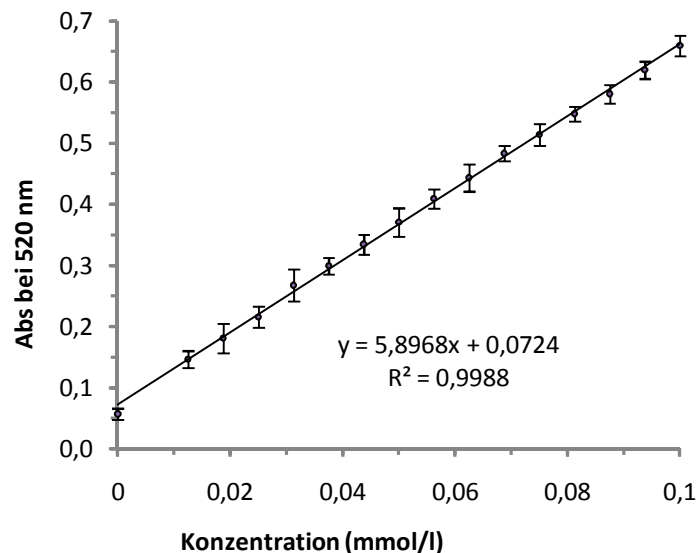


Abbildung 4.4: Ausgleichsgerade für die Quantifizierung der DPPH-Konzentration aus Mittelwert und Standardabweichung von $n = 39$ Einzelmessungen, sowie Geradengleichung und Regressionskoeffizient (R^2).

Damit wurden die Bedingungen, die in der Donor-Zelle vorherrschen nachgestellt. Prinzipiell ist die Methode nach *Blois* (85) genau so präzise, nur ist der zeitliche Aufwand deutlich größer da DPPH erst mit Cystein zum DPPH-H abreagieren muss (Gleichung 5).



Die Reaktionszeit mit Cystein beträgt nach der Originalmethode 30 Minuten, erst danach wird empfohlen die Lösung zu vermessen. Da hier aber mit einem anderen Lösungsmittel gearbeitet wurde, könnten andere Reaktionszeiten notwendig sei (90, 91). Es sollte daher

bei der Nutzung eines anderen Lösungsmittelgemisches die Reaktionszeit experimentell ermittelt werden (92, 93). Bei dem verwendeten Lösungsmittel war die Reaktion nach 25 Minuten abgeschlossen. Beide Verfahren (nach *Blois* und eigenes) ergaben vergleichbare Kalibriergeraden, weswegen mit der einfacheren und mit weniger Aufwand verbundenen Methode (Verdünnungsreihen, Gemisch aus DPPH und DPPH-H) weitergearbeitet wurde.

Gehaltsbestimmung von kristallinem DPPH: Die tatsächliche Stoffmenge an “nicht-reduzierter“ Festsubstanz von DPPH, wurde mit dem von *Yordanov* (66) ermittelten molaren Absorptionskoeffizienten berechnet. Damit war in der verwendeten Rohsubstanz 86 ± 2 % reines DPPH vorhanden. Diese Angabe wurde bei der Einwaage, für die Stammlösung einbezogen.

Nachweis und Bestimmungsgrenze: Die Nachweis- sowie die Bestimmungsgrenze wurden anhand der Leerwertmethode bestimmt. Damit ist bis zu einer Absorption von 0,085 (entspricht 0,002 mmol/l), DPPH bei diesem Verfahren noch nachweisbar und ab einer Absorption von 0,11 (entspricht 0,006 mmol/l) eine quantitative Bestimmung möglich.

Richtigkeit: Zur Bestimmung der Übereinstimmung zwischen dem ermittelten Wert und einem als richtig angesehenen Wert wurden an zehn Tagen jeweils 3 DPPH Standardlösungen (0,01875 mmol/l, 0,05 mmol/l, 0,08125 mmol/l) wie beschrieben quantifiziert. Alle Ergebnisse lagen unterhalb der vorgegebenen Abweichung von 15 % ($>0,05$ mmol/l), beziehungsweise 20 % ($< 0,05$ mmol/l) (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Konzentrationen der Standardlösung und deren prozentuale Abweichung von der errechneten (Geradenfunktion) als richtig angesehene Konzentration.

Konzentration (mmol/l)	Abweichung von theoretischer Konzentration
0,01825	2 %
0,05	3 %
0,08125	0,5 %

Präzision: Die Werte liegen unterhalb der vorgeschriebenen Abweichung, von nicht mehr als 15 %, im Bereich der höheren Konzentrationen, beziehungsweise 20 %, im Bereich der niedrigen Konzentrationen (s. Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Repräsentative Darstellung von niedrigen (0,0125; 0,0187), mittleren (0,0312; 0,0562) und hohen (0,075; 0,0937; 0,1) Konzentrationen samt mittlerer Standardabweichung, dem Variationskoeffizienten und dem Gesamtfehler (methodischer) nach McFarren (94) bei n = 39.

Theoretische Konzentration	Mittelwert (n = 39)	mittlere Standardabweichung	Variationskoeffizient	Gesamtfehler, nach McFarren (94)
0,0125	0,0124	0,0011	0,093	18 %
0,0187	0,0204	0,0007	0,037	17 %
0,0312	0,0344	0,0012	0,036	18 %
0,0562	0,0571	0,0026	0,047	11 %
0,075	0,749	0,003	0,04	8 %
0,0937	0,0928	0,0024	0,025	4 %
0,1	0,0996	0,0028	0,028	5 %

4.4.3 Reaktion der DPPH-Lösung in der Diffusionszelle

Wie schon in Kapitel 4.2.2 erwähnt, besteht die Reaktionslösung aus einem Wasser/Propylenglykol/Ethanol-Gemisch. Ausschlaggebend für diese Zusammensetzung war die Löslichkeit und Stabilität von DPPH und die Reaktion der Haut auf diese Flüssigkeiten. Für die Experimente in der Diffusionszelle wurde die Stammlösung zunächst mit demineralisiertem Wasser, Propylenglykol (PG) und Ethanol auf eine Konzentration von 0,1 mmol/l gebracht. Die Anteile der jeweiligen Komponenten für die verwendete Lösung wurden zunächst experimentell ermittelt.

In Tabelle 4.3 sind fünf Kombinationen der unterschiedlichen Komponenten aufgelistet. Kombination (I) und (II) sind zwar durch den geringen Wasseranteil sehr gut für die Löslichkeit von DPPH, der hohe Anteil an Propylenglykol hatte jedoch negative Eigenschaften für die Haut. Der hygroskopische Charakter von PG verursachte ein Ablösen der Hornschicht, sodass sich ein Zwischenraum bildet. Dort sammelte sich DPPH-

Lösung (Blasenbildung) und verfälschte damit das Ergebnis. Eine Erhöhung der Ethanolmenge bei gleichzeitiger Erniedrigung von PG war aufgrund der denkbaren Denaturierung von Enzymen auch nicht möglich. Deshalb wurde zunächst versucht mit einem höheren Wasseranteil zu arbeiten (Kombination III und IV), was sich als ungünstig herausstellte, da im Laufe des Versuchs DPPH ausfiel und somit die Absorption zu niedrig war. Mit Mischung (V) gelang es optimale Lösungseigenschaften und für die Haut eine rein organoleptisch gute Verträglichkeit zu erreichen. Dies wurde bei einem Langzeitversuch, bei dem die Haut 12 Stunden in der Diffusionzelle eingespannt blieb, überprüft (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4.3: Mischung (I) und (II), verursachen ein Ablösen des Stratum Corneum nach kurzer Zeit, Flüssigkeit sammelte sich zwischen Hornschicht und Epidermis. Lösung (III) und (IV) nach kurzer Zeit fiel DPPH aus. Kombination (V), optimale Eigenschaften in Bezug auf Löslichkeit und Hautverträglichkeit.

	Stammlösung	Propylenglykol	Ethanol	Wasser
I)	1 T	5 T	4 T	-
II)	1 T	4 T	4 T	1 T
III)	1 T	3 T	1 T	5 T
IV)	1 T	4 T	-	6 T
V)	1 T	4 T	2 T	4 T

Im Laufe des Entwicklungsprozesses kam es zu einer Erhöhung des pH-Wertes in der Donor-Zelle und dadurch zu einer zunächst ungewöhnlichen Verschiebung des Absorptionsmaximums. Beides konnte durch den Einsatz eines Phosphatpuffers (pH = 5,4) statt demineralisiertem Wasser in der Donor-Zelle verhindert werden. Der Grund für die Alkalisierung in der Donor-Zelle konnte nicht abschließend geklärt werden. Da die Reaktion von DPPH zu DPPH-H ein Proton (H⁺) benötigt (s. Gleichung 1), wird vermutet, dass es damit zu einer Erhöhung der Hydroxid-Konzentration kam, die eine Zunahme des pH-Wertes erklären könnte.

Die DPPH-Lösung wurde daraufhin auf das Verhalten in alkalischem und saurem Milieu untersucht. Wie schon in der Originalmethode von *Blois* (85) beschrieben, zeigte sich im

sauren Medium keine Veränderung im Spektrum, anders dagegen im alkalischen. Nach Zugabe von Natronlauge entfärbte sich die Lösung nach wenigen Sekunden von tief violett nach braun-orange. Dieselbe Reaktion war auch mit Diphenylpicrylhydrazin mit Natronlauge zu beobachten. Auch die Spektren der beiden Endprodukte waren deckungsgleich (Abbildung 4.5), sodass die Vermutung nahe liegt, dass bei beiden Reaktionen dasselbe Produkt entsteht.

Weiterführende Untersuchungen über den genauen Mechanismus dieser Reaktionen wurden jedoch nicht angestellt, stattdessen wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 5,4 eingestellt. Dieser Wert hatte sich als geeignetster Kompromiss herausgestellt, da er eine optimale Stabilität für das Radikal bot und die Hautoberfläche nicht zu sehr reizte.

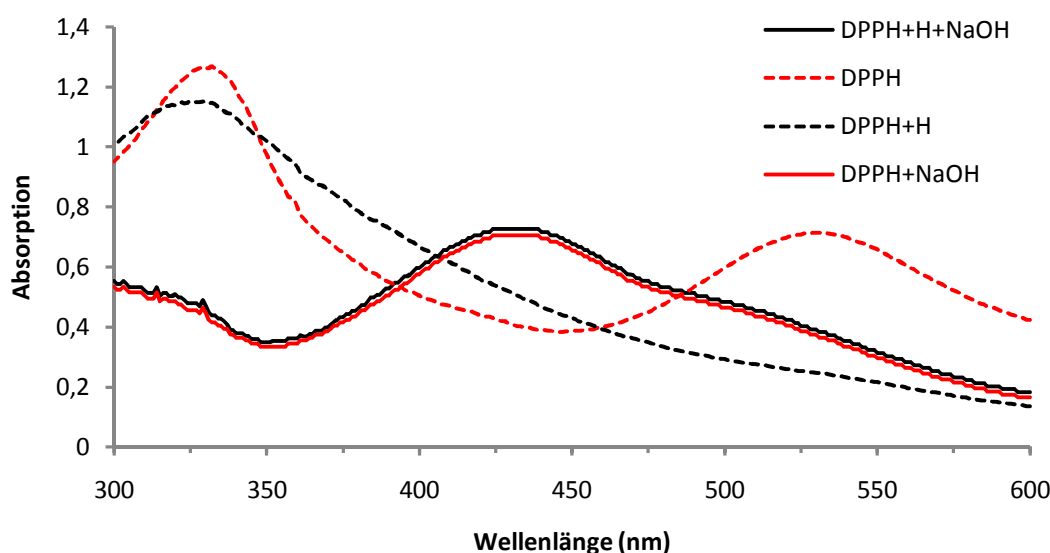
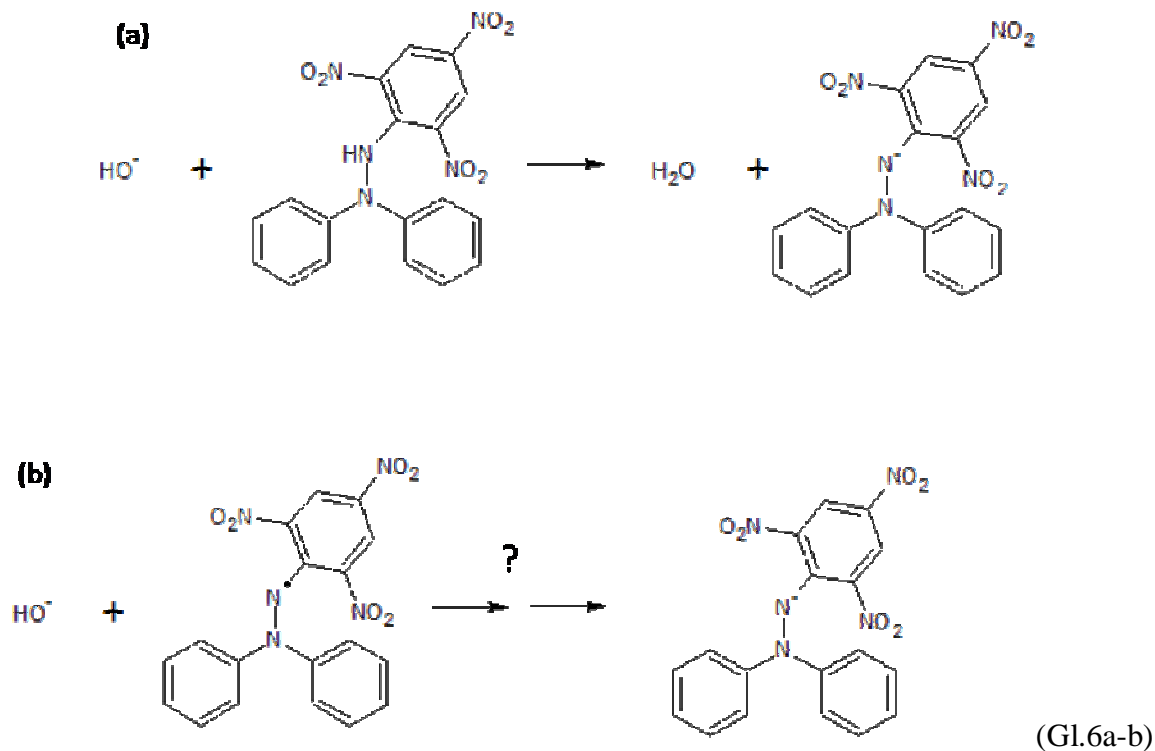


Abbildung 4.5: Rote Linie, Spektrum nach Reaktion von Diphenylpicrylhydrazyl mit NaOH; schwarze Linie, Spektrum nach Reaktion von Diphenylpicrylhydrazin mit NaOH. Zum Vergleich die Spektren von DPPH (rot gestrichelt) und DPPH+H (schwarz gestrichelt).

Aufgrund der Acidität des Stickstoffatoms an Position eins, handelt es sich bei dem entstehenden Produkt höchstwahrscheinlich, um das deprotonierte Diphenylpicrylhydrazin.

Die Reaktion zwischen dem Hydrazin und der Natronlauge ist eine einfache Säure-Base-Reaktion (Gleichung 6a). Der Reaktionsmechanismus des Radikals mit der Lauge zum deprotonierten Produkt, ist allerdings noch nicht geklärt (Gleichung 6b).



Die Instabilität von Diphenylpicrylhydrazyl in alkalischem Medium ist schon lange bekannt (85), allerdings ist nicht dokumentiert wie der genaue Mechanismus dieser Reaktion verläuft. Eine Hydroxilierung, am Picryl-Rest, wie manche Autoren behaupten (137), scheidet im vorliegenden Fall aus, da die UV-Spektren nicht übereinstimmen. Eine genauere Analyse der Zwischenprodukte wäre notwendig um eine konkrete Aussage zu treffen. Der Nutzen für vorliegende Arbeit ist aber zweitrangig, weshalb darauf verzichtet wurde.

4.4.4 Eindringtiefenbestimmung von DPPH mit ESI-TOF-MS und Dickenbestimmung

Die Bestimmung der Eindringtiefe ist insofern wichtig, da dadurch eine Aussage getroffen werden kann, in welcher Hautschicht die Reaktion mit dem DPPH hauptsächlich stattgefunden hat. In Kombination mit der mikroskopischen Dickenbestimmung der Hautschnitte konnte damit, auf eine direkte Lokalisation des Radikals geschlossen werden.

4.4.4.1 Mikroskopische Dickenbestimmung

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten eine sehr homogene Dicken-Verteilung (s. Abbildung 4.6).

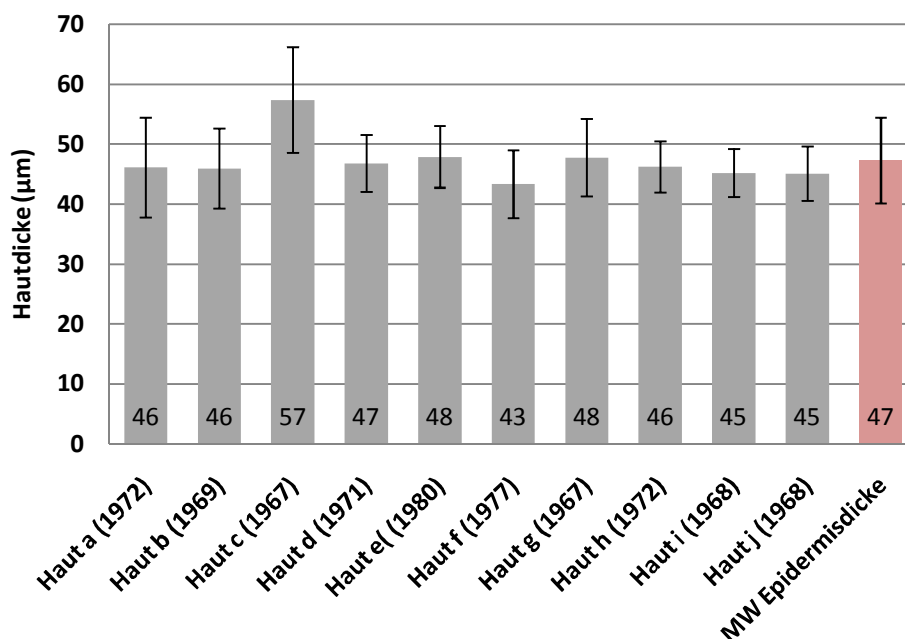


Abbildung 4.6: Epidermisdicke von zehn Spendern, Mittelwert und Standardabweichung bei n=9, rot Mittelwert aller zehn Spenderhäute und Standardabweichung, Geburtsjahr: 1967 bis 1980

Da alle untersuchten Hautproben aus der Bauchregion stammten, war dieses Ergebnis zu erwarten, da Haut aus diesem Areal nicht ständiger Beanspruchung wie zum Beispiel starker Sonnenexposition ausgesetzt ist. Das macht Bauchhaut zum idealen Untersuchungsmaterial wenn, wie in diesem Fall, Penetrationsuntersuchungen vorgenommen werden sollen. Zu beachten ist dabei allerdings das Bauchhaut häufiger Dehnungstreifen aufweisen als andere Hautbereiche.

Diese wurden dann, wenn vorhanden großzügig ausgespart und nicht verwendet. Dickenmessungen an solchen Stellen ergaben, dass die Epidermis dort bis zu 50 % dünner ist (Daten nicht gezeigt), was dann zu nicht vergleichbaren Messergebnissen führt.

4.4.4.2 Bestimmung der Eindringtiefe von DPPH mit ESI-TOF-MS

Wie in Kapitel 4.2.4 schon erwähnt, wurde zur Bestimmung der Eindringtiefe von DPPH, die Haut nachträglich mit einem Kryotom horizontal abgetragen. Die Haut wurde in 5 µm-Schritten, beginnend mit der Hautoberseite, bis in eine Tiefe von 100 µm geschnitten. Die Schnitte wurden dann anschließend mit Chloroform mehrmals extrahiert. Der Extrakt wurde danach zur Trockne eingeengt und mit einer definierten Menge Chloroform wieder aufgelöst. Zunächst wurde versucht das Diphenylpicrylhydrazin mittels UV-VIS Spektrometrie zu erfassen, allerdings war die Konzentration offenbar so gering, dass weder eine quantitative noch eine qualitative Auswertung möglich war. Durch das Vorschalten einer chromatografischen Methode, beispielsweise einer HPLC, wäre eine Erhöhung der Sensitivität sicherlich möglich. Jedoch würde der Aufwand eine neue Analytik für DPPH-H zu etablieren den Rahmen dieser Arbeit sprengen, sollte aber Bestandteil weiterer Untersuchungen sein.

Es war also eine Methode notwendig die sensitiv genug war um auch geringste Mengen an Diphenylpicrylhydrazin qualitativ zu detektieren.

Mit der Massenspektrometrie ist es möglich, auch geringste Spuren einer Substanz zu erfassen. Um DPPH-H zu detektieren, wurde mit einer ESI-TOF-MS Anlage gearbeitet, da es bei der Elektrospray-Ionisation im Normalfall zu keiner Fragmentierung der Moleküle

kommt. Nach Auswertung der Massenspektren ergab sich eine nachweisbare Tiefe von 50 μm . Danach konnte keine eindeutige Aussage mehr getroffen werden. Es wurden insgesamt drei Extrakt-Reihen, mit Haut von drei unterschiedlichen Spendern hergestellt. Bei einem Hautextrakt war der Masse-Peak von DPPH-H, noch bis zu einer Schnitttiefe von 60 μm zu finden in den anderen zwei nicht mehr.

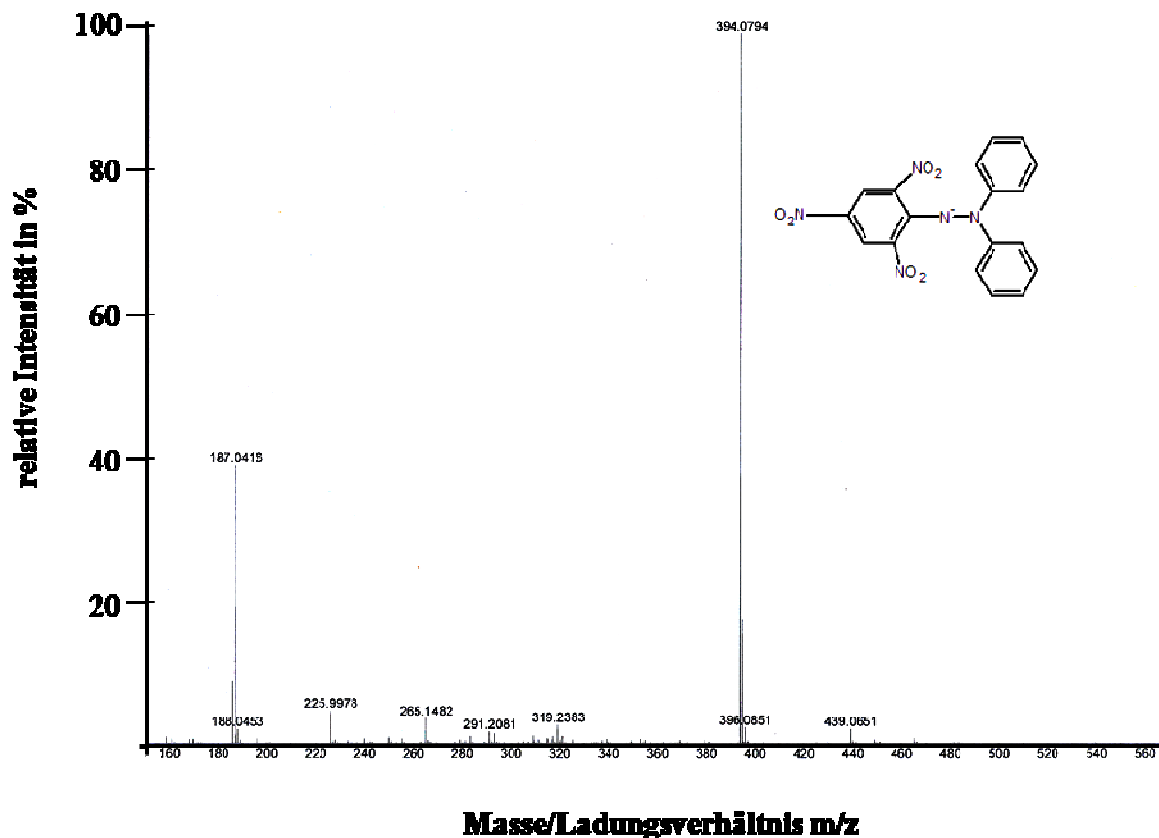


Abbildung 4.7: Massenspektrum eines Haut-Extrakts aus 10 μm Schnitttiefe. Zu sehen ist der Peak für das Molekülanion ($m/z = 394$) des deprotonierten Diphenylpicrylhydrazin (Strukturformel im Diagramm dargestellt).

Wenn man nun diese Daten mit der mikroskopischen Dickenbestimmung kombiniert, erhält man ein Verteilungsmuster von DPPH-H in der Haut. Der größte Anteil ist demnach in der Epidermis zu finden und dort wiederum in der Hornschicht. Diese bedingt quantitative

Aussage stützt sich auf den mikroskopischen Auswertungen (4.3.4.1). Dabei wurde der Masse-Peak mit zunehmender Eindringtiefe immer kleiner. Daraus wurde auf eine geringere Konzentration von DPPH-H in diesen Hautschnitten gefolgert.

Ob DPPH auch bis zur Dermis diffundierte, konnte aufgrund der Datenlage nicht eindeutig geklärt werden. Der anatomische Aufbau der Haut (s. Kapitel 2), mit ihrer papillenartigen Struktur, lässt eine genaue Lokalisation einer Substanz nach dieser Methode nicht zu. Epidermis-Gewebe ragt teilweise tief in die Dermis hinein. Durch die horizontale Schnittweise erfasst man damit auch Mischgewebe (Epidermis und Dermis). Vermutlich wird eine geringe Menge auch in die Dermis diffundieren, allerdings dürfte der Diffusionsdruck von DPPH in Richtung Dermis durch deren höhere Polarität (52) sehr klein sein. Hinzukommt die ständige Versorgung der Dermis mit dem wässrigen Nährmedium aus der Akzeptor-Zelle, was die Diffusion von dem im Wasser unlöslichem DPPH in diesen Bereich noch zusätzlich erschwert.

4.4.5 Temperaturabhängige Reduktion von DPPH

Die Geschwindigkeit mit der die Reduktion voranschreitet kann durch mehrere Faktoren erhöht oder erniedrigt werden. Aus Voruntersuchungen war bekannt, dass die Temperatur einen erheblichen Einfluss auf die Reduktion von DPPH hatte (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde eine neue Versuchsreihe angesetzt um diesen Einfluss zu dokumentieren. Dabei wurde in eine Diffusionszelle statt eine Hautstanze eine, gegenüber dem Lösungsmittel und dem DPPH unempfindliche, Kunststoffolie eingespannt. Mit dieser Maßnahme war es möglich die milieubedingte Reduktion und damit die Abnahme der Extinktion von DPPH von der Reaktion mit der Haut zu differenzieren. In Abbildung 4.8 ist das Ergebnis dieser Versuchsreihe dargestellt.

Es war deutlich eine größere Abnahme des Absorptionswertes mit erhöhter Temperatur zu beobachten. Eine weitere Senkung der Temperatur brachte keinen nennenswerten Effekt auf die Reduktionsrate von DPPH.

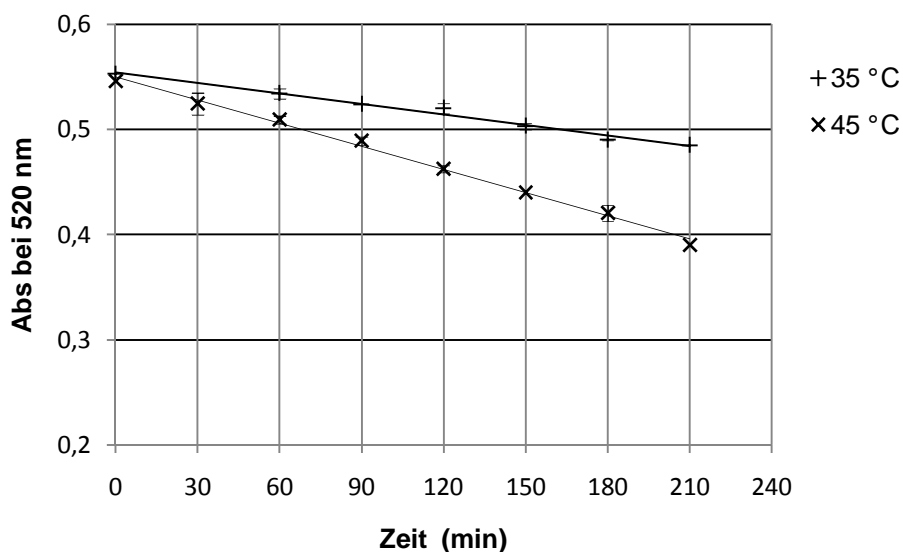


Abbildung 4.8: Temperaturabhängige Abnahme der Absorption der DPPH-Lösung bei 520 nm in der Donor-Zelle über die Zeit. Bei 35 °C sinkt diese um 12 Prozent (n = 3,) und um 29 Prozent bei 45 °C (n = 3,).

Für die darauffolgenden Messungen wurde eine Temperatur von 35 °C gewählt.

4.4.6 Ermittlung der optimalen Reaktionszeit

Für die Bestimmung der optimalen Reaktionszeit wurde der Ablauf mehrerer Experimente zusammengefasst und ist exemplarisch in Abbildung 4.9 dargestellt.

Der Kurvenverlauf zeigte eindeutig einen dreiphasigen Vorgang. Zunächst fiel die DPPH-Konzentration, im Gegensatz zum Kontrollwert, steil ab (Phase I in Abb. 4.9). Abhängig von der Hautprobe verlief Phase I über einen Zeitraum von 30 bis 60 Minuten. Danach sank die DPPH-Konzentration zwar weiterhin, nahm aber einen flacheren Verlauf an (Phase II in Abb. 4.9), der bis zu einer Versuchsdauer von 180 Minuten anhielt. Nach maximal 200 Minuten ging die Kurve in einen linearen Verlauf über, die sich, von der Steigung her, kaum noch von der Kontrollkurve unterschied (Phase 3 Abbildung 4.9). Bei dem Großteil der Hautproben war die dritte Phase schon nach drei Stunden erreicht,

weshalb dieser Zeitpunkt für die weiteren Versuche als Endpunkt der Reaktion festgelegt wurde.

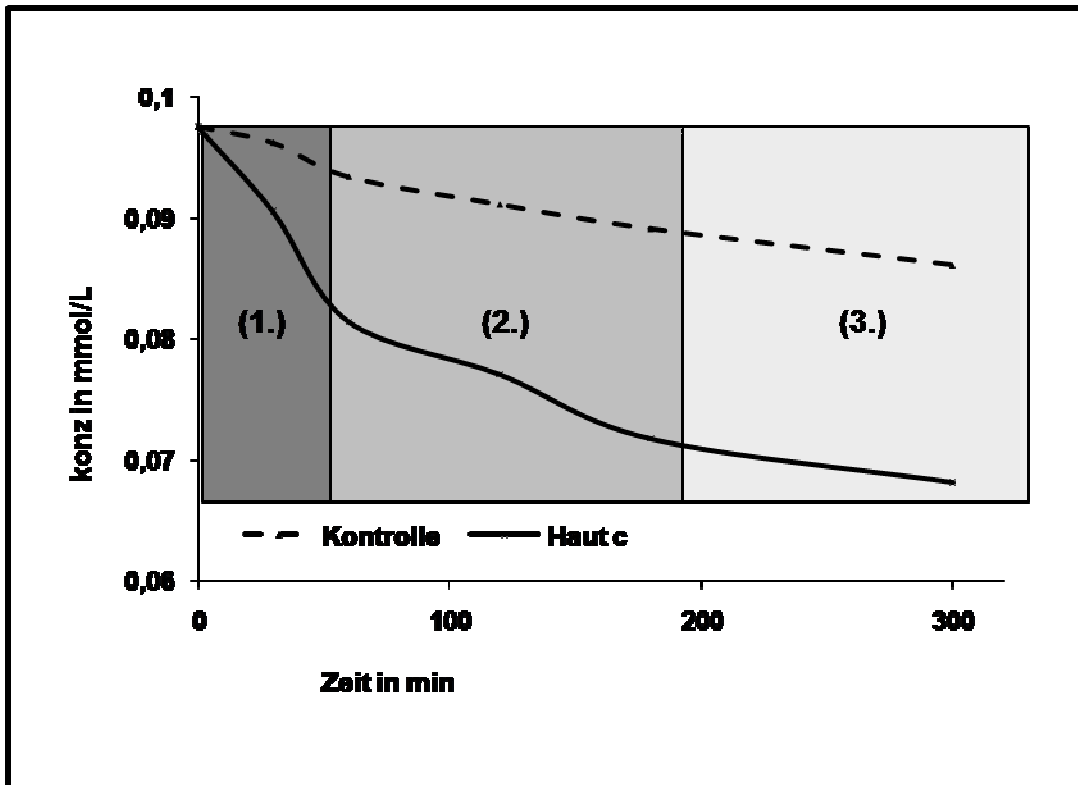


Abbildung 4.9: Exemplarischer Kurvenverlauf der Reaktion in der Diffusionzelle; Reaktion von DPPH mit einer Hautstanze (durchgezogene Linie, Haut c), Reaktion von DPPH Lösung mit einer inerten Kunststoffolie (gestrichelte Linie, Kontrolle) 1. Phase: starkes Absinken der DPPH-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle Beginn der Reaktion zwischen Haut und DPPH; 2. Phase: Reaktion zwischen der Haut und dem DPPH; 3. Phase: Reaktion zwischen Haut und DPPH beendet → annähernd gleiche Steigung zwischen Haut-und Kontrollkurve.

Da es das eigentliche Ziel dieses Verfahrens war, behandelte Haut direkt mit unbehandelter zu vergleichen und eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität der Haut zu zeigen, wurde diese Tatsache in Kauf genommen, dass in manchen Proben der Endpunkt noch nicht erreicht war.

Die ermittelten Versuchsbedingungen aus vorigen Kapiteln wurden für alle nachfolgenden Experimente übernommen:

- Stammlösung maximal fünf Tage verwendbar
- DPPH-Stammlösung: 1 mmol/l, 9 Teile PG, 1 Teil Ethanol
- Lösungsmittelgemisch in der Donor-Zelle: 1 Teil Stammlösung, 4 Teile PG, 2 Teile Ethanol, 4 Teile Wasser (gepuffert: 5,4)
- Temperatur: 35 °C
- Dauer des Experiments: 180 Minuten
- Quantifizierung: Geradenfunktion über Verdünnungsreihen

4.5 Beschreibung der Vorgänge bei der Reaktion der Haut und dem DPPH während eines Experiments

Bevor das entwickelte Verfahren eingesetzt werden konnte, musste noch eine essentielle methodische Frage geklärt werden: der Grund für die sinkende DPPH-Konzentration in der Donor-Zelle während eines Experiments.

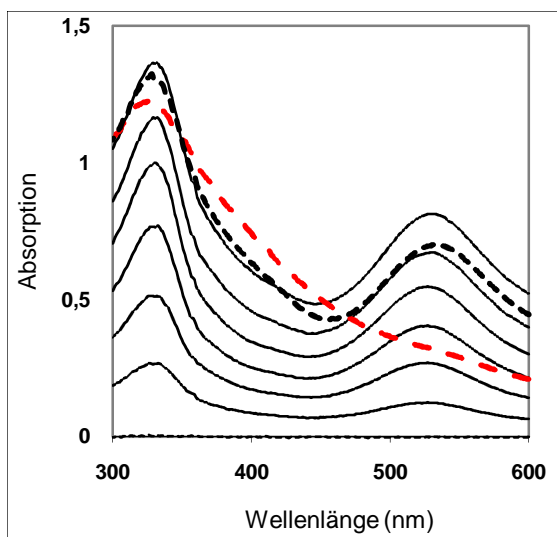
4.5.1 Hypothese zur sinkenden DPPH-Konzentration in der Donor-Zelle

Die sinkende Konzentration an DPPH in der Donor-Zelle während des Experiments, lässt zwei Interpretationen zu:

1. Diphenylpicrylhydrazyl diffundiert aus der Donor-Zelle in die Haut und verbleibt dort.
2. DPPH diffundiert aus der Donor-Zelle in die Haut, wird reduziert und das entstehende korrespondierende Diphenylpicrylhydrazin diffundiert in die Donor-Zelle.

Beide Vorgänge würden eine sinkende DPPH-Konzentration in der Donor-Zelle im Laufe des Experiments erklären. Ersteres würde bedeuten, dass das Absinken der DPPH-Konzentration nicht mit der antioxidativen Kapazität der Haut gleichgestellt werden kann. Demnach würde die Abnahme der Absorption der DPPH-Lösung nur durch eine Diffusion von DPPH aus der Lösung in die Haut resultieren. Das Verfahren wäre somit nicht geeignet die antioxidative Kapazität zu bestimmen. Anders würde es sich bei dem zweiten hypothetischen Verlauf verhalten. Das in die Haut diffundierende DPPH, würde nachdem es dort zu dem korrespondierenden Hydrazin reduziert wurde, in die Donor-Zelle diffundieren.

(a)



(b)

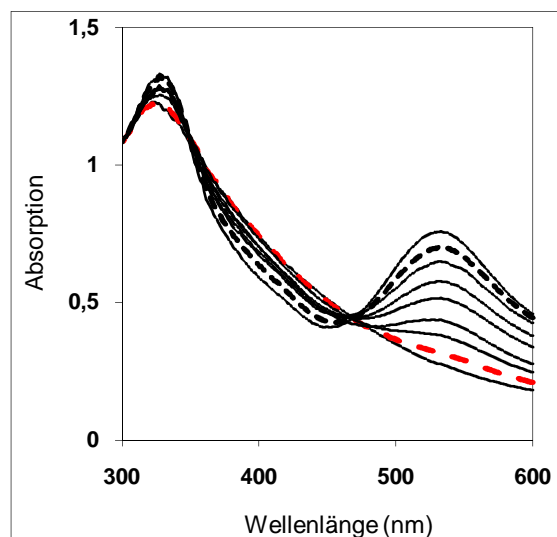


Abbildung 4.10: Das linke Diagramm zeigt eine Verdünnungsreihe von stetig abnehmender DPPH-Konzentration. Das rechte Diagramm zeigt eine Verdünnungsreihe mit stetig abnehmender DPPH-Konzentration und gleichzeitig steigender DPPH-H-Konzentration. In beide Diagramme sind jeweils zwei Spektren integriert (gestrichelt), die während eines Experiments aufgenommen wurden; eine (gestrichelt schwarz) und sechs (gestrichelt rot) Stunden nach Beginn des Experiments.

Um eine der Beiden Hypothesen zu bestätigen, wurde die Zusammensetzung der Lösung in der Donor-Zelle untersucht. Dafür wurden Proben zu unterschiedlichen Zeiten aus der Donor-Zelle entnommen und photometrisch vermessen. Zusätzlich wurden zwei

unterschiedliche Verdünnungsreihen vermessen. Eine (a) mit stetig steigender Konzentration an DPPH und die andere (b) mit einem Gemisch aus steigender Konzentration an DPPH und gleichzeitig sinkender Konzentration an DPPH-H. In Abbildung 4.10 ist das Ergebnis dieses Experiments dargestellt. Auffällig ist beim Verlauf der Spektren von (b), dass es zwei Schnittpunkte zwischen den Kurven gab, die in (a) nicht vorkamen.

Die während eines Experiments aufgenommenen Spektren aus den Donor-Zellen wurden nachträglich in die Diagramme eingefügt und analysiert (s. Abbildung 4.10). Dieses Experiment wurde insgesamt fünfmal innerhalb von zwei Jahren wiederholt. Das Resultat entsprach jedes Mal den in Abbildung 4.10 dargestellten Ergebnissen. Es war deutlich zu erkennen, dass es sich bei dem, aus der Donor-Zelle entnommenen Proben um Gemische aus DPPH und DPPH-H handelte.

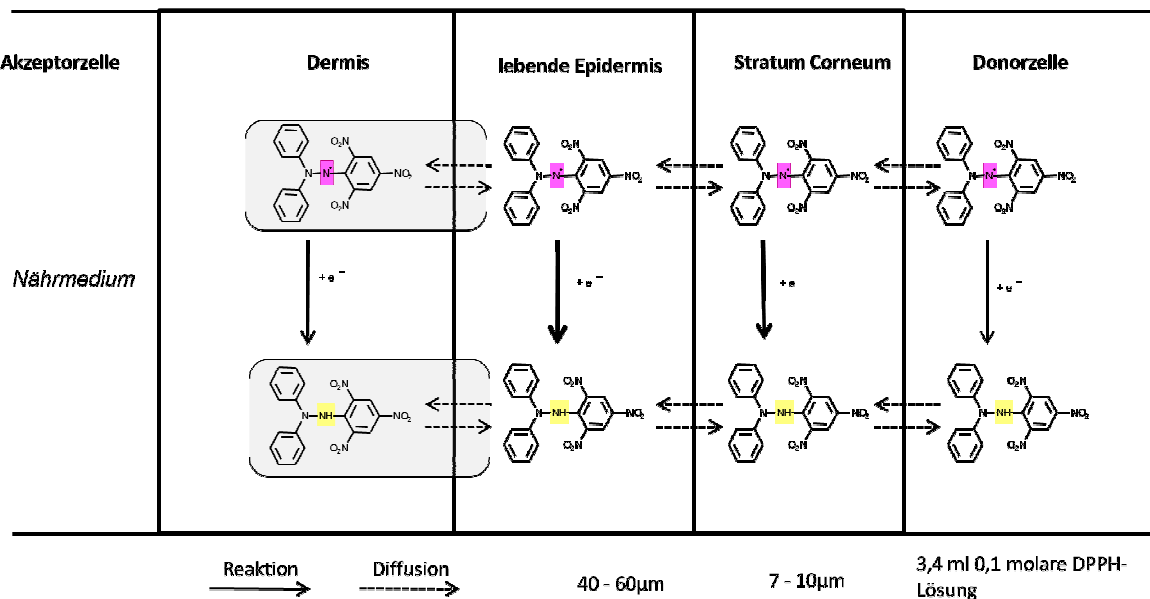


Abbildung 4.11: Angenommener Ablauf einer Reaktion (schematisch dargestellt). In jeder Hautschicht und in der Donor-Zelle wird DPPH zu DPPH-H reduziert. Das Ausmaß der Reaktion wird durch die Stärke der Reaktionspfeile wiedergegeben. In Klammern dargestellt, die geringe Diffusion in die Dermis.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, dass es zu Beginn eines Experiments zu einer Diffusion von Diphenylpicrylhydrazyl in die oberen Hautschichten kommt, dort von den antioxidativen Systemen der Haut zu Diphenylpicrylhydrazin reduziert wurde und in die Donor-Zelle diffundiert. In Abbildung 4.11 ist der Ablauf schematisch dargestellt.

Damit wurde gezeigt, dass das Verfahren für die Quantifizierung der antioxidativen Kapazität der Epidermis von exzidiierter Humanhaut, geeignet ist.

4.6 Ergebnisse zur antioxidativen Kapazität von exzidiierter Humanhaut an dem neu etablierten Verfahren

Zunächst sollte geklärt werden wie groß die Schwankungen innerhalb einer Spenderhaut sind bezogen auf die Reduktion von DPPH. Es sollte auch untersucht werden, inwiefern das Alter der Haut bzw. des Spenders einen Einfluss auf die antioxidative Kapazität besitzt. Hierfür wurden zahlreiche Hautproben unterschiedlicher Spender untersucht.

4.6.1 Intraindividuelle Schwankungen einer Spenderhaut

Haut ist, auch wenn sie vom gleichen Spender stammt, unterschiedlich beschaffen. Vor allem die Hornhaut kann in der Dicke stark variieren. Aus diesem Grund wurde nur Bauchhaut verwendet. Allerdings kann es auch hier, durch unterschiedliche Beanspruchung der Bauchpartie zu abweichenden Hautdicken kommen. Grund dafür sind Dehnungsstreifen, Narbengewebe oder frühere unterschiedlich starke Sonnenexposition.

Als äußere Barriere ist das Stratum corneum hauptsächlich für das Eindringen von Fremdstoffen, in diesem Fall gelöstem DPPH verantwortlich. Deshalb ist es von großer Bedeutung, dass diese Schicht annähernd homogen ist, um große Schwankungen zu vermeiden. Für diese Untersuchungen wurde die Spenderhaut an unterschiedlichen Stellen ausgestanzt. Außerdem wurde auf eine optisch gleichbleibende Hautstruktur geachtet (Aussparung von z. B. Narbengewebe und Muttermale). Als Kontrolle wurde eine

Kunststofffolie zwischen die Diffusionszellen gespannt, um die milieubedingte Reduktion darzustellen.

Die Experimente mit unbehandelten Hautstanzen zeigten trotz Entnahme an unterschiedlichen Stellen einen sehr ähnlichen Verlauf (4.12). Bei zunehmender Lagerungsdauer zeigte sich jedoch ein immer kleiner werdendes Reduktionsvermögen gegenüber dem DPPH (Daten nicht gezeigt).

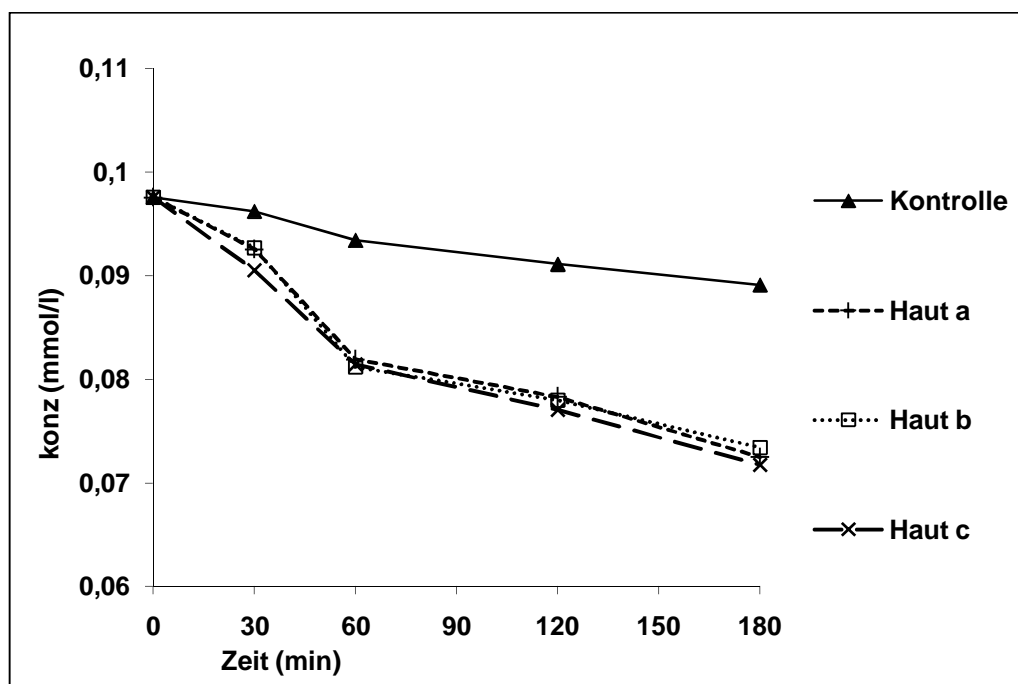


Abb. 4.12: Verlauf der DPPH-Konzentration über den Zeitraum von drei Stunden. Kontrollkurve (Kontrolle: Reaktion des DPPH-Radikals ohne Haut) zeigt einen annähernd linearen Abfall. Nach drei Stunden ist die Reaktion mit der Haut offensichtlich beendet, es ist nur noch die milieubedingte Reduktion von DPPH zu beobachten. Haut (a) bis (c) sind Hautstanzen des selben Spenders (♀, Bauch, Geb. Jahr 1967, Hauttyp: 3). Kontrolle: n = 3, Haut (a)-(c): n = 1

Es ist sehr wahrscheinlich, dass in der Haut befindliche antioxidative Enzyme und nichtenzymatische Antioxidantien mit der Zeit weniger werden oder im Fall der Enzyme

ihre Funktion verlieren. *Wester et al.* (71) haben anhand anaerober Metabolisierung von Glucose zu Laktose die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) und damit die Viabilität von exzidiierter Humanhaut bestimmt. Während der ersten 18 Stunden war die Metabolisierungsrate am höchsten und fiel an Tag zwei um das Dreifache ab. Danach blieb die Rate aber bis zum achten Tag konstant, um danach drastisch abzusinken. Bei *Messenger et al.* (97) beispielsweise zeigt zuvor eingefrorene Haut nach dem Auftauen die größte Viabilität gemessen an der LDH-Aktivität. Trotz dieser Daten wurde in dieser Arbeit die Haut maximal bis zum vierten Tag nach der chirurgischen Entnahme verwendet. Als Grund für diese kürzere Verwendung der Haut wurde die Tatsache hinzugezogen, dass die LDH zwar etwas über die enzymatische Aktivität der Zelle aussagt jedoch nicht über deren antioxidativen Status. Aber gerade an dieser Information über die Haut liegt das Hauptanliegen dieses Verfahrens, weswegen eine lange Lagerung nicht in Betracht kam.

4.6.2 Interindividuelle Schwankungen der Spenderhaut

Nachdem gezeigt wurde, dass Proben vom gleichen Spender keinen größeren Schwankungen unterliegen, wurden nun Hautproben von verschiedenen Spendern miteinander verglichen. Dabei zeigten sich erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Hautproben in Bezug auf ihre Fähigkeit DPPH zu reduzieren. Das Alter der Spender hatte offensichtlich keinen erkennbaren Einfluss, allerdings war der Probenumfang nicht groß genug, um eine endgültige Aussage zu treffen (Abbildung 4.13).

Für diese Abweichungen kann es verschiedene Gründe geben. Die Reaktion zwischen den antioxidativen Systemen der Haut und dem DPPH kann, wie schon erwähnt nur stattfinden, wenn ein direkter Kontakt besteht. Es konnte schon gezeigt werden, dass DPPH in die oberen Hautschichten eindringt und damit in Berührung mit diesen Systemen kommt. Die Zeit, die dieser Vorgang benötigt wurde jedoch noch nicht näher berücksichtigt. Die Versuche wurden nach drei Stunden beendet, da aufgrund des Kurvenverlaufs davon ausgegangen wurde, dass die sinkende DPPH-Konzentration nur noch aus der milieubedingte Reduktion resultierte (siehe dazu Abbildung 4.12). Wie schon angeführt wies, bei einigen der verwendeten Hautproben der Verlauf der Kurve jedoch auf eine noch nicht beendete Reaktion hin. Die Diffusionsgeschwindigkeit von gelöstem DPPH in die

Haut hängt maßgeblich von der Dicke des Stratum Corneum ab und diese variiert natürlich von Mensch zu Mensch. Die Dicke der Hornschicht wurde zwar von mehreren Hautproben mikroskopisch bestimmt, allerdings nicht von allen hier dargestellten Spendern. Die Hornschicht der untersuchten Proben hatte eine Spanne von sechs bis zehn Mikrometern, was im Extremfall zu unterschiedlichen Penetrationsgeschwindigkeiten führen kann und damit zu einer Verschiebung des Reaktionsverlaufs.

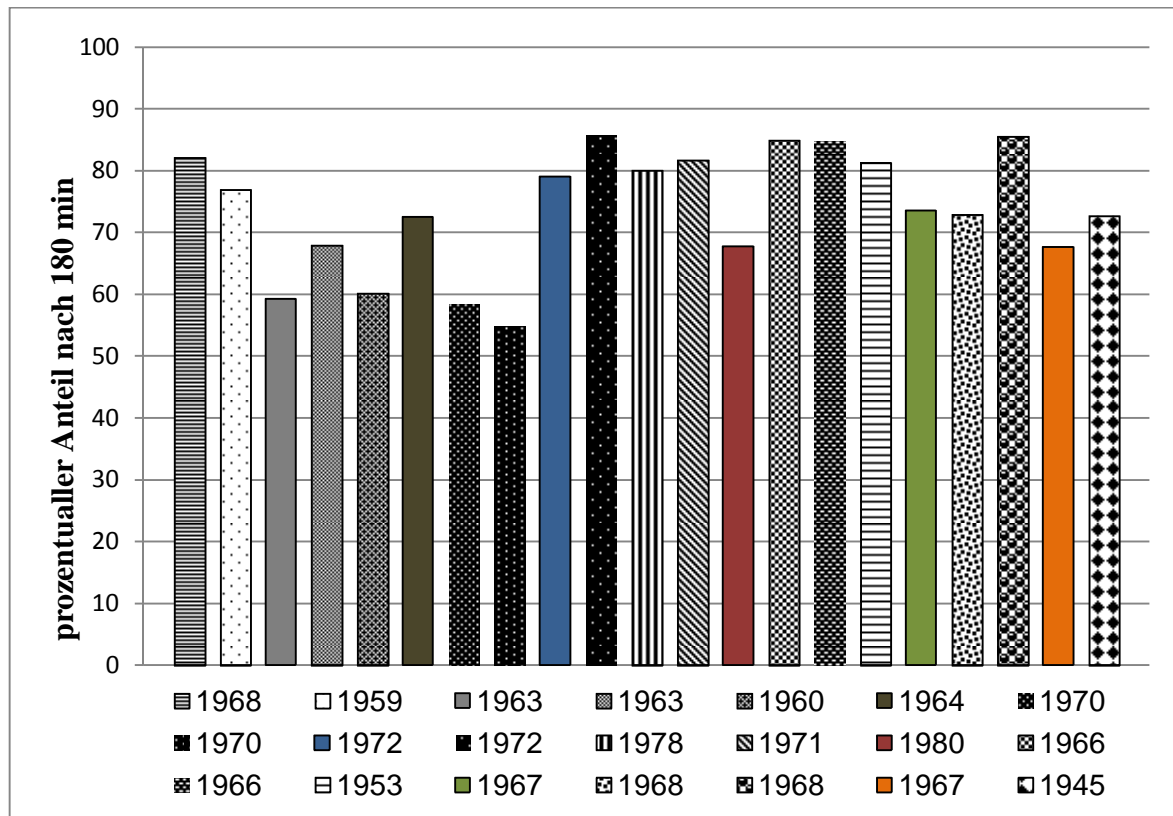


Abbildung 4.13: Das Diagramm zeigt jeweils den prozentualen Anteil an nichtreduziertem DPPH, nachdem die Hautstanzen drei Stunden in der Diffusionszelle eingespannt waren. Unter der Abszisse das jeweilige Geburtsjahr des Spenders; Median von n = 3-4 Einzelwerten

Es wurde eine Versuchsdauer von drei Stunden festgelegt, da es für die meisten Proben zutraf, dass die Reduktion von DPPH durch die antioxidativen Systeme der Haut beendet war. Außerdem brachte eine Verlängerung des Versuchs keinen Vorteil für das eigentliche

Ziel des Verfahrens, der Untersuchung von Antioxidantien auf die antioxidative Kapazität von Haut.

Ein weiterer Grund für die interindividuellen Schwankungen war, das unterschiedliche Alter der Hautproben. In Voruntersuchungen wurde festgestellt (Daten nicht gezeigt), dass die Haut nach zunehmender Lagerungsdauer die Fähigkeit einbüßte DPPH zu reduzieren. Deshalb wurde die Haut nur am zweiten, dritten und vierten Tag nach der Entnahme für die Experimente verwendet. Aber auch in dieser kurzen Zeitspanne war ein sinkendes Reduktionsvermögen zu verzeichnen. Schließlich ist natürlich die individuelle Variabilität der Spender zu nennen, von denen nur Geschlecht, Alter und der Hauttyp bekannt war, Krankheiten, Ernährung und sonstige Informationen wie Zigaretten- oder Alkoholkonsum, die den antioxidativen Status eines Organismus beeinflussen können (98), waren dagegen unbekannt und sind sicherlich auch an den unterschiedlichen Verläufen beteiligt.

4.6.3 Hemmung reduzierender Enzyme durch SH-Reagenzien

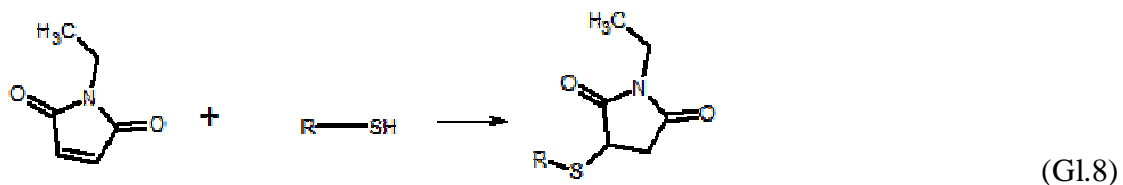
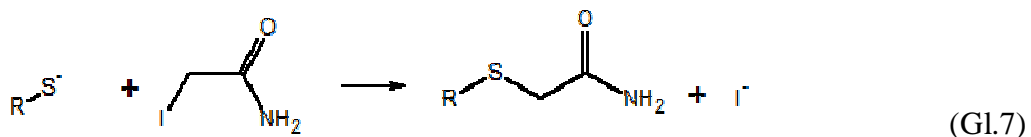
Die Haut verfügt, wie schon in anderen Kapiteln beschrieben, über ein ganzes Arsenal an reduzierenden Systemen mit unterschiedlichen Mechanismen. Einen großen Anteil an der Reduktion von ROS (99) haben thiolgruppenhaltige Enzyme, die sich mit SH-Reagenzien blockieren lassen. Dabei gehen die Thiolgruppen dieser Enzyme eine kovalente Bindung mit diesen Reagenzien ein. Da die Schwefelwasserstoff-Gruppe sehr stark an Redoxreaktionen beteiligt ist, ist es sinnvoll diese zu blockieren, um ihrerseits eine Beteiligung dieser Mechanismen bei diesem Verfahren zu zeigen. Dieselben Reagenzien wurden auch erfolgreich bei den ESR-Untersuchungen verwendet, um eine höhere Lebensdauer der Spinsonden in der Haut zu erzielen (100).

Als ein sehr häufig verwendetes und effektives SH-Reagenz wird N-Ethylmaleinimid (NEM) beschrieben (101). Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit, kann NEM bei der Inkubation der exzidierten Haut ins Nährmedium gegeben werden und gewährleistet damit eine optimale Verteilung über die ganze Haut, ohne die Hautoberfläche in irgendeiner Weise zu beeinträchtigen. Die Penetrationseigenschaften der Mikroemulsion wurden nicht beeinflusst, was noch gezeigt werden konnte. Dieser Umstand ist zwar bei diesem

Verfahren und bei diesem Experiment nicht von großer Relevanz, war aber insbesondere für die späteren ESR-Untersuchungen von einiger Bedeutung.

Allerdings zeigte sich im Laufe der ESR-Experimente, dass die mit NEM-behandelten Hautproben, aus noch nicht geklärten Ursachen, größere Schwankungen zeigten. Die festgestellten Schwankungen könnten damit in Zusammenhang gebracht werden, dass sich bei NEM-behandelten Proben das Stratum corneum von der Epidermis löste. Aus diesem Grund wurde für diese Untersuchungen ein anderes SH-Reagenz eingesetzt

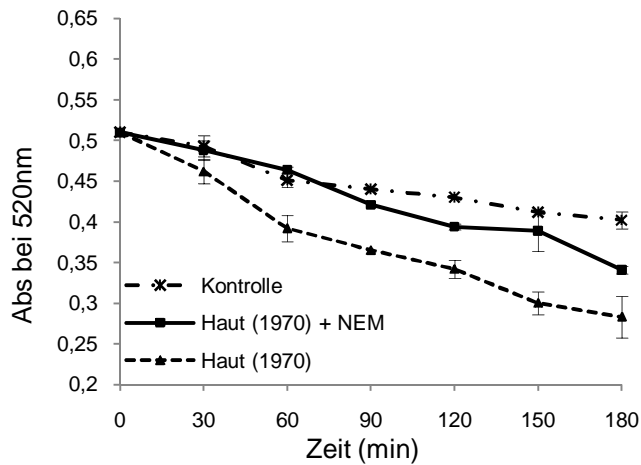
Ein weiterer eingesetzter Thiolgruppen-Hemmstoff ist Iodacetamid, der genau wie NEM, mit Schwefelwasserstoff-Gruppen eine kovalente Bindung eingeht (Gleichung 7 und 8) und auch wie NEM wasserlöslich ist.



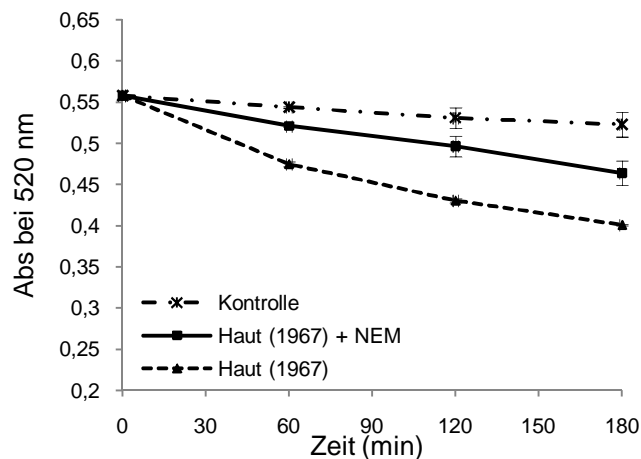
Beide Reagenzien sind keine spezifischen Enzymhemmer, sie blockieren lediglich die Thiolgruppen in Aminosäuren und Peptiden. Zum einen wird durch die Blockade des Schwefels die reduzierende Gruppe inaktiviert, wie beim Glutathion, und zum anderen kann es durch die Verbindung mit den SH-Reagenzien bei Proteinen zu einer Konformationsänderung und damit zum Funktionsverlust kommen.

Eine vollständige Hemmung der Reduktion von DPPH war mit diesen SH-Reagenzien nicht möglich, wie man in Abbildung 4.14 und 4.15 sehen kann. Das liegt zum einen daran, dass natürlich auch andere Substanzen an der Reduktion von DPPH beteiligt sind, die keine Thiolgruppe besitzen wie Ascorbinsäure oder Vitamin E. Zum anderen an der

Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine bei denen die Thiolgruppe nur schwer zugänglich ist und/oder sterisch abgeschirmt vorliegt (102).

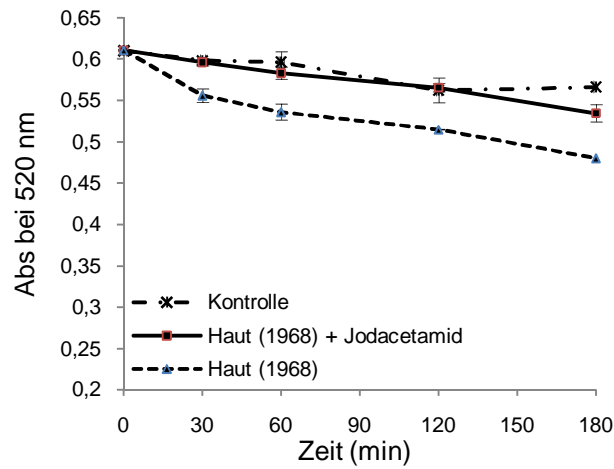


(a)

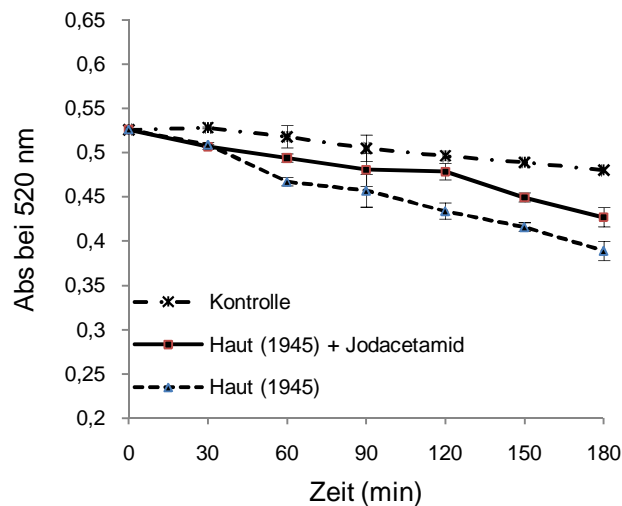


(b)

Abbildung 4.14: Verlauf der Reduktion von DPPH über den Zeitraum von drei Stunden bei mit NEM-behandelter Haut (durchgezogene Linie) und unbehandelter Haut. Als Kontrolle wurde eine inerte Kunststoffolie zwischen die Zellen gespannt (Strich-Punkt-Linie). Die Experimente wurden an Bauchhaut (♀, (a) 38 Jahre, (b) 41 Jahre) am ersten Tag nach Entnahme durchgeführt (Median, n = 4). Inkubation mit N-Ethylmaleinimid (NEM), (0,1 mol/l, 12 h)



(a)



(b)

Abbildung 4.15: Verlauf der Reduktion von DPPH über den Zeitraum von drei Stunden bei behandelter Haut (durchgezogene Linie) und unbehandelter Haut. Als Kontrolle wurde eine inerte Kunststoffolie zwischen die Zellen gespannt (Strich-Punkt-Linie). Die Experimente wurden an Bauchhaut (♀, (a) 40 Jahre, (b) 63 Jahre) am ersten Tag nach Entnahme durchgeführt (Median, n = 4). Inkubation mit Iodacetamid (0,1 Mol/l, 12 h)

Allerdings ist der hemmende Effekt nicht ausschließlich das Ergebnis der Inaktivierung der SH-Gruppen. Aufgrund des komplexen Zusammenspiels der antioxidativen Systeme in der Haut, reicht es, einige Bestandteile zu hemmen, um den Ablauf zu stören (30).

4.6.4 Einfluss der Mikroemulsion auf das Verfahren

Bevor die exzidierte Haut mit wirkstoffhaltiger Mikroemulsion behandelt wurde, sollte der Einfluss der Formulierung selbst auf den antioxidativen Status der Haut und auf den Ablauf der Reaktion untersucht werden. Mikroemulsionen haben in der Regel einen sehr hohen Anteil an Tensiden und Co-Tensiden, damit es möglich ist, ein sehr großes Spektrum an unterschiedlich schwerlöslichen Substanzen gleichzeitig in Lösung zu bekommen (103). Die thermodynamische Stabilität und die simple Herstellung dieser Formulierung machen diese zum idealen Wirkstoffträger in dieser Arbeit. Nach dem Auftragen auf die Haut interagieren Bestandteile der Mikroemulsion mit den interzellulären Lipiden der Epidermis und bewirken dadurch einen erleichterten Stofftransport in die Haut (95, 96, 104).

Für diese Arbeit wurde eine Mikroemulsion von *Jurkovič et al.* verwendet, die nur leicht modifiziert wurde. Gründe, die für diese Formulierung sprach, wurden in Kapitel 3 und 6 ausführlich erläutert.

Die Bestandteile sind Miglyol 812[®], Labrasol[®], Plurol oleique[®] und destilliertes Wasser. Auf die viskositätserhöhenden Stoffe Aerosil 200[®] und Xanthan Gummi[®] wurde verzichtet. Um zu verhindern, dass die Formulierung über den Rand der Hautstanze fließt und damit eventuell durch die Schnittfläche eindringt, wurde die Haut auf einen Ring positioniert (s. Kapitel 3.2.5.1, Abbildung 3.6). Nach drei Stunden wurde die Formulierung rückstandsfrei entfernt und die Hautstanze in die Diffusionszelle eingespannt. Der Verlauf eines Experiments ist hier repräsentativ für vier Versuchsreihen in Abbildung 4.16 dargestellt.

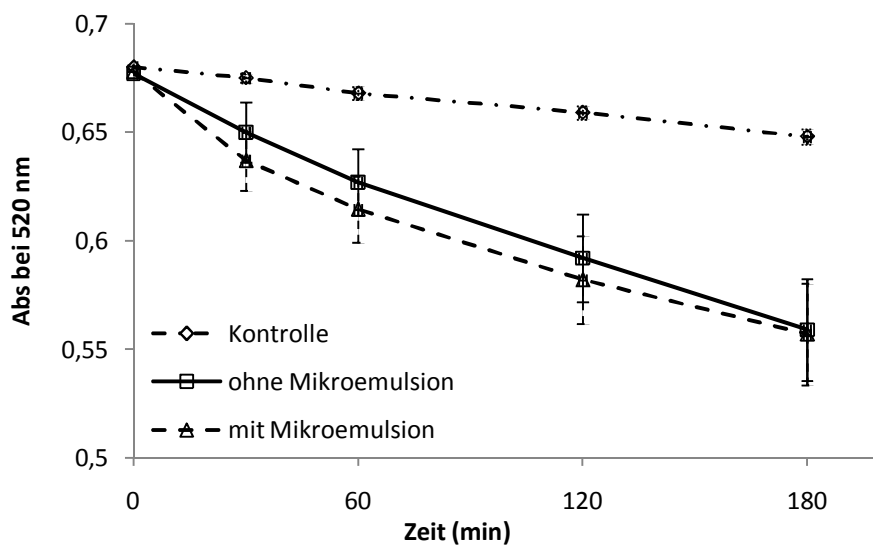


Abbildung 4.16: Repräsentativer Kurvenverlauf einer Mikroemulsion-behandelten (Δ) und unbehandelten (\square) Haut. Als Kontrolle wurde eine inerte Kunststoffolie zwischen die Zellen gespannt (Strich-Punkt-Linie). (Median, n = 3)

Offensichtlich hatte die verwendete Mikroemulsion keinen signifikanten Einfluss, weder auf den Verlauf der Reaktion noch auf den Endpunkt nach drei Stunden. Die zunächst vermutete verstärkte Diffusion von DPPH bei der vorbehandelten Haut trat nicht ein.

Im weiteren Verlauf wurde in den folgenden Versuchen die wirkstofffreie Mikroemulsion-behandelte-Haut trotzdem immer mit der Formulierung mit behandelt, um eventuelle Abweichungen auszuschließen.

4.6.5 Quantifizierung des Reduktionsvermögens

Die Fähigkeit das stabile Radikal Diphenylpicrylhydrazyl zu reduzieren wird in der Literatur häufig als antioxidative Aktivität (AA %) bezeichnet, die dann als prozentualer Anteil angegeben wird (105). Dies ist prinzipiell auch bei diesem neu entwickelten Verfahren möglich.

Die prozentuale antioxidative Aktivität wird nach folgender Formel berechnet:

$$AA \% = 100 - \{ [(Abs_{Probe} - Abs_{Leer}) \cdot 100] / Abs_{Kontrolle} \}$$

Danach ist die antioxidative Aktivität umso größer, je näher sie der Zahl 100 kommt. Diese dimensionslose Darstellung des Reduktionsvermögens ist sicherlich etwas abstrakt und wurde auch eingangs zur Orientierung verwendet. Im späteren Verlauf wurde schließlich eine ergänzende Art der Quantifizierung gewählt.

Aufgrund der konstant bleibenden Fläche in der Donor-Zelle, die von der DPPH-Lösung umspült wurde, war eine Angabe in Massenverbrauch an DPPH pro Flächeneinheit zu bevorzugen. In Tabelle 4.4 sind beispielhaft beide Angaben für einige Hautproben dargestellt. Auch hier wird deutlich, dass es keinen messbaren Zusammenhang zwischen Alter des Spenders und der antioxidativen Aktivität gab.

Tabelle 4.4: Dargestellt ist die antioxidative Aktivität (AA %) und die reduzierte Menge an DPPH pro Quadratzentimeter Haut nach drei Stunden in der Diffusionszelle.

Geb. Jahr des Hautspenders	1972	1971	1970	1968	1968	1966	1963	1959	1945
µg/cm ²	24	36	56	28	41	26	54	62	44
AA %	25	30	44	27	33	25	42	60	37

Sehr aufschlussreich wären noch Untersuchungen in Bezug auf den Hauttyp gewesen. Dieser war leider in dieser Versuchsreihe nicht bekannt. Mit einem bekannten Hauttyp könnte eine Aussage getroffen werden, ob die derzeitige Einordnung der Typen hauptsächlich auf die Art und Menge des Melanins zurückzuführen ist oder ob die antioxidativen Systeme der Haut dazu beitragen.

4.7 Bewertung von Spinsonden als Radikalfänger

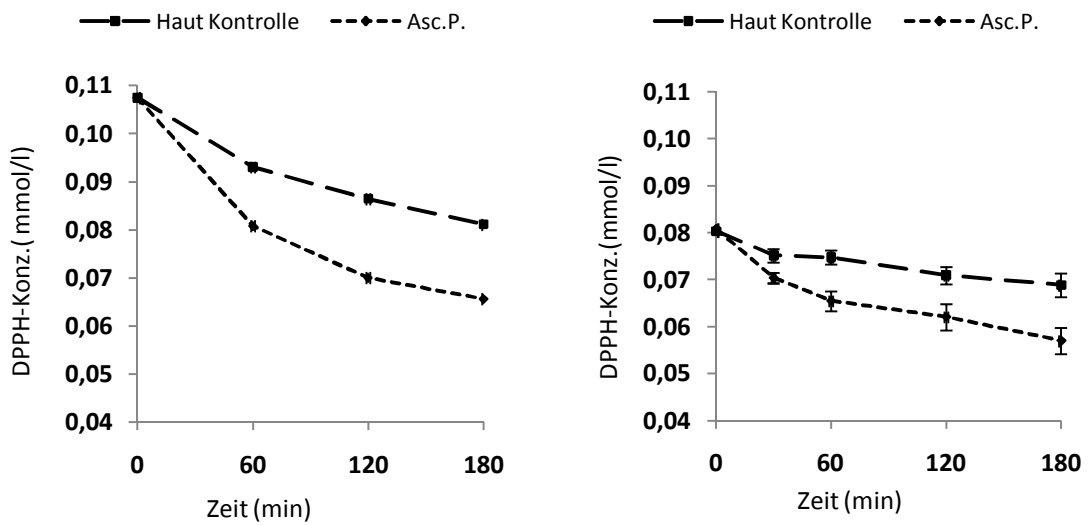
Das neu entwickelte Verfahren konnte nun für das eigentliche Ziel, der Bewertung von äußerlich applizierten Antioxidantien eingesetzt werden.

4.7.1 Der Standard Ascorbinsäurepalmitat

Zunächst einmal sollte das Verfahren an dem Standard Ascorbinsäurepalmitat (Asc.P.) getestet werden.

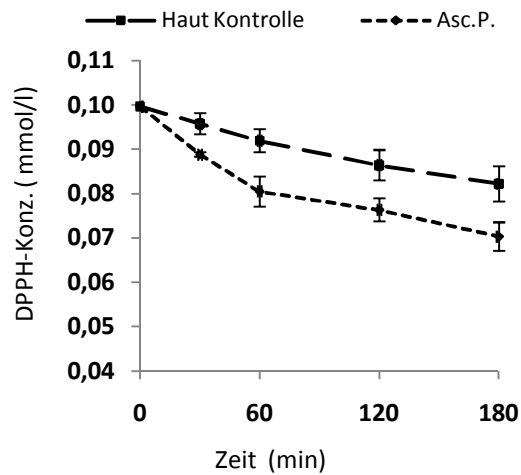
Die Entscheidung statt der hydrophilen Ascorbinsäure das lipophile Ascorbinsäurepalmitat zu verwenden, wurde aus mehreren Gründen getroffen. Zum einen war die Stabilität in Bezug auf oxidative Prozesse in Mikroemulsionen höher als bei der Ascorbinsäure (106) und zum anderen drang das lipophile Palmitat leichter in Haut ein (107). *Pokorski et al* konnten zeigen, dass Asc.P. im Gegensatz zur Ascorbinsäure die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und sich in Biomembranen sammelt (108).

Es wurde dieselbe Applikationsdauer verwendet, die zuvor für die Spinsonden bei den ESR-Vorversuchen als optimal angesehen wurde, also drei Stunden. Um eine Vergleichbarkeit zwischen dem Standard und den Spinsonden zu erzielen, war es unbedingt erforderlich, die Stöchiometrie der Reaktion zwischen DPPH, Asc.P. und den Spinsonden zu kennen. Dabei fällt auf, dass ein Molekül Ascorbinsäure zwei Moleküle DPPH reduziert. Bei den Spinsonden ist es jeweils ein Molekül. Deshalb wurde für die folgenden Versuche die Konzentration von Asc.P. in der Formulierung gegenüber den Spinsonden auf 50 mmol/l halbiert.



(a)

(b)



(c)

Abbildung 4.17: Erhöhte Reduktion von DPPH bei Ascorbinsäurepalmitat behandelter gegenüber unbehandelter Haut (Kontrolle). (a) Geb. Jahr 1967 (n = 4), (b) Geb. Jahr 1972 (n = 3), (c) Geb. Jahr 1978 (n = 4)

Wie zu erwarten war, zeigte sich bei den mit Ascorbinsäurepalmitat behandeltem Hautproben eine gesteigerte Reduktionsrate gegenüber der wirkstofffreien Mikroemulsion-behandelten Hautprobe (Abbildung 4.17 a-c). Ferner entsprach die Masse an DPPH, die behandelte Haut zusätzlich zur unbehandelten Haut reduzierte einem ähnlichen Betrag und lässt damit vermuten, dass die Stoffmenge an eingedrungenem ASC.P. bei den untersuchten Proben einem gleichwertigen Niveau entspricht (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Absolute Stoffmengen, die jeweils von der wirkstofffreien Mikroemulsion-behandelten Haut und der mit ASC.P.-haltigen Mikroemulsion behandelten Haut nach drei Stunden reduziert worden sind. Die Mehrleistung ist durch die Differenz der beiden Werte dargestellt.

Geburtsjahr	Ohne Wirkstoff, reduzierte Stoffmenge in μg	ASC.P., reduzierte Stoffmenge in μg	Δ in μg
1967	29\pm7	50\pm5	21
1972	15\pm3	32\pm5	17
1978	23\pm5	39\pm4	16

Die mit Ascorbinsäurepalmitat behandelte Haut hatte ein deutlich erhöhtes Reduktionvermögen im Vergleich zur unbehandelten Haut. Gleichzeitig konnte damit gezeigt werden, dass Ascorbinsäurepalmitat nach der Applikation, nicht gänzlich durch die antioxidativen Systeme der Haut oxidiert wurde, sodass es in ausreichender Menge in den oberen Hautschichten für die Reaktion mit DPPH zur Verfügung stand. Mit dem erfolgreichen Einsatz des Standards ASC.P. konnte das Verfahren nun für die Bewertung von neuartigen Radikalfängern eingesetzt werden.

4.7.2 Überprüfung der Spinsonden TEMPOL, DHME, DPS und CAT-1 auf ihr reduktives Potential nach Applikation auf exzidiierter Humanhaut

Anders als bei dem Standard gab es bei den eingesetzten Spinsonden keine Erfahrungen mit der verwendeten Mikroemulsion. Es war nicht bekannt ob die Nitroxide mit dieser Formulierung in die Haut transportiert wurden und wenn, in welchem Ausmaß. Durch die parallel verlaufenden ESR-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass zumindest DHME und TEMPOL in ausreichender Menge und über die gesamte Haut verteilt waren. Bei den Spinsonden DPS und CAT-1 war die Datenlage nicht eindeutig. Es konnte nicht geklärt

werden, ob genügend Sonde in die Haut eingedrungen war (näheres siehe Kapitel 6). Dessen ungeachtet wurden DPS und CAT-1 als Testsubstanzen eingesetzt.

TEMPOL: Alle mit TEMPOL vorbehandelten Hautproben zeigten eine erhöhte antioxidative Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Haut.

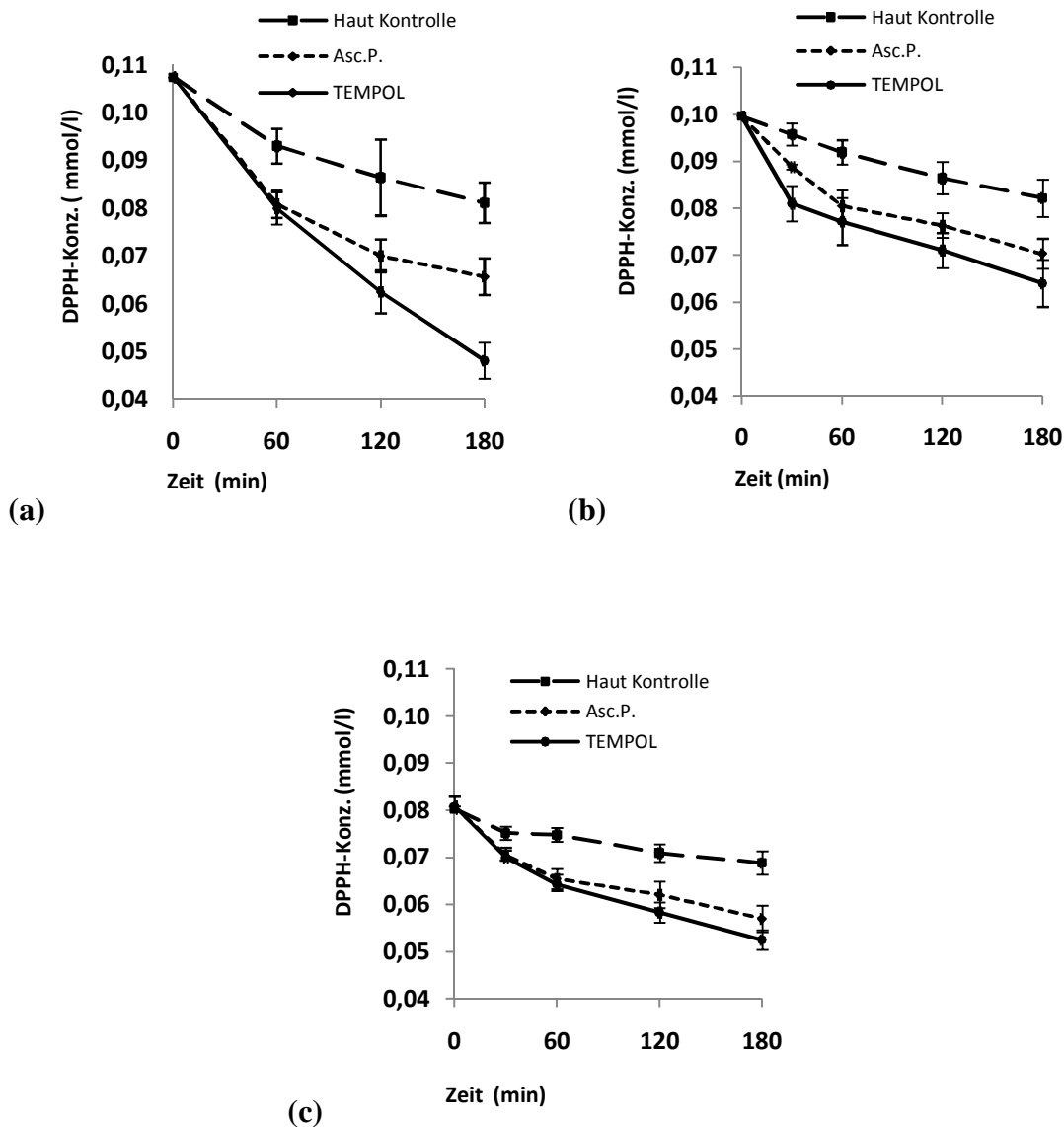


Abbildung 4.18: Erhöhte Reduktion von DPPH bei TEMPOL-behandelter gegenüber ASC.P.-behandelter und mit wirkstofffreier Mikroemulsion-behandelter Haut; (a) Bauchhaut, Geb. Jahr 1967, Median und Spanne von n = 4 Einzelmessungen; (b) Bauchhaut, Geb. Jahr 1972, Median und Spanne von n = 3 Einzelmessungen; (c) Bauchhaut, Geb. Jahr 1978, Median und Spanne von n = 3 Einzelmessungen

Zusätzlich konnte eine gleichwertige und in einigen Fällen höhere Reduktionsrate als beim Standard Ascorbinsäurepalmitat festgestellt werden. Der steil abfallende Kurvenverlauf von TEMPOL-behandelter Haut nach drei Stunden deutete zudem auf eine noch nicht beendete Reaktion hin (s. Abbildung 4.18).

DHME: Die neue Spinsonde Doxylhexansäuremethylester (DHME) hatte den größten Effekt auf die Reduktion von DPPH. Darüber hinaus lässt der Kurvenverlauf vermuten, dass die Reaktion noch nicht beendet war (Abbildung 4.19).

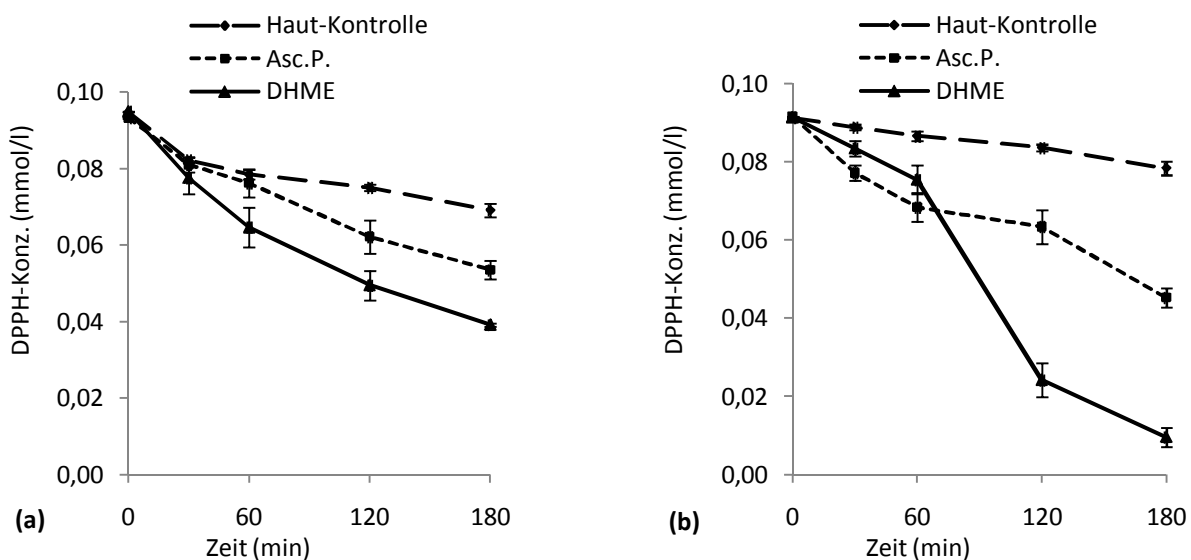


Abbildung 4.19: Erhöhte (a) bis stark erhöhte (b) Reduktion von DPPH bei DHME-behandelter gegenüber ASC.P.-behandelter und mit wirkstofffreier Mikroemulsion-behandelter Haut; (a) Bauchhaut, Geb. Jahr 1968, Median und Spanne von n = 3 Einzelmessungen; (b) Bauchhaut, Geb. Jahr 1972, Median und Spanne von n = 3 Einzelmessungen

Bemerkenswert war die Tatsache, dass bei einigen mit DHME behandelten Hautproben die Reduktion von DPPH innerhalb der Versuchsdauer bis auf die Bestimmungsgrenze ging (Abbildung 4.19 b). Eine höhere Konzentration an DHME in der Haut könnte ein möglicher Grund für diese verstärkte Reduktion sein. Aus den ESR-Untersuchungen ist

bekannt (Kapitel 6), dass DHME sehr gut und in großer Menge in die Haut transportiert wird.

Dies kann allerdings nicht der alleinige Grund sein, da auch TEMPOL in hoher Konzentration in der Haut vorhanden (Kapitel 6) war und es aber mit TEMPOL-behandelter Haut noch nicht zu einem so drastischen Abfall der DPPH-Konzentration gekommen war.

Doxypalmitinsäure: Auch mit der sehr lipophilen Spinsonde DPS kam es zu einer Reduktion von DPPH. Allerdings war der Effekt nicht so ausgeprägt wie bei TEMPOL und DHME. Die Reduktionsrate schwankte, bei allen vermessen Proben um den Wert des Standards (Abbildung 4.20).

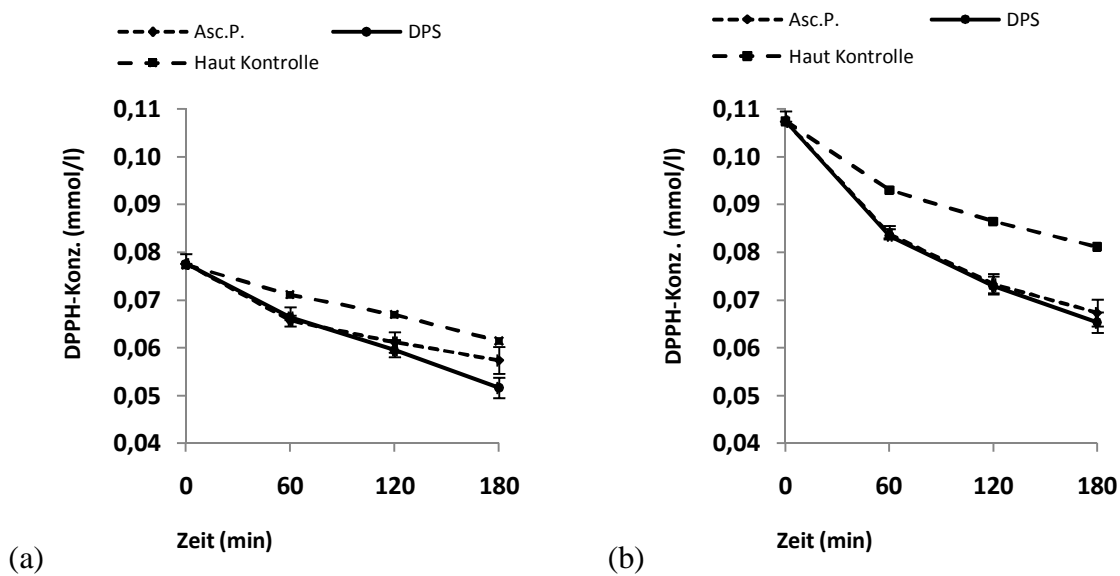


Abbildung 4.20: Gleichwertige Reduktion von DPPH bei DPS-behandelter und ASC.P.-behandelter Haut. Und erhöhte Reduktion gegenüber wirkstofffreier Mikroemulsion-behandelter Haut; (a) Bauchhaut, Geb. Jahr 1968, Median und Spanne von n = 3 Einzelmessungen; (b) Bauchhaut, Geb. Jahr 1967, Median und Spanne von n = 3 Einzelmessungen

Offenbar ist der sehr ähnliche n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient von DPS und dem Standard Ascorbinsäurepalmitat verantwortlich, für eine entsprechende Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Haut und die dadurch ähnlich starke Reaktion mit DPPH. Durch den Palmitinsäure-Rest, den beide Strukturen aufweisen, werden beide sich hauptsächlich in sehr lipophilen Bereichen, wie den Lipidmembranen der Haut, bewegen.

Die geringere Aktivität gegenüber dem DPPH im Vergleich zu TEMPOL oder DHME könnte an einer kleineren Konzentration der Sonde in der Haut liegen. Dies wurde anhand von ESR-Untersuchungen festgestellt. Die geringere Konzentration kann zum einen durch eine stärkere Reaktion mit den antioxidativen Systemen der Haut erklärt werden und zum anderen an einer schlechteren Diffusion in die Haut. Vermutlich sind beide Prozesse daran beteiligt.

CAT-1: Entgegen der Erwartung zeigte CAT-1 (Abbildung 4.21) einen ähnlich hohen Effekt auf die Reduktionsrate wie Tempol (Abbildung 4.17). Zunächst war vermutet worden, dass die hydrophile Sonde schlecht in die Haut diffundieren würde und damit zu einer quantitativ geringeren Reaktion mit DPPH führen würde. Im Normalfall ist das Stratum Corneum für solch polare Substanzen wie CAT-1, sehr schwer zu überwinden. Die Quellfähigkeit der Hornschicht mit Wasser könnte eine mögliche Ursache dieser Diskrepanz sein. Durch das dreistündige Einwirken der wasserhaltigen Mikroemulsion auf die Haut, könnte das Stratum Corneum genügend hydrophile Bereiche aufweisen um CAT-1 aufzunehmen.

Aufgrund der schlechten Detektion von CAT-1 in parallel stattfindenden ESR-Untersuchungen, konnte diese Hypothese jedoch noch nicht bestätigt werden. Von *Hochkirch* (57) ist bekannt, dass CAT-1 sich vorwiegend in den polaren Regionen der Haut verteilt und in geringerem Maße auch in den unpolaren Bereichen, wie dem Stratum corneum. Allerdings wurde dort die gesamte Hautstanz in eine CAT-1-haltige Lösung getaucht, was natürlich zu einem ganz anderen Verteilungsverhalten der Spinsonde führt. Somit lassen sich diese Erkenntnisse nur bedingt nutzen.

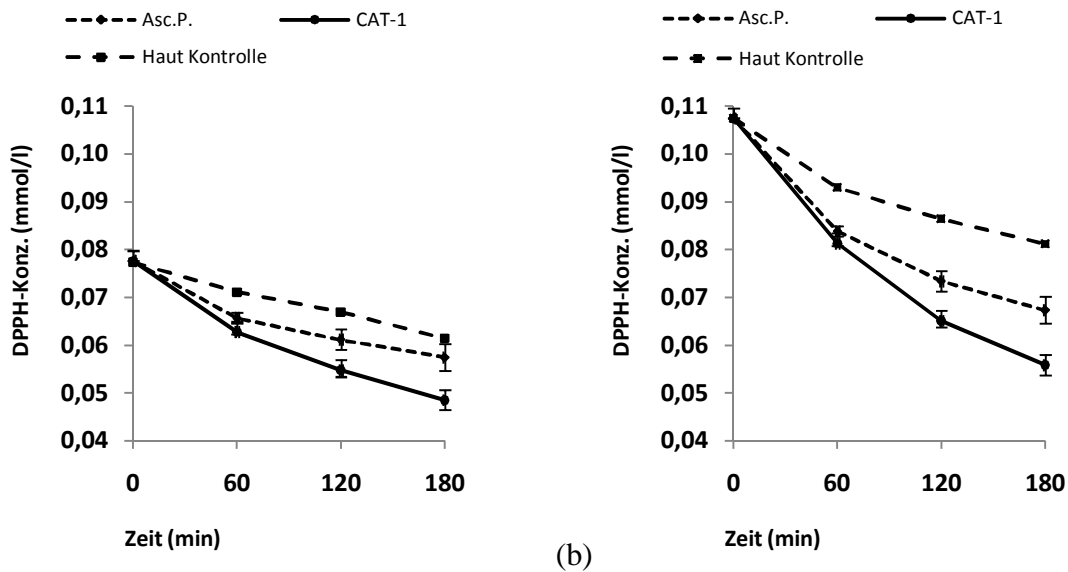


Abbildung 4.21: Erhöhte Reduktion von DPPH bei CAT-1-behandeltem gegenüber ASC.P.-behandeltem und mit wirkstofffreier Mikroemulsion-behandeltem Haut; (a) Bauchhaut, Geb. Jahr 1967, Median und Spanne von n = 3 Einzelmessungen; (b) Bauchhaut, Geb. Jahr 1972, Median und Spanne von n = 3 Einzelmessungen

Abschließend kann man feststellen, dass alle getesteten Substanzen die Fähigkeit besitzen das synthetische Radikal Diphenylpicrylhydrazyl stärker zu reduzieren als Haut alleine. Obgleich die Datenlage nicht ausreicht, um eine endgültige Aussage zu treffen, zeichnet sich ein Trend bei den Nitroxiden TEMPOL und besonders bei DHME ab (s. Abbildung 4.22). Bei dem Nitroxyl-Radikale CAT-1 und DPS konnte man mindestens eine Gleichwertigkeit zu dem Standard Ascorbinsäurepalmitat feststellen.

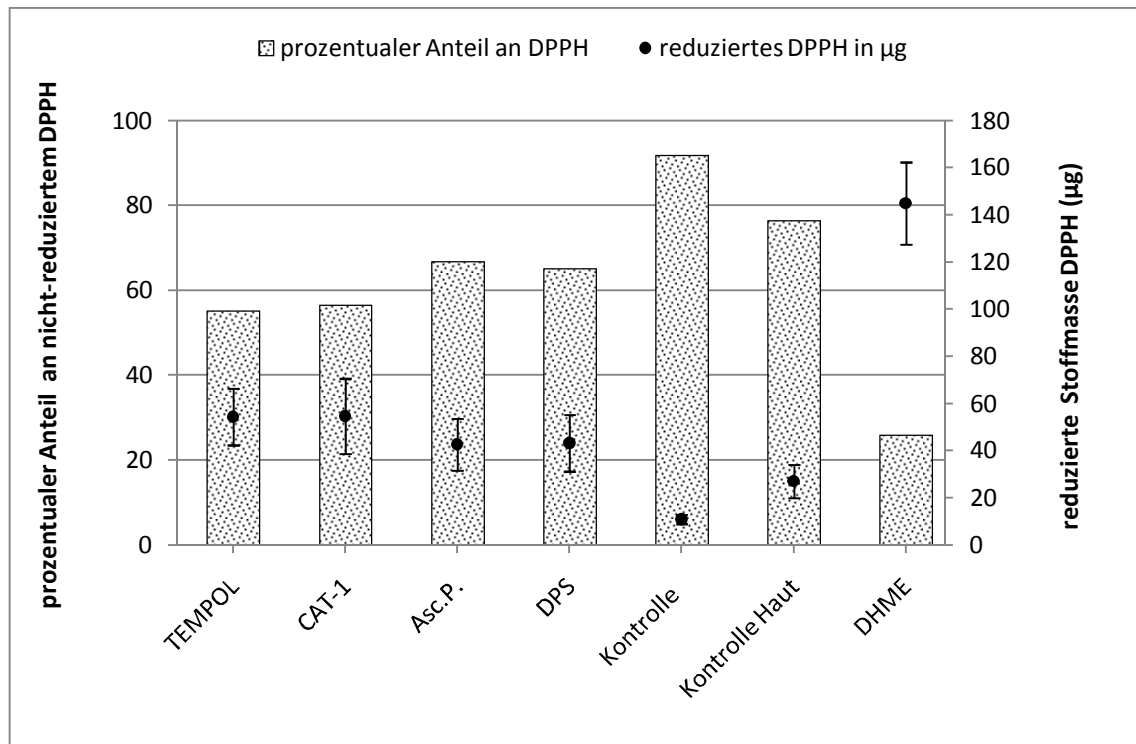


Abbildung 4.22: Auf der linken Ordinate ist der prozentuale Anteil an DPPH nach drei Stunden (bezogen auf den Anfangswert, 100 %) dargestellt; die rechte Ordinate zeigt die absolute Masse, die in einer Diffusionszelle reduziert wurde

4.8 Zusammenfassung und Diskussion

Mit dem in dieser Arbeit neu etabliertem Verfahren war es zum ersten Mal gelungen die antioxidative Kapazität der Epidermis von exzidiierter Humanhaut zu bestimmen und als Äquivalent des stabilen Radikals Diphenylpicrylhydrazyl darzustellen. Dabei wurden ausgestanzte Hautproben zwischen zwei Diffusionszellen gespannt. Die Oberseite der Haut wurde dabei mit dem Modell-Radikal DPPH umspült, um ein Eindringen von reaktiven Sauerstoffspezies zu simulieren. Die Reduktion des Modell-Radikals wurde photometrisch verfolgt. Der genaue Ablauf und der Mechanismus der Reaktion von DPPH mit der Haut konnte zum Teil aufgeklärt werden. Dabei drang DPPH über die Dauer des Experimentes in die Haut ein, wurde reduziert und diffundiert wieder heraus. Zusätzlich konnte mit der Bestimmung der Eindringtiefe, der Wirkungsbereich von DPPH (gestützt durch

histologische Untersuchungen) auf die Epidermis eingeengt werden. Es konnte überdies gezeigt werde, dass mit dieser Methode kein Zusammenhang zwischen Alter des Spenders und deren antioxidativer Status festgestellt werden konnte. Um aber eine endgültige Aussage zu treffen, ist eine größere Probenanzahl notwendig.

Außerdem konnte durch die Blockierung von Thiolgruppen, eine direkte oder indirekte Beteiligung von SH-Gruppen-abhängigen Redoxmechanismen, bei der Umsetzung von DPPH zu DPPH-H gezeigt werden.

Ferner konnte mit dieser Methode die antioxidative Wirkung von Ascorbinsäurepalmitat bestätigt werden und gleichzeitig damit auch gezeigt werden, dass der Standard nach der Applikation nicht gänzlich von den antioxidativen Systemen der Haut oxidiert wurde und damit eine Reaktion mit DPPH eingehen konnte.

Die als Antioxidantien eingesetzten Spinsonden konnten alle eine Erhöhung des reduktiven Potenzials der Haut bewirken. Mit TEMPOL und DHME behandelte Haut konnte sogar einen stärkeren Effekt auf DPPH ausüben als die mit dem Standard behandelten Hautproben. Um die teilweise sehr hohe Aktivität von der neuen Substanz DHME zu ergründen, sind weitere Untersuchungen notwendig. Einerseits wäre es sehr wissenswert, warum TEMPOL nicht die gleiche Aktivität gegenüber DPPH besitzt wie DHME, obwohl die Substanzmenge in der Haut vergleichbar war (s. Kapitel 6.5). In diesem Zusammenhang wäre weiterhin zu klären wo sich die beiden Substanzen auf zellulärer Ebene aufhalten.

Leider ist die hier verwendete ESR-Anlage nicht hochauflösend genug um zelluläre Dimensionen aufzuzeigen.

Bei CAT-1 und DPS ist die Datenlage nicht eindeutig. Obwohl durch die parallel verlaufenden ESR-Untersuchungen bekannt war, dass die Konzentration dieser Radikale nicht annähernd die Höhe der anderen beiden erreichte, konnte eine Reduktion von DPPH verzeichnet werden. Allerdings ist bei der Detektion von Spinsonden in Humanhaut mit der ESR-Technologie mit Einschränkungen zu rechnen, sodass die genaue Konzentration schwer zu bestimmen war.

Durch die Reduktion des Radikals DPPH nach Applikation von TEMPOL und DHME auf Haut, die über einen Zeitraum von drei Stunden ging, wird damit schließlich auch die hohe

biochemische Stabilität dieser Substanzgruppen bestätigt. Zum einen sind die Radikale so stabil, dass sie nicht gleich mit den Molekülen aus der Haut reagieren und zum anderen aber so reaktiv, dass sie das Modellradikal DPPH reduzieren. Dies lässt vermuten, dass die deutlich reaktiveren ROS durch diese Substanzen, soweit sie sich in der gleichen Umgebung aufhalten, zu unschädlichen Spezies reagieren.

Kapitel 5

5. Weitere Verfahren zur Erfassung von UV-induzierten Schäden in exzidiierter Humanhaut und deren Vermeidung durch Protektiva

Die vielfältige Wirkung von ultravioletter Strahlung auf Humanhaut wurde schon in den vorigen Kapiteln näher erläutert. Aufgrund der Fülle an Mechanismen, die durch Strahlung in Gang gesetzt werden, ergeben sich aber auch Möglichkeiten, diese einzeln zu untersuchen und damit auch Auswirkungen von vermeintlichen Protektiva zu prüfen.

5.1 Sonnenbrandzellen-Methode

Sonnenbrandzellen sind charakteristisch für die Epidermis bei allen Säugern (109), die hohen Dosen an UVB/C oder UVA-Strahlung, in Gegenwart von phototoxischen Substanzen, wie Psoralenen (110, 111), ausgesetzt werden. Es handelt sich hierbei um Keratinozyten die aufgrund eines irreparablen Schadens oder einer gefährlichen Mutation in der Zelle den programmierten Zelltod (Apoptose) durchlaufen. Dieser Schutzmechanismus verhindert, dass potenziell karzinogene Mutationen im Erbgut fortbestehen (112). Im Gegensatz zur Nekrose stirbt bei der Apoptose nur die betroffene Zelle, und das umliegende Gewebe wird nicht beeinflusst. Histologisch zu erkennen sind apoptotische Keratinozyten unter anderem durch einen pyknotischen Kern und ein eosinophiles

Zytoplasma, das durch eine Hämatoxylin/Eosin-Färbung gut sichtbar gemacht werden kann. In Abbildung 5.1, ist der Unterschied zwischen lebenden Keratinozyten und apoptotischen Zellen gut zu erkennen. Prinzipiell sind apoptotische Zellen auch durch die TUNEL-Methode (Terminal-desoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) zu detektieren, allerdings ergab sich damit kein Vorteil gegenüber der verwendeten Färbung, weder apparativ noch methodisch.

Die Pathogenese der Entstehung von Sonnenbrandzellen ist noch nicht vollständig geklärt. *Brenner et al.* (113) konnten schon 1979 eine verminderte Reparatur von Thymidin-Dimeren nach UV-Bestrahlung von Epidermiszellen feststellen.

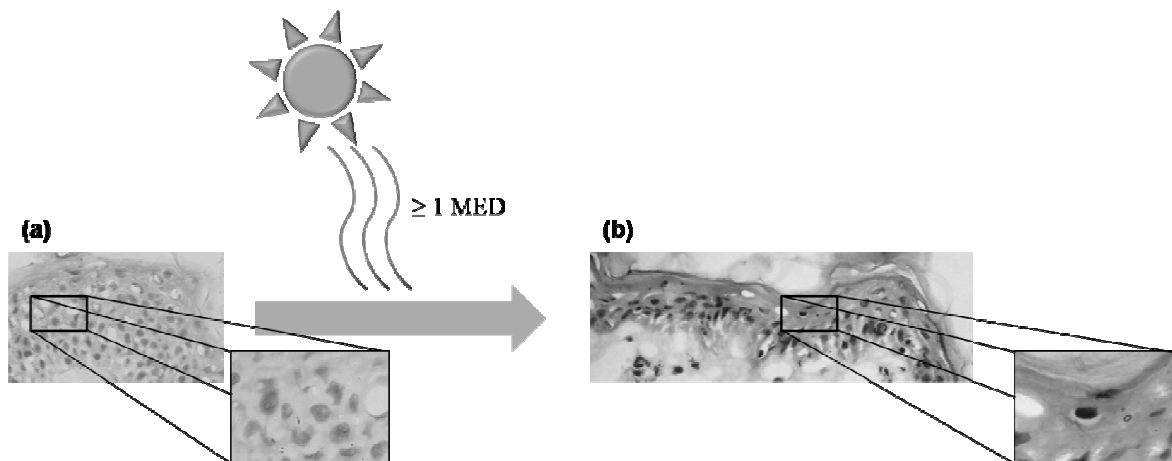


Abbildung 5.1: (a) Humanhaut vor Sonnenexposition/UV-Strahlung; (b) Haut 30 Stunden nach der Sonnenexposition/UV-Strahlung mit mindestens einer minimalen Erythem Dosis (MED), pyknotischer Kern in (b) (Ausschnitt). Vergrößerung 200fach, Ausschnitt 400fach; Hautschnitte (5 μm dick) nach H&E-Färbung und Fixierung

Da die Bildung von Sonnenbrandzellen nicht ausschließlich die Folge von reaktiven Sauerstoffspezies ist, wurde von den eingesetzten Radikalfängern nur eine begrenzte protektive Wirkung erwartet.

5.1.1 Untersuchungen von Sonnenbrandzellen an exzidiierter Humanhaut

In Kapitel 4 wurden die Spinsonden Tempol, CAT-1, DPS, DHME und das Standard-Antioxidans Ascorbinsäurepalmitat auf die Fähigkeit untersucht, das synthetische Radikal DPPH zu reduzieren. Alle Substanzen konnten ihre potenziell antioxidativen Eigenschaften bestätigen, indem sie DPPH effizient reduzierten. Mit den nachfolgenden Versuchen sollte untersucht werden ob Spinsonden in der Lage sind die Entstehung von Sonnenbrandzellen zu vermindern. Der verminderte Effekt von Vitamin C auf die Entstehung von Sonnenbrandzellen (SBZ) konnte schon an Schweine- und Mäusehaut gezeigt werden (114, 115). Dabei konnte eine Reduktion um bis zu 20% an SBZ erzielt werden. Deshalb wurde Ascorbinsäure auch bei diesen Experimenten als Standard eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich Humanhaut verwendet die, wie bei *Hoffmann-Wellenhof et al.* (116) direkt nach der chirurgischen Entnahme weiterverarbeitet wurde. Die Hautproben wurden mit den in Kapitel 4 verwendeten Formulierungen behandelt und im Anschluss mit einem Sonnensimulator oder einer UVC-Lampe bestrahlt. Die Hautstanzen wurden dann, abweichend von (116), nach 30 Stunden in einem Brutschrank, kryokonserviert. Bis zur Anfertigung der Schnitte wurden die Proben bei minus 80 °C aufbewahrt. Nach der Färbung und Fixierung, erfolgte die Quantifizierung der SBZ mit einem Lichtmikroskop.

Bei den üblichen *in vivo* Experimenten wird bei Bestrahlungen vorwiegend, statt der Energieangabe der Strahlungs-dosis, die individuelle **minimale Erythem Dosis (MED)** angegeben. Als MED wird die Strahlungs-dosis festgelegt die, abhängig von der Wellenlänge, gerade einen Sonnenbrand (Erythem) hervorruft. Dabei hängt die Energiedosis nicht nur von der Wellenlänge der Strahlung, sondern auch vom Hauttyp, also dem Pigmentierungsgrad der Haut ab. Von der WHO werden bei hellhäutigen Menschen, abhängig von der Pigmentierung, vier Hauttypen festgelegt (117).

Tabelle 5.1: Experimentell ermittelte MED für verschieden Hauttypen im UVA und UVB Bereich (modifiziert nach (118))

Hauttyp	MED UVB (mJ/cm²)	MED UVA (J/cm²)
Hauttyp I	24	6
Hauttyp II	31	7
Hauttyp III	48	10
Hauttyp IV	116	17

Dabei sinkt die Empfindlichkeit gegenüber der UV-Strahlung mit steigendem Hauttyp. *Freeman* und *Applegate* (118) haben für verschieden Hauttypen und Wellenlängenbereiche jeweils die MED experimentell ermittelt (Tabelle 5.1).

Diese Strahlungsintensitäten sind aber nicht als absolute Richtwerte zu verstehen, da wie schon erwähnt die MED eine experimentelle Größe ist die für jede Person individuell ermittelt werden muss. Da jedoch die Bestimmung der MED bei der verwendeten exzidierten Humanhaut nicht mehr möglich war, aber der Hauttyp der verwendeten Proben bekannt war, wurde diese Intensitäten als Näherung verwendet. Da es mit exzidiertem Humanhaut sehr wenig Erfahrung mit Bestrahlungsexperimenten in dieser Form gibt, war eine Reihe von Voruntersuchungen notwendig, um eine optimale Bestrahlungsdauer bzw.-dosis, Inkubation der Formulierung und eine bestmögliche Zeitspanne in der die Sonnenbrandzellen entstehen konnten, zu bestimmen.

5.1.2 Parameterentwicklung

Wie erwähnt wird die minimale Erythemdosis experimentell ermittelt, und wird als Orientierung für die Stärke einer Strahlungsquelle herangezogen. In diesem Fall kann die MED jedoch nur geschätzt werden, da diese *ex vivo* nicht mehr bestimmt werden kann. Für die folgenden Experimente wurde, um Vergleichbarkeit zwischen den Proben zu gewährleisten, nur Haut vom Typ III verwendet.

Tabelle 5.2: Leistung der verwendeten Strahlungsquellen und berechnete MED auf Basis von Tabelle 5.1

	UVA	UVB	UVC	Gesamtdosis
Sonnensimulator (1 min)	11,6 mW/cm ²	630 µW/cm ²	-----	0,734 J/cm ²
10 Minuten	0,7 MED	7,9 MED	-----	7,34 J/cm ²
20 Minuten	1,4 MED	15,8 MED	-----	14,68 J/cm ²
30 Minuten	2,1 MED	23,7 MED	-----	21,02 J/cm ²
EPROM-Löschler (1 min)	-----	-----	22 mW/cm ²	1,32 J/cm ²

Damit lässt sich mit den in Tabelle 5.1 aufgelisteten Strahlungsdosen ein Zeitplan für die Experimente entwickeln (s. Tabelle 5.2). Für Bestrahlungsexperimente mit der energiereicheren UVC-Strahlung wurden drei Bestrahlungszeiten definiert: 2, 5 und 10 Minuten. Diese entsprachen den ungefähren Energiemengen, die der Sonnensimulator emittiert hatte. Es wurden zwar schon Strahlungsintensitäten für UVC-Strahlung bestimmt, die einer MED entsprechen sollen (119, 120), diese unterscheiden sich jedoch stark voneinander.

Bei diesem Verfahren ist es unbedingt erforderlich, dass die Zellen der Haut speziell die Keratinozyten vital bleiben, da die Apoptose ein aktiver Prozess ist. Es hat sich gezeigt, dass die Einwirkzeit von drei Stunden, die eine hohe Konzentration an eingedrungenen Testsubstanzen gewährleistet, zu lang war. Die hohe Konzentration der Nitroxyl-Radikale und dem Ascorbinsäurepalmitat führte, schon bei unbestrahlter Haut, zu mehr nekrotischen Zellen als bei unbehandelter Haut. Offensichtlich ist die Akkumulation der Substanzen (auch von Ascorbinsäurepalmitat) nach drei Stunden so hoch, dass es zu negativen Auswirkungen kommt. *In Vivo* würden diese Substanzen durch den ständigen Stoffaustausch durch die Gewebeflüssigkeit "verdünnt" werden, in diesem Fall aber bildet sich eine Art Depot. Nach zahlreichen Experimenten wurden 30 Minuten als optimal eingestuft. Bei dieser Einwirkzeit zeigte sich kein Unterschied zur wirkstofffreien Mikroemulsion-behandelten Haut hinsichtlich der nekrotischen Zellen.

Bezüglich der idealen Zeitspanne, die zur Entstehung der Sonnenbrandzellen erforderlich ist, gibt es nur unzureichende Angaben. Im Normalfall wird Haut erst nach der Entstehung der Sonnenbrandzellen als Biopsie entnommen. Dadurch ist gewährleistet, dass die Zellen vital sind und die Apoptose als aktiver Prozess eingeleitet werden kann. *Hofmann-Wellenhof et al.* (116) hatten mit kurz zuvor entnommener Humanhaut experimentiert, diese wurde dann nach der Bestrahlung 48 Stunden im Brutschrank aufbewahrt bevor sie eingefroren wurde. Diese Zeitspanne war im vorliegenden Fall zu lang, da sich zu viele nekrotische Zellen bildeten. Ursache für dieses stärker verlaufende Absterben der Keratinozyten ist sehr wahrscheinlich die abweichende Zeitperiode zwischen Entnahme und Erstversorgung mit Nährlösung. Während *Hofmann-Wellenhof* schon nach 30 Minuten die Haut versorgen konnte, war es in dieser Arbeit erst nach zwei Stunden möglich. In diesem scheinbar kurzen Zeitraum ist die Haut unterversorgt und es kann zum Absterben von Zellen kommen. Da nekrotische Zellen auch benachbarte Zellen negativ beeinflussen, wurde eine Reduktion der Zeit, nach dem Bestrahlen bis zum Einfrieren, von 48 auf 30 Stunden vorgenommen.

5.1.3 Ergebnisse

Sonnensimulator

Im Gegensatz zu den anderen eingesetzten Methoden (s. Kapitel 4 und 6) war bei dieser die Variabilität zwischen den Spendern deutlich größer. Für die Experimente wurde zwar nur Haut des Typs III verwendet und alle Hautproben wurden auch mit den gleichen Strahlungsdosen behandelt, dennoch ist diese Typisierung kein fester Wert, weshalb auch die Haut unterschiedlich auf die gleiche Strahlungsmenge reagierte. Wie man aus Tabelle 6 entnehmen kann gibt es zwischen den Hauttypen größere Spielräume was die Strahlung anbelangt, darum ist es sinnvoll die genaue MED von den Hautproben vorher zu ermitteln, um vergleichbare Bedingungen zu schaffen. Dennoch zeigten alle Hautproben, obwohl sie nicht die gleichen Ausgangsvoraussetzungen hatten, die gleiche Tendenz in Bezug auf die protektive Wirkung der getesteten Substanzen.

Eine Gemeinsamkeit, die alle bestrahlten Proben hatten, war die Tatsache dass nach einer Bestrahlungszeit von 30 Minuten die Strahlungsdosis offensichtlich so hoch war, dass

keine Unterscheidung zwischen behandelter oder unbehandelter Haut möglich war. 80 bis 90 Prozent der gezählten Zellen waren zum Teil so stark geschädigt, dass auch keine Unterscheidung zwischen Nekrose und Apoptose mehr festgestellt werden konnte. Ein solch starker Effekt war zumindest für die unbehandelte Haut erwartet worden, da die Strahlungsdosis dem 25fachen einer MED entsprach.

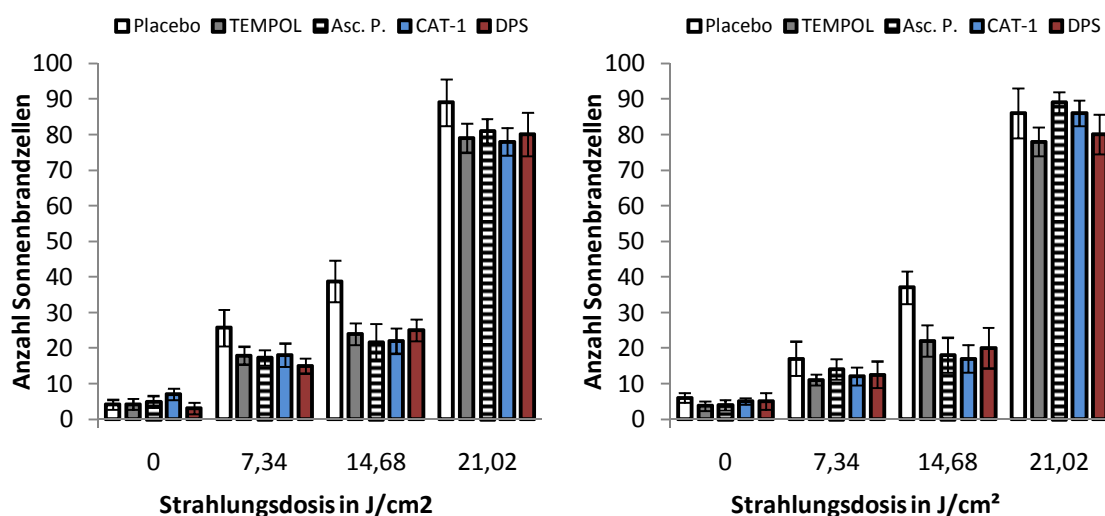


Abbildung 5.2: Anzahl der Sonnenbrandzellen in Abhängigkeit der Strahlungsdosis, (Bauchhaut, ♀, Geburtsjahr 1943), links (Bauchhaut, ♀, Geburtsjahr 1971, Placebo: mit wirkstofffreier Mikroemulsion behandelte Haut; Median und Spanne von n = 3 Einzelwerten

Offensichtlich war die Wirkung der Protektiva nach 30 Minuten erschöpft, es ist zwar noch ein Trend zu erkennen, der ist jedoch nicht signifikant (s. Abbildung 5.2).

Nach einer Bestrahlungszeit von zehn Minuten waren die hauteigenen Schutzmechanismen noch in der Lage, die schädlichen Auswirkungen der Strahlung abzufangen. Der Effekt der Testsubstanzen war zwar zu sehen, jedoch nicht sehr ausgeprägt. Erst nach weiteren zehn Minuten war der Unterschied zur wirkstofffreien Mikroemulsion-behandelten Haut deutlich zu erkennen. Danach näherten sich die Werte wieder dem Niveau der unbehandelten Haut.

Wie stark die Hautzellen nach 30 Minuten unter dem Sonnensimulator geschädigt wurden, ist auf den Fotografien in Abbildung 5.3 eindeutig zu sehen.

Desweiteren konnte bei den untersuchten Hautproben, wie schon in Kapitel 4, kein Einfluss durch das Alter des Spenders festgestellt werden. Damit wurde auch bei diesem Verfahren gezeigt, dass die Reparaturmechanismen und die Schutzsysteme der Haut im akuten Fall nicht vom Alter abhängen, sondern hauptsächlich vom Hauttyp.

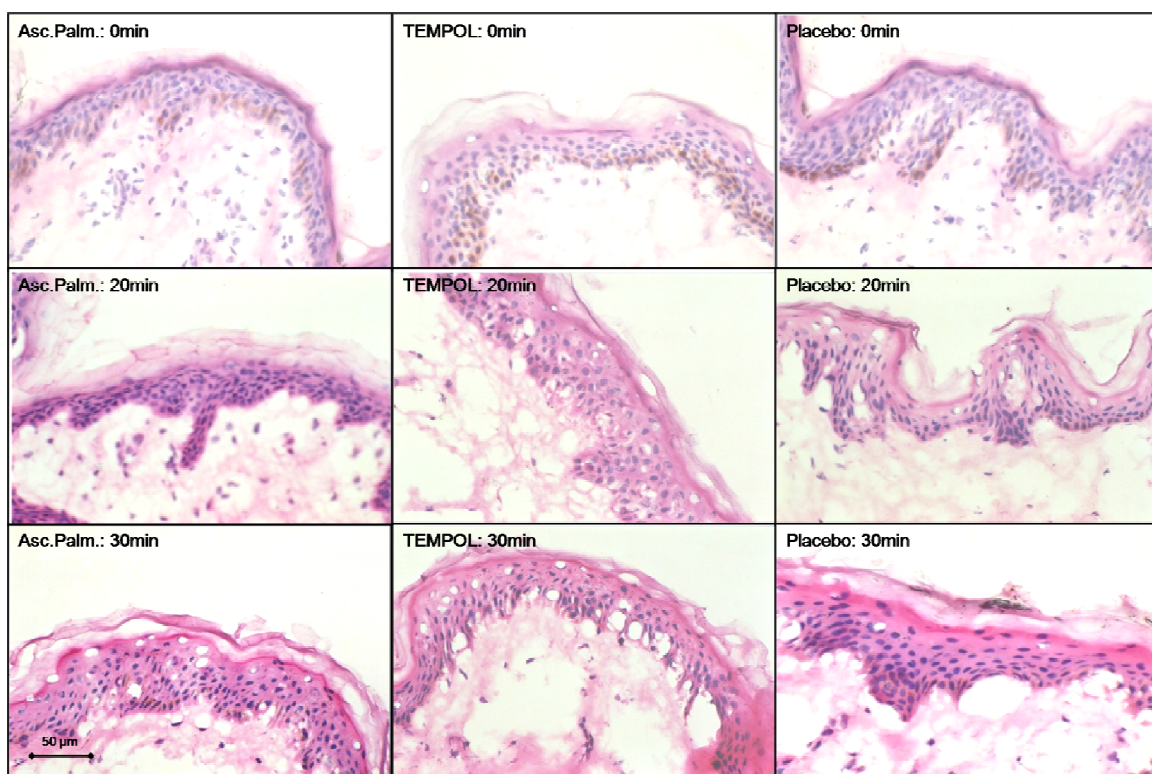


Abbildung 5.3: H&E gefärbte Hautschnitte (5µm), 30 Stunden nach der Bestrahlung (0, 20, 30 Minuten), links mit Ascorbinsäurepalmitat, Mitte mit TEMPOL und rechts mit wirkstofffreier Mikroemulsion behandelt (Placebo), (Bauchhaut, ♀, Geburtsjahr 1968; 200fache Vergrößerung)

Das neue Nitroxyl-Radikal DHME wurde auch bei diesem Verfahren eingesetzt und obwohl das Ergebnis dem der anderen Testsubstanzen gleichkam, kann dieser Umstand

nur als Trend gewertet werden, da zu wenige Messwerte zur Verfügung standen. DHME wurde erst zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Arbeit synthetisiert. Die Untersuchungen der Sonnenbrand-Zellen-Methode waren zu dieser Zeit bereits nahezu abgeschlossen.

UVC-Strahler

Für den UVC-Bereich gibt es keine einheitlichen Angaben für eine minimale Erythemdosis, da es zum einen nicht zumutbar wäre, Menschen dieser aggressiven Strahlung auszusetzen und zum anderen, weil die Notwendigkeit noch nicht besteht, zumal dieser Wellenlängenbereich fast vollständig von der Erdatmosphäre absorbiert wird. Dessen ungeachtet sollte der Einfluss dieser Strahlung auf tiefere Bereiche der Epidermis dargestellt werden. Die Strahlungsdauer, die genutzt werden sollte, orientierte sich an den Energiemengen, die bei dem Sonnensimulator eingesetzt wurden. Die Hautproben wurden deshalb zwei ($2,64 \text{ J/cm}^2$), fünf ($6,6 \text{ J/cm}^2$) oder zehn ($12,3 \text{ J/cm}^2$) Minuten lang bestrahlt.

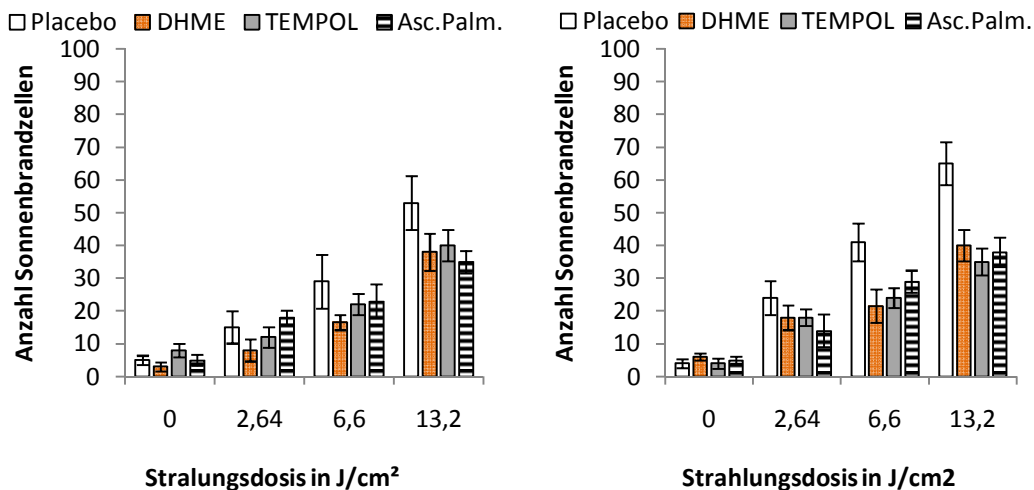


Abbildung 5.4: Anzahl der Sonnenbrandzellen in Abhängigkeit der Strahlungsdosis, rechts, ♀, Bauchhaut, Geburtsjahr 1943; links, ♀, Bauchhaut, Geburtsjahr 1989, Placebo: mit wirkstofffreier Mikroemulsion behandelte Haut; Median und Spanne von $n = 3$ Einzelwerten

Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse aus den ESR-Experimenten von den Nitroxyl-Radikalen DPS und CAT-1, wurde die Anzahl der eingesetzten Nitroxyl-Radikale in dieser Versuchsreihe auf TEMPOL und DHME begrenzt.

Auch bei dieser Versuchsreihe zeigten sich eindeutige Effekte durch die verwendeten Radikalfänger (s. Abbildung 5.4). Obwohl es UVC-Strahlung nicht vermag in tiefere Bereiche der lebenden Epidermis einzudringen, war die Wirkung in den Hautpräparaten sehr deutlich zu sehen.

Mit der dargestellten Methode war es gelungen, den protektiven Charakter der zuvor schon in Kapitel 4 getesteten Substanzen zu bestätigen. Offensichtlich waren diese Stoffe in der Lage, Faktoren, die zur Entstehung von Sonnenbrandzellen führen, zu beeinflussen. Welcher Art die Einflussnahme der Radikalfänger war, konnte noch nicht geklärt werden. Die Vermutung lag nahe, dass durch Strahlung entstehende ROS, direkt oder indirekt mit den Nitroxyl-Radikalen und der Ascorbinsäure reagierten und diese damit nicht mehr mit anderen Bestandteilen der Haut reagieren konnten. Diese Vermutung wurde auch durch Ergebnisse aus Kapitel 4 gestützt, in denen die verwendeten Substanzen das Modellradikal DPPH reduzierten. Vorstellbar wäre auch eine Absorption der Strahlung durch die Radikalfänger, die alle Absorptionsmaxima zwischen 450 und 200 nm haben und damit analog zum Schutzmechanismus des Melanins wirken. Vermutlich waren beide Wege daran beteiligt und führten in der Summe zu den beobachteten Effekten. Um eine abschließende Beurteilung abzugeben sind allerdings weitere Untersuchungen nötig.

5.2 Untersuchungen an Hauthomogenaten unter Verwendung der ESR-Spektroskopie

Dieses eingangs sehr vielversprechende Konzept stellte sich im Verlauf der Arbeit als sehr aufwendig in der Durchführung und letztendlich in der eingesetzten Form als nicht reproduzierbar heraus. Dessen ungeachtet könnte dieses Verfahren mit einigen Modifikationen zu aussichtsreichen Erkenntnissen führen, weswegen in diesem Kapitel die aufgetretenen methodischen Schwierigkeiten aufgezeigt werden sollen.

5.2.1 Versuchsprinzip

Bei diesem Verfahren wird die antioxidative Aktivität mit Hilfe des stabilen freien Radikals, Diphenylpicrylhydrazyl quantifiziert. Dafür wird das zu bestimmende Substrat in flüssiger Form mit DPPH zusammengebracht und nach einer festgelegten Zeitspanne die verbleibende Menge an DPPH ermittelt. Diese Quantifizierung kann, da DPPH paramagnetisch ist, mit der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie erfolgen. Damit lässt die verbleibende Menge Rückschlüsse auf das reduktive Potenzial des zu untersuchenden Materials zu. Außerdem ist es mit der ESR-Spektroskopie möglich, den kinetischen Verlauf der Reaktion zu beobachten, da es sich um eine nichtinvasive Methode handelt.

Da in vorliegendem Fall das zu untersuchende Material Humanhaut war, wurde diese zu einem Homogenat verarbeitet. Die genaue Vorgehensweise wurde in Kapitel 3 schon ausführlich erläutert. Das Hauthomogenat konnte zusammen mit gelöstem DPPH in eine Kapillare aufgezogen werden und im Resonator vermessen werden. Als Vorlage für diese Vorgehensweise diente eine Arbeit von *Fuchs et al.* (86), die leicht modifiziert wurde. Anstatt der Ethanol/Puffer-Lösung, wie in dieser Methode beschrieben, wurde eine isotonische Kaliumchlorid-Lösung verwendet, um Enzym-katalysierte Mechanismen, die durch ethanolhaltiges Lösungsmittel sicherlich beeinträchtigt worden wären, zu verhindern. Diese Mechanismen haben aber einen beträchtlichen Einfluss auf das reduktive Potenzial der Haut, wie im Kapitel 4 gezeigt wurde. Mit diesem Verfahren sollte die antioxidative Gesamtkapazität eines Homogenats quantifiziert werden

Die mit Homogenat und DPPH-Lösung gefüllte Kapillare wurde über einen Zeitraum von 60 Minuten vermessen.

5.2.2 Ergebnisse

Bei allen vermessenen Proben konnte ein Sinken des DPPH-Signals registriert werden, dennoch war das Sinken des DPPH-Signals nicht ausschließlich die Folge einer Reduktion von DPPH. Es zeigte sich, dass DPPH in die Dichtmasse, die zum Abdichten

der Kapillare genutzt wurde, diffundierte und damit ein Absinken der Konzentration verursachte. Zudem war bei einigen Proben ein scheinbarer Anstieg der DPPH-Konzentration zu beobachten. Ursache war ein Ausfallen von DPPH durch die rein wässrige Umgebung und durch Hautpartikel, die als Kristallisationskeime fungierten.

Das Problem mit der Dichtmasse konnte mit dem Zuschmelzen der Kapillare gelöst werden. Die unkontrollierte Kristallisation von DPPH konnte jedoch nicht verhindert werden. Durch Zentrifugation wurde versucht mit dem Überstand des Homogenats weiterzuarbeiten, um Kristallisationskeime aus der Lösung zu nehmen, und damit der Kristallisation entgegen zu wirken. Der Überstand besaß aber nur ein sehr geringes Reduktionsvermögen gegenüber dem DPPH (Daten nicht gezeigt).

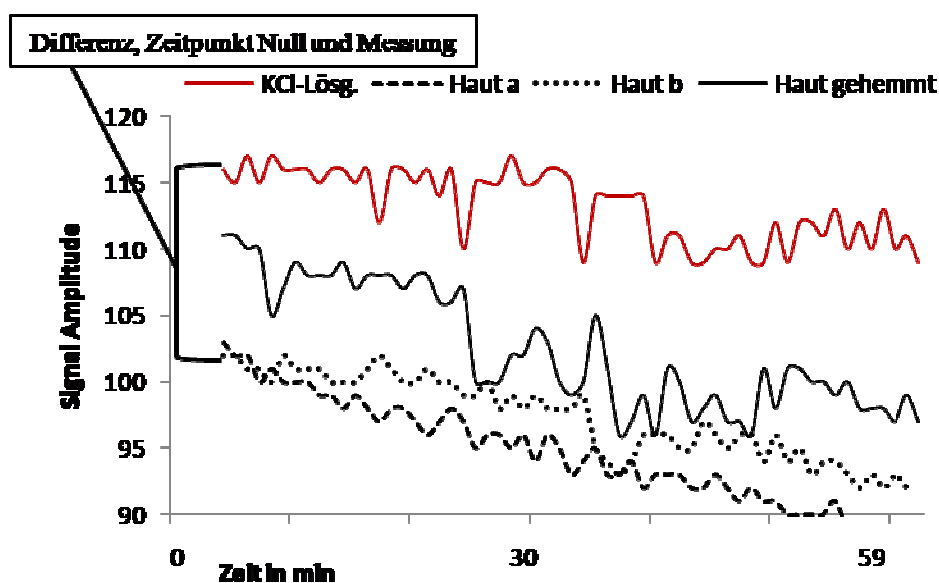


Abbildung 5.5: Verlauf des DPPH-Signals in Abhängigkeit der Zeit, (Bauchhaut, ♀, Geb. Jahr 1968), dargestellt ist die Amplitudendifferenz der Mittellinie des 3-Linien Spektrums, der Abfall der Signal-Amplitude findet schon vor Beginn der Messung statt, deutlich zu erkennen an der unterschiedlichen Anfangs-Amplitude

Wenn keine Kristallisation stattfand, konnte bei dem Hauthomogenat eine erhöhte Reduktionsrate gegenüber der Kontrolllösung festgestellt werden. Zusätzlich konnte eine

Thiolgruppen-abhängige Reduktion des Diphenylpicrylhydrazyls gezeigt werden, durch Vorbehandlung der Hautprobe mit N-Ethylmaleinimid (NEM).

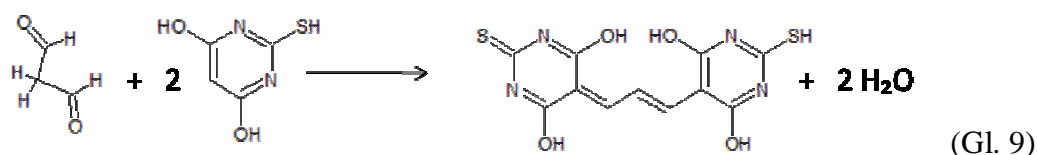
Wie in Abbildung 5.5 angezeigt, erfolgte der Hauptteil der Reduktion schon bevor die Messung gestartet werden konnte, zu Erkennen an der tieferen Anfangsamplitude. Danach war die Abnahme des Signals kaum noch von der Kontrolle zu unterscheiden (erkennbar an der entsprechenden Steigung).

Letzten Endes ließe sich mit dieser Methode, in dieser Form aufgrund der genannten Schwierigkeiten, keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielen. Damit war es auch nicht möglich schädlichen Auswirkungen durch UV-Strahlung zu erfassen. Eine Reduktion von DPPH war zwar messbar, diese war aber sehr stark vom Homogenat abhängig. Es war kaum möglich ein einheitliches Homogenat herzustellen, ohne Hilfsmittel wie Kollagenasen einzusetzen, die das Ergebnis beeinflussen. Zudem ließ sich das Ausfallen von DPPH kaum unterbinden, da der wässrige Anteil der Messlösung zu hoch war. Prinzipiell ließe sich die Löslichkeit von DPPH mit Ethanol erhöhen, dabei würden aber Enzyme in ihrer Aktivität beeinflusst, was das Ergebnis wieder beeinträchtigen würde. Im Laufe der Experimente wurden sukzessive die entstandenen Schwierigkeiten eliminiert, allerdings ließ sich das Hauptproblem, ein reproduzierbares Homogenat herzustellen, nicht beheben.

5.3 Nachweis von Lipidperoxidationsprodukten in Hauthomogenaten

Ein weiteres Verfahren um durch UV-Strahlen verursachte Schäden an exzidiierter Humanhaut zu erfassen, ist die Messung von Lipidperoxidationsprodukten. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Membranphospholipiden der Zellen reagieren empfindlich auf oxidative Prozesse. Oxidantien reagieren dabei mit den Fettsäuren und können über radikalische Zwischenstufen zu Peroxyradikalen führen. Dieser als Lipidperoxidation beschriebene Vorgang kann zur völligen Zerstörung von Zellmembranen führen. Im Rahmen der Lipidperoxidation entstehen Aldehyde, welche weitere reaktive Eigenschaften besitzen und die Molekülstruktur von Proteinen, Enzymen, RNA und

DNA schädigen können (121). Es ist bekannt, dass UVA-Strahlung die Lipidperoxidation z. B. in kultivierten humanen Fibroblasten hervorrufen kann (122). Ein Endprodukt der Lipidperoxidation der Membranlipide ist Malondialdehyd (MDA). Dieses entsteht aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch Reaktion mit einem Peroxyl-Radikal, das danach mit Sauerstoff reagiert und anschließend mit einer Zyklisierung und Fragmentierung endet. MDA kann mit Thiobarbitursäure zu einem roten Azomethinfarbstoff reagieren, photometrisch bestimmt und quantifiziert werden (s. Gleichung 9).



Nachteilig an dieser Methode ist die mangelnde Selektivität der Thiobarbitursäure, diese reagiert auch mit anderen ubiquitär vorhandenen Aldehydgruppen zu farbigen Produkten. Deshalb wird auch meistens die Gesamtheit der thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBARS) bestimmt. Ein spezifischer Nachweis von MDA gelingt durch die chromatografische Trennung der TBARS per HPLC (123). In der vorliegenden Arbeit wurde MDA nach der von *Buege* und *Aust* entwickelten Methode quantifiziert (124).

5.3.1 Versuchsaufbau

Hauthomogenate wurden wie in 3.2.3 beschrieben hergestellt, wobei anfangs die Dichte der Suspension bei 1g Haut pro 9 ml KCl-Lösung lag und später auf 1g Haut pro 3 ml KCl-Lösung erhöht wurde. Nach Zentrifugation des Homogenats wurde mit dem Überstand weitergearbeitet (135). Als Kontrollwert diente unbehandelte und unbestrahlte Haut. Die Hautproben wurden mit einem Sonnensimulator mit einer Dosis von 21 J/cm² (s. 3.3.2) bestrahlt. Diese hohe Energiemenge wurde eingesetzt, weil aus den Experimenten aus 5.1 bekannt war, dass eine solche Dosis eine massive Schädigung der

Zellen hervorruft. Damit sollte gewährleistet werden, dass genügend Thiobarbitursäure reaktive Substanzen zur Detektion zur Verfügung standen.

5.3.2 Ergebnisse

Die ersten Versuchsreihen zeigten zunächst einen leicht erhöhten Wert an TBARS bei bestrahlter Haut gegenüber der Kontrollhaut. Dabei handelte es sich aber um zuvor eingefrorene Haut. Experimente mit Frischhaut konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen. Auch nachdem der Hautanteil und die Strahlungsdauer auf 90 Minuten (63 J/cm²) erhöht wurde, konnten keine auswertbaren Absorptionen gemessen werden weder bei den bestrahlten noch bei unbestrahlten Hautproben.

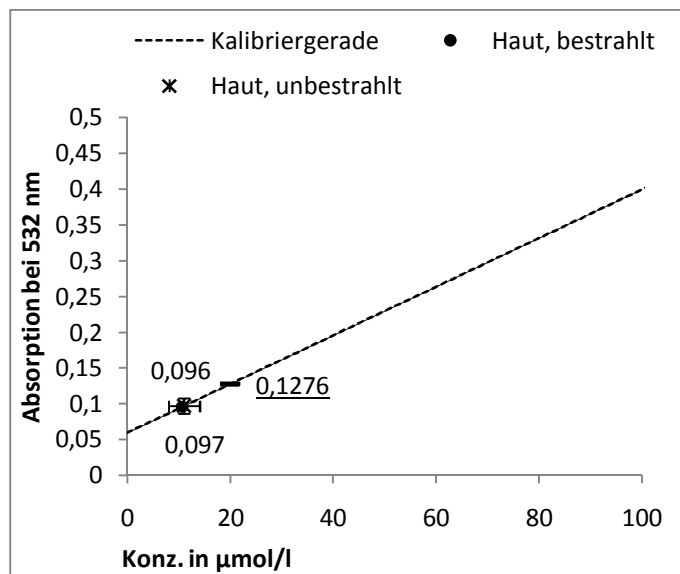


Abbildung 5.6: Verdünnungsreihe der TBARS, unterstrichener Wert entspricht der niedrigsten Verdünnung der Kalibrier-Geraden, Wert für unbestrahlte (oben) und bestrahlte (unten) Haut, beide Werte liegen sehr eng beieinander und unterhalb des kleinsten Wertes der Verdünnungsreihe, n = 3, Bauchhaut, ♀, Geb. Jahr 1971

Wie in dem Diagramm (s. Abbildung 5.6) deutlich dargestellt ist, lag die Absorption der Proben unterhalb der kleinsten für die Kalibriergeraden verwendeten Konzentration, also unter der Bestimmungsgrenze.

Offensichtlich ließen sich in dieser Form keine Lipidperoxidationsprodukte erfassen, die Konzentration an thiobarbitursäurereaktiven Substanzen reichte nicht aus, um eine Quantifizierung durchzuführen. Ursache könnte die Verwendung des Homogenats aus Ganz-Haut (Epidermis- und Dermisgewebe) sein. Da die Oxidation der Membranlipide hauptsächlich in der Epidermis stattfindet, sollte auch nur diese verwendet werden. Die Epidermis lässt sich aber nicht ohne weiteres von der Dermis ablösen. Mit einem Dermatom oder anderen Präpariertechniken wäre es möglich Spalthaut zu erhalten, ohne den Status der Peroxidationsprodukte zu verändern, wie es z. B. durch Hitzeseparation oder enzymatischen Abbau der Fall wäre. Womöglich würden dadurch quantifizierbare Mengen an TBARS erfasst werden. Leider konnten, bis zur Fertigstellung dieser Arbeit, diese Maßnahmen aus Zeitgründen nicht mehr ausgeführt werden.

5.4 Zusammenfassung

Im vorangegangenen Kapitel wurden drei Methoden, unter anderem hinsichtlich ihrer Tauglichkeit als Testverfahren für topisch applizierte Antioxidanten untersucht. Die Ergebnisse sollen nun kurz zusammengefasst werden.

Mit der Sonnenbrandzellen-Methode konnte der protektive Charakter, der zuvor schon in Kapitel 4 getesteten Substanzen, bestätigt werden. Alle verwendeten Substanzen waren in der Lage, Faktoren die zur Entstehung von Sonnenbrandzellen führen, positiv zu beeinflussen. Es konnte allerdings noch nicht geklärt werden, im welchem Rahmen sich diese Einflussnahme bewegt. Reaktive Sauerstoffspezies, die strahlungsbedingt entstehen könnten direkt oder indirekt mit den Nitroxyl-Radikalen und der Ascorbinsäure reagieren, bevor diese mit anderen Bestandteilen der Haut reagieren können. Mechanismen, die eine Apoptose einleiten würden, könnten damit minimiert werden, und damit die erniedrigte Apoptoserate bei den behandelten Hautproben erklären. Vorstellbar wäre auch eine Absorption der Strahlung durch die Radikalfänger, die alle Absorptionsmaxima zwischen

450 und 200 nm besitzen. Eine abschließende Beurteilung ist allerdings erst nach weiteren Untersuchungen mit anderen Radikalfängern möglich.

Die Untersuchung der Hauthomogenate mittels der ESR-Technologie konnte in der angewandten Form schließlich nicht zu den erwarteten Ergebnissen führen. Das Grundproblem der schlechten Löslichkeit von DPPH in wässrigem Medium, konnte nicht endgültig gelöst werden. Es konnte zwar eine messbare Reduktion von DPPH in den Hautproben festgestellt werden, diese war aber sehr stark von der Konsistenz des Homogenats abhängig. Eine Trennung des kollagenhaltigen Gewebes wäre eine Möglichkeit das Resultat zu verbessern.

Mit der Quantifizierung von Lipidperoxidationsprodukten verhält es sich ähnlich, auch in diesem Fall wäre es sicherlich notwendig die oberen Hautschichten von den tieferen zu trennen. Da die Oxidation der Membranlipide hauptsächlich in der Epidermis stattfindet, sollte auch nur diese verwendet werden, um eine Konzentrierung der Peroxidationsprodukte zu erreichen. Mit einem Dermatom könnte so eine Trennung zum Teil gelingen. Eine vollständige Trennung der Epidermis von der Lederhaut, lässt sich damit aber, wegen der papillenartiger Struktur, nicht durchführen. Leider konnten diese Überlegungen, bis zur Fertigstellung dieser Arbeit, nicht mehr praktisch umgesetzt werden.

Kapitel 6

6. ESR-Tomografie mit exzidiierter Humanhaut

Mit der Elektronenspinresonanz-Tomografie steht eine einzigartige Methode zur Verfügung Radikale, in diesem Fall Nitroxyl-Radikale, nicht-invasiv in einem Gewebe zu detektieren. Das zu vermessende Material bleibt dabei vollkommen intakt und somit unbeeinflusst von der Messung. Durch die räumliche Darstellung ist es möglich ein Verteilungsprofil der Spinsonde in dem Gewebe zu erstellen. Bei der ESR-Tomografie handelt es sich um eine spezielle Form der ESR-Spektroskopie. Statt ein einziges Spektrum von der ganzen Probe zu nehmen, werden von der Probe mehrere Projektionen mit einer räumlichen Kodierung aufgenommen (s. Kapitel 3) und später zu einem dreidimensionalen Spektrum rückkonstruiert (s. Abbildung 6.1).

An dieser Stelle muss auf Beschränkungen für den Einsatz der ESR-Spektroskopie und Tomografie hingewiesen werden. Biologische Proben enthalten gemäß ihrer Natur meist größere Mengen Wasser bzw. Elektrolyt-Lösungen, die wiederum aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften Mikrowellenstrahlen absorbieren und in Wärme umwandeln. Diese zu Detektion eines Signals erforderliche Mikrowellenenergie wird also vermindert und verringert so die Signalintensität. Diesen Umstand kann man nur durch Verminderung der Probenmenge (Reduzierung der Probengröße) und Probenpositionierung (im Nulldurchgang der E-Feld-Phase der Mikrowellenschwingung) begegnen. Darüber hinaus ist für den Einsatz der ESR-Tomografie nachteilig, dass die Signalintensität des ESR-Spektrums über die räumliche Ausdehnung des zu untersuchenden Objekts verteilt wird und damit zu einer Verringerung des Signal-Rausch-

Verhältnisses führt. Diesem Umstand kann man im wesentlichen durch Erhöhung der eingesetzten Spinsondenkonzentration abhelfen.

Die Höhe der Konzentration einer Spinsonde, die letztendlich in die Haut eindringt, hängt von mehreren Faktoren ab, der

- **Art der Applikation**
- **Höhe der Ausgangskonzentration**
- **Reaktion des Nitroxylradikals mit den antioxidativen Systemen der Haut**
- **physikochemischen Eigenschaften der Spinsonde selbst.**

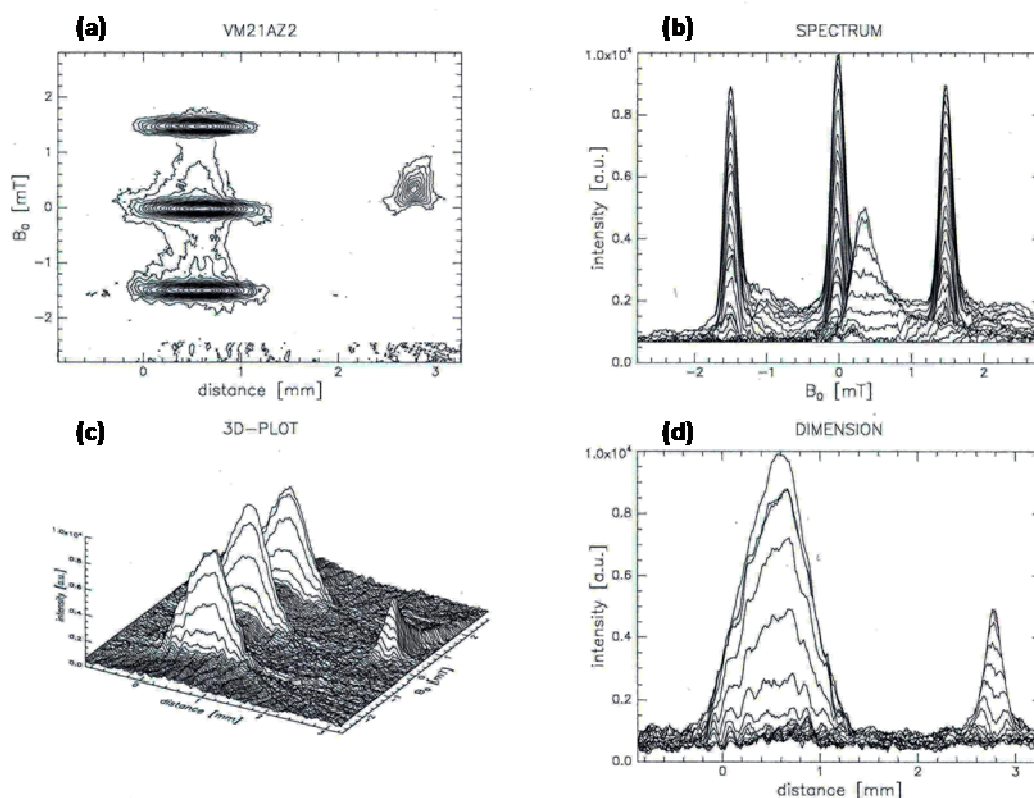


Abbildung 6.1: 3-Linien-Signal eines Nitroxids und 1-Linien-Signal des DPPH-Kristalls; a) räumliche Ansicht von oben, b) spektrale Auflösung (1-Linien-Signal vorne), c) 3-D Ansicht, d) räumlich Auflösung von der Seite

Im folgenden Kapitel sollten die Versuchsbedingungen und Parameter für die späteren Bestrahlungsexperimente festgelegt werden. Dabei galt es ein besonderes Augenmerk auf die oben genannten Faktoren zu legen. Außerdem sollte die Anzahl, der am Ende eingesetzten Nitroxyl-Radikale eingegrenzt werden.

6.1 Auswahl eines geeigneten Applikationsweges und der -form

Applikationsweg

Für das Einschleusen von Substanzen in exzidierte Humanhaut gibt es im Grunde genommen nur drei Möglichkeiten, von der Dermis-Seite, der Epidermis-Seite oder einer Kombination aus beidem.

Von der Dermis-Seite wäre die Aufnahme über das Nährmedium, auf dem die Hautprobe lagert, möglich. Dieser Weg würde auch der natürlichen Transportrichtung von körpereigenen Stoffen und manchen Arzneistoffen entsprechen. Allerdings ist die Konzentration an Wirkstoff die in *ex vivo*-Experimenten erreicht werden *in vivo* kaum nachzuahmen. Zudem beschränkt das wässrige Medium den Einsatz vieler lipophiler Substanzen.

Die zweite Möglichkeit besteht darin, die Wirkstoffe in Lösung oder als Suspension mit einem geeigneten Trägermaterial in die Epidermis eindringen zu lassen. Da die oberen Hautschichten als äußere Barriere so aufgebaut sind, dass sie das Eindringen von Fremdstoffen verhindern, spricht gegen diesen Weg. Andererseits ist es mit einer Vielzahl an geeigneten Trägermaterialien möglich, die Hornschicht so zu beeinflussen, dass z. B. Arzneistoffe eindringen können. Eine lange Einwirkzeit lässt sich dadurch aber meistens nicht verhindern. Um die Einwirkzeit erheblich zu verringern, bestünde noch die Möglichkeit das Stratum Corneum zu entfernen, was als sogenanntes "tape stripping" (48) bekannt ist, jedoch würde das den nativen Zustand der Haut beeinträchtigen.

Durch die Kombination beider Wege bliebe das Tauchen der Hautprobe in eine Wirkstofflösung als dritte Möglichkeit. Zweifellos ist die Eindringgeschwindigkeit und Konzentration des Wirkstoffs im Gewebe hier am höchsten. *Herrling et al.* (125-127)

schleusten mit dieser Methode Nitroxyl-Radikale in die Haut, doch verwendeten sie dafür ethanolhaltige Lösungen, die zum einen zytotoxisch wirken und zum anderen antioxidative Enzyme denaturieren können. Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine Unterstützung der antioxidativen Systeme zu erreichen, weshalb dieses Verfahren nicht in Betracht kam. *Hochkirch (57)* konnte hohe Konzentrationen an Spinsonde in die Haut befördern, diese wurden aber mit Tauchversuchen von Nitroxiden in wässrigen Lösungen erzielt. Die schlechte Löslichkeit von einigen verwendeten Nitroxyl-Radikalen limitierte die Verwendung dieses Verfahrens.

Für das Ziel dieser Arbeit, Nitroxide auf ihre protektive Wirkung zu prüfen, bietet die epikutane Applikation letztendlich die besten Voraussetzungen und wurde deshalb verwendet.

Formulierung

Die Effektivität einer Formulierung hängt maßgeblich von drei Faktoren ab,

- **von den Eigenschaften des Wirkstoffs**
- **von den Eigenschaften des Vehikels**
- **vom Zustand der Haut**

Da es nicht die Zielstellung dieser Arbeit war eine neue Formulierung zu entwickeln, wurde auf ein schon bestehendes Trägermaterial zurückgegriffen, das alle geforderten Ansprüche erfüllte.

Da die physikochemischen Eigenschaften der eingangs gewählten Nitroxyl-Radikale, sehr unterschiedlich waren, fiel die Wahl auf eine Mikroemulsion. Dadurch konnten alle in Lösung gehalten und damit vergleichbare Ausgangsbedingungen geschaffen werden. Die Verwendung des als Standardantioxidans verwendeten Ascorbinsäurepalmitat in Kapitel 4 machte es notwendig eine Mikroemulsion zu nutzen, die mit dieser Substanz schon getestet wurde. *Jurcovic et al. (42)* konnten mit einer von ihnen entwickelten Formulierung gute Ergebnisse erzielen, weshalb jene Mikroemulsion für diese Arbeit übernommen wurde (s. Kapitel 3.1.2).

6.2 Nitroxyl-Radikale in exzidiierter Humanhaut nach epikutaner Applikation

Es ist bekannt, dass die Epidermis als äußeres Begrenzungsorgan ständig mit exogenen Noxen in Kontakt kommt und diese durch ein Netzwerk an unterschiedlichen antioxidativen Systemen, sei es enzymatischer oder nicht-enzymatischer Natur, unschädlich macht (128, 129). Die verwendeten Nitroxyl-Radikale sind diesen Systemen auch ausgesetzt und werden nach dem Eindringen in die Haut zum Teil zu den korrespondierenden Hydroxylamin und weiter bis zum sekundären Amin reduziert (57, 130). Das Ausmaß dieser Reduktion hängt sehr stark von der Struktur und dem Aufenthaltsort der Spinsonde ab. Es wurde berichtet (131), dass das höchste reduktive Potenzial im Inneren der Zelle vorzufinden ist, daher sind Spinsonden, die in den intrazellulären Raum eindringen können einer höheren Bio reduktionrate ausgesetzt als Sonden die sich im extrazellulären Raum aufhalten.

6.2.1 Entwicklung der Parameter für die Applikation der Nitroxide auf der Haut

Nachdem eine Mikroemulsion als Darreichungsform gewählt wurde, blieb nur noch die Frage zu klären, wie lange die Formulierung auf die Haut einwirken soll, um eine optimale Verteilung und Konzentration in der Haut zu erreichen. Dafür wurden die Hautstanzen unterschiedlich lang mit der wirkstoffhaltigen Mikroemulsion behandelt.

Als Standardformulierungsmenge wurde nach zahlreichen Vorversuchen 50 µl einer 0,1 molaren Nitroxid-Mikroemulsionslösung für die topische Applikation gewählt. Diese Menge war ausreichend, um die Hautstanzen optimal zu benetzen, ohne dabei über den Hautrand zu fließen. Die Formulierung wurde auf ein Hautstanze (Ø 20 mm) aufgetragen und bei 34°C inkubiert. Nach 60, 180 und 360 Minuten wurde die Formulierung entfernt und die Hautstanze für die Vermessung im Resonator vorbereitet (s. Kapitel 3.3.3).

Ein steady state-Zustand trat nach einer Einwirkdauer von drei Stunden ein. Eine längere Einwirkzeit brachte keine weitere Erhöhung der Nitroxid-Konzentration in der Haut. (s. Abbildung 6.2).

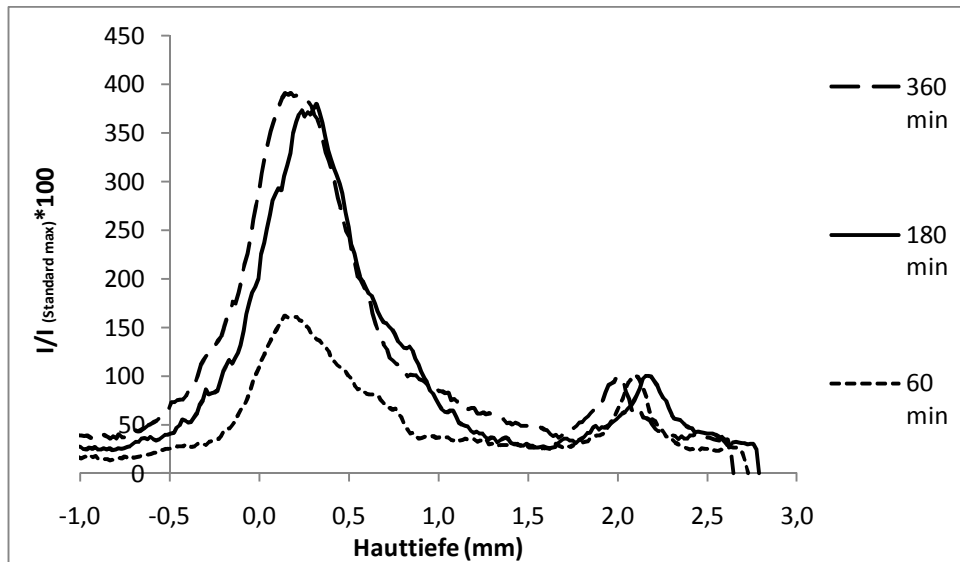


Abbildung 6.2: Intensitätsprofile über die Hauttiefe von mit TEMPOL behandelter Haut (Bauch, ♀, Geburtsjahr 1968), rechts das Signal vom Standard DPPH, links die mittleren Peaks des 3-Linien Signals von TEMPOL nach unterschiedlicher Einwirkdauer. Auf der Ordinate ist die Intensität des mittleren Nitroxid-Peaks dargestellt, normiert auf den Intensitätspeak des Standards DPPH.

Diese Voruntersuchungen wurden alle mit TEMPOL durchgeführt, da es sich sehr früh herausgestellt hatte, dass diese Sonde eine ausreichend hohe Penetration zeigte, um detektiert zu werden. Die optimale Einwirkzeit wurde später, bei der Auswahl der letztendlich verwendeten Nitroxide, bestätigt.

6.3 Eingesetzte Nitroxide

Nachfolgend sollten die, für die Untersuchungen ausgewählten Nitroxyl-Radikale mit Piperidin- bzw. Oxazolidininstruktur kurz charakterisiert und ihre Auswahlkriterien dargestellt werden. Alle eingesetzten Verbindungen verfügen über ein ungepaartes Elektron und sind somit paramagnetisch. Aus den Strukturen der verwendeten Spinsonden ergeben sich entsprechende Unterschiede in Bezug auf ihre Lipophilie, die für das Eindringen in die Haut von besonderer Bedeutung ist. Als Maß für die Lipophilie der verwendeten Nitroxyl-Radikale kann der n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient herangezogen werden. Den kleinsten Verteilungskoeffizienten der verwendeten Spinsonden weist CAT-1 auf. Für diese war aufgrund ihrer positiven Ladung eine geringe Membrangängigkeit zu erwarten. Es war schon gelungen größere Mengen an CAT-1 in exzidierte Humanhaut zu befördern, allerdings waren das hauptsächlich Tauchversuche (57). Bei *Moll* (54) gelang dies durch den Einsatz von Liposomen, jedoch nur durch die Hemmung der Hautproben mit einem SH-Reagenz. Mit dieser Maßnahme konnte der oxidative Abbau von CAT-1 zu ESR-stummen Verbindungen zum größten Teil verhindert werden.

TEMPOL ist eine amphiphile Sonde, die aufgrund ihres Verteilungskoeffizienten und ihrer Molekülstruktur eine unterschiedlich stark ausgeprägte Affinität zu den Lipiddoppelmembranen der unterschiedlichen Hautschichten aufweist. Während bei angestrebten Effekten auf der Hautoberfläche eine Fixierung der Wirkstoffe auf bzw. in der oberen Hornschicht und eine geringe Penetration der Hornschichtbarriere erwünscht ist, sollte bei Topika zum Schutz vor Strahlenschäden, die meist in der Epidermis und in der oberen Dermis lokalisiert sind, eine hohe Verfügbarkeit in diesen Bereichen gewährleistet sein. Demzufolge sollte im Idealfall, die Diffusion so gesteuert werden, dass ausreichende Nitroxid-Konzentrationen am Wirkort erzielt werden. Der Übergang in die gefäßtragenden Teile der Dermis sollte jedoch langsam genug erfolgen, um unerwünschte systemische Wirkungen zu vermeiden. Es wurde schon mehrfach gezeigt, dass TEMPOL, topisch eingesetzt, in Humanhaut eindringt. Der amphiphile Charakter und die relativ

kleine Größe des Moleküls sind offensichtlich die optimalen Voraussetzungen, um in die Haut einzudringen und sich dort zu verteilen.

Das Nitroxylradikal **Doxylpalmitinsäure** (DPS) ist die lipophilste von den eingesetzten Substanzen und ist durch ihre langgestreckte Molekülform eher im Nachteil zu den oben genannten Nitroxyl-Radikalen, da es dadurch langsamer in die Haut diffundiert und damit nicht die Konzentration erreicht wie kleinere Moleküle. Allerdings ist der Umstand, dass Palmitinsäure in hohen Konzentrationen in den Phospholipiden der Haut vorkommt von Vorteil, da sich dort DPS im günstigsten Fall anreichert.

Das Nitroxylradikal **Doxylhexansäuremethylester** wurde eigens für diese Arbeit entworfen und synthetisiert (s. Kapitel 3.4), da es sich im Laufe der Untersuchungen mit den unterschiedlichen Spinsonden herausgestellt hatte, dass Doxylpalmitinsäure nicht den erwünschten Effekt hatte. Die neue Substanz sollte den Charakter einer amphiphilen Sonde wie TEMPOL haben und gleichzeitig die langgestreckte Molekülform einer Fettsäure besitzen, um sich in den Lipiddoppelmembranen besser einzufügen.

Als letztes sei noch ein Derivat von TEMPOL, das **TEMPOL-Benzooat** zu nennen, welches einen n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten von über 100 hat (59) und damit sehr lipophil ist. Ähnlich wie DPS diffundiert diese Substanz, wenn sie in einer Formulierung gelöst vorliegt nur sehr langsam in die Haut. Die sehr geringe Konzentration machte es sehr schwer das Radikal in der ESR zu detektieren, da zu der kleinen Signalintensität noch die Dämpfung durch die Hautprobe dazukam.

6.4 Auswahl der Nitroxide

Von den fünf getesteten Nitroxyl-Radikalen, konnten sich nur TEMPOL und DHME durchsetzen. Zum einen, aufgrund der positiven Ergebnisse aus den parallel stattfindenden Rasteruntersuchungen mit den Diffusionszellen, und zum anderen, weil die Detektion dieser Substanzen in der ESR-Tomografie optimal waren, um sie später auch quantifizieren zu können. Die Spinsonden Doxylpalmitinsäure und CAT-1 zeigten gegenüber DPPH ein gutes Reduktionsvermögen (s. Kapitel 4.7.2), auch hatten beide eine positive Wirkung auf die Entstehung von Sonnenbrandzellen (s. Kapitel 5.1), sie waren aber aufgrund

unterschiedlicher Ursachen, sehr schwer bis gar nicht in den ESR-Messungen zu detektieren. Weiterführende Untersuchungen mit Haut, bei der das Stratum Corneum entfernt wurde zeigten, dass die Penetration von DPS durch diese Barriere der geschwindigkeitsbestimmende Schritt war (Daten nicht gezeigt). Die sehr sperrige Molekülform und die damit verbundene geringe Mobilität, macht es für ESR-Untersuchungen zusätzlich schwer. Eine geringe Beweglichkeit verursacht eine Verbreiterung des 3-Linien-Spektrums, mit kleiner werdender Intensität. Zur Abschätzung der Signalintensität **I** dient die Beziehung,

$$\mathbf{I} = \Delta \mathbf{Hpp}^2 \times \mathbf{Amplitude}$$

Δ Hpp: Peak-to-Peak-ESR-Linienbreite

Aus ihr ist ersichtlich, dass die Signalamplitude bei Linienverbreiterung stark abnimmt und sich damit das Signal-Rausch-Verhältnis, insbesondere in der ESR-Tomografie, ungünstig gestaltet. Die ohnehin schon geringe Signalstärke geht damit im Grundrauschen unter. Bei CAT-1 verhält sich die Situation etwas anders, es ist bekannt (57), dass das Nitroxid bei Experimenten in denen die Haut getaucht wurde, eine sehr gute Verteilung im gesamten Gewebe stattfindet. Das Stratum corneum ist für das polare Nitroxyl-Radikal CAT-1 eine schwer überwindbare Barriere. Hier wäre eine Formulierung, die penetrationsfördernde Wirkung für polare Stoffe beinhaltet wie z. B. Propylenglykol oder Dimethylsulfoxid, geeigneter. Dies würde aber eine Vergleichbarkeit zwischen den anderen Nitroxiden unmöglich machen.

TEMPOL-Benzolat konnte schon im Vorfeld bei den Raster Untersuchungen aus Kapitel 4, aufgrund von Wirkungslosigkeit ausgesondert werden. Zudem war die Signalintensität der vermessenen Proben nicht vom Grundrauschen zu unterscheiden, was eine Detektion der Sonde aussichtslos machte. Damit hatte sich die oben (s. Kapitel 6.3) genannte Vermutung bestätigt, dass die Sonde, zumindest mit der verwendeten Formulierung, nur in sehr geringen Umfang in die Haut eindringt.

Zusätzlich zu den hervorragenden Penetrations- und Verteilungseigenschaften von TEMPOL und DHME, zeigten beide über die gesamte Mess-Zeit und darüber hinaus eine hohe Stabilität gegenüber den reduktiven Systemen der Haut. Eine Tatsache, die für die anschließenden Bestrahlungsexperimente von entscheidender Bedeutung war.

6.5 Ergebnisse der ESR-Untersuchungen an Nitroxid-beladenen Hautproben

6.5.1 Einfluss der Spenderhaut auf die Verteilung und das Ausmaß der Bio-reduktion der Nitroxide durch hauteigene Mechanismen

Bei der Verwendung der ESR-Tomografie war zu beachten, dass tomografische Aufnahmen einen erheblichen Zeitaufwand darstellten. Es war natürlich zu erwarten, dass die Radikale nach der Applikation ständig in Kontakt mit den antioxidativen Systemen der Haut bleiben würden und im Laufe der Messung die Konzentration sinken würde. *Hochkirch* konnte anhand von ESR-Untersuchungen mit unterschiedlichen Nitroxyl-Radikalen diesen Sachverhalt auch bestätigen. Die Reduktion der Radikale im Gewebe geht wie erwartet weiter, war jedoch abhängig von dem jeweiligen Nitroxid. Offensichtlich zeigen Nitroxide mit steigender Lipophilie auch eine gesteigerte Reduktionsrate. Zu erklären war dies durch die bessere Zellgängigkeit von Stoffen mit steigender Lipophilie und damit einem gesteigerten Kontakt mit intrazellulären Reduktionsmitteln (87).

In Kapitel 4 konnte schon gezeigt werden, dass sich ein Großteil des reduktiven Potenzials der oberen Hautschichten durch SH-Reagenzien hemmen lässt, wobei nicht geklärt wurde ob diese antioxidativen Systeme intra - oder extrazellulär zu finden sind. Dennoch ist zu vermuten, dass die Mehrheit der thiolgruppenabhängigen Systeme intrazellulär oder in lipophilen Bereichen der Haut zu finden ist, da die Reduktion des sehr hydrophoben Modellradikals DPPH durch SH-Reagenzien überwiegend verhindert wurde.

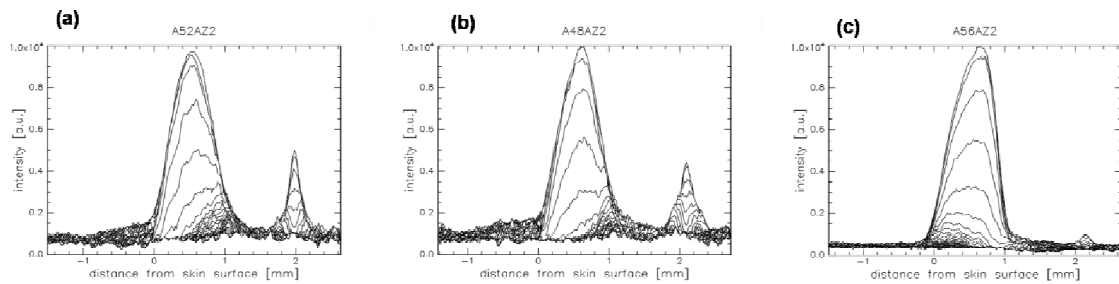


Abbildung 6.3: Drei mit TEMPOL behandelte Hautproben, (a) ungehemmt, (b) mit NEM gehemmt und (c) mit Iodacetamid gehemmt, die Signalintensität des Nitroxid-Radikals wird relativ zum Standard-Peak (rechter Peak im Diagramm) von (a)-(c) immer größer

Auch bei den ESR-Untersuchungen konnte ein sehr starker Einfluss von SH-gruppenabhängigen Antioxidantien gezeigt werden, die an der Reduktion der Nitroxide beteiligt waren. Dabei war Iodacetamid, als eines der SH-Reagenzien, deutlich wirksamer als N-Ethylmaleinimid (s. dazu auch Abbildung 6.3).

Durch Hemmung der Enzyme können sich die Nitroxyl-Radikale, ohne dass sie zu ESR-stummen Verbindungen reduziert werden, im Gewebe verteilen. Ein Teil der antioxidativen Systeme bleibt selbstverständlich von den SH-Reagenzien unbeeinflusst, wie Ascorbinsäure oder α -Tocopherol. Bei der Reduktion von ROS oder von Nitroxiden, handelt es sich um ein komplex ineinander greifendes Netzwerk von Enzymen und niedermolekularen Antioxidantien. Diese sind in Zyklen miteinander verbunden, die zum Teil oxidierte Verbindungen wieder regenerieren und nicht direkt mit ROS reagieren. Das bedeutet, es würde genügen wenn ein Bestandteil dieses Kreislaufs nicht funktioniert, um den Ablauf zu stören.

Um in den folgenden Untersuchungen das Verhalten von den Nitroxiden DHME und TEMPOL besser einschätzen zu können, sollten Hautproben von unterschiedlichen Spendern miteinander verglichen werden. Aus den parallel stattfindenden Untersuchungen aus Kapitel 4 war bekannt, dass die antioxidative Kapazität individuellen Schwankungen unterliegt, jedoch unabhängig vom Alter des Spenders ist. Sehr informativ wäre noch, wie

sich die Penetration der Nitroxyl-Radikale bei Hautproben unterschiedlicher Spender verhält. Um eine größtmögliche Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurde darauf geachtet immer weibliche Bauchhaut vom Hauttyp III zu verwenden. Mikroskopische Untersuchungen (s. Kapitel 3) an Hautproben haben gezeigt, dass die Dicke der Epidermis in der Bauchregion bei durchschnittlich 50 μm und bei der Hornschicht bei 20 μm liegt, wobei die Spanne sehr klein war. Vor allem die enge Spannweite beim Stratum corneum ist für das Eindringen in die Haut von Bedeutung, da diese Barriere den geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Diffusion darstellt.

DHME

Die Schwankungen in der Konzentration des Nitroxids DHME innerhalb eines Spenders waren sehr gering. Betrachtet man jedoch die Intensitätsprofile der Spender untereinander, zeigten sich größere Unterschiede (s. Abbildung 6.4 a). Auf diese Weise ließen sich die Ergebnisse aus Abschnitt 4.6.1 und 4.2 bestätigen, die ein ähnliches Bild vom Reduktionsvermögen der Haut wiedergaben.

TEMPOL

Das Radikal TEMPOL zeigte ein vergleichbares Bild (s. Abbildung 6.4 b). Innerhalb einer Spenderhaut liegen die Peak-Maxima eng beieinander und zwischen den Spendern schwanken die Werte etwas. Dabei war zu beobachten, dass in Hautproben, in denen hohe Konzentrationen von TEMPOL zu detektieren waren, auch hohe Konzentrationen an DHME zu finden waren.

Da sich die Bedingungen für die Penetration der Nitroxide zwischen den Hautproben, bezüglich Hautdicke und Region ähnelten, lassen die Ergebnisse vermuten, dass die Unterschiede der Konzentrationen zwischen den Spenderhäuten hauptsächlich durch unterschiedlich stark agierenden antioxidative Systeme der Haut verursacht wurde.

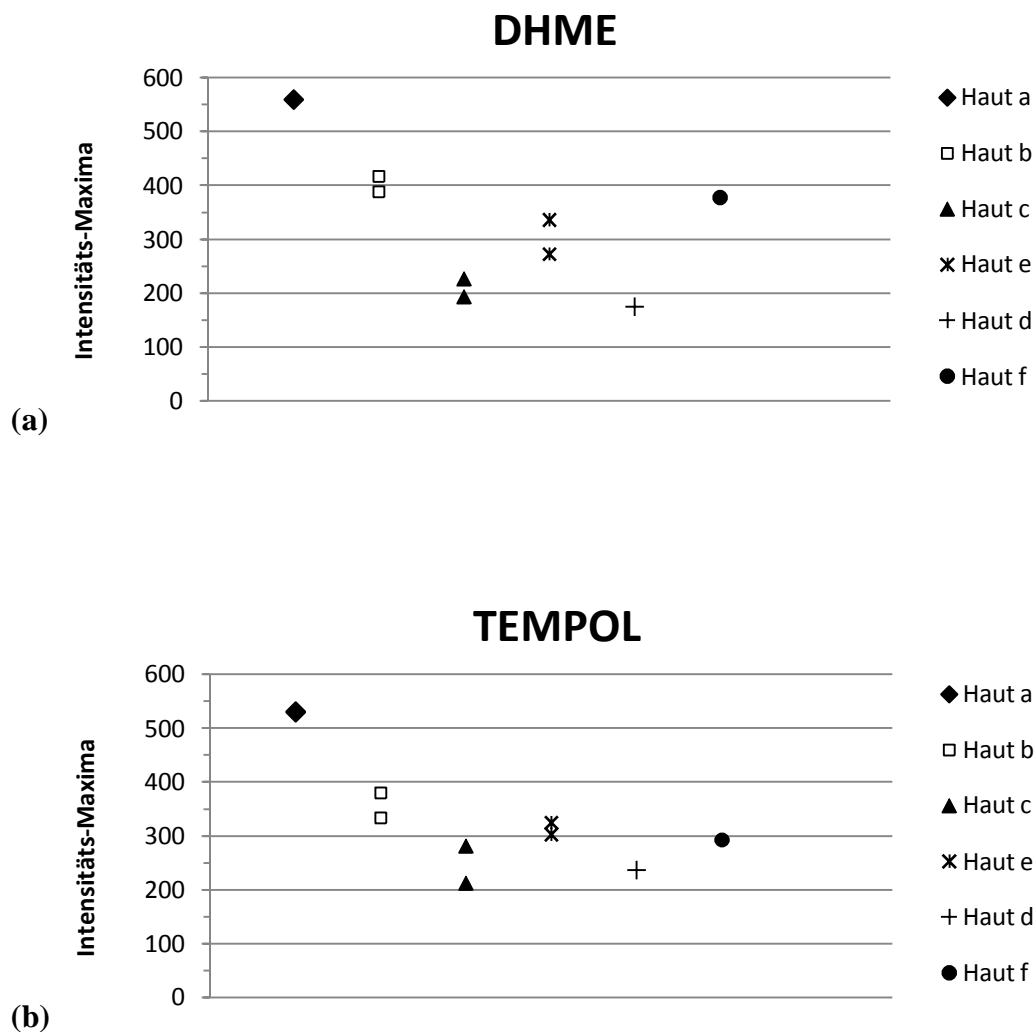


Abbildung 6.4: Signalintensität des mittleren Signals des 3-Linien-Spektrums von (a) DHME bzw. (b) TEMPOL beladenen Hautproben unterschiedlicher Spender a bis f; n=1-2, (Bauchhaut, ♀, Geburtsjahr, a: 1967, b: 1972, c: 1971, d: 1968, e: 1967, f: 1954)

6.5.2 Verteilung der Nitroxide DHME und TEMPOL in Humanhaut

Mit der ESR-Tomografie war es möglich, die Verteilung der einzelnen Nitroxide in der Haut zu verfolgen und zu quantifizieren. Zahlreiche Untersuchungen mit den Nitroxyl-

Radikalen CAT-1 und TEMPO wurden dazu von *Hochkirch* gemacht, die zeigten, dass die Polarität und Größe der verwendeten Substanzen ausschlaggebend für die Verteilung und Anreicherung in den unterschiedlichen Hautschichten war. Gleichzeitig wurde auch ein Polaritätsprofil der oberen Hautschichten, durch die Auswertung der Hyperfeinaufspaltung, angefertigt (57, 54). Allerdings lassen sich diese Daten nur bedingt für diese Arbeit nutzen, da die Hautproben durch tauchen in eine Nitroxid-Lösung beladen wurden und nicht wie in vorliegender Arbeit durch topische Applikation. Durch das Tauchen dringt die Spinsonde hauptsächlich durch die Unterseite der Haut ein und geht dabei bedingt durch Quellung der Haut andere Wege als durch die äußere Applikation.

Wie schon erwähnt, stellte sich nach drei Stunden Einwirkdauer ein steady state Zustand ein. Offensichtlich wurden Nitroxide bei der Passage durch die Zellschichten solange durch hauteigene antioxidative Systeme reduziert, bis sie sich in Bereichen sammelten, an denen sie vor weiterer Reduktion geschützt waren. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass eine weitere Erhöhung der Einwirkzeit keinen nennenswerten Einfluss mehr hatte, weder auf das Verteilungsprofil noch auf die Konzentration.

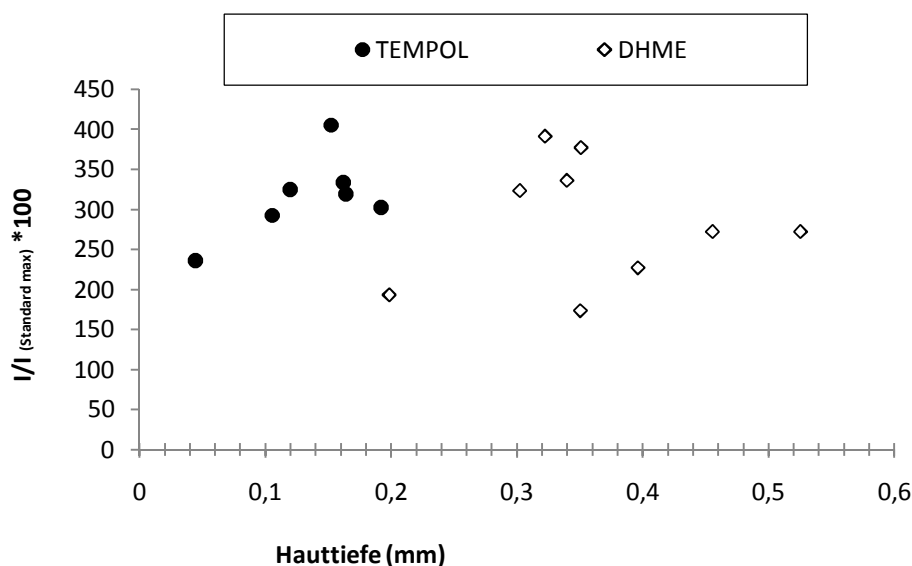


Abbildung 6.5: Verteilung der auf den Standard normierten Signalintensitäten des mittleren Signals des 3-Linien-Spektrums, im Verhältnis zur Hauttiefe, (Bauchhaut, ♀, Geburtsjahr: 1967-1982)

Durch Einbeziehung der Ergebnisse aus den mikroskopischen Untersuchungen und der Verteilungsprofile der ESR-Tomogramme konnte jedoch eine Aufenthaltswahrscheinlichkeit für die Radikale in den einzelnen Hautschichtenermittelt werden (s. Abbildung 6.5).

In Verbindung mit den Dickenbestimmungen aus den mikroskopischen Untersuchungen, sammelt sich TEMPOL bevorzugt in den tieferen Bereichen der Epidermis und DHME in oberen Bereichen der Dermis. Durch die papillenartige Struktur der Epidermis, ragen Teile der epidermalen Papillen bis weit in die Dermis hinein (bis zu 200 μm , Daten nicht gezeigt). Damit ist eine Überschneidung beider Hautschichten nicht zu vermeiden. Außerdem besteht die Oberflächenbestimmung mit Hilfe der Kohlemessung in der ESR aus gemittelten Werten, da die Hautoberfläche keine ebene Fläche darstellt.

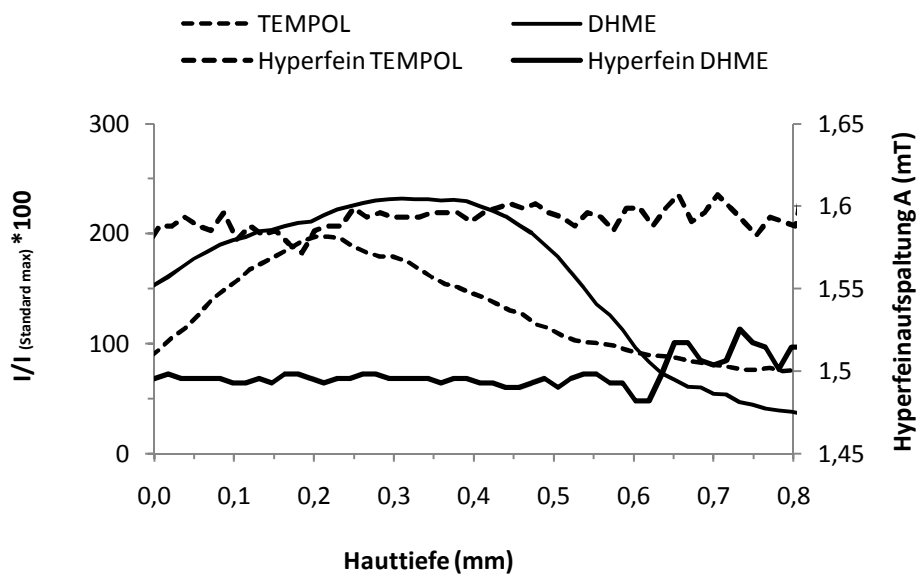


Abbildung 6.6: Intensitätsprofil von TEMPOL (gestrichelte Linie) bzw. DHME (durchgezogene Linie) über die Hauttiefe und entsprechende polaritätsabhängige Hyperfeinaufspaltung; n = 2, (Bauchhaut, ♀, Geburtsjahr 1952)

Zusätzlich zur Verteilung der Nitroxide in der Haut, war es möglich, die Polarität des umgebenden Gewebes der Radikale abzuschätzen. Dabei wurde die Hyperfeinaufspaltung des 3-Linien Spektrums über die Hauttiefe betrachtet. Offensichtlich hielt sich das hydrophilere TEMPOL in einer polarerer Umgebung, als der Methylester (DHME), auf. Zu erkennen an der größeren Hyperfeinaufspaltung (s. Abbildung 6.6).

Beide Radikale halten sich zwar eindeutig in gleichen Hautschichten auf, sind aber auf molekularer Ebene offensichtlich in unterschiedlichen Bereichen zu finden. Mögliche Bereiche unterschiedlicher Polarität wären z. B. außerhalb und innerhalb der Lipiddoppelschichten (außerhalb, TEMPOL; innerhalb, DHME) und in den Zellen, also im Zytosol (TEMPOL).

6.5.3 Quantifizierung der Nitroxyl-Radikale in der Haut

Um eine Aussage über die Stoffmenge der Nitroxide zu geben, die in der Haut verteilt sind, muss zunächst der Standard DPPH quantifiziert werden. Dafür wurde die Methode von *Hochkirch et al.* (70) verwendet. Danach enthielt der DPPH-Kristall auf dem Quarzträger ein Gesamtgewicht an freiem Radikal von 0,64 µg. Mit der bekannten Spinkonzentration an DPPH wurden anhand der Signalintensitäten der Nitroxyl-Radikale deren Stoffmasse ermittelt. Bei TEMPOL ergaben die Berechnungen Stoffmengen von 25 bis 56 nmol, bei DHME 30 bis 56 nmol, die in den vermessenen Proben, als freies Radikal vorlagen.

6.5.4 Einfluss des DPPH Standards auf die Auswertung der ESR-Tomogramme

Der Referenzstandard Diphenylpicrylhydrazyl fungiert zum einen als äußere Begrenzung um nachträglich die Ausmaße der Probe zu bestimmen (s. Kapitel 3.3.3) und zum anderen diente er zur Quantifizierung der Spinsonde in der Probe (s. Kapitel 3.3.4). Die Konzentration des DPPH-Dot sollte so gewählt werden, dass die Anzahl der Spins der

Probe und des Standards auf einem ähnlichen Niveau liegen. Üblicherweise wird die Spinsonden-Konzentration erhöht oder erniedrigt, um ein vergleichbares Niveau zu erhalten. Dabei handelt es sich aber meistens um Lösungen die in ihrer Konzentration leicht zu modifizieren sind. In diesem Fall ist die Menge an Nitroxid die in die Haut inkorporiert wurde sehr gering, da Nitroxide in Haut den reduktiven Systemen ausgesetzt waren und weil durch die Barriere-Eigenschaften der Hornschicht nur sehr langsam Sonde nachdiffundiert. Außerdem war die Signalintensität, durch den hohen Dämpfungswert den eine Hautprobe besitzt, deutlich verringert.

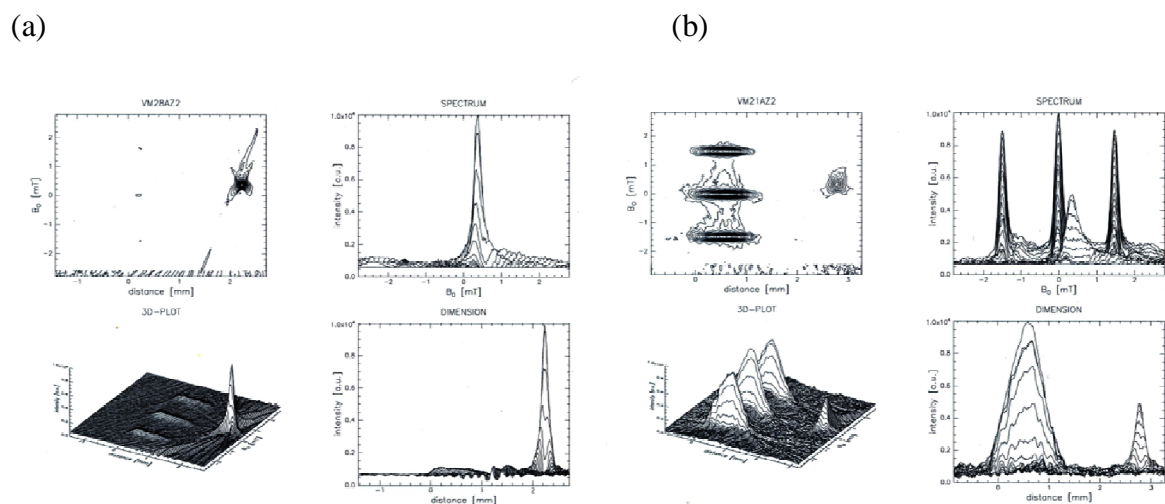


Abbildung 6.7: TEMPOL behandelte Haut (3h) mit (a) großem DPPH-Dot (b) angepasstem DPPH-Dot; 1-Linien-Signal: DPPH, 3-Linien-Signal: TEMPOL

Die Auswertung eines solchen Spektrums wäre fehlerbehaftet und ungenau. Deutlich wird diese Problematik in Abbildung 6.7, auf der zwei ESR Tomogramme mit zwei unterschiedlich großen DPPH-Dots dargestellt sind.

Obwohl sich in beiden Hautproben eine ähnliche Konzentration an Nitroxyl-Radikal befand, war die Signalintensität der Spinsonde in 6.7a kaum vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden. In 6.7b ist ein deutlich kleinerer DPPH-Peak zu erkennen, der damit eine Auswertung sowohl der Menge an Nitroxid als auch des Verteilungsprofils des Nitroxids

in der Haut ermöglichte. Der DPPH-Dot in Abbildung 6.7a ist damit zwar für Hautproben adäquat die in eine Nitroxid-Lösung getaucht wurden (deutlich höhere Konzentration an Spinsonde in der Hautprobe) aber nicht für die topisch applizierten Nitroxid-Radikale, wie in dieser Arbeit.

6.6 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurde das Verhalten von Nitroxyl-Radikalen in exzidiierter Humanhaut nach topischer Applikation untersucht. Dazu wurden zunächst einige Parameter festgelegt, die zu einer geeigneten Applikationsart, -form und -dauer führten. In diesem Zusammenhang stellte sich schnell heraus, dass nicht alle ursprünglich geplanten Nitroxyl-Radikale geeignet waren. Doxylpalmitinsäure, TEMPOL-Benzoat und CAT-1 zeigten mit der gewählten Formulierung sehr niedrige bis gar keine Signale in den ESR-Messungen, wobei nicht ganz geklärt werden konnte ob die Konzentration in der Haut zu gering war, oder die Moleküleigenschaften für die geringe Signalintensität verantwortlich waren. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die Penetration von DPS und CAT-1 in die Haut hauptsächlich durch die Hornschicht verhindert wurde. Zusätzlich wurde bei DPS die Signalintensität auf Kosten der Verbreiterung des 3-Linien-Spektrums erniedrigt. Dies war die Folge der verminderten Mobilität von DPS, verursacht durch das große und sperrige Molekül.

Nur DHME und TEMPOL erfüllten die Voraussetzungen für die anschließenden Bestrahlungsexperimente. Sie zeigten beide eine ausreichend hohe Signalintensität in der Haut, um auch nach weiterer UV-Bestrahlung eine Quantifizierung zu ermöglichen. Mit der verwendeten Mikroemulsion konnten beide Nitroxyl-Radikale gleichermaßen in die Haut befördert werden und erreichten nach 180 Minuten ihre Höchstkonzentration. Auch durch eine längere Einwirkdauer ließ sich die Konzentration nicht nennenswert steigern. Offensichtlich wurden die Nitroxide während der Passage durch die Haut solange durch antioxidative Systeme reduziert bis sie sich in Bereichen sammeln, an denen sie vor weiterer Reduktion geschützt waren oder die verantwortlichen Antioxidantien verbraucht waren. Auch ein niedriger Diffusionsdruck durch die sinkende Konzentration in der Mikroemulsion könnte ein Grund gewesen sein. Aufgrund von weiteren Untersuchungen

zeigte sich, dass eine weitere Erhöhung der Einwirkzeit und Ausgangskonzentration, keinen nennenswerten Einfluss mehr hatte, weder auf das Verteilungsprofil noch auf die Signalintensität. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass sich die Nitroxide in Regionen anreicherten, in denen sie vor weiterer Reduktion geschützt waren. Die Stabilität der Nitroxide über eine Zeitspanne von 30 Minuten bestätigt diese Vermutung (Daten nicht gezeigt).

Anhand der ESR-tomografischen Darstellung konnten für beide Nitroxide Verteilungsprofile erstellt werden. Dabei konnten für TEMPOL eine verstärkte Aufenthaltswahrscheinlichkeit in den mittleren und unteren Bereichen der Epidermis, und für DHME in der oberen Dermis ausgemacht werden.

Durch Auswertung der polaritätsabhängigen Hyperfeinaufspaltung konnten zusätzlich Informationen über die direkte Umgebung der Sonden in der Haut gewonnen werden. Dabei war festzustellen, dass sich TEMPOL in hydrophileren Bereichen aufhält als DHME, was aufgrund der n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten der beiden Stoffe nicht ungewöhnlich wäre. Mögliche Bereiche unterschiedlicher Polarität in der Haut wären z. B. außerhalb und innerhalb der Lipiddoppelschichten und in den Zellen also im Zytosol. Diese Gegebenheit war für die folgenden Bestrahlungsexperimente von großem Interesse, da somit auch eine Aussage über den Entstehungsort von ROS getroffen werden konnte.

Ferner konnte durch den Thiolgruppenhemmstoff Iodacetamid bestätigt werden, dass Mercapto-Gruppen bei der Reduktion von Radikalen beteiligt waren. Die Nitroxyl-Radikale erreichten in gehemmter Haut, aufgrund der verminderten Reduktion durch die antioxidativen Systeme, eine bis zu vierfach höhere Konzentration in den vermessenen Hautproben, als in ungehemmter. Dabei war kein Unterschied zwischen den beiden Nitroxiden zu erkennen.

Weiterhin konnten, durch Quantifizierung des Referenzstandards DPPH, die Gesamtstoffmengen der eingedrungenen und nicht reduzierten Spinsonde bestimmt werden. Auch in diesem Fall verhielten sich beide Spinsonden ähnlich. Bei TEMPOL konnten Stoffmengen in Höhe von 25 bis 56 nmol und bei DHME 30 bis 56 nmol nachgewiesen werden.

Kapitel 7

7. Bestrahlungsexperimente

Im folgenden Kapitel wird das Verhalten, der im Kapitel 6 ausgewählten Nitroxyl-Radikale in der Haut, nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlungsquellen näher betrachtet. Das elektromagnetische Spektrum, welches in diesen Experimenten eingesetzt wurde, reicht vom sichtbaren Licht bis zur, für das menschliche Auge unsichtbaren, UV-Strahlung. Die Auswirkung von ultravioletter Strahlung auf Humanhaut wurde schon in Kapitel 2 und 4 erläutert und wird nur noch einmal kurz zusammengefasst:

Kurzwellige UVC-Strahlung wird fast vollständig von den toten Zellen der Hornschicht absorbiert, trotzdem können sie aufgrund ihres ionisierenden Charakters ROS generieren, die sich dann in tiefere Hautschichten fortpflanzen und damit trotzdem Schäden verursachen. Strahlung aus dem UVB-Bereich gelangt bis in die lebende Epidermis und kann dort zur Beeinträchtigung der Funktion der DNA führen. Und zuletzt die langwellige UVA-Strahlung. Sie dringt noch tiefer in die Haut ein und kann dort vor allem über radikalische Mechanismen die Bildung von kanzerogenem Gewebe begünstigen. Ein zusätzlicher nicht erwünschter Nebeneffekt der allgemein unter dem Begriff „aging“ bekannt ist, ist die strahlungsbedingte Strukturveränderung von Kollagenen (133) und anderen Bindegewebsproteinen, so dass deren Funktion beeinträchtigt wird und der Alterungsprozess in der Haut schneller voranschreitet. Dies macht sich durch eine verstärkte Faltenbildung und einem Verlust an Elastizität bemerkbar. Hat aber im Gegensatz zu den davor genannten Auswirkungen der UV-Strahlung eher einen kosmetischen Stellenwert.

7.1 Exzidierte Humanhaut als Modellsystem für Bestrahlungsversuche

Wie schon im Kapitel 6, wurde auch bei den Bestrahlungsexperimenten exzidierte Humanhaut als Modellsystem verwendet. Humanhaut ist auf den ersten Blick nicht unbedingt als Modellsystem zu bevorzugen, da es bedingt durch die verschiedenen Spender zu individuellen Schwankungen im Bereich der Hautdicke, Alter des Spenders, Hauttyp und Hautbereich kommen kann. Es wurde aber anhand von Vorversuchen festgestellt, dass Parameter wie das Alter eines Spenders keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die antioxidative Kapazität (Kapitel 4) oder das Eindringverhalten (Kapitel 6) der Spinsonden hatte. Um weiteren Schwankungen vorzubeugen, wurde ausschließlich Bauchhaut von weiblichen Spendern für die Untersuchungen eingesetzt. Die Hautdicke, speziell die der Epidermis, wurde parallel zu den Bestrahlungsversuchen anhand von Gefrierschnitten bestimmt und ist im Methodenteil näher beschrieben. Die Epidermis hatte, unabhängig vom Alter des Spenders, bei allen untersuchten Proben einen Wert von 40 – 60 μm . Dabei wurde auch die Dicke der Hornschicht bestimmt, die mit einer Spanne von 7- 10 μm ausreichend klein war. Die Beschaffenheit der obersten Hautschichten ist insofern wichtig, als dass sie eine gewisse Vergleichbarkeit unter den unterschiedlichen Hautproben gewährleistet. Die Eindringtiefe der Strahlung korreliert natürlich mit der Art und dem Ausmaß der Schäden in der Haut, und ist bei gleichbleibender Strahlungsstärke ausschließlich von der Dicke des Stratum corneum abhängig

7.2 Die Nitroxide TEMPOL und DHME

Die beiden Nitroxide TEMPOL und Doxylhexansäuremethylester haben sich bei allen zuvor durchgeführten Untersuchungen als geeignet für die folgenden Bestrahlungsexperimente herausgestellt. Beide zeigten sie eine Erhöhung der antioxidative Kapazität im Rahmen des neu entwickelten Modellsystems (siehe Kapitel 4.4). Zudem zeigten sie eine sehr gute Aufnahme in die Haut nach topischer Applikation, was anhand der ESR-Tomografie gezeigt werden konnte. Die Spinsonden zeigten außerdem über einen

endlichen Zeitraum nach Entfernung der Formulierung eine annähernd gleichbleibende Konzentration in der Haut. Dieser Umstand ist für die folgenden Bestrahlungsuntersuchungen von enormer Bedeutung, da die Konzentration an intakter Sonde über den Bestrahlungszeitraum stabil bleiben sollte, um eine eindeutige Aussage zu treffen.

Außerdem sollte sich zeigen ob das unterschiedliche Verteilungsprofil beider Nitroxide in der Haut, auch zu verschiedenen Effekten bei der Bestrahlung führt

7.3 Ergebnisse der Bestrahlungsexperimente von Nitroxid-beladener Haut mit unterschiedlichen Strahlungsquellen

7.3.1 Bestrahlungen mit einem Sonnensimulator

Um das natürliche Spektrum der Sonne zu imitieren, wurden die Hautproben mit einem Sonnensimulator bestrahlt. Die Bedingungen für diese Experimente entsprachen den aus Kapitel 5. 1. In Tabelle 8 sind die verwendeten Strahlungsdosen des Sonnensimulators aufgeführt und zum Vergleich die Energiemenge einer dreistündigen Sonneneinstrahlung in unseren Breitengraden. Dabei fällt auf, dass die Strahlungsmenge bei der UVA-Strahlung dem fünf bis sechsfachen und bei der UVB-Strahlung ungefähr dem 17000fachen der natürlich vorkommenden Energiemenge entsprach. Auf den ersten Blick scheint die UVB-Dosis sehr groß zu sein, allerdings ist inzwischen bekannt, dass UVB-Strahlung nur zu einem geringen Teil an der Bildung von ROS beteiligt ist. Hauptverursacher von reaktiven Sauerstoffspezies ist die längerwellige UVA-Strahlung. Diese führt in Anwesenheit von Sauerstoff über angeregte Zwischenstufen zu radikalischen Sauerstoffverbindungen, wie beispielsweise dem Superoxidationradikal (134). Den Effekt, den diese Strahlung auf zellulärer Ebene besitzt, kann mit der hier verwendeten ESR-Technologie zwar nicht dargestellt werden, es ist aber von den Versuchsreihen aus Kapitel 5 bekannt, dass diese sehr hohen UVB-Werte einen massiven Schaden an den Hautzellen verursachen.

Tabelle 7.1: Strahlungsdosen der unterschiedlichen Wellenlängenbereiche, als Vergleich die Strahlungsdosis eines dreistündigen Aufenthalts in der Mittagssonne (118)

	UVA	UVB	Gesamtdosis
Sonnensimulator, Strahlungsintensität	11,6 mW/cm ²	630 μW/cm ²	12,23 mW/cm ²
10 Minuten	6,96 J/cm ²	0,378 J/cm ²	7,34 J/cm ²
20 Minuten	13,92 J/cm ²	0,756 J/cm ²	14,68 J/cm ²
30 Minuten	20,88 J/cm ²	1,134 J/cm ²	21,02 J/cm ²
Natürliche Sonne (180 min)	25,9 J/cm ²	0,0004 J/cm ²	25,9 J/cm ²

Das Bestrahlungsschema wurde anfangs wie in Tabelle 7.1 dargestellt beibehalten, doch zeigte sich nach ersten Experimenten ein zunächst unerwarteter Effekt. Die Konzentration der Nitroxyl-Radikale schien bei den bestrahlten Hautproben gleich zu bleiben oder sogar zu steigen.

Repräsentativ für mehrere Experimente ist in Abbildung 7.1 das Konzentrationsprofil von zwei, mit DHME beladenen Hautstanzen, dargestellt. Demzufolge zeigte die Bestrahlung keinen nennenswerten Effekt auf die Konzentration des Radikals in der Haut.

Ursache dieses paradoxen Verhaltens, war ein bisher nicht beachteter Effekt. Die Bedingungen im Sonnensimulator waren dafür verantwortlich, dass die Bestrahlung keine Reaktion zeigte. Das Gebläse, was zur Kühlung der Lampe vorgesehen war, verursachte eine massive Verdunstungsreaktion auf der Hautprobe. Das Nährmedium wurde durch die Verdunstung in Epidermis-Richtung geführt und beförderte offensichtlich Nitroxyl-Radikale, die in tieferen Hautschichten waren, nach oben. Damit wurden reduzierte Nitroxide ständig von tieferliegenden, nachströmenden, ersetzt.

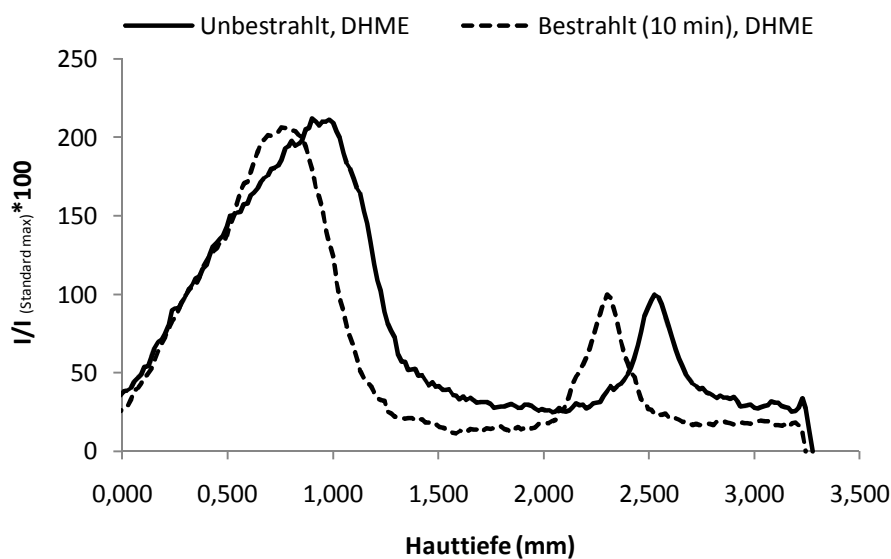


Abbildung 7.1: Intensitätsprofile über die Hauttiefe, normiert auf den Standard DPPH (jeweils rechter Peak), die durchgezogene Linie zeigt die unbestrahlte, die gestrichelte Linie die bestrahlte Hautprobe, Bestrahlungsquelle: Sonnensimulator, (Bauch, ♀, Geburtsjahr 1977), Median von n = 3 Einzelmessungen

Durch das Entfernen von unterem Hautgewebe, bedingt durch die notwendige Präparation der Hautproben vor dem Vermessen im Resonator, ist dieses Phänomen nicht im Tomogramm zu sehen. Wenn eine Vermessung der unpräparierten Probe möglich wäre, wäre ein eventuelles Absinken des Spinsondensignals im unteren Bereich der Hautprobe zu beobachten.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden einige Untersuchungen mit verändertem Versuchsaufbau durchgeführt. Dabei wurden Hautproben abgedeckt in den Sonnensimulator gestellt. Der Luftstrom des Gebläses sollte jedoch ungehindert an die Probe gelangen. In Abbildung 7.2 dargestelltes Konzentrationsprofil bestätigt die Annahme, dass Nitroxide aus tieferen Schichten durch den Verdunstungseffekt an die Oberfläche diffundieren.

Um die Einflussnahme durch diesen Effekt zu beseitigen oder zumindest zu minimieren, wurde die Luftzirkulation so weit wie möglich um die Probe geleitet. Durch Verwendung

eines Kühlblocks unter der Hautstanze konnte eine Überhitzung der Probe vermieden werden.

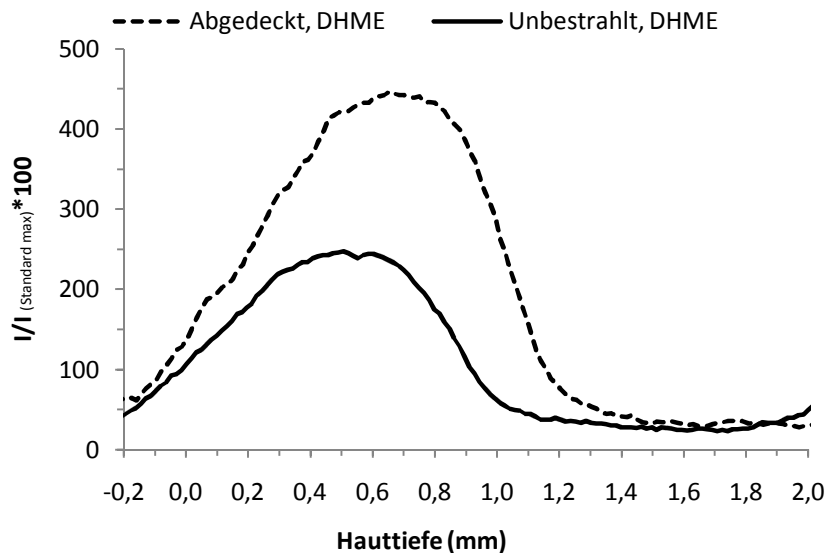
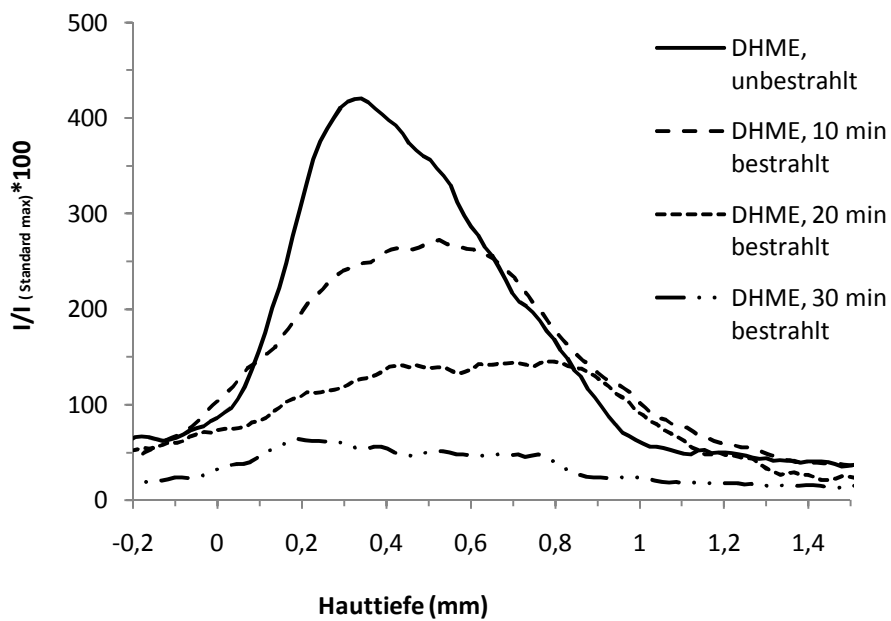
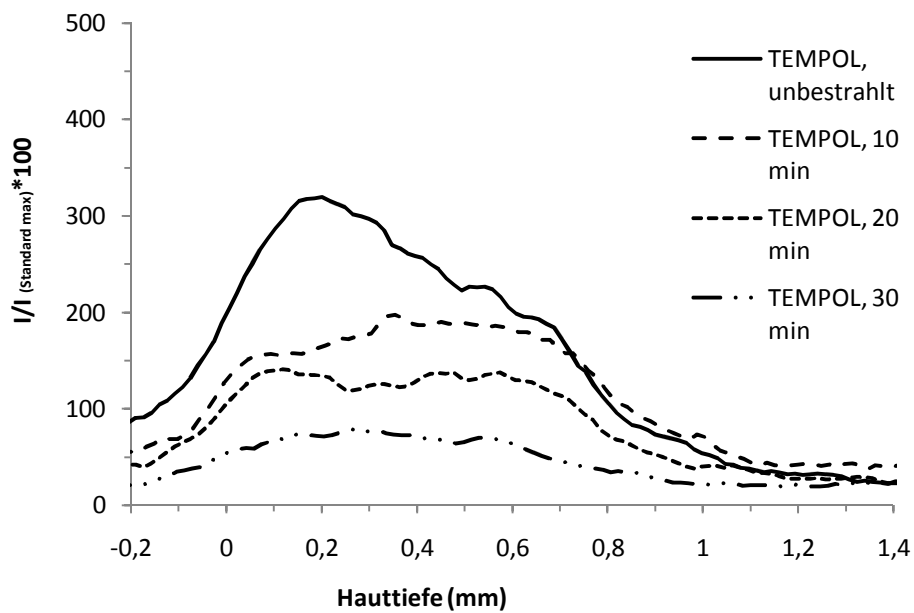


Abbildung 7.2: Intensitätsprofile über die Hauttiefe, gestrichelt das Profil einer Hautprobe die sich über einen Zeitraum von zehn Minuten in dem Sonnensimulator befand und dabei aber lichtdicht abgedeckt war. Das Lüftungsgebläse konnte ungehindert an die Hautprobe, Bestrahlungsquelle: Sonnensimulator, (Bauch, ♀, Geburtsjahr 1977), Median von n = 2 Einzelmessungen

Die Signalintensität der Nitroxide in der Haut, sank nach der Bestrahlung zum Teil bis zum völligen Verschwinden des Signals. Dabei konnten weder bei kurzen noch bei längeren Bestrahlungszeiten (10, 20 und 30 Minuten) eine direkte Korrelation zwischen Eindringtiefe der Strahlung und Reduktion der Nitroxyl-Radikale festgestellt werden. Bei allen Proben, war ein gleichmäßiges Sinken über die gesamte Hauttiefe zu beobachten. Was wiederum für intensive Verteilungsprozesse während und nach der Bestrahlung sprach (Abbildung 7.3).



(a)



(b)

Abbildung 7.3: Intensitätsprofil von DHME (a) - bzw. TEMPOL (b) -behandelter Haut nach 0, 10, 20 und 30 Minuten Bestrahlung mit dem Sonnensimulator, (Bauchhaut, ♀, Geburtsjahr 1989), Median von n = 2 Einzelmessungen

Beide Nitroxide zeigten eine ähnlich starke Empfindlichkeit gegenüber dem Sonnensimulator, wobei DHME etwas stärker reduziert wurde (Abbildung 7.4). Es wurde auf die Darstellung von Intensitäten der 30 Minuten-Werte verzichtet, da es bei diesen Proben nicht mehr möglich war zwischen der Signalintensität der Nitroxide und dem Untergrundrauschen zu differenzieren.

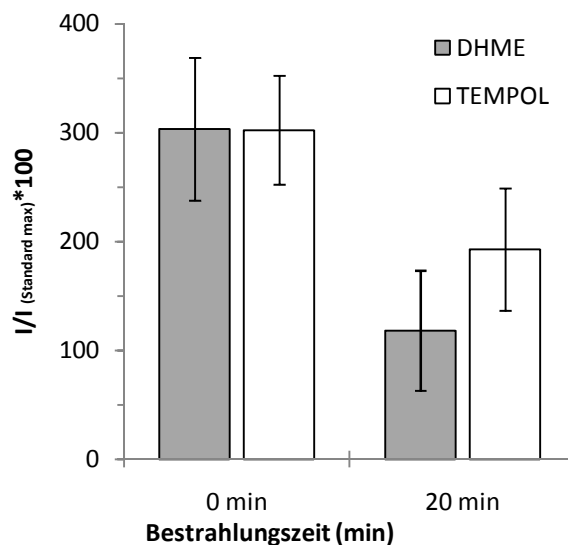


Abbildung 7.4: Intensitätsänderung von unbestrahlter und mit dem Sonnensimulator bestrahlter Haut, (Bauchhaut, ♀, sechs unterschiedliche Spender, Geburtsjahr 1959 bis 1989), arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung von n = 9-12 Einzelwerten.

Obwohl sich TEMPOL tendenziell näher an der Hautoberfläche befand und damit mehr von der Strahlung abbekommen müsste, ist der Effekt sogar geringer als beim tiefer liegenden DHME. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Reduktion der Nitroxyl-Radikale zum Großteil keine direkte Folge der Bestrahlung ist.

Viel wahrscheinlicher ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, die wiederum mit TEMPOL und DHME zu den ESR-stummen, korrespondierenden Hydroxylaminen reagieren. Durch Diffusion gelangen dann nicht reduzierte Nitroxide in obere Hautschichten. Zwischen Bestrahlung, Präparation und Vermessung der Hautstanze im

Resonator vergehen nur wenige Minuten, weshalb diese Verteilungsprozesse in kurzer Zeit erfolgen.

Die scheinbar nicht abnehmende Konzentration der Nitroxide in den oberen Hautschichten könnte noch eine andere Ursache haben. Reduzierte Nitroxyl-Radikale lagen in den oberen Hautschichten vermehrt als Hydroxylamin vor (57). Diese waren in der Lage mit entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies zu reagieren und wieder zum ursprünglich eingesetzten Radikal oxidiert zu werden. Welche der beiden Mechanismen nun tatsächlich vorlag, konnte nicht geklärt werden, vermutlich waren beide an dem Prozess beteiligt.

Die unterschiedlich starke Reduktion der beiden Spinsonden könnte Rückschlüsse auf den Entstehungsort von radikalischen Sauerstoffspezies führen. In Kapitel 6 wurde anhand der Hyperfeinaufspaltung vermutet, dass TEMPOL sich in hydrophilerer Umgebung aufhält als DHME. Eine mögliche Ursache für die verstärkte Reduktion von DHME könnte eine vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in lipohileren Bereichen sein. Innerhalb der Lipiddoppelschicht von Membranbestandteilen könnten ungesättigte Fettsäuren durch radikalische Intermediate zu Lipidhydroperoxiden reagieren. Diese könnten entweder mit hauteigenen antioxidativen Systemen oder mit einem Nitroxyl-Radikal reagieren.

7.3.2 Bestrahlung mit einem UVC-Strahler

Für die UVC-Bestrahlung wurde eine Lampe aus einem EPROM-Löschler, mit der Emmisionswellenlänge von 254 nm und Leistung von 22 mW/cm², verwendet. In der Computertechnik werden solche Lampen eingesetzt um Datenspeicherzellen (EPROM) zu löschen. Die ultraviolette Strahlung verursacht dabei eine Ionisierung des Halbleitermaterials, dazu ist allerdings nur kurzwellige Strahlung geeignet.

Im Gegensatz zum vorherigen Abschnitt, kam es bei der Bestrahlung der Hautproben zu keiner Erwärmung oder unerwünschten Verdunstungseffekten, wie beim Sonnensimulator.

Es wurde anfangs das gleiche Bestrahlungsmuster wie in Kapitel 5.1 verwendet. Bei der Bestrahlungsdauer von zwei Minuten (2,64 J/cm²) zeigten sich hingegen keine nennenswerten Effekte im Vergleich zur unbestrahlten Haut. Eine fünfminütige (6,6 J/cm²)

Bestrahlung erbrachte sehr stark schwankende Ergebnisse, auch innerhalb einer Probe. Nur nach zehnmütiger ($12,3 \text{ J/cm}^2$) Strahlungsdauer konnten reproduzierbare Resultate erzielt werden, weshalb nur noch diese Zeit beibehalten wurde.

Obwohl, wie schon mehrfach erwähnt, UVC-Strahlung es nicht vermag in den lebenden Bereich der Haut zu gelangen, zeigte sich auch hier eine strahlungsbedingte Erniedrigung der Nitroxid-Konzentration über die gesamte vermessene Probe. Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten (s. Kapitel 7.3) war beim Bestrahlen der Hautproben mit UVC-Licht, eine Korrelation zwischen der eindringenden Strahlung und dem Abbau der Nitroxide in den oberen Hautschichten zu erkennen. Außerdem war praktisch kein Unterschied mehr zwischen der Reduktion von TEMPOL und DHME festzustellen. In Abbildung 7.5 sind die Ergebnisse der Bestrahlungsexperimente mit dem UVC-Strahler zusammengefasst. Dabei wurden die Maxima der Signalintensitäten der mittleren Linie aufgezeichnet.

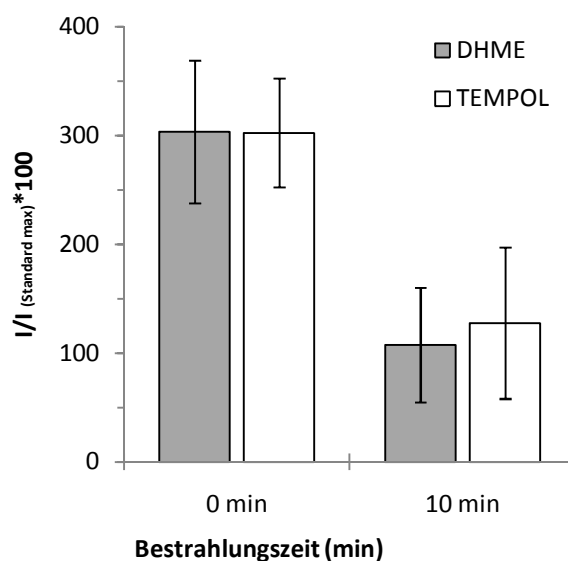


Abbildung 7.5: : Intensitätsänderung von unbestrahlter und mit dem UVC-Strahler bestrahlter Haut, (Bauchhaut, ♀, sechs unterschiedliche Spender Geburtsjahr 1959 bis 1989), Median von $n = 7-9$ oder arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung von $n = 10-14$ Einzelwerten.

Die deutliche Abnahme der Konzentration der Nitroxyl-Radikale, in den bestrahlten Hautproben lässt mehrere Erklärungen zu. 1) Die auf die oberen Hautschichten begrenzt auftreffende Strahlung wird von dort vorhandenen Nitroxiden absorbiert und werden zu den korrespondierenden Hydroxylaminen abgebaut. Da kurzwellige Strahlung schon nach geringer Eindringtiefe stark gestreut und geschwächt wird ist dieser Effekt auf das Stratum corneum begrenzt. 2) Wasser das in den obersten Hautschichten eingelagert ist, kann durch energiereiche Strahlung homolytisch gespalten werden, was zu kurzlebigen, äußerst reaktiven radikalischen Verbindungen führt. Diese wiederum können eine Kettenreaktion auslösen und in tiefere Regionen vordringen. Dort können sie durch hauteigene antioxidative Mechanismen, einer Schädigung der Zellen oder durch vorhandene Nitroxide gestoppt werden. Und 3) besteht die Möglichkeit, dass reflektierte Strahlung durch die Seiten der Haut eindringt (57), die bedingt durch das Ausstanzen keine schützende Hornschicht hat. Dort kann die Strahlung direkt in das wasserreiche Gewebe vordringen und wie in Punkt 2) die Ausbreitung reaktiver Sauerstoffspezies vorantreiben. Letzteres kann durch den Versuchsaufbau und die Art der Präparation minimiert werden. Die Hautstanze hat, wenn sie bestrahlt wird einen Durchmesser von 20 mm. Vor der Messung im Resonator wird ein 4,5 mm großes Stück aus der Mitte der bestrahlten Probe gewonnen, das dann vermessen wird. Als wahrscheinlichste Ursache bietet sich Punkt 2) an, hier sollten im oberen Bereich der Haut die Nitroxide am stärksten abgebaut werden, da sich die radikalischen Verbindungen erst von oben nach unten verteilen müssen. Anders als bei der UVA-Strahlung, die ROS sowohl in oberen als auch in tieferen Schichten generieren kann.

Abbildung 7.6 a-d bestätigen die Annahme aus Punkt 1) und 2). Es ist eine Abnahme der Nitroxid-Konzentration im oberen Bereich der bestrahlten Haut festzustellen. Im unteren Bereich der Haut sank die Konzentration zwar auch ab, resultierte aber zum einen durch die Umverteilung der Nitroxyl-Radikale in Richtung Hautoberfläche und zum anderen durch die Diffusion von ROS in tiefere Hautschichten. Der Effekt der Umverteilung war nicht so deutlich zu erkennen, wie bei der bestrahlten Haut aus Kapitel 7.3 (Sonnensimulator). Dort wurden durch die stärkere Verdunstung (Lüftung und Wärme), Nitroxide aus tieferen Hautschichten in Richtung Oberfläche transportiert. Zudem dringen UVA/B-Strahlen tiefer in die Haut ein, wo sie dann direkt zur Entstehung von ROS führen können.

Reaktive Sauerstoffspezies müssen dementsprechend nicht erst von der Hautoberfläche in tiefere Schichten wandern, sondern entstehen über die gesamte Eindring-Tiefe der UVA/B-Strahlung.

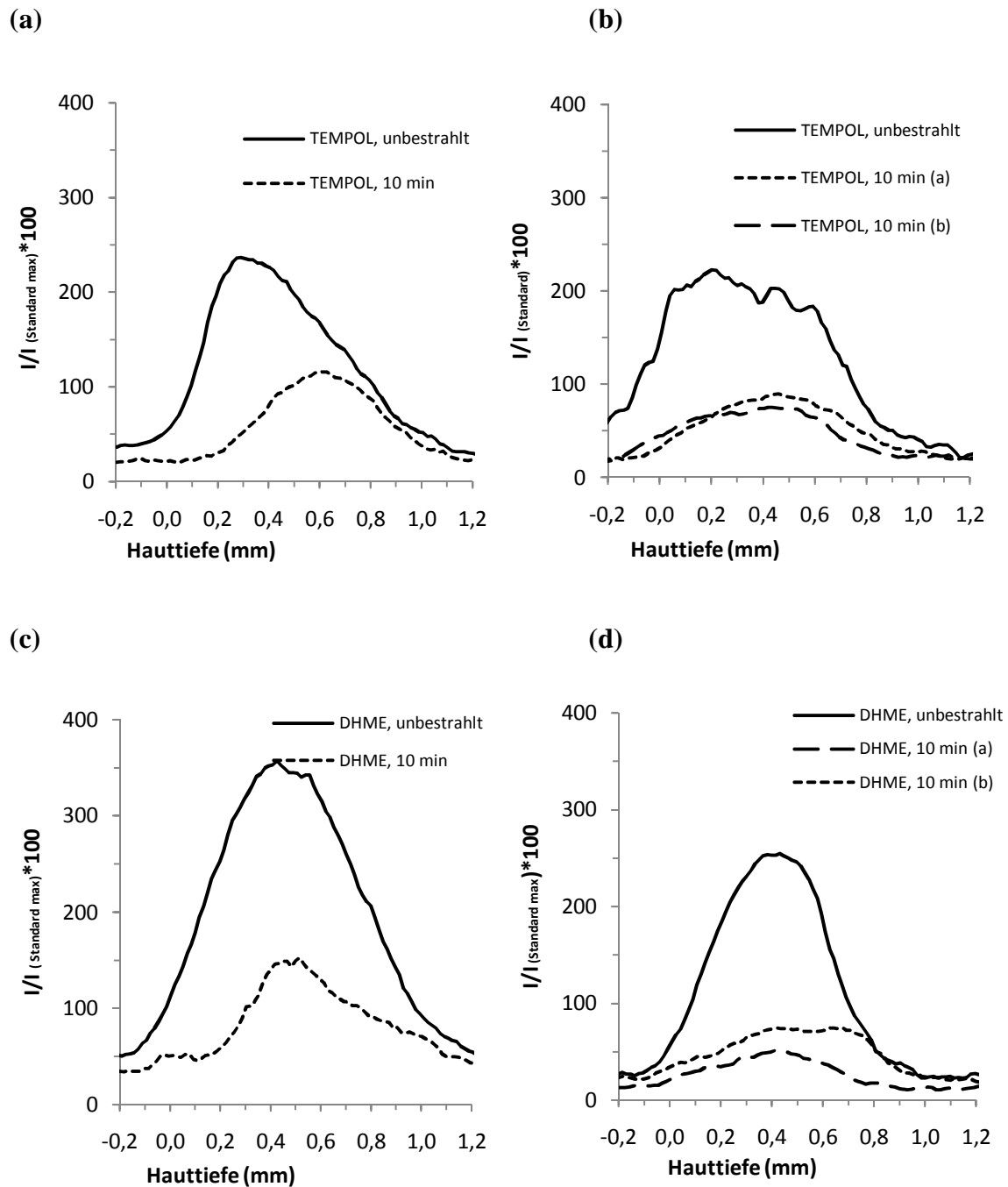


Abbildung 7.6: Intensitätsprofile von TEMPOL a-b bzw. DHME c-d über die Hauttiefe von UVC-bestrahlter (gestrichelte Linie) und unbestrahlter (durchgezogene Linie) Haut, (b und d, Brusthaut, Geburtsjahr 1964; a und c, Bauchhaut, ♀, Geburtsjahr 1952), n = 1

Eigene Untersuchungen (Daten nicht gezeigt) lassen vermuten, dass die Reduktion der Nitroxyl-Radikale nach Bestrahlungsende noch über einen längeren Zeitraum weiterging. Hautproben, die nach Bestrahlung im Dunkeln für 30 Minuten liegengelassen wurden, zeigten eine geringere Signalintensität, als gleich vermessene Proben. Zudem zeigte sich nach diesem Vorgehen ein ähnliches plateau-hafte Verteilungsprofil wie bei den Hautproben, die mit dem Sonnensimulator bestrahlt wurden. Dies deutet sowohl auf eine Wanderung von ROS in tiefere als auch von Nitroxiden in obere Hautschichten.

Die durgeführten Experimente konnten kein grundlegend unterschiedliches Verhalten der beiden Nitroxyl-Radikalen gegenüber der UVC-Strahlung zeigen. Beide wurden gleichermaßen von entstehenden ROS oder direkt durch die energiereiche Strahlung zu ESR-stummen Verbindungen abgebaut.

7.3.3 Wirkung von UV-Strahlung auf, mit Iodacetamid-gehemmter, Humanhaut

Nachfolgend sind Ergebnisse einer anderen Versuchsanordnung aufgeführt. Sie sollten den Einfluss von hauteigenen, mit SH-Reagenzien hemmbaren Antioxidantien zeigen. Dafür wurden Hautstanzen mit Iodacetamid inkubiert, im Anschluss wurden die Hautproben wie zuvor mit UVC-Strahlung behandelt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 7.7 zusammengefasst.

Ein großer Teil der antioxidativen Systeme, die für die Reduktion von Nitroxiden verantwortlich sind, konnte durch SH-Reagenzien (z. B. Iodacetamid) blockiert werden. Dies konnte schon im vorigen Kapitel demonstriert werden. Die Nitroxid-Konzentration der behandelten Hautproben war im Vergleich zur unbehandelten deutlich erhöht. Es war allerdings nicht bekannt, ob sich die gehemmten Systeme auch an der Reduktion von Radikalen beteiligen. Durch Bestrahlung beider Hautproben konnte eine Teilnahme dieser Systeme überprüft werden.

Der Konzentrationsabfall der gehemmten Haut war, im Vergleich zur ungehemmten nach Bestrahlung, deutlich größer (Abbildung 7.7). Eigenen Berechnungen zufolge wurde bei behandelter Haut bis zu 50 nmol (TEMPOL) bzw. 10 nmol (DHME) mehr Nitroxid

reduziert (pro Hautstanze), als unbehandelte. Eine Erklärung für die gesteigerte Reduktion, trotz gleichbleibender Strahlungsintensität, wäre die Übernahme der antioxidativen Aufgaben der gehemmten Enzyme, durch die in großer Menge vorliegenden Nitroxyl-Radikale.

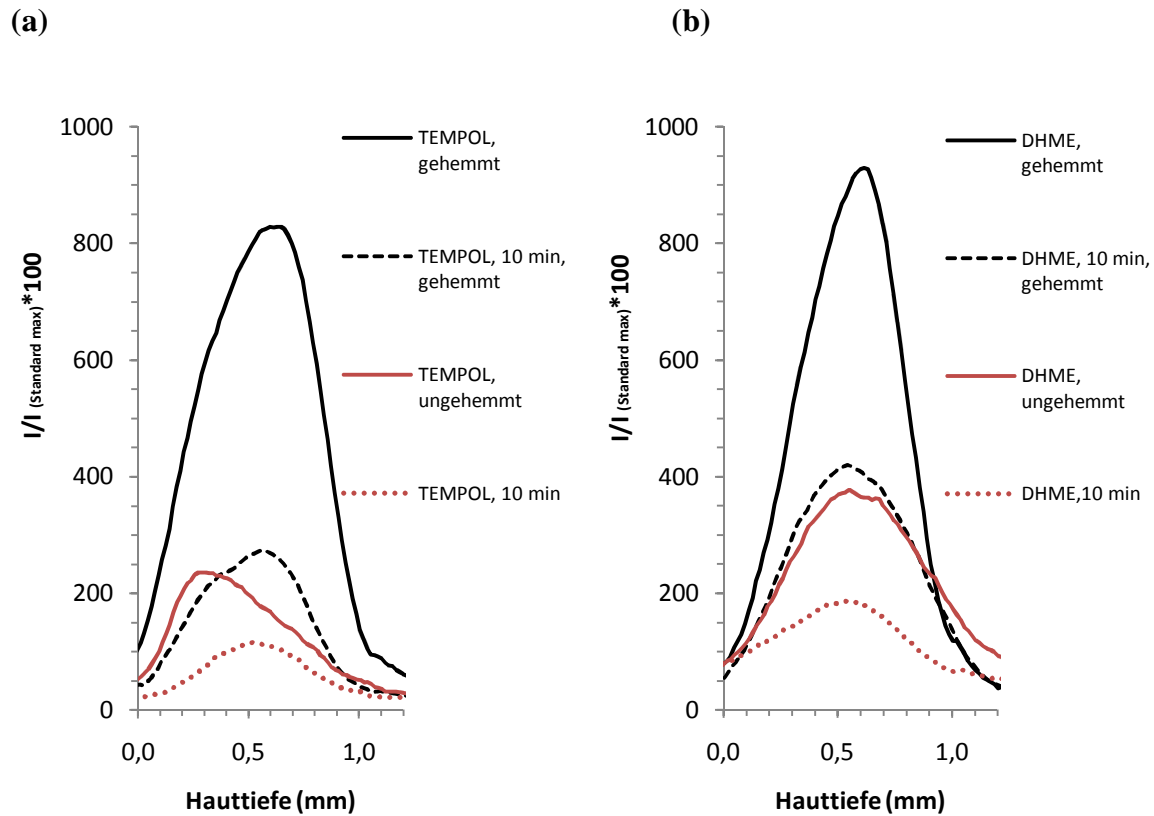


Abbildung 7.7: Intensitätsprofile von TEMPOL a bzw. DHME b über die Hauttiefe, (Brusthaut, Geburtsjahr 1964), durchgezogene schwarze Linie: mit Iodacetamid behandelte Haut (gehemmt); gestrichelte schwarze Linie: mit Iodacetamid behandelte (gehemmt) und bestrahlte (10 min, UVC) Haut; durchgezogene rote Linie: unbestrahlte und ungehemmte Haut; gestrichelt rote Linie: ungehemmte und bestrahlte (10 min, UVC) Haut.

Aufgrund der hier gezeigten Daten, konnte bestätigt werden, dass UVC-Strahlung zwar nicht in tiefere Hautschichten vordringen konnte, jedoch entstehende ROS, durch Verteilungsprozesse in alle Bereiche der Haut wandern. Die hohe Empfindlichkeit der eingesetzten Nitroxyl-Radikale gegenüber ROS bestätigt das große reduktive Potenzial

dieser Substanzgruppe. Zudem erhöht die schnelle Verteilung im Hautgewebe der verwendeten Nitroxide die Wahrscheinlichkeit mit ROS in Kontakt zu kommen und damit umliegendes Gewebe vor deren schädlichem Einfluss zu abzusichern.

7.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die Ergebnisse der Bestrahlungsexperimente vorgestellt. Dabei wurden die Parameter der vorangegangenen Experimente übernommen. Bei den Untersuchungen kamen zwei Bestrahlungsquellen zum Einsatz, die alle drei Bereiche des ultravioletten Spektrums abdeckten.

Als UVA/B-Quelle diente ein Sonnensimulator, wobei dieser ein Vielfaches der natürlichen Strahlungsintensität generierte. Bei den vermessenen Hautproben konnte keine direkte Korrelation zwischen Eindringtiefe der Strahlung und Abbau der Nitroxide festgestellt werden. Die mit Spinsonden beladenen Hautstanzen zeigten alle nach UV-Strahlung eine Reduktion der Signalintensität der Nitroxide über die gesamte Probe. Dabei wurde DHME, obwohl es sich tendenziell in tieferen Hautschichten als TEMPOL aufhielt, etwas stärker reduziert. Damit lässt sich folgern, dass die Reduktion der Nitroxyl-Radikale größtenteils nicht durch einfache Absorption stattfand, sondern durch das Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies, die wiederum mit TEMPOL und DHME zu den ESR-stummen, korrespondierenden Hydroxylaminen reagierten. Die stärkere Reduktion von DHME könnte ein Hinweis auf den Entstehungsort der UVA/B-induzierten ROS geben. Die im vorigen Kapitel gezeigte Hyperfeinaufspaltung beider Nitroxide, ließ den Schluss zu, dass sich DHME in lipophilerer Umgebung befand als TEMPOL. Durch den stärkeren Abbau von DHME ließe sich damit auch ein direkter Zusammenhang über die Entstehung von ROS in diesen Bereichen folgern. Eine abschließende Beurteilung wäre aber erst durch weitere Untersuchungen möglich.

Die gleichmäßige Konzentration der Nitroxide über die vermessene Haut, nach der Bestrahlung, kam sehr wahrscheinlich durch Verteilungsprozesse während des Aufenthalts im Sonnensimulator. Es stellte sich heraus, dass die Bedingungen im Sonnensimulator Verdunstungseffekte verursachten, durch die die Nitroxide aus tieferen Hautschichten in höhere transportiert wurden. Eine weitere Möglichkeit für dieses Phänomen, wäre die

Rück-Oxidation der Hydroxylamine zu den ursprünglich eingesetzten Nitroxyl-Radikalen. Diese lagen dort vermehrt vor nachdem sie strahlungsinduziert aus den Nitroxiden reduziert wurden. Durch weitere Bestrahlung könnten entstehende reaktive Sauerstoffspezies mit ihnen reagieren und wie schon erwähnt zum Radikal reoxidiert werden (57). Es konnte noch nicht geklärt werden, welches der beiden Mechanismen diesen Effekt hervorbrachte, aber vermutlich sind beide daran beteiligt. Eine andere Versuchsanordnung könnte dabei helfen den genauen Verlauf der stattfindenden Prozesse zu ergründen.

Als UVC-Strahler wurde eine Lampe verwendet, die eine Wellenlänge von 254 nm emittierte. Anders als beim Sonnensimulator, waren hier keine Verdunstungseffekte zu beobachten. Damit ließ sich ein genaueres Bild über die stattfindenden Prozesse schaffen. Obwohl kurzwellige Strahlung es nicht vermag in den lebenden Bereich der Epidermis vorzudringen, war eine Reaktion über den gesamten vermessenen Bereich der Haut zu beobachten. Allerdings wurde in den oberen Schichten deutlich mehr Spinsonde abgebaut. Dies konnte nur bedeuten, dass UVC-induzierte, reaktive Sauerstoffspezies von der Oberfläche in tiefere Schichten vordrangen und dabei mit den vorhandenen Nitroxiden, den antioxidativen Systemen und Bestandteilen der Haut (Membranlipide, Proteine) reagierten. Weitere Untersuchungen konnten bestätigen, dass die Verteilungsprozesse, auch bei UVC-bestrahlter Haut weitergingen. Diese waren jedoch durch den fehlenden Verdunstungseffekt deutlich langsamer. Ein grundlegender Unterschied zur sonnenbestrahlten Haut konnte, in Bezug auf die Reduktionsrate, jedoch nicht beobachtet werden. Auch waren beide Nitroxide gleichermaßen empfindlich gegenüber der UVC-Strahlung.

Weiterhin wurde eine starke Beteiligung von Thiolgruppen-abhängigen, antioxidativen Systemen bestätigt, sowohl bei der Reduktion der Spinsonden als auch bei der Abwehr von ROS. Eine Hemmung durch SH-Reagenzien zeigte zunächst einen enormen Anstieg an eingedrungenen nichtreduzierten Nitroxyl-Radikalen, gegenüber ungehemmter Haut. Durch den Einfluss von UVC-Strahlung sank die Signalintensität jedoch deutlich stärker ab, als bei unbehandelter Haut. Offensichtlich hatten die Nitroxyl-Radikale, durch das Wegfallen der hauteigenen Schutzsysteme, deren Platz eingenommen und wurden dadurch verstärkt reduziert.

Letztendlich konnte durch die Bestrahlungsexperimente das große reduktive Potenzial von TEMPOL und DHME gezeigt werden. Ihre amphiphile Struktur machte sie, gekoppelt mit ihrer geringen molekularen Ausdehnung, zu idealen Radikalfängern. Sie konnten, bedingt durch ihre Amphiphilie, sowohl in lipophilen wie hydrophilen Bereichen operieren. Der genaue Entstehungsort von ROS konnte zwar nicht festgestellt werden, die UVC-Bestrahlungsexperimente, konnte aber eindeutig eine Wanderung von reduzierenden Stoffen von obere in tiefere Hautschichten zeigen. Eine erhöhte strahlungsbedingte Reduktion von DHME und TEMPOL war besonders nach der Hemmung der hauteigenen antioxidativen Systeme zu beobachten. Unter diesen Bedingungen übernahmen die Nitroxyl-Radikale die antioxidativen Aufgaben der gehemmten Schutzmechanismen.

Kapitel 8

8. Zusammenfassung, Fazit und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein gut reproduzierbares Verfahren entwickelt und etabliert werden, das es ermöglicht topisch applizierte Antioxidantien direkt auf exzidierte Humanhaut, auf ihre antioxidative Kapazität zu testen. Dabei waren die Nitroxyl-Radikale TEMPOL und DHME, bezüglich ihres Reduktionsvermögens, besonders vielversprechend.

Die ESR-Technologie lieferte zudem Einsichten über das Eindringverhalten, die Stabilität und das Verteilungsprofil von unterschiedlichen Nitroxyl-Radikalen in exzidierte Humanhaut. Diese Ergebnisse dienten als Basis für *ex vivo* Bestrahlungsexperimente, mit unterschiedlichen Strahlungsquellen des ultravioletten Bereichs. Hierbei dienten ausgewählte Nitroxide als Reportermoleküle, um strahlungsinduzierte reaktive Sauerstoffspezies indirekt durch ihre Reduktion zu ESR-stummen Verbindungen nachzuweisen.

Mit diesem hier neu etablierten Verfahren ist es zum ersten Mal gelungen, die antioxidative Kapazität der Epidermis von exzidierte Humanhaut zu bestimmen und als Äquivalent des stabilen Radikals Diphenylpicrylhydrazyl darzustellen. Dabei wurden Hautstanzen zwischen zwei Diffusionszellen gespannt. Von der Epidermis-Seite wurden die Hautstanzen von einer genau definierten DPPH-Lösung umspült (Donor-Zelle). Die Probenentnahme erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten aus der Donor-Zelle. Die Höhe der Reduktionsrate von DPPH zu DPPH-H, wurde als ein Maß für die antioxidative Kapazität gleichgesetzt. Der Ablauf der Reaktion von DPPH mit der Haut konnte zum Teil aufgeklärt werden. Dabei dringt DPPH über die Dauer des Experimentes in die Haut ein, wird reduziert und DPPH-H diffundiert heraus. Zusätzlich konnte mit der Bestimmung der

Eindringtiefe der Wirkungsbereich von DPPH, gestützt durch histologische Untersuchungen, auf die Epidermis eingengt werden. Überdies konnte mit dieser Methode kein Zusammenhang zwischen Alter des Spenders und dem antioxidative Status der Hautprobe festgestellt werden.

Durch Blockierung von Thiolgruppen mittels SH-Reagenzien an Hautproben konnte die Umsetzung von DPPH zu DPPH-H auf ein Minimum verringert werden. Dies belegt eine direkte oder indirekte Beteiligung von SH-Gruppen-haltigen Verbindungen, an dieser Reaktion.

Eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität von Humanhaut ließ sich durch den Einsatz von topisch applizierten Nitroxyl-Radikalen und Ascorbinsäurepalmitat erzielen. Dabei übten TEMPOL und das, eigens für diese Arbeit entwickelte Nitroxyl-Radikal, Doxylhexansäuremethylester, einen stärkeren Effekt auf die Reduktion von DPPH als das als Standard-Antioxidans eingesetzte Ascorbinsäurepalmitat. Die Reaktion über einen Zeitraum von 180 Minuten zeigte darüber hinaus die hohe biochemische Stabilität der Nitroxyl-Radikale nach Applikation auf die Haut. Zum einen waren die Nitroxide so stabil, dass sie nicht gleich mit den reduktiven Systemen der Haut reagierten, zum anderen aber so reaktiv, dass sie das Modellradikal DPPH abfangen konnten. Bisher ist zu wenig, über den Zustand von antioxidativen Substanzen nach dem Eindringen in die Haut, bekannt. Viele sogenannte Radikalfänger unterliegen während der Passage durch das Hautgewebe einem oxidoreduktiven Abbau und werden damit wirkungslos (104). Anhand des entwickelten Verfahrens ist es somit möglich, solche Stoffe auf ihre Tauglichkeit als potenziell topisch angewendete Radikalfänger zu testen. So konnten beispielsweise CAT-1, DPS und TEMPOL-Benzolat, die zweifelsohne ein hohes reduktives Potenzial besitzen, aufgrund ihres mangelnden Penetrationsvermögens für weitere Untersuchungen ausgeschlossen werden. Die schlechte Penetration dieser Nitroxyl-Radikale konnte anhand der parallel stattfindenden ESR-Untersuchungen bestätigt werden. Insofern konnte dieses Verfahren, zusätzlich eine Aussage über die Effektivität einer Formulierung geben.

Die protektiven Eigenschaften der Nitroxyl-Radikale wurden noch auf andere Aspekte der UV-induzierten Schäden untersucht. Dabei konnten nur mit der Sonnenbrandzellen-Methode verwertbare und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Anhand der Reduktion von UV-induzierten Sonnenbrandzellen konnte die antioxidative Aktivität aller

eingesetzten Substanzen bestätigt werden. Sonnenbrandzellen entstehen überwiegend durch irreparable Schädigung des Erbmaterials durch direkte Absorption von UVB-Strahlung an Bestandteilen der DNS und weniger durch radikalische Mechanismen, weshalb die Schutzwirkung durch die eingesetzten Nitroxide zunächst unklar war. Offensichtlich sind bei der Entstehung von Sonnenbrandzellen mehr radikalische Prozesse beteiligt als angenommen. Dies wurde auch durch Bestrahlungsexperimente mit UVC-Strahlen deutlich, die nicht in tiefere Bereiche der Epidermis eindringen, dem Bildungsort von Sonnenbrandzellen. Hier waren sicherlich ROS an der Entstehung von apoptotischen Keratinozyten beteiligt und diese wiederum konnten durch Nitroxyl-Radikale oder Ascorbinsäurepalmitat gleichermaßen abgefangen werden. Vorstellbar wäre auch eine Absorption der Strahlung durch die Radikalfänger, die alle Absorptionsmaxima zwischen 450 und 200 nm haben, und damit analog zum Schutzmechanismus des Melanins wirken würden. In jedem Fall sind weitere Untersuchungen notwendig, um den Mechanismus dieser Schutzwirkung zu ergründen.

Der Nachweis von Lipidperoxidationsprodukten in *ex vivo* bestrahlter Haut konnte nach der verwendeten Methode nicht erbracht werden. Die Konzentration an Malondialdehyd und anderen Endprodukten der Lipidperoxidation (thiobarbitursäurereaktiven Substanzen) reichte nicht aus um eine Quantifizierung durchzuführen.

Mit der ESR-Tomografie konnten Informationen über das Verhalten der verwendeten Nitroxide in exzidierte Humanhaut gewonnen und als Grundlage für Untersuchungen mit den Diffusionszellen und den nachfolgenden Bestrahlungsexperimenten genutzt werden. Hierbei konnte die mangelnde Aktivität der Spinsonden CAT-1, DPS und TEMPOL-Benzoat, anhand der ungenügenden Penetration dieser Sonden in Haut, erklärt werden. Hautproben die mit diesen Nitroxiden behandelt wurden zeigten sehr geringe Signalintensitäten bei den ESR-Messungen. Wobei es nicht ganz auszuschließen war, dass die geringe Signalintensität auch an den Moleküleigenschaften und der damit verbundenen schlechteren Detektion lag. Aufgrund der sperrigen Molekülform von DPS war davon auszugehen, dass die damit gekoppelte verminderte Mobilität das 3-Linien-Spektrum verbreitert und damit die Signalintensität sank. Weitere Untersuchungen mit Hautproben, bei denen das Stratum corneum entfernt wurde, zeigten allerdings, dass das Eindringen von DPS und CAT-1 in Haut, hauptsächlich durch die Hornschicht verhindert wurde.

Nur DHME und TEMPOL zeigten eine ausreichend hohe Signalintensität in der Haut, um eine nachträgliche Quantifizierung zu ermöglichen und erfüllten damit auch die Voraussetzungen für nachfolgende Bestrahlungsversuche. Außerdem konnte eine Art Sättigung beobachtet werden. Hautproben erreichten nach 180 Minuten Einwirkzeit mit der Nitroxid-beladenen Mikroemulsion eine Höchstkonzentration. Eine weitere Erhöhung der Einwirkdauer brachte keine nennenswerte Intensitätssteigerung der ESR-Signale. Augenscheinlich wurden die Nitroxide während der Passage durch die Haut solange durch antioxidative Systeme reduziert bis sie sich in Bereichen sammelten an denen sie vor weiterer Reduktion geschützt oder die verantwortlichen reduktiven Systeme verbraucht waren. Ein weiterer Grund könnte ein verringerter Diffusionsdruck, durch die sinkende Konzentration in der Mikroemulsion, gewesen sein. Weiter Untersuchungen, mit höherer Ausgangskonzentration der Nitroxide in der Mikroemulsion, könnten Gewissheit bringen, welcher Sachverhalt zutrifft.

Anhand der räumlich aufgelösten ESR-Spektren konnten Verteilungsprofile von DHME und TEMPOL erstellt werden. Doxylhexansäuremethylester hielt sich dabei überwiegend in der oberen Dermis und TEMPOL in der unteren bis mittleren Bereich der Epidermis. Dies deckt sich mit den Untersuchungen von *Hochkirch*, wonach der untere Teil der Epidermis die polarste Region darstellt. Folglich sammelt sich das hydrophilere TEMPOL in dieser Hautschicht. Hierbei könnte das Verteilungsmuster der beiden Sonden Aufschluss über andere Stoffe (z. B. Arzneistoffe) geben, die sich aufgrund ähnlicher physikochemischer Eigenschaften analog verhalten könnten. Weiterhin konnte die Reduktion der verwendeten Nitroxyl-Radikale sehr effektiv durch das SH-Reagenz Iodacetamid verringert werden. Damit wurden bis zu vierfach höhere Konzentrationen an Nitroxiden in gehemmter Haut erreicht. Dabei war kein Unterschied zwischen der Reduktion von TEMPOL und DHME zu erkennen, demzufolge wurden vermutlich beide von den gleichen antioxidativen Systemen abgebaut.

Sehr Aufschlussreich waren die Auswertungen der polaritätsabhängigen Hyperfeinaufspaltung, die zusätzliche Informationen über die direkte Umgebung der Sonden in der Haut geben konnten. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich TEMPOL in hydrophileren Bereichen aufhält, hingegen DHME sich in lipophilerer Umgebung aufhielt. Das war (n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten) zwar zu erwarten, wurde aber mit TEMPOL und DHME, innerhalb von Humanhaut noch nicht dokumentiert.

Mögliche Bereiche unterschiedlicher Polarität in der Haut wären z. B. die Lipiddoppelschichten in Membranen als relativ unpolaren Bereich und das Zytosol innerhalb einer Zelle als sehr polare Region. Auskünfte über den genauen Aufenthaltsort der verwendeten Spinsonden können jedoch noch nicht gegeben werden, sind aber Schwerpunkt und Gegenstand aktueller Untersuchungen in unserem Arbeitskreis.

Als antioxidativ wirksame Nitroxide wurden TEMPOL und DHME ermittelt, da sie sich in allen vorhergehenden Versuchsreihen als geeignetste der untersuchten Nitroxyl-Radikale herausgestellt hatten. Zur Untersuchung der protektiven Eigenschaften von Nitroxiden vor UV-induzierten Schäden wurden zwei Bestrahlungsquellen unterschiedlicher Wellenlängenbereiche verwendet. Dabei konnte bei UVA/B-bestrahlten Hautproben keine direkte Korrelation zwischen Eindringtiefe der Strahlung und Abbau der Nitroxide festgestellt werden. Die hohe Reaktivität der niedermolekularen, primär generierten, Radikale war offensichtlich dafür verantwortlich, dass sich stabilere Folgeprodukte bildeten, die sich wiederum im Hautgewebe verteilten und mit den vorhandenen Nitroxiden zu ESR-stummen Verbindungen reagierten. Zusätzlich wurden, durch Verdunstungseffekte, tiefer in der Haut gelöste Nitroxide, in höhere Schichten transportiert. Einzig bei der UVC-bestrahlten Haut, konnte ein Zusammenhang zwischen Eindringtiefe der Strahlung und Abbau der Nitroxide festgestellt werden, da bei diesen Experimenten keine merkliche Verdunstung stattfand. Bei längeren Zeitspannen zwischen Bestrahlung und Messung wiederum, kamen aber auch hier Verteilungsprozesse von ROS und der Nitroxide zum Tragen. Damit konnte nochmals bestätigt werden, dass sich radikalische Prozesse auch nach der Generierung über eine endliche Zeit ausbreiten und vor allem nicht am Entstehungsort bleiben.

Trotz unterschiedlicher Verteilungsmuster in der Haut, zeigten TEMPOL und DHME vergleichbare Reduktionsraten. Somit ließ sich noch kein Areal bestimmen, welches besonders empfindlich für die Bildung von ROS war.

Letztendlich konnte durch Bestrahlung Nitroxid-beladener Haut das große reduktive Potenzial von TEMPOL und DHME dargestellt werden. Ihre amphiphile Struktur machte sie, gekoppelt mit ihrer geringen molekularen Ausdehnung, zu idealen Radikalfängern. Sie konnten sowohl in lipophilen wie hydrophilen Bereichen operieren. Der genaue Entstehungsort von ROS konnte nicht festgestellt werden, jedoch konnten

Bestrahlungsexperimente eindeutig eine Wanderung von reduzierenden Stoffen von obere in tiefere Hautschichten zeigen. Besonders nach Hemmung der hauteigenen antioxidativen Systeme konnte eine verstärkte Reduktion von DHME und TEMPOL beobachtet werden. Unter diesen Bedingungen übernahmen die Nitroxyl-Radikale die antioxidativen Aufgaben der SH-gehemmten Schutzmechanismen.

Als Ausblick wäre die Entwicklung einer Formulierung zu nennen, die es ermöglicht Nitroxyl-Radikale anderer physikochemischer Natur (Doxylpalmitinsäure, TEMPOL-Benzoat und CAT-1), in Humanhaut zu befördern. Denkbar wären dabei unter anderen liposomale Zubereitungen.

Kapitel 9

9. Präsentationen

Publikation

U. Hochkirch, W. Herrmann, R. Stößer, K.-P. Moll, **J. Gallego Llerena**, M.Linscheid und H.-H. Borchert. Determination of Spin Concentration in ESR Tomography as Applied for the Spatial Distribution of Spin Labels in Human Skin. Appl. Magn. Reson., 35, 173-184, 2008

Poster

Julian Gallego Llerena, H.-H. Borchert; DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY IN HUMAN EPIDERMIS, DPHG-Jahrestagung (Erlangen), 2007

Julian Gallego Llerena, H.-H. Borchert; EINFLUSS VON NITROXYLRADIKALEN AUF DIE ENTSTEHUNG VON SONNENBRANDZELLEN IN EXZIDIERTER HUMANHAUT, DPHG-Jahrestagung (Bonn), 2008

Julian Gallego Llerena, Werner Herrmann, H.-H. Borchert; SPATIAL DISTRIBUTION OF MODEL SUBSTANCES IN HUMAN SKIN BY MEANS OF EPR TOMOGRAPHY, DPHG-Jahrestagung (Jena), 2009

Literaturverzeichnis

1	E. W. Breitbart, A. Wende, P. Mohr, R. Greinert und B. Volkmer. Hautkrebs, Technical Report, Robert Koch Institut, 2004
2	World Health Organization, Artificial Tanning and Sunbeds-risks and guidance, 2003
3	B.K. Armstrong and A. Kricger, How much melanoma is caused by sun exposure?, <i>Melanoma Research</i> , 1993: 3:395-401
4	W. Howard, M.D. Rogers PhD, A Martin, M.D. Weinstock PhD et al., Incidence Estimate of Nonmelanoma Skin Cancer in the United States, 2006. <i>Archives of Dermatology</i> , 2010.
5	Fritsch P: Dermatologie. 3. Auflage. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona 1990
6	S. Rothberg, R.G. Crouse, J.L. Lee, Glycine- ¹⁴ C incorporation into the proteins of normal stratum corneum and the abnormal stratum corneum of psoriasis. <i>J. Invest. Derm.</i> , 37 : 497-505, 1961
7	R.P Gallagher et al., Sunlight exposure, pigmentary factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. I. Basal cell carcinoma. <i>Arch Dermatol</i> , 131 (2):157-63, 1995
8	K.H Kim und J.I. Young, Influence of ultraviolet A on scheduled and unscheduled DNA synthesis by ultraviolet B. <i>Photoderm Photoimmunol Photomed</i> , 9 : 36-9. 1992
9	L. Talve, F. Stenback, und C.T. Jansen, UVA irradiation increases the incidence of epithelial tumors in UVB-irradiated hairless mice. <i>Photodermatol Photoimmunol Photomed</i> , 7 (3):109-15, 1990..
10	B.K. Armstrong und A. Kricger, The epidemiology of UV induced skin cancer. <i>J. Photochem. Photobiol. B</i> : 63 : 1-3, 2001
11	R. Wepf, R.H.H. Neubert. Stratum corneum, Struktur und Morphologie einer hoch effizienten Barriere. <i>Pharm. Ztg.</i> , 17 :14-21, 2007
12	Heymann E: Haut, Haar und Kosmetik. Eine chemische Wechselwirkung. S. Hirzel Verlag Stuttgart, 1994
13	J.B. Kerr, C.T. McElroy. Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. <i>Science</i> , 262 : 1032-1034, 1993
14	E. Kohen, J. Hirschberg, R. Santus. Photobiology. Academic Press, Inc. San Diego, London, 1995
15	W.A.G. Bruls, H. Slaper, J.C. van der Leun und L. Berrens. Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths, <i>Photochem. Photobiol.</i> , 40 :485-494, 1984
16	Frain-Bell W: Cutaneous photobiology. Oxford University Press Oxford, New York, Tokyo, 1985
17	I. Moll, Fotoinduzierte epidermale Veränderungen und ihre therapeutischen Optionen. <i>Akt Dermatol</i> , 25 : 174-177, 1999
18	A.C. Tedesco, L. Martinez, S. Gonzalez. Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defensive and reparative cutaneous mechanisms. <i>Braz J Med Biol Res.</i> 30 (5): 561-575, 1997

19	Fritsch P: Aufbau und Funktion der normalen Haut. In: Dermatologie. 3. Auflage. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, 3-321990
20	A.R. Young, C.A. Chadwick, G.I. Harrison, O. Nikaido, J. Ramsden, C.S. Potten: The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema. <i>J Invest Dermatol</i> , 111 : 982-988, 1998
21	R. Ogura, J. Nishi, M. Sugiyama, N. Haramaki, M. Kotegawa: Lipid radical formation of the epidermis exposed to ultraviolet light (ESR study). <i>Photomed Photobiol</i> , 12 : 179-184, 1990
22	R. Ogura, M. Sugiyama, J. Nishi, N. Haramaki: Mechanism of lipid radical formation following exposure of epidermal homogenate to ultraviolet light. <i>J Invest Dermatol</i> , 97 : 1044-1047, 1991
23	S. Kawanishi, Y. Hiraku. Sequence-specific DNA damage induced by UVA radiation in the presence of endogenous and exogenous photosensitizers. In: Thiele J, Elsner P (eds.) Oxidants and antioxidants in cutaneous biology – Current problems in dermatology. Karger, Basel, 29 : 74-82, 2001
24	R. Marks. The Stratum Corneum: The Final Frontier. In <i>Waltham International Science Symposium: Nature, Nurture, and the Case for Nutrition</i> , 2017S-2021S. Am. Soc. Nutr. Sci., 2004. Suppl.
25	P. Schroeder, J. Haendeler, J. Krutmann. The role of near infrared radiation in photoaging of the skin, <i>Exp. Gerontol</i> . 2008
26	B.P. Yu, Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. <i>Physiol Rev</i> 74 (1): 139-162, 1994
27	B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge: Free radicals in biology and medicine. 2. Auflage, Oxford: Clarendon Press (1989)
28	B. Frei: Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. <i>Am J Medicine</i> , 97 (suppl 3A), 5-13, 1994
29	H.S. Black: Potenzial involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. <i>Photochem Photobiol</i> , 46 (2): 213-221, 1987
30	R. Lavker und K. Kaidbey: The spectral dependence for UVA-induced cumulative damage in human skin. <i>J Invest Dermatol</i> , 108 , 17-21, 1997
31	F. Bernerd und D. Asselineau: Successive alteration and recovery of epidermal differentiation and morphogenesis after specific UVB-damages in skin reconstructed <i>in vitro</i> . <i>Developmental Biology</i> , 183 , 123-138, 1997
32	National Institute of Health: Sunlight, ultraviolet radiation, and the skin. NIH Consensus Statement, 7 (8):1-29, 1989
33	T. Herrling, K. Jung und J. Fuchs. The role of melanin against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair. <i>Spectrochimica Acta Part</i> , 69 : 1429-1435, 2008
34	A. Svoboda, D. Walterova, J. Vostalova. Ultraviolet Induced Alteration To The Skin. <i>Biomed Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub</i> . 150 (1):25-38, 2006
35	L. J. Kirschenbaum, X. Qu, J. Cosmetic. Sci. 51 :179182, 2000
36	X. Qu, L. J. Kirschenbaum, E. T. Borish, <i>Photochem. Photobiol.</i> , 71 :307-313, 2000
37	M. Noll: Apoptose: Mord und Selbstmord im menschlichen Organismus. <i>PZ</i> , 142 (23): 11-17, 1997
38	L.A. Applegate, E. Frenk. Cellular defense mechanisms of the skin against oxidant stress and in particular UVA radiation. <i>Eur J Dermatol</i> , 5 : 97-103, 1995

39	J.J. Thiele, F. Dreher, L. Packer. <i>Antioxidant defense systems in skin</i> . In: P. Elsner, H.I. Maibach (eds.) <i>Cosmeceuticals – Drugs vs. Cosmetics</i> . Marcel Dekker New York, Basel, 145-187, 2000
40	J. Fuchs, M.E. Huflejt, L.M. Rothfuss, D.S. Wilson, G. Carcamo, L. Packer. Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. <i>J Invest Dermatol</i> , 93 :769-773, 1989
41	Y. Shindo, E. Witt, D. Han, L. Packer. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. <i>J Invest Dermatol</i> , 102 : 470-475, 1994
42	P. Jurcovič, M. Šentjurc, M. Gašperlin, J. Kristl und S. Pečar. Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions, <i>Eur. J. Pharm. Biopharm.</i> , 56 :59-66,2003
43	D. Darr, S. Combs, S. Dunston, T. Manning, S. Pinnell: Topical vitamin C protects porcine skin from ultraviolet radiation-induced damage. <i>Br J Dermatol</i> , 127 : 247-253, 1992
44	M. McVean, D.C. Liebler: Inhibition of UVB induced DNA photodamage in mouse epidermis by topically applied α -tocopherol. <i>Carcinogenesis</i> , 18 (8): 1617-1622, 1997
45	N. Muizzuddin, A.R. Shakoori, K.D. Marenus: Effect of topical application of antioxidants and free radical scavengers on protection of hairless mouse skin exposed to chronic doses of ultraviolet B. <i>Skin Res Technol</i> , 4 : 200-204, 1998
46	O. Piloty und B. und Graf Schwerin. <i>Über die Existenz von Derivaten des vierwertigen Stickoffs</i> , Ber. Dtsch. Chem. Ges., 34 :2354-2367, 1901
47	H. Wieland und M. Offenbacher. Diphenylstickstoffoxyd, ein neues organisches Radikal mit vierwertigem Stickstoff, <i>Ber. Dtsch. Chem. Ges.</i> , 47 :2111-2115, 1914
48	D. H. Johnson, M.A.T. Rogers und G. Trappe. Aliphatic Hydroxylamins. Part II. Autoxidation, <i>J. Chem. Soc.</i> , 1093-1103, 1956
49	M. A.T. Rogers. Aliphatic Hydroxylamins. Part III. Reaction with Diazotised Aromatic Amines. A Novel Synthesis of Acylbenzenes from Corresponding Amine. <i>J. Chem. Soc.</i> , 2784-2789, 1956
50	D. F. Bowman, T. Gillan und K. U. Ingold. Kinetic Applications Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. III. Self-Reactions of Dialkyl Nitroxide Radicals. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 93 :6555-6561,1971
51	A. Nilsen und R. Breslau. Nitroxide Decomposition: Implications towards Nitroxide Design for Applications in Living Free-Radical Polymerization. <i>J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.</i> 44 :697-717, 2006
52	K. P. Moll. Mobilität von ESR-Spinsonden nach epikutaner Applikation/ unter besonderer Berücksichtigung der Wechselwirkungen zwischen Liposomen und Haut. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin, 2004
53	T. B. Marriot, S.P. Van und O.H. Griffith. Axial Isomer and ESR Spectra of the Steroid Spin Label, 3-Doxyl-5 α -Cholestane, <i>J. Magn. Res.</i> , 24 :41-52, 1976
54	K.P.Moll, W. Herrmann, R. Stösser und H.H. Borchert. Changes of the properties in the upper layers of human skin on treatment with models of different pharmaceutical formulations - an ex vivo ESR imaging study. <i>ChemMedChem</i> . 3 (4), 653-9, Apr. 2008
55	V.V. Khramtsov, I.A. Grigorev, D.J. Lurie, M.A. Foster, J.L. Zweier und P. Kuppusamy. Spin pH and SH probes: enhancing functionality of EPR-based techniques. <i>Spectroscopy</i> . 18 :213-225, 2004

56	C. Kroll, W. Herrmann, R. Stößer, H. H. Borchert und K. Mäder. Influence of Drug Treatment on the Microacidity in Rat and Human Skin-An In Vitro Electron Spin Resonance Imaging Study. <i>Pharmaceutical Research</i> , 18 :4, 2001
57	U. Hochkirch. Stabile Nitroxyl-Radikale als Reporter für UV-induzierte Hautschädigungen. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin, 2007
58	E. Damiani, L. Rosati, R. Castagna, P. Carloni, L. Greci, Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. <i>J. Photochem. Photobiol B: Biology</i> , 82 , 2006
59	Kroll, C. Analytik, Stabilität und Biotransformation von Spinsonden sowie deren Einsatz im Rahmen pharmazeutisch-technologischer und biopharmazeutischer Untersuchungen. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 1999
60	Müller, B.W.: Mikroemulsionen als neue Wirkstoff-Trägersysteme, in: Müller, R.H.; Hildebrand, G.E. (Eds.): Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1998
61	Junginger, H.E.: Systematik der Dermatika – Kolloidchemischer Aufbau, in: Niedner, R.; Ziegenmeyer, J. (Eds): Dermatika. Therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie, Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1992
62	G. Scott. TRANSFORMATIONS OF ANTIOXIDANTS DURING PROCESSING. <i>Pure and Appl. Chem.</i> , 55 (10):1615-1627, 1983
63	N. Noguchi und E. Niki. PHENOLIC ANTIOXIDANTS: A RATIONALE FOR DESIGN AND EVALUATION OF NOVEL ANTIOXIDANT DRUG FOR ATHEROSCLEROSIS. <i>Free Radical Biology & Medicine</i> , 28 (10), 1538–1546, 2000
64	E. H. Braude, A.G. Brook, R. P. Linstead. <i>J. Chem. Soc.</i> , 3574, 1954
65	M. A. Slifkin, Y.M. Suleiman. <i>Rafiation Effects</i> . 27 :111, 1975
66	N. D. Yordanov, A. G. Christova. Quantitative spectrophotometric and EPR-determination of 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). <i>J. Anal. Chem.</i> , 358 :610-613, 1997
67	R. Wiesner, J. Rathmann, H. G. Holzhütter, R. Stößer, K. Mäder, N. Nolting, H. Kuhn.: Nitric oxide oxidises a ferrous mammalian lipoxxygenase to a preactivated species, <i>FEBS Letters</i> 389 , 229 – 232 (1996)
68	B. Ranby, J. F. Rabek. ESR Spectroscopy in Polymer Research, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1977, pp. 11 - 38
69	Weil, J. A.; Bolton, J. R.; Wertz, J. E.: Electron Paramagnetic Resonance - Elementary Theory and Practical Applications, John Wiley & Sons, Inc., New York 1994
70	U. Hochkirch, W. Herrmann, R. Stößer, K.-P. Moll, J. Gallego Llerena, M. Linscheid und H.H. Borchert. Determination of Spin Concentration in ESR Tomography as Applied for the Spatial Distribution of Spin Labels in Human Skin. <i>Appl. Magn. Reson.</i> 35 , 173-184, 2008
71	R. C. Wester, J. Christoffel., T. Hartway, N. Poblete, H. I Maibach, J Forsell. Human Cadaver Skin Viability for In Vitro Percutaneous Absorption: Storage and Detrimental Effects of Heat-Separation and Freezing. <i>Pharm. Res.</i> 15 :82 – 84 (1998)
72	T. Mammone, E. Goyarts, P.E. Ya, M. Ingrassia, D. Gan, K. Marenus, D. Maes. Normal Human Keratinocytes Pretreated with Damaged mRNA Are Resistant to UVB Damage and Exhibit Increased DNA Repair. <i>Skin Pharmacol. Physiol</i> , 18 :12-19, 2005

73	S. Nakayama, E. M. Katho, T. Tsuzuki und S. Kobayashi. Protective Effect of α -Tocopherol-6-O-Phosphate Against Ultraviolet B-Induced Damage in Cultured Mouse Skin. <i>J. Invest Dermatol.</i> , 121 :406-411, 2003
74	W. L. Hubbell und H. M. McConnell. Molecular Motion in Spin-Labeled Phospholipids and Membranes. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 93 :2 314-326, 1970
75	R. B. Boers, P. Gast, A. J. Hoff, H. J. M. de Groot und J. Lutgenburg. Synthesis and Spectroscopic Characterization of [5- ¹³ C]- and [6- ¹³ C]- Ubiquinone- 10 for Studies of Bacterial Photosynthetic Reaction Centers. <i>Eur. J. Org. Chem.</i> , 189-202, 2002
76	N. D. Yordanov. Quantitative EPR spectrometry-“State of the Art”. <i>Appl Magn. Reson.</i> , 6 , 241-257, 1994
77	R. M. Tyrrell. Ultraviolet radiation and free radical damage to skin, <i>Biochem Soc Symp</i> 61 : 47-53, 1995
78	M. Dizdaroglu, P. Jaruga, M. Birincioglu und H. Rodriguez. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. <i>Free Radic. Biol. Med.</i> , 32 : 1102-115, 2002
79	J. Cadet, T. Douki, D. Gaspauto und J.-L. Ravanat. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. <i>Mut.Res.</i> , 531 : 5-23, 2003
80	N.S. Agar, G.M. Halliday, R.StC. Barnetson, H.N. Ananthaswamy, M. Wheeler und A.M. Jones. The basal layer in human squamos tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: A rolefor UVA in human skin carcinogenesis. <i>PNAS</i> , 101 : 4954-4959, 2004
81	P. Meredith and J. Riesz ¹ . Radiative Relaxation Quantum Yields for Synthetic Eumelanin, <i>Photochem. Photobiol.</i> , 79 (2):211-216, 2007
82	R. Marks. The Stratum Corneum Barrier: The Final Frontier. In <i>WALTHAM International Science Symposium: Nature, Nurtureand the Case for Nutrition</i> , 2017S-2021S. Am. Soc. Nutr. Sci., 2004. Suppl.
83	R. Glaser. <i>Biophysik</i> , Kapitel 4. Physikalische Faktoren der Umwelt. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1996
84	Y. Shindo, E. Witt, D. Han, W. Epstein und L. Packer. Enzymic and Non-Enzymic Antioxidants in Epidermis and Dermis of Human Skin. <i>J. Invest. Dermatol.</i> , 102 :122-124, 1994
85	M. S. Blois: Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, <i>Nature</i> , No.4617 :1199-1200, 1958
86	J. Fuchs, S. Weber, M. Podda, N. Groth, T. Herrling, L. Packer und R. Kaufmann. HPLC Analysis of Vitamin E Isoforms in Human Epidermis: Correlation with Minimal Erythema Dose and Free Radical Scavenging Activity, <i>Free Radical Biology and Medicine</i> , 34 (3), 330-336, 2003
87	K. Russell. The abstraction of hydrogen atoms from mercaptans by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. <i>Journal of Physical Chemistry</i> , 58 , 437-439, 1954
88	J. O. Metzger und J. Griep-Raming, Electrospray ionization and atmospheric pressure ionization mass spectrometry of stable organic radicals, <i>Eur. Mass Spectrom.</i> : 5 :157-163, 1999
89	H. Wagner, K.H. Kostka, C.-M. Lehr und U.F. Schaefer. Drug distribution in human skin using two different <i>in vitro</i> test systems. Comparison with <i>in vivo</i> data. <i>Pharm Res</i> (17 : 1475-1481, 2000

90	K. Schwarz, G. Bertelsen, L.R. Nissen, P.T. Gardner, M.I. Heinonen, A. Hopia, T. Huynh-Ba, P. Lambelet, D. McPhail, L.H. Skibsted und L. Tijburg. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. <i>Eur. Food Res. Technol.</i> , 212 : 319-328, 2001
91	Lebeau, J., Furman, C., Bernier, J.-L., Duriez, P., Teissier, E. and Cotelle, N. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids, <i>Free Radic. Biol. Med.</i> , 29 (9): 900-912., 2000
92	Lu, Y. and Foo, L.Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace, <i>Food Chemistry</i> , 68 : 81-85, 2000
93	C. Sanchez-Moreno. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, <i>Food Sci. Tech. Int.</i> , 8 (3): 121-137, 2002
94	E.F. McFarren, T. R. J. Lishka, J. H Parker. Criterion for judging acceptability of analytical methods. <i>Analytical Chemistry</i> , 42 : 358-365, 1970
95	M. B. Delgado-Charo, G. Iglesias-Vilas, J. Blanco-Mendez, Delivery of hydrophilic solute through the skin from novel microemulsions systems, <i>Eur. J. Pharm. Biopharm.</i> : 43 :37-42, 1997
96	A. Tanojo, H.E. Junginger* und H.E. Boddé, In vivo human skin permeability enhancement by oleic acid: transepidermal water loss and fourier-transform infrared spectroscopy studies, <i>J.Control. Rel.</i> , 47 (1), 31-39, 1997
97	S. Messenger, A.C. Hann, P. A. Goddard, P. W. Dettmar und J.-Y. Maillard. Assessment of skin viability: is it necessary to use different methodologies?, <i>Skin Research and Technology</i> , 9 :321-330, 2003
98	Chavz J. Cano C, Souki A, Bermúdez V, Medina M, Ciszek A, Amell A, Vargas ME, Reyna N, Toledo A, Cano R, Suárez G, Contreras F, Israili ZH, Hernández-Hernández R, Valasco M., Effect of cigarette smoking on the oxidant/antioxidant balance in healthy subjects. <i>Am. J. Ther.</i> , Mar-Apr;14(2):189-93.
99	K. Chandan, Redox Signaling and the Emerging Therapeutic Potential of Thiol Antioxidants, <i>Biochem. Pharmacol.</i> , 55 (11), 1747-1758; 1998
100	A. Alonso, W. P dos Santos, S. J Leonor, J. G dos Santos, M.: Tabak. Stratum corneum Protein Dynamics as evaluated by a Spin-Label Maleinimide Derivative: Effect of Urea. <i>Biophysical Journal</i> 81 , 3566 – 3576 (2001)
101	L. K. Rogers, B. L. Leinweber und C. V. Smith. Detection of reversible protein thiol modifications in tissues. <i>Anal. Biochem.</i> , 171-184, 2006
102	F. Hollander. Inhibition of Gastric Secretion <i>in Vivo</i> by Iodoacetamide and N-Ethyl Maleimide, <i>Am. J. Physiol.</i> : 187 :231-236, 1956
103	S. Terjarla, Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications, <i>Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.</i> , 16 :461-521, 1999
104	U. Schmalfluss, R. Neubert, W. Wohlrab. Modification of drug penetration into human skin using microemulsions, <i>J. Control. Release</i> , 46 :279-285, 1997
105	L. L. Mensor, F. S. Menezes, G.G. Leitao, A.S. Reis, T. C. dos Santos, C. S. Coube und S. G. Leitao. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by Use of Free Radical Method. <i>Phytother. Res.</i> , 15 :127-130, 2001
106	P. Špiclin, M. Gašperlin, V. Kmetec. Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions, <i>Int. J. Pharm.</i> , 222 : 271-279, 2001
107	R. M. Colven, S. R. Pinell. Topical vitamin C in aging, <i>Clin. Dermatol.</i> : 14 : 227-234, 1996

108	M. Pokorski, M. Marczak, A. Dymecka und P. Suchocki. Ascorbyl Palmitate as a Carrier of Ascorbate into Neural Tissues. <i>J. Biomed. Sci.</i> , 10 :193-198, 2003
109	M. Weil, M. D. Jacobson, H. S. Coles, T. J. Davies, R. L. Gardner, K. D. Raff und M. C. Raff. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. <i>J. Cell. Biol.</i> , 133 :1053-1059, 1996
110	R. Rosario, G. J. Mark, J. A. Parrish und M. C. Mihm Jr.. Histological changes produced in skin by equally erythemogenic doses of UVA, UVB, UVC and UVA with psoralens. <i>Br. J. Dermatol.</i> , 101 :299-308
111	J. I. Youn, R. W. Gange, D. Maytum und J. A. Parrish, Effect of hypoxia on sunburn cell formation and inflammation induced by ultraviolet radiation, <i>Photodermatology</i> , 5 :252–256, 1988,
112	A. R. Young. The sunburn cell. <i>Photodermatology</i> , 4 :127–134, 1987
113	W. Brenner und F. Gschnait. Decreased DNA Repair Activity in Sunburn Cells. <i>Arch. Dermatol. Res.</i> , 266 :11-16, 1979
114	D. L. Bissett, R. Chatterjee and D. P. Hannon. Photoprotective effect of superoxide-scavenging antioxidants against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse. <i>Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.</i> , 7 :56–62, 1990,
115	D. Darr, S. Combs, S. Dunston, T. Manning and S. Pinnell. Topical vitamin C protects porcine skin from ultraviolet radiation-induced damage. <i>Br. J. Dermatol.</i> , 127 :247–253, 1992
116	R. Hofmann-Wellenhof, J. S., A. Roschger, D. Strunk, M. Hubmer, C. Hoffmann, F. Quehenberger, M. Horn, H. Kerl und P. Wolf. Sunburn Cell Formation, Dendritic Cell Migration, and Immunomodulatory Factor Production After Solar-Simulated Irradiation of Sunscreen-Treated Human Skin Explants <i>In Vitro</i> . <i>J Invest Dermatol</i> , 123 :781–787, 2004
117	R. Weller, J. Hunter, J. Savin und M. Dahl <i>Clinical Dermatology</i> , <i>JAMA</i> , 301 (16) 1720, 2009
118	U. Schönfelder, Der Einfluss von Cholesterol auf die UV-induzierte Peroxidation der Lipide des menschlichen Stratum corneum, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität, 1999
119	O. Braun-Falco, G. Plewig, H.H. Wolff: <i>Dermatologie und Venerologie</i> , Springer Verlag, 3. neubearbeitete Auflage, 493-500, (1984)
120	G Kelfkens und J C van der Leun, Skin temperature changes after irradiation with UVB or UVC: implications for the mechanism underlying ultraviolet erythema, <i>Physic. Med. Biol.</i> , 34 , 599, 1989
121	E. Weidauer. Der Einfluss von oxidativem Stress auf die antioxidativen Enzyme von Lungenzellen und Aspekte zum Mechanismus der Paraquattoxizität. Dissertation. Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2001
122	P. Morliere et al.: UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts. <i>Biochim Biophys Acta</i> . 1084 (3): 261-8, 1991.
123	D. R. Janero. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. <i>Free Radic Biol Med.</i> , 9 (6):515-40. Review, 1990
124	I. A. Buege, S.D. Aust. Microsomal lipid peroxidation. <i>Methods Enzymol.</i> , 30 :302-10. 1978
125	L. Zastrow, L. Ferrero, T. Herrling und N. Groth, Integrated Sun Protection Factor: A New Sun Protection Factor Based on Free Radicals Generated by UV Irradiation, <i>Skin Pharmacol. Physiol.</i> , 17 :219-231, 2004

126	T. Herrling, T. Rehberg, J. Fuchs und N. Groth, UV-induced free radicals in the skin detected by ESR spectroscopy and imaging using nitroxides. <i>Free Radic. Biol. Med.</i> , 35 :59-67, 2003
127	T. Herrling, L.Zastrow, J. Fuchs und N. Groth, Electron spin resonance Detection of UV-Induced Free Radicals. <i>Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.</i> , 15 :381-383, 2002
128	K. U. Schallreuter und J. M. Wood. Free Radical Reduction in the Human Epidermis. <i>Free Radic. Biol.Med.</i> , 6 :519-532, 1989
129	A. Sary , C. Robert und A. Sarasin. Deleterious effects of ultraviolet A radiation in human cell. <i>Mut. Res.</i> , 383 :1-8, 1997
130	J. E. Baur,S. Wang und M.C. Brandt, Fast-Scan Voltametry of Cyclic Nitroxide Free Radicals. <i>Anal. Chem.</i> 68 :3815-3821, 1996
131	J. Fuchs, R. J. Mehlhorn und L. Packer. Free Radical Reduction Mechanisms in Mouse Epidermis Skin Homogenates. <i>J. Invest. Dermatol.</i> , 93 :633-640, 1989
132	C. Kroll, Analytik, Stabilität und Biotransformation von Spinsonden sowie deren Einsatz im Rahmen pharmazeutisch-technologischer und biopharmazeutischer Untersuchungen, Dissertation, HU-Berlin, 1999
133	J. C. Monboisse und J. P. Borel. Oxidative damage to collagen. Free radicals in aging, Birkhäuser Verlag: 323-327, 1992
134	M.L. Cunningham, J.S. Johnson, S.H. Giovanazzi und M.J. Peak. Photosensitized production of the superoxide anion by monochromatic (290-405 nm) ultraviolet
135	S. Marquardt. Lipidperoxidation und lokale histologische Veränderungen nach experimentellem Thoraxtrauma im Tiermodell der Ratte. Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Ulm, 2007
136	J. M. Metz, D. Smith, R. Mick, R. Lustig, J. Mitchell, M. Cherakuri, E. Glatstein und S.M. Hahn. A Phase I Study of Topical Tempol for the Prevention of Alopecia Induced by Whole Brain Radiotherapy. <i>Clinical Cancer Research</i> , 10 :6411-6417, 2004
137	P. Ionita. Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species?, <i>Chem. Pap.</i> , 59(1) :11-16, 2005
138	M. M. Maltempo, S. S. Eaton, G. R. Eaton: Spectral-spatial imaging, in: G.R. Eaton; , S. S. Eaton, Ohno, K. (Eds.): EPR imaging and in vivo EPR, <i>CRC Press</i> , Boca Raton, 145 – 152, 1991

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Berlin, den 25. Juli 2010

Julián Gallego Llerena