

Anwendung der Elektronenspinresonanzspektrometrie  
und der Spin-Trapping-Methode  
für die Untersuchung  
der Wirkung von Retinoiden und Carotinoiden  
auf die Bildung von Sauerstoffradikalen  
in stimulierten neutrophilen Granulozyten

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.),

genehmigt durch

die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Phys. Marisela Bohne, geb. Rodriguez Mouriz

geb. am 19.06.1961 in Havanna

Gutachter: Prof. Dr. Heinz Struy  
Prof. Dr. Siegfried Ansorge  
Prof. Dr. med. Hans K. Biesalski

Eingereicht am: 20.09.2001

Verteidigung am: 11.04.2002

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Gollnick für die sehr interessante Promotionsthematik, die sowohl im klinischen als auch im Forschungsbereich aktuell ist, für die Unterstützung durch seine Erfahrung sowie die zur Verfügung gestellten Daten und Mittel für die Durchführung der Arbeit. Für die stets hilfreiche Unterstützung durch Fachärzte und Schwestern der Klinik für Dermatologie und Venerologie möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Struy für die mir zur Verfügung gestellte wissenschaftliche Leitung und Betreuung dieser Dissertation, seine vielfältigen fachlichen Anregungen und Hinweise bei der praktischen Bearbeitung der Aufgabenstellungen und bei der Anfertigung dieser Arbeit. Ausdrücklich möchte ich mich für die fachliche Unterstützung und die freundliche Atmosphäre im Laborbereich bei Herrn Prof. Struy und seinen Laborleitern Frau Dr. Gerber, Herrn Dr. Gärtner und Herrn Dr. Krell bedanken.

Außerdem möchte mich beim medizinisch-technischen Personal des Instituts für Immunologie für die tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinem Ehemann und meiner Tochter, die viel Geduld dafür aufgebracht haben, daß ich ihnen während der Erstellung dieser Arbeit wenig Zeit widmen konnte.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Einleitung .....	6
1.1. Problemstellung und Zielsetzung .....	6
1.2. Neutrophile Granulozyten .....	11
1.2.1. Biologische Funktion .....	11
1.2.2. Mechanismen der Radikalbildung in stimulierten neutrophilen Granulozyten.....	12
1.3. Elektronenspinresonanzspektroskopie.....	15
1.3.1. Grundlagen der Methode .....	15
1.3.2. Die Spin-Trapping-Technik .....	17
1.4. Retinoide.....	20
1.4.1. Vorkommen und Bedeutung .....	20
1.4.2. Pharmakokinetik und Wirkmechanismen .....	22
1.5. Carotinoide.....	25
1.5.1. Vorkommen und Bedeutung .....	25
1.5.2. Pharmakokinetik und Wirkmechanismen .....	26
2. Material und Methoden .....	28
2.1. Material .....	28
2.2. Methoden .....	31
2.2.1. Herstellung der Suspensionen neutrophiler Granulozyten .....	31
2.2.2. Bereitstellung von opsoniertem Zymosan .....	31
2.2.3. Probanden und Studiendesign.....	32
2.2.4. Die Elektronenspinresonanzmeßtechnik.....	34
2.2.5. Meßansätze für die Radikalmessung in stimulierten neutrophilen Granulozyten.....	36
2.2.6. Meßansätze für die Radikalmessung im Xanthin/Xanthinoxidase-System....	37
2.2.7. Meßansätze für die Messung des Einflusses von Retinoiden und Carotinoiden auf die freien Radikale in stimulierten neutrophilen Granulozyten.....	38
2.2.8. Meßansätze für die Messung des Einflusses von Superoxiddismutase, Katalase, Natriumazid, Fe <sup>2+</sup> - und Fe <sup>3+</sup> -Ionen auf die freien Radikale in stimulierten neutrophilen Granulozyten.....	39
2.2.9. Meßansätze für die Messung des Einflusses der Neotigason- oder Neotigason/PUVA-Therapie in stimulierten neutrophilen Granulozyten von Patienten mit <i>Psoriasis vulgaris</i> .....	39

2.3.	Statistische Auswertung.....	40
3.	Ergebnisse .....	41
3.1.	Superoxid- und Hydroxylradikalmessungen in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten .....	41
3.2.	Einfluß von Retinoiden auf die Bildung freier Sauerstoffradikale .....	44
3.2.1.	Einfluß der Retinoid-Isomere der ersten Generation auf die freien Sauerstoffradikale in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten .....	44
3.2.2.	Einfluß der 13- <i>cis</i> - und 9- <i>cis</i> -Retinsäure auf die Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion.....	51
3.2.3.	Einfluß der Retinoid-Isomere der zweiten Generation auf die freien Sauerstoffradikale in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten .....	52
3.2.4.	Einfluß von Acitretin auf die Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion.....	58
3.2.5.	Einfluß von Superoxiddismutase, Katalase, Natriumazid, Fe <sup>2+</sup> und Fe <sup>3+</sup> auf die freien Sauerstoffradikale in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten.....	60
3.2.6.	Einfluß von Superoxiddismutase, Katalase, Natriumazid, Fe <sup>2+</sup> und Fe <sup>3+</sup> auf die freien Sauerstoffradikale in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten von Patienten mit <i>Psoriasis vulgaris</i> .....	63
3.2.7.	Untersuchungen zum Einfluß von Neotigason <i>in vivo</i> und von Neotigason und Neotigason/PUVA-Kombinationstherapie auf die Freisetzung von Sauerstoffradikalen in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten von Patienten mit Psoriasis.....	66
3.2.8.	<i>In vitro</i> -Untersuchungen zum Einfluß von Psoralen-UVA-Phototherapie auf die Freisetzung von Sauerstoffradikalen in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten .....	71
3.3.	Einfluß von Carotinoiden auf die Bildung freier Sauerstoffradikale .....	73
3.3.1.	Effekte von $\beta$ -Carotinoid-Isomeren auf die freien Sauerstoffradikale in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten.....	73
3.3.2.	Effekte von $\beta$ -Carotinoid-Isomeren auf die Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion.....	75
3.3.3.	<i>In vivo</i> -Untersuchungen zum Einfluß von $\beta$ -Carotin auf die freien Sauerstoffradikale in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten im Rahmen einer Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie.....	76
4.	Diskussion.....	80
4.1.	Sauerstoffradikale in der Epidermis .....	80
4.2.	Messung der Sauerstoffradikalbildung durch Elektronenspinresonanzspektrometrie .....	81
4.3.	Wirkung von Retinoiden .....	83
4.4.	Sauerstoffradikalbildung in stimulierten Granulozyten von Kontrollprobanden.....	88

4.5.	Sauerstoffradikalbildung in stimulierten Granulozyten von Patienten mit <i>Psoriasis vulgaris</i> .....	91
4.6.	Wirkung von 13- <i>cis</i> -Retinsäure (Isotretinoin) auf die neutrophilen Granulozyten .....	94
4.7.	Einfluß der Retinoid-Psoralen-UVA-Kombinationstherapie auf die Sauerstoffradikalbildung in neutrophilen Granulozyten bei Psoriasis .....	95
4.8.	Wirkung von Carotinoiden in der Prävention vor UV-Schädigung .....	98
4.9.	Schlußfolgerungen .....	102
5.	Zusammenfassung .....	105
6.	Literaturverzeichnis .....	113
	Tabellarischer Lebenslauf .....	129

## Abkürzungsverzeichnis

4-POBN	$\alpha$ -4-Pyridyl-1-oxid-N-tert-butylnitron
8-MOP	8-Methoxy-psoralen
CRBP	zelluläre Retinol-bindende Proteine
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid
DMPO-OH	5,5-Dimethyl-2-hydroxy-1-pyrrolin-N-oxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTPA	Diethylentriaminpentaacetat
EPR	Elektronenspinresonanzspektroskopie
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
MPO	Myeloperoxidase
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
$\bullet\text{O}_2^-$	Superoxidanion
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
OCI <sup>-</sup>	Hypochlorit
$\bullet\text{OH}$	Hydroxylradikal
PMN	Polymorphkernige Leukozyten
PUVA	Psoralen-UVA
RARE	Retinsäure-Response-Element
RBP	Retinol-bindende Proteine
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SOD	Superoxiddismutase

# 1. Einleitung

## 1.1. *Problemstellung und Zielsetzung*

Eine der wichtigsten Komponenten im Abwehrsystem des menschlichen Organismus bilden die Leukozyten, speziell die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, welche die überwiegende Mehrheit der zirkulierenden Leukozyten darstellen. Ihre große Zahl, ihre Mobilität und ihre hohe Sensitivität auf chemotaktische Reize versetzen sie in die Lage, schnell und in großer Anzahl am Ort einer akuten bakteriellen Infektion zu wirken. Durch Phagozytose und anschließende Abtötung der Mikroorganismen bilden sie eine wirksame erste Barriere gegen Krankheitserreger.

Die Abtötung und der Abbau der Mikroorganismen nach deren Phagozytose beruht auf sauerstoffabhängigen und sauerstoffunabhängigen Prozessen. Die sauerstoffunabhängige Freisetzung lysosomaler Enzyme hat einen wesentlichen Anteil am Abbau der Mikroben. Bei der Abtötung von Krankheitserregern kommt die entscheidende Bedeutung der Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite zu.

Andererseits sind sowohl die Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite als auch die Freisetzung lysosomaler Enzyme zwei der Hauptmechanismen, durch die die Phagozyten schädigende Wirkungen auf das umgebende Gewebe in entzündlichen und anderen pathologischen Vorgängen hervorrufen können. Sowohl die bakterizide als auch die schädigende Wirkung der während der Phagozytose freigesetzten Sauerstoffradikale müssen bei der Untersuchung von neutrophilen Granulozyten in biologischen Systemen beachtet werden.

In Hinsicht auf dermatologische Erkrankungen wurden im Kontext der vorliegenden Promotionsarbeit zwei mit starker Entzündung der Haut einhergehende chronische Erkrankungen ausgewählt.

Bei der Psoriasis findet sich in Abhängigkeit von der Akuität mehr oder weniger, am stärksten bei den steril-pustulösen Verlaufsformen, eine Ansammlung von neutrophilen Granulozyten in der Epidermis mit besonderer Bevorzugung des *Stratum corneum*, wo sie sogenannte Munroe'sche Mikroabszesse ausbilden. PMN sind erst an zweiter Stelle involviert, während primär eine T-Zell-abhängige Autoimmungeneese besteht. Eine massive lokale Interleukin-8-Freisetzung als Chemoattraktans für

neutrophile Granulozyten führt zur Einwanderung in die Epidermis [73, 77, 126, 127, 133, 171].

Neutrophile Granulozyten spielen bei der Akne in ihren unterschiedlichen Schweregraden eine unterschiedliche Rolle. Zum einen wandern sie zum Ort des Geschehens ein, nachdem das Follikelepithel durch Einwanderung von T-Zellen spongiosisch aufgelockert ist und chemoattraktive Substanzen in die Peripherie gelangen, zum anderen spielen sie ihre Rolle nach Ruptur von Follikelwänden in der Mikrophagozytose während der ersten Tage, wo sie danach von Makrophagen abgelöst werden [83, 137].

In psoriatischen Läsionen ist die Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten verstärkt. Die Migration von Neutrophilen von den Hautkapillaren zum *Stratum corneum* kann Membranschädigungen an den Keratinozyten induzieren [126]. Andererseits sind sie ein notwendiger Faktor in der antibakteriellen Abwehr. Die zystische Akne ist durch eine folliculäre Hyperkeratose, verstärkte Sebum-Produktion und durch eine dermale Infiltration von Neutrophilen gekennzeichnet, die durch die Freisetzung von Chemoattraktanten z.B. aus *Propionibacterium acnes* hervorgerufen wird. In diesem Fall ist die doppelte Wirkung der freigesetzten Radikale besonders deutlich, da sie einerseits unabdingbar zur Bekämpfung der Infektionsfelder sind, andererseits aber zu Proliferationsstörungen führen [125, 181].

Als Retinoide wird eine Gruppe von natürlichen und künstlichen Abkömmlingen von Vitamin A (Retinol) bezeichnet, die eine ähnliche biologische Wirkung wie Retinol haben. Dazu zählen Retinol selbst, Retinal und seine Isomere, die Retinylester, all-*trans*-, 9-*cis*- und 13-*cis*-Retinsäure sowie weitere Substanzen, die für ihre vielfältige biologische Wirkung insbesondere auf Wachstum und Differenzierung bekannt sind [69]. In der klinischen Anwendung wurden nacheinander mehrere Generationen von synthetischen Retinoiden eingesetzt, die sich jeweils auch durch ihre chemische Struktur unterscheiden [183, 69].

In der Behandlung von genetischen Fehlbildungen der Haut (Genodermatosen), von chronischen Erkrankungen vom erythroquamösen Typ, vor allem der Psoriasis, bei schwerer nodulozystischer Akne und in der Behandlung UV-induzierter Dysplasien der Epidermis, mit Entwicklung von Präkanzerosen und etablierten Plattenepithelkarzinomen, spielen Retinoide in topischer und systemischer Anwendung eine nicht mehr wegzudenkende Rolle. Neue Indikationsfelder sind auch Autoimmunerkrankungen wie kutaner *Lupus erythematoses*, *Lichen planus*, bullöse

gen wie kutaner *Lupus erythematoses*, *Lichen planus*, bullöse Dermatosen sowie Erkrankungen aus der Dermatoonkologie wie multiple Basaliome und Lymphome. Provitamin A (Betacarotin) wird in der Prävention des UV-Lichtschadens eingesetzt. Die Klärung der Mechanismen der therapeutischen Wirkung von Retinoiden und Carotinoiden wurde sowohl in experimentellen Grundlagenarbeiten als auch in der klinischen Forschung in einer großen Menge von Publikationen vor allem seit Mitte der Siebziger Jahre bearbeitet. [39, 160, 166, 177, 185].

Langjährige Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* zeigten die Effekte von Retinoiden auf Leukozyten bzw. zirkulierende neutrophile Granulozyten. So wurde 1981 von Tsambaos & Orfanos gezeigt, daß das Prodrug Etretinat *in vivo* die Migration der Neutrophilen in die psoriatische Epidermis hemmt [180], und van de Kerkhof *et al.* fanden, daß Acitretin, der Metabolit von Etretinat, eine signifikante dosisabhängige Hemmung der Akkumulierung neutrophiler Granulozyten bei Patienten mit palmoplantarer Pustulose [13, 184]. In verschiedenen Arbeiten von Bauer und Orfanos sowie von Dubertret *et al.* konnte gezeigt werden, daß der immunmodulatorische und antiinflammatorische Effekt des aromatischen Retinoids Acitretin in der Psoriasis therapie ihren Ursprung in der Wirkung auf die humanen Lymphozyten im peripheren Blut sowie die neutrophilen Granulozyten haben kann [52]. Plewig & Wagner fanden in Biopsien der Haut, daß bei *Akne conglobata* und *Akne fulminans* nach Behandlung mit dem nicht-aromatischen Retinoid 13-*cis*-Retinsäure (Isotretinoin) eine Verminderung der Papeln, Pusteln und Knötchen sowie der Leukozyten auftritt [138, 139]. Pigatto *et al.* sowie Norris *et al.* berichten über die inhibitorischen Effekte von 13-*cis*-Retinsäure in der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten in zystischer Akne *in vivo* [120, 135]. Sie postulieren, daß diese Wirkung durch die Hemmung der Migration stimulierter Monozyten und Leukozyten durch biologische Barrieren, wie die Basalmembranen des Blutgefäßendothels, hervorgebracht wird. Weitere Untersuchungen von Camisa *et al.* [36] zeigten, daß 13-*cis*-Retinsäure ein starker Inhibitor der Superoxidproduktion und der Freisetzung von  $\beta$ -Glucuronidase ist und daß die antiinflammatorische Wirkung durch die Hemmung der Sekretion lysosomaler Enzyme der neutrophilen Granulozyten bedingt sein kann. Wozel *et al.* und Fumarulo *et al.* [60, 193] berichten, daß die topische Anwendung von 13-*cis*-Retinsäure die LTB<sub>4</sub>-induzierte Migration von neutrophilen Granulozyten hemmt. Ihre Ergebnisse bestätigen das Postulat, daß die Wirkung von Retinoiden mit der Hemmung der Migration von neutrophilen Granulozyten sowie der Inhibierung der Radikalbildung und der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren zusammenhängt. Hiramatsu & Packer [84, 128] un-

tersuchten mit Hilfe der EPR *in vitro* die antioxidative Aktivität verschiedener Retinoide in einem nichtbiologischen System und bestätigten unter anderem für die all-*trans*- und 13-*cis*-Retinsäure sowie für Acitretin eine starke Wirkung als Radikalfänger.

Eine wesentliche Rolle in der Prävention UV-induzierter Schädigungen und Krebs spielen wegen ihrer starken Potenz als Radikalfänger die Carotinoide –  $\beta$ -Carotin (Provitamin A) und seine Derivate. Die biologische Wirkung von  $\beta$ -Carotin beruht zum großen Teil auf dem daraus resultierenden Schutz des Gewebes vor oxidativen Schädigungen [95, 97, 129]. Di Mascio und Sies arbeiteten an der weiteren Aufklärung der Mechanismen dieser Wirkungen in biologischen Systemen.  $\beta$ -Carotin (Provitamin A) wurde zur Prävention der Haut vor UV-Schädigungen zusammen mit anderen Vitaminen (Vitamin C und E, Thiole) eingesetzt. Die Supplementierung mit  $\beta$ -Carotin bildet in Kombination mit topischer Anwendung einen effizienten Schutz gegen Entzündungsvorgänge und UV-induzierte Hautalterung.  $\beta$ -Carotin kann aktivierte Sauerstoffverbindungen durch Quenchen inaktivieren und die Bildung freier Radikale hemmen [48, 49]. Ebenfalls in der Literatur diskutiert wird der direkte Einfluß von  $\beta$ -Carotin auf das Immunsystem. So wurden eine Stimulation von Lymphozyten *in vitro* [158, 190] und ein protektiver Effekt bei UV-induzierten Schädigungen des Immunsystems [11] gefunden. Gollnick, Biesalski *et al.* [14, 20, 57, 68] konnten erstmals *in vivo* zeigen, daß eine orale Supplementierung mit  $\beta$ -Carotin über einen Zeitraum von 10 Wochen UV-induzierte Veränderungen beeinflussen kann.  $\beta$ -Carotin verringert die Erythembildung, stärkt die Immunabwehr der Haut, vermindert die Lichtempfindlichkeit und hemmt die UV-induzierte Verringerung der Antwort auf Recall-Antigene.

In Hinsicht auf die protektive Wirkung von  $\beta$ -Carotin muß auch die Abhängigkeit der  $\beta$ -Carotin-Tocopherol-Ascorbinsäure-Kaskade diskutiert werden. Studien über die Konzentration von  $\beta$ -Carotin und  $\alpha$ -Tocopherol in Plasma und Gewebe bei Probanden unter UV-Bestrahlung zeigten einen deutlicheren Abfall von  $\alpha$ -Tocopherol bei Probanden unter  $\beta$ -Carotin-Supplementierung [14]. Zu einer Verunsicherung in Hinblick auf den präventiven Einsatz von  $\beta$ -Carotin haben einige Studien geführt. So wurde in einer Studie ein negativer Effekt einer  $\beta$ -Carotin-Supplementation bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern und Placebo auf die Inzidenz von Lungenkarzinomen gezeigt [17, 122]. In einer weiteren Studie wurde ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko bei Alkoholikern mit hoher Konzentration von  $\beta$ -Carotin im Blutplasma gefunden [146].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine Untersuchung des Einflusses gegenwärtig in der Dermatologie bzw. in der Prävention von UV-Schädigungen eingesetzter Retinoide

vom Typ des Etreinat, seines ersten Metaboliten Acitretin, des Isotretinoin und von  $\beta$ -Carotin auf humane neutrophile Granulozyten. Hierbei war primäres Ziel, den Einfluß dieser Substanzen *in vitro* und *in vivo* auf die Freisetzung von freien Radikalen in neutrophilen Granulozyten während des Prozesses der Phagozytose näher zu analysieren. Da Retinoide vom Typ des Acitretin und des Isotretinoin die Infiltration neutrophiler Granulozyten in die Epidermis inhibieren und somit sekundär die Freisetzung von freien Radikalen als wesentlichen Mechanismus der Inflammation der Haut beeinflussen, war abzuklären, welche dosisabhängigen Effekte jedes der untersuchten Isomere in dieser Hinsicht hatte. Außerdem sollte erstmalig der Einfluß von  $\beta$ -Carotin *in vivo* auf die Phagozytose im Rahmen einer Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie unter Einsatz von UV-Bestrahlung untersucht werden. Weitere Untersuchungen *in vitro* sollten zeigen, welche spezifischen Wirkungen der einzelnen  $\beta$ -Carotin-Isomere auf die Freisetzung von freien Radikalen in neutrophilen Granulozyten während der Phagozytose auftreten.

Wir untersuchten diese Wirkungen in biologisch funktionsfähigen und stimulierbaren Granulozyten, wo der physiologische Ablauf der Phagozytose dem Ablauf *in vivo* vergleichbar ist. Da bekannt ist, daß verschiedene Stereoisomere eine unterschiedliche spezifische Wirkung auf die Phagozytose ausüben können, wurde der Einfluß der einzelnen Isomere auf das System separat untersucht. Das erlaubt uns, Rückschlüsse auf die Wirkung dieser Isomere auf molekularer Ebene zu ziehen. Dazu wurde eine hochempfindliche Nachweismethode benötigt, die eine spezifische Erfassung der unterschiedlichen Sauerstoffradikale und mehr Aufschluß über die Entstehung und die Reaktionswege dieser Radikale erlaubt.

Eine geeignete Methode für die Erfassung von Sauerstoffradikalen ist die Elektronenspinresonanzspektrometrie in Verbindung mit der Spin-Trapping-Technik. In der vorliegenden Arbeit wurde die Radikalbildungen in Suspensionen stimulierter neutrophiler Granulozyten gemessen, was die Erfassung von Wirkungen auf zellulärer Ebene ermöglichte, wie sie unter den Bedingungen *in vivo* auftreten können. Um auch rein antioxidative Effekte erfassen zu können, wurde außerdem die Radikalbildung in dem nichtzellulären Xanthin/Xanthinoxidase-System gemessen. Die *in vitro*-Experimente wurden von der Untersuchung der neutrophilen Granulozyten einzelner Probanden begleitet, die sich entweder unter Retinoid-Therapie befanden oder an einer  $\beta$ -Carotin-Studie teilnahmen.

## 1.2. Neutrophile Granulozyten

### 1.2.1. Biologische Funktion

Hauptaufgabe der neutrophilen Granulozyten ist die Abtötung von Eiter- und Sepsiserregern. Die Ausschaltung von Bakterien erfolgt in erster Linie über Phagozytose und intrazelluläre Abtötung. Die Bindung der antikörperbeladenen Bakterien an die neutrophilen Granulozyten über entsprechende Rezeptoren (Fc-Rezeptoren und C3-Komplementrezeptoren) löst transmembranale Signale aus. Daraufhin umfließt die Zelle die gebundenen Bakterien und schließt sie in eine Vakuole ein. Diese fusioniert mit Lysosomen, die u.a. proteolytische Enzyme enthalten. Anschließend werden die Bakterien, meist mit Hilfe von Sauerstoffradikalen, in den Phago-Lysosomen abgetötet. Sauerstoffradikale werden bei der Aktivierung auch nach außen abgegeben, was zusätzlich zur Abtötung adhärenter, noch nicht phagozytierter Bakterien führt. Außerdem haben von Phagozyten gebildete reaktive Sauerstoffmetabolite auch eine große Bedeutung als Mediatoren von nichtinfektiösen Entzündungsprozessen. [44, 45, 114]

Der Beginn der Phagozytose geht einher mit einer Reihe energieintensiver Prozesse, die den Sauerstoffverbrauch der Granulozyten sehr schnell deutlich erhöhen. Dazu gehören neben der Freisetzung mikrobizider Enzyme, wie Lysozym und Proteasen aus den Granula insbesondere auch die intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffradikale. Wegen des hiermit verbundenen plötzlich erhöhten Sauerstoffverbrauchs werden diese Vorgänge als „respiratorischer Burst“ bezeichnet [6]. Die dafür notwendige Energie wird durch den Pentosephosphat-Zyklus bereitgestellt, dessen Aktivität drastisch zunimmt. Es wird NADPH gebildet, das dazu dient, an membranständigem Zytochrom (Cytochrom b-245) gebundenen molekularen Sauerstoff zu reduzieren. Diese Reaktion wird von der NADPH-Oxidase katalysiert, einem membranständigen Enzym, das sowohl in der Zellmembran als auch in der Membran der Granula zu finden ist.

Molekularer Sauerstoff wird mit Hilfe der NADPH-Oxidase in Superoxidanion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) umgewandelt. In weiteren Reaktionen werden Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Singulett-sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) und Hydroxylradikal ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) erzeugt [16, 175, 176]. Die letzteren beiden Sauerstoffmetabolite sind stark wirksame Mikrobizide. Zusätzlich bildet die Kombina-

tion von Peroxiden, Myeloperoxidase und Halogeniden ein wirksames Halogenierungssystem, das Bakterien und Viren zerstören kann [22, 38, 40, 93].

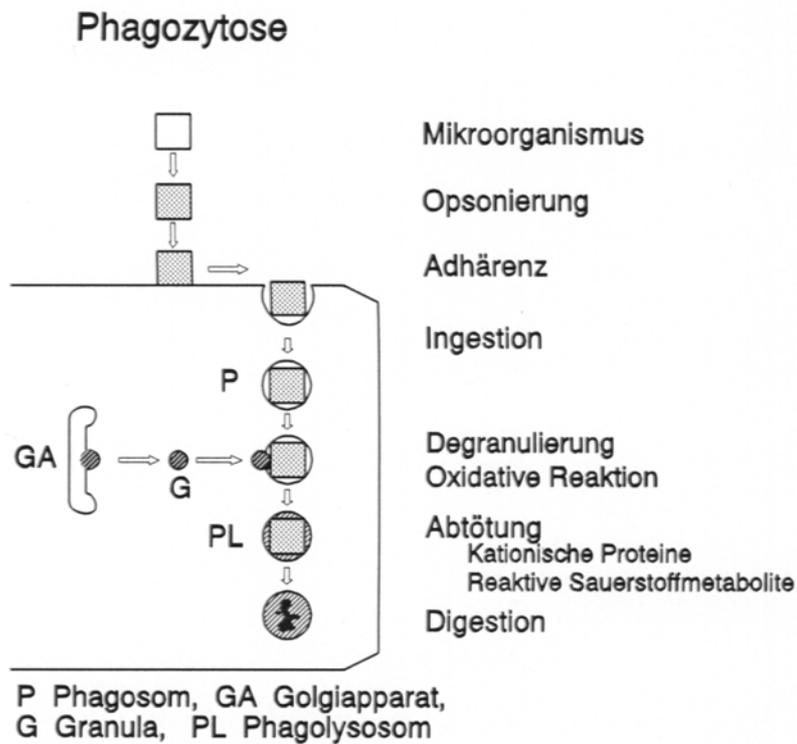


Abb. 1: Schematischer Ablauf der Phagozytose

### 1.2.2. Mechanismen der Radikalbildung in stimulierten neutrophilen Granulozyten

Die Bildung der Sauerstoffmetabolite beginnt mit der Erzeugung des Superoxidationradikals ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) durch NADPH-Oxidase unter Energieverbrauch.

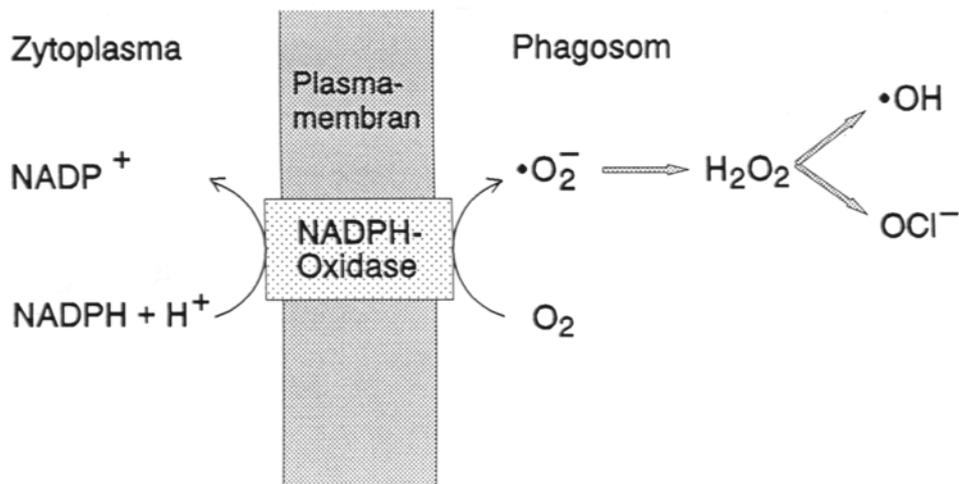


Abb. 2: Phagozytose: Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite

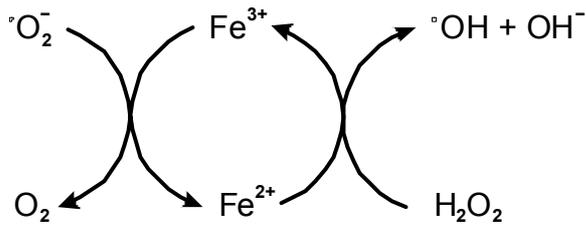
Durch die anschließende Reduktion von  $\cdot\text{O}_2^-$  durch spontane Dismutation wird Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) produziert:



Diese Reaktion wird durch die Wirkung von Superoxiddismutase (SOD) beschleunigt. Hydroxylradikal wird im wesentlichen über zwei Reaktionswege erzeugt: Durch die Eisen-katalysierte Haber-Weiss-Reaktion und/oder durch die Reaktion des Superoxidations mit Hypochlorit, das im Myeloperoxidase- $\text{H}_2\text{O}_2$ -Halidsystem entsteht (Abb. 3).

Die eisenabhängige Haber-Weiss-Reaktion besteht aus zwei Teilreaktionen. Zunächst wird in der Zelle vorhandenes dreiwertiges Eisen mit Hilfe von Superoxidation zu zweiwertigem Eisen reduziert. Das dabei entstehende zweiwertige Eisen wird mit Hilfe von Wasserstoffperoxid wieder zu dreiwertigem Eisen oxidiert, wobei als Reaktionsprodukt Hydroxylradikal entsteht. Damit wirkt Eisen in dieser Reaktion als Katalysator der Umwandlung von Superoxidation und Wasserstoffperoxid zu Hydroxylradikal und Sauerstoff <sup>[74, 107]</sup>. Eisen steht unter physiologischen Bedingungen in der Zelle sowohl in zwei- als auch in dreiwertiger Form ausreichend zur Verfügung. Außerdem wird es von den neutrophilen Granulozyten zusätzlich bei der Phagozytose aus Bakterien gewonnen, die über einen hohen Eisengehalt verfügen <sup>[45]</sup>.

### Fe<sup>2+</sup> - katalysierte Haber-Weiss-Reaktion



### Myeloperoxidase - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Chlorid - System

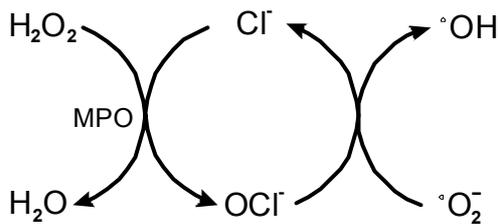


Abb. 3: Zwei Wege zur Bildung von Hydroxylradikalen

Bei dem zweiten genannten Reaktionsweg reagiert Wasserstoffperoxid mit Chlorid, das ausreichend in der Zelle vorhanden ist, was zur Entstehung des hochtoxischen und mikrobizid wirksamen Hypochlorits ( $\text{OCl}^-$ ) führt, das mit Amino- und SH-Gruppen reagieren kann. Die Entstehung von Hypochlorit wird von der Myeloperoxidase (MPO) katalysiert, einem Enzym, das während der Phagozytose aus den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten freigesetzt wird <sup>[40, 92]</sup>. Hypochlorit seinerseits kann, abgesehen von seiner direkten mikrobiziden Wirkung, auch mit Superoxid zu Hydroxylradikal reagieren <sup>[38]</sup>.

Durch eine Störung der Sauerstoffradikalproduktion werden Abtötungsdefekte hervorgerufen, was zu heterogenen Krankheitsbildern führt. Die Sauerstoffradikalbestimmung kann natürlich nur einen Teilaspekt der komplexen Vorgänge bei der Phagozytose beleuchten. Nicht mit der Radikalproduktion zusammenhängende Ursachen von Phagozytosedefekten können beispielsweise Motilitätsstörungen der neutrophilen Granulozyten und das Fehlen von Adhärenzproteinen oder Komplementrezeptoren sein.

### 1.3. Elektronenspinresonanzspektroskopie

#### 1.3.1. Grundlagen der Methode

Die Elektronenspinresonanzspektroskopie (EPR-Spektrometrie) ist ein Spektroskopie-Verfahren im Mikrowellenbereich, das zur Strukturuntersuchung verschiedener paramagnetischer Substanzen verwendet wird. Es beruht auf der 1945 von Zavoiski experimentell entdeckten elektronenparamagnetischen oder Elektronenspinresonanz an paramagnetischen Stoffen. Als paramagnetisch werden Stoffe bezeichnet, die ein magnetisches Moment haben und deshalb auf äußere Magnetfelder reagieren können. Das sind im wesentlichen Stoffe, die unpaarige Elektronen enthalten. Der Spin solcher Elektronen wird nicht vom gegensätzlich ausgerichteten Spin eines anderen Elektrons kompensiert und kommt deshalb als magnetisches Moment makroskopisch zur Geltung <sup>[94]</sup>.

Wird an eine paramagnetische Substanz von außen ein starkes Magnetfeld angelegt, richten sich die unpaarigen Elektronen in zwei unterschiedlichen Energiezuständen aus, die dem gegensätzlich ausgerichteten Spin ( $-\frac{1}{2}$  und  $+\frac{1}{2}$ ) entsprechen (Zee-mann-Effekt). Dabei entspricht der Spin von  $-\frac{1}{2}$  der Ausrichtung der Elektronen in Richtung des Magnetfeldes und dem niedrigeren Energiezustand, der mit hoher Wahrscheinlichkeit eingenommen wird, der Spin von  $+\frac{1}{2}$  der entgegengesetzten Ausrichtung und dem höheren Energiezustand der Elektronen. Der Abstand dieser Energiezustände ist der Feldstärke des angelegten Magnetfeldes proportional:

$$\Delta E = \gamma \cdot H_0 = h \cdot \nu$$

wobei  $\Delta E$  die Energiedifferenz,  $\gamma$  das Produkt aus g-Faktor (siehe unten) und Bohrschem Magneton  $\mu_B$ ,  $H_0$  die Feldstärke,  $h$  das Plancksche Wirkungsquantum und  $\nu$  die Frequenz bezeichnen.

Bei Einstrahlung einer elektromagnetischen Welle mit der Frequenz  $\nu$ , die der Differenz dieser Energiezustände entspricht, tritt eine Resonanz-Absorption durch die Elektronen mit dem niederen Energiezustand auf, die dadurch in den höheren Zustand versetzt werden. Die sich daraus ergebende Energiedifferenz kann analog der Lichtabsorption in der Spektroskopie gemessen werden. Unterschiedliche paramagnetische Substanzen werden durch ein unterschiedliches Verhältnis von Absorptionsfrequenz zu magnetischer Feldstärke charakterisiert und können damit mit Hilfe des

Spektrums quantifiziert werden. Dieses Verhältnis geht als sogenannter g-Faktor in die obige Gleichung ein.

Der g-Faktor hängt von der Elektronen-Konfiguration des gemessenen Radikals oder Ions ab und gibt somit eine erste Information über die Probe. Weitere Informationen gewinnt man durch den Effekt der sogenannten hyperfeinen Wechselwirkung. Damit ist die Wechselwirkung des Elektrons mit benachbarten Atomkernen gemeint, die ebenfalls ein magnetisches Moment besitzen. Jeder dieser Atomkerne verändert die Resonanzfeldstärke ein wenig. Da diese Änderung, abhängig von der Orientierung des magnetischen Moments des Atomkerns, in beide Richtungen gehen kann, wird im Endeffekt das Absorptionsmaximum in eine Reihe von Maxima aufgespaltet, die sich symmetrisch um die durch den g-Faktor bestimmte Feldstärke gruppieren. Aus Anzahl der Aufspaltungen und Größe der Verschiebungen können Informationen über den Aufbau der beteiligten Moleküle und Ionen gewonnen werden.

Um ein möglichst vollständiges Absorptionsspektrum für eine Probe zu erhalten, muß eine der beiden veränderlichen Größen (Feldstärke des Magnetfeldes und Frequenz der Mikrowelle) kontinuierlich über den gesamten möglichen Bereich verändert werden, wobei die zweite Größe konstant gehalten wird. Anders als bei der klassischen Spektroskopie wird bei der EPR aus versuchstechnischen Gründen nicht die Wellenlänge der Strahlung geändert, um die Absorptionsmaxima zu finden. Statt dessen wird bei gleichbleibender Wellenlänge die Stärke des Magnetfeldes kontinuierlich geändert („gesweept“). Da die Energiedifferenz zur Feldstärke proportional ist, hat das den gleichen Effekt wie die Änderung der Wellenlänge. Die Feldstärke, bei der ein Absorptionsmaximum entsteht, wird als Resonanzfeldstärke bezeichnet.

Zu den Stoffen mit paramagnetischen Eigenschaften zählen auch die freien Radikale. In der vorliegenden Arbeit wird die EPR-Methode zur Bestimmung verschiedener Sauerstoffradikale verwendet. Dabei wurde die Meßprobe in einer Quarzküvette in das Zentrum des erzeugten Magnetfeldes gebracht und von einer elektromagnetischen Welle ( $\nu = 10^{10}$  Hz) bestrahlt, die in einer Mikrowellenbrücke erzeugt wurde. Während der Messung wurde das Magnetfeld kontinuierlich in einem für die zu bestimmenden Radikale relevanten Bereich (von 3420 bis 3500 G) geändert. Um Meßfehler zu reduzieren, wurde jede Messung mehrfach (20 oder 40 mal) durchgeführt und das aus diesen Messungen resultierende akkumulative Spektrum ausgewertet. Aus der Feldstärke der Resonanzstellen des gewonnenen Absorptionsspektrums läßt sich auf die Art der enthaltenen Radikale schließen, die Fläche unter dem Resonanz-

signal entspricht der Konzentration der Radikale, die Intensität des Signals ist dazu proportional [94, 140, 141, 150, 151].

### 1.3.2. Die Spin-Trapping-Technik

Sauerstoffradikale haben zwar paramagnetische Eigenschaften und sind deshalb grundsätzlich ein geeignetes Substrat für die Bestimmung mit der EPR-Spektroskopie. In der Praxis wird ihre Bestimmung aber durch ihre Instabilität stark erschwert. Die Radikale werden sofort nach ihrer Entstehung wieder in weniger reaktive Verbindungen umgewandelt – bei der Zersetzung von Mikroorganismen, bei weiterführenden intrazellulären Reaktionen oder durch den Abbau über verschiedene enzymatische Reaktionen zum Schutz der eigenen Zelle. Diese Reaktionsfreudigkeit führt zu einer sehr geringen Halbwertszeit, die eine genaue quantitative Erfassung praktisch unmöglich macht. Die Halbwertszeit für das Hydroxylradikal beträgt beispielsweise nur  $10^{-9}$  s, die für Singulett-Sauerstoff  $10^{-6}$  s [33, 84].

Ein Ausweg aus diesem Problem wurde mit der Verwendung der Spin-Trapping-Technik gefunden [142, 143]. Diese Technik benutzt bestimmte diamagnetische Substanzen (Spinfallen oder Spintrap-Moleküle), die mit den freien Radikalen reagieren und ein relativ stabiles Produkt – das Spinaddukt – bilden, das mit Hilfe der EPR erfaßt werden kann. Das Spektrum, das für ein solches Addukt gemessen wird, ist dabei sowohl von der Art des Spintrap-Moleküls als auch von den Eigenschaften des gebundenen Radikals abhängig. Die genaue Bestimmung des gebundenen Radikals ist gerade in biologischen Systemen, wo eine Vielzahl verschiedener Radikale gleichzeitig auftreten, unabdingbar. Die Unterscheidung verschiedener Radikale wird dabei durch die oben beschriebene hyperfeine Aufspaltung der Spektrallinien ermöglicht, die für jedes Addukt ein charakteristisches Muster erzeugt.

Jansen, Evans und einige andere Forscher untersuchten eine ganze Reihe von Spintrap-Molekülen und bestimmten die Reaktionskonstanten für deren Reaktion mit verschiedenen Radikalen [55, 144]. Insbesondere wurden auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Spintrap-Moleküle  $\alpha$ -4-Pyridyl-1-oxid-N-tert-butylNitron (4-POBN) und 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO) (beide gehören zu den Nitronen) untersucht, die eine hohe Sensitivität für Radikale zeigen [31, 33, 152].

Britigan, Cohen und Rosen etablierten eine Spin-Trapping-Technik für die Bestimmung von Hydroxylradikal und Superoxidanion bei stimulierten Neutrophilen [24, 25, 26,

<sup>144]</sup> Das Spintrap-Molekül DMPO bildet mit Superoxid das Addukt DMPO-OOH und mit Hydroxylradikal das Addukt DMPO-OH. Durch die Zugabe von DMSO (das bei der verwendeten Konzentration keinen relevanten Einfluß auf die Funktion der Neutrophilen hat) stabilisiert sich das Addukt DMPO-OOH. In der Anwesenheit von DMSO reagiert DMPO mit Hydroxylradikalen und bildet das stabile Addukt DMPO-CH<sub>3</sub> <sup>[23, 27, 28, 29]</sup>. Diese Methode wird auch in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung von Superoxidanion verwendet.

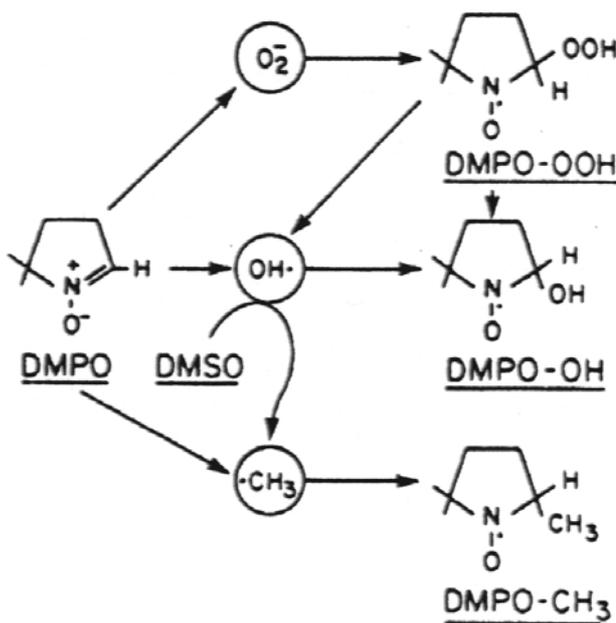


Abb. 4: Reaktionsschema zur Bildung des DMPO-Spintrap-Adduktes in Gegenwart von DMSO

Ramos, Rosen *et al.* verwendeten zur Bestimmung von Hydroxylradikalen das Spintrap-Molekül 4-POBN in Verbindung mit Ethanol <sup>[145]</sup>. Dieses System reagiert viel empfindlicher auf Hydroxylradikale als die vorher verwendeten Spintrap-Moleküle Phenyl-t-butylnitron (PBN) und DMPO. So konnten damit Radikale bei stimulierten Neutrophilen sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Eisen detektiert werden, während mit anderen Methoden in Abwesenheit von Eisen keine Radikale nachgewiesen werden konnten <sup>[30]</sup>. In unserer Arbeit wird diese Methode zur Bestimmung von Hydroxylradikalen verwendet. Mit dem Spintrap-Molekül  $\alpha$ -4-Pyridyl-1-oxid-N-tert-butylnitron (4-POBN) bildet das freie Hydroxylradikal in Gegenwart von

Ethanol das stabile  $\alpha$ -Hydroxyethyl-Addukt des Spintrap-Moleküls POBN (4-POBN-CH(CH<sub>3</sub>)OH) [24, 151].

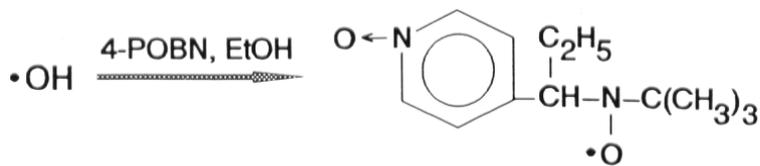
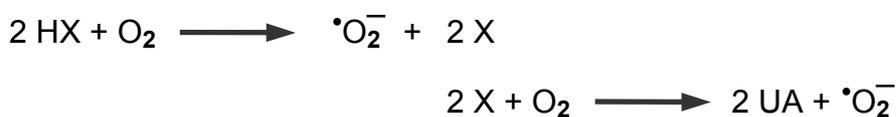


Abb. 5: Bildung des 4-POBN-OH-Addukts in Gegenwart von Ethanol

Das Spintrap-Molekül DMPO hat sich in nichtzellulären Systemen gut etabliert. Buettner und Jurkiewicz beschrieben in ihrer Arbeit die Bildung der DMPO-OOH-Addukte, die von der Xanthinoxidase katalysiert wird [32]. So wird die Oxidation von Hypoxanthin zu Harnsäure beschleunigt und Wasserstoffperoxid und Superoxid freigesetzt. Das macht dieses System für unsere Studien attraktiv, wo es zur parallelen Untersuchung des Einflusses von Retinoiden und Carotinoiden in stimulierten neutrophilen Granulozyten eingesetzt wird. Die Xanthinoxidasereaktion läuft folgendermaßen ab:



wobei HX Hypoxanthin, X Xanthin und UA Harnsäure bezeichnen. Durch die Hypoxanthin-Xanthinoxidase-Reaktion wird Superoxidradikal freigesetzt. Die spontane Superoxiddismutation produziert aus Superoxidanion Wasserstoffperoxid, welches in Anwesenheit von Fe<sup>2+</sup> über die Eisen-katalysierte Fenton-Reaktion zur Bildung von Hydroxylradikal führt [34, 107, 108].



Diese Methoden waren die Grundlage für die Untersuchung des Einflusses von Retinoiden und Carotinoiden auf die Freisetzung von Sauerstoffradikalen in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten.

## **1.4. Retinoide**

### **1.4.1. Definition**

Retinoide sind natürlich vorkommende oder synthetische Abkömmlinge des Vitamins A (Retinol). Sie sind durch eine ähnliche biologische Aktivität wie ihre Muttersubstanz charakterisiert. Ebenso wie Retinol sind sie lipophil und haben eine hormonartige Wirkung auf verschiedene biologische Prozesse. Die Entdeckung der extra- und intrazellulären Transportproteine für Retinoide und zuletzt der Retinoidrezeptoren deutet auf eine spezifische biologische Aktivität hin <sup>[4, 56]</sup>.

Die Definition der Retinoide hat sich im Laufe der Jahre gewandelt. Ursprünglich wurden als Retinoide eine Gruppe von natürlich vorkommenden oder synthetischen Abkömmlingen des Vitamins A (Retinol) bezeichnet, die eine bestimmte chemische Struktur (vier Isoprenoideinheiten in einer Kopf-Schwanz-Struktur) aufweisen. Nach der Entdeckung der Retinoidrezeptoren wurde die Definition auf Substanzen erweitert, die eine spezifische biologische Wirkung durch die Bindung an diese Rezeptoren und deren Aktivierung verursachen. Mittlerweile sind allerdings auch Retinoide bekannt, deren biologische Wirkung auf anderen Mechanismen beruht <sup>[196]</sup>.

Heute werden Retinoide als kleinmolekulige Hormone definiert, die in einer Reihe fundamentaler biologischer Funktionen involviert sind. So modulieren sie die zelluläre Proliferation und Differenzierung und regulieren die Apoptose. Wegen ihrer Teilnahme an vielen physiologischen Prozessen haben die Retinoide ein klinisches Potential auf mehreren therapeutischen Gebieten. Zu den Retinoiden werden heute Retinol selbst, Retinal und seine Isomere, die Retinylester, *all-trans*-, *9-cis*- und *13-cis*-Retinsäure sowie weitere verwandte Substanzen gezählt, die für ihre vielfältige biologische Wirkung insbesondere auf Wachstum und Differenzierung bekannt sind. Zu den neuesten synthetischen Retinoiden zählen die Tazarotene, die eine spezifische Wirkung auf einzelne Retinoidrezeptoren haben <sup>[69, 72, 90, 181]</sup>.

### **1.4.2. Vorkommen und Bedeutung**

Retinoide wirken unter anderem als Regulatoren, die das funktionelle Gleichgewicht von Proliferation und Differenzierung der Zellen auf genetischer Ebene regulieren und aufrechterhalten. Im adulten Organismus wirken Retinoide z.B. als Schutz-

faktoren vor maligner Entgleisung <sup>[71, 75]</sup>. So wurden Retinoide erfolgreich bei der Behandlung prämaligener Tumore und bei der Reduzierung der Inzidenz sekundärer Tumore eingesetzt, während für  $\beta$ -Carotin (s.u.) eine ähnliche Aktivität nicht gefunden werden konnte <sup>[51]</sup>. Auch eine Wirkung auf das Immunsystem (sowohl immunsupprimierende als auch immunstimulierende Aktivitäten) kann für die Retinoide nachgewiesen werden <sup>[69]</sup>. Die vielfältige Wirkung der Retinoide schaffte die Voraussetzung für neue therapeutische Konzepte sowohl in der Dermatologie als auch auf anderen Gebieten. In besonderem Maße betrifft das die Onkologie, wo es inzwischen reale Möglichkeiten der Behandlung maligner Erkrankungen mit Retinoiden gibt, normalerweise in Kombination mit anderen Medikamenten, wie Zytokinen und Zytostatika <sup>[7, 10, 106, 112]</sup>.

Die therapeutische Anwendung von Retinoiden in der Dermatologie beruht letztendlich ebenfalls wesentlich auf der regulierenden Wirkung, die sie auf Differenzierung und Proliferation ausüben. So verstärken Retinoide wie Acitretin und Etretinat die Differenzierung der Keratinozyten und hemmen die Proliferation in der Basalzellschicht. Diese Wirkungen sind allerdings nicht einheitlich; verschiedene Retinoide können teilweise auch entgegengesetzte Wirkungen haben. Unterschiedliche Retinoide können dosisabhängig und zeitabhängig einerseits zu einer mehr embryonalen Redifferenzierung als auch andererseits zu einer kurzfristigen Proliferationssteigerung führen. Abhängig von der Affinität der einzelnen Retinoide zu den verschiedenen Retinoidrezeptoren können Einflüsse über die Basalzellschicht hinaus auf die Ein- und Abschaltung von Genen in differenzierten Keratinozyten auftreten <sup>[70, 109, 164, 168, 186]</sup>.

Sie führen darüber hinaus – entsprechend ihren immunmodulatorischen Funktionen – zum Abklingen der dermalen Entzündung <sup>[97, 124]</sup>. Das Hauptgebiet der klinischen Anwendung von Retinoiden liegt bei der Therapie der Psoriasis, verschiedener Genodermatosen und der schweren Akne <sup>[47, 96, 191]</sup>. In letzter Zeit werden Retinoide auch zur Behandlung einer Reihe weiterer Erkrankungen eingesetzt; dazu gehören insbesondere Autoimmunerkrankungen, wie kutaner *Lupus erythematoses*, *Lichen planus* und bullöse Dermatosen sowie Erkrankungen aus der Dermatoonkologie wie Plattenepithel-Karzinom, multiple Basaliome und Lymphome <sup>[70, 76, 85]</sup>.

Der Einsatz der Retinoide allein oder in Kombination mit anderen Behandlungsmodalitäten (Cignolin, Vitamin D3-Derivate, Teer, UVA, UVB, Psoralen-UVA, Bade-PUVA, Balneo-Phototherapie) hat in besonderer Weise zum Fortschritt der Behand-

lungseffektivität bei der Psoriasis beigetragen. Die Kombinationstherapie wirkt schneller bei verminderter Dosis als die Monotherapie und zeigt daher weniger Nebenwirkungen [37, 86, 87, 131, 154].

Durch den Einfluß auf Proliferation, Keratinisierung und Differenzierung epithelialer Zellen, durch die Modulation der zellulären und humoralen Immunantwort wie auch durch die antiinflammatorischen Wirkungen, z.B. auf die Arachidonsäurekaskade und die Neutrophilenaktivität, eignen sich Etretinat bzw. Acitretin insbesondere zur Behandlung verschiedener Dermatosen wie *Psoriasis vulgaris*, vor allem erythrodermatischer und pustulöser Formen [54, 65]. Der Signaltransduktionsweg über zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) reguliert sowohl die Keratinozytendifferenzierung und das Wachstum, wie auch inflammatorische Reaktionen. Es wurde darüber berichtet, daß cAMP-Veränderungen am psoriatischen Gewebe durch Retinoide normalisiert werden können [136, 196]. Der neutrophile Granulozyt wird in seiner Funktion beeinflusst [8, 104, 193]. Isotretinoin wird in weiteren Indikationen auch alternativ zu Etretinat/Acitretin bei der pustulösen Psoriasis eingesetzt und kann auch mit PUVA kombiniert werden [86, 111]. Im Gegensatz zu Acitretin scheint Isotretinoin stärker auf reaktive Oxygenspezies (ROS) einzuwirken, die im Rahmen der massiven Infiltration mit Neutrophilen bei der psoriatischen Epidermis eine wesentliche Rolle spielen.

Isotretinoin ist zur Zeit das am stärksten wirksame Medikament bei der schweren Akne. Es zeigt sebosuppressive, komedolytische, antikomedogene sowie antiinflammatorische Wirkung. Es wird bei der *Akne conglobata*, der Knötchenform der *Akne papulopustulosa*, der Akne-Tetrade sowie bei den schweren Verlaufsformen der *Rosacea*, wie *Rosacea conglobata* eingesetzt, und ist auch bei der gramnegativen Follikulitis nicht mehr wegzudenken [46, 123, 138, 172, 181].

### 1.4.3. Pharmakokinetik und Wirkmechanismen

Retinoide sowie Vitamin A werden im Gastrointestinaltrakt resorbiert [136]. Im Plasma werden sie von spezifischen Retinol-bindenden Proteinen (RBP) zu den Geweben transportiert. Die intrazelluläre Aufnahme erfolgt durch Diffusion. Durch zwei Oxidationsschritte wird Retinol über Retinaldehyd in Retinsäure umgewandelt.

Intrazellulär übernehmen die zellulären Retinol-bindenden Proteine (CRBP) die Transportfunktion des RBP im Plasma. Das Retinol wird mit Hilfe von CRBP-1 und NADP<sup>+</sup>-abhängiger Retinoldehydrogenase zu Retinaldehyd oxidiert. Retinaldehyd

wird in einer irreversiblen Reaktion mit Hilfe der NADP<sup>+</sup>-abhängigen Retinaldehydrogenase zur *all-trans*-Retinsäure, dem aktiven natürlichen Retinoid im Gewebe, oxidiert. Die *all-trans*-Retinsäure wird teilweise zur 13-*cis*- und 9-*cis*-Retinsäure isomerisiert <sup>[80]</sup>.

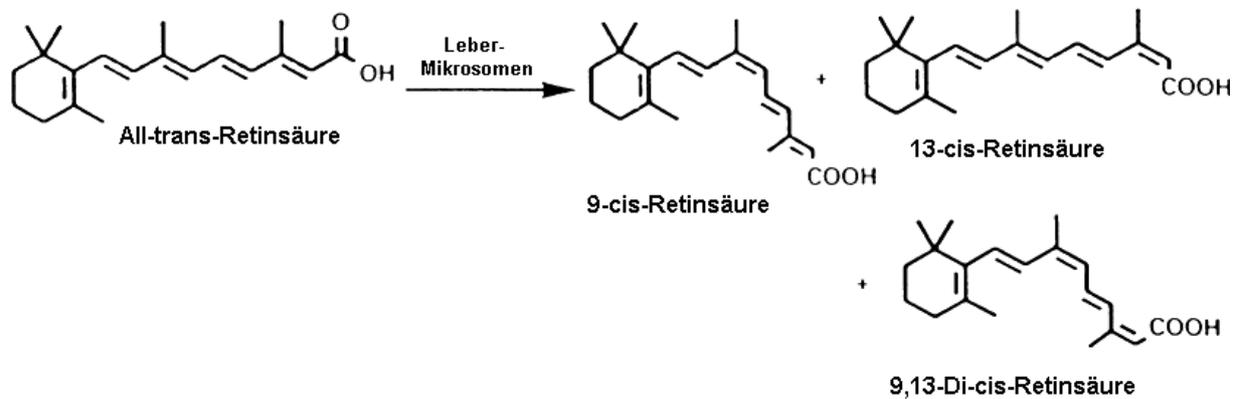


Abb. 6: Retinsäure-Isomerisation

Retinoide üben ihre Wirkung auf die Zielzelle durch die Aktivierung von nukleären Retinoidrezeptoren aus. Zwei große Familien von Retinoidrezeptoren sind bekannt: RAR und RXR sowie deren Isoformen <sup>[21, 192, 194]</sup>. Sie werden vorwiegend in der Haut in Form von Dimeren, Homodimeren und Heterodimeren exprimiert. Die Retinoidrezeptoren zeigen unterschiedliche Affinitäten für die verschiedenen Retinoide, so zeigt z.B. RAR eine hohe Affinität für die *all-trans*-Retinsäure und RXR für die 9-*cis*-Retinsäure. Der Retinsäure-Rezeptor-Komplex aktiviert Gene mit dem Retinsäure-Response-Element (RARE), was die Transkription (mRNS-Synthese) dieser Gene und die Translation (Proteinsynthese) auslöst und somit zur Retinoidwirkung auf Proteinebene führt <sup>[4, 21, 41, 90, 118]</sup>.

Die Dermatologie verfügt über mehrere Generationen von Retinoiden. Zu den Retinoiden der ersten Generation gehören nichtaromatische Substanzen wie Tretinoin (*all-trans*-Retinsäure) und Isotretinoin (13-*cis*-Retinsäure) <sup>[46, 85]</sup>. Zu den Retinoiden der zweiten Generation zählen die monoaromatischen Retinoide wie Etretinat, Acitretin und Monotretinoid <sup>[1, 100]</sup>. Zur dritten Retinoidgeneration gehören polyaromatische Substanzen wie die Arotinoide und Adapelene <sup>[124]</sup>. Eine vielversprechende neue Generation der synthetischen Retinoide bildet die Gruppe der Tazarotene. Verschiedene Vertreter dieser Gruppe haben eine spezifische Affinität entweder zu den RXR- oder zu den RAR-Rezeptoren. Sie modulieren verschiedene pathogene Fak-

toren der Psoriasis – die Hyperproliferation der Keratinozyten, die anormale Differenzierung der Keratinozyten und die Infiltration inflammatorischer Komponenten in die Haut – und werden in der topischen Anwendung bei der Therapie von psoriatischen Plaques eingesetzt [72, 90, 116].

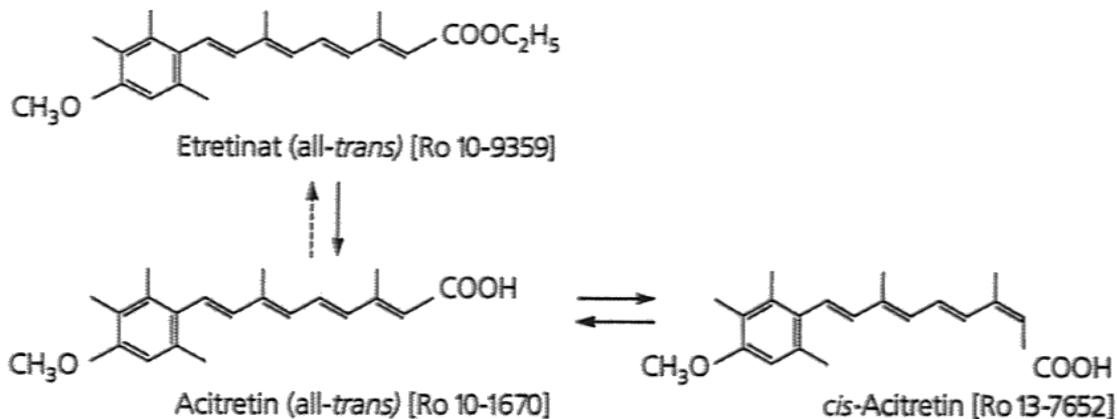


Abb. 7: Stoffwechselwege für Etretinat und Acitretin

In der Dermatologie werden derzeit die beiden oral anwendbaren Retinoide Isotretinoin (Roaccutan) und Acitretin (Neotigason) eingesetzt, außerdem topische Retinoide wie die *all-trans*- und die *13-cis*-Retinsäure, der aromatische Ester Monotretinoid und Drittgenerations-Retinoide (polyaromatische Substanzen) wie Adapalen (Differin). [71, 81, 132]. Isotretinoin wird sowohl topisch wie auch systemisch vornehmlich bei Akne eingesetzt. Acitretin fand seine Anwendung in der Dermatologie insbesondere bei Psoriasis, Genodermatosen und bei Indikationen in der Dermatoonkologie. Tazarotene wie das Benzylretinoid AGN 190168 werden unter anderem in der topischen Anwendung bei Psoriasis eingesetzt.

## 1.5. Carotinoide

### 1.5.1. Vorkommen und Bedeutung

$\beta$ -Carotin (Provitamin A) wird in der Prävention der Haut vor UV-Schädigungen zusammen mit anderen Vitaminen (Vitamin C und E, Thiole) eingesetzt. Die Supplementierung mit  $\beta$ -Carotin in Kombination mit topischer Anwendung bildet einen effizienten Schutz gegen Entzündungsvorgänge und UV-induzierte Hautalterung <sup>[95]</sup>.  $\beta$ -Carotin kann aktivierte Sauerstoffverbindungen durch Quenchen deaktivieren und die Bildung freier Radikale hemmen. Diese Fähigkeit kann die Schäden verhindern, die durch reaktive Radikale auf DNS-Ebene sowie an Proteinen, Kohlenwasserstoffen und Lipiden hervorgerufen werden. Ebenfalls in der Literatur diskutiert wird der direkte Einfluß von  $\beta$ -Carotin auf das Immunsystem <sup>[7]</sup>. So wurden eine Stimulation von Lymphozyten *in vitro* <sup>[158, 190]</sup> und ein protektiver Effekt bei UV-induzierten Schädigungen des Immunsystems <sup>[11]</sup> gefunden. Gollnick, Biesalski *et al.* <sup>[57, 68]</sup> konnten erstmals *in vivo* zeigen, daß eine orale Supplementierung mit  $\beta$ -Carotin über einen Zeitraum von 10 Wochen UV-induzierte Veränderungen beeinflussen kann.  $\beta$ -Carotin verringert die Erythembildung, führt zu einem signifikanten Anstieg der epidermalen Langerhanszellen, stärkt die Immunabwehr der Haut, vermindert die Lichtempfindlichkeit sowie hemmt den UV-induzierten Abfall der Recall-Antigene. Gleichzeitig nimmt unter natürlichem Sonnenlicht die  $\beta$ -Carotin-Konzentration in der Haut und im Plasma deutlich ab <sup>[14, 67]</sup>.

Carotinoide verstärken die Immunabwehr, indem sie die Zytotoxizität der Makrophagen gegenüber Tumorzellen erhöhen, eine erhöhte Lymphozytenproduktion bewirken und die Interferonwirkung beeinflussen <sup>[35]</sup>.  $\beta$ -Carotin bewirkt zudem einen Anstieg der T- und B-Zellaktivität, wodurch die zelluläre Immunantwort beeinflusst wird. Die epidermale Langerhanszellendichte steigt signifikant an. In mehreren Studien wurde zudem eine antikancerogene Wirkung nach  $\beta$ -Carotin-Konsumierung gefunden. Diese Wirkung könnte auch auf den Einfluß von  $\beta$ -Carotin auf die Immunabwehr zurückgeführt werden <sup>[7, 11, 20, 93]</sup>.

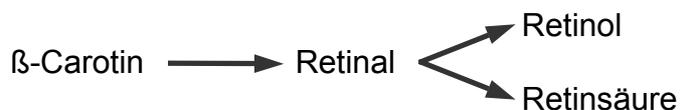
Andere Ergebnisse in Hinsicht auf die antikancerogene Wirkung von  $\beta$ -Carotin haben zwei Studien erbracht, bei denen eine  $\beta$ -Carotin-Supplementation im Vergleich zum Placebo negativ ausfiel, d.h. daß z.B. mehr Lungenkarzinome in der supplementierten Gruppe als in der Placebo-Gruppe auftraten. Die publizierten Ergebnisse lassen

eine selektive Aufregulation von Retinoidrezeptoren annehmen, die sich negativ auf die Eliminierung maligner Zellen oder transformierter Zellen auswirken könnte <sup>[67]</sup>.

Anders als bei diesen langzeitsupplementierten Gruppen wird im Rahmen der UV-Protektion nur eine mehrwöchige Supplementation vor und während der Exposition gegenüber UV-Licht angestrebt. Der Verbrauch von Antioxidantien unter UV-Strahlung ist belegt. Sowohl im Serum als auch in der Haut fallen die Spiegel für  $\beta$ -Carotin, alpha-Tocopherol und Ascorbinsäure ab <sup>[7, 49, 57, 68]</sup>.

### 1.5.2. Pharmakokinetik und Wirkmechanismen

$\beta$ -Carotin gehört zur großen Gruppe der Carotinoide, von denen etwa 50 Provitamin-A-Aktivität besitzen. Der Verzehr von Gemüse und Obst stellt die Hauptquelle für  $\beta$ -Carotin und andere Carotinoide im Organismus dar. Die Carotinoide sind fettlösliche Substanzen, die im Dünndarm resorbiert werden. Ein Teil der Carotinoide wird in den Intestinalzellen mit Hilfe der  $\beta$ -Carotin-15,15'-Dioxygenase gespalten und zu Retinol und Retinaldehyd metabolisiert:



Die umgewandelten Carotinoide zeigen eine antiproliferative und differenzierende Wirkung. Der Transport der intakt resorbierten Carotinoide im Blut erfolgt in den Lipoproteinen, gespeichert werden sie im Fettgewebe und der Leber. In der Haut ist  $\beta$ -Carotin in der Epidermis am stärksten konzentriert (2,2  $\mu\text{g/g}$ ). In der Dermis beträgt die Konzentration etwa 0,7  $\mu\text{g/g}$  und in der Subcutis wird eine Konzentration von etwa 1,9  $\mu\text{g/g}$  gemessen. In den Zellen sind Carotinoide Bestandteil von Membranen und tragen durch ihre antioxidative Wirkung zur Membranstabilisierung bei. Nach der Aufnahme der Carotinoide mit der Nahrung zeigen insbesondere vier Isomere eine biologische Wirkung: die *all-trans*-, *9-cis*-, *11-cis*- und *13-cis*-Isomere <sup>[169, 170]</sup>.

Die antioxidative Wirkung der Carotinoide geht auf ihre Fähigkeit zum Inaktivieren (Quenchen) aktivierter Sauerstoffverbindungen zurück. Dabei reagieren sie insbesondere mit hoch reaktivem Singulett-Sauerstoff, der dadurch in die wenig reaktive Grundform umgewandelt wird, und geben danach die dadurch gewonnene Energie als Wärme wieder ab. So können sie dazu beitragen, daß die Bildung freier Radikale gehemmt wird <sup>[48, 129]</sup>.

Die Effekte von  $\beta$ -Carotin sind ganz wesentlich auf die Verhinderung der durch Photooxidation ausgelösten Zellzerstörungen durch seine antioxidative Wirkung zurückzuführen, und weniger, wie ursprünglich angenommen, auf die Absorption von Licht durch die Verfärbung der Haut.  $\beta$ -Carotin kann nicht nur Singulett-Sauerstoff quenchen, sondern trägt auch zur Hemmung der durch Singulett-Sauerstoff ausgelösten Lipidperoxidation und der damit verbundenen schädigenden Wirkungen bei. In diesem Fall agiert  $\beta$ -Carotin nicht durch Deaktivierung, sondern als sogenannter Scavenger – es bindet sich an die Peroxylradikale, wobei seine Polyenkette gebrochen wird, und bildet mit ihnen, besonders bei niedrigen Sauerstoffpartialdrücken, resonanzstabilisierte Radikale.  $\beta$ -Carotin ergänzt so die Wirkungsweise anderer, endogener (z.B. Superoxiddismutase, Glutathionreduktase) oder exogener Antioxidantien (Tocopherol, Selen) <sup>[59, 95, 161]</sup>.

Auch die bereits angesprochenen immunologischen Effekte der Carotinoide können teilweise auf ihre antioxidative Wirkung zurückgeführt werden. So verhindern sie beispielsweise die hemmende Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Aktivität der T-Lymphozyten sowie auf die spontane und chemotaktische Migration von neutrophilen Granulozyten und tragen damit zu einer Normalisierung der Funktion des Immunsystems bei <sup>[155]</sup>.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

Bei der Vorbereitung von Zellsuspensionen, der Messung von Sauerstoffradikalen in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten und von durch die Xanthinoxidase-Reaktion freigesetzten Sauerstoffradikalen sowie bei der Untersuchung des Einflusses von Retinoiden und  $\beta$ -Carotin auf die genannten Messungen wurden folgende Chemikalien und Substanzen verwendet:

<i>Puffer und Lösungen</i>	
PBS-Dulbecco's (pH=7.3)	Gibco BRL
Polymorphprep (13,8 % Natrium Metrizoate + 8 % Dextran, Osmolarität 460 mOsm)	Nycomed Pharma
<i>Chemikalien</i>	
DTPA (Diethylentriaminpentaacetat)	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
Absolutes Ethanol	Sigma
Zymosan (Suspension)	Sigma
NaN <sub>3</sub> (Natriumazid)	Merck
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (Eisen <sup>3+</sup> -Ionen)	Merck
FeCl <sub>2</sub> (Eisen <sup>2+</sup> -Ionen)	Merck
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck

<i>Enzyme</i>	
Superoxiddismutase (lyophilisiert, Stammlösung 1 mg/2 ml Puffer)	Boehringer
Katalase (lyophilisiert, Stammlösung 1 mg/2 ml Puffer)	Boehringer
Xanthin und Xanthinoxidase	Boehringer
<i>Spintrap-Moleküle</i>	
5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO)	Sigma
$\alpha$ -4-Pyridyl-1-oxid-N-tert-butylnitron (4-POBN)	Sigma
<i>Monoaromatische Retinoide der zweiten Generation</i>	
All- <i>trans</i> -9-(4-methoxy-2,3,6-trimethylphenyl)-3,7-dimethyl-2,4,6,8-nonatetraenoic acid Acitretin (Ro 10-1670), Neotigason	Hoffmann-La Roche
Etretinat (Ro 10-9359), Tigason	Hoffmann-La Roche
13- <i>cis</i> -Acitretin (Ro 13-7652)	Hoffmann-La Roche
<i>Nicht-aromatische Retinoide der ersten Generation</i>	
all- <i>trans</i> -Retinsäure, Tretinoin	Hoffmann-La Roche
13- <i>cis</i> -Retinsäure (Ro 04-3740), Isotretinoin	Hoffmann-La Roche
9- <i>cis</i> -Retinsäure	Hoffmann-La Roche

<i>β-Carotin-Isomere</i>	
all- <i>trans</i> -β-Carotin	Hoffmann-La Roche
13- <i>cis</i> -β-Carotin	Hoffmann-La Roche
9- <i>cis</i> -β-Carotin	Hoffmann-La Roche
<i>Photoaktivator</i>	
Psoralen (8-MOP, 8-Methoxypsoralen)	Gerot Pharmazeutika

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Herstellung der Suspensionen neutrophiler Granulozyten**

Für die Herstellung der neutrophilen Granulozytensuspensionen wurde peripher-venöses Blut in 10 ml heparinisierten Blutröhrchen unter Standardbedingungen abgenommen und sofort verarbeitet. Die Granulozytenseparation erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation. Hierbei wurden 7 ml Polymorphprep mit dem frischen Vollblut überschichtet und anschließend 30 min bei 1800 U/min zentrifugiert. Der Überstand und die Fraktionen wurden vorsichtig bis zum Granulozytenring abgesaugt. Die dichte Suspension wurde mit einer feinen Pipette gewonnen, das übrigbleibende Erythrozytensediment wurde verworfen. Die Granulozytensuspension wurde in 4 °C kalte Lösung von PBS (pH 7,3) in Wasser (1:1) aufgenommen, gewaschen und erneut 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Das Granulozytensediment wurde in 1 ml frisch hergestellter 4 °C kalter Ammoniumchloridlösung (87 mg/10 ml H<sub>2</sub>O) aufgeschwemmt, um eventuelle Erythrozytenkontaminationen zu lysieren. Nach 5 min Einwirkzeit wurde diese Suspension erneut 10 min bei 1200 U/min zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das 97-99 % reine Granulozytensediment wurde in 100-300 µl 4 °C kaltem PBS (pH 7,3) zur Suspension bereitet. Die 10fach im PBS verdünnte Zellsuspension wurde unter dem Mikroskop in der BÜRKER-Kammer auf Reinheit untersucht. Danach wurde sie mit einer Trypan-Blau-Färbung auf ihre Vitalität geprüft. Anschließend wurden die neutrophilen Granulozyten unter dem Mikroskop mit Hilfe der BÜRKER-Kammer gezählt und in 4 °C kaltem PBS (pH 7,3) zu einer Konzentration von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt. Mit diesem Verfahren wurden aus 10 ml heparinisiertem Blut ca. 200-400 µl Granulozyten-Stammsuspension mit  $1 \times 10^8$  Zellen/ml erhalten, deren Vitalität 97-99 % und deren Reinheit 95-98 % betrug.

### **2.2.2. Bereitstellung von opsoniertem Zymosan**

Die Stimulation der neutrophilen Granulozyten erfolgte durch Zusatz von opsoniertem Zymosan. Hierbei handelt es sich um eine Suspension von Polysaccharid-Bestandteilen der Zellmembran von Hefezellen. Diese wurden über die Komplement-Reaktion mit C3b aus Humanserum aktiviert (opsoniert), wodurch die neutrophilen

Granulozyten zur Phagozytose und zum Stoffwechsel verstärkt angeregt wurden. Für die Herstellung dieses Substrates wurde eine Zymosansuspension (15 mg/ml) in physiologischer Kochsalzlösung 20 min lang bei 100 °C im Wasserbad gekocht und anschließend bei 900 U/min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml humanem Poolserum resuspendiert, 45 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und dann zweimal mit HBSS (gepufferte Salzlösung nach HANKS) gewaschen. Das opsonierte Zymosan wurde mit einer Konzentration von 15 mg/ml in HBSS resuspendiert, aliquotiert, bei -196 °C schockgefroren und bei -20 °C gelagert. Unmittelbar vor der Messung wurden die benötigten Aliquote bei 4 °C im Kühlschrank aufgetaut.

### **2.2.3. Probanden und Studiendesign**

Für die *in vitro*-Untersuchungen (Kontrollmessungen sowie Messungen mit Zugabe von Retinoiden oder  $\beta$ -Carotinoiden in Granulozytensuspensionen) wurden Blutproben von Blutspendern der Blutbank des Instituts für Transfusionsmedizin und Immunohämatologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg verwendet.

Für die *in vivo*-Untersuchung des Einflusses von Retinoiden auf die Bildung freier Radikale in stimulierten neutrophilen Granulozyten wurden Blutproben von Patienten mit *Psoriasis vulgaris* (Plaque-Typ) verwendet, die sich in der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg unter der Acitretin- oder Acitretin/PUVA-Kombinationstherapie befanden. Während dieser Therapie wird Neotigason (Wirkstoff Acitretin, 3x10 mg/Tag) zunächst als Monotherapie angewendet, danach mit einer Psoralen-UVA-Phototherapie über mehrere Wochen kombiniert.

Für die *in vitro*-Untersuchungen zur Psoralen-UVA-Phototherapie wurden Granulozytensuspensionen ( $1 \times 10^7$  Zellen/ml) von Kontrollprobanden *in vitro* in Schalen platziert und von oben mit UVA (kumulative Dosis 0,5 – 2 J/cm<sup>2</sup>) bestrahlt. Die Bestrahlung wurde mit der UV-800-Lampe von Philips (315 – 400 nm, Maximum bei 355 nm, Intensität 7 mW/cm<sup>2</sup>) durchgeführt. Die Proben wurden bei konstanter Temperatur (25 °C) sowohl mit als auch ohne Zugabe von Psoralen (0, 100, 200 ng/ml) bestrahlt.

Für die *in vivo*-Untersuchung zum präventiven Einsatz von  $\beta$ -Carotin wurden Blutproben im Rahmen einer Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie entnommen. Aus den Blutproben wurden Granulozytensuspensionen, wie oben beschrieben, gewon-

nen und Plasma separiert. Die gesunden Probandinnen (Hauttyp II und III) wurden einer 8-wöchigen oralen Supplementierung mit Placebo oder  $\beta$ -Carotin (30 mg/Tag) unterzogen. Danach wurden sie 7 Tage mit einer kontrollierten individuell angepaßten sonnenähnlichen Dosis UVA bestrahlt. Die Ruhephase betrug 4 Wochen.

Ziel dieser Studie war zum einen die Untersuchung der Effekte von  $\beta$ -Carotin-Supplementierung auf die Bildung freier Radikale in phagozytierenden neutrophilen Granulozyten, zum anderen die Klärung der Frage, inwieweit  $\beta$ -Carotin eine Prävention von UV-Schäden bewirken kann. In Abb. 8 sind die Zeitpunkte der Entnahme der Proben für die Untersuchung gezeigt.

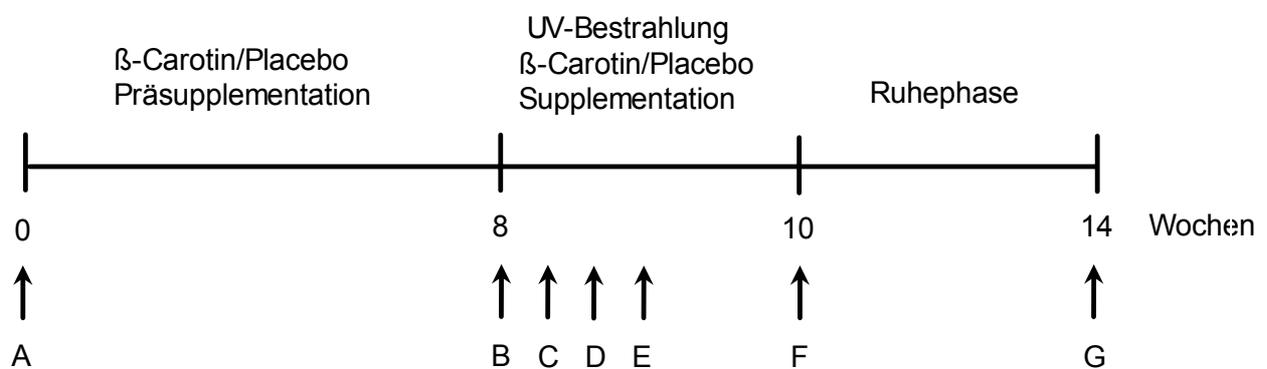


Abb. 8: Studiendesign für die  $\beta$ -Carotin/Placebo-Präsupplementierung und -Supplementierung in Kombination mit UVA-Strahlung.

- A – Kontrollmessung vor oraler Supplementierung
- B – 8 Wochen nach oraler Supplementierung mit  $\beta$ -Carotin oder Placebo
- C, D, E – 3., 5. und 7. Tag der UVA-Bestrahlungsphase
- F – unmittelbar nach dem Ende der Bestrahlungsphase
- G – 4 Wochen nach Ende der Bestrahlungsphase

Die Messung der  $\beta$ -Carotin-Serumspiegel erfolgte durch HPLC-Analyse (reverse Phase) mit Hilfe der in der Klinik für Dermatologie und Venerologie für die klinische Studie etablierte Methode <sup>[68]</sup>. Das Labor ist mit einem HPLC-System der Firma Shimadzu (LC10-Serie) ausgestattet. Die  $\beta$ -Carotin-Extraktion und -Analyse erfolgten nach der von Prof. Biesalski etablierten Methode <sup>[14]</sup>. Die Proben einschließlich des internen Standards ( $\beta$ -Carotin-Standard von Hoffmann-La Roche) wurden in der mobilen Phase (Hexan 98 %, Isopropanol 2 %) aufgenommen. Die Messung erfolgte

durch einen UV-Detektor bei 450 nm. Zur Berechnung der  $\beta$ -Carotin-Menge wurde die interne Standardmethode verwendet.

#### 2.2.4. Die Elektronenspinresonanzmeßtechnik

In unserem experimentellen Ansatz wurde als EPR-Spektrometer das ECS 106 der Firma BRUKER-Analytische Meßtechnik mit einem Resonator 4102 ST verwendet. Für die Steuerung, Kontrolle und Spektralanalyse wurde die im System integrierte Software von BRUKER verwendet, die auf der Basis des Echtzeit-Betriebssystems OS9 arbeitet.

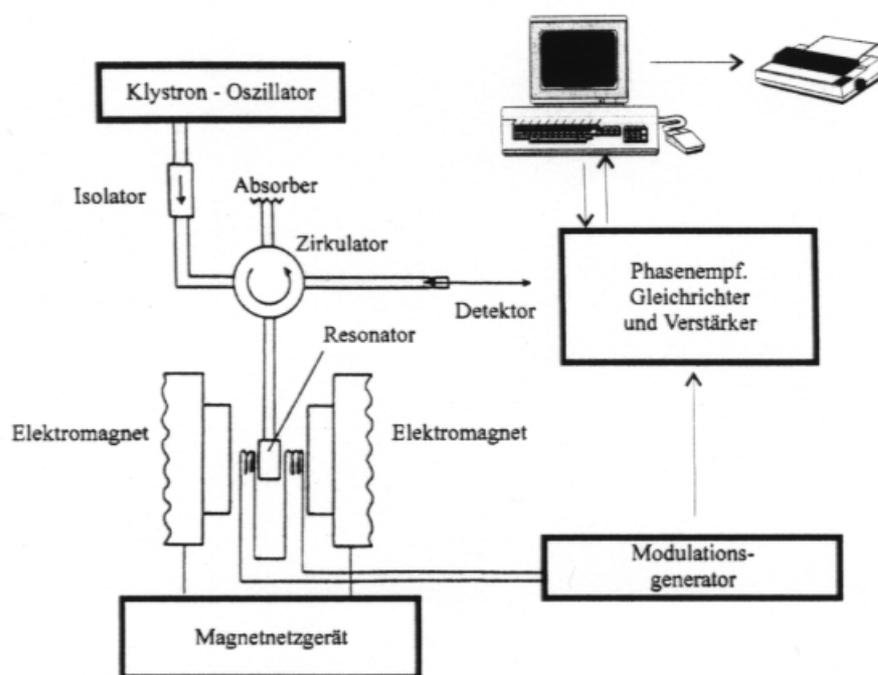


Abb. 9: Schematischer Aufbau des Spektrometers ECS 106.

Zur Anregung der Elektronen wurde eine stabile Mikrowelle mit einer Frequenz von 9,74 GHz und einer Leistung von etwa 10 mW verwendet, die in der Mikrowellenbrücke durch den Resonator ER 4102 ST erzeugt wurde. Über einen Hohlleiter wurde die Mikrowelle zum Meßort geführt. Das erzeugte elektromagnetische Feld wurde in einem Feldstärkebereich von 3425 bis 3495 Gauss moduliert, was einer „sweep“-Breite von etwa 70 Gauss entspricht. Über diesen „sweep“-Bereich wurden 10 s lange Messungen gestartet, die 20 mal (für DMPO) oder 40 mal (für 4-POBN) wiederholt und danach gemittelt wurden. Die Erfassung der Meßwerte erfolgte bei einer

Zeitkonstanten von 20 ms und einem Auflösungsvermögen der magnetischen Feldstärke von 1024 Punkten je Scan. Die Messungen erfolgten in einer Quarz-Küvette (Flachzelle) ER 160 FC jeweils 10, 20 und 30 min nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit opsoniertem Zymosan bei einer Zimmertemperatur von ca. 25 °C.

In der folgenden Übersicht sind die standardisierten Einstellungen aufgelistet, wie sie am EPR-Spektrometer ECS 106 angezeigt wurden:

<u>Receiver</u>		<u>Signal Channel</u>	
Receiver Gain	: 3.20e+04	Coverision	: 10.24 ms
Phase	: 0 deg	Time Const	: 20.48 ms
Harmonic	: 1	Sweep Time	: 10.486 s
Mod Frequency	: 100 kHz	Scale	: 13
Mod Amplitude	: 1.015 G		
<u>Field</u>		<u>Microwave</u>	
Center Field	: 3460.00 G	Frequency	: 9.7400 GHz
Sweep Width	: 70.00 G	Power	: 1.00e+01 mW
Resolution	: 1024 points		

Die EPR-Spektren wurden erfaßt und je nach Verwendung der Spintrap-Moleküle DMPO oder 4-POBN die gebildeten Spintrap-Addukte nach ihren charakteristischen Resonanzpeaks identifiziert und quantifiziert. In Abb. 10 sind charakteristische Spintrapadduktspektren dargestellt, die 20 min nach Zugabe von opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) zu neutrophilen Granulozyten aufgenommen wurden.

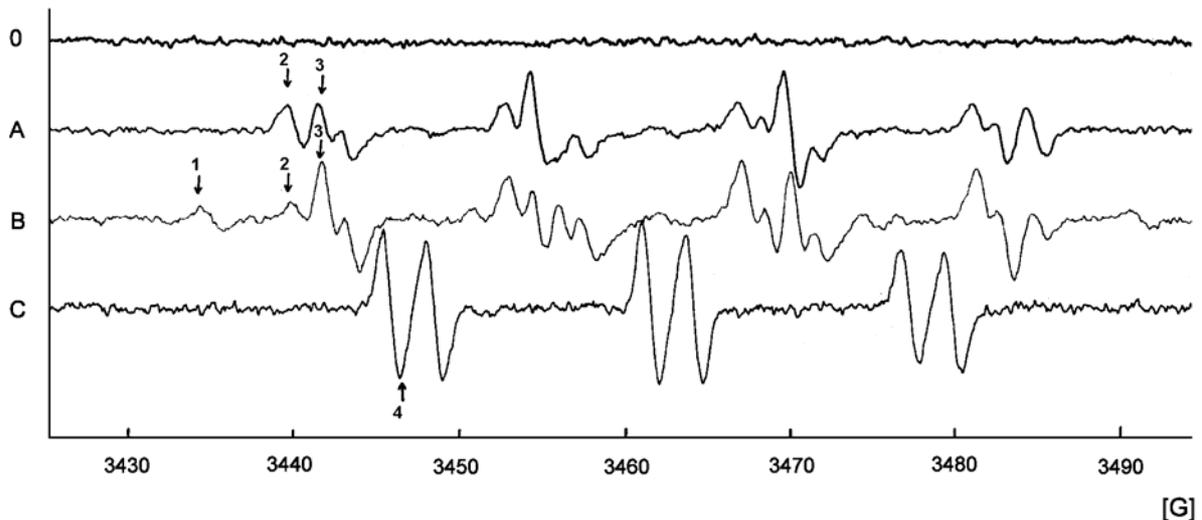


Abb. 10: EPR-Spektren 20 min nach Stimulation von Granulozytensuspensionen mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) in den Standardreaktionen.

O – Kontrollmessung ohne Stimulus,

A – Spektrum für DMPO (100 mM) in  $5 \times 10^6$  Zellen ohne Zugabe von DMSO,

B – Spektrum für 100 mM DMPO in  $5 \times 10^6$  Zellen mit 140 mM DMSO,

C – Spektrum für 4-POBN (10 mM) in  $1 \times 10^7$  Zellen mit 170 mM Ethanol.

Spintrap-Addukte:

1 – DMPO-CH<sub>3</sub> (2,5,5-Trimethyl-1-pyrrolin-N-oxid)

2 – DMPO-OH (5,5-Dimethyl-2-hydroxy-1-pyrrolin-N-oxid)

3 – DMPO-OOH (5,5-Dimethyl-2-hydroperoxy-1-pyrrolin-N-oxid)

4 – 4-POBN-OH (4-POBN-CH(CH<sub>3</sub>)OH)

### 2.2.5. Meßansätze für die Radikalmessung in stimulierten neutrophilen Granulozyten

Alle Meßansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 500 µl vorbereitet. Dieses enthält die entsprechende Granulozytensuspension ( $1 \times 10^8$  Zellen/ml) in Pufferlösung (Dulbeccos PBS, pH 7,3), das verwendete Spintrap-Molekül DMPO oder 4-POBN (Sigma), den Zusatz DMSO (Merck) für DMPO bzw. absolutes Ethanol (Sigma) für 4-POBN sowie opsoniertes Zymosan (Sigma, Stammpräparation 15 mg/ml) für die Stimulation der neutrophilen Granulozyten. Für das zu untersuchende Retinoid oder β-Carotinoid wurde zunächst mit Hilfe einer lipophilisierten Pipette je eine 100-fach konzentrierte Stammlösung in DMSO oder in absolutem Ethanol hergestellt, die bei –

80 °C aufbewahrt wurden. Aus diesen Stammlösungen wurden vor der Verwendung Verdünnungsreihen angefertigt, die den benötigten Konzentrationen der untersuchten Substanz entsprachen. Daraus wurde jeweils die Menge Lösung entnommen, die der Menge von DMSO oder absolutem Ethanol in der Kontrollmessung entsprach, so daß die Konzentrationen dieser Zusätze in allen Ansätzen gleich blieben. Das Gesamtvolumen betrug bei diesen Meßansätzen 500 µl. Vor der Vorbereitung der Meßansätze wurden alle Zusätze auf eine Raumtemperatur von ca. 25 °C temperiert.

Im folgenden sind die absoluten Konzentrationen der einzelnen Zusätze für die verschiedenen Meßansätze aufgelistet.

*Reaktionsansatz für die Superoxid-Detektion:*  $5 \times 10^6$  neutrophile Granulozyten in Suspension, opsoniertes Zymosan (3 mg/ml), DMSO (140 mM), DTPA (0,1 mM) und DMPO (100 mM). Das Reaktionsvolumen wurde durch Zugabe von Pufferlösung (Dulbeccos PBS, pH 7,3) auf 500 µl aufgefüllt.

*Kontrollmessung für die Superoxid-Detektion:*  $5 \times 10^6$  neutrophile Granulozyten in Suspension, DMSO (140 mM), DTPA (0,1 mM) und DMPO (100 mM). Das Reaktionsvolumen wurde durch Zugabe von Pufferlösung (Dulbeccos PBS, pH 7,3) auf 500 µl aufgefüllt.

*Reaktionsansatz für die Hydroxylradikal-Detektion:*  $1 \times 10^7$  neutrophile Granulozyten in Suspension, opsoniertes Zymosan (3 mg/ml), absolutes Ethanol (170 mM), DTPA (0,1 mM) und 4-POBN (10 mM). Das Reaktionsvolumen wurde durch Zugabe von Pufferlösung (Dulbeccos PBS, pH 7,3) auf 500 µl aufgefüllt.

*Kontrollmessung für die Hydroxylradikal-Detektion:*  $1 \times 10^7$  neutrophile Granulozyten in Suspension, absolutes Ethanol (170 mM), DTPA (0,1 mM) und 4-POBN (10 mM). Das Reaktionsvolumen wurde durch Zugabe von Pufferlösung (Dulbeccos PBS, pH 7,3) auf 500 µl aufgefüllt.

#### **2.2.6. Meßansätze für die Radikalmessung im Xanthin/Xanthinoxidase-System**

Da die Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion von pH-Wert und Temperatur abhängig ist, wurde besonders auf diese zwei Faktoren geachtet. Die Pufferlösung wurde für jedes Experiment neu hergestellt, der pH-Wert kontrolliert, und die Lösung vor Gebrauch auf ca. 25 °C temperiert.

*Reaktionsansatz für die Messung von Superoxid:* Xanthin (0,25 mM) und Xanthinoxidase (23 mU/ml) in Anwesenheit von DMPO (10 mM) und 0,1 mM DTPA. Reaktionsvolumen 500 µl.

*Reaktionsansatz für die Messung von Hydroxylradikal:* Xanthin (0,25 mM) und Xanthinoxidase (23 mU/ml), supplementiert mit 0,1 mM Fe<sup>2+</sup> und 0,1 mM DTPA in Anwesenheit von 4-POBN (0,33 mM), 170 mM Ethanol, absolut und 0,1 mM DTPA. Reaktionsvolumen 500 µl.

### **2.2.7. Meßansätze für die Messung des Einflusses von Retinoiden und Carotinoiden auf die freien Radikale in stimulierten neutrophilen Granulozyten**

Die Reaktionen unter Zugabe der Retinoid-Isomere Acitretin, Etretinat und 13-*cis*-Acitretin (monoaromatische Substanzen), Tretinoin (*all-trans*-Retinsäure), Isotretinoin (13-*cis*-Retinsäure) und 9-*cis*-Retinsäure (nichtaromatische Substanzen), sowie der Carotinoide *all-trans*-β-Carotin, 13-*cis*-β-Carotin und 9-*cis*-β-Carotin wurden ebenso wie die in Abschnitt 2.2.5 beschriebenen Messungen vorbereitet. Zusätzlich wurden eine 100-fach konzentrierte Stammlösung (unter Stickstoffbegasung aliquotiert und bei –80 °C aufbewahrt) und Verdünnungsreihen in DMSO und in absolutem Ethanol für jedes Isomer hergestellt. Die Aliquote wurden kurz vor dem Einsatz entnommen und im Kühlschrank gelagert.

Eine Kontrollmessung für Superoxidanion und Hydroxylradikal ohne Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit und ohne Zusatz der Isomere (Retinoid oder Carotinoid) wurde in jedem Experiment durchgeführt. In Zymosan-stimulierten Granulozytensuspensionen wurde eine solche Kontrollmessung zweimal durchgeführt und der Mittelwert als Kontrolle für das jeweilige Experiment berechnet. Dabei wurden nur Experimente mit einer Abweichung von maximal 3 % der Kontrollmessungen untereinander ausgewertet.

Eine Vitalitätskontrolle wurde nach 25 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur mit jeder Substanz (Retinoid oder Carotinoid) in den verwendeten Konzentrationen durchgeführt. Dafür wurde eine 1%ige Trypanblau-Lösung in physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:1 mit der Zellsuspension auf einem Objektträger gemischt. Bei der anschließenden mikroskopischen Auswertung wurden 100 Zellen ausgezählt und der Anteil vitaler Zellen ohne blaue Kernfärbung bestimmt.

### **2.2.8. Meßansätze für die Messung des Einflusses von Superoxiddismutase, Katalase, Natriumazid, Fe<sup>2+</sup>- und Fe<sup>3+</sup>-Ionen auf die freien Radikale in stimulierten neutrophilen Granulozyten**

Ausgehend von diesen Standardansätzen wurde in den Messungen der Einfluß verschiedener Zusätze auf die Entstehung der freien Sauerstoffradikale in stimulierten neutrophilen Granulozyten untersucht. Als Zusätze wurden Superoxiddismutase (Boehringer), Katalase (Boehringer), Natriumazid (Merck), Fe<sup>2+</sup>-Ionen (FeCl<sub>2</sub> von Merck) und Fe<sup>3+</sup>-Ionen (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O von Merck) verwendet. Die Ansätze für diese Messungen wurden ebenso wie die in Abschnitt 2.2.5 beschriebenen Messungen und Kontrollmessungen vorbereitet. Das jeweilige Volumen der Zusätze wird hierbei von der Menge der entsprechenden Pufferlösung abgezogen, um das Gesamtvolumen bei 500 µl konstant zu halten. Die Konzentrationen in den Meßansätzen betrug für die Superoxiddismutase 50 U/ml, für die Katalase 200 U/µl, für Natriumazid 1 mM und für die Fe<sup>2+</sup>- und Fe<sup>3+</sup>-Ionen 0,1 mM.

### **2.2.9. Meßansätze für die Messung des Einflusses der Acitretin- oder Acitretin/PUVA-Therapie in stimulierten neutrophilen Granulozyten von Patienten mit *Psoriasis vulgaris***

*Kontrollmessung für die Superoxidanion- und Hydroxylradikal-Detektion in neutrophilen Granulozyten von Patienten unter UVA-Bestrahlung:* Granulozytensuspensionen (1x10<sup>8</sup> Zellen/ml), gewonnen aus den Blutproben von UVA-bestrahlten Patienten, wurden wie in den oben beschriebenen Kontrollreaktionen für Superoxidanion und Hydroxylradikal mit Spintrap-Molekülen und Zusätzen versetzt. Das EPR-Signal wurde ohne Stimulation 30 Minuten lang in 5-Minuten-Abständen gemessen, um eine unspezifische Bindung an die Spintrap-Moleküle DMPO und 4-POBN ausschließen zu können.

*Kontrollmessung für die Superoxidanion- und Hydroxylradikal-Detektion für in vitro UVA-bestrahlte neutrophile Granulozyten:* Für die *in vitro*-Untersuchungen zur Psoralen-UVA-Phototherapie wurden Granulozytensuspensionen (1x 10<sup>7</sup> Zellen/ml) von Kontrollprobanden in Schalen plaziert und von oben mit UVA (kumulative Dosis 0,5 – 2 J/cm<sup>2</sup>) mit und ohne Zugabe von Psoralen (0, 100, 200 ng/ml) bestrahlt. Die Bestrahlung wurde mit einer UV-800-Lampe von Philips (315-400 nm, Maximum bei 355 nm, Intensität 7 mW/cm<sup>2</sup>) bei konstanter Temperatur von 25 °C durchgeführt. Die bestrahlten Granulozytensuspensionen wurden in 10 ml Dulbeccos PBS (pH 7,3)

bei 25 °C gewaschen und zu einer Suspension mit  $1 \times 10^8$  Zellen/ml vorbereitet. Diese wurde erneut auf Vitalität untersucht und eine 30-minütige Kontrollkinetik ohne Stimulation mit den Spintrap-Molekülen und Zusätzen wie in den oben beschriebenen Kontrollreaktionen für Superoxidanion und Hydroxylradikal durchgeführt, um eine mögliche UVA-Stimulation zu finden.

### **2.3. Statistische Auswertung**

Alle Daten der *in vitro*-Experimente sowie die Meßdaten von Patientenproben wurden mit Hilfe von Students t-Tests ausgewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Superoxid- und Hydroxylradikalmessungen in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten

Zur Bestimmung des günstigsten Meßzeitpunktes und zur Abschätzung der Reproduzierbarkeit der Messungen wurden Kontrollmessungen mit Granulozyten aus dem Blut gesunder Probanden durchgeführt. Dabei ergab sich, daß die EPR-Signalamplituden für DMPO-OOH- und 4-POBN-OH-Messungen in stimulierten neutrophilen Granulozyten ihr Maximum 20 – 30 Minuten nach der Stimulation erreichen.

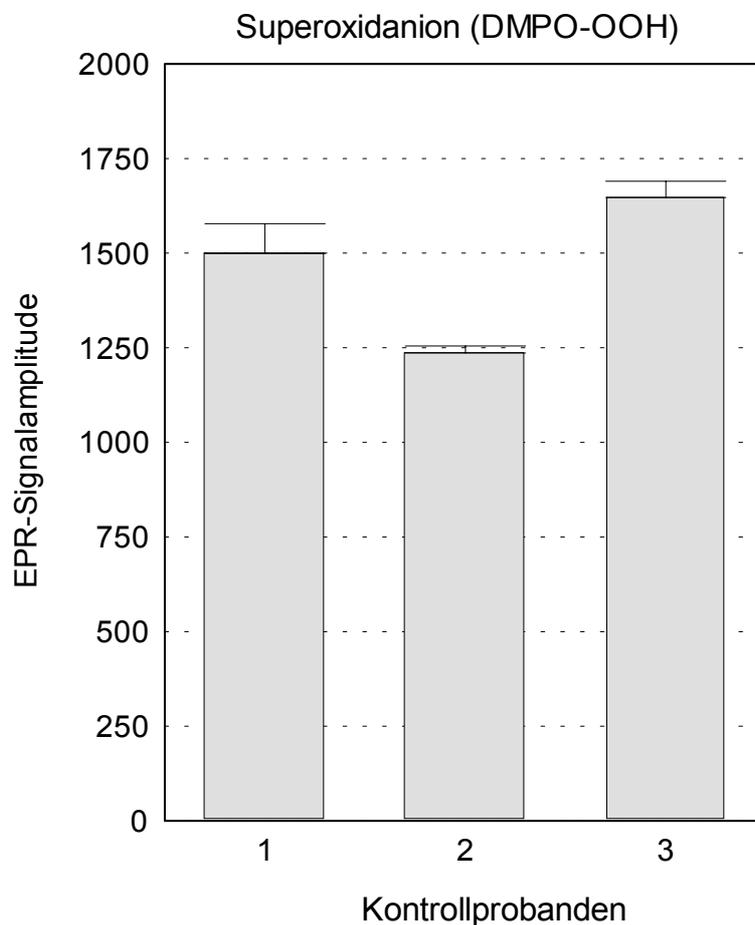


Abb. 11: Mittelwert und Standardabweichung der EPR-Signalamplitude von DPMO-OOH 20 Minuten nach Stimulation von neutrophilen Granulozyten ( $5 \times 10^6$  Zellen) mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) in Gegenwart von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA und 100 mM DPMO. Dargestellt sind die Ergebnisse von 4 Wiederholungsmessungen für 3 Kontrollprobanden.

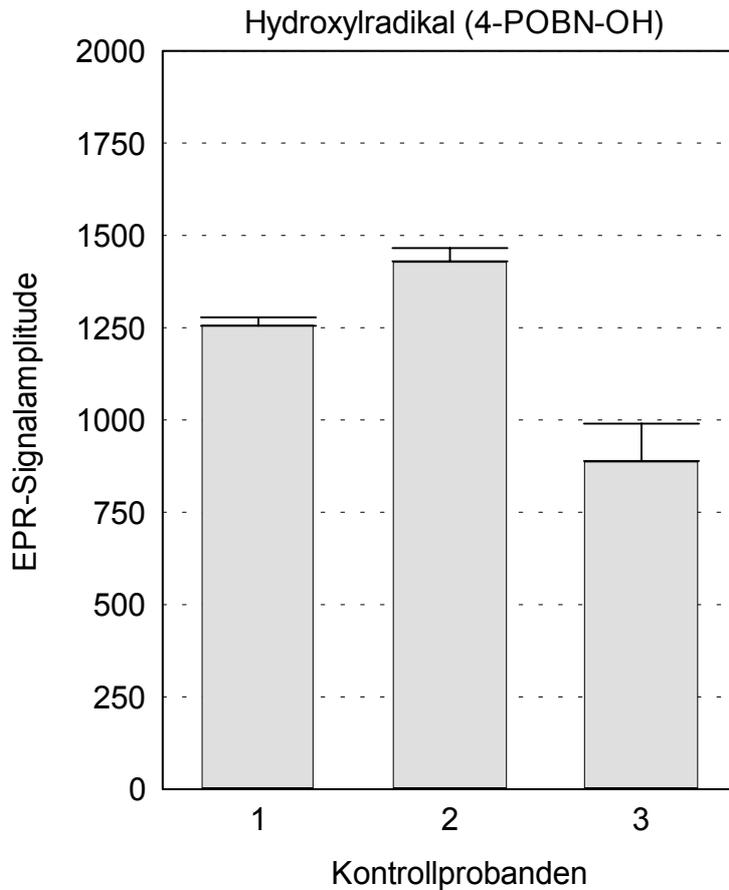


Abb. 12: Mittelwert und Standardabweichung der EPR-Signalamplitude von 4-POBN-OH 20 Minuten nach Stimulation von neutrophilen Granulozyten ( $1 \times 10^7$  Zellen) mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) in Gegenwart von 170 mM absolutem Ethanol, 0,1 mM DTPA und 10 mM 4-POBN. Dargestellt sind die Ergebnisse von 4 Wiederholungsmessungen für 3 Kontrollprobanden.

Aus den Abbildungen 11 und 12 ist zu erkennen, daß der Wiederholungsfehler der EPR-Signale für jede Kontrolle 20 Minuten nach der Stimulation gering war. Alle nachfolgenden Messungen wurden deshalb 20 Minuten nach der Stimulation vorgenommen. Die Darstellungen der Meßergebnisse beziehen sich auf die EPR-Signale zu diesem Zeitpunkt.

Die Meßergebnisse variierten um bis zu 3,6 % bei je 4 Wiederholungen für 3 Proben. Um Falschaussagen durch Meßfehler weitgehend auszuschließen, wurden in jedem Experiment die Kontrollmessungen wiederholt ausgeführt.

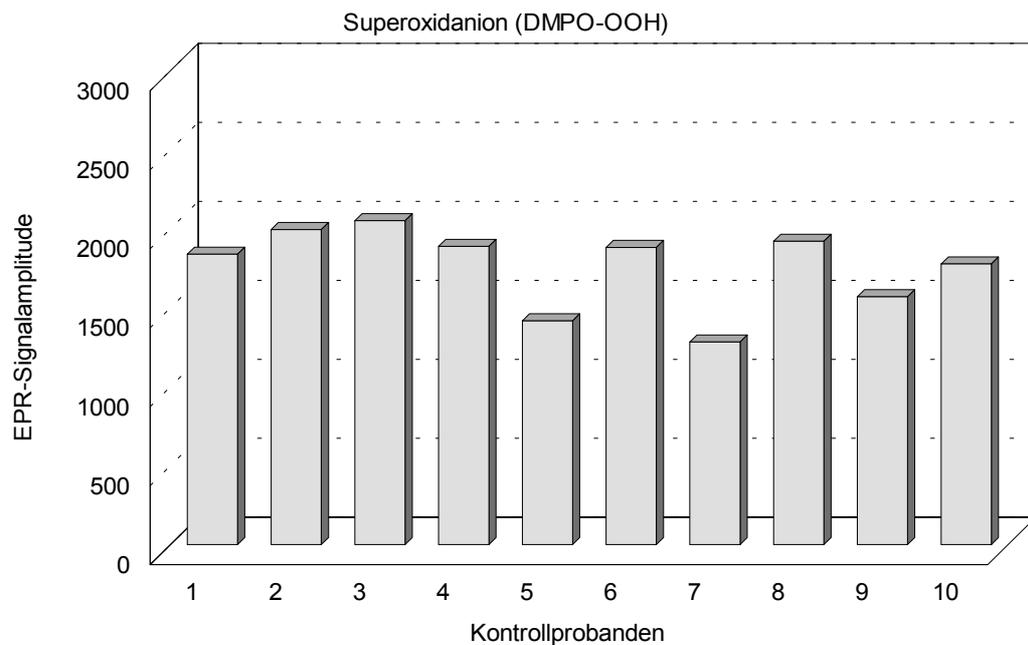


Abb. 13: EPR-Signalamplituden von DPMO-OOH 20 Minuten nach Stimulation von neutrophilen Granulozyten ( $5 \times 10^6$  Zellen) mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) in Gegenwart von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA und 100 mM DPMO. Dargestellt sind die Ergebnisse der Messungen für 10 Kontrollprobanden.

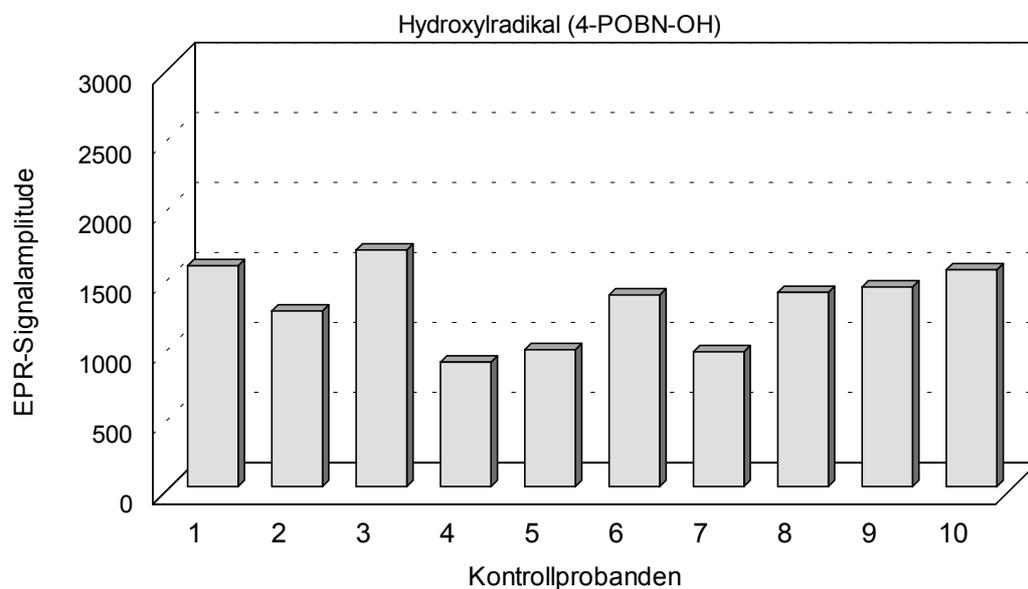


Abb. 14: EPR-Signalamplituden von 4-POBN-OH 20 Minuten nach Stimulation von neutrophilen Granulozyten ( $1 \times 10^7$  Zellen) mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) in Gegenwart von 170 mM absolutem Ethanol, 0,1 mM DTPA und 10 mM 4-POBN. Dargestellt sind die Ergebnisse der Messungen für 10 Kontrollprobanden.

Aus den Messungen der EPR-Signalamplituden für die Bildung von Superoxid (DMPO-OOH-Addukt, Abb. 13) und Hydroxylradikal (4-POBN-OH, Abb. 14) in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten von 10 Kontrollprobanden ist zu erkennen, daß die Absolutwerte dieser Messungen bei den verschiedenen Probanden starken Schwankungen unterworfen sind. Im folgenden wurden deshalb alle Messungen relativ zum gemessenen Mittelwert des Kontrollwertes des jeweiligen Probanden dargestellt, der jeweils als 100 % angenommen wurde.

### **3.2. *Einfluß von Retinoiden auf die Bildung freier Sauerstoffradikale***

#### **3.2.1. *Einfluß der Retinoid-Isomere der ersten Generation auf die freien Sauerstoffradikale in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten***

In diesen Untersuchungen wurde der Einfluß verschiedener Retinoid-Isomere auf die Bildung von Superoxidanion und Hydroxylradikal in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten untersucht, die aus dem Vollblut von 8 Kontrollprobanden gewonnen wurden. Die Proben wurden mit verschiedenen Konzentrationen von *all-trans*-Retinsäure (Tretinoin, s. Abb. 15), *13-cis*-Retinsäure (Isotretinoin, s. Abb. 16) und *9-cis*-Retinsäure (dargestellt in Abb. 17) versetzt. Die Messungen erfolgten 20 Minuten nach der Stimulation mit opsoniertem Zymosan.

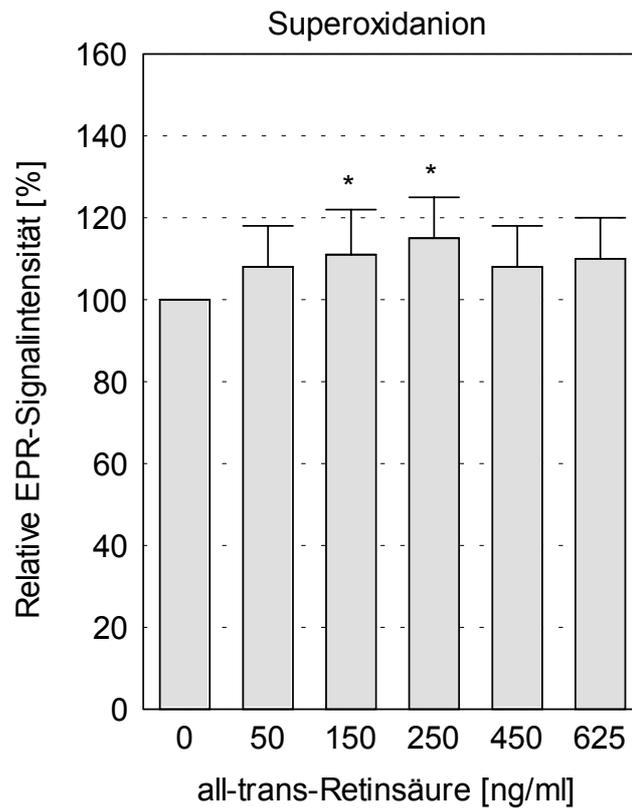


Abb. 15: Einfluß von all-*trans*-Retinsäure auf die Bildung des DMPO-Superoxidanion-Adduktes. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten 20 Minuten nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten ( $5 \times 10^6$  Zellen) von 8 Probanden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) im Vergleich zur mittleren relativen EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen. Die Zellsuspension wurde in Dulbeccos PBS, pH 7,3 unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA und 100 mM DMPO vorbereitet. Signifikanz nach Students t-Test \*  $p < 0.05$ .

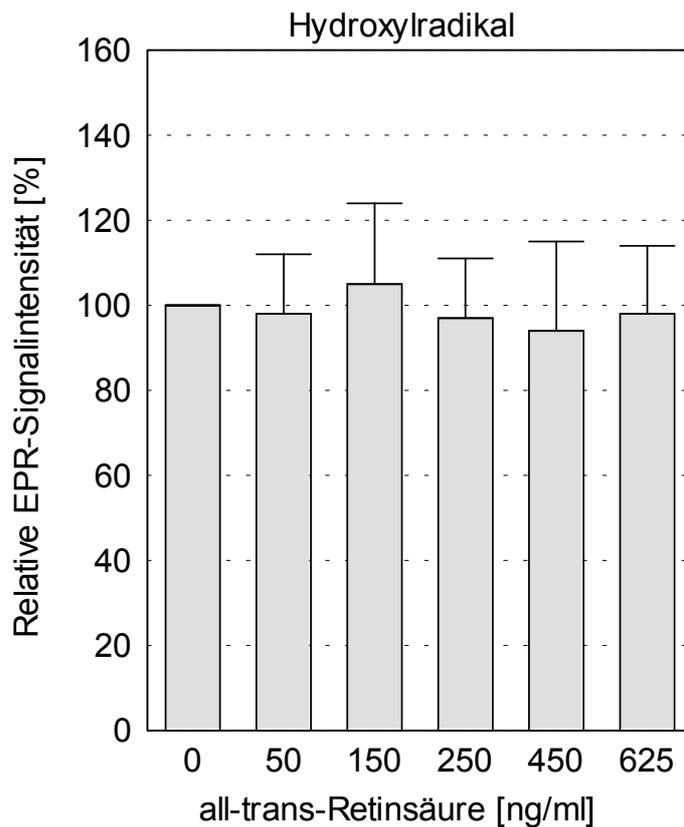


Abb. 16: Einfluß von all-*trans*-Retinsäure auf die Bildung des 4-POBN-Hydroxylradikal-Adduktes. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten 20 Minuten nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten ( $1 \times 10^7$  Zellen) von 8 Probanden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) im Vergleich zur mittleren relativen EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen. Die Zellsuspension wurde in Dulbeccos PBS, pH 7,3 unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA, 170 mM absolutem Ethanol und 10 mM 4-POBN vorbereitet.

In Abb. 15 ist zu sehen, daß die Zugabe von all-*trans*-Retinsäure eine signifikante Erhöhung der Erzeugung von Superoxidanion ( $p < 0.05$ ) bei Konzentrationen von 150 und 250 ng/ml verursacht. Die Hydroxylradikalbildung wurde bei allen getesteten Konzentrationen nicht beeinflusst (Abb. 16).

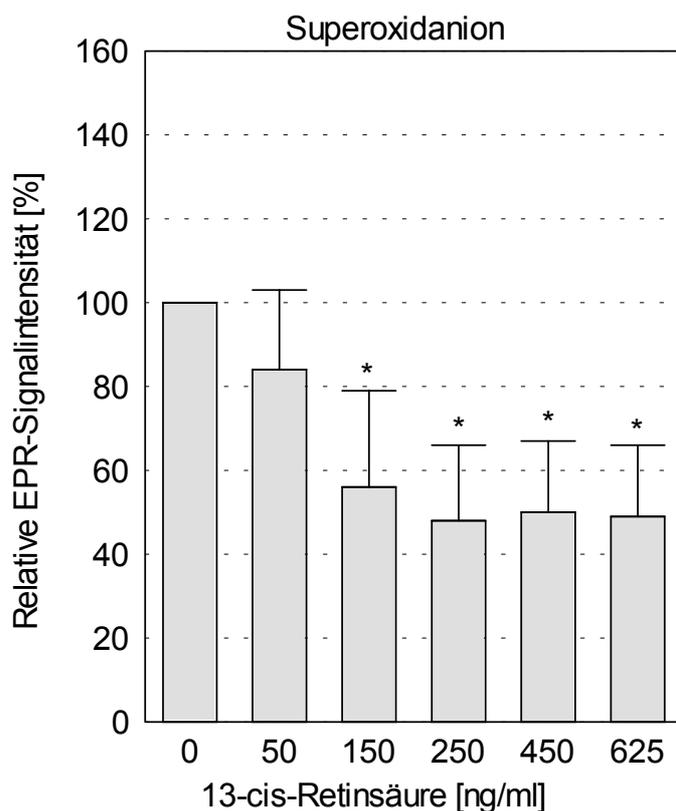


Abb. 17: Einfluß von 13-*cis*-Retinsäure auf die Bildung des DMPO-Superoxidanion-Adduktes. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten 20 Minuten nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten ( $5 \times 10^6$  Zellen) von 8 Probanden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) im Vergleich zur mittleren relativen EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen. Die Zellsuspension wurde in Dulbeccos PBS, pH 7,3 unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA und 100 mM DMPO vorbereitet. \*  $p < 0.05$ .

Wie in Abb. 17 zu sehen ist, bewirkte die Zugabe von 13-*cis*-Retinsäure (Isotretinoin) in Konzentrationen ab 150 ng/ml eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Verminderung der Produktion von Superoxidanion.

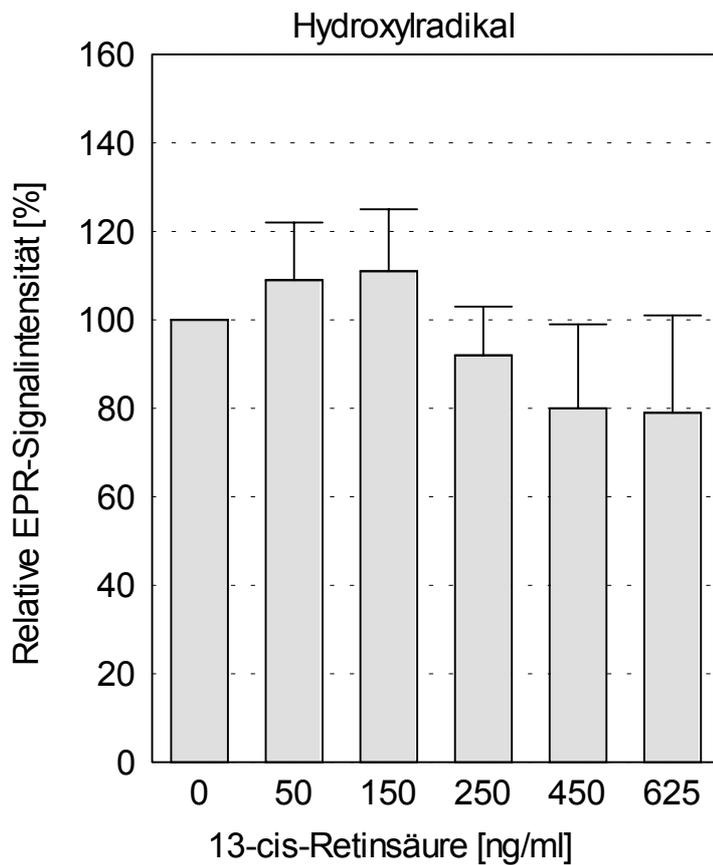


Abb. 18: Einfluß von 13-*cis*-Retinsäure auf die Bildung des 4-POBN-Hydroxylradikal-Adduktes. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten 20 Minuten nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten ( $1 \times 10^7$  Zellen) von 8 Probanden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) im Vergleich zur mittleren relativen EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen. Die Zellsuspension wurde in Dulbeccos PBS, pH 7,3 unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA, 170 mM absolutem Ethanol und 10 mM 4-POBN vorbereitet.

Der Einfluß von 13-*cis* Retinsäure (Isotretinoin) auf die Bildung von Hydroxylradikal war nicht signifikant. Es ist aber eine Tendenz zur Erhöhung der Radikalproduktion bei niedrigen Konzentrationen (50 – 150 ng/ml) und zur Verminderung der Radikalerzeugung bei höheren Konzentrationen (ab 350 ng/ml) zu erkennen (Abb. 18).

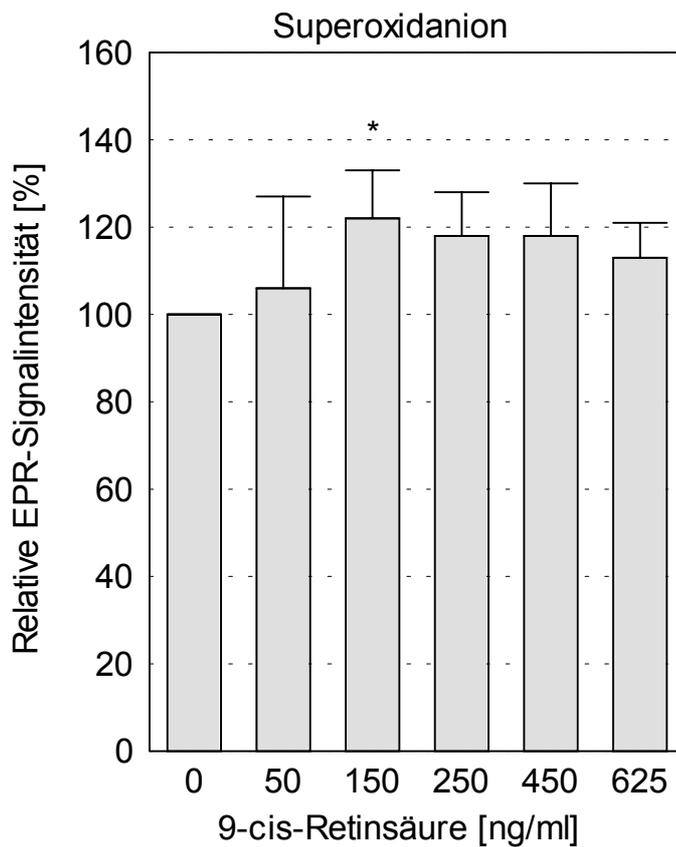


Abb. 19: Einfluß von 9-*cis*-Retinsäure auf die Bildung des DMPO-Superoxidanion-Adduktes. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten 20 Minuten nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten ( $5 \times 10^6$  Zellen) von 8 Probanden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) im Vergleich zur mittleren relativen EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen. Die Zellsuspension wurde in Dulbeccos PBS, pH 7,3 unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA und 100 mM DMPO vorbereitet. \*  $p < 0.05$ .

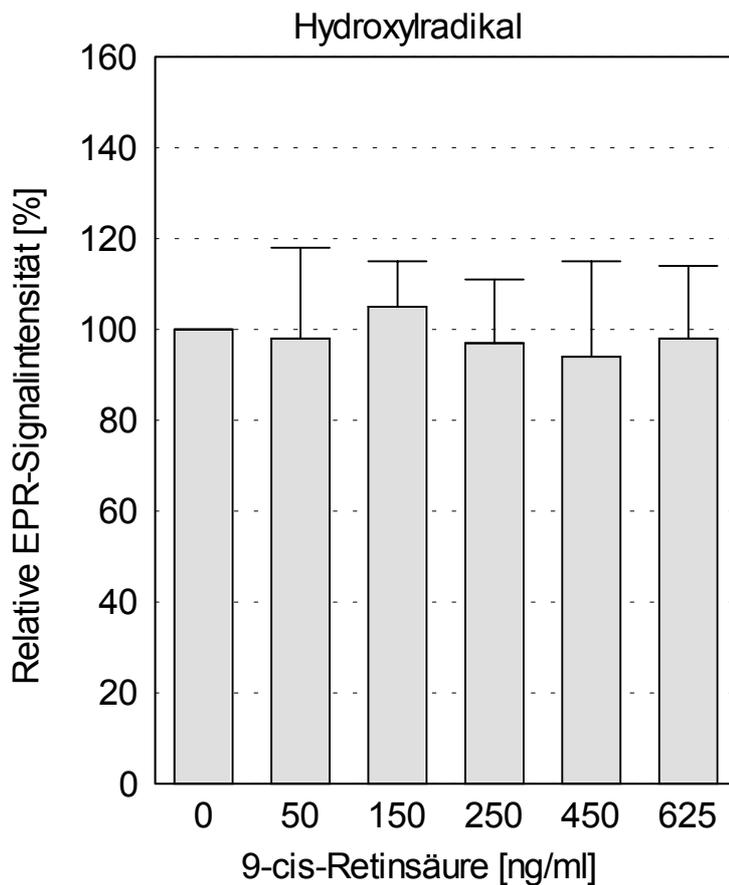


Abb. 20: Einfluß von 9-*cis*-Retinsäure auf die Bildung des 4-POBN-Hydroxylradikal-Adduktes. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten 20 Minuten nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten ( $1 \times 10^7$  Zellen) von 8 Probanden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) im Vergleich zur mittleren relativen EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen. Die Zellsuspension wurde in Dulbeccos PBS, pH 7,3 unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA, 170 mM absolutem Ethanol und 10 mM 4-POBN vorbereitet.

Aus den Abbildungen 19 und 20 ist zu erkennen, daß 9-*cis*-Retinsäure einen ähnlichen Effekt wie all-*trans*-Retinsäure auf die Radikalbildung hat. Es ist eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Erhöhung der Produktion von Superoxidanion bei Konzentrationen von 150 ng/ml zu erkennen, während auf die Hydroxylradikalbildung kein signifikanter Einfluß ersichtlich ist.

### 3.2.2. Einfluß der 13-cis- und 9-cis-Retinsäure auf die Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion

Untersuchungen zum Einfluß von Retinoiden auf die Bildung von Superoxidanion und Hydroxylradikal *in vitro* wurden im Xanthin/Xanthinoxidase-System durchgeführt. Dem System wurden 13-cis- und 9-cis-Retinsäure in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und die Bildung der Addukte für Superoxidanion und Hydroxylradikal gemessen. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Einfluß von 13-cis-Retinsäure (Isotretinoin) und 9-cis-Retinsäure auf die Bildung von Superoxid (DMPO-OOH) und Hydroxylradikal (4-POBN-OH) über die Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion. Mittelwerte und Standardabweichungen der EPR-Signalamplituden für je 5 Messungen jeweils im Vergleich zur mittleren EPR-Signalamplitude der Kontrollmessungen in Prozent der Kontrolle. Ansatz für Superoxid: 0,25 mM Xanthin, 23 mU/ml Xanthinoxidase, 0,1 mM DTPA und 10 mM DMPO. Ansatz für Hydroxylradikal: 170 mM absolutes Ethanol, 0,1 mM DTPA, 0,25 mM Xanthin und 23 mU/ml Xanthinoxidase, in Anwesenheit von 0,33 mM 4-POBN unter Zugabe von 0,1 mM Fe<sup>2+</sup>. \* p<0.05

Superoxid (DMPO-OOH)						
Retinsäurekonzentration (ng/ml)	0	62,5	125	250	500	1000
13-cis Retinsäure	100	97 ± 6	91 ± 8 *	90 ± 8 *	83 ± 8 *	76 ± 10 *
9-cis Retinsäure	100	91 ± 8	88 ± 13	84 ± 11 *	67 ± 8 *	65 ± 9 *
Hydroxylradikal (4-POBN-OH)						
Retinsäurekonzentration (ng/ml)	0	62,5	125	250	500	1000
13-cis Retinsäure	100	45 ± 15 *	52 ± 18 *	49 ± 13 *	53 ± 9 *	66 ± 10 *
9-cis Retinsäure	100	100 ± 8	91 ± 13	87 ± 13 *	89 ± 15	89 ± 9 *

Aus den Ergebnissen ist zu erkennen, daß sowohl 13-cis- als auch 9-cis-Retinsäure einen signifikant hemmenden Einfluß (p<0.05) auf die Bildung der Radikale in der

Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion haben. Insbesondere wurde eine Verminderung der Hydroxylradikalproduktion auf die Hälfte des Kontrollwertes bereits bei geringen Konzentrationen (62,5 ng/ml) von 13-*cis*-Retinsäure (Isotretinoin) gefunden, während 9-*cis*-Retinsäure in Konzentrationen ab 125 ng/ml nur eine geringe Senkung (um etwa 10 %) der Bildung dieses Radikals bewirkte. Die Hemmung der Produktion von Superoxidanion erhöhte sich bei beiden Retinoiden mit zunehmender Konzentration.

### **3.2.3. Einfluß der Retinoid-Isomere der zweiten Generation auf die freien Sauerstoffradikale in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten**

Weiterhin wurde der Einfluß verschiedener Retinoid-Isomere der zweiten Generation (Acitretin, Etretinat und 13-*cis*-Acitretin) auf die Bildung von Superoxid und Hydroxylradikal in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten untersucht, die aus dem Vollblut von 8 Kontrollprobanden gewonnen wurden. Die Retinoide wurden der Suspension in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und jeweils die Produktion der Addukte für Superoxidanion und Hydroxylradikal gemessen. Die Ergebnisse der Messungen sind in den folgenden 3 Abbildungen dargestellt.

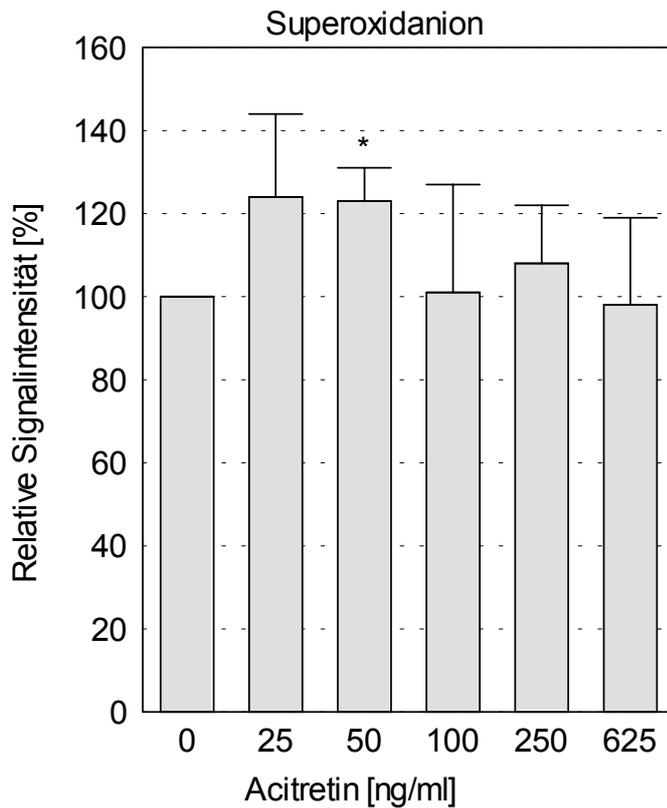


Abb. 21: Einfluß von Acitretin auf die Bildung des DMPO-Superoxidanion-Adduktes. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten 20 Minuten nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten ( $5 \times 10^6$  Zellen) von 8 Probanden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) im Vergleich zur mittleren relativen EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen. Die Zellsuspension wurde in Dulbeccos PBS, pH 7,3 unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA und 100 mM DMPO vorbereitet. \*  $p < 0.05$ .

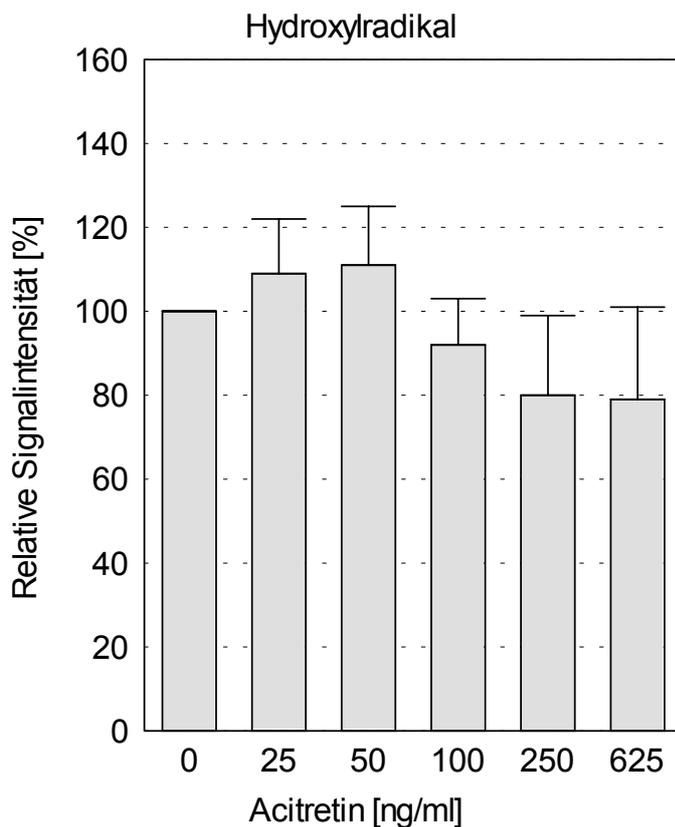


Abb. 22: Einfluß von Acitretin auf die Bildung des 4-POBN-Hydroxylradikal-Adduktes. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten 20 Minuten nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten ( $1 \times 10^7$  Zellen) von 8 Probanden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) im Vergleich zur mittleren relativen EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen. Die Zellsuspension wurde in Dulbeccos PBS, pH 7,3 unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA, 170 mM absolutem Ethanol und 10 mM 4-POBN vorbereitet.

Aus den Abbildungen 21 und 22 ist zu erkennen, daß Acitretin eine Erhöhung der Radikalproduktion bei niedrigen Konzentrationen (25 – 50 ng/ml für Superoxidanion und 50 – 150 ng/ml für Hydroxylradikal) zeigt. Dieser Einfluß ist bei 50 ng/ml für die Superoxidanionbildung signifikant ( $p < 0.05$ ). Für die Hydroxylradikalbildung zeigt sich außerdem eine hemmende Tendenz für höhere Konzentrationen von Acitretin (ab 250 ng/ml).

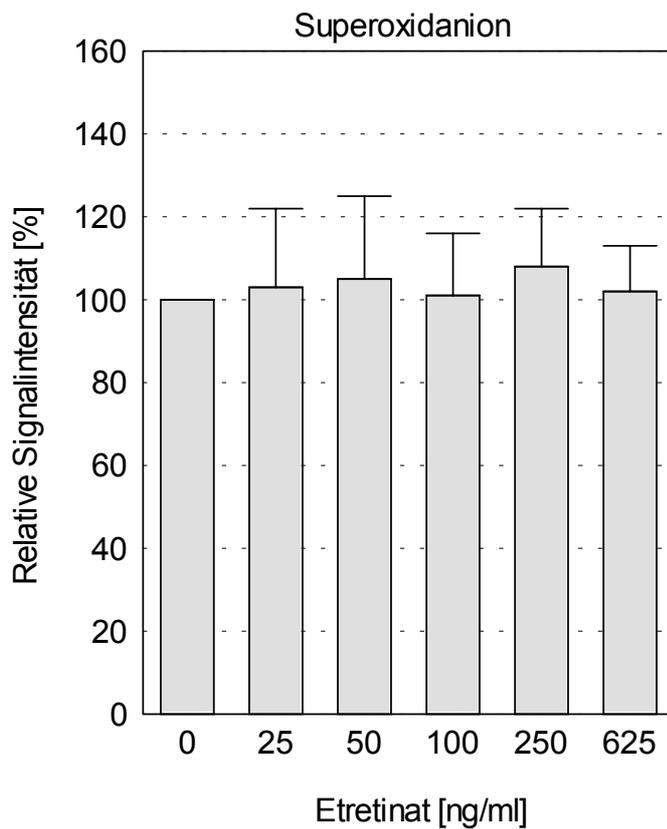


Abb. 23: Einfluß von Etretinat auf die Bildung des DMPO-Superoxidanion-Adduktes. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten 20 Minuten nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten ( $5 \times 10^6$  Zellen) von 8 Probanden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) im Vergleich zur mittleren relativen EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen. Die Zellsuspension wurde in Dulbeccos PBS, pH 7,3 unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA und 100 mM DMPO vorbereitet.

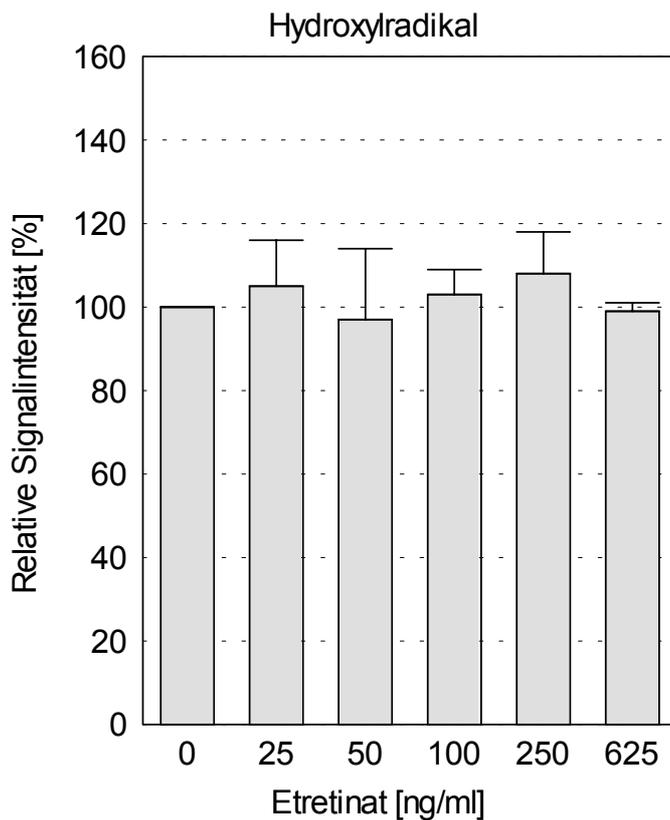


Abb. 24: Einfluß von Etretinat auf die Bildung des 4-POBN-Hydroxylradikal-Adduktes: Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten 20 Minuten nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten ( $1 \times 10^7$  Zellen) von 8 Probanden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) im Vergleich zur mittleren relativen EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen. Die Zellsuspension wurde in Dulbeccos PBS, pH 7,3 unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA, 170 mM absolutem Ethanol und 10 mM 4-POBN vorbereitet.

Wie aus den Abbildungen 23 und 24 zu erkennen ist, scheint Etretinat in den verwendeten Konzentrationen keinerlei signifikanten Einfluß auf die untersuchten Reaktionen zu haben. Alle gemessenen Werte lagen im Bereich der Messungen ohne Retinoidzugabe.

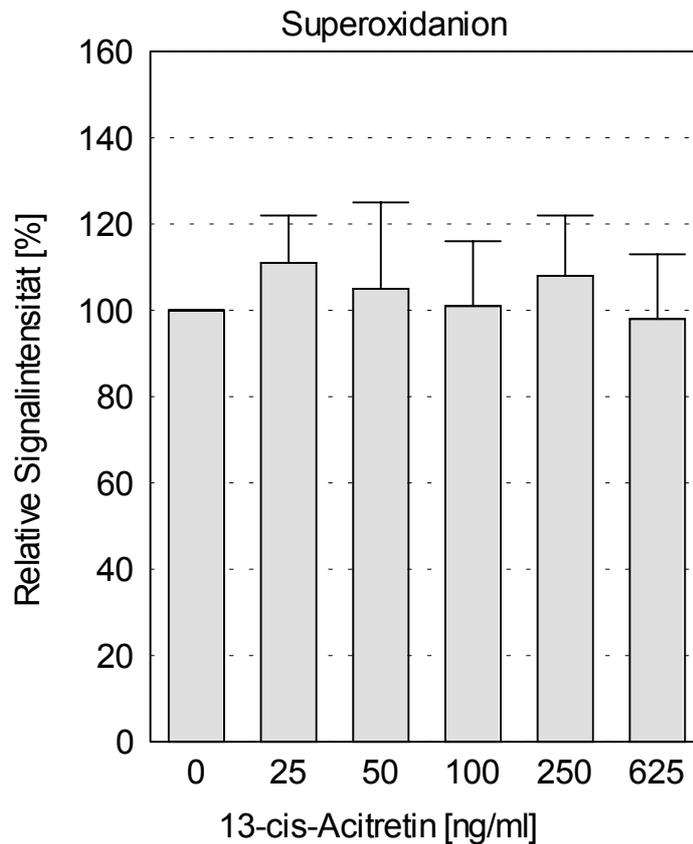


Abb. 25: Einfluß von 13-*cis*-Acitrein auf die Bildung des DMPO-Superoxidanion-Adduktes. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten 20 Minuten nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten ( $5 \times 10^6$  Zellen) von 8 Probanden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) im Vergleich zur mittleren relativen EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen. Die Zellsuspension wurde in Dulbeccos PBS, pH 7,3 unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA und 100 mM DMPO vorbereitet.

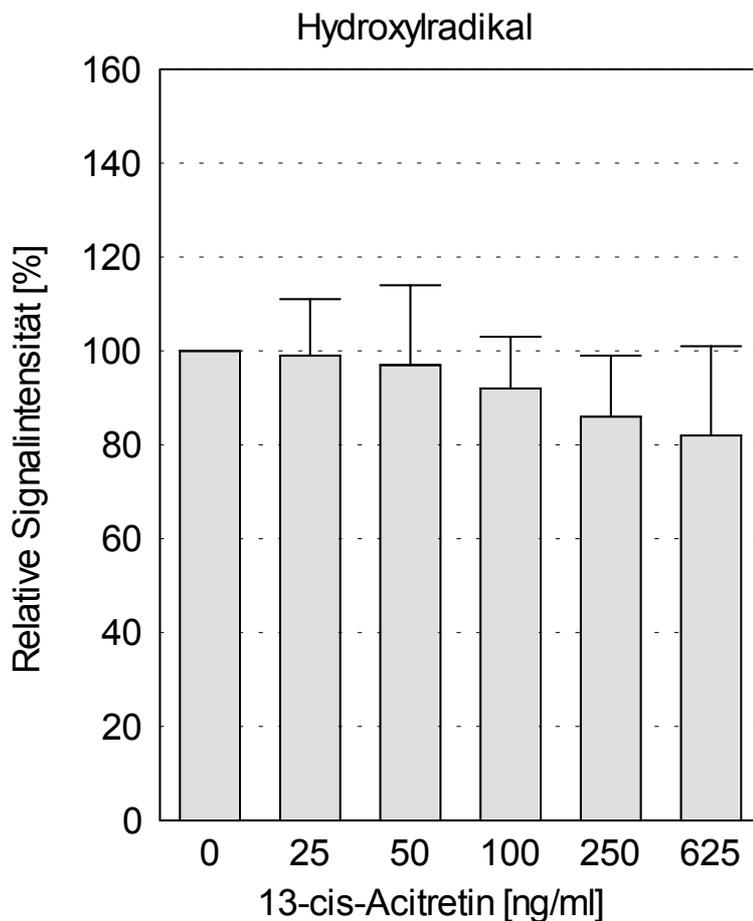


Abb. 26: Einfluß von 13-*cis*-Acitrein auf die Bildung des 4-POBN-Hydroxylradikal-Adduktes. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten 20 Minuten nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten ( $1 \times 10^7$  Zellen) von 8 Probanden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) im Vergleich zur mittleren relativen EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen. Die Zellsuspension wurde in Dulbeccos PBS, pH 7,3 unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA, 170 mM absolutem Ethanol und 10 mM 4-POBN vorbereitet.

Ähnlich wie Acitrein zeigt 13-*cis*-Acitrein bei Konzentrationen ab 250 ng/ml die Tendenz zur Verminderung der Bildung von Hydroxylradikal, während es auf die Produktion von Superoxidanion bei den gemessenen Konzentrationen keinen Einfluß zu haben scheint (Abb. 25, 26).

#### **3.2.4. Einfluß von Acitrein auf die Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion**

Der Einfluß von Acitrein auf die Bildung von Superoxid und Hydroxylradikal wurde außerdem *in vitro* mit Hilfe der Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion untersucht. Acitrein

wurde dem Reaktionsgemisch in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und die Bildung der Radikaladdukte gemessen, wie in Abschnitt 2.2.6 der Methoden beschrieben. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Einfluß von Acitretin auf die Bildung von Superoxid (DMPO-OOH) und Hydroxylradikal (4-POBN-OH) über die Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion. Mittelwerte und Standardabweichungen der EPR-Signalamplituden für je 5 Messungen jeweils im Vergleich zur mittleren EPR-Signalamplitude der Kontrollmessungen. Ansatz für Superoxid: 0,25 mM Xanthin, 23 mU/ml Xanthinoxidase, 0,1 mM DTPA und 10 mM DMPO. Ansatz für Hydroxylradikal: 170 mM absolutes Ethanol, 0,1 mM DTPA, 0,25 mM Xanthin und 23 mU/ml Xanthinoxidase, in Anwesenheit von 0,33 mM 4-POBN unter Zugabe von 0,1 mM Fe<sup>2+</sup>. \* p<0.05, Angaben in Prozent der Kontrolle

Acitretin (ng/ml)	0	62,5	125	250	500	1000
Superoxidanion	100	71 ± 8 *	73 ± 14 *	78 ± 6 *	80 ± 8 *	79 ± 13 *
Hydroxylradikal	100	82 ± 16 *	78 ± 14 *	84 ± 13 *	83 ± 16 *	80 ± 5 *

Es wurde eine signifikante (p<0.05) hemmende Wirkung auf die Bildung beider Radikale gefunden (Verminderung um ca. 20 %), die bei allen gemessenen Konzentrationen signifikant war, wobei eine Konzentrationsabhängigkeit kaum zu bemerken war.

### **3.2.5. Einfluß von Superoxiddismutase, Katalase, Natriumazid, Fe<sup>2+</sup> und Fe<sup>3+</sup> auf die freien Sauerstoffradikale in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten**

Um den Einfluß der untersuchten Retinoide auf die Bildung freier Sauerstoffradikale genauer zu bestimmen, wurden zunächst Kontrollmessungen am Blut gesunder Probanden mit verschiedenen Substanzen durchgeführt, die bekanntermaßen die Mechanismen der Radikalbildung während der Phagozytose beeinflussen. Die Bildung von Superoxid (DMPO-OOH) und Hydroxylradikal (4-POBN-OH) in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten wurde unter Zusatz von Superoxiddismutase (50 U/ml), Katalase (200 U/µl), Natriumazid (1 mM), Fe<sup>2+</sup>-Chlorid (0,1 mM) und Fe<sup>3+</sup>-Chlorid (0,1 mM) gemessen. Die Messungen wurden an Granulozytensuspensionen von 6 Kontrollprobanden durchgeführt. Diese Messungen wurden als Kontrollmessungen für die im nächsten Abschnitt vorgestellten Untersuchungen in Granulozytensuspensionen von 6 Patienten mit *Psoriasis vulgaris* (Plaque-Typ) durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen sind in den Abbildungen 27 und 28 dargestellt.

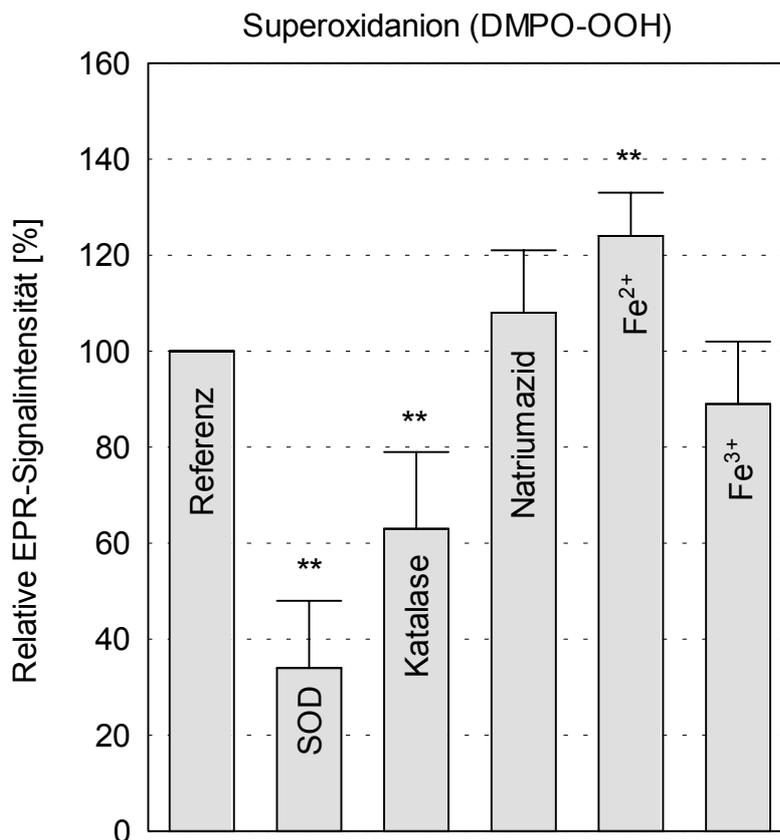


Abb. 27: Vergleich des Einflusses von Superoxiddismutase (50 U/ml), Katalase (200 U/ $\mu$ l), Natriumazid (1 mM), Fe<sup>2+</sup> (0.1 mM) und Fe<sup>3+</sup> (0.1 mM) auf die Bildung von Superoxidanion in Zymosan-stimulierten Granulozyten von 6 Probanden. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten im Vergleich zur mittleren relativen EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen. Die Granulozyten ( $5 \times 10^6$  Zellen) wurden unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA und 100 mM DMPO mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) stimuliert, die Messungen wurden jeweils 20 Minuten nach der Stimulation durchgeführt. \*\*  $p < 0.01$ .

Im Vergleich zu den Messungen ohne Zugabe zusätzlicher Substanzen wurde die Produktion von Superoxidanion bei Zugabe von Superoxiddismutase sowie von Katalase signifikant ( $p < 0.01$ ) vermindert (um 66 bzw. 37 %). Die Zugabe von Natriumazid und Fe<sup>2+</sup>-Ionen führt zu einer signifikanten Erhöhung ( $p < 0.01$ ) des EPR-Signals für die Superoxianionbildung um 8 bzw. 24 %. Die Zugabe von Fe<sup>3+</sup>-Chlorid führte zu einer leichten Verminderung (11 %) der Superoxidproduktion (Abb. 27).

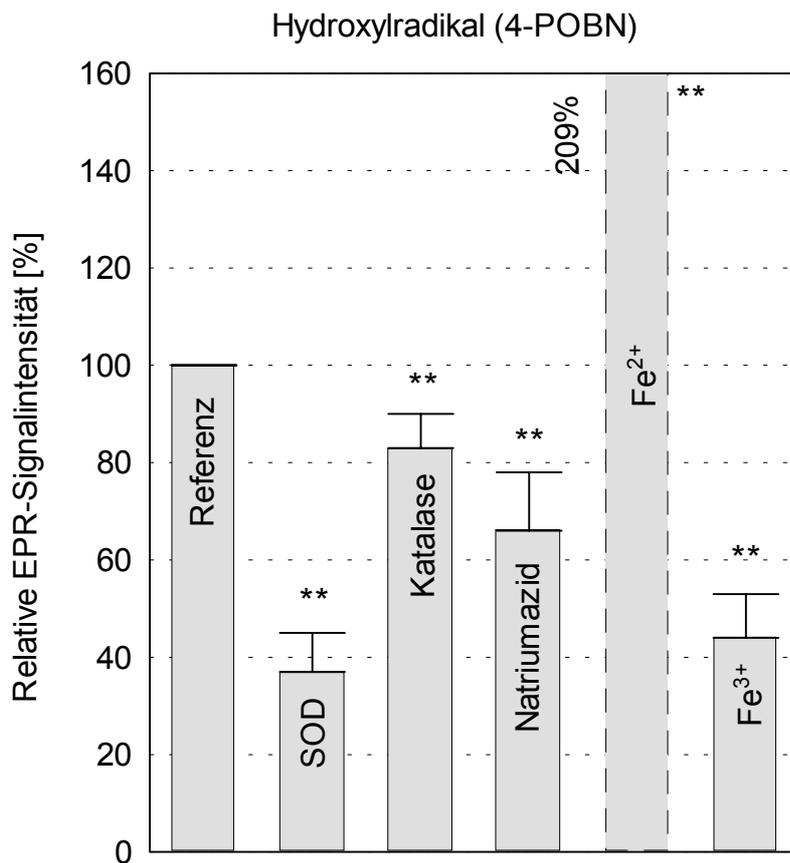


Abb. 28: Vergleich des Einflusses von Superoxiddismutase (50 U/ml), Katalase (200 U/ $\mu$ l), Natriumazid (1 mM), Fe<sup>2+</sup> (0.1 mM) und Fe<sup>3+</sup> (0.1 mM) auf die Bildung von Hydroxylradikal in Zymosan-stimulierten Granulozyten von 6 Probanden. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten im Vergleich zur mittleren relativen EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen. Die Granulozytensuspensionen ( $1 \times 10^7$  Zellen) wurden unter Zusatz von 170 mM absolutem Ethanol, 0,1 mM DTPA und 10 mM 4-POBN mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) stimuliert, die Messungen wurden jeweils 20 Minuten nach der Stimulation durchgeführt.

\*\*  $p < 0.01$

Eine signifikante ( $p < 0.01$ ) Verminderung der EPR-Signalamplitude für das Hydroxylradikal-Addukt wurde bei Zugabe von Superoxiddismutase (um 63 %), Katalase (um 17 %), Natriumazid (um 34 %) und von Fe<sup>3+</sup>-Ionen (um 56 %) gefunden. Die stärkste Veränderung des EPR-Signals wurde durch den Zusatz von Fe<sup>2+</sup>-Chlorid hervorgerufen (Erhöhung um 109 %).

### **3.2.6. Einfluß von Superoxiddismutase, Katalase, Natriumazid, $Fe^{2+}$ und $Fe^{3+}$ auf die freien Sauerstoffradikale in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten von Patienten mit *Psoriasis vulgaris***

Neotigason ist ein Präparat mit dem Wirkstoff Acitretin, das zur Psoriasis-Therapie eingesetzt wird. In dieser Untersuchung sollte geklärt werden, inwieweit der Einsatz von Acitretin bzw. der Acitretin/PUVA-Kombinationstherapie die im vorigen Abschnitt gezeigten Wirkungen verschiedener Substanzen auf die Freisetzung von Sauerstoffradikalen moduliert. Die Untersuchung wurde an 6 Patienten mit *Psoriasis vulgaris* (Plaque-Typ) durchgeführt.

Um die Wirkungen der Therapie von den eventuellen Wirkungen der Erkrankung selbst unterscheiden zu können, wurden alle Messungen zunächst vor Beginn der Therapie vorgenommen. Alle Meßansätze entsprachen den Kontrollmessungen an gesunden Probanden, die im letzten Abschnitt dargestellt wurden.

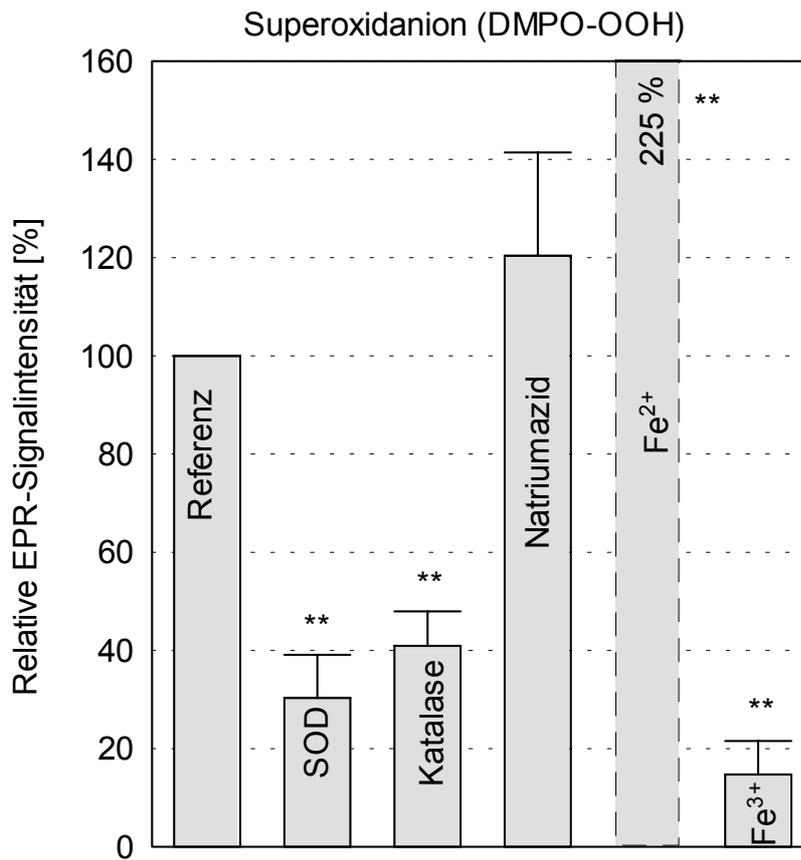


Abb. 29: Vergleich des Einflusses von Superoxiddismutase (50 U/ml), Katalase (200 U/ $\mu$ l), Natriumazid (1 mM), Fe<sup>2+</sup>-Chlorid (0.1 mM) und Fe<sup>3+</sup>-Chlorid (0.1 mM) auf die Bildung von Superoxidanion in Zymosan-stimulierten Granulozytensuspensionen von 6 Patienten mit *Psoriasis vulgaris* (Plaque-Typ) vor Therapiebeginn. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalamplituden im Vergleich zur mittleren EPR-Signalamplitude der Kontrollmessungen. Die Granulozytensuspensionen ( $5 \times 10^6$  Zellen) wurden unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA und 100 mM DMPO wurden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) stimuliert, die Messungen wurden jeweils 20 Minuten nach der Stimulation durchgeführt. \*\*  $p < 0.01$

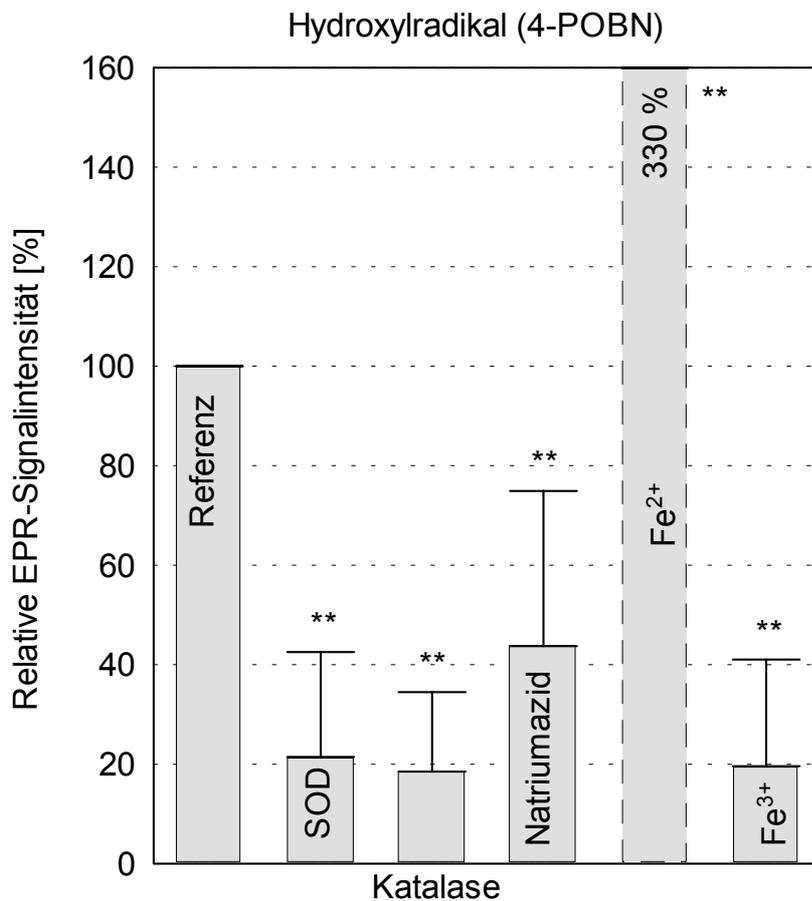


Abb. 30: Vergleich des Einflusses von Superoxiddismutase (50 U/ml), Katalase (200 U/ $\mu$ l), Natriumazid (1 mM), Fe<sup>2+</sup> (0.1 mM) und Fe<sup>3+</sup> (0.1 mM) auf die Bildung von Hydroxylradikal in Zymosan-stimulierten Granulozyten von 6 Patienten mit *Psoriasis vulgaris* (Plaque-Typ) vor Therapiebeginn. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalamplituden im Vergleich zur mittleren EPR-Signalamplitude der Kontrollmessungen. Die Granulozytensuspensionen ( $1 \times 10^7$  Zellen) wurden unter Zusatz von 170 mM absolutem Ethanol, 0,1 mM DTPA und 10 mM 4-POBN wurden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) stimuliert, die Messungen wurden jeweils 20 Minuten nach der Stimulation durchgeführt. \*\* p<0.01

Wie aus den Ergebnissen zu erkennen ist, unterscheiden sich die gemessenen Werte für die Psoriasispatienten (Abb. 29, 30) deutlich von den Werten, die für gesunde Probanden (Abb. 27, 28) gemessen wurden.

Im Vergleich zu den Messungen ohne Zugabe zusätzlicher Substanzen wurde die Produktion von Superoxidanion (Abb. 29) bei Zugabe von Superoxiddismutase, Katalase sowie von Fe<sup>3+</sup>-Chlorid signifikant (p<0.01) vermindert (um 70, 59 bzw. 85 %). Die Zugabe von Natriumazid führte zu einer leichten Erhöhung des EPR-Signals (um 20 %), während die Zugabe von Fe<sup>2+</sup>-Chlorid die Bildung von Super-

20 %), während die Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$ -Chlorid die Bildung von Superoxidanion-Addukt mehr als verdoppelt (Erhöhung auf 225 %,  $p < 0.01$ ).

Ähnlich sieht es auch bei der Bildung von Hydroxylradikal aus (Abb. 30). Die Zugabe von Superoxiddismutase, Katalase und Natriumazid führte zu einer signifikanten ( $p < 0.01$ ) Verminderung (um 79, 81 bzw. 56 %) der EPR-Signalamplitude für das Hydroxylradikal-Addukt. Die stärkste Veränderung der EPR-Signals wurde auch hier durch den Zusatz von  $\text{Fe}^{2+}$ -Chlorid (Erhöhung auf 330 %) und von  $\text{Fe}^{3+}$ -Chlorid (Verminderung auf ca. 20 %) hervorgerufen.

### ***3.2.7. Untersuchungen zum Einfluß von Acitretin in vivo und von Acitretin und Acitretin/PUVA-Kombinationstherapie auf die Freisetzung von Sauerstoffradikalen in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten von Patienten mit Psoriasis***

Im Rahmen einer Paralleluntersuchung zur Wirkung von Acitretin und der gut etablierten Acitretin/PUVA-Kombinationstherapie wurden Blutproben von 8 Patienten mit *Psoriasis vulgaris* (Plaque-Typ) entnommen. Die Probenentnahme erfolgte vor Therapiebeginn und über mehrere Wochen immer vor der PUVA-Behandlung unter ähnlichen Bedingungen. Die Messungen wurden mit den Standardansätzen durchgeführt, die auch für die Kontrollproben verwendet wurden. Eine Kontrollmessung über 30 Minuten ohne Stimulation wurde vor Beginn des Experiments gemacht. Die Ergebnisse der Messungen sind in den Abbildungen 31 und 32 dargestellt.

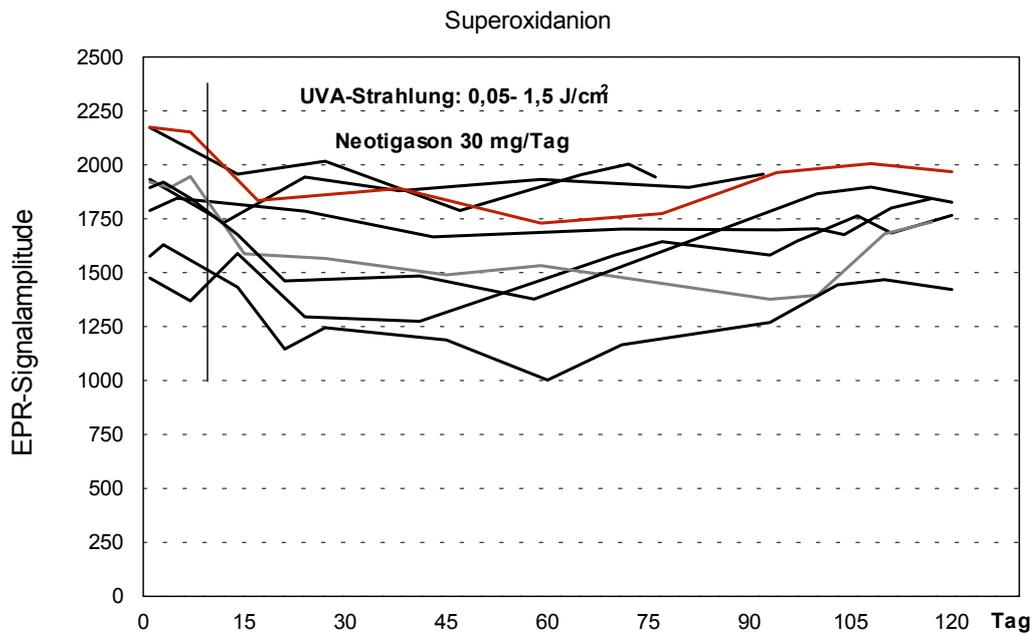


Abb. 31: Einfluß einer Acitretin/PUVA-Kombinationstherapie auf die Bildung von Superoxidanion (DMPO-OOH-Addukt) in Zymosan-stimulierten Granulozytensuspensionen von 8 Patienten mit *Psoriasis vulgaris* (Plaque-Typ) vor und während der Therapie. Die Granulozytensuspensionen ( $5 \times 10^6$  Zellen) mit Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA und 100 mM DMPO wurden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) stimuliert, die Messungen wurden jeweils 20 Minuten nach der Stimulation durchgeführt.

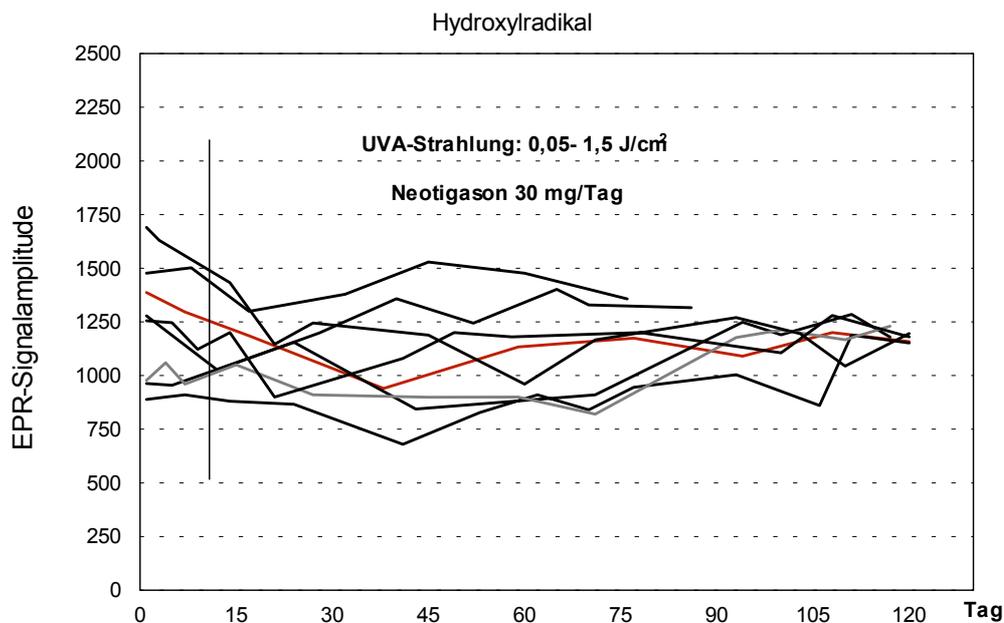


Abb. 32: Einfluß einer Acitretin/PUVA-Kombinationstherapie auf die Bildung von Hydroxylradikal (4-POBN-OH-Addukt) in Zymosan-stimulierten Granulozytensuspensionen von 8 Patienten mit *Psoriasis vulgaris* (Plaque-Typ) vor und während der Therapie. Die Granulozytensuspensionen ( $1 \times 10^7$  Zellen) mit Zusatz von 170 mM absolutem Ethanol, 0,1 mM DTPA und 10 mM 4-POBN wurden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) stimuliert, die Messungen wurden jeweils 20 Minuten nach der Stimulation durchgeführt.

Wie aus den Abbildungen zu sehen ist, konnte in dieser Paralleluntersuchung kein signifikanter Einfluß der Therapie auf die untersuchten Parameter festgestellt werden. Bei den meisten Messungen war aber eine relativ deutliche Tendenz zu einer Verminderung 2 – 3 Wochen nach Therapiebeginn auszumachen, die allerdings nicht signifikant ist.

Die Abbildungen 33 und 34 zeigen ebenfalls den Einfluß einer Acitretin/PUVA-Kombinationstherapie auf die Bildung von Superoxid (DMPO-OOH-Addukt) und Hydroxylradikal (4-POBN-OH) in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten. Die Messungen in stimulierten neutrophilen Granulozyten für jeden Patienten erfolgte 3 – 4 Wochen nach Therapiebeginn vor und nach PUVA-Behandlung. In den Abbildungen werden die Meßwerte unmittelbar vor der PUVA-Behandlung den Werten unmittelbar nach der Behandlung gegenübergestellt.

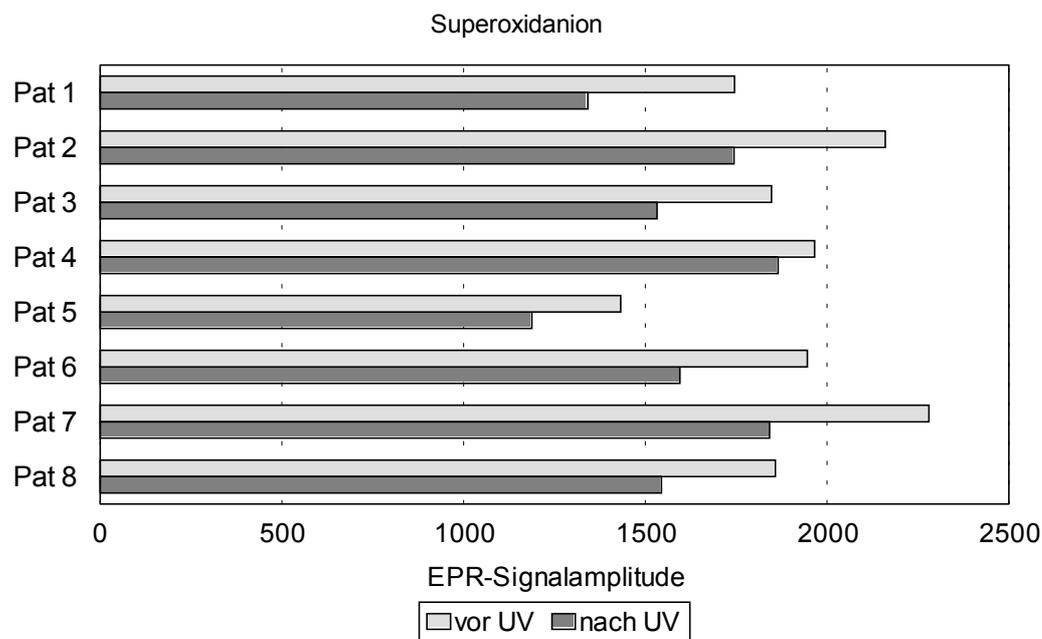


Abb. 33: Messung des DMPO-Superoxidanion-Adduktes unmittelbar vor und nach UVA-Bestrahlung, jeweils 3 gepoolte Messungen innerhalb der dritten und vierten Woche der Acitretin/PUVA-Kombinationstherapie. EPR-Signalamplitude 20 Minuten nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten ( $5 \times 10^6$  Zellen) von 8 Patienten mit *Psoriasis vulgaris* (Plaque-Typ) mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml). Die Zellsuspension wurde in Dulbeccos PBS, pH 7,3 unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA und 100 mM DMPO vorbereitet. Die statistische Analyse der Mittelwerte für die 8 Patienten vor und nach der Therapie zeigte einen signifikanten Unterschied ( $p < 0.05$ ).

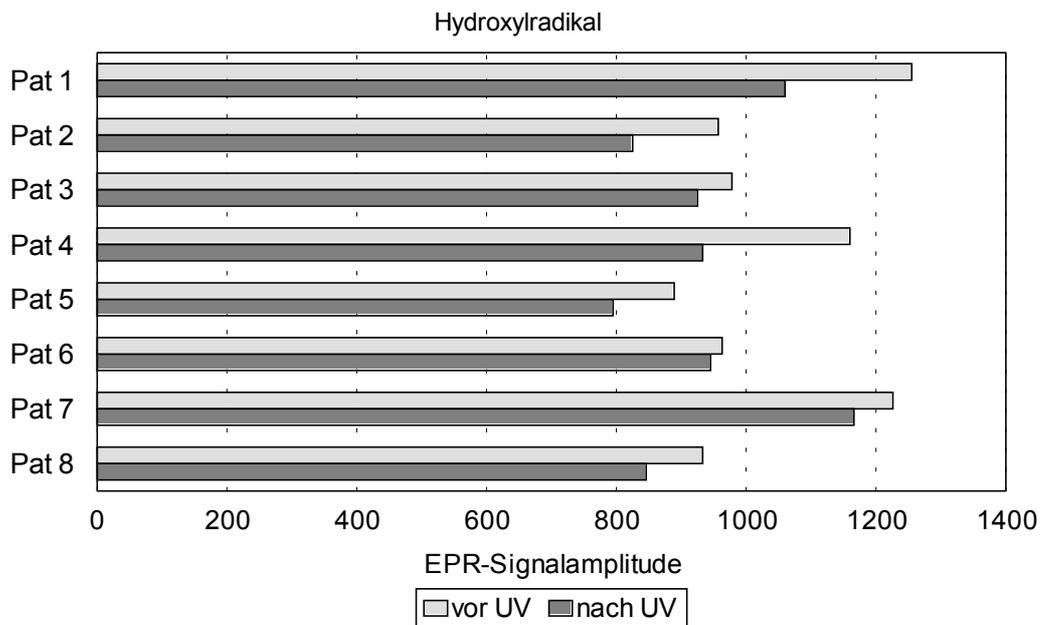


Abb. 34: Messung des 4-POBN-Hydroxylradikal-Adduktes unmittelbar vor und nach UVA-Bestrahlung, jeweils 3 gepoolte Messungen innerhalb der dritten und vierten Woche der Acitretin/PUVA-Kombinationstherapie. EPR-Signalamplitude 20 Minuten nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten ( $5 \times 10^6$  Zellen) von 8 Patienten mit *Psoriasis vulgaris* (Plaque-Typ) mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml). Die Zellsuspension wurde in Dulbeccos PBS, pH 7,3 unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA, 170 mM absolutem Ethanol und 10 mM 4-POBN vorbereitet.

In Abb. 33 ist eine Verminderung der Produktion von Superoxidanion nach der PUVA-Therapie zu erkennen. Die statistische Analyse der Mittelwerte für die 8 Patienten vor und nach der Therapie (z.B. 1745 vs. 1342 bei Patient 1) zeigte einen signifikanten Unterschied ( $p < 0.05$ ). Wie in Abb. 34 zu sehen ist, zeigen die Messungen auch eine deutliche Tendenz zur Verminderung der Hydroxylradikalproduktion unmittelbar nach der PUVA-Behandlung im Vergleich zu den Werten unmittelbar vor der Behandlung (z.B. 1255 vs. 1060 beim gleichen Patienten). Diese Tendenz ist allerdings in der statistischen Auswertung nicht signifikant.

### 3.2.8. *In vitro*-Untersuchungen zum Einfluß von Psoralen-UVA-Phototherapie auf die Freisetzung von Sauerstoffradikalen in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten

Nach der in Abschnitt 2.2.8 beschriebenen Methode wurden die Granulozytensuspensionen in den Standardansätzen für die Messung von Superoxidanion und Hydroxylradikal wie in 2.2.4 vorbereitet. Eine Kontrollmessung über 30 Minuten ohne Stimulation wurde vor Beginn des Experiments durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen sind in den Abbildungen 35 und 36 dargestellt.

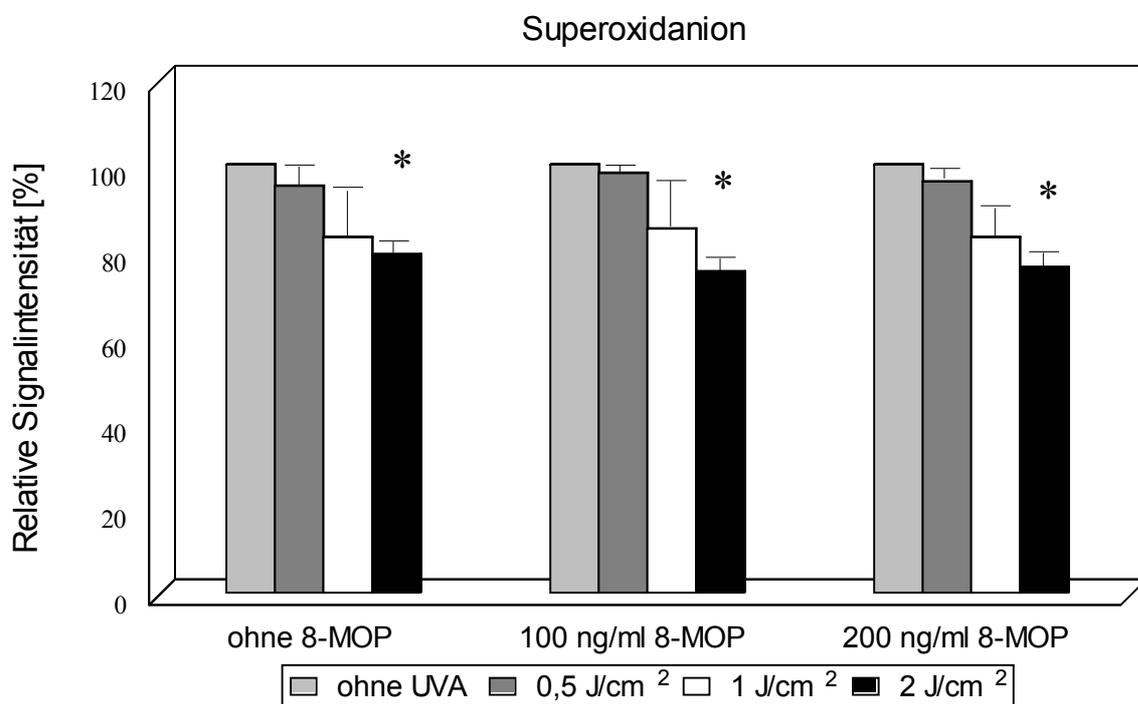


Abb. 35: Einfluß von PUVA *in vitro* auf die Bildung von DMPO-Superoxidanion-Addukt in stimulierten neutrophilen Granulozyten 20 Minuten nach Stimulation mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml).

Mittelwerte der relativen EPR-Signalintensitäten von Superoxidanion im Vergleich zu den Kontrollmessungen für 5 Experimente.

Meßansatz:  $5 \times 10^6$  neutrophile Granulozyten in Suspension, opsoniertes Zymosan (3 mg/ml), 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA und 100 mM DMPO. \*  $p < 0.05$

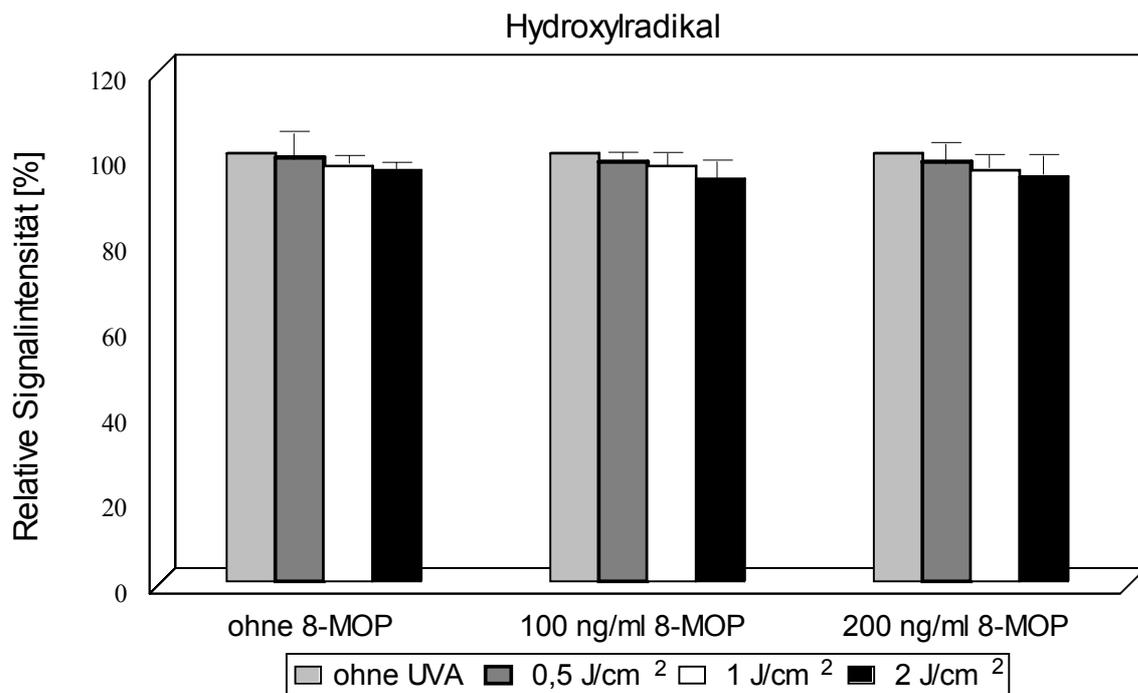


Abb. 36: Einfluß von PUVA *in vitro* auf die Bildung des 4-POBN-Hydroxylradikal-Adduktes in stimulierten neutrophilen Granulozyten 20 Minuten nach Stimulation mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml).

Mittelwerte der relativen EPR-Signalintensitäten von Superoxidanion im Vergleich zu den Kontrollmessungen für 5 Experimente.

Meßansatz:  $1 \times 10^7$  neutrophile Granulozyten in Suspension, opsoniertes Zymosan (3 mg/ml), 170 mM absolutes Ethanol, 0,1 mM DTPA und 0,1 mM 4-POBN.

Wie aus Abb. 35 zu ersehen ist, wird die Bildung von Superoxidanion bei UVA-Bestrahlung dosisabhängig vermindert. Diese Verminderung ist ab Strahlungsdosen von  $2 \text{ J/cm}^2$  signifikant ( $p < 0.05$ ). Die Zugabe von Psoralen unmittelbar nach der Bestrahlung zeigt eine leichte Verstärkung dieses Effekts. Bei der Bildung von Hydroxylradikal ist ebenfalls eine Tendenz zur dosisabhängigen Verminderung bei UVA-Bestrahlung zu erkennen, die aber nicht signifikant ist. Ein Einfluß von Psoralen unmittelbar nach der Bestrahlung ist hier nicht zu erkennen (Abb. 36).

### 3.3. Einfluß von Carotinoiden auf die Bildung freier Sauerstoffradikale

#### 3.3.1. Effekte von $\beta$ -Carotinoid-Isomeren auf die freien Sauerstoffradikale in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten

In den nachfolgenden Abbildungen ist der Einfluß von all-*trans*-, 9-*cis*- und 13-*cis*- $\beta$ -Carotin auf die Bildung von Superoxid und Hydroxylradikal in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten dargestellt, die aus dem Vollblut der Kontrollprobanden gewonnen wurden.

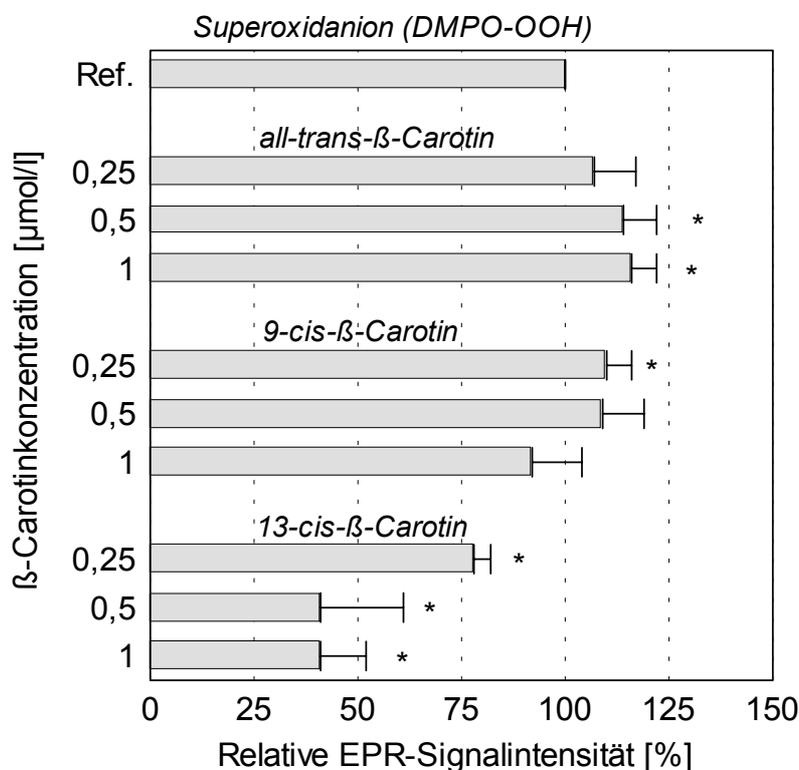


Abb. 37: Einfluß von all-*trans*-, 9-*cis*- und 13-*cis*- $\beta$ -Carotin auf die Bildung des DMPO-Superoxidanion-Adduktes. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten 20 Minuten nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten ( $5 \times 10^6$  Zellen) von 8 Probanden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) im Vergleich zur mittleren relativen EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen (Ref.). Die Zellsuspension wurde in Dulbeccos PBS, pH 7,3 unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA und 100 mM DMPO vorbereitet. \*  $p < 0.05$ .

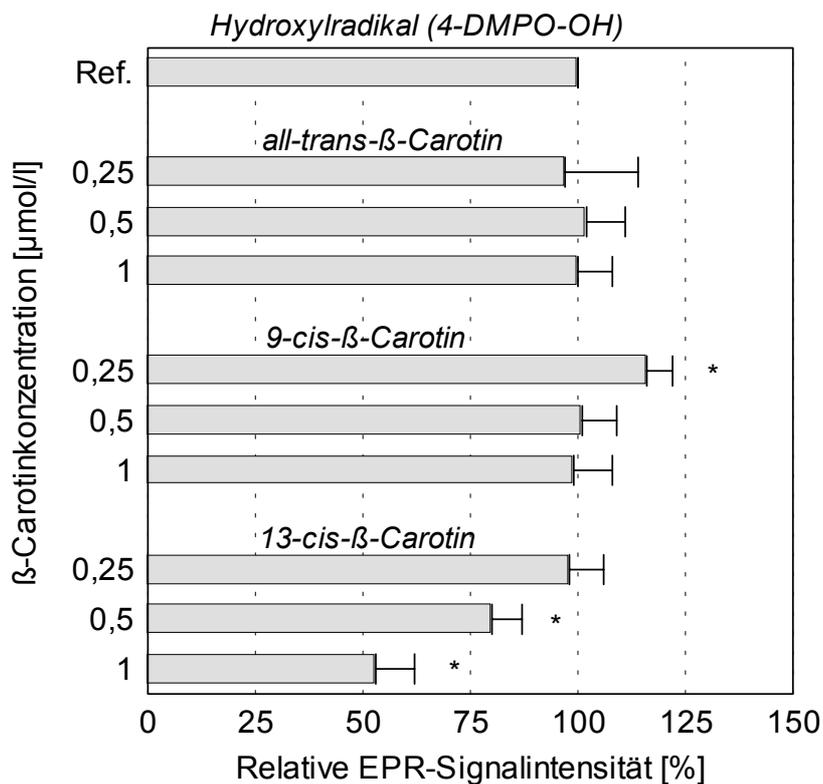


Abb. 38: Einfluß von *all-trans*-, *9-cis*- und *13-cis*-β-Carotin auf die Bildung des 4-POBN-Hydroxylradikal-Adduktes. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten 20 Minuten nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten ( $1 \times 10^7$  Zellen) von 8 Probanden mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml) im Vergleich zur mittleren relativen EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen (Ref.). Die Zellsuspension wurde in Dulbeccos PBS, pH 7,3 unter Zusatz von 140 mM DMSO, 0,1 mM DTPA, 170 mM absolutem Ethanol und 10 mM 4-POBN vorbereitet. \*  $p < 0.05$ .

Aus den Ergebnissen ist zu erkennen, daß *all-trans*-β-Carotin eine signifikante Erhöhung ( $p < 0.05$ ) der Produktion von Superoxidanion bei Konzentrationen von 0,5 – 1 µmol/l bewirkt. Auf die Hydroxylradikalproduktion ist dagegen kein Einfluß sichtbar.

Für *9-cis*-β-Carotin war nur bei kleinen Konzentrationen (0,25 µmol/l) eine signifikante Verstärkung der Produktion von Superoxidanion zu beobachten. Bei höheren Konzentrationen ist dagegen ein Trend zur Verminderung des EPR-Signals zu erkennen. Auch die Hydroxylproduktion wird bei niedrigen Konzentrationen (0,25 µmol/l) signifikant verstärkt, während bei höheren Konzentrationen kein Einfluß sichtbar ist.

*13-cis*-β-Carotin hat einen signifikanten konzentrationsabhängigen hemmenden Einfluß auf die Bildung von Superoxidanion und Hydroxylradikal.

### 3.3.2. Effekte von $\beta$ -Carotinoid-Isomeren auf die Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion

Der Einfluß von all-*trans*-, 13-*cis*- und 9-*cis*- $\beta$ -Carotin auf die Bildung von Superoxid und Hydroxylradikal in der Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Einfluß von  $\beta$ -Carotinoid-Isomeren auf die durch Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion gebildeten Sauerstoffradikale. Dargestellt sind die Mittelwerte der EPR-Signalamplituden von 5 Wiederholungsansätzen in Prozent der Kontrollmessung. Ansatz für Superoxid: 0,25 mM Xanthin, 23 mU/ml Xanthinoxidase, 0,1 mM DTPA und 10 mM DMPO. Ansatz für Hydroxylradikal: 170 mM absolutes Ethanol, 0,1 mM DTPA, 0,25 mM Xanthin und 23 mU/ml Xanthinoxidase, in Anwesenheit von 0,33 mM 4-POBN unter Zugabe von 0,1 mM Fe<sup>2+</sup>. \* p<0.05.

Superoxid (DMPO-OOH)				
$\beta$ -Carotinkonzentration (ng/ml)	0	0,25	0,5	1
all- <i>trans</i> - $\beta$ -carotin	100	87 ± 13 *	89 ± 11 *	87 ± 10 *
13- <i>cis</i> - $\beta$ -carotin	100	97 ± 18	96 ± 19	94 ± 18
9- <i>cis</i> - $\beta$ -carotin	100	101 ± 15	110 ± 17	99 ± 15
Hydroxylradikal (4-POBN)				
$\beta$ -Carotinkonzentration (ng/ml)	0	0,25	0,5	1
all- <i>trans</i> - $\beta$ -carotin	100	98 ± 18	101 ± 21	99 ± 16
13- <i>cis</i> - $\beta$ -carotin	100	97 ± 18	97 ± 17	97 ± 7
9- <i>cis</i> - $\beta$ -carotin	100	102 ± 17	97 ± 17	102 ± 18

Wie aus den Ergebnissen zu erkennen ist, hat nur all-*trans*- $\beta$ -Carotin bei allen untersuchten Konzentrationen eine signifikant hemmende Wirkung auf die Produktion von Superoxidanion, die unabhängig von der Konzentration ist. In allen anderen Messungen wurden keine Wirkungen der Carotinoid-Isomere auf die Radikalproduktion gefunden.

### **3.3.3. In vivo-Untersuchungen zum Einfluß von $\beta$ -Carotin auf die freien Sauerstoffradikale in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten im Rahmen einer Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie**

Wir untersuchten die neutrophilen Granulozyten von 15 Probandinnen mit dem Hauttyp II und III vor und nach einer 8-wöchigen oralen Supplementierung mit Placebo (5 Probanden) oder 30 mg/Tag  $\beta$ -Carotin (10 Probanden). Parallel wurde der all-*trans*- $\beta$ -Carotin-Serumspiegel der Probandinnen durch eine HPLC-Analyse kontrolliert. Die Untersuchungen begleiteten auch die Bestrahlungsphase (am 3., 5. und 7. Tag), die mit einer kontrollierten individuell angepaßten sonnenähnlichen Dosis UVA durchgeführt wurde, sowie eine nachfolgende 4-wöchige Ruhephase. Auch hier wurde der  $\beta$ -Carotin-Serumspiegel gemessen.

In beiden Gruppen sind die Meßwerte während der Bestrahlungsphase großen Schwankungen unterworfen. Eine signifikante Verstärkung der Produktion von Superoxidanion ist in der Placebogruppe nach dem Ende der Bestrahlungsphase (F und G) zu beobachten. In der  $\beta$ -Carotin-supplementierten Gruppe ist dagegen eine Erhöhung der Superoxidanionproduktion während der Bestrahlungsphase und eine Rückkehr zum Ausgangswert nach dem Ende der Bestrahlungsphase zu erkennen.

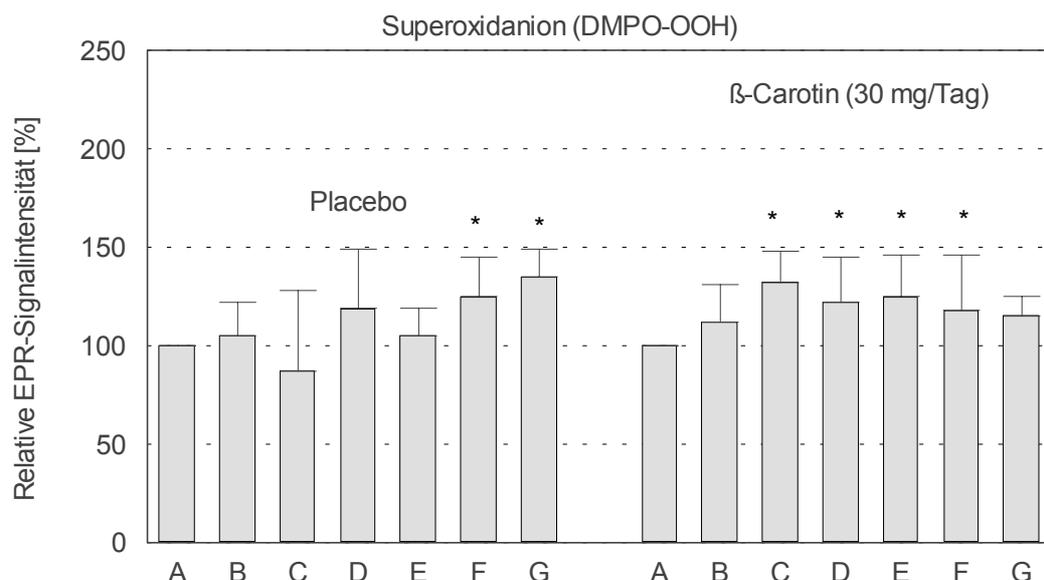


Abb. 39: Einfluß von oraler  $\beta$ -Carotin/Placebo-Supplementierung mit und ohne UVA-Körperbestrahlung auf die Bildung von DMPO-Superoxidanion-Addukten in stimulierten neutrophilen Granulozyten. Relative EPR-Signalintensitäten von Superoxidanion in der Standardmessung 20 Minuten nach Stimulation mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten von 15 Probanden, davon 5 in der Placebogruppe, im Vergleich zur mittleren EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen. Meßansatz:  $5 \times 10^6$  neutrophile Granulozyten in Suspension, opsoniertes Zymosan (3 mg/ml), DMSO (140 mM), DTPA (0,1 mM) und DMPO (100 mM). \*  $p < 0.05$

- A – Kontrollmessung vor oraler Supplementierung
- B – 8 Wochen nach oraler Gabe von  $\beta$ -Carotin (30 mg/ml) oder Placebo
- C, D, E – 3., 5. und 7. Tag der UVA-Bestrahlungsphase
- F – unmittelbar nach dem Ende der Bestrahlungsphase
- G – 4 Wochen nach Ende der Bestrahlungsphase

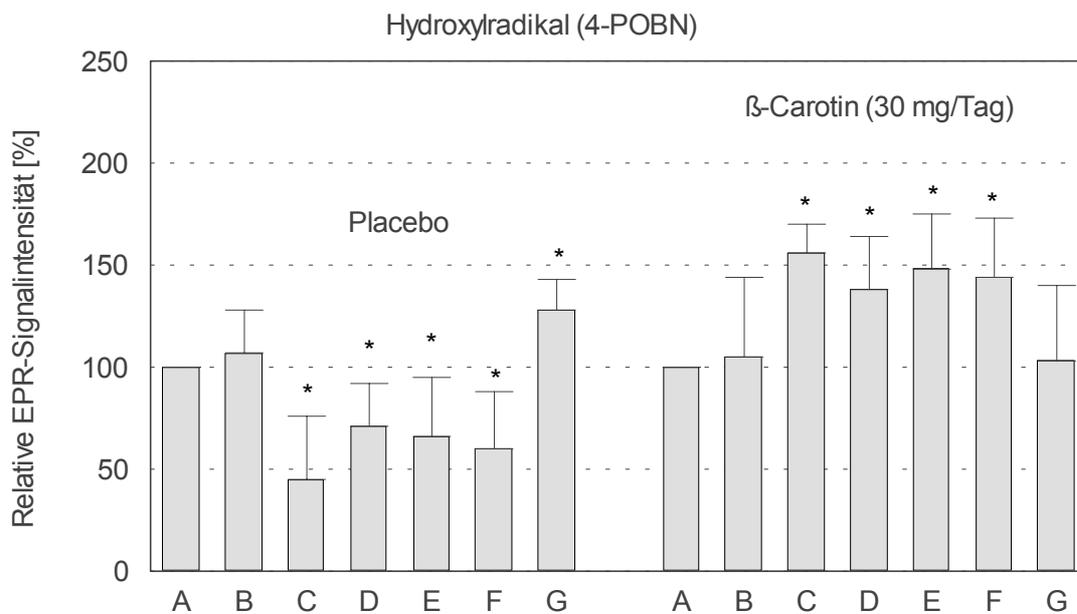


Abb. 40: Einfluß von oraler  $\beta$ -Carotin/Placebo-Supplementierung mit und ohne UVA-Körperbestrahlung auf die Bildung von 4-POBN-Hydroxylradikal-Addukt in stimulierter neutrophiler Granulozytensuspension. Relative EPR-Signalintensitäten von Superoxidanion in der Standardmessung 20 Minuten nach Stimulation mit opsoniertem Zymosan (3 mg/ml). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen EPR-Signalintensitäten von 15 Probanden, davon 5 in der Placebogruppe, im Vergleich zur mittleren relativen EPR-Signalintensität der Kontrollmessungen. Meßansatz:  $1 \times 10^7$  neutrophile Granulozyten in Suspension, opsoniertes Zymosan (3 mg/ml), absolutes Ethanol (170 mM), DTPA (0,1 mM) und 4-POBN (10 mM). \*  $p < 0.05$

- A – Kontrollmessung vor oraler Supplementierung
- B – 8 Wochen nach oraler Gabe von  $\beta$ -Carotin (30 mg/ml) oder Placebo
- C, D, E – 3., 5. und 7. Tag der UVA-Bestrahlungsphase
- F – unmittelbar nach dem Ende der Bestrahlungsphase
- G – 4 Wochen nach Ende der Bestrahlungsphase

In der Placebogruppe ist eine signifikante Minderung der Hydroxylradikalbildung während der Strahlungsphase zu erkennen. Nach der 4-wöchigen Ruhephase ist in dieser Gruppe eine signifikante Erhöhung des Hydroxylradikaladduktes festzustellen. In der  $\beta$ -Carotin-supplementierten Gruppe wurde, ähnlich wie für Superoxidanion, eine signifikante Erhöhung der Hydroxylradikalbildung gefunden. Nach der 4-wöchigen

Ruhephase kehrten die Werte für Hydroxylradikal wieder in den Bereich der Kontrollmessungen zurück.

In Abb. 41 sind die mittleren  $\beta$ -Carotin-Spiegel dargestellt, die im Verlauf der Studie mit und ohne  $\beta$ -Carotin-Supplementierung gemessen wurden.

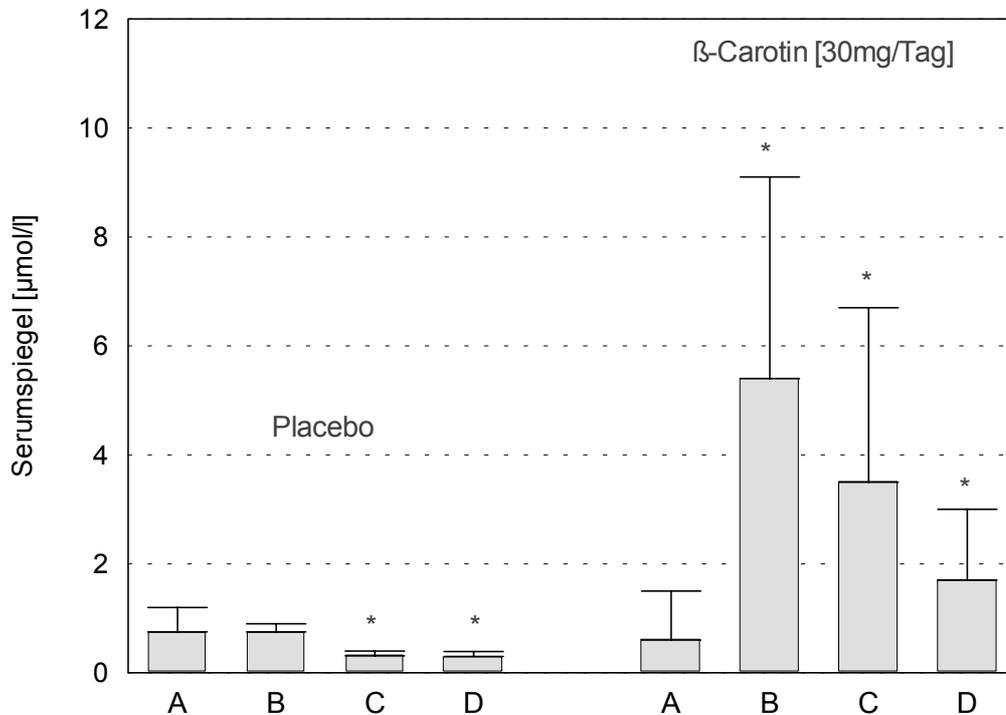


Abb. 41: All-*trans*- $\beta$ -Carotin-Serumspiegel, gemessen mittels HPLC. Mittelwerte und Standardabweichungen von 15 Probanden (davon 5 in der Placebogruppe). \*  $p < 0.05$

A – Kontrollmessung vor oraler Supplementierung

B – 8 Wochen nach oraler Gabe von  $\beta$ -Carotin (30 mg/ml) oder Placebo

C – 5. Tag der UVA-Bestrahlungsphase

D – unmittelbar nach dem Ende der Bestrahlungsphase

In der Placebogruppe wurde ein signifikanter Abfall des all-*trans*- $\beta$ -Carotin-Spiegels ( $p < 0.05$ ) in der Bestrahlungsphase gefunden. In der  $\beta$ -Carotin-supplementierten Gruppe war ein starker Anstieg des all-*trans*- $\beta$ -Carotin-Spiegels nach der Supplementierungsphase erkennbar. In der Bestrahlungsphase zeigte der Serumspiegel einen deutlichen Abfall, lag aber auch am Ende der Bestrahlungsphase noch signifikant über dem Ausgangsniveau.

## 4. Diskussion

### 4.1. Sauerstoffradikale in der Epidermis

Die Untersuchung der Bildung reaktiver Sauerstoffradikale, die in der Pathogenese von Entzündungsprozessen der Haut und bei verschiedenen Dermatosen eine wichtige Rolle spielen, kann einen Beitrag zur Klärung der Mechanismen solcher Prozesse und zur Entwicklung effektiver Therapien leisten.

Sauerstoffradikale können in der Epidermis durch eine ganze Reihe von Prozessen erzeugt werden <sup>[157]</sup>. Das können physikalische Einflüsse wie die Einwirkung ionisierender und nichtionisierender (ultravioletter) Strahlung bei Anwesenheit von Sauerstoff oder die chemische und biochemische Wirkung verschiedener Substanzen sein <sup>[39, 53, 128]</sup>. Dazu zählen beispielsweise photosensibilisierende Stoffe (Psoralene und Porphyrine), verschiedene Enzyme und Komplexe, die in ihren niedrigen Oxidationszuständen Transitionsmetalle enthalten, Hypoxanthin, das als Ausgangsstoff für die Produktion von Harnsäure dient, sowie photochemische Produkte. Auch physiologische Faktoren wie die Infiltration durch neutrophile Granulozyten bei Entzündungsprozessen spielen eine wichtige Rolle <sup>[13, 81, 162]</sup>.

Die aufgezählten Mechanismen können sowohl zur extrazellulären als auch zur intrazellulären Erzeugung von Superoxidanion führen. Die Reaktionen von molekularem Sauerstoff mit photochemischen Mediatoren oder mit Transitionsmetallkomplexen sind unter anderem abhängig von der Sauerstoffkonzentration, der UV-Strahlungsintensität und zellulären Redoxprozessen in der Epidermis. Biochemische Mechanismen, wie die Xanthinoxidasereaktion und die phagozytoseabhängige NADPH-Oxidase-Aktivität sind von der Verfügbarkeit von Hypoxanthin bzw. der Infiltration der Epidermis durch neutrophile Granulozyten abhängig <sup>[157]</sup>. In allen diesen Reaktionen spielt molekularer Sauerstoff die Rolle als Elektronenakzeptor bei der Bildung von Superoxidanion <sup>[108, 165]</sup>. Superoxidanion hat bei der Entstehung von Sauerstoffradikalen eine zentrale Bedeutung, da es als Ausgangspunkt und Reaktionsprodukt für die Bildung weiterer Radikale, insbesondere von Hydroxylradikal, dient.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Mechanismen der Bildung reaktiver Sauerstoffradikale näher untersucht: die Bildung von Superoxidanion durch die Xanthinoxidase-Reaktion sowie die Infiltration neutrophiler Granulozyten bei entzündlichen Dermatosen und die damit einhergehende Phagozytose. Außerdem wurde der

Dermatosen und die damit einhergehende Phagozytose. Außerdem wurde der Einfluß ionisierender Strahlung untersucht, indem die Wirkung von UV-Therapie auf die Freisetzung von Sauerstoffradikalen in Granulozyten getestet wurde.

Die Xanthinoxidase-Reaktion ist ein wichtiger Mechanismus der Erzeugung von Superoxidanion in der Epidermis bei UV-induzierten Verbrennungen sowie bei Ischämie. Dabei dient Hypoxanthin als Substrat, das mit molekularem Sauerstoff unter Vermittlung von Xanthinoxidase zunächst zu Xanthin und danach zu Harnsäure reagiert, wobei Superoxidanion und Wasserstoffperoxid freigesetzt werden. Die Verfügbarkeit von Hypoxanthin spielt deshalb eine entscheidende Rolle für die Radikalbildung in der Epidermis. So wurde z.B. bei Psoriasispatienten eine Erhöhung der Xanthinoxidasekonzentration gefunden, die mit der Hyperplasie der Epidermis korrelierte. Als Mechanismus der Schädigung der Epidermis durch UV-Bestrahlung und Wärme wird unter anderem die Erhöhung der Xanthinoxidase-Aktivität diskutiert <sup>[115]</sup>.

Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale spielt eine wesentliche Rolle für die mikrobizide und inflammatorische Aktivität der neutrophilen Granulozyten. Solche Radikale können bei Bedarf durch biochemische Prozesse im Zellplasma synthetisiert oder aus intrazellulären Granula freigesetzt werden <sup>[44, 105]</sup>. Die Erzeugung von freien Sauerstoffradikalen und die Freisetzung von Enzymen aus zytoplasmatischen Granula sind wichtige Mechanismen, über die Phagozyten schädigende Wirkungen in Entzündungsprozessen und in anderen pathologischen Zuständen wie ischämischen Schädigungen hervorbringen können <sup>[13]</sup>.

Für die Untersuchung der damit verbundenen Prozesse hat sich die Methode der Aktivierung der neutrophilen Granulozyten mit verschiedenen Stimulantien etabliert. Als Stimulantien werden beispielsweise Phorbolmyristatacetat (PMA), N-formylmethionylleucylphenylalanin (fMLP), C5a und opsoniertes Zymosan verwendet <sup>[9, 88]</sup>. In den vorliegenden Untersuchungen wurde für die Anregung der Granulozyten opsoniertes Zymosan verwendet, dessen Anwendung sich als zuverlässig, reproduzierbar und einfach handhabbar erwiesen hat <sup>[182]</sup>.

#### **4.2. Messung der Sauerstoffradikalbildung durch Elektronenspinresonanzspektrometrie**

Um die Reaktionen der Sauerstoffradikalbildung quantitativ untersuchen zu können, werden sehr empfindliche Meßmethoden benötigt. Deshalb wurde für diese Untersu-

chungen die Elektronenspinresonanzspektrometrie (EPR) verwendet, die quantitativ sehr genaue Messungen erlaubt <sup>[150]</sup>.

Erschwert werden die Untersuchungen allerdings durch die Tatsache, daß die zu untersuchenden Reaktionsprodukte eine sehr große Reaktivität und damit eine sehr kurze Halbwertszeit besitzen. In biologischen Systemen ist der schnelle Abbau von Sauerstoffradikalen durch Radikalfänger wie Katalase oder Glutathionperoxidase lebenswichtig, um zellschädigende Wirkungen zu vermeiden. Um überhaupt eine Messung zu ermöglichen, muß dieser Abbau zeitweise verhindert werden, was in den vorliegenden Untersuchungen durch die Bindung der Radikale an Spintrap-Moleküle geschieht <sup>[89]</sup>.

Für die Messung von Superoxidanion wurde 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO) verwendet, das sich mit Superoxidanion zu dem stabilen Addukt 5,5-Dimethyl-2-hydroperoxy-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO-OOH) verbindet. Für die Messung des Hydroxylradikals kam  $\alpha$ -4-Pyridyl-1-oxid-N-tert-butylnitron (4-POBN) zum Einsatz, das mit Hydroxylradikal und Ethanol das stabile Addukt 4-POBN-CH(CH<sub>3</sub>)OH bildet. Beide Spintrap-Moleküle sind in der Literatur gut beschrieben <sup>[26]</sup>. Die wesentlich längeren Halbwertszeiten der damit gebildeten Addukte im Vergleich zu den freien Sauerstoffradikalen ermöglichen ihre Untersuchung mit Hilfe der EPR.

Eine wesentliche Voraussetzung für ihren Einsatz ist außerdem, daß sie in den verwendeten Konzentrationen weder zytotoxisch wirken, noch den intrazellulären Stoffwechsel beeinflussen. Für 4-POBN sind keine solchen Wirkungen bekannt. Aus der Literatur ist aber bekannt, daß das Spintrap-Molekül DMPO in hohen Konzentrationen (> 100 mM) die intrazellulären Reaktionen der neutrophilen Granulozyten beeinflussen kann, indem es z.B. die spontane Dismutation von Superoxidanion zu Wasserstoffperoxid hemmt <sup>[28]</sup>. In unseren Untersuchungen wurden Konzentrationen von DMPO verwendet, bei denen solche Effekte nicht auftreten, so daß wir davon ausgehen können, daß durch das Spintrap-Molekül keine unbeabsichtigten Seiteneffekte ausgelöst werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die Zuverlässigkeit dieser Messungen ist die Tatsache, daß die Bindungen der Sauerstoffradikale an die Spintrap-Moleküle nur vorübergehender Natur sind. Die Sauerstoffradikale gehen nach ihrer Trennung vom Spintrap-Molekül die gleichen Reaktionen ein, wie sie auch ohne deren Vorhandensein stattfinden, d.h., sie beteiligen sich an weiteren intrazellulären Reaktionen und

werden durch Radikalfänger abgebaut. Damit ist gewährleistet, daß durch das Einfangen der Radikale deren Aktivität nicht gemindert wird und keine Verfälschung der zu untersuchenden Zellreaktionen stattfindet. Die Anwesenheit der Spintrap-Moleküle bewirkt lediglich eine zeitliche Verzögerung dieser Reaktionen, was nach der Herstellung des Reaktionsgleichgewichts keinen Einfluß auf die ablaufenden biochemischen Gesamtprozesse haben sollte. Diese zeitliche Verzögerung ist die Voraussetzung für die Erfassung der Sauerstoffradikale mit der verwendeten Methode. Sie ermöglicht einen zuverlässigen und präzisen Nachweis der in den untersuchten Systemen erzeugten reaktiven Sauerstoffmetabolite mit Hilfe der EPR [24, 29].

Der zu untersuchende Einfluß von Retinoiden und Carotinoiden auf die Wirkung von Sauerstoffradikalen ist vielfältig und kann nicht in einem einzelnen Testsystem erfaßt werden. Daher wurde die EPR zur Untersuchung der Bildung der reaktiven Sauerstoffradikale Superoxidanion und Hydroxylradikal in zwei verschiedenen Systemen verwendet. Zum einen wurde die Bildung der Sauerstoffradikale in einem biologischen System – in neutrophilen Granulozyten – untersucht, in denen durch Stimulation mit opsoniertem Zymosan die Phagozytose angeregt wurde. Zum anderen wurde ein rein enzymatisches azelluläres System verwendet. Unter Verwendung der EPR wurden Messungen der in der Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion *in vitro* freigesetzten Radikale durchgeführt, was Rückschlüsse auf Radikalerzeugung in der Epidermis über diesen Reaktionsweg erlaubt.

### **4.3. Wirkung von Retinoiden**

Eines unserer Ziele war die Untersuchung des Einflusses von Retinoiden auf die Bildung von Sauerstoffradikalen, um die Wirkung dieser Substanzen im therapeutischen Einsatz weiter zu klären. Die Effekte von Retinoiden können sehr komplex sein, und die Mechanismen, die diese Effekte bedingen, sind in einem zellulären System vielfältiger Natur.

Als ein solcher Mechanismus werden Wirkungen auf die Zellmembranen durch Retinoide diskutiert. Das kann auf mehrere Arten geschehen: durch Veränderung der Permeabilität, wodurch der Ionenaustausch gestört wird, durch Einbettung in die Phospholipide der Membran und durch Veränderung der intrazellulären Mikroviskosität [58, 157, 189]. Ein weiterer Mechanismus der Wirkung der Retinoide könnte ihre direkte antioxidative Kapazität in einer Umgebung mit erhöhter Sauerstoffradikalbildung sein [19, 84].

Die Vielfalt der genannten Mechanismen kann in einem einzelnen Testverfahren nicht vollständig erfaßt werden. Daher wurde die EPR-Spintrap-Technik in zwei Testsystemen verwendet.

Der Einfluß von Retinoiden auf die Radikalbildung in stimulierten neutrophilen Granulozyten kann durch Wirkungen auf die Zellmembranen, durch die Aktivität der NADPH-Oxidase sowie durch intrazelluläre Einflüsse verursacht werden. Auch eine antioxidative Aktivität der Retinoide kann die Freisetzung der Radikale beeinflussen [60, 159].

Die Freisetzung von Radikalen im Xanthin/Xanthinoxidase-System wird dagegen eher von den antioxidativen Wirkungen der Retinoide beeinflusst. Nicht auszuschließen ist aber auch eine Hemmung der Oxidationsreaktion von Hypoxanthin zu Harnsäure, bei der Wasserstoffperoxid und Superoxid freigesetzt werden und damit auch direkt die Superoxidanionbildung beeinflusst wird. Außerdem ist ein direkter Einfluß der Retinoide auf die eisenabhängige Fenton-Reaktion, die zur Bildung von Hydroxylradikal aus Wasserstoffperoxid und Superoxidradikal führt, vorstellbar [32, 107, 108].

Unsere Ergebnisse zeigen, daß bei Zugabe von Retinoiden in das von uns untersuchte zelluläre System Einflüsse auf die phagozytoseabhängige Freisetzung von Radikalen zu beobachten sind, die von der Art und der Konzentration der Isomere abhängig sind. Es zeigte sich, daß die getesteten Retinoide der ersten Generation einen recht unterschiedlichen Einfluß auf die Radikalbildung hatten (Abb. 15 – 20). Die Zugabe von *all-trans*- und *9-cis*-Retinsäure hatte bei niedrigen Konzentrationen (150 ng/ml) einen verstärkenden Effekt auf die Produktion von Superoxidanion (ca. 10 – 15 %), der bei höheren Konzentrationen wieder abklang. Ein Einfluß dieser beiden Retinoide auf die Hydroxylradikalbildung war nicht zu erkennen. Die Zugabe von *13-cis*-Retinsäure (Isotretinoin) wirkte dagegen signifikant hemmend auf die Bildung von Superoxidanion. Diese Hemmung war bereits bei niedrigen Konzentrationen zu beobachten (ca. 18 % bei 50 ng/ml), wuchs konzentrationsabhängig bis etwas über 50 % bei 250 ng/ml und blieb dann konstant. Auf die Hydroxylradikalproduktion wirkte *13-cis*-Retinsäure (Isotretinoin) bis zu einer Konzentration von 150 ng/ml leicht verstärkend, während bei höheren Konzentrationen eine leichte Hemmung zu erkennen war.

Die Tatsache, daß die Wirkung von Retinoiden spezifisch und dosisabhängig ist, kann im therapeutischen Einsatz von Bedeutung sein. In neutrophilen Granulozyten

zeigen die getesteten Retinoide eine antioxidative Wirkung auf freigesetzte Radikale in der Umgebung, wodurch weiterer Schaden durch die erhöhte Radikalbildung bei Entzündung verhindert werden kann. Bei höheren Konzentrationen der Retinoide wird die Freisetzung der Phagozytose-abhängigen Sauerstoffradikale nicht mehr beeinflusst oder, wie im Fall der 13-*cis*-Retinsäure (Isotretinoin), signifikant gehemmt, wobei die antioxidative Wirkung auf die Umgebung erhalten bleibt. Die signifikant antioxidative Wirkung von 13-*cis*-Retinsäure und Acitretin stimmt auch gut mit der Tatsache überein, daß sich beide Substanzen erfolgreich mit einer UVA-Lichttherapie kombinieren lassen.

Auch die Retinoide der zweiten Generation zeigten keinen einheitlichen Einfluß auf die Radikalbildung (Abb. 21 – 26). Acitretin förderte die Bildung von Superoxidanion bei niedrigen Konzentrationen (bei 25 – 50 ng/ml, Erhöhung um ca. 20 %), bei höheren Konzentrationen verschwand diese Wirkung aber wieder. Auf die Hydroxylradikalbildung wirkte Acitretin ähnlich wie 13-*cis*-Retinsäure – leicht verstärkend (um ca. 10 %) bei niedrigen Konzentrationen und leicht hemmend (um ca. 20 %) bei höheren Konzentrationen. Diese Ergebnisse korrelieren mit der therapeutischen Anwendung von Acitretin bei Psoriasis. Bei den klinischen Verlaufsformen der pustulösen Psoriasis, bei denen eine verstärkte Infiltration von neutrophilen Granulozyten typisch ist, werden hohe Dosen (1 mg/kg Körpergewicht) von Acitretin, Etretinat bzw. 13-*cis*-Retinsäure eingesetzt. Mit diesem hochdosierten Einsatz wird die Migration der neutrophilen Granulozyten und ihre sekundäre Schädigung durch freie Radikale gehemmt.

Bei dem untersuchten Retinoid der zweiten Generation, dem Prodrug Etretinat, wurde kein erkennbarer Einfluß auf die Bildung von Superoxidanion und Hydroxylradikal gefunden. Andererseits zeigte sein Metabolit 13-*cis*-Acitretin bei höheren Konzentrationen eine leichte Hemmung der Erzeugung von Hydroxylradikal. Diese auf den ersten Blick recht widersprüchlichen Ergebnisse stimmen aber mit verschiedenen in der Literatur beschriebenen Resultaten überein. So wurde gezeigt, daß unter bestimmten experimentellen Bedingungen Retinoide bei niedrigen Konzentrationen die Produktion von Superoxidanion in neutrophilen Granulozyten verstärken können <sup>[60, 64]</sup>, was mit der von uns gefundenen Verstärkung der Superoxidanionbildung bei niedrigen Konzentrationen von all-*trans*-Retinsäure (bei 150 – 250 ng/ml), 9-*cis*-Retinsäure (bei 150 ng/ml) und Acitretin (bei 25 – 50 ng/ml) korreliert.

Ähnliche konzentrationsabhängige und isomerspezifische Effekte der Retinoide wurden in Arbeiten von Gonzalez-Cabello *et al.* zum Einfluß von Retinoiden auf Lymphozyten *in vitro* beschrieben. Die Autoren fanden, daß sowohl Retinsäure als auch Retinal bei höheren Konzentrationen die durch Concanavalin A und Interleukin-2 induzierte Blastogenese in humanen Lymphozyten *in vitro* hemmten. Bei mittleren Konzentrationen verschwand dieser Effekt. Bei niedrigeren Konzentrationen kehrte sich die Wirkung der Retinoide um – sie zeigten einen signifikanten stimulierenden Einfluß. Erklärt werden können diese Effekte durch die Wirkung der Retinoide auf die Proteinkinase C, ein Schlüsselenzym in der Blastogenese der Lymphozyten [54, 64, 102, 163, 178].

Chemilumineszenzuntersuchungen von Fumarulo *et al.* bestätigen, daß Retinoide bei nichttoxischen Konzentrationen einen inhibierenden Einfluß auf den oxidativen Stoffwechsel der Leukozyten bei Stimulation mit verschiedenen Substanzen (PMA, fMLP, A23187, Zymosan) ausüben können [60]. Dieser hemmende Einfluß der Retinoide scheint irreversibel zu sein; er bleibt auch erhalten, wenn die Substanzen noch vor der Stimulation aus den Zellen ausgewaschen werden. Als mögliche Erklärungen für diese Wirkung wurden neben einer Inhibierung der Proteinkinase C auch Änderungen in der Membranviskosität in Betracht gezogen [64, 157, 189].

Mit der Hemmung der oxidativen Prozesse ist auch eine Hemmung der Migration der Leukozyten verbunden [13]. Diese Wirkungen könnten einen wichtigen Mechanismus darstellen, über den Retinoide sowohl antiinflammatorische Aktionen als auch protektive Effekte gegen Entzündungsprozesse hervorbringen. Diese Hypothese wird durch den Fakt erhärtet, daß die in unseren Untersuchungen beobachteten hemmenden Effekte der 13-*cis*-Retinsäure bei Konzentrationen beobachtet werden, die *in vivo* bei therapeutisch relevanten Dosierungen auftreten (ab 150 ng/ml, siehe Abb. 17).

Außer den genannten sind eine Reihe weiterer Mechanismen für die Wirkung der Retinoide vorstellbar. So haben Retinoide die Fähigkeit, die Enzymsekretion aus zytoplasmatischen Granula in neutrophilen Granulozyten zu hemmen [15]. Damit beeinflussen die Retinoide *in vivo* eine Funktion der Phagozytose, die über das Zytoskelett vermittelt wird. Auch das Plasmamembranpotential wird von Retinoiden beeinflusst. Retinoide wie Retinsäure, Retinol und Retinal wirken dosisabhängig hyperpolarisierend auf die Zellmembran [64, 189]. Unsere Ergebnisse sprechen auch dafür, daß die untersuchten Retinoide durch den Einfluß auf die Zellmembran die NADPH-Oxidase-Aktivität verändern und damit die Superoxidanionbildung beeinträchtigen können.

Retinoide beeinflussen den Stoffwechsel der Prostaglandine, die wiederum eine hemmende Wirkung auf die Superoxidanionproduktion und die Degranulation der neutrophilen Granulozyten haben, welche unter anderem durch Lipoxygenase-Produkte vermittelt wird [60, 84].

Ein weiterer Wirkmechanismus ist der Einfluß der Retinoide auf Leukotriene. Leukotriene sind Substanzen, die eine wichtige Rolle als Mediator bei Entzündungsprozessen spielen. Retinoide können die Wirkung der Leukotriene oder auch deren Produktion hemmen und dadurch eine antiinflammatorische Wirkung hervorrufen. Die letztere Wirkung ist für das in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen produzierte Leukotrien-B<sub>4</sub> [193] sowie für Leukotrien-C<sub>4</sub> bekannt, das aus Eosinophilen stammt [104]. Der Einfluß der Retinoide auf Leukotriene kann auch zur Hemmung der Leukotrien-B<sub>4</sub>-induzierten Migration neutrophiler Granulozyten führen. *In vivo* kann die systemische Anwendung von 13-*cis*-Retinsäure, Etretinat und seinem Metaboliten Acitretin die Migration der neutrophilen Granulozyten inhibieren. Ein besonders deutlicher Effekt auf die Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten in der Epidermis wurde beim Einsatz von 13-*cis*-Retinsäure gefunden [8, 13, 135]. Die Hemmung der LTB<sub>4</sub>-Produktion in humanen PMNs durch Retinoide kann außerdem eine antiinflammatorische Wirkung durch den Einfluß auf Prostaglandin PGE<sub>2</sub> hervorrufen, was in der therapeutischen Effizienz bei Psoriasis eine wichtige Rolle spielt, da in psoriatischer Haut hohe Konzentrationen von Arachidonsäure gemessen werden [115].

Der Einfluß von Retinoiden *in vivo* schließt immunologische Aspekte ein, so daß für die Interpretation der Messungen von einzelnen Patienten unter Retinoid-PUVA-Therapie diese Mechanismen zu berücksichtigen sind. Die Ergebnisse der *in-vitro*-Untersuchungen können somit nicht direkt auf die Situation *in vivo* übertragen werden.

In dem von uns untersuchten Xanthin/Xanthinoxidase-System zeigte sich eine antioxidative Wirkung auf die freigesetzten Radikale in allen Messungen. Die Retinoide der ersten Generation, 13-*cis*- und 9-*cis*-Retinsäure, hemmten die Bildung von Superoxidanion konzentrationsabhängig bis zu 24 bzw. 35 % bei der höchsten gemessenen Konzentration von 1000 ng/ml. Der Einfluß dieser Retinoide auf die Hydroxylradikalbildung war ebenfalls hemmend. Dabei zeigte 13-*cis*-Retinsäure eine andere Abhängigkeit von der Konzentration – die größte Hemmung (55 %) wurde bei der niedrigsten zugegebenen Dosis (62,5 ng/ml) gemessen, bei höheren Konzentrationen nahm die Hemmung wieder leicht ab. Die Zugabe von 9-*cis*-Retinsäure bewirkte

nur eine leichte Hemmung (bis 11 %) bei hohen Konzentrationen (Tab. 1). Acitretin als Retinoid der zweiten Generation wirkte ebenfalls hemmend auf die Radikalproduktion. Die Superoxidproduktion wurde dabei bei niedriger Konzentration etwas stärker gehemmt (19 % bei 62,5 ng/ml) als bei höheren Konzentrationen (ca 20 % bei 500 und 1000 ng/ml). Die Hydroxylradikalproduktion wurde bei der Zugabe von Acitretin bei allen gemessenen Konzentrationen um ca. 20 % vermindert (Tab. 2).

Die gemessene antioxidative Aktivität von Retinoiden im Xanthin/Xanthinoxidase-System kann Aufklärung über das intrazelluläre Geschehen in aktivierten neutrophilen Granulozyten geben. Da die Menge der freigesetzten Radikale im Xanthin/Xanthinoxidase-System an das Niveau in aktivierten neutrophilen Granulozyten angeglichen wurde, ist anzunehmen, daß diese antioxidative Aktivität sowohl intrazellulär als auch extrazellulär vorhanden ist. Die Untersuchungen in Granulozyten zeigen, daß die Wirkung von Retinoiden in einem zellulären System nicht auf diese antioxidative Aktivität beschränkt ist. So finden wir bei einigen Isomeren mit antioxidativer Wirkung (9-*cis*- und *all-trans*-Retinsäure) einen stimulativen Effekt auf die Freisetzung von Radikalen in stimulierten neutrophilen Granulozyten.

Die antioxidative Wirkung verschiedener Retinoide, wie 13-*cis*- und *all-trans*-Retinsäure, wurde mit den Untersuchungen von Himaratsu und Packer bestätigt <sup>[84]</sup>. Diese antioxidative Kapazität der Retinoide kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, insbesondere durch die Art der Umgebung (hydrophil oder hydrophob) Umgebung, von der die Stereostruktur der Retinoide abhängt.

#### **4.4. Sauerstoffradikalbildung in stimulierten Granulozyten von Kontrollprobanden**

Die mikrobizide Funktion der neutrophilen Granulozyten beruht zu einem wesentlichen Teil auf der zellschädigenden Wirkung reaktiver Sauerstoffradikale, die sie während der Phagozytose auf die eingedrungenen Erreger ausüben <sup>[44]</sup>. Eine zentrale Rolle im Stoffwechsel der Sauerstoffradikale spielt dabei das Superoxidanion, das mit Hilfe der NADPH-Oxidase aus Sauerstoff gebildet wird. Superoxidanion selbst besitzt zwar kaum mikrobizide Wirkung, dient aber als Ausgangspunkt für die Bildung der eigentlichen mikrobiziden Radikale, insbesondere von Hydroxylradikal <sup>[29]</sup>. Auf die Entstehung und die weiteren Reaktionen von Superoxidanion haben eine ganze Reihe von Faktoren Einfluß. Einige davon wurden in der vorliegenden Arbeit bei Kontrollprobanden sowie bei Psoriasis-Patienten untersucht (Abb. 27 – 30).

Ein großer Teil des gebildeten Superoxidanions wird durch eine spontane Dismutation zu Wasserstoffperoxid umgewandelt, welches eine wichtige Rolle in den weiteren Reaktionen unter Entstehung von Hydroxylradikal spielt <sup>[28, 92]</sup>. Superoxiddismutase (SOD) ist ein Metallprotein, das als Superoxid-Oxidoreduktase diese Reaktion katalysiert <sup>[148]</sup>. In den Messungen nach Zugabe von SOD ist der dadurch bedingte verstärkte Abbau von Superoxidanion deutlich zu erkennen (signifikante Verringerung um 66 %, siehe Abb. 27). Die Bildung von Hydroxylradikal aus Superoxidanion wird ebenfalls gehemmt, was durch eine in der gleichen Größenordnung signifikant verminderte Hydroxylradikalbildung erkennbar ist (Abb. 28). Damit erfüllt SOD die Aufgabe eines Radikalfängers, der überschüssiges Superoxidanion abbauen kann <sup>[108]</sup>.

Ebenfalls als natürlicher Radikalfänger wirkt die Katalase, die während der Phagozytose aus den intrazellulären Granula der Granulozyten freigesetzt wird. Dieses Enzym spielt eine Rolle beim Abbau von überschüssigem Wasserstoffperoxid. Dadurch wird, ähnlich wie bei der SOD, der Zerfall von Superoxidanion durch die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts erhöht und seine Konzentration verringert. In den vorgestellten Messungen wurde bei Zugabe von Katalase die Superoxidanionproduktion signifikant um 37 % vermindert (siehe Abb. 27). Die Konzentration von Hydroxylradikal wurde ebenfalls signifikant vermindert (Abb. 28), wenn auch in geringerem Maße (um 17 %).

Diese Verminderung ist im wesentlichen der geringeren Bildung von Hydroxylradikal über den Myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Chlorid-Reaktionsweg zuzurechnen. Durch Zugabe des Myeloperoxidase-Hemmers Natriumazid kann dieser Reaktionsweg blockiert werden <sup>[25, 92, 145]</sup>. Bei den Messungen wurde nach Zugabe von Natriumazid eine signifikante Verminderung der Hydroxylradikalbildung um ca. 35 % gefunden (Abb. 28), während für die Bildung von Superoxidanion keine wesentliche Veränderung erkennbar war (Abb. 27). Daß die Hydroxylradikalbildung nicht vollständig blockiert wurde, kann durch die Existenz eines weiteren Reaktionsweges zu Hydroxylradikal erklärt werden – der eisenabhängigen Haber-Weiss-Reaktion <sup>[34]</sup>.

Durch die Zugabe von zwei- oder dreiwertigem Eisen kann das Reaktionsgleichgewicht der Haber-Weiss-Reaktion in eine bestimmte Richtung verschoben werden <sup>[30, 31]</sup>, was sich in unseren Untersuchungen bestätigte. Bei der Zugabe von zweiwertigem Eisen wurde die Produktion von Hydroxylradikal auf mehr als das Doppelte erhöht, während die Zugabe von dreiwertigem Eisen der gleichen Konzentration (1 mM) die Hydroxylradikalbildung auf etwa die Hälfte reduzierte (Abb. 28). Durch die

gleichzeitige Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts in der Reaktion von Superoxidanion zu Sauerstoff wäre eine Änderung der Konzentration von Superoxidanion in der gleichen Größenordnung zu erwarten. Eine Veränderung in der gleichen Richtung war zwar vorhanden, jedoch fiel diese wesentlich weniger deutlich aus. Bei Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$  erhöhte sich die Superoxidanionbildung signifikant um 24 %, bei der Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$  wurde eine nichtsignifikante Verminderung um 11 % gefunden (Abb. 27).

Die deutlich unterschiedlich starke Wirkung der Zugabe von Eisenionen auf die Produktion von Superoxidanion und Hydroxylradikal kann dadurch erklärt werden, daß neben der Haber-Weiss-Reaktion auch die Myeloperoxidase- $\text{H}_2\text{O}_2$ -Chlorid-Reaktion beeinflußt wird. Die verstärkte Produktion von Superoxidanion bei der Zugabe von zweiwertigem Eisen führt zu einer verstärkten Produktion von Wasserstoffperoxid und damit zu einer verstärkten Bildung von Hydroxylradikal über das Myeloperoxidase- $\text{H}_2\text{O}_2$ -Halidsystem. Damit wird die Hydroxylradikalbildung stärker erhöht, als es durch die Haber-Weiss-Reaktion allein der Fall gewesen wäre, während umgekehrt die Superoxidanionkonzentration durch den zusätzlichen Verbrauch weniger stark anwächst, als es bei alleiniger Verschiebung der Haber-Weiss-Reaktion zu erwarten wäre. Der entgegengesetzte Effekt tritt bei der Zugabe von dreiwertigem Eisen ein <sup>[107]</sup>.

Einen Einfluß auf die besprochenen Meßergebnisse kann auch das eisenbindende Protein Lactoferrin haben, das bei der Neutrophilen-Degranulation in verstärktem Maße aus den neutrophilen Granula freigesetzt wird. Lactoferrin entzieht den Reaktionen kurzfristig Eisen, stellt es aber der Zelle durch seine speichernde Wirkung wieder zur Verfügung, so daß es einen Puffereffekt hat <sup>[44, 91]</sup>.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, daß es im Rahmen der sauerstoffabhängigen Infektabwehr der neutrophilen Granulozyten zur Sauerstoffradikal-Entstehung über ein komplexes System intrazellulär ablaufender Reaktionswege kommt. Hierbei kann nach der initialen Superoxidanion-Bildung die Hydroxylradikal-Entstehung über verschiedene Reaktionswege erfolgen, wobei eine wesentliche Rolle die Myeloperoxidase- $\text{H}_2\text{O}_2$ -Chlorid-Reaktion und die Eisen-katalysierte Haber-Weiss-Reaktion spielen. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur und mit weiteren Untersuchungen, die in unserem Labor durchgeführt wurden <sup>[173, 175, 176]</sup> und dienten als Grundlage für die weiteren Messungen.

#### **4.5. Sauerstoffradikalbildung in stimulierten Granulozyten von Patienten mit Psoriasis vulgaris**

Psoriasis ist eine Dermatose, bei der die neutrophilen Granulozyten eine wichtige Rolle spielen. In der aktiven Phase der Psoriasis sind die betroffenen Hautpartien, die Läsionen, sehr stark mit diesen Leukozyten infiltriert <sup>[13, 193]</sup>. Auch die Aktivität der peripheren Leukozyten steigt bei Psoriasis im Vergleich zu gesunden Probanden. Bei Psoriasis-Patienten wird eine verstärkte Adhäsion der Leukozyten am Epithel beobachtet. Die Fc-Rezeptorfunktion der neutrophilen Granulozyten ist erhöht <sup>[110]</sup> und verschiedene Autoren berichten von einer Verstärkung des respiratorischen Bursts in neutrophilen Granulozyten bei Psoriasis <sup>[82]</sup>, was im Einklang mit Berichten über ein erhöhtes glycolytisches Potenzial dieser Granulozyten steht <sup>[188]</sup>. Die Ursachen dafür werden diskutiert. Dazu zählen eine erhöhte Konzentration von Lactoferrin im Blutplasma <sup>[91]</sup>, eine verstärkte Wirkung von Endotoxin, chemotaktischen Faktoren, Zytokinen und Arachidonsäurederivaten <sup>[78]</sup>, der oxidative Stress infolge der psoriatischen Inflammation, die erhöhte Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase infolge der Oxidation von Arachidonsäure und der erhöhten Synthese von Nukleinsäuren in der psoriatischen Haut <sup>[187]</sup> sowie die verminderte Aktivität von Superoxiddismutase <sup>[42, 43, 50, 159]</sup>.

Ob die neutrophilen Granulozyten auch eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Psoriasis spielen, ist umstritten. Einige Autoren finden einen Zusammenhang zwischen epidermaler Proliferation und der Infiltration mit neutrophilen Granulozyten, andere bestreiten einen solchen Zusammenhang <sup>[13, 130, 159]</sup>. So wurde bei pustulösen Formen der Psoriasis mit chronisch-inflammatorischem Verlauf eine starke Infiltration mit polymorphkernigen Leukozyten gefunden <sup>[119]</sup>. Die Korrelation des PSI-Score (Anteil der betroffenen Körperoberfläche) mit der Ausprägung des respiratorischen Bursts weist darauf hin, daß der respiratorische Burst mit der Aktivität der Psoriasis korreliert.

Um den Einfluß von Retinoiden auf die Bildung freier Sauerstoffradikale bei Psoriasis-Patienten genauer untersuchen zu können, wurden zunächst die Messungen des Einflusses von SOD, Katalase, Natriumazid sowie zwei- und dreiwertigem Eisen auch an neutrophilen Granulozyten von Patienten mit *Psoriasis vulgaris* durchgeführt (Abb. 29, 30). Dadurch sollten Unterschiede bei der Bildung von Superoxidanion und Hydroxylradikal im Vergleich zu gesunden Probanden (Abb. 27, 28) gefunden werden.

Die Meßwerte für die Bildung von Superoxidanion und Hydroxylradikal in stimulierten neutrophilen Granulozyten von Psoriasispatienten ohne Zugabe zusätzlicher Substanzen lagen im Bereich der für gesunde Probanden gefundenen Werte. Nach Zugabe der verschiedenen Substanzen wurden qualitativ die gleichen Effekte gefunden, wie sie im vorigen Abschnitt für die Proben von gesunden Kontrollprobanden beschrieben wurden. Quantitativ zeigten sich allerdings deutliche Unterschiede für einige Substanzen, was darauf hinweist, daß sich die oben beschriebenen Wege des Radikalstoffwechsels in den peripheren neutrophilen Granulozyten von Patienten mit Psoriasis von denen gesunder Probanden unterscheiden.

Der Einfluß der Zugabe der Eisenionen ( $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$ ) war bei Proben von Psoriasispatienten wesentlich stärker ausgeprägt. So wurde bei der Zugabe von zweiwertigem Eisen die Superoxidanionproduktion in stimulierten Granulozyten von Psoriatikern signifikant um 125 % erhöht (im Vergleich zu 24 % in stimulierten Granulozyten von Kontrollprobanden). Die Hydroxylradikalproduktion stieg bei Psoriasispatienten signifikant um 230 % (im Vergleich zu 109 % bei Kontrollprobanden).

Die Zugabe von dreiwertigem Eisen fördert die Bildung von zweiwertigem Eisen und Sauerstoff über die Haber-Weiss-Reaktion. Die dadurch bewirkte signifikante Verminderung der Konzentration von Superoxidanion fällt bei Psoriasispatienten viel stärker aus (um 85 % im Vergleich zu 11 % in den Kontrollproben, siehe Abb. 29). Das kann seine Ursache in einer verminderten Aktivität der NADPH-Oxidase haben, welche die Bildung von Superoxidanion aus Sauerstoff vermittelt, oder in einer verminderten Verfügbarkeit von NADPH, das als Energiespender für verschiedene Reaktionen benötigt wird. Da das Superoxidanion außer in der Haber-Weiss-Reaktion auch in anderen Reaktionen, wie der spontanen Dismutation zu Wasserstoffperoxid, benötigt wird, kann nicht mehr ausreichend Superoxidanion nachgebildet werden. Das niedrigere Niveau von Superoxidanion beeinträchtigt die Reduktion von dreiwertigem zu zweiwertigem Eisen, das wiederum für die Bildung von Hydroxylradikal notwendig ist. Wie nach diesen Überlegungen zu erwarten ist, fällt die Abnahme der Hydroxylradikalproduktion bei Zugabe von dreiwertigem Eisen bei stimulierten Granulozyten von Psoriasispatienten ebenfalls stärker aus (um 81 %, siehe Abb. 30) als bei Kontrollprobanden (um 56 %).

Diese Überlegungen werden auch von der gefundenen Wirkung von Katalase auf die Radikalbildung in stimulierten Granulozyten von Psoriasispatienten gestützt. Bei der Zugabe von Katalase wurde bei Psoriasispatienten eine signifikante Hemmung der

Superoxidanionbildung um 59 % im Vergleich zu einer Hemmung um 37 % bei den Kontrollprobanden gemessen. Die Hydroxylradikalbildung wurde signifikant um 81 % (im Vergleich zu nur 17 %) vermindert. Da Katalase den Zerfall von Wasserstoffperoxid katalysiert, hat sie Einfluß auf alle Reaktionen, an denen Wasserstoffperoxid beteiligt ist. Insbesondere wird auch die Dismutation von Superoxidanion zu Wasserstoffperoxid gefördert, wodurch der Haber-Weiss-Reaktion weniger Superoxidanion zur Verfügung steht, außerdem wird die Bildung von Hydroxylradikal aus Wasserstoffperoxid in der Haber-Weiss-Reaktion vermindert. Steht durch eine verminderte NADPH-Oxidase-Aktivität weniger Superoxidanion zur Verfügung, so wird dieser Effekt durch eine weitere Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts noch verstärkt.

Auch die Zugabe von SOD zu stimulierten Granulozyten von Psoriasispatienten hatte einen stärkeren Effekt auf die Hydroxylradikalbildung als bei Proben von Kontrollprobanden, wenn der Unterschied auch nicht so stark ausgeprägt war (signifikante Minderung um 79 % im Vergleich zu 63 %). Die SOD fördert die Dismutation von Superoxidanion zu Wasserstoffperoxid und führt bei verminderter Aktivität von NADPH-Oxidase ebenfalls zu einer stärkeren Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts der Haber-Weiss-Reaktion. Da sie aber im Gegensatz zur Katalase nicht direkt auf die Haber-Weiss-Reaktion wirkt, fällt der Unterschied in den Messungen hier geringer aus.

Schließlich spricht auch die stärkere Hemmung der Hydroxylradikalproduktion durch den Myeloperoxidaseblocker Natriumazid bei Psoriasispatienten (56 %) im Vergleich zu den Messungen bei Kontrollprobanden (34 %) dafür, daß die Aktivität der Haber-Weiss-Reaktion als alternativem Produzenten von Hydroxylradikal weniger stark als bei Kontrollpatienten anwächst. Das kann ebenfalls durch eine geringere Aktivität von NADPH-Oxidase und eine dadurch bedingte geringere Verfügbarkeit von Superoxidanion erklärt werden.

Ein komplexeres Bild ergibt sich, wenn diese Überlegungen mit den Ergebnissen der Wirkung von zweiwertigem Eisen auf die Bildung von Sauerstoffradikalen in neutrophilen Granulozyten von Psoriasispatienten ergänzt werden. Die Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$  in stimulierten Granulozyten fördert direkt die Bildung von Hydroxylradikal aus Wasserstoffperoxid über die Haber-Weiss-Reaktion und hemmt die Umwandlung von Superoxidanion zu Sauerstoff in der gleichen Reaktion. Das führt zu einer verstärkten Bildung beider Radikale. Bei den Kontrollprobanden fiel die Zunahme der Bildung

von Superoxidanion im Vergleich zur Bildung von Hydroxylradikal sehr moderat (24 %) aus, was durch die verstärkte Dismutation von Superoxidanion zu Wasserstoffperoxid erklärt werden kann. Die Messungen bei Psoriasispatienten zeigten aber eine deutlich stärkere Erhöhung der Superoxidanionbildung (um 125 %). Das deutet auf einen verminderten Abbau von Superoxidanion hin. Einer der wichtigsten Reaktionswege für den Abbau von Superoxidanion ist die Dismutation zu Wasserstoffperoxid. Die erhöhte Konzentration von Superoxidanion kann daher u.a. mit einer verminderten Aktivität der SOD bei Psoriasis erklärt werden kann. Unsere Daten korrelieren mit den in der Literatur bekannten Messungen, die eine verminderte SOD-Aktivität in neutrophilen Granulozyten bei Psoriasis bestätigen <sup>[50]</sup>. Allerdings würde eine verminderte Bildung von Wasserstoffperoxid zu einer verminderten Produktion von Hydroxylradikal führen, da das benötigte Wasserstoffperoxid für die eisenkatalysierte Haber-Weiss-Reaktion nicht ausreichend zur Verfügung stehen würde. Da die Hydroxylradikalbildung im Gegenteil sogar stärker zunimmt (um 230 %) als bei den Kontrollprobanden (um 109 %), ist die Verminderung der SOD-Aktivität für die gefundenen Effekte nicht ausreichend. Als mögliche Erklärung bietet sich hier auch eine verminderte Aktivität der Myeloperoxidase an, was zu einem verminderten Abbau von Wasserstoffperoxid führt.

Ein weiterer möglicher Faktor ist eine erhöhte Bindung von dreiwertigem Eisen durch eisenbindende Proteine wie Lactoferrin. Es ist bekannt, daß bei Psoriasis die Konzentration von Lactoferrin im Blutplasma deutlich erhöht ist <sup>[91]</sup>. Die hohe Affinität von Lactoferrin zu  $Fe^{3+}$  könnte die eisenkatalysierte Haber-Weiss-Reaktion beeinträchtigen.

Nicht auszuschließen ist auch die Möglichkeit, daß bei Psoriasis die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch benachbarte Zellen oder Enzyme in der Epidermis und im Blutplasma den Metabolismus des Phagosoms und damit die Superoxidanionbildung beeinflusst <sup>[39, 157]</sup>.

#### **4.6. Wirkung von 13-cis-Retinsäure (Isotretinoin) auf die neutrophilen Granulozyten**

Eines der wirksamsten Medikamente bei der Behandlung verschiedener Dermatosen ist Isotretinoin (13-cis-Retinsäure). Es wird bei verschiedenen Akneformen wie *Akne conglobata*, bei schwerer Rosacea und gramnegativer Follikulitis eingesetzt, insbesondere bei leichter Akne. Bei dieser Form des Einsatzes stehen die komedolytische

und antikomedogene sowie eine antiinflammatorische Wirkung im Vordergrund [46, 83, 137, 139, 172]. Außerdem wurde diese Substanz in der Therapie verschiedener Dermatosen dadurch interessant, daß sie mit PUVA-Therapie kombiniert werden kann, was mit Erfolg bei der pustulösen Psoriasis eingesetzt wird [66, 156].

Unsere Messungen ergaben, daß Isotretinoin in der Lage ist, die Erzeugung reaktiver Sauerstoffmetabolite in dem von uns getesteten System mit Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten signifikant zu hemmen. Insbesondere die Produktion von Superoxidanion wurde konzentrationsabhängig um bis zu 50 % vermindert (Abb. 17). Die Bildung von Hydroxylradikal wurde bei höheren Konzentration ebenfalls vermindert (um etwa 20 %, Abb. 18). In der klinischen Anwendung könnte das eine direkte Ursache für den beobachteten antiinflammatorischen Effekt sein.

Auch in dem von uns untersuchten Xanthin/Xanthinoxidase-System zeigt Isotretinoin eine starke antioxidative Aktivität bei der Freisetzung von Sauerstoffradikalen. Die Bildung von Superoxid wurde konzentrationsabhängig um bis zu 24 % gehemmt, die Hydroxylradikalbildung wurde bereits bei niedrigen Konzentrationen um ca. 50 % vermindert (Tab.1). Diese Aktivität kann bei Entzündungen in der Epidermis eine protektive Rolle spielen [19]. Die Abwehrmechanismen der Haut unter anderem gegen Propionibakterien bei Akne und die schädliche Wirkung von Lichtstrahlung erhöhen im kranken Gewebe und in der Umgebung die Konzentration freigesetzter Radikale. Die Verminderung dieses Effekts durch Isotretinoin könnte einer der wichtigsten Wirkmechanismen der Isotretinoin-Therapie sein.

#### **4.7. Einfluß der Retinoid-Psoralen-UVA-Kombinationstherapie auf die Sauerstoffradikalbildung in neutrophilen Granulozyten bei Psoriasis**

In unseren Untersuchungen spielte die Wirkung der UV-Strahlung zum einen deshalb eine Rolle, weil bekannt ist, daß UV-Strahlung die Isomerisierung oder Photodestruktion von Vitamin A und analoger Retinoide hervorrufen kann, zum anderen deshalb, weil Patienten unter PUVA-Therapie ebenfalls erheblicher UV-Strahlung ausgesetzt werden [5, 95, 169, 170].

Die EPR, die für viele biomedizinische Aufgabenstellungen eingesetzt wird, ist in der Photodermatologie als eine sehr sensitive und spezifische Untersuchungsmethode etabliert [58, 128]. Sie wurde zur Messung der Veränderung von Lipiden, Proteinen und Membranen verwendet. Unter anderem wurde die Methode für die Messung von endogenen Ascorbinradikalen in UV-bestrahlter Haut verwendet. Mit Hilfe von EPR-

Untersuchungen wurde eine erhöhte Konzentration freier Radikale bei Psoriasis-Patienten gefunden, die mit der Aktivität der Krankheit korrelierte. Nach erfolgreicher Behandlung der Psoriasis wurde ein deutlicher Rückgang der Radikalbildung gefunden <sup>[179]</sup>. Auch die Erzeugung persistenter organischer Radikale nach epidermaler Applikation von radikalerzeugenden Substanzen wie 4-Hydroxyanisol und Anthralin wurde mit Hilfe der EPR nachgewiesen. Eine wichtige Rolle spielt die Methode in der Detektion und Klärung der Rolle von Melanin. Weitere Anwendung fand die EPR beispielsweise in der Messung von Änderungen in der Membranviskosität epidermaler Zellen sowie zur Untersuchung von Elektronentransferreaktionen wie dem Ascorbat- und Thiol-vermittelten Elektronentransfer, die mit der Aktivität der Thiothioninreduktase in Zusammenhang gebracht wird <sup>[58]</sup>.

Spintrap-Moleküle werden in der Dermatologie zur Messung von freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffmetaboliten in der Haut eingesetzt. Mit Hilfe des Spintrap-Moleküls DMPO wurden Alkylradikale gemessen, die unter UV-Bestrahlung aus Hautlipiden gebildet werden. In Keratinozyten wurden Glutathion-Thiol-Radikale nach Behandlung mit Hydroperoxid gemessen. Die Aktivität von Superoxiddismutase in der Epidermis wurde ebenfalls mit Hilfe von DMPO untersucht <sup>[121]</sup>.

Die isomerisierende und destruktive Wirkung von UV-Strahlung auf verschiedene Retinoide ist aus *in vitro*-Untersuchungen bekannt <sup>[3, 12]</sup>. Die Effekte von UV-Strahlung *in vivo* sind weniger eindeutig und hängen von der Art der Retinoide ab. So wurde für epidermales Retinol eine Photodestruktion *in vivo* gefunden, bei Patienten unter einer kombinierten Retinoid-PUVA-Therapie dagegen eine Photoisomerisierung, aber keine Photodestruktion von Etretinat und Acitretin. Beide Retinoide wurden dabei in ihr 13-*cis*-Isomer umgewandelt. Diese Transisomerisierung trat bereits bei niedrigdosierter UV-Strahlung auf und war nicht dosisabhängig. Für Isotretinoin (13-*cis*-Retinsäure) wurde *in vivo* eine Photoisomerisierung zu all-*trans*-Retinsäure beobachtet, die aber weniger ausgeprägt und dosisabhängig war. Als Erklärung für diese unterschiedlichen Wirkungen wurden beispielsweise die Resistenz von Acitretin gegen Photodestruktion durch seine Bindung an die zellulären Retinsäure-bindenden Proteine (CRABP) und die verstärkte Aufnahme von aromatischen Retinoiden in bestrahltem Gewebe diskutiert. Die Ergebnisse zeigen, daß durch UV-Strahlung, wie sie bei der Phototherapie angewendet wird, die Pharmakokinetik der oral verabreichten Retinoide durch deren Isomerisierung verändert wird. <sup>[12, 18]</sup>

Eine Verminderung der benötigten UV-Dosis in der Photodermatologie kann durch Kombination der UV-Behandlung mit der Applikation geeigneter Substanzen erreicht werden. So wird die Effizienz der PUVA-Therapie durch die zusätzliche Gabe von Acitretin deutlich erhöht, was die benötigte UV-Dosis und die Dauer der Behandlung signifikant reduziert. Die PUVA-Photochemotherapie ist eine Kombination des photosensibilisierenden Psoralens 8-Methoxypsoralen (8-MOP) mit UVA-Bestrahlung, die bei der Behandlung von Psoriasis etabliert ist [61, 62, 86, 87, 156]. Photosensibilisatoren sind Substanzen, die durch UV-Strahlung in einen aktivierten Zustand versetzt werden, in dem sie die Oxidation anderer Moleküle bewirken. Die Wirkung des Photoaktivators 8-MOP verläuft zweistufig: Zunächst wird durch sauerstoffunabhängige Lichtanregung ein stabiles Photoaddukt (8-MOP DNA) gebildet. In der zweiten Stufe reagiert dieses Addukt wiederum unter Lichtanregung mit Sauerstoff im Grundzustand ( $^3\text{O}_2$ ), der durch Energietransfer in Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) überführt wird (Typ-II-Reaktion). Die Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit weiteren Elektronenakzeptoren führt zur Bildung einer großen Menge von Superoxidanion und anderen reaktiven Oxygenspezies [62, 79, 155].

Es ist bekannt, daß 8-MOP in Kombination mit UVA bei Psoriasis die Chemotaxis der Leukozyten hemmt [99]. In psoriatischen Plaques bilden sich Immunkomplexe aus verschiedenen Immunglobulinen und Komplement [113]. Durch diese Immunkomplexe wird offenbar die Bildung des psoriatischen leukotaktischen Faktors (PLF) induziert, der eine chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten hat und zu einer weiteren Ansammlung von Leukozyten am psoriatischen Herd und einer Verstärkung der lokalen inflammatorischen Prozesse führt. Nach den Ergebnissen von Mizuno *et al.* wirkt 8-MOP hemmend auf die leukotaktische Aktivität von PLF und verhindert dadurch eine weitere Infiltration des Infektionsherdes mit Leukozyten [100, 101, 113]. Als Mechanismus für diesen Effekt wird die photochemische Bindung von 8-MOP an PLF oder an aktiviertes Komplement diskutiert.

In unseren Untersuchungen haben wir die Bildung von Superoxidanion und Hydroxylradikal bei Patienten mit Psoriasis gemessen, die mit einer kombinierten Acitretin-PUVA-Therapie (Re-PUVA-Therapie) behandelt wurden (Abb. 31, 32). Unsere Ergebnisse der Untersuchungen *in vivo* sprechen dafür, daß die Re-PUVA-Therapie zu einer leichten Senkung der Produktion von Hydroxylradikal führt. Deutlicher wird diese Hemmung, wenn man in Einzelpatienten unter Re-PUVA-Therapie neutrophile Granulozyten unmittelbar vor und nach der Bestrahlung untersucht (Abb. 33, 34).

Bei allen 8 getesteten Patienten ist eine Senkung der Produktion von Superoxidanion und Hydroxylradikal deutlich zu erkennen. Dieser unmittelbare Effekt kann auf eine Verminderung der Freisetzung von Radikalen in stimulierten neutrophilen Granulozyten, bedingt durch Photoschädigungen, zurückgeführt werden. Um den Trend der Langzeiteffekte statistisch zu validieren, reicht die Größe der untersuchten Gruppe nicht aus. Außerdem war der Therapieansatz individuell an jeden Patienten angepaßt und die Dosierung von UV-Strahlung und Retinoidgabe nicht identisch, was Aussagen über die Ergebnisse weiter erschwert.

*In-vitro*-Kontrolluntersuchungen in stimulierten neutrophilen Granulozyten von Kontrollprobanden, die unter UVA bzw. verschiedenen Konzentrationen von 8-MOP unter gleichen Bedingungen bestrahlt wurden, bestätigen unsere *in-vivo*-Ergebnisse. 20 Minuten nach der Stimulation ist eine dosisabhängige Minderung der Bildung von Superoxidanion festzustellen. Dieser unmittelbare Effekt der PUVA-Behandlung könnte *in vivo* zusammen mit anderen UVA-bedingten Schäden zu der beobachteten Minderung der Hydroxylradikalbildung führen.

*In vivo* ist auch nicht auszuschließen, daß es durch PUVA-Wirkungen auf benachbarte Zellen, wie Lymphozyten oder Makrophagen, zu einer Beeinflussung von sauerstoffabhängigen Prozessen in Leukozyten kommen kann. Es ist bekannt, daß die PUVA-Therapie zu einer Inaktivierung von Lymphozyten führt, was z.B. durch eine Hemmung der Proliferation, Interleukin-Produktion und funktionalen Aktivität von T-Lymphozyten zum Ausdruck kommt. Insbesondere durch die schädigende Wirkung von aktiviertem 8-MOP auf die DNS wird die Apoptose von Lymphozyten induziert. Im frühen Stadium der Apoptose werden phagozytosefördernde Substanzen wie Phosphatidylserin exprimiert, die dann durch ihre Wirkung auf benachbarte Zellen zu einer generellen Anregung der Phagozytose führen können [63, 101, 195].

#### **4.8. Wirkung von Carotinoiden in der Prävention vor UV-Schädigung**

Carotinoide sind Derivate von  $\beta$ -Carotin mit einer zentralen Polyen-Kette, die im Organismus eine vielseitige Wirkung haben. Sie verfügen über Provitamin-A-Aktivität, die sie in der Protektion gegen Tumorbildung und Wachstum eine wichtige Rolle spielen läßt [7, 35, 160]. Durch ihre antioxidativen Fähigkeiten wirken sie bei der Deaktivierung von Singulett-sauerstoff und freien Radikalen mit [48, 97, 129]. Schließlich spielen sie eine wichtige Rolle als Immunstimulatoren, die in der Lage sind, die Lympho-

zytenaktivität und den respiratorischen Burst von neutrophilen Granulozyten zu modulieren [20, 158, 190].

Die antioxidative Wirkung von  $\beta$ -Carotin beruht auf seiner Fähigkeit, aktivierte Sauerstoffverbindungen durch Quenchen zu inaktivieren, wodurch die Bildung freier Radikale gehemmt wird. Insbesondere ist  $\beta$ -Carotin in der Lage, Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) zu inaktivieren. Singulett-Sauerstoff entsteht, wenn ein lichtempfindliches Molekül, das durch Lichteinwirkung in den Triplettzustand versetzt wurde, mit Sauerstoff im Grundzustand ( $^3\text{O}_2$ ) reagiert. Er ist ein hochgradig aktiver Radikalgenerator mit zellschädigender Wirkung. Die erzeugten Radikale können mit Lipiden, Proteinen, Nucleinsäuren und Kohlenhydraten reagieren und dadurch eine sehr breite Palette pathologischer Störungen hervorrufen [155]. Bei der Inaktivierung durch  $\beta$ -Carotin wird die Erregungsenergie des Singulett-Sauerstoffs auf  $\beta$ -Carotin übertragen und es entsteht ein Carotino-triplett, das sich spontan unter Wärmeabgabe wieder zu  $\beta$ -Carotin umwandelt. Carotinoide können somit auf katalytische Weise Singulett-Sauerstoffmoleküle deaktivieren [35, 48].

Carotinoide können aber auch direkt als Antioxidant wirken, indem sie Superoxid und Hydroxylradikale inaktivieren und deren zellschädigende Wirkung verhindern.  $\beta$ -Carotin reagiert mit Peroxylradikalen, wobei es selbst zu einem resonanzstabilisierten 13-Carotenylnradikal oxidiert wird. Dieses Radikal ist in Abwesenheit von Sauerstoff ein wirksamer Kettenbrecher. Mit Sauerstoff reagiert es dagegen zu einem  $\beta$ -Carotin-Peroxylradikal, was letztendlich zur Generierung weiterer Radikale in einer Kettenreaktion führt.  $\beta$ -Carotin ergänzt damit als kettenbrechendes Antioxidans, das bei geringem Sauerstoffpartialdruck wirkt, die Wirkung anderer Antioxidantien, wie zum Beispiel Vitamin E, die auch bei höherem Sauerstoffpartialdruck wirken [97, 161]. In unseren Ergebnissen bestätigen sich diese vielfältigen Wirkungen der  $\beta$ -Carotinoide. So zeigte z.B. all-*trans*- $\beta$ -Carotin einen antioxidativen Effekt gegen die Superoxidanionbildung im Xanthin/Xanthinoxidase-System (Tab. 3).

Carotinoide spielen außerdem eine wichtige Rolle als Immunstimulatoren. Sie verstärken die Immunabwehr, indem sie die Zytotoxizität der Makrophagen gegenüber Tumorzellen erhöhen, eine erhöhte Lymphozytenproduktion bewirken und die Interferonwirkung beeinflussen [35].  $\beta$ -Carotin bewirkt zudem einen Anstieg der T- und B-Zellaktivität, wodurch die zelluläre Immunantwort erhöht wird. Die antikancerogene Wirkung von  $\beta$ -Carotin könnte also auch auf seinen Einfluß auf die Immunabwehr zurückgeführt werden [95, 190]. Auch durch die rein antioxidativen Effekte von  $\beta$ -Carotin

kann ein Teil seiner antikancerogenen Wirkung erklärt werden. So wird beispielsweise die mutagene Wirkung von photoaktiviertem 8-MOP in der PUVA-Therapie bei einer Supplementierung mit  $\beta$ -Carotin um 50 % verringert. Diese Verringerung ist auf die Inaktivierung von Singulett-Sauerstoff und Sauerstoffradikalen zurückzuführen, so daß nur der sauerstoffabhängige Teil der Wirkung von 8-MOP, nicht aber der therapeutisch relevante sauerstoffunabhängige Effekt des Psoralens unterdrückt wird <sup>[155]</sup>.

Unsere Ergebnisse korrelieren mit der Tatsache, daß  $\beta$ -Carotin *in vivo* auf das Immunsystem eine stimulierende bzw. restaurierende Wirkung gegen UVA-Schädigung haben kann. Es wird beispielsweise bei regelmäßigem Besuch im Solarium eine Unterdrückung des Immunsystems durch eine verminderte Radikalbildung während der Phagozytose hervorgerufen. So ist bei Probandinnen unter  $\beta$ -Carotin-Supplementierung eine stärkere Sauerstoffradikalbildung während der UVA-Bestrahlungsphase zu beobachten, die sofort nach der Bestrahlung zu den ursprünglichen Normalwerten zurückgeht. Dieser Effekt ist auch sehr deutlich bei der Bildung von Superoxidanion in stimulierten neutrophilen Granulozyten. Die Hydroxylradikalproduktion in neutrophilen Granulozyten während der UVA-Bestrahlungsphase bei den placebosupplementierten Probanden zeigt eine signifikante Minderung, was für stimulierte neutrophile Granulozyten von Probanden aus der Gruppe mit  $\beta$ -Carotin-Supplementierung nicht zu beobachten war. In diesem Fall wurde eine erhöhte Hydroxylradikalproduktion während der Bestrahlungsphase beobachtet (Abb. 39, 40). Für beide gemessenen Sauerstoffradikale wurde eine Rückkehr zu Normalwerten nach Ende der Bestrahlung im Gegensatz zu einer erhöhten Radikalproduktion in der Placebogruppe gefunden.

Diese Ergebnisse korrelieren gut mit den in der Arbeitsgruppe von Gollnick und Biealski <sup>[57, 68]</sup> gefundenen Resultaten. In Untersuchungen zur protektiven Wirkung von  $\beta$ -Carotin bei UV-Bestrahlung *in vivo* wurden dort verschiedene Effekte einer oralen Supplementierung mit  $\beta$ -Carotin gefunden. Dazu zählen die Verminderung der Erythembildung, die Stärkung der Immunabwehr der Haut und die Verminderung der Lichtempfindlichkeit der Haut. Es wurden eine Hemmung der UV-induzierten Verringerung der Antwort auf der Recall-Antigene in der Epidermis sowie eine Verminderung der Exprimierung von Matrix-Metallproteinase 1 in Biopsiematerialien der Haut gefunden, was ebenfalls einem protektiven Effekt von  $\beta$ -Carotin entspricht. Gleichzeitig wurde ebenfalls in Hautbiopsien ein Anstieg der epidermalen Langerhans-Zellen beobachtet, die eine wesentliche Rolle für die lokale Immunität der Haut spielen.

Der Metabolismus von  $\beta$ -Carotin und seiner Isomere *in vivo* ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die verschiedenen Isomere von  $\beta$ -Carotin können sich in nicht-enzymatischen Reaktionen ineinander umwandeln. Dabei kann sich das all-*trans*-Isomer sowohl in 9-*cis*- als auch in 13-*cis*- $\beta$ -Carotin umwandeln, während diese wieder zu all-*trans*- $\beta$ -Carotin transformieren können. Ähnliche nichtenzymatische Isomerisierungen finden auch zwischen den Isomeren von Retinal (13-*cis*-, all-*trans*- und 9-*cis*-Retinal) statt. Durch diese Isomerisierungen wird die genaue Untersuchung des  $\beta$ -Carotin-Stoffwechsels erschwert. Klar ist aber, daß verschiedene enzymatische Reaktionen die Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Retinal befördern, wobei offensichtlich eine Schlüsselrolle der Umwandlung von all-*trans*- $\beta$ -Carotin in all-*trans*-Retinal zukommt <sup>[117]</sup>. Retinal kann sich in einer irreversiblen Reaktion in Retinsäure umwandeln, wobei verschiedene Retinal-Isomere die entsprechenden Retinsäure-Isomeren bilden. Ein weiterer möglicher Weg der Entstehung von all-*trans*-Retinsäure aus all-*trans*- $\beta$ -Carotin läuft über die Zwischenstufe von  $\beta$ -Apocarotinoiden und von  $\beta$ -Apocarotinsäure.

Unsere Messungen in stimulierten neutrophilen Granulozyten *in vitro* zeigen, daß die verschiedenen Carotinoid-Isomere eine spezifische Wirkung auf die Sauerstoffradikalbildung während der Phagozytose haben. Hier wiederholt sich die Verstärkung der Superoxidanionproduktion bei Zugabe von all-*trans*- $\beta$ -Carotin. Im Gegensatz dazu sind die Ergebnisse von 13-*cis*- $\beta$ -Carotin, das eine starke Minderung der Radikalbildung, sowohl von Superoxidanion als auch von Hydroxylradikal, im zellulären System hervorruft (Abb. 37, 38).

Die Tatsache, daß eine Abnahme des Serumspiegels für all-*trans*- $\beta$ -Carotin während der Bestrahlungsphase festgestellt wurde, deutet darauf hin, daß  $\beta$ -Carotin sich in seiner Doppelfunktion als Antioxidant und Immunstimulator *in vivo* unter der UVA-Bestrahlung bestätigt (Abb. 41).

Außerdem kann dieser Abfall des Plasmaspiegels von all-*trans*- $\beta$ -Carotin zu der oben genannten Transisomerisierung von  $\beta$ -Carotin und damit zur Bildung von 13-*cis*- $\beta$ -Carotin führen, das eine wichtige Rolle in der Protektion gegen UVA-induzierte photooxidative Reaktionen sowie gegen die Freisetzung von Radikalen, die Schaden im Gewebe und im Immunsystem hervorrufen, spielen könnte <sup>[169, 170]</sup>. Das korreliert wiederum mit der *in vivo* festgestellten Wirkung der  $\beta$ -Carotin-Supplementierung auf die Verringerung der Erythembildung und Lichtempfindlichkeit der Haut.

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe der oxidativen Schädigung durch UV-Strahlung von Proteinen (Elektrophoresemessungen) und Lipiden (Messungen von Malondialdehyd) in Proben ergaben, daß keine großen oxidativen Veränderungen im Plasma sowie in Granulozytensuspensionen feststellen konnten. Eine Analyse des plasmatischen und intrazellulären antioxidativen Status ergab, daß bei niedrig-dosierter UVA-Strahlung ( $< 2 \text{ J/cm}^2$ ) noch genügend Protektion vorhanden ist [14, 149].

#### **4.9. Schlußfolgerungen**

In unserer Arbeit konnten wir nachweisen, daß Retinoide der ersten und zweiten Generation eine antioxidative Aktivität besitzen. Diese konnten wir im Xanthin/Xanthinoxidase-System für 13-*cis*- und 9-*cis*-Retinsäure und für Acitretin deutlich messen. In stimulierten neutrophilen Granulozyten zeigten die Retinoide in Abhängigkeit von der Konzentration sowohl stimulierende als auch hemmende Effekte auf die Freisetzung von Radikalen. So wird bei all-*trans*- und 9-*cis*-Retinsäure sowie bei Acitretin für Superoxidradikal, bei 13-*cis*-Retinsäure für Hydroxylradikal eine verstärkte Freisetzung bei niedrigen Konzentrationen gemessen. Bei höheren Konzentrationen verschwinden diese Effekte bei all-*trans*- und 9-*cis*-Retinsäure, während es bei 13-*cis*-Retinsäure zu einem hemmenden Effekt bis 20 % auf die Bildung von Hydroxylradikal kommt. 13-*cis*-Retinsäure bewirkt eine starke konzentrationsabhängige Verminderung der Superoxidanionproduktion in neutrophilen Granulozyten.

Bei unbehandelten Psoriasispatienten wurden in neutrophilen Granulozyten einige Abweichungen zum Verlauf der Phagozytose im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden gefunden. Diese Abweichungen sind deutlich bei Zugabe von Katalase, Natriumazid und Eisenionen auf die Radikalproduktion, was auf wesentliche Verschiebungen der Reaktionswege hindeutet.

In der Paralleluntersuchung zur Wirkung von Retinoiden im Rahmen einer Acitretin/PUVA-Kombinationstherapie in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten wurde keine ausgeprägte Verminderung der Radikalbildung gefunden. Der Vergleich zu den Effekten, die in der  $\beta$ -Carotin-Studie in neutrophilen Granulozyten von UVA-bestrahlten Probanden der Placebogruppe auftraten, weist auf eine protektive Wirkung von Retinoiden gegen UVA-induzierte Schädigung hin. Unmittelbar nach der PUVA-Therapie wurde in jeder der untersuchten Proben eine deutliche Verminderung der Freisetzung von Radikalen gemessen, die jedoch im Laufe der Therapie

nicht anhielt, was auf eine Verminderung der Freisetzung von Radikalen in stimulierten neutrophilen Granulozyten, bedingt durch Photoschädigungen, hindeutet.

Unsere *in vitro* durchgeführten Experimente bestätigen die dosisabhängige Minderung der Freisetzung von Radikalen mit Zunahme der UVA-Strahlungsdosis, was die Erklärung der *in vivo* gefundenen Ergebnisse mit dem protektiven Effekt der Retinoide untermauert.

Die Anwendung von Carotinoiden in der Prävention vor UV-Schädigungen zeigte eine protektive Wirkung auf neutrophile Granulozyten *in vivo* bei den Probanden unter  $\beta$ -Carotin-Supplementierung im Vergleich zur Placebogruppe. Insbesondere wurde eine Rückkehr zu Normalwerten in der Produktion von Superoxidanion und Hydroxylradikal nach Bestrahlungsende im Gegensatz zu einer erhöhten Radikalproduktion in der Placebogruppe gefunden. Der Abfall des Serumspiegels während der Bestrahlungsphase deutet auf eine Hemmung der UVA-vermittelten photooxidativen Reaktionen hin, die zu einer erhöhten Freisetzung von Radikalen führt. Bei genauer Betrachtung der Experimente *in vitro* ist eine Parallele zu den Retinoiden erkennbar. So ist hier ebenfalls eine antioxidative Aktivität bei all-*trans*- $\beta$ -Carotin meßbar, die sich in dem stimulierten neutrophilen Granulozyten ganz anders verhält und zu einer Stimulation der Freisetzung von Radikalen führt. 13-*cis*- und 9-*cis*- $\beta$ -Carotin wirken hemmend auf die stimulierten neutrophilen Granulozyten. Hier sind, ähnlich wie bei den Retinoiden, jedem Isomer spezifische Aktivitäten zugeordnet. Dabei sollte nicht aus dem Blick verloren werden, daß die UV-Strahlung die Transisomerisierung von Carotinoiden und Retinoiden in Richtung der 13-*cis*-Isomere bevorzugt.

Offene Fragen bleiben allerdings in Hinsicht auf den Verlauf der Phagozytose bei Psoriasis-Patienten, die weitere Untersuchungen auf enzymatischer Ebene (Messung der Enzymaktivität) erforderlich machen. Zur Wirkung von Retinoiden und Carotinoiden auf neutrophile Granulozyten wäre es interessant, eine Vorinkubation der neutrophilen Granulozyten durchzuführen. Diese Arbeiten könnten mit wasserlöslichen Präparaten durchgeführt werden, die mittlerweile beispielsweise für  $\beta$ -Carotin zur Verfügung stehen.

Unter dem Gesichtspunkt des therapeutischen Einsatzes von Retinoiden und Carotinoiden wäre es sinnvoll, ihren Einfluß auf Keratinozytenkulturen mit Hilfe der EPR zu untersuchen. Auch die Untersuchung der Bildung freier Radikale bei Verwendung

dieser Präparate in Kombination mit UV-Bestrahlung kann in Keratinozytenkulturen relevant sein.

## 5. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Erfassung der Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale in menschlichen weißen Blutkörperchen (neutrophilen Granulozyten) mit Hilfe der Elektronenspinresonanzspektrometrie und unter Anwendung der Spin-Trapping-Methode, die während der zellulären Abwehrprozesse (Phagozytose) freigesetzt werden.

Die EPR-Spektrometrie ist ein Absorptionsspektroskopie-Verfahren im Mikrowellenbereich, das zur Strukturuntersuchung verschiedener paramagnetischer Substanzen verwendet wird. In biologischen Systemen kann es deshalb zur Untersuchung von Metalloproteinen und freien Radikalen eingesetzt werden. Die Methode beruht darauf, daß sich die unpaarigen Elektronen einer paramagnetischen Substanz bei Anlegen eines Magnetfeldes in zwei unterschiedlichen Energiezuständen ausrichten, die dem gegensätzlich ausgerichtetem Spin ( $-\frac{1}{2}$  und  $+\frac{1}{2}$ ) entsprechen (Zeemann-Effekt). Dabei entspricht der Spin von  $-\frac{1}{2}$  der Ausrichtung der Elektronen in Richtung des Magnetfeldes und dem niedrigeren Energiezustand, der mit hoher Wahrscheinlichkeit eingenommen wird. Die Differenz der beiden Energiezustände ist proportional zu der Feldstärke des angelegten Magnetfeldes und zu dem g-Faktor, der von der Konfiguration der untersuchten Substanz bestimmt wird.

Wird eine elektromagnetische Welle in das Meßsystem eingestrahlt, deren Frequenz der Differenz dieser Energiezustände entspricht, tritt eine Resonanz-Absorption durch die Elektronen mit dem niederen Energiezustand auf, die dadurch in den höheren Zustand versetzt werden. Bei der EPR-Spektrometrie wird eine elektromagnetische Welle konstanter Frequenz in das Meßsystem eingespielt, während die Stärke des angelegten magnetischen Feldes kontinuierlich geändert wird. Dadurch wird ein von der magnetischen Feldstärke abhängiges Absorptionsspektrum gewonnen. Das Spektrum einer gemessenen Substanz wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst.

Der g-Faktor kann direkt aus der Feldstärke im Maximum des Spektrums bestimmt werden. Er hängt im Wesentlichen von der Elektronen-Konfiguration ab und gibt damit Aufschluß über die Art der gemessenen Substanz. Weitere Informationen liefert die symmetrische Aufspaltung des Absorptionsmaximum in eine Reihe von Maxima, die durch die sogenannte hyperfeine Wechselwirkung bedingt wird. Dabei handelt es sich um die Wechselwirkung des Elektrons mit benachbarten Atomkernen, die ebenfalls ein magnetisches Moment besitzen. Aus Anzahl der Aufspaltungen und Größe

der Verschiebungen können Informationen über den Aufbau der beteiligten Moleküle gewonnen werden. Schließlich ist die Fläche unter dem Resonanzsignal der Konzentration der gemessenen Substanz proportional.

Zusätzlich sind Amplitude und Breite der Spektrallinien von zwei Zeitkonstanten abhängig. Die Spin-Gitter-Relaxationszeit ( $T_1$ ) gibt an, wie schnell die durch die Absorption angeregten Elektronen wieder in den niedrigeren Energiezustand zurückspringen. Sie ist abhängig von der Stärke der Koppelung der Spins in der molekularen Umgebung. Die Spin-Spin-Relaxationszeit ( $T_2$ ) gibt an, wie schnell Elektronen mit entgegengesetztem Spin ihren Spin (und damit ihre Energie) austauschen. Je kleiner diese Zeitkonstanten sind, desto breiter und flacher fallen die gemessenen Signale aus, da die gemessene Energie eines Zustandes gemäß der Heisenbergschen Unschärferelation immer stärker streut.

Die Gesamtheit der genannten Informationen, die aus einem Absorptionsspektrum gewonnen werden können, macht die EPR-Spektrometrie zu einem sehr genauen Verfahren, das in biologischen Systemen mit Erfolg zur Bestimmung von freien Radikalen eingesetzt werden kann.

Die Untersuchung von Sauerstoffradikalen mit dieser Methode wird allerdings stark durch die Instabilität der Sauerstoffradikale erschwert. Die Toxizität der Sauerstoffradikale bedingt die Notwendigkeit ihres schnellen Abbaus in biologischen Systemen. Die Radikale werden sofort nach ihrer Entstehung wieder in weniger reaktive Verbindungen umgewandelt – bei der Zersetzung von Mikroorganismen, bei weiterführenden intrazellulären Reaktionen oder durch den Abbau über verschiedene enzymatische Reaktionen zum Schutz der eigenen Zelle. Diese Reaktionsfreudigkeit führt zu einer sehr geringen Halbwertszeit, die eine genaue quantitative Erfassung praktisch unmöglich macht.

Die Spin-Trapping-Technik bietet einen Ausweg aus diesem Problem. Bei der Verwendung dieser Methode werden sogenannte Spinfallen oder Spintrap-Moleküle benutzt, die mit den Radikalen reagieren und ein stabileres Zwischenprodukt (das Spinaddukt) bilden, das mit Hilfe der EPR-Spektrometrie erfaßt werden kann. Bei den Spintrap-Molekülen handelt es sich um diamagnetische Substanzen (meist Nitrone oder Nitrosoverbindungen), die erst in Verbindung mit einem freien Radikal ein Absorptionsspektrum erzeugen. Dieses Spektrum ist sowohl von der Art des Spintrap-Moleküls als auch von den Eigenschaften des gebundenen Radikals abhängig, wobei

insbesondere die Aufspaltung der Spektrallinien durch die hyperfeine Wechselwirkung zur Identifizierung verwendet wird.

Eine der wichtigsten Komponenten im Abwehrsystem des menschlichen Organismus bilden die Leukozyten, speziell die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, welche die überwiegende Mehrheit der zirkulierenden Leukozyten darstellen. Ihre große Zahl, ihre Mobilität und ihre hohe Sensitivität auf chemotaktische Reize versetzen sie in die Lage, schnell und in großer Anzahl am Ort einer akuten bakteriellen Infektion zu wirken. Durch Phagozytose und anschließende Abtötung der Mikroorganismen bilden sie eine wirksame erste Barriere gegen Krankheitserreger.

Die Abtötung und der Abbau der Mikroorganismen nach deren Phagozytose beruht auf sauerstoffabhängigen und sauerstoffunabhängigen Prozessen. Die sauerstoffunabhängige Freisetzung lysosomaler Enzyme hat einen wesentlichen Anteil am Abbau der Mikroben. Bei der Abtötung von Krankheitserregern kommt die entscheidende Bedeutung der Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite zu.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Verwendung der EPR-Spektroskopie mit der Spin-Trapping-Technik für die Erfassung der Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale mit Halbwertzeiten im Nano- und Mikrosekundenbereich in humanen neutrophilen Granulozyten während der Phagozytose. Insbesondere wurde die Wirkung verschiedener Stereoisomere von Retinoiden und Carotinoiden, die in der Dermatologie eingesetzt werden, auf die Kaskade von Ereignissen untersucht, die mit der sauerstoffabhängigen mikrobiziden Aktivität assoziiert ist, sowie der modulierende Einfluß von UV-Strahlung.

Für den Nachweis der freien Radikale wurden zwei Spintrap-Moleküle verwendet, die eine gleichzeitige Erfassung von Superoxidanion und Hydroxylradikal erlauben. Zur Bestimmung von Superoxidanion wurde 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO) verwendet, das mit dem Superoxidanion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) das Addukt DMPO-OOH bildet. Durch die Zugabe von DMSO stabilisiert sich dieses Addukt. Das Spintrap-Molekül  $\alpha$ -4-Pyridyl-1-oxid-N-tert-butylnitron (4-POBN) reagiert in Gegenwart von Ethanol mit sehr hoher Empfindlichkeit auf die Anwesenheit von Hydroxylradikal ( $\cdot\text{OH}$ ) mit der Bildung des Adduktes 4-POBN-CH(CH<sub>3</sub>)OH.

Retinoide und Carotinoide werden in der Dermatologie und Dermatoonkologie erfolgreich eingesetzt. Das Hauptgebiet der klinischen Anwendung von Retinoiden liegt bei der Therapie der Psoriasis (insbesondere in Kombination mit anderen Behandlungs-

modalitäten), verschiedener Genodermatosen und der schweren Akne, sie werden aber beispielsweise auch bei Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Das Carotinoid  $\beta$ -Carotin wird in der Prävention der Haut vor UV-Schädigungen zusammen mit anderen Vitaminen eingesetzt. Die Supplementierung mit  $\beta$ -Carotin in Kombination mit topischer Anwendung bildet einen effizienten Schutz gegen Entzündungsvorgänge und UV-induzierte Hautalterung.

Die biologische Aktivität der Retinoide wird u.a. durch extra- und intrazelluläre Transportproteine und Retinoidrezeptoren vermittelt. Wesentlich für ihre Wirkung ist der regulierende Einfluß, den sie auf Differenzierung und Proliferation ausüben. So verstärken die Retinoide Acitretin und Etreinat die Differenzierung der Keratinozyten und hemmen die Proliferation in der Basalzellschicht. Eine wichtige Rolle bei ihrer Wirkung spielt außerdem ihr Einfluß auf zirkulierende neutrophile Granulozyten. Dazu zählen der Einfluß auf die Migration der Neutrophilen in die Epidermis sowie immunmodulatorische und antiinflammatorische Effekte. Insbesondere wird die antioxidative Aktivität verschiedener Retinoide und Carotinoide als Mechanismus diskutiert, der der Infiltration der Epidermis durch neutrophile Granulozyten und der Freisetzung von freien Radikalen in der Haut entgegenwirkt. Für Carotinoide konnte neben der ebenfalls vorhandenen antioxidativen Wirkung auch ein direkter Einfluß auf das Immunsystem gezeigt werden. Carotinoide verstärken die Immunabwehr, indem sie die Zytotoxizität der Makrophagen gegenüber Tumorzellen erhöhen.

Die neutrophilen Granulozyten reagieren auf chemotaktische Reize, die beispielsweise bei lokalen Infektionen ausgesandt werden und sind in der Lage, das Gewebe zu infiltrieren und Infektionserreger durch Phagozytose und anschließende Abtötung zu bekämpfen. Der Abtötungsmechanismus, der während und nach der Phagozytose zum Einsatz kommt, beruht wesentlich auf der Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen. Zu Beginn der Phagozytose reagiert molekularer Sauerstoff durch Vermittlung von NADPH-Oxidase zu Superoxidanion, das seinerseits zum großen Teil spontan oder durch die Wirkung von Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid dismutiert. Wasserstoffperoxid ist ein wichtiger Reaktionspartner für weitere Reaktionen, in deren Verlauf insbesondere das Hydroxylradikal eine zentrale Rolle spielt. Das Hydroxylradikal hat eine direkte mikrobizide Wirkung auf die phagozytierten Erreger und wird im wesentlichen über zwei voneinander unabhängige Reaktionswege gebildet. Bei der Haber-Weiss-Reaktion entsteht Hydroxylradikal aus Wasserstoffperoxid bei gleichzeitiger Reduktion von Superoxidanion zu molekularem Sauerstoff, wobei

Eisenionen als Katalysator auftreten. Bei der Myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Chlorid-Reaktion reagiert Wasserstoffperoxid mit Chlorid zu dem hochreaktiven Hypochlorit, wobei das Enzym Myeloperoxidase als Katalysator wirkt. Das gebildete Hypochlorit kann außerdem mit dem Superoxidanion zu Hydroxylradikal reagieren.

Die zur Untersuchung verwendeten neutrophilen Granulozyten wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus peripher-venösem heparinisiertem Blut von Blutspendern, von Patienten mit *Psoriasis vulgaris* (Schuppenflechte) sowie von Probanden im Rahmen einer Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie gewonnen. Die Stimulation der neutrophilen Granulozyten erfolgte durch Zusatz von opsoniertem Zymosan.

Parallel zu den Radikalmessungen an Granulozyten untersuchten wir den Einfluß von Retinoid- und Carotinoid-Isomeren auf die Oxidationsreaktion von Hypoxanthin zu Harnsäure im nicht-zellulären Xanthin/Xanthinoxidase-System, bei der Wasserstoffperoxid und Superoxid freigesetzt werden. Dadurch konnten wir Aussagen über die rein antioxidativen Wirkungen der Retinoide sowie über den direkten Einfluß der Retinoid- und Carotinoid-Isomere auf die eisenabhängige Haber-Weiss-Reaktion gewinnen, die zur Bildung von Hydroxylradikal aus Wasserstoffperoxid und Superoxidradikal führt.

Aus den Ergebnissen der Untersuchung von Retinoiden der ersten Generation (13-*cis*- und 9-*cis*-Retinsäure) im Xanthin/Xanthinoxidase-System ist eine deutliche antioxidative Aktivität dieser Retinoide zu erkennen, sowohl in Bezug auf Superoxidanion als auch in Bezug auf Hydroxylradikal. Bei der Untersuchung der gleichen Retinoide in stimulierten neutrophilen Granulozyten war der Effekt weniger eindeutig. Während die Zugabe von 13-*cis*-Retinsäure eine signifikante Verminderung der Produktion von Superoxidanion bewirkte, hatte der Zusatz von 9-*cis*-Retinsäure sowie der ebenfalls getesteten all-*trans*-Retinsäure eine leichte Erhöhung der Superoxidanionproduktion zur Folge, die bei niedrigeren Konzentrationen stärker ausgeprägt war. Auf die Bildung von Hydroxylradikal in den Granulozyten wirkte keine der getesteten Substanzen signifikant.

Ähnliche Ergebnisse wurden für die untersuchten Retinoide der zweiten Generation gefunden. Das in der Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion zugegebene Acitretin bewirkte eine deutliche Verminderung der gebildeten Radikale, während die Zugabe von Acitretin zu den stimulierten Granulozyten eine Erhöhung der Produktion von Superoxidanion insbesondere bei niedrigen Konzentrationen bewirkte. Der Einfluß der an-

deren beiden Retinoide der zweiten Generation auf die Radikalproduktion in stimulierten Granulozyten war nicht signifikant. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, daß die *in vitro* zu beobachtende antioxidative Wirkung der Retinoide während der Phagozytose von anderen, teilweise entgegengesetzten, Wirkungen überlagert wird. Diese unterschiedlichen und konzentrationsabhängigen Wirkungen von Retinoiden können im therapeutischen Einsatz von Bedeutung sein. Bei niedrigen Konzentrationen wird die Phagozytose und die mikrobizide Aktivität im entzündeten Gewebe unterstützt, gleichzeitig aber eine antioxidative Wirkung auf freigesetzte Radikale in der Umgebung ausgeübt und damit weiterer Schaden durch die erhöhte Radikalbildung verhindert.

Die Untersuchungen zur Bildung von Sauerstoffradikalen in neutrophilen Granulozyten von gesunden Probanden und von Patienten mit *Psoriasis vulgaris* bei Zusatz verschiedener Substanzen, die die hierfür relevanten Reaktionswege beeinflussen, ergaben, daß sich die gemessenen Werte für die Psoriasispatienten deutlich von den Werten für gesunde Probanden unterschieden. Bei Zugabe von Katalase, Natriumazid und insbesondere von Eisenionen waren die gemessenen Veränderungen der Radikalproduktion bei Psoriasispatienten deutlich stärker ausgeprägt. Das deutet auf eine Verschiebung bei den Reaktionen hin, die zur Radikalbildung führen. Als Ursache können eine Reihe von biochemischen Veränderungen angenommen werden. Dazu zählen die verminderte Verfügbarkeit von Superoxidanion aufgrund der verminderten Aktivität der NADPH-Oxidase oder eines erhöhten Verbrauch von NADPH in den Entzündungsprozessen, eine verminderte Aktivität der SOD und der Myeloperoxidase sowie die erhöhte Bindung von dreiwertigem Eisen durch eisenbindende Proteine wie Lactoferrin.

Einige Patienten mit *Psoriasis vulgaris* wurden in einer Paralleluntersuchung zur Wirkung von Retinoiden im Rahmen einer Acitretin/PUVA-Kombinationstherapie in Zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten untersucht. Die geringe Zahl der untersuchten Patienten sowie Unterschiede in Stadium und Verlauf der Krankheit erschweren allerdings eine statistisch relevante Aussage über die Ergebnisse der Messungen. Da der Therapieansatz individuell an jeden Patienten angepaßt wurde, waren auch die Dosierung von UV-Strahlung und Retinoidgabe nicht identisch, was Aussagen über die Ergebnisse weiter erschwert. Entsprechend konnte kein signifikanter Einfluß der Therapie auf die Radikalbildung gefunden werden. Bei den meisten Messungen war aber eine deutliche Tendenz zu einer Verminderung der Radi-

kalbildung 2 – 3 Wochen nach Therapiebeginn auszumachen. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muß auch berücksichtigt werden, daß der verwendete Photoaktivator (Psoralen) ebenfalls Wirkungen auf die Membranen und die Freisetzung von Radikalen hat, die sich nicht von den Wirkungen des Retinoids trennen lassen. Wenn man außerdem die Ergebnisse der Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie zur Wirkung von  $\beta$ -Carotin gegen UV-Schädigungen in neutrophilen Granulozyten in Betracht zieht, bei der unter analogen Bedingungen, aber ohne Einsatz von Psoralen, ein protektiver Effekt nachgewiesen werden konnte, dann ist eine protektive Wirkung von Acitretin ebenfalls wahrscheinlich.

Die Untersuchungen des Einflusses verschiedener Carotinoide auf die Freisetzung von Radikalen in stimulierten neutrophilen Granulozyten sowie im Xanthin/Xanthinoxidase-System zeigten ähnliche Ergebnisse wie die analogen Untersuchungen der Retinoide. Während die Carotinoide in der Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion einen hemmenden (*all-trans*- $\beta$ -Carotin) oder keinen signifikanten Einfluß auf die Radikalbildung hatten, war die Situation bei den Messungen in stimulierten neutrophilen Granulozyten komplexer. So wurde die Produktion von Superoxidanion erhöht (*all-trans*- $\beta$ -Carotin), vermindert (13-*cis*- $\beta$ -Carotin), oder konzentrationsabhängig erhöht oder vermindert (9-*cis*- $\beta$ -Carotin). Ähnlich wie bei den Retinoiden sind hier jedem Isomer spezifische Aktivitäten zugeordnet. Dabei sollte auch in Betracht gezogen werden, daß die UV-Strahlung die Transisomerisierung von Carotinoiden und Retinoiden in Richtung der 13-*cis*-Isomere bevorzugt.

In der bereits erwähnten Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie untersuchten wir die Wirkung einer oralen Supplementierung mit  $\beta$ -Carotin auf die Radikalbildung in stimulierten neutrophilen Granulozyten von Probanden während und nach einer kontrollierten UV-Bestrahlung. Während bei der Placebo-Gruppe ein deutlicher Abfall der Radikalbildung zu beobachten war, der offensichtlich durch die UV-Schädigung der neutrophilen Granulozyten verursacht wurde, war die Radikalbildung bei der  $\beta$ -Carotin-supplementierten Gruppe im Vergleich zu den Anfangswerten erhöht. Das zeigt eine protektive Wirkung von  $\beta$ -Carotin in Bezug auf die Fähigkeit der neutrophilen Granulozyten zur Radikalbildung. Auch der gemessene Abfall des  $\beta$ -Carotin-Serumspiegels während der Bestrahlungsphase deutet auf eine Hemmung der UVA-vermittelten photooxidativen Reaktionen, die zu einer erhöhten Freisetzung von Radikalen führt. Die Rückkehr zu Normalwerten in der Radikalproduktion nach Bestrah-

lungsende bei  $\beta$ -Carotin-supplementierten Patienten korreliert gut mit dem Rückgang UV-bedingter Schädigungen wie der Erythembildung.

In unserer Arbeit ist es uns gelungen, die Wirkung der Retinoide und Carotinoide sowohl in einem zellulären als auch in einem nicht-zellulären System zu analysieren. Wir untersuchten diese Substanzen in Verbindung mit der UV-Strahlung im Rahmen einer therapeutischer Behandlung sowie mit sonnenlichtähnlicher Strahlung. Diese Aspekte sind in der dermatologischen Kombinationstherapie von starker Relevanz und wurden bisher wenig untersucht. Die Rolle der Protektion gegen UV-Schädigungen nimmt durch veränderte Umweltbedingungen und Kulturverhalten der Europäer weiter zu.

Offene Fragen bleiben in Hinsicht auf den genauen Verlauf der photooxidativen Prozesse auf molekularer Ebene sowie die Wirkung dieser Substanzen in anderen Zellsystemen (Keratinocyten, Langerhans-Zellen). Interessant wäre auch die Suche nach neuen wirksamen Antioxidanten oder die Kombination von  $\beta$ -Carotin mit anderen Wirkstoffen, um einen effizienteren Schutz zu gewährleisten.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Almond-Roesler, B., C. E. Orfanos: Trans-Acitreten wird in Etretenat rückmetabolisiert. Bedeutung für die orale Retinoidtherapie. *Hautarzt* 47, 173 – 177 (1996)
2. Almond-Roesler, B., U. Blume-Peytavi, S. Bisson, M. Krahn, E. Rohloff, C. E. Orfanos: Monitoring of isotretinoin therapy by measuring the plasma levels of isotretinoin and 4-oxo-isotretinoin. A useful tool for management of severe acne. *Dermatology* 196, 176 – 181 (1998)
3. Andersson, E., I. Rosdahl, H. Torma, A. Vahlquist: Ultraviolet irradiation depletes cellular retinol and alters the metabolism of retinoic acid in cultured human keratinocytes and melanocytes. *Melanoma Res.* 9, 339 – 46 (1999)
4. Apfel, C., M. Crettaz, G. Siegenthaler, W. Hunziker: Synthetic retinoids: differential binding to retinoic acid receptors. In: Saurat, J.-H. (eds): *Retinoids: 10 years on*, pp. 110 – 120, Retinoid Symposium Karger Basel 1990
5. Ashcroft, D. M., A. Li Wan Po, C. E. Griffiths: Therapeutic strategies for psoriasis. *J. Clin. Pharm. Ther.* 25, 1 – 10 (2000)
6. Baolu, Z., L. Xiaojie, H. Rungen, J. Wenying, X. Wenjuan: ESR studies on oxygen consumption during the respiratory burst of human polymorphonuclear leukocytes. *Cell. Biol. Int.* 13, 317 – 323 (1989)
7. Basu, T. K., N. B. Temple, A. M. Hodgson: Vitamin A, betacarotene and cancer. *Prog. Clin. Biol. Res.* 25, 217 – 228 (1988)
8. Bauer, R., C. E. Orfanos: Impaired motility and random migration of vital polymorphonuclears *in vitro* after therapy with oral aromatic retinoid in psoriasis. *Int. J. Dermatol.* 1, 72 – 77 (1984)
9. Bednar, M., M. Balazy, M. Murphy, C. Booth, S. Fuller, A. Barton, J. Bingham, L. Golding, C. Gross: Peroxynitrite augments fMLP-stimulated chemiluminescence by neutrophils in human whole blood. *J. Leukoc. Biol.* 60, 619 – 624 (1996)
10. Bellag, W.: Vitamin A and retinoids: from nutrition to pharmacotherapy in dermatology and oncology. *Lancet* 1, 860 (1983)
11. Bendich, A.: Beta carotene and the immune response. *Proc. Nutr. Soc.* 50, 263 – 274 (1991)
12. Berne, B., O. Rollmann, A. Vahlquist: UV-induced isomerization of oral retinoids *in vitro* and *in vivo* in hairless mice. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 7, 146 – 152 (1990)
13. Beursken, T., A. Chang, P. E. J. van Erp, P. C. M. van de Kerkhof: Epidermal proliferation and accumulation of polymorphonuclear leucocytes in the psoriatic lesion. *Dermatologica* 178, 67 – 72 (1989)

14. Biesalski, H. K., C. Hemmes, W. Hopfenmüller, S. C. Chun, H. Gollnick: Effects of controlled exposure of sunlight on skin levels of beta carotene. *Free Radic. Res.* 24, 215 – 218 (1996)
15. Bischoff, R., E. M. de Jong, H. F. C. Rulo: Topical application of 13-cis-retinoic acid in the treatment of chronic plaques psoriasis. *Clin. Exp. Dermatol.* 17, 9 – 12 (1992)
16. Black, C., J. Cook, A. Russo, A. Samuni: Superoxide production by stimulated neutrophils: temperature effect. *Free Radic. Res.* 12, 27 – 37 (1991)
17. Black, H. S., G. Okotie-Eboh, J. Gerguis: Diet potentiates the UV-carcinogenic response to beta-carotene. *Nutr. Cancer*, 37, 173 – 178 (2000)
18. Blaner, W. S., J. A. Olson: Retinol and retinoic acid metabolism. In: Sporn M. B., Roberts A. B., Goodman D. S. (eds.): *The retinoids. Biology, chemistry and medicine*, pp. 229 – 255, 2nd edition Raven press New York 1994
19. Bohne, M., H. Struy, A. Gerber, H. Gollnick: Effects of retinoids on the generation of neutrophil-derived reactive oxygen species studied by EPR spin trapping techniques. *Inflamm. res.* 46, 423 – 424 (1997)
20. Bohne, M., H. Struy, A. Gerber, H. Gollnick: Protection against UVA damage and effects on neutrophil-derived reaktive oxygen species by  $\beta$ -carotene. *Inflamm. res.* 46, 425 – 426 (1997)
21. Bourguet, W., M. Ruff, P. Chambon, H. Gronemayer, O. Meras: Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXA- $\alpha$ . *Nature*, 375 (1995)
22. Britigan, B., T. Coffman, D. Adelberg, M. Cohen: Mononuclear phagocytes have the potential for sustained hydroxyl radical production. *J. Exp. Med.* 168, 2367 – 2372 (1988)
23. Britigan, B., T. Coffman, G. Buettner: Spin trapping evidence for the lack of significant hydroxal radical production during the respiration burst of human phagocytes using a spin adduct resistant to superoxide-mediated destruction. *J. Biol. Chem.* 265, 2650 – 2656 (1990)
24. Britigan, B., M. S. Cohen, G. M. Rosen: Detection of the production of oxygen-centered free radicals by human neutrophils using spin trapping techniques: A critical perspective. *J. Leukoc. Biol.* 41, 349 – 362 (1987)
25. Britigan, B., D. Hamill: The interaction of 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide with human myeloperoxidase and its potential impact on spin trapping of neutrophil-derived free radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 275, 72 – 81 (1989)
26. Britigan, B., D. Hamill: Effect of the spin trap 5,5-DMPO on human neutrophil function: novel inhibition of neutrophil stimulus-response coupling? *Free Radic. Biol. Med.* 8, 459 – 470 (1990)

27. Britigan, B., D. Hasset, G. Rosen, D. Hamill, M. Cohen: Neutrophil degranulation inhibits potential hydroxyl-radical formation. *Biochem. J.* 264, 447 – 455 (1989)
28. Britigan, B., T. Roeder, G. Buettner: Spin traps inhibit formation of hydrogen peroxide via the dismutation of superoxide: implications for spin trapping the hydroxyl free radical. *Biochem. Biophys. Acta* 1075, 213 – 222 (1991)
29. Britigan, B., G. Rosen, Y. Chai, M. Cohen: Do human neutrophils make hydroxyl radical? *J. Biol. Chem.* 261, 4426 – 4431 (1986)
30. Britigan, B., G. Rosen, B. Thompson, Y. Chai, M. Cohen: Stimulated human neutrophils limit iron-catalyzed hydroxyl radical formation as detected by spin-trapping techniques. *J. Biol. Chem.* 261, 17026 – 17032 (1986)
31. Buettner, G.: The spin trapping of superoxide and hydroxyl free radicals with DMPO (5,5-Dimethylpyrroline-N-oxide): more about iron. *Free Radic. Res.* 19, 79 – 87 (1993)
32. Buettner, G., B. Jurkiewicz: Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 49 – 55 (1993)
33. Buettner, G., R. Mason: Spin-trapping for detecting superoxide and hydroxyl free radicals *in vitro* and *in vivo*. *Methods Enzymol.* 186, 127 – 133 (1990)
34. Burkitt, M.: ESR spin trapping studies into the nature of the oxidizing species formed in the Fenton reaction: Pitfalls associated with the use of 5,5-DMPO in the detection of the hydroxyl radical. *Free Radic. Res.* 18, 43 – 57 (1993)
35. Byers, T.: Diet  $\beta$ -carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu. Rev. Nutr.* 12, 139 – 159 (1992)
36. Camisa, C., G. Weissmann: The effects of retinoids on neutrophil functions *in vitro*. *J. Am. Acad. Dermatol.* 6, 620 (1982)
37. Camisa, C.: Psoriasis: a clinical update on diagnosis and new therapies. *Cleve. Clin. J. Med.* 67, 105– 119 (2000)
38. Candeias, L., K. Patel, M. Stratford, P. Wardman: Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEBS Lett.* 333, 151 – 153 (1993)
39. Carbonare, M. D., A. Pathak: Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. *J. Photochem. Photobiol.* 14, 105 – 124 (1992)
40. Chamulitrat, W., M. Cohen, R. Mason: Free radical formation from organic hydroperoxides in isolated human polymorphonuclear neutrophils. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 439 – 445 (1991)
41. Chen, H., L. Privalsky: Cooperative formation of high-order oligomers by retinoid X receptors: An unexpected mode of DNA recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 422 – 426 (1995)

42. Christophers, E.: What does epidemiology tell us about disease mechanisms in psoriasis? *Clin. Exp. Dermatol.* 25, 164 (2000)
43. Christophers, E.: The immunopathology of psoriasis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 110, 199 – 206 (1996)
44. Cohen, M.: Molecular events in the activation of human neutrophils for microbial killing. *Clin. Infect. Dis.* 18, 170 – 179 (1994)
45. Cohen, M., B. Britigan, Y. Chai, S. Pou, T. Roeder, G. Rosen: Phagocyte-derived free radicals stimulated by ingestion of iron-rich *Staphylococcus aureus*: a spin trap study. *J. Infect. Dis.* 163, 819 – 824 (1991)
46. Cunliffe, W. J., A. M. Layten: Guidelines for optimal use of isotretinoin in acne. *J. Am. Acad. Dermatol.* 27, 2 – 7 (1992)
47. Cunliffe, W. J., P.C. van de Kerkhof, R. Caputo, S. Cavicini, A. Cooper, O. L. Fyrand, H. Gollnick, A. M. Layton, J. J. Leyden, J. M. Mascaró, J. P. Ortonne, A. Shalita: Roaccutane treatment guidelines: results of an international survey. *Dermatology* 194, 351 – 357 (1997)
48. Di Mascio, P., S. Kaiser, H. Sies: Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 532 – 538 (1989)
49. Di Mascio, P., M. E. Murphy, H. Sies: Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 194 – 200 (1991)
50. Dogan, P., Ü. Soyuer, G. Tanrikulu: Superoxide dismutase and myeloperoxidase activity in polymorphonuclear leucocytes, and serum ceruloplasmin and copper levels, in psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 120, 239 – 244 (1989)
51. Dragnev, K. H., J. R. Rigas, E. Dmitrovsky: The retinoids and cancer prevention mechanisms. *The Oncologist* 5, 361 – 368 (2000)
52. Dubertret, L., C. Chastang, R. Touraine: Maintenance treatment of psoriasis by Tigason: A double-blind randomized clinical trial. *Br. J. Dermatol.* 113, 323 – 320 (1985)
53. Dubertret, L.: Skin and environment. *C. R. Acad. Sci.* 323, 629 – 632 (2000)
54. Elias, P. M., M. L. Williams: Retinoids, cancer and the skin. *Arch. Dermatol.* 117, 160 – 180 (1981)
55. Evans, C. A.: Spin trapping. *Aldrichimica Acta* 12, 23 – 29 (1979)
56. Fisher, G. J., H. S. Talwar, J.-H. Xiao, S. C. Datta, A. P. Reddy, M.-P. Gaub, C. Rochetta-Egly, P. Chambon, J. J. Voorhees: Immunological identification and functional quantitation of Retinoic Acid and Retinoid X Receptor protein in human skin. *J. Biol. Chem.* 269, No 32, 20629 – 20635 (1994)
57. Francz, P. I., J. Conrad, A. K. Greul, H. K. Biesalski: Klinisch experimentelle Ergebnisse der Anwendung von Betakarotin zum UV-Schutz. *Kosmetische Medizin* 19 Ausgabe 4 Okt (1998)

58. Fuchs, J., L. Packer: Electron paramagnetic resonance in dermatologic research with particular reference to photodermatology. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 7, 229 – 232 (1990)
59. Fuchs, J.: Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and  $\beta$ -carotene in cutaneous photoprotection. *Free Radic. Biol. Med.*, 25, 848 – 973 (1998)
60. Fumarulo, R., M. Conese, S. Riccardi, D. Giordano, P. Montemorro, M. Colucci, N. Semeraro: Retinoids inhibit the respiratory burst and degranulation of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Agents and Actions* 34, 339 – 344 (1991)
61. Gasparro, F. P.: PUVA improvements will come from molecular biology. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 16, 83 – 84 (2000)
62. Gasparro, F. P., B. Liao, P. J. Foley, X. M. Wang, J. M. McNiff: Psoralen photochemotherapy, clinical efficacy, and photomutagenicity: the role of molecular epidemiology in minimizing risks. *Environ. Mol. Mutagen.* 31, 105 – 112 (1998)
63. Gerber, A., M. Bohne, J. Rasch, H. Struy, S. Ansorge, H. Gollnick: Apoptosis of lymphocytes is a possible mechanism of extracorporeal photoimmunotherapy. *Dermatology* 201, 111 – 117 (2000)
64. Gergely, P., L. Csaky, P. Gonzalez-Cabello: Immunological effects of retinoids. *J. Exp. Clin. Med.* 15, 235 – 239 (1990)
65. Gollnick, H.: Acitretin in psoriasis: an update. In: Saurat J.-H. (ed.): *Retinoids: 10 years on*, pp. 204 – 213, Retinoid Symposium Karger Basel, 1991
66. Gollnick, H.: Oral retinoids – efficacy and toxicity in psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 135, 6 – 17 (1996)
67. Gollnick, H.: The use of retinoids and betacarotene in the treatment and prevention of precancerous, cancerous and lymphomatous lesions of the skin. *Retinoids*, 13, 6 – 12 (1997)
68. Gollnick, H., W. Hopfenmüller, C. Hemmes, S. C. Chun, C. Schmidt, K. Sundermeier, H. K. Biesalski: Systemic beta carotene plus topical UV-sunscreen are an optimal protection against harmful effects of natural UV-sunlight: results of the Berlin-Eliath study. *Eur. J. Dermatol.* 6, 200 – 205 (1996)
69. Gollnick, H., S. Kirsten: Retinoide – wo stehen wir heute? *Haut und Gesundheit*, 71, 442 – 452 (1996)
70. Gollnick, H., C. E. Orfanos: Clinical efficacy of etretinate and acitretin: european experience. In: Roenigk H. H. Jr., Maibach H. I. (eds.): *Psoriasis 2nd edn.*, pp. 725 – 748, Marcel Dekker, New York 1991
71. Gollnick, H., C. E. Orfanos: Theoretical aspects of the use of retinoids as anticancer agents. In: Marks R. (ed.): *Retinoids in cutaneous malignancy*, pp. 41 – 65, Blackwell Science, Oxford 1991

72. Gollnick, H., A. Menter: Combination therapy with tazarotene plus a topical corticosteroid for the treatment of plaque psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 140, 18 –23 (1999)
73. Gottlieb, A., J. G. Krueger, R. Bright, M. Ling, M. Lebwohl, S. Kang, S. Feldmann, M. Spellmann, K. Wittkowski, H. D. Ochs, P. Jardiou, R. Bauer, M. White, R. Dedrick, M. Garovoy: Effects of administration of a single dose of a humanized monoclonal antibody to CD11a on the immunobiology and clinical activity of psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 42, 428 – 435 (2000)
74. Grady, J., Y. Chen, D. Chasteen, D. Harris: Hydroxyl radical production during oxidative deposition of iron in ferritin. *J. Biol. Chem.* 264, 20224 – 20229 (1989)
75. Griffiths, E. M., C. M. Ditre, C. N. Ellis, J. J. Voorhees: Topical retinoic acid in the treatment of photodamage. In: Marks R. (ed.): *Retinoids in Cutaneous Malignancy*, pp. 87 – 101, Blackwell Science Oxford 1991
76. Grupper, C. H., B. Beretti: Retinoid combinations. In: Roenigk H. H. Jr., Maibach H. I. (eds.): *Psoriasis*, pp. 775 – 782 2nd edn., Marcel Dekker, New York 1991
77. Guilhaou, J.: Immunopathogenesis of psoriasis: news in an old concept. *Dermatology* 197, 310 – 312 (1998)
78. Guthrie, L. A., L. McPhail, P. M. Henson, R. B. Jr. Johnston: Priming of neutrophils for an enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharides. *J. Exp. Med.* 160, 1656 – 1671 (1984)
79. Halliwell, B., M. C. Gutteridge: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* 186, 1 – 14 (1990)
80. Hansen, L. A., C. C. Siegmann, F. Andreola, S. A. Ross, G. J. Kellof, L. M. De Luca: Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis* 21, 1271 – 1279 (2000)
81. Haydey, R. P., M. L. Reed, L. M. Dzubow, J. L. Shurpack: Treatment of keratoacanthomas with oral 13-cis-retinoic acid. *N. Engl. J. Med.* 303 – 560 (1980)
82. Herlin, T., N. Borregaard: Increased rate of opsonization of zymosan by serum from patients with psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.* 273, 343 – 345 (1982)
83. Higaki, S., T. Kitagawa, M. Kagoura, M. Morohashi, T. Yamagishi: Correlation between *Propionibacterium acnes* biotypes, lipase activity and rash degree in acne patients. *J. Dermatol.* 27, 519 – 522 (2000)
84. Hiramatsu, M., L. Packer: Antioxidant activity of retinoids. *Methods Enzymol.* 190, 273 – 280 (1990)
85. Hong, W. K., S. M. Lippman, L. M. Itri: Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Eng. J. Med.* 323, 795 – 801 (1990)

86. Hönigsmann, H., P. C. Calzavara-Pinton, B. Ortel: Phototherapy and Photochemotherapy. In: Dubertret L. (ed.): Psoriasis, pp. 135 – 150, JSED Brescia 1994
87. Iest, J., J. Boer: Combined treatment of psoriasis with acitretin and UVB phototherapy compared with acitretin alone and UVB alone. *Br. J. Dermatol.* 120, 665 – 670 (1989)
88. Jackson, S., M. Stark, C. Rowlands, J. Evans: Electron spin resonance detection of oxygen-centred radicals in murine macrophages stimulated with bacterial endotoxin. *Free Radic. Biol. Med.* 7, 165 – 170 (1989)
89. Jansen, H. H., A. Mahfoudi, S. Rambaud, C. Lavau, W. Wahli, A. Dejean: Multimeric complexes of the PML-retinoic acid receptor fusion protein in acute promyelocytic leukemia cells and interference with retinoic and peroxisome-proliferator signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 7401 – 7405 (1995)
90. Johnson, A., R. A. S. Chandraratna: Novel retinoids with receptor selectivity and functional selectivity. *Br. J. Dermatol.* 140, 12 – 17 (1999)
91. Kähler, S., E. Christophers, J.-M. Schröder: Plasma lactoferrin reflects neutrophil activation in psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 119, 189 – 293 (1988)
92. King, C., M. Jefferson, E. Thomas: Secretion and inactivation of myeloperoxidase by isolated neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 61, 293 – 302 (1997)
93. Knight, J. A.: Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30, 145 – 158 (2000)
94. Knowles, P., D. Marsh, H. Rattle: Magnetic resonance. In: *Magnetic resonance of biomolecules*, Verlag J. Wiley & Sons, pp. 189 – 220, New York (1976)
95. Kornhauser, A., W. Wamer, A. Giles: Protective effect of beta carotene against psoralen phototoxicity: relevance to protection against carcinogenesis. *Basic Life Science* 39, 465 – 481 (1986)
96. Kragballe, K., C. T. Jansen, J. M. Geiger, J. R. Bjerke, E. S. Falk, N. Hjorth, J. Lauharana, N. J. Mork, T. Reunala, K. Rosen, H. Schmidt, P. O. Thune, C. Vahlquist: A double-blind comparison of acitretin and etretinate in the treatment of severe psoriasis. *Acta Derm. Venereol. (Stockh.)* 69, 35 – 40 (1989)
97. Krinsky, N. I.: Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic. Biol. Med.*; 76, 617 (1989)
98. Krutmann, J.: Neue Entwicklungen in der Phototherapie. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 125, 871 – 874 (2000)
99. Langner, A., E. Christophers: Leukocyte chemotaxis after *in vitro* treatment with 8-methoxypsoralen and UVA. *Arch. Dermatol. Res.* 260, 51 – 55 (1977)
100. Langner, A., V. Stapór, H. Wolska: Combined treatment of chronic plaque psoriasis with etretinate and topical 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J. Dermatol. Treat.* 6, 53 (1995)

101. Laskin, J. D., H. Mersmelstein, N. Heindel, Y. Ron: Selective inactivation of lymphocytes after psoralen/ultraviolet light (PUVA) treatment without affecting systemic immune responses. *J. Leukoc. Biol.* 54, 138 – 144 (1991)
102. Lawson, N. D., N. Berliner: Neutrophil maturation and the role of retinoic acid. *Exp. Hematol.* 27, 1355 – 1367 (1999)
103. Lebwohl, M.: Advances in psoriasis therapy. *Dermatol. Clin.* 18, 13 – 19 (2000)
104. Lehmann, P. A., W. R. Jr. Henderson: Retinoid-induced inhibition of eosinophil LTC<sub>4</sub> production. *Prostaglandins*, 39, 569 – 574 (1990)
105. Lehrer, R., T. Ganz, M. Selsted, B. Babior, J. Curnutte: Neutrophils and host defense. *A. Int. Med.* 109, 127 – 142 (1988)
106. Lippman, S. M., R. Lotan: Advances in the development of retinoids as chemopreventive agents. *J. Nutr.* 130, 479 – 482 (2000)
107. Lloyd, R. V., P. Hanna, R. Mason: The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 885 – 888 (1997)
108. Lloyd, R. V., R. Mason: Evidence against transition metal-independent hydroxyl radical generation by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 256, 16733 – 16736 (1990)
109. Lowe, N. J.: Systemic retinoid therapy. In: Weinstein G. D., Gottlieb A. B., (eds.): *Therapy of Moderate-to-Severe Psoriasis*, pp. 94 – 105, National Psoriasis Foundation Portland 1993
110. Lundin, A., L. Hakansson, R. Hällgren, G. Michaelsson, P. Venge: Studies on the phagocytic activity of the granulocytes in psoriasis and palmoplantar pustulosis. *Br. J. Dermatol.* 109, 539 – 547 (1983)
111. Magis, N. L., J. J. Blummel, P. C. van de Kerkhof, R. M. Gerritsen: The treatment of psoriasis with etretinate and acitretin: a follow up of actual use. *Eur. J. Dermatol.* 10, 517 – 521 (2000)
112. Meyskens, F. L. Jr.: Retinoids for the management of human cancer: Discovered and rediscovered. In: Livera M. A., Vidali G. (eds.): *Retinoids: From Basic Science to Clinical Applications*, pp. 367 – 383, Birkhäuser Verlag Basel 1994
113. Mizuno, N., H. Enami, K. Esaki: Effect of 8-methoxypsoralen plus UVA on psoriasis leucotactic factor. *J. Invest. Dermatol.* 72, 64 – 66 (1979)
114. Morenz, J.: Sauerstoffabhängige Mikrobizidiemechanismen der neutrophilen Granulozyten. *Wiss. Z. Humboldt-Univ. Berlin* 35, 23 – 27 (1986)
115. Morris, J., C.W. Trenam, J. R. Earl: Reactive oxygen species in skin inflammation. In: Blake D., Winyard P. G. (eds.): *Immunopharmacology of Free Radical Species*, pp. 113 – 124, Academic Press Ltd. 1995
116. Mrowietz, U., K. Zhu, E. Christophers: Treatment of severe psoriasis with anti-CD25 monoclonal antibodies. *Arch. Dermatol.* 136, 675 – 676 (2000)

117. Nagao, A., J. A. Olson: Enzymatic formation of 9-*cis*, 13-*cis*, and all-*trans* retinals from isomers of  $\beta$ -carotene. *FASEB J.* 8, 968 – 973 (1994)
118. Nagpal, S., R. A. Chandraratna: Recent developments in receptor-selective retinoids. *Curr. Pharm. Res.* 6, 919 – 931 (2000)
119. Nakamura, K., S. Imakado, M. Takizawa, M. Adachi, M. Sugaya, M. Wakugawa, A. Asahina, K. Tamaki: Exacerbation of pustulosis palmaris et plantaris after topical application of metals accompanied by elevated levels of leukotriene B<sub>4</sub> in pustules. *J. Am. Dermatol.* 42, 1021 – 1025 (2000)
120. Norris, D. A., M. D. Tonnesen: Isotretinoin produces significant inhibition of monocyte and neutrophil chemotaxis *in vivo* in patients with cystic acne. *J. Invest. Dermatol.* 89, 38 – 43 (1987)
121. Ogura, R., H. Ueta, M. Sugiyama, T. Hidaka: Distribution of superoxide dismutase activity in the epidermis: measurement with electron spin resonance trapping. *J. Invest. Dermatol.* 94, 227 – 229 (1990)
122. Olson, J. A.: Carotenoids and human health. *Arch. Latinoam. Nutr.* 49, 7 – 11 (1999)
123. Orfanos, C. E., R. Ehlert, H. Gollnick: The retinoids. A review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs* 34, 459 – 503 (1987)
124. Orfanos, C. E., R. Stadler, H. Gollnick, D. Tsambaos: Current developments of oral retinoid therapy with three generations of drugs. In: Orfanos, C. E. (ed.): *Recent development in Clinical Research. Curr. Probl. Derm.* 13, pp. 33 – 49, Karger Basel 1985
125. Orfanos, C. E., C. C. Zouboulis: Oral retinoids in the treatment of seborrhoea and acne. *Dermatology* 196, 140 – 147 (1998)
126. Ortonne, J.-P.: Aetiology and pathogenesis of psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 135, 1 – 5 (1996)
127. Ortonne, J.-P.: Recent developments in the understanding of the pathogenesis of psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 140, 1 – 7 (1999)
128. Packer, L., B. Ames, K. Davies, B. Halliwell, E. Niki, W. Pryor, H. Sies: Oxygen radicals in biological systems. *Methods Enzymol.* 233, 241 – 269 (1992)
129. Palozza, P., S. Moualla, N. I. Krinsky: Antioxidant activity of carotenoids. *Free Radic. Biol. Med.* 13, 127 – 137 (1992)
130. Paslin, D.: Psoriasis without neutrophils. *Int. J. Dermatol.* 29, 37 – 40 (1990)
131. Parkar, S., P. Coburn, C. Lawrence: A randomised double-blind comparison of PUVA-etretinate and PUVA-placebo in the treatment of chronic plaque psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 110, 215 – 220 (1984)
132. Parkinson, D. R., M. A. Smith: Retinoid therapy for acute promyelocytic leukemia: A coming of age for the differentiation therapy of malignancy. *Ann. Int. Med.* 117 (4), 338 – 339 (1992)

133. Peters, B. P., F. G. Weissmann, M. A. Gill: Pathophysiology and treatment of psoriasis. *A. J. Health Syst. Pharm.* 57, 645 – 659 (2000)
134. Phillips, W. G., S. M. Breathnach: Psoriasis: Immune indicators and treatment. *Clin. Immunother.* 1, 157 – 167 (1994)
135. Pigatto, P.D., R. Riva, A. F. Finzi: Effects of etretinate on the neutrophil chemotaxis in pustular and vulgar psoriasis. Symposium on Retinoids, 16<sup>th</sup> International Congress of Dermatology Tokyo (1982)
136. Pilkington, T., R. Brogdan: Acitretin: A review of its pharmacology and therapeutic use. *Drugs* 43, 597 – 627 (1992)
137. Plewig, G., T. Jansen: Acneiform dermatoses. *Dermatology* 196, 102 – 107 (1998)
138. Plewig, G., J. Nikolowski, H. H. Wolff: Action of isotretinoin in acne, rosacea and gram-negative folliculitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 6, 766 – 785 (1982)
139. Plewig, G., A. Wagner, O. Braun-Falco: Orale Behandlung schwerster Akneformen mit 13-cis-Retinsäure. *München Med. Wochenschr.* 122, 1287 – 1293 (1980)
140. Pou, S., M. Cohen, B. Britigan, G. Rosen: Spin-trapping and human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 264, 12299 – 12302 (1989)
141. Pou, S., M. Peric, H. Halpern, G. Rosen: Use of a low-frequency ESP spectrometer: implications for spin-trapping free radicals, in situ. *Free Radic. Res.* 12, 39 – 46 (1991)
142. Pou, S., C. Ramos, T. Gladwell, E. Renks, M. Centra, D. Young, M. Cohen, G. Rosen: A kinetic approach to the selection of a sensitive spin trapping system for the detection of hydroxyl radical. *Anal. Biochem.* 217, 76 – 83 (1994)
143. Pou, S., G. Rosen: Spin-trapping of superoxide by 5,5-DMPO: Application to isolated perfused organs. *Anal. Biochem.* 190, 321 – 325 (1992)
144. Pou, S., G. Rosen, B. Britigan, M. Cohen: Intracellular spin-trapping of oxygen-centered radicals generated by human neutrophils. *Biochem. Biophys. Acta* 991, 459 – 465 (1989)
145. Ramos, C. L., S. Pou, B. E. Britigan, M. S. Cohen, G. M. Rosen: Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. *J. Biol. Chem.* 267, 8307 – 8312 (1994)
146. Ratnasinghe, D., M. R. Forman, J. A. Tangrea, Y. Qiao, S. X. Yao, E. W. Gunter, M. J. Barrett, C. A. Giffen, Y. Erozan, M. S. Tockman, P. R. Taylor: Serum carotenoids are associated with increased lung cancer risk among alcohol drinkers, but not among non-drinkers in a cohort of tin miners. *Alcohol* 35, 355 – 360 (2000)
147. Raynaud, F., P. Gerbaud, D. Evain-Brion: Beneficial effect of a combination of retinoids and long-acting theophylline in treatment of psoriasis vulgaris. *Br. J. Dermatol.* 31, 740 – 742 (1994)

148. Reguli, J., Z. Durackova, J. Pogady, D. Martisova, A. Stasko: EPR spin trapping study of reactive oxygen products of respiratory burst of phagocytes. Bratisl. Lek. Listy 93, 557 – 567 (1992)
149. Reinheckel, T., M. Bohne, W. Halangk, W. Augustin, H. Gollnick: Evaluation of UVA-mediated oxidative damage to proteins and lipids on extracorporeal photoimmunotherapy. Photochem. Photobiol. 69, 566 – 570 (1999)
150. Rosen, G. M., M. S. Cohen, B. E. Britigan, S. Pou: Application of spin traps to biological systems. Free Radic. Res. Comms. 9, 187 – 195 (1990)
151. Rosen, G. M., S. Pou, B. E. Britigan, M. S. Cohen: Spin trapping of hydroxyl radicals in biological systems. Methods Enzymol. 233, 105 – 111 (1994)
152. Roubaud, V., P. Sankarapandi, P. Kuppusamy, P. Tordo, J. L. Zweier: Quantitative measurement of superoxide generation using the spin trap 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide. Anal. Biochem. 247, 404 – 411 (1997)
153. Rousseau, E. J., A. J. Davison: Protection by  $\beta$ -carotene and related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity: Implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis. Free Radic. Biol. Med. 13, 407 – 433 (1992)
154. Ruzicka, T., C. Sommerburg, O. Braun-Falco, K. Wolfgang, W. Lengen, W. Lensing, H. I. Letzel, W. Meigel, E. Paul, B. Przybilla, M. Steinert, M. Winzer, A. Wiskemann: Efficiency of acitretin in combination with UVB in the treatment of severe psoriasis. Arch. Dermatol. 126, 482 – 486 (1990)
155. Santamaria, L., A. Bianchi-Santamaria: Free radicals as carcinogens and their quenchers as anticarcinogens. Med. Oncol. Tumor Pharmacother. 8, 121 – 140 (1991)
156. Saurat, J.-H., J.-M. Geiger, P. Amblard: Randomized double-blind multicenter study comparing acitretin-PUVA, etretinate-PUVA and placebo PUVA in the treatment of psoriasis. Dermatologica 177, 218 – 224 (1988)
157. Schallreuter, K. U., J. M. Wood: Free radical reduction in the human epidermis. Free Radic. Res. 6, 519 – 532 (1989)
158. Schoen, D. J., R. R. Watson: Prevention of UV irradiation induced suppression of monocyte functions by retinoids and carotenoids *in vitro*. Photochem. Photobiol. 48, 659 – 663 (1988)
159. Schopf, R. E., J. Höcher, M. Rehder, L. Färber, B. Morsches: Etretinate or cyclosporin-A treatment normalizes the enhanced respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes in psoriasis. Arch. Dermatol. Res. 284, 227 – 231 (1992)
160. Schumacher, A., G. Stüttgen: Vitamin A-Säure bei Hyperkeratosen, epithelialen Tumoren und Akne. Orale und lokale Anwendung. Dtsch. Med. Wochenschr. 96, 1547 – 51 (1971)

161. Seifter, E., J. Mendecki, S. Holtzman, J. D. Kanofsky, E. Friedenthal, L. Davis, J. Weizzweig: Role of vitamin A and  $\beta$ -carotene in radiation protection: relation to antioxidant properties. *Pharmac. Ther.* 39, 357-365 (1988)
162. Segdewick, J. B., P. R. Bergstresser, E. R. Hurd: Increased granulocyte adherence in psoriasis and psoriatic arthritis. *J. Invest. Dermatol.* 74, 81 – 84 (1980)
163. Semba, R. D.: The role of vitamin A and related retinoids in immune function. *Nutr. Rev.* 56, 38 – 48 (1998)
164. Shahidullah, M., S.-N. Tham, C.-L. Goh: Etreinate therapy for psoriasis and other keratinising disorders: a 10-years retrospective study in Singapore. *Int. J. Dermatol.* 32, 686 – 689 (1993)
165. Shi, X., N. Dalal: Vanadate-mediated hydroxyl radical generation from superoxide radical in the presence of NADH: Haber-Weiss Fenton-Mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 336 – 341 (1993)
166. Simon, J. C., D. Pfeifer, E. Schopf: Recent advances in phototherapy. *Eur. J. Dermatol.* 10, 642 – 645 (2000)
167. Smith, J. V., E. M. de Jong, G. J. de Jong, P. C. van de Kerkhof: Topical all-trans retinoic acid does not influence minimal erythema doses for UVB light in normal skin. *Acta Derm. Venereol.* 80, 66 – 67 (2000)
168. Stadler, R., M. Müller, M. Detmar, C. E. Orfanos: Retinoids and keratinocyte differentiation *in vitro*. *Dermatologica* 175, 48 – 49 (1987)
169. Stahl, W., W. Schwarz, A. R. Sundquist, H. Sies: Cis-trans isomers of lycopene and  $\beta$ -carotene in human serum and tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 294, 173 – 177 (1992)
170. Stahl, W., H. Sies: Geometrical isomers of  $\beta$ -carotene and lycopene: *in vivo* studies with humans. In: Livrea M.A., Vidali G. (eds.): *Retinoids: From basic science to clinical applications*, pp. 29 – 32, Birkhäuser Verlag Basel 1994
171. Sticherling, M., W. Sautier, J. M. Schroder, E. Christophers: Interleukin-8 plays its role at local level in psoriasis vulgaris. *Acta Derm. Venereol.* 79, 4 – 8 (1999)
172. Strauss, J. S., R. P. Rapini, A. R. Shalita, E. Konecky, P. E. Pochi, H. Comite, J. H. Exner: Isotretinoin therapy for acne: results of a multicenter dose-response study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 10, 490 (1984)
173. Struy, H., St. Altmann, D. Schmidt, R. Gärtner, J. Morenz: Hydroxyl radical generation by human neutrophils and eosinophils. *Allergy* 50, 143 (1995)
174. Struy, H., M. Bohne, A. Gerber, H. Gollnick, J. Morenz: Antioxidant effect of 13-cis- $\beta$ -carotene on the neutrophil-generated oxygen-derived free radicals. *Immunobiology* 194, 88 (1995)
175. Struy, H., D. Schmidt, R. Gärtner, J. Morenz: EPR studies on the generation of hydroxyl radicals by stimulated neutrophils. *Immunobiol.* 191, 275 (1994)

176. Struy, H., D. Schmidt, R. Gärtner, H.-U. Schulz, J. Morenz: Bildung von Hydroxylradikalen durch stimulierte neutrophile Granulozyten: Eine EPR-Studie. Fortschritte in der Hygiene und Mikrobiologie. R.C. Pechstein-Verlag Dobersdorf 196 – 198 (1994)
177. Stüttgen, G.: Zur Lokalbehandlung von Keratosen mit Vitamin A-Säure. Dermatologica 124, 65 – 80 (1962)
178. Szondy, Z., U. Reichert, L. Fesus: Retinoic acids regulate apoptosis of T lymphocytes through an interplay between RAR and RXR receptors. Cell Death Differ. 5, 4 – 10 (1998)
179. Trautinger, F., R.M. Knobler, W. Macheiner, C. Grünwald, M. Mischke: Release of oxygen-free radicals by neutrophils is reduced by photopheresis. Ann. NY Acad. Sci. 636, 383 – 385 (1991)
180. Tsambaos, D., C. E. Orfanos: Chemotherapy of psoriasis and other skin disorders with oral retinoids. Pharmac. Ther. 14, 355 – 374 (1981)
181. Tsukada, M., M. Schroeder, T. C. Roos, R. A. Chandraratna, U. Reichert, H. F. Merk, C. E. Orfanos, C. C. Zouboulis: 13-*cis* retinoic acid exerts its specific activity on human sebocytes through selective intracellular isomerization to all-*trans* retinoic acid and binding to retinoid acid receptors. J. Invest. Dermatol. 115, 321 – 327 (2000)
182. Ushijima, Y., H. Totsune, A. Nishida, M. Nakano: Chemiluminescence from human polymorphonuclear leukocytes activated with opsonized zymosan. Free Radic. Biol. Med. 22, 401 – 409 (1997)
183. Vahlquist, A., O. Rollman: Clinical pharmacology of 3 generations of retinoids. Dermatologica 175, 1, 20 – 27 (1987)
184. van de Kerkhof, P. C. M., G. Volden, H. Gollnick: Comparisons and combinations. In: Meir P.D., van de Kerkhof P. C. M. (eds.): Textbook of Psoriasis, pp. 268 – 275, Churchill Livingstone, Edinburgh 1986
185. van Rossum, M. M., J. M. Mommers, P. C. van de Kerkhof, P. E. van Erp: Coexpression of keratins 13 and 16 in human keratinocytes indicates association between hyperproliferation-associated and retinoid-induced differentiation. Arch. Dermatol. Res. 292, 16 – 20 (2000)
186. van Rossum, M. M., J. M. Mommers, P. E. van Erp, E. Leyninger, A. Clucas, P. C. van de Kerkhof: CD 2394, a novel synthetic retinoid, initiates an embryonic type of differentiation in hyperproliferative skin. Acta Derm. Venereol. 80, 98 – 101 (2000)
187. Vorhees, J. J.: Leukotrienes and other lipoxigenase products in the pathogenesis and therapy of psoriasis and other dermatoses. Arch. Dermatol. 119, 541 – 547 (1983)
188. Wasik, F., J. Jedrezejak, M. Miklaszewska: Granulocyte pyruvate kinase in psoriasis vulgaris and psoriasis arthropathica. Br. J. Dermatol. 116, 9 – 14 (1987)

189. Wassall, S. R., W. Stillwell: Interactions of retinoids with phospholipid membranes: Electron spin resonance. *Methods Enzymol.* 189, 383 – 394 (1990)
190. Watson, R. R., R. H. Prabhala, P. M. Plezia, D. S. Alberts: Effect of betacarotene on lymphocyte subpopulations in humans: evidence for a dose-response relationship. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 90 – 94 (1991)
191. Weinstein, G.D., H. Krueger: An overview of psoriasis. In: Weinstein G. D., Gottlieb A. B. (eds.): *Therapy of Moderate-to-severe psoriasis*, pp. 1 – 22, National Psoriasis Foundation Portland 1993
192. Willy, P. J., K. Umesono, S. Ong E., R. M. Evans, R. A. Heyman, D. J. Mangelsdorf: LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Development* 9, 1033 – 1045 (1995)
193. Wozel, G., A. Chang, M. Zultak, B. M. Czarnetzki, R. Happle, J. Barth, P. C. M. van de Kerkhoff: The effect of topical retinoids on the leukotriene-B<sub>4</sub>-induced migration of polymorphonuclear leukocytes into human skin. *Arch. Dermatol. Res.* 283, 158 – 161 (1991)
194. Xiao, J.-H., B. Durand, P. Chambo, J. J. Voorhees: Endogenous Retinoic acid Receptor (RAR)- Retinoid X-Receptor (RXR) heterodimers are the major functional forms regulating retinoid-responsive elements in adult human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 2001 – 2011 (1995)
195. Yang, Y., S. Minucci, K. Ozato, R. A. Heyman, J. D. Ashwell: Efficient inhibition of activation-induced fas ligand up-regulation and T-cell apoptosis by retinoids requires occupancy of both retinoid X receptors and retinoic acid receptors. *J. Biol. Chem.* 270, 18672 – 18677 (1995)
196. Zouboulis, C. C., C. E. Orfanos: Retinoide – Zwölf Jahre Wirksamkeit und Verträglichkeit der systemischen Therapie. In: Saurat J.-H. (ed.): *Retinoide*, pp. 301 – 308, Karger Basel 1996

## LEBENS LAUF

Name, Vorname	Bohne, Marisela
Geburtsname	Rodriguez Mouriz
Geburtsdatum	19.06.1961
Geburtsort	Havanna
Wohnsitz	Ortelsburger Str. 12, 28211 Bremen
Telefon/E-Mail	(421)4986898 / bohne@nikocity.de
Staatsangehörigkeit	Bundesrepublik Deutschland
Familienstand	verheiratet, 1 Kind
Schulbildung	
1966 - 1979	Grundschule, Gymnasium mit Mathematik/Physik-Ausbildung, Abschluß: Abitur
Hochschulbildung	
1979 - 1984	Studium der Fachrichtung Physik/Mathematik, Spezialisierung Biophysik an der Staatlichen Universität Minsk (UdSSR)
1984	Verteidigung der Diplomarbeit "Untersuchung der wasserlöslichen Eiweiße der Hornhaut bei Katarakt mit Hilfe des UV-Beschädigungsmodells" Abschluß als Diplomphysiker mit der Spezialisierung Biophysik (1991 in Deutschland anerkannt)
Berufsausübung	
1984 - 1985	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biotechnologie Havanna, Abteilung für Genetik
1985 - 1987	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Genetik der Mikroorganismen der Akademie der Wissenschaften der UdSSR, Pustschino b. Moskau
1987 - 1989	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biotechnologie Havanna, Abteilung für Genetik
01.05.1990 – 31.03.1999	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (hauptsächlich eingebunden in klinische Studien und Projekte mit interdisziplinärem Charakter)
01.08.2000 – 24.08.2001	CBM GmbH Bremen, Softwareentwicklungsfortbildung
seit 01.09.2001	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Festkörperphysik der Universität Bremen

**Sprachen:** spanisch (nativ), deutsch, russisch, englisch