

**Der Einfluß von Cholesterol auf die UV-induzierte Peroxidation  
der Lipide des menschlichen Stratum corneum**

Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität

von Frau Ute Schönfelder

geb. am: 21.12.1971 in: Grimma

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Schubert, Freiburg
2. Prof. Dr. R. Ulbrich-Hoffmann, Halle
3. Prof. Dr. J. Lasch, Halle

Halle (Saale), 24.2.1999

# Inhalt

<b>1.</b>	<b>Zielstellung und Strategie der Arbeit</b>	1
1.1.	Zielstellung	1
1.2.	Strategie	2
<b>2.</b>	<b>Die Wirkungen ultravioletter Strahlung auf die menschliche Haut</b>	4
2.1.	Die Haut des Menschen	4
2.1.1.	Funktionen und Aufbau der menschlichen Haut	4
2.1.2.	Bau und Differenzierungsprozeß der Epidermis	6
2.1.3.	Das Zwei-Kompartiment-Modell des Stratum corneums	8
2.2.	Wechselwirkungen von UV-Strahlung mit der menschlichen Haut	11
2.2.1.	Positive Wirkungen von UV-Strahlung auf die Haut: Vitamin D Synthese	13
2.2.2.	Hautschädigende Effekte von UV Licht	13
2.2.3.	Oxidativer Stress an der menschlichen Haut	15
2.2.3.1.	Reaktive Sauerstoffspezies und ihre Entstehung	16
2.2.3.2.	Antioxidative Abwehrmechanismen	18
2.2.4.	Schutzmechanismen der Haut vor ultravioletter Strahlung	21
2.2.4.1.	Pigmentierung	21
2.2.4.2.	Verdickung der Epidermis	22
2.2.4.3.	Zelluläre Anpassungsmechanismen an UV-induzierten oxidativen Stress	22
<b>3.</b>	<b>Cholesterol als Stratum corneum Lipid</b>	24
3.1.	Eigenschaften und Funktionen von Cholesterol in Biomembranen	24
3.2.	Cholesterolsynthese in der Haut	24
3.3.	Die Bedeutung von Cholesterol und seiner Derivate für die Permeabilitätsbarriere des Stratum corneums	26
<b>4.</b>	<b>Material und Bestrahlungsbedingungen</b>	27
4.1.	Chemikalien und Geräte	27
4.2.	Lipide	29
4.2.1.	Lipidmischungen	29
4.2.2.	Lipidextraktion	30
4.2.3.	Säulenchromatographie	31
4.2.4.	Präparative Dünnschichtchromatographie	31
4.2.5.	Liposomen	31
4.2.6.	Lipidfilme	33

4.3.	Bestrahlungsbedingungen	34
4.3.1.	Künstlich erzeugtes UV Licht	34
4.3.2.	Natürliches Sonnenlicht	35
<b>5.</b>	<b>Nachweis der UV-induzierten Oxidation an Stratum corneum Lipiden</b>	36
5.1.	Nachweis und Quantifizierung von Lipidoxidationsprodukten	36
5.1.1.	Nachweis und Quantifizierung von Malondialdehyd	37
5.1.1.1.	Nachweis von Malondialdehyd mit 2-Thiobarbitursäure	39
5.1.1.2.	Weitere Nachweismöglichkeiten und biologische Bedeutung von Malondialdehyd	41
5.1.1.3.	Entstehung von MDA in Modellmembranen durch UV Bestrahlung	43
5.1.2.	Nachweis und Quantifizierung von Lipidhydroperoxiden	46
5.1.2.1.	Nachweis von Lipidhydroperoxiden durch 2',7'-Dichlorofluorescein	47
5.1.2.2.	Weitere Methoden zum Nachweis von Lipidhydroperoxiden	49
5.1.2.3.	Bildung von LOOH in Modellmembranen durch UV Bestrahlung	50
5.2.	Nachweis der UV-induzierten Lipiddegradation mit AMD unterstützter HPTLC	53
5.2.1.	AMD unterstützte HPTLC	53
5.2.2.	UV-induzierte Lipiddegradation in Modellmembranen	55
5.3.	Messung des Sauerstoff-Verbrauchs	59
5.3.1.	Aufbau und Funktionsweise der Clark-Elektrode	59
5.3.2.	UV-induzierter Sauerstoff-Verbrauch in Liposomensuspensionen	60
5.4.	Diskussion	62
5.4.1.	Nachweis der UV-induzierten Oxidation an Modellmembranen aus synthetischen und semi-synthetischen Lipiden	62
5.4.2.	Wirkt Cholesterin als Antioxidans?	67
5.4.3.	Nachweis der UV-induzierten Oxidation an Modellmembranen aus humanen Stratum corneum Lipiden	70
<b>6.</b>	<b>Mechanismus der UV-induzierten Lipidperoxidation</b>	74
6.1.	Analytik von Cholesteroloxidationsprodukten	75
6.1.1.	Trennung von Oxysterolen mittels Dünnschichtchromatographie	78
6.1.1.1.	Chromatographisches System	78
6.1.1.2.	Entstehung von Cholesteroloxidationsprodukten in Liposomen durch UV-Bestrahlung	81
6.1.2.	Trennung von Oxysterolen durch HPLC	84
6.1.2.1.	Chromatographisches System	84
6.1.2.2.	Entstehung von Cholesteroloxidationsprodukten in hSCLL durch natürliche Sonnenstrahlung	86
6.2.	Radikalfänger-Studien	87

6.2.1.	Dimethylsulfoxid als Hydroxylradikal-Fänger	87
6.2.2.	Azid als Singulett-Sauerstoff-Fänger	88
6.3.	Diskussion	91
<b>7.</b>	<b>Folgen der UV-induzierten Oxidation der Stratum corneum Lipide</b>	96
7.1.	Glukose-Efflux-Messung	96
7.1.1.	Bau und Funktionsweise der Glukoseoxidase-Enzymelektrode	96
7.1.2.	Glukose-Efflux aus Liposomen	97
7.2.	Einfluß der Oxidation auf das Proliferationsverhalten von humanen Keratinozyten	98
7.2.1.	Bestimmung der Zellproliferation	99
7.2.2.	Die Wirkung von Lipiden und Lipidoxidationsprodukten auf das Proliferationsverhalten von Keratinozyten	99
7.3.	Diskussion	102
7.3.1.	Der Einfluß von UV-Strahlung auf die Membranpermeabilität von Modellvesikeln	102
7.3.2.	Der Einfluß von Lipidoxidationsprodukten auf humane Keratinozyten	106
<b>8.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	108

# **1. Zielstellung und Strategie der Arbeit**

## **1.1. Zielstellung**

Mit der vorliegenden Arbeit soll die durch ultraviolette Strahlung induzierte Peroxidation der Lipide des menschlichen Stratum corneum nachgewiesen und die Oxidationsprodukte charakterisiert werden.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen steht dabei die Frage, inwieweit die besondere Lipidzusammensetzung die Empfindlichkeit der Stratum corneum Lipide gegenüber einer Oxidation beeinflußt. Seit den 70er Jahren wird in der Literatur eine antioxidative Wirksamkeit von Cholesterol diskutiert. Da Cholesterol in erheblicher Konzentration im menschlichen Stratum corneum vorkommt, soll die Frage beantwortet werden, ob und inwiefern Cholesterol die UV-induzierte Peroxidation der Stratum corneum Lipide beeinflußt.

Darüber hinaus soll geklärt werden, nach welchem Mechanismus die UV-induzierte Oxidation der Stratum corneum Lipide verläuft. Diese Frage wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Abhängig von den am Oxidationsmechanismus beteiligten Spezies, lassen sich zwei Oxidationstypen unterscheiden.

Weiterer Gegenstand der Untersuchungen sind die Konsequenzen der UV-induzierten Oxidation der Stratum corneum Lipide für die menschliche Epidermis. So wird in der vorliegenden Arbeit neben dem Nachweis und der Aufklärung des Mechanismus der UV-induzierten Lipidperoxidation untersucht, welche Auswirkungen die Lipidperoxidation für die Permeabilität der untersuchten Modellmembranen hat. Abschließend soll der Einfluß der Lipidoxidationsprodukte auf die Proliferation der humanen Epidermiszellen (Keratinozyten) anhand von Toxizitätstestungen untersucht werden.

## **1.2. Strategie**

Als Modell für das menschliche Stratum corneum wurden sowohl Liposomen als auch trockene Lipidfilme verwendet. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, daß sich beide Systeme gut als Modellmembranen für Oxidationsexperimente eignen [Bose et al. 1989; Bathia et al. 1990; Bose und Chatterjee 1994].

Liposomen sind Vesikel, die aus einer oder mehrerer, in sich geschlossener Lipiddoppelschichten bestehen, die ein wäßriges Kompartiment umschließen. Gewöhnlich bilden amphiphile Lipide (z.B. Phospholipide) spontan derartige Strukturen, wobei sich die hydrophilen Molekülteile an der Wasser/Lipid-Grenzfläche, die hydrophoben Teile im Inneren der Lipiddoppelschicht organisieren. Je nach Größe und Lamellarität (Anzahl der Lipidbilayer) unterscheidet man MLV (multilamellar vesicles), SUV (small unilamellar vesicles; < 50 nm) und LUV (large unilamellar vesicles > 60 nm) [Chatterjee und Agarwal, 1988]. Seit den 60er Jahren werden sie als einfaches Modell zur Untersuchung von Struktur und Funktionen von Biomembranen verwendet. Studien zur Membranfluidität, Phasenübergängen, Membranpermeabilität oder Protein-Lipid-Wechselwirkungen wurden an liposomalen Modellmembranen durchgeführt [Chatterjee und Agarwal 1988]. Ihr Vermögen sowohl hydrophile als auch lipophile Substanzen einzuschließen, machen sie zu potentiellen Carriern, um Arzneistoffe in Organe oder Gewebe zu transportieren [Gregoriadis 1988]. Neben diesen Anwendungsbereichen werden Liposomen auch zur Untersuchung der Lipidperoxidation herangezogen [Bose et al. 1989; Bathia et al. 1990]. Sowohl Oxidationsmechanismen [Bose et al. 1990] als auch die Wirksamkeit von Antioxidantien [Pelle et al. 1990] wurde am Liposomenmodell untersucht.

Liposomen lassen sich nicht nur aus Phospholipiden herstellen. Auch die Lipide des menschlichen Stratum corneums bilden Vesikel [Lasch et al. 1994] und können als simples Modell für das menschliche Stratum corneum fungieren.

Im Gegensatz zu einer Vesikelsuspension enthält das Stratum corneum unter physiologischen Bedingungen nur einen geringen Prozentsatz an Wasser (unter 15 %) [Melnick 1990]. Da die Halbwertzeit von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) u. a. vom Reaktionsmedium abhängig ist, kann der hohe Wassergehalt in

den Vesikelsuspensionen zu einer stark von den natürlichen Bedingungen abweichenden ROS Entstehung führen. Wie *Halliwell* und *Gutteridge* belegen, ist z. B. die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in D<sub>2</sub>O um den Faktor 10 bis 15 höher als in Wasser [Halliwell und Gutteridge 1992]. Um die aus den Vesikelsuspensionen erhaltenen Ergebnisse mit der Situation im menschlichen Stratum corneum vergleichen zu können, wurde zusätzlich die UV-induzierte Lipidperoxidation an trockenen Lipidfilmen untersucht. *Bose* und *Chatterjee* beschrieben ein Lipidfilm-Modell zur Untersuchung der Lipidperoxidation [Bose und Chatterjee 1994].

Die Liposomen und Lipidfilme, als Modelle für das menschliche Stratum corneum, wurden künstlich erzeugtem und natürlichem UV Licht ausgesetzt und auf diese Weise die Lipidperoxidation induziert. Zur Untersuchung des Einflusses von Cholesterin auf die Oxidation der Stratum corneum Lipide wurde der Cholesterolgehalt in den Modellmembranen variiert.

## 2. Die Wirkungen ultravioletter Strahlung auf die menschliche Haut

### **2.1. Die Haut des Menschen**

#### **2.1.1. Funktionen und Aufbau der menschlichen Haut**

Die Haut bildet die äußere Begrenzung des menschlichen Körpers gegenüber seiner Umwelt. Mit ihrem breiten Funktionsspektrum ist sie jedoch weit mehr als eine einfache Hülle. Zum einen stellt sie eine Barriere gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen, wie chemischen oder physikalischen Noxen sowie Mikroorganismen dar. Gleichzeitig bewahrt sie den Organismus vor dem Verlust von Wasser durch Verdunstung. Zum anderen fungiert die Haut als Sinnesorgan. Rezeptoren für den Tastsinn (Druck, Berührung, Vibration) und das Temperaturempfinden (Thermorezeptoren) sowie Schmerzrezeptoren sind in der Haut lokalisiert. Die Haut spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Körpertemperatur. Sie ist Ort immunologischer Abwehrmechanismen und Biosynthesen (z.B. Vitamin D<sub>3</sub>, Cholesterin).

Die Haut ist das größte (Oberfläche bis zu 2 m<sup>2</sup>) und schwerste (ca. 3 kg) Organ des Menschen. Sie ist aus drei Schichten aufgebaut (Abbildung 1). Die Subcutis, die untere Hautschicht, enthält Fett- und lockeres Bindegewebe. Sie stellt die Verbindung zur angrenzenden glatten Muskulatur her. Sie enthält die Vibrationsrezeptoren. An der Grenze zur darüber liegenden Dermis oder Lederhaut befindet sich der untere Gefäßplexus sowie die Haarfollikel.

Die Dermis besteht aus Bindegewebe, das für die Reißfestigkeit und Elastizität der Haut verantwortlich ist. Das Bindegewebe wird von drei Strukturelementen gebildet: langen, parallel angeordneten Faserbündeln von Kollagen des Typ I und III (Festigkeit), elastischen, verzweigten Elastinfasern (Elastizität) sowie einer viskosen Glukosaminoglykan-Grundsubstanz, in die diese Fasern eingebettet sind. In der Dermis befinden sich außerdem Schweiß- und Talgdrüsen, in ihr verlaufen Nervenbahnen, Blut- und Lymphgefäß und sie enthält Sinneszellen (Berührungs- und Druckrezeptoren).

Zelluläre Bestandteile der Dermis sind die Fibroblasten, die Orte der Glukosaminoglykanproduktion, der Kollagen- und Elastinsynthesen, sowie immunologisch aktive Mastzellen, Makrophagen und Lymphozyten. In der oberen Dermis befindet sich der oberflächliche Gefäßplexus. Unterer und oberflächlicher Gefäßplexus sind durch vertikal verlaufende Gefäße miteinander verbunden. Dieses Gefäßsystem ist nicht nur für die Hautversorgung, sondern auch für die Thermoregulation verantwortlich.

Die Dermis ist mit der darüber befindlichen Epidermis wellenförmig verzahnt. Aufgaben der Epidermis sind vorrangig Barriere- und Schutzfunktionen.

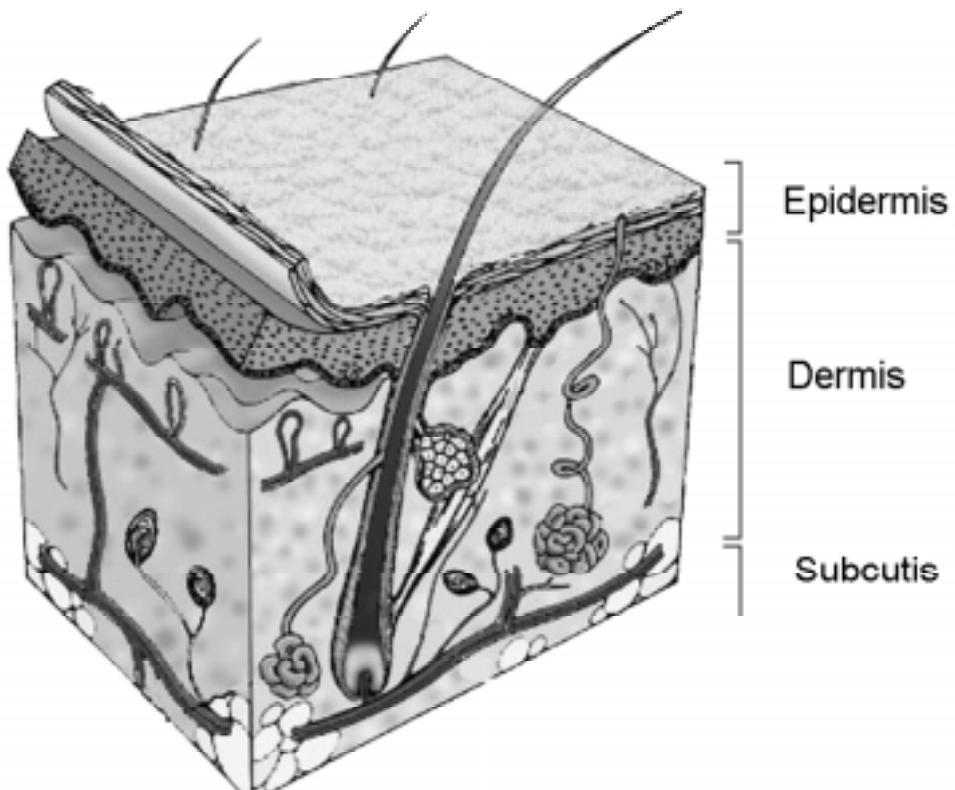


Abbildung 1: Schematischer Querschnitt durch die menschliche Haut mit Epidermis, Dermis und Subcutis [GALDERMA LABORATORIES, Inc. <http://www.galderma.com/skin/your-skin.html>].

### 2.1.2. Bau und Differenzierungsprozeß der Epidermis

In der menschlichen Epidermis lassen sich lichtmikroskopisch 5 Schichten unterscheiden. Diese werden von Epidermiszellen, den Keratinozyten, unterschiedlicher Differenzierungsstadien gebildet. Die Abbildung 2 zeigt die verschiedenen Epidermisschichten, die nach den morphologischen Merkmalen der sich differenzierenden Keratinozyten bezeichnet werden.

Die Basalzellschicht (Stratum basale) enthält die Keratinoblasten (Stammzellen). Diese sitzen auf der Basalmembran und sind über Hemidesmosomen mit ihr verbunden. Die Basalmembran wird aus einer Vielzahl von Strukturproteinen wie Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin u.a. gebildet. Sie steht über Ankerfibrillen (Kollagen Typ VII u.a.) mit der Dermis in Verbindung [Fritsch 1990].

Die durch Teilung der basalen Stammzellen entstehenden Tochterzellen wandern während ihrer Differenzierung nach außen. In der Stachelzellschicht (Stratum spinosum) beginnt sich ihre Gestalt zu verändern. Die zuvor säulenförmigen Zellen beginnen abzuflachen und bilden stachelförmige Fortsätze, die benachbarte Zellen über Desmosomen verbinden. Die differenzierenden Keratinozyten produzieren Keratine, die sich intrazellulär zu Filamentbündeln organisieren. Im oberen Stratum spinosum werden intrazelluläre Lamellengranula (Keratinosomen oder Odland-Bodies) sichtbar.

In der Granularzellschicht (Stratum granulosum) finden weitere biochemische und morphologische Veränderungen der Zellen statt. Die Keratinozyten, die immer flacher werden, enthalten durchgängig Keratinosomen. Dabei handelt es sich um Vesikel, die "geldrollenartige" [Landmann 1991] Stapel von Lipiddoppelschichten enthalten. Die keratinosomalen Lipide werden in den Keratinozyten des Stratum granulosum synthetisiert und vom Golgi-Apparat als Vesikel abgeschnürt. Sie setzen sich vorwiegend aus Sphingolipiden, Sterolen und freien Fettsäuren zusammen. Die Keratinosomen wandern, während die Keratinozyten das Stratum granulosum durchlaufen, an den apikalen Zellpol und verschmelzen schließlich mit der Zellmembran, wobei ihr Lipidinhalt in den Interzellularraum exozytiert wird. Im Stratum granulosum finden neben Synthesen auch Degradationsprozesse statt. Zellkerne und andere Organellen (Mitochondrien) der Keratinozyten werden abgebaut. Die Zellen verlieren ihre Teilungsfähigkeit. Auch die

Plasmamembranen werden sukzessive abgebaut und durch eine Hornhülle ersetzt. Diese verleiht den Keratinozyten zusätzliche Stabilität und Rigidität.

An das Stratum granulosum schließt sich eine dünne, homogene Schicht sehr flacher Keratinozyten an, das Stratum lucidum.

In der äußersten Epidermisschicht, dem Stratum corneum (Hornschicht), haben die Keratinozyten das Ende ihres Differenzierungsprozesses erreicht. Sie werden dann als Corneozyten bezeichnet. Bei den Corneozyten handelt es sich um abgestorbene keratinhaltige Zellreste, die von einer Hornhülle umschlossen sind. Sie sind von sehr flacher Gestalt (ca.  $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m} \times 0,5 \mu\text{m}$ ). Eingebettet sind die Corneozyten in dichte multilamellare interzelluläre Lipidschichten.

Weitere in der Epidermis vorkommende Zellpopulationen sind die Melanozyten, immunologisch aktive Langerhans-Zellen, sowie Mechanorezeptoren (Merkel-Zellen). Die Melanozyten befinden sich im Stratum basale, wo sie ähnlich wie die basalen Keratinozyten mit der Basalmembran assoziiert sind. Langerhans-Zellen findet man vorwiegend im Stratum spinosum. Beide Zelltypen sind von heterogener Gestalt. Über zahlreiche dendritische Zellfortsätze stehen sie mit den umgebenden Keratinozyten in Kontakt.

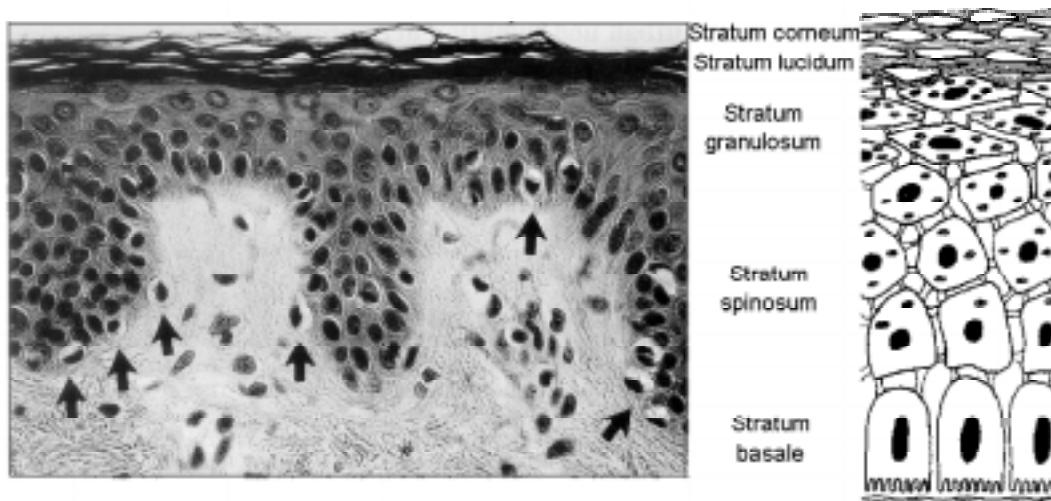


Abbildung 2: Querschnitt durch die menschliche Epidermis. Die Pfeile markieren Melanozyten.  
Abbildung links: Fritsch 1990; Abbildung rechts: Melnick 1990

### 2.1.3. Das Zwei-Kompartiment-Modell des Stratum corneums

Das Stratum corneum, bestehend aus verhornten, miteinander verbundenen Corneozyten, eingebettet in eine multilamellare Lipidmatrix, ist die entscheidende Permeabilitätsbarriere der menschlichen Epidermis.

Für eine grobe Beschreibung des Stratum corneums hat sich das "Brick and Mortar" Modell von Elias durchgesetzt [Elias 1984]. Es vergleicht die Corneozyten mit Ziegelsteinen, die wie in einer Mauer regelmäßig überlappend angeordnet und von einer Mörtelschicht, der interzellulären Lipidmatrix, umgeben sind.

Die multilamellaren, interzellulären Lipidschichten im Stratum corneum sind von charakteristischer und von der übrigen Epidermis abweichender Zusammensetzung. Man findet vorrangig Neutrallipide, wie Triacylglycerole, Sterole, Sterolester und freie Fettsäuren (Abbildung 3), Sphingolipide (Ceramide, Abbildung 4), sowie Cholesterol-3-sulfat. Die meisten Acylketten der Lipide sowie ein großer Anteil der freien Fettsäuren sind gesättigt. Phospholipide sind im Stratum corneum nur in geringer Konzentration, weniger als 5 % [Melnick 1990], vorhanden. Sie werden im Laufe des Keratinisierungsprozesses zu freien Fettsäuren abgebaut [Landmann 1990].

Die interzellulären Lipide stammen aus den im Stratum spinosum und Stratum granulosum gebildeten Keratinosomen. Nachdem die Keratinosomen an der oberen Grenze des Stratum granulosum in den Interzellularraum sekretiert wurden, erfolgt die Fusion der gestapelten Lipiddoppelschichtscheibchen zu ausgedehnten Lipidschichten.

Die Erneuerung der Epidermis ist ein kontinuierlicher Prozeß. Die Differenzierung der Keratinozyten dauert in der Regel 28 Tage. An der Basalmembran des Stratum basale entstehen durch Teilung permanent Tochterzellen, die in den Keratinisierungsprozeß eintreten. An der oberen Schicht des Stratum corneum schilfern ständig Corneozyten ab.

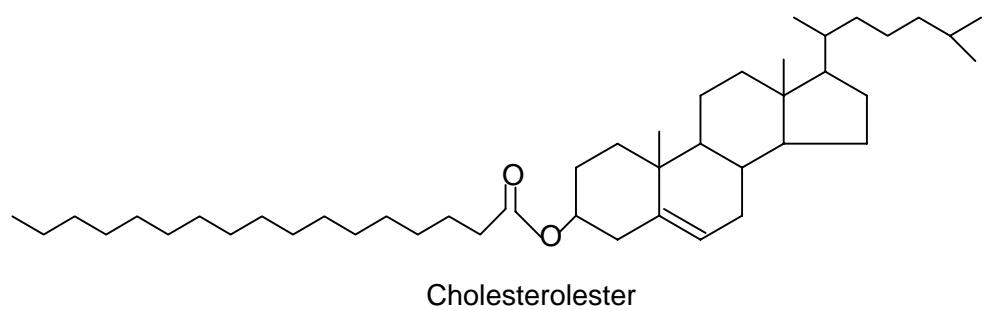
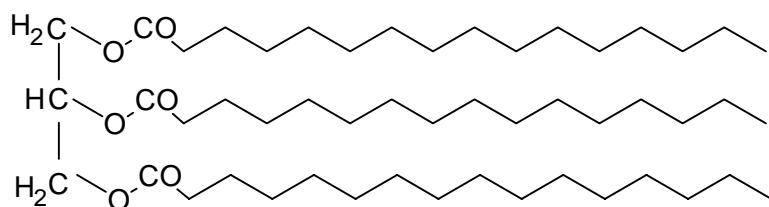
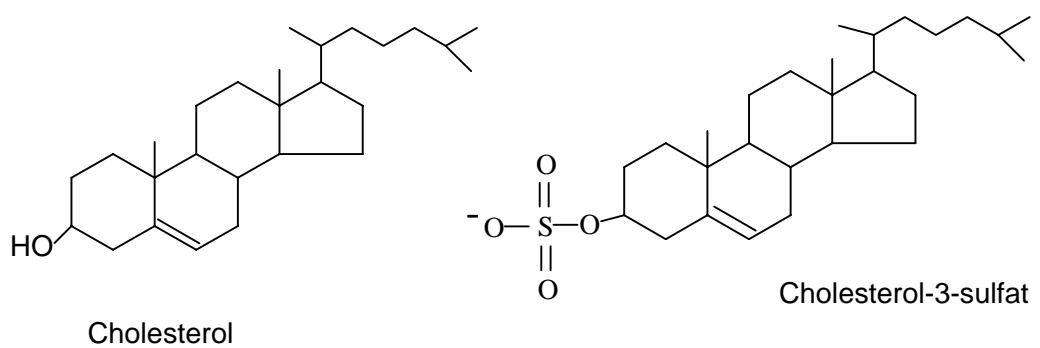


Abbildung 3: Charakteristische Stratum corneum Lipide: Triacylglycerole, freie Fettsäuren, freie und veresterte Sterole sowie Cholesterol-3-sulfat.

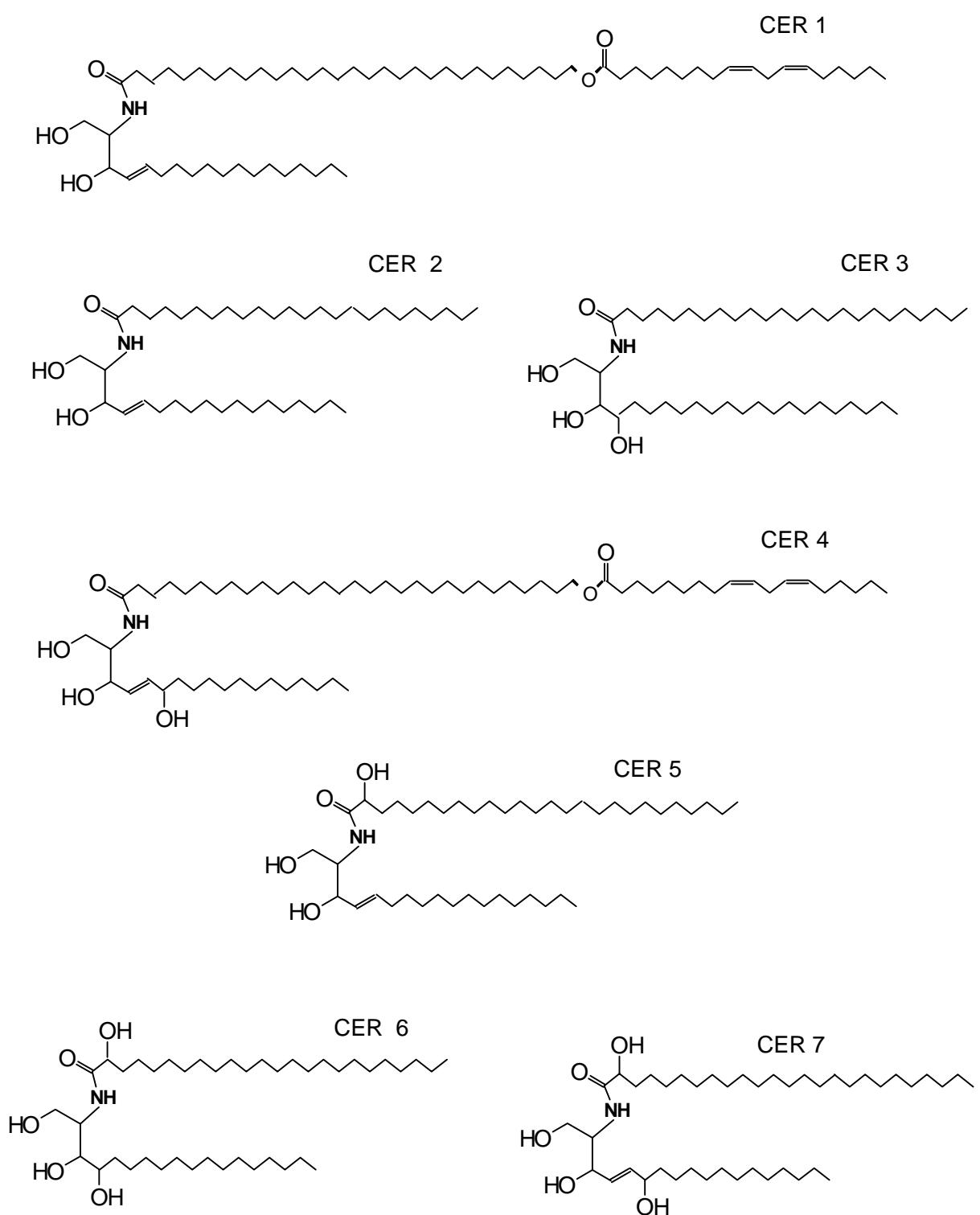


Abbildung 4: Ceramid-Klassen des menschlichen Stratum corneums [Robson et al. 1994].

## 2.2. Wechselwirkungen von UV-Strahlung mit der menschlichen Haut

Das Sonnenlicht, das die Erdoberfläche erreicht, setzt sich aus ultravioletter Strahlung der Bereiche A und B, aus sichtbarem Licht, sowie infraroter Strahlung zusammen. Ein Großteil der von der Sonne emittierten Strahlung wird in den oberen Schichten der irdischen Atmosphäre, in der Ozonschicht, absorbiert oder gestreut. Dazu gehören die Strahlung des UV-C Bereiches ( $\lambda \leq 280$  nm), sowie 90 % des UV-B Anteils ( $\lambda = 280\text{-}320$  nm). Faktoren, die die Intensität und spektrale Zusammensetzung der ultravioletten Strahlung auf der Erde beeinflussen sind neben der atmosphärischen Ozonschicht sowohl der Sonnenstand, abhängig von Breitengrad, Jahres- sowie Tageszeit, als auch die Anwesenheit von Wolken, Dunst oder Schmutzpartikeln. In Abbildung 5 ist die spektrale Verteilung der Sonnenstrahlung vor und nach der Abschwächung durch die Erdatmosphäre dargestellt.

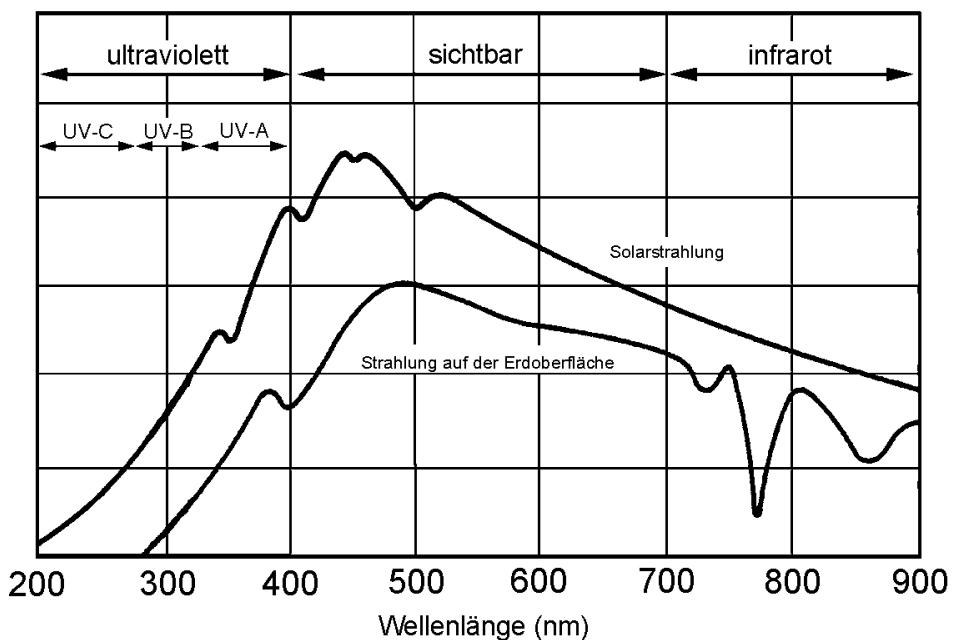


Abbildung 5: Spektrum der Sonnenstrahlung vor und nach der Absorption durch die Erdatmosphäre.  
[Environmental Health Criteria 160, WHO, Genf 1994]

Die Epidermis der menschlichen Haut dient nicht nur zum Schutz gegenüber Fremdstoffen und Mikroorganismen, sie stellt auch eine optische Barriere dar, welche ultraviolette Strahlung reflektiert, absorbiert und streut. Trifft Licht auf die Oberfläche der Haut wird ca. 5 % dieser Strahlung reflektiert [Eichler und Seiler 1991]. Die übrige Strahlung dringt in die Haut ein und wird in Abhängigkeit von ihrer Wellenlänge in unterschiedlichem Maße

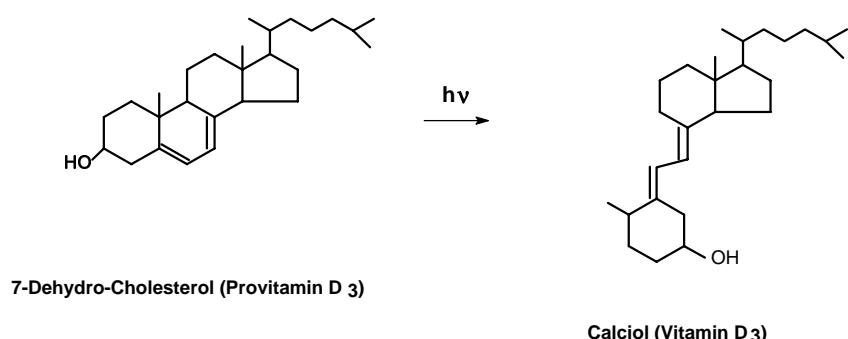
absorbiert. Dabei verhält sich die Eindringtiefe der Strahlung in die Haut proportional zur Wellenlänge dieser Strahlung. Mit größerer Wellenlänge gelangt die Strahlung tiefer in die Haut. Während die kurzwellige UV-B Strahlung zum überwiegenden Teil im Stratum corneum absorbiert wird, gelangt ein Großteil des UV-A Lichtes bis in die lebenden Epidermisschichten (Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum). Langwelliges UV-A, sowie sichtbares Licht erreicht die Dermis. In der folgenden Tabelle sind die Transmissionswerte durch unterschiedliche Hautschichten für verschiedene Wellenlängenbereiche zusammengefaßt.

Tabelle 1: Transmission ultravioletter und sichtbarer Strahlung durch unterschiedliche Schichten der menschlichen Epidermis [Bruels et al. 1984].

Transmission in %			
	UV-B (290 nm)	UV-A (365 nm)	VIS (546 nm)
Stratum corneum	14	64	80
lebende Epidermis	0,27	19	48

## 2.2.1. Positive Wirkungen von UV-Strahlung auf die Haut: Vitamin D Synthese

Das Vitamin D<sub>3</sub> (Calcidiol) wird durch UV-B Strahlung (297 nm) in der Haut aus seiner Vorstufe (Provitamin D<sub>3</sub>: 7-Dehydrocholesterol) gebildet [Iseler und Brubacher 1982].



Vitamin D<sub>3</sub> besitzt hormonelle Funktionen. Es reguliert innerhalb des Mineralstoffwechsels die Kalzium- und Phosphatresorption in Darm und Niere und ist deshalb für den Knochenbau von essentieller Bedeutung. Ein Mangel an Vitamin D<sub>3</sub> (beispielsweise durch ungenügende UV-B Bestrahlung) äußert sich u.a. als Rachitis.

## 2.2.2. Hautschädigende Effekte von UV Licht

Ultraviolette Strahlung beeinflußt das Immunsystem. UV-Strahlung (vorwiegend UV-B) löst einen Schwund der Langerhans-Zellen in der Epidermis aus [Rae et al. 1989]. Außerdem wird die Dichte der HLA-Oberflächen Marker reduziert und somit das Antigen-Präsentationsvermögen dieser Zellen herabgesetzt [Koulu et al. 1985, Beissert und Granstein 1995]. Gleichzeitig wird die Aktivität der natürlichen Killerzellen in der Epidermis verringert [Hersey et al. 1988]. Die Folge ist eine lokale Desensibilisierung des Immunsystems.

Chronische UV-B Exposition bewirkt aber auch eine verstärkte Produktion der Interleukine IL-1 und IL-6 [Ramadori 1992]. Dieses Signal stimuliert verschiedene Abwehrzellen, so daß der Verlust an Langerhans-Zellen in der Haut nach einer gewissen Zeit ausgeglichen

wird. Besonders wenn es bereits zu einem Sonnenbrand gekommen ist, führt die Erhöhung des IL-1 Spiegels zur Fieberentstehung, Gefäßerweiterung (Hautrötung) und Entzündung (Prostaglandinbiosynthese). Die durch IL-1 stimulierte Prostaglandinsynthese wird durch die Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub> durch UV Strahlung unterstützt. Die Phospholipase A<sub>2</sub> setzt Arachidonsäure aus Membranlipiden frei. Diese geht in die Prostaglandinsynthese ein. [Black 1987, Punnonen et al. 1987, Hanson und DeLeo 1989].

Chronische UV Exposition verändert darüber hinaus das äußere Erscheinungsbild der Haut (Photoaging oder Lichtalterung). Zu den Anzeichen licht-gealterter Haut gehören grobe und feine Falten sowie Schlaffheit [Kligman und Kligman 1986]. Die Ursache für ein solches Erscheinungsbild liegt in einer Schädigung der Dermis. Das Bindegewebsnetzwerk aus Kollagenfasern und Elastin wird zerstört. Die Verbindungen zwischen den Elastinfasern lösen sich, so daß das Elastin in wirren, ungeordneten Knäulen vorliegt. Das Kollagen wird teilweise abgebaut, während verstärkt die Verbindungen der Grundsubstanz synthetisiert werden [Kligman und Kligman 1986].

Infolge eines Sonnenbrandes entstehen in den oberflächlichen Epidermisschichten ‘sunburn cells’. Es handelt sich dabei um Keratinozyten, die aufgrund von nichtreparablen, UV-induzierten DNA-Schäden einen programmierten Zelltod (Apoptosis) durchlaufen. Die Entstehung von sunburn cells wird hauptsächlich durch UV-B verursacht [Danno und Horio 1987].

UV-Strahlung induziert in den Zellen der Dermis und Epidermis DNA-Schäden, wie Pyrimidindimerbildung, Einzelstrangbrüche oder Protein-DNA-Quervernetzungen [Sies 1986]. Der Anteil der UV-A Strahlung an der Entstehung von DNA-Schäden wurde lange Zeit unterschätzt. Inzwischen weiß man, daß auch UV-A die Entstehung von Strangbrüchen und Pyrimidindimeren induzieren kann [Stary et al. 1996]. Der UV-A Effekt wird zum einen dadurch verstärkt, daß der UV-A Anteil am natürlichen Sonnenlicht ca. 20-fach höher ist, als der UV-B Anteil [Pitts 1990]. Zum anderen kann UV-A Licht, wie bereits beschrieben, tiefer in die menschliche Haut eindringen [Bruels et al. 1984], während nur ein kleiner Teil der UV-B Strahlung in tiefere Epidermisschichten gelangt.

Die Induktion von DNA Schäden erfolgt jedoch für UV-A und UV-B Strahlung auf unterschiedlichen Wegen. Während UV-B Licht direkt von der DNA absorbiert wird, schädigt das UV-A Licht die DNA auf indirektem Wege. UV-A Strahlung wird nicht von

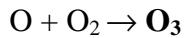
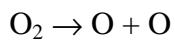
der DNA, sondern von endogenen Sensitizern (beispielsweise Riboflavin, Porphyrinen, NAD(P)H, Hämproteinen) absorbiert, die die Entstehung von ROS (Superoxidanionen, Singulett-Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid) induzieren (Vgl. Abschnitt 2.3.1. sowie Kapitel 6). ROS reagieren mit der DNA und führen zur Bildung von Pyrimidindimeren, Strangbrüchen und DNA-Protein-Quervernetzungen [de Laat JMT und de Gruijl 1996]. Auch andere Hautschädigungen sind auf das Wirken von ROS zurückzuführen, beispielsweise die beschriebene Entstehung von sunburn cells [Danno et al. 1984], die Schädigung der epidermalen Langerhans-Zellen [Horio und Okamoto 1987] oder die Prozesse der Lichtalterung [Kligman und Kligman 1986].

In vivo werden Oxidationsschäden an der DNA weitestgehend repariert. Eine unvollständige Reparatur kann jedoch Mutationen zur Folge haben. Häufige Mutationen, die auf UV-induzierte Pyrimidindimere zurückzuführen sind, sind Basenaustausche (G:C → A:T) [Stary et al. 1997]. Für die UV-induzierte Entstehung von Hautkrebs sind u.a. solche Punktmutationen verantwortlich [Kanjilal et al 1993, Beissert und Granstein 1995]. Nach heutigem Erkenntnisstand ist vorrangig die UV-B Strahlung für die Krebsentstehung verantwortlich. Doch gibt es inzwischen Hinweise darauf, daß auch UV-A in hohen Dosen (beispielsweise bei der Benutzung von Sonnenbänken) die Tumorentstehung fördert [de Laat und de Gruijl 1996].

### 2.2.3. Oxidativer Stress an der menschlichen Haut

Vor ca. 1-2 Milliarden Jahren änderte sich die Zusammensetzung der irdischen Ur-Atmosphäre, die bis dahin hauptsächlich aus Wasserdampf, Stickstoff, Kohlendioxid, Methan und Ammoniak bestand und nahezu sauerstofffrei war. Die Entwicklung von sauerstoffproduzierenden Mikroorganismen und die Entstehung von Grünpflanzen führte zu einem Anstieg der Sauerstoffkonzentration. Heute besteht unsere Atmosphäre zu rund 21 % (v/v) aus Sauerstoff, zu 78 % (v/v) aus Stickstoff und zu 1 % (v/v) aus anderen Gasen, darunter 0,03 % (v/v) Kohlendioxid. Mit dem Anstieg der atmosphärischen Sauerstoffkonzentration konnte sich auf der Erde die aerobe Lebensweise etablieren, die

zur Energiegewinnung Sauerstoff als Elektronenakzeptor innerhalb der Atmungskette nutzt. Sauerstoff in Form von Ozon bewahrt außerdem sämtliches Leben auf der Erde vor einem Großteil solarer UV Strahlung (Abbildung 5). Die stratosphärische Ozonschicht (in ca. 20 km Höhe), die für die UV-Absorption verantwortlich ist, entsteht durch die Photolyse von molekularem Sauerstoff durch ultraviolette Strahlung ( $\lambda < 242$  nm), wobei zunächst atomarer Sauerstoff gebildet wird. Atomarer Sauerstoff verbindet sich mit molekularem Sauerstoff zu Ozon [Holleman und Wiberg 1985].



Doch der lebensnotwendige Sauerstoff kann unter bestimmten Bedingungen zu einem gefährlichen Zellgift werden. Die Entstehung von ROS kann zu oxidativen Schäden an Lipiden, Nukleinsäuren und Proteinen führen und macht schützende Abwehrmechanismen erforderlich.

#### 2.2.3.1. Reaktive Sauerstoffspezies und ihre Entstehung

Das natürlich vorkommende Sauerstoffmolekül besitzt zwei ungepaarte Elektronen, die in unterschiedlichen  $\pi^*$  Orbitalen lokalisiert sind und parallelen Spin aufweisen. Der Sauerstoff liegt im Triplettzustand ( ${}^3\text{O}_2$ ) vor und ist ein Diradikal. Diese Konstellation macht den Triplett-Sauerstoff sehr unreakтив, da er aufgrund des Spinverbots (Pauli-Prinzip) nicht mit Verbindungen im Singulett-Zustand reagieren kann. Reaktionspartner müssen entweder selbst angeregt sein oder der Sauerstoff muß aktiviert werden.

Die Aktivierung von molekularem Sauerstoff kann auf physikalischerem Weg durch Energieübertragung oder chemisch durch Elektronentransfer erfolgen [Elstner 1990]. Die physikalische Aktivierung führt zur Spinumkehr bei einem der beiden ungepaarten Elektronen. Als Folge sind beide  $\pi^*$  Orbitale mit einem Elektron besetzt, die antiparallelen Spin aufweisen bzw. zwei Elektronen mit antiparallelem Spin besetzen gemeinsam ein  $\pi^*$

Orbital. Sauerstoff in diesem Zustand wird als Singulett-Sauerstoff bezeichnet ( $^1\text{O}_2$ ). Biologisch ist nur die letztere Form des Singulett-Sauerstoff von Bedeutung [Elstner 1990]. Die chemische Aktivierung von Sauerstoff geht mit der Aufnahme von Elektronen einher. Der Sauerstoff wird reduziert. Die Aufnahme eines Elektrons durch Triplett-Sauerstoff resultiert in der Bildung des Superoxidanions ( $\text{O}_2^-$ ). Bei dieser Spezies ist ein  $\pi^*$  Orbital komplett mit zwei Elektronen, die antiparallelen Spin aufweisen, besetzt, das zweite  $\pi^*$  Orbital enthält ein freies Elektron. Das Superoxidanion ist folglich ein Radikal. Superoxidanionen entstehen unter physiologischen Bedingungen durch die unvollständige Reduktion des Sauerstoffs innerhalb der mitochondrialen Atmungskette. Circa 1-2 % der Elektronen verlassen das Cytochrom c bevor  $\text{O}_2$  vollständig zu Wasser reduziert wurde [Frei 1994]. Die Entstehung von Superoxidanionen erfolgt auch durch verschiedene enzymatische Reaktionen, z.B. durch die Xanthinoxidase, D-Aminosäureoxidases oder NADPH abhängige Oxidasen in phagozytierenden Zellen, wie Neutrophilen oder Monozyten [Frei 1994].

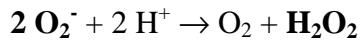
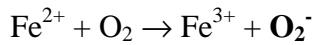
Die Aufnahme eines weiteren Elektrons durch Superoxidanionen führt zur vollständigen Besetzung der  $\pi^*$  Orbitale des Sauerstoffmoleküls. Bei der entstehenden Spezies handelt es sich um Peroxidanionen ( $\text{O}_2^{2-}$ ), ihre protonierte Form ist Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Biologisch relevant ist die Entstehung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  infolge der enzymatisch katalysierten Dismutation von Superoxidanionen zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid (Superoxiddismutasesreaktion).  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird durch die Katalase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut.

Die Ein-Elektronenreduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  führt zur homolytischen Spaltung der O-O Bindung und zur Entstehung der äußerst reaktiven Hydroxylradikale ( $\text{OH}^\bullet$ ) [Czapski 1984]. Die vollständige Reduktion des Sauerstoffs ist mit der Aufnahme von 4 Elektronen im Wassermolekül, beispielsweise durch die Reaktionen in der mitochondrialen Atmungskette, erreicht.

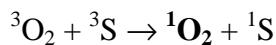
Reaktive Sauerstoffspezies sind außerdem das Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) und andere Stickoxide, Hypochlorid [Panasenko et al. 1994], Ozon, sowie Alkoxy- ( $\text{RO}^\bullet$ ) und Peroxylradikale ( $\text{ROO}^\bullet$ ).

Neben den bereits erwähnten biologischen Quellen reaktiver Sauerstoffspezies entstehen ROS auch auf anderen Wegen. Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid und

Hydroxyradikale können im wässrigen Milieu und Anwesenheit von Metallionen ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ) aus molekularem Sauerstoff spontan entstehen. Folgende Reaktionen laufen ab [Halliwell und Gutteridge 1992]:



Die Entstehung von Singulett-Sauerstoff ist durch Energieübertragung von angeregten Sensitizermolekülen auf molekularen Triplett-Sauerstoff, die zur Spinumkehr eines ungepaarten Elektrons führt, möglich. Wie in Kapitel 6 dargestellt ist, führt die Absorption von Strahlungsenergie durch einen Sensitizer ( $\text{S}^0$ ) zu dessen Anregung ( ${}^1\text{S}$ ,  ${}^3\text{S}$ ). Der Sensitizer im angeregten Triplettzustand überträgt seine Energie auf Triplett-Sauerstoff ( ${}^3\text{O}_2$ ):



### 2.2.3.2. Antioxidative Abwehrmechanismen

Die Haut, als äußere Umhüllung des menschlichen Organismus, ist permanent Umwelteinflüssen, wie ultraviolettem Licht, ausgesetzt. Durch Absorption von UV-Strahlung durch endogene Sensitizer, die zur Entstehung von ROS führt, werden DNA, Proteine, Zucker und Lipide oxidiert [Sies 1986]. Die Folgen sind u. a. DNA Schädigungen (Mutagenese, Cancerogenese), Proteinschäden (Enzymaktivierung) und Lipidperoxidation (Membranschäden).

An diesen oxidativen Stress ist die Haut mit einer Reihe von antioxidativen Schutzmechanismen angepaßt. Antioxidantien verhindern die Bildung und die Verbreitung von ROS. Man unterscheidet enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien, die enzymatischen Antioxidantien werden außerdem in primäre und sekundäre Antioxidantien eingeteilt.

#### *Nicht-enzymatische Antioxidantien*

Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien gehören die Radikalfänger. Das sind Moleküle, die ungepaarte Elektronen abfangen und selbst zu Radikalen werden. Da diese Radikale relativ stabil sind, können auf diese Weise Oxidationsketten unterbrochen werden. Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien gehören auch Moleküle, mit deren Hilfe oxidierte Radikalfänger regeneriert werden.

Wichtige lipophile, nicht-enzymatische Antioxidantien sind  $\alpha$ -Tocopherol, Ubichinon und Ubichinol, sowie  $\beta$ -Carotin. Diese Moleküle wirken als Radikalfänger (z. B.  $\alpha$ -Tocopherol) bzw. können mit Singulett-Sauerstoff reagieren (z. B.  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Carotin). Das Redox-System Ubichinol/Ubichinon ist an der Regenerierung von  $\alpha$ -Tocopherol-Radikalen beteiligt, sowie selbst ein Radikalfänger [Fuchs et al. 1992].

Die wichtigsten hydrophilen, nicht-enzymatischen Antioxidantien sind Ascorbat und Glutathion. Beide Moleküle sind am Recyclingmechanismus oxidierter Radikalfänger beteiligt. Glutathion fungiert darüberhinaus selbst als Radikalfänger. Ihm kommt bei der Abwehr von UV-Schäden in Zellen der menschlichen Haut (Fibroblasten, Keratinozyten) eine besondere Bedeutung zu. An dermalen Fibroblastenkulturen konnte gezeigt werden, daß die Reduzierung der intrazellulären Glutathionkonzentration, die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber zytotoxisch wirkendem UV-B und UV-A Licht deutlich erhöht [Tyrrell und Pidoux 1986, 1988]. Wie von *Connor und Wheeler* an der Haut von Mäusen gezeigt wurde, kommt es unmittelbar nach der UV Exposition zur Abnahme der Glutathionkonzentration [Connor und Wheeler 1987]. Auch der  $\alpha$ -Tocopherol-, Ubichinon- und Ascorbat-Spiegel sinkt infolge von UV-B Bestrahlung [Fuchs et al. 1989]. Die Abbildung 6 faßt die Mechanismen der Radikalfängerwirkung und -regenerierung zusammen.

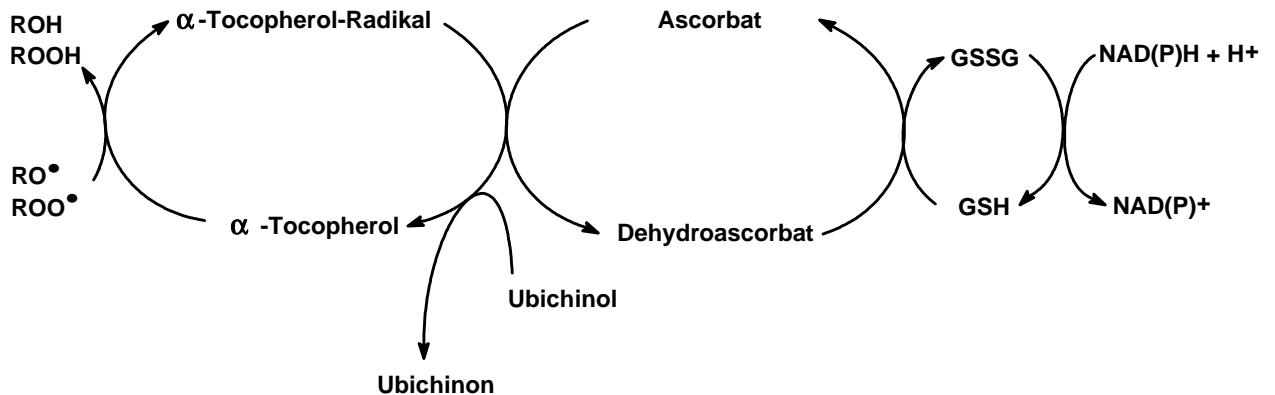


Abbildung 6: Recyclingmechanismen von nicht-enzymatischen Antioxidantien nach Shindo et al. 1994

### Enzymatische Antioxidantien

Zu den enzymatischen Antioxidantien gehören Enzyme, die ROS abbauen sowie Enzyme, die oxidierte Radikalfänger regenerieren. Diese antioxidativen Enzyme werden als primäre Antioxidantien bezeichnet [Urban 1995]. Zu den sekundären enzymatischen Antioxidantien werden jene Enzyme gezählt, die oxidierte Proteine abbauen, Lipidhydroperoxide metabolisieren sowie DNA-Schäden reparieren. Primäre enzymatische Antioxidantien sind die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase sowie die Glutathion-Peroxidase und -Reduktase (GSH-Px, GSSG-Red).

Wie die nicht-enzymatischen Antioxidantien werden auch die enzymatischen Antioxidantien von UV-Strahlung beeinflusst. Die SOD Aktivität in der Haut von Mäusen sinkt nach einer einmaligen UV-B Bestrahlung signifikant ab und regeneriert sich innerhalb von 72 h [Miyachi et al. 1987]. Ursache ist eine Schädigung des Proteins durch ROS z. B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Bray und Cookle 1974]. Auch die Aktivitäten der Katalase und der Glutathion-Reduktase nehmen infolge von UV-B Bestrahlung ab. Dies wurde sowohl an der Haut von Mäusen [Fuchs et al. 1989] als auch an humanen Keratinozytenkulturen nachgewiesen [Punnonen et al. 1991].

Stunden bis Tage nach einem oxidativen Angriff durch UV-induzierte ROS, kommt es zur Regenerierung der hauteigenen Antioxidantien. Im Falle der Glutathion verbrauchenden

und regenerierenden Enzyme (GSH-Px, GSSG-Red), aber auch der SOD erfolgt eine Erhöhung der Enzymkonzentration einige Tage nach der UV-Exposition [Shindo et al. 1994].

## 2.2.4. Schutzmechanismen der Haut vor ultravioletter Strahlung

### *2.2.4.1. Pigmentierung*

Die Absorption von UV-Strahlung in der Haut wird durch Makromoleküle, wie Proteine (Tyrosin-, Tryptophanseitenketten) oder DNA, hervorgerufen. Die wichtigsten UV-absorbierenden Substanzen in der Haut sind jedoch die Melanine. Diese Pigmente werden in den Melanosomen der in der Basalschicht der Epidermis vorkommenden Melanozyten produziert. Melanosomen sind vom Golgi-Apparat abgeschnürte, tyrosinasehaltige Vesikel. Im Verlaufe der Melanosomenreifung reichert sich Melanin durch das Wirken der Tyrosinase in den Melanosomen an. Biosynthesevorstufen für Melanin sind Tyrosin und 3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa). Grundsätzlich werden zwei Arten von Melaninen unterschieden: die schwarzbraunen, nahezu unlöslichen, gegen Chemikalien sehr resistenten Eumelanine und die gelblich, rötlichen Phaeomelanine. Letztere sind in verdünnten Alkalien löslich und kommen seltener vor als die Eumelanine. In den menschlichen Melanozyten werden jedoch stets beide Formen produziert.

Die reifen Melanosomen wandern durch die dendritischen Zellfortsätze der Melanozyten in die benachbarten Keratinozyten, wo sie in Melanosomenkomplexen verpackt werden. Die Hautfarbe des Menschen wird durch Anzahl, Größe und Verteilung dieser Melanosomenkomplexe bestimmt.

Die Melaninbildung wird durch UV Licht induziert. Man kann zwei Arten der UV-induzierten Pigmentierung unterscheiden [Rorsman 1989]. Die sofortige Bräunung (immediate pigment darkening, IPD), die noch während der UV-Bestrahlung einsetzt, beruht auf der Oxidation des in der Haut bereits vorhandenen Melanin-Pigments. Das IPD ist nicht von Dauer, es bildet sich bereits wenige Stunden nach der Bestrahlung zurück.

Diese Bräunung wird hauptsächlich durch UV-A hervorgerufen. Daneben gibt es die verzögerte Bräunung (delayed tanning, DT). Sie ist erst einige Tage nach der UV-Exposition sichtbar und beruht auf der Neubildung von Melanin. Diese Bräunung ist von längerer Dauer. UV-B induziert das DT effektiver als UV-A.

Neben der Absorption von UV Strahlung durch Melanin [Musk und Parsons 1987], besteht die schützende Wirkung dieser Pigmente auch darin, freie Radikale abzufangen und so unschädlich zu machen [Pathak und Stratton 1968].

#### *2.2.4.2. Verdickung der Epidermis*

Infolge der Einwirkung von UV-Strahlung auf die menschliche Haut kommt es zu einer deutlichen Verdickung der Epidermisschichten [Lavker und Kaidbey 1997]. Es entsteht eine sogenannte Lichtschwiele. Dies beruht auf Störungen in der Keratinozytendifferenzierung. Die im Normalfall erfolgende Abflachung der Keratinozyten während ihrer Differenzierung, wird durch UV Einwirkung gestört. Die Zellen flachen sich nicht so stark ab und verlieren ihre regelmäßige Anordnung. Außerdem kommt es zu einer verstärkten Proliferation und einer erhöhten Zahl der übereinander liegenden Zellschichten [Bernerd und Asselineau 1997]. Die Folge ist eine Verdickung der gesamten Epidermis bis zum Doppelten ihrer ursprünglichen Ausdehnung [NIH Consens Statement 1989]. Diese Effekte werden sowohl durch UV-B als auch UV-A Strahlung ausgelöst.

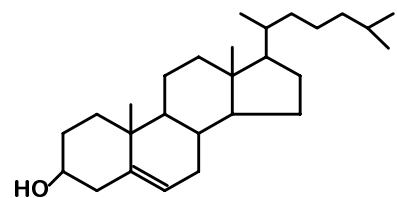
Durch die Verdickung der Epidermis (einschließlich der Hornschicht) wird ein größerer Teil der besonders gefährlichen UV-B Strahlung absorbiert [Bruels et al. 1984] und gelangt somit nicht in tiefere Hautschichten.

#### *2.2.4.3. Zelluläre Anpassungsmechanismen an UV-induzierten oxidativen Stress*

Oxidativer Stress, hervorgerufen durch  $H_2O_2$ , UV-A Bestrahlung oder Glutathionmangel, bewirkt in humanen Fibroblasten die Induktion der Hämoxxygenase 1 [Vile und Tyrrell 1993]. Als Stressantwort steigen sowohl der mRNA Spiegel, als auch die Aktivität dieses mikrosomalen, Häm abbauenden Enzyms. Die Folge des Hämabbaus ist ein intrazellulärer

Anstieg der Konzentration von freiem  $\text{Fe}^{2+}$ . Diesem Signal folgt eine Erhöhung der Ferritinkonzentration. Ferritin ist ein  $\text{Fe}^{2+}$  komplexierendes Protein, das den intrazellulären  $\text{Fe}^{2+}$ -Spiegel reguliert. Da ungebundenes  $\text{Fe}^{2+}$  die Lipidperoxidation induzieren kann (Vgl. Abschnitt 1.2.3.1.), führt eine Erhöhung der Ferritinkonzentration, zu einer effektiveren Komplexierung von  $\text{Fe}^{2+}$  Ionen und somit zu einer Erhöhung des antioxidativen Status der Zelle.

### 3. Cholesterol als Stratum corneum Lipid



#### 3.1. Eigenschaften und Funktionen von Cholesterol in Biomembranen

Das Cholesterolmolekül besitzt eine amphipatische Struktur. Das planare Steroidgerüst enthält eine hydrophile Hydroxylgruppe in  $3\beta$ -Stellung sowie eine hydrophobe aliphatische Seitenkette am Kohlenstoffatom 17. Cholesterol ist Bestandteil von fast allen eukaryontischen Zellmembranen. Entsprechend seiner Struktur baut es sich so in eine Lipiddoppelschicht ein, daß die hydrophile OH-Gruppe an die wässrige Phase grenzt und sich das Steroidgerüst und die aliphatische Seitenkette im hydrophoben Kettenbereich der Phospholipide befinden.

Cholesterol beeinflußt die Eigenschaften der Lipidmembran. Es ist bereits lange bekannt, daß der Einbau von Cholesterol den Ordnungsgrad der Membran erhöht. Durch die Behinderung der cis-trans-Isomerisierungen an Doppelbindungen kommt es zu einer engeren Packung der Acylketten. Dieser Effekt ist als ‘condensing effect’ beschrieben [Tajima und Gershfeld 1978, Stillwell et al. 1994] und resultiert in einer Verringerung der Membranpermeabilität [Demel et al. 1972]. Darüber hinaus kann Cholesterol die Membranfunktionalität auch durch Wechselwirkung mit Membranproteinen, z. B. der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase in Erythrozytenmembranen, beeinflussen [Yeagle 1983].

#### 3.2. Cholesterolbiosynthese in der Haut

Cholesterol wird im menschlichen Organismus hauptsächlich in der Leber und der Darmmukosa synthetisiert. Hauptort der extrahepatischen, extraintestinalen Cholesterolbiosynthese ist die Haut [Melnick 1990]. Sowohl die Zellen der Dermis als auch der Epidermis (Keratinozyten des Stratum basale) synthetisieren Cholesterol.

Die de novo Synthese von Cholesterol geht vom Acetyl Coenzym A aus. Über die Zwischenverbindung Acetoacetyl Coenzym A wird das 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A gebildet (HMG-CoA). Die Reduktion des HMG-CoA zum Mevalonat ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Biosynthese. Mevalonat wird schrittweise phosphoryliert und anschließend decarboxyliert. Das entstehende Isopentenyl-Pyrophosphat ( $C_5$ ) geht in mehrere Kondensationsschritte ein. Es entsteht zunächst Geranyl-Pyrophosphat ( $C_{10}$ ), anschließend das Farnesyl-Pyrophosphat ( $C_{15}$ ). Bis zu diesem Syntheseschritt finden alle Reaktionen im Zytosol der Zellen statt. Die Verknüpfung von zwei Molekülen Farnesyl-Pyrophosphat führt zur Entstehung von Squalen ( $C_{30}$ ), das nicht mehr wasserlöslich ist. Die weiterführenden Reaktionen finden an membranständigen Enzymen statt. Über eine Epoxidierung wird die Sauerstoff-Funktion am  $C_3$  eingeführt, es folgen Zylkisierungen, 3 Demethylierungen, die Einführung der  $\Delta^5$ -Doppelbindung, sowie die Sättigung der aliphatischen Seitenkette.

Die Cholesterolbiosynthese wird sowohl in Leber und Darm als auch in der Haut über die HMG-CoA Reduktase Reaktion reguliert. Hohe Mevalonat- und Cholesterolkonzentrationen hemmen die HMG-CoA Reduktase (Produkthemmung) und inhibieren damit die gesamte Biosynthese von Cholesterol. Die Regulation der hepatischen HMG-CoA Reduktase funktioniert hauptsächlich über die rezeptorvermittelte Aufnahme von Lipoproteinen (LDL). Diese binden an die LDL Rezeptoren der Leberzellen, werden endozytiert und in Lysosomen verdaut. Frei werdendes Cholesterol hemmt die HMG-CoA Reduktase. Die Cholesterolbiosynthese in der Leber wird außerdem durch Oxysterole ( $7\alpha$ - und  $7\beta$ -Hydroxy- sowie  $7$ -Keto-Cholesterol) gehemmt [Kandutsch und Chen 1973].

Die Cholesterolbiosynthese in der Haut läuft unabhängig vom übrigen Cholesterolstoffwechsel ab. Die Regulation der epidermalen HMG-CoA Reduktase erfolgt nicht durch die LDL Konzentration. Die differenzierten Keratinozyten besitzen keine LDL Rezeptoren. Lediglich die undifferenzierten basalen Keratinozyten weisen noch LDL Rezeptoren auf. Die Funktion des HMG-CoA Inhibitors übernimmt in der epidermalen Cholesterolbiosynthese das Cholesterol-3-sulfat [Williams et al. 1985]. Dieses kann im Gegensatz zu LDL die Zellmembranen auch ohne Rezeptor passieren. Cholesterol-3-sulfat entsteht durch die Übertragung eines Sulfatrestes vom  $3'$ -Phospho-adenosin- $5'$ -phosphat

(PAPS) auf das Cholesterol. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Cholesterolsulfotransferase.

### **3.3. Die Bedeutung von Cholesterol und seiner Derivate für die Permeabilitätsbarriere des Stratum corneums**

Das Stratum corneum der menschlichen Haut enthält sehr hohe Konzentrationen an freien und veresterten Sterolen, sowie Cholesterol-3-sulfat. In verschiedenen Arbeiten variiert die ermittelte Cholesterolkonzentration zwischen 18,8 % [Lampe et al. 1983] und 43,5 % [Zellmer und Lasch 1997]. Die Konzentrationen von Sterolestern werden mit 12,4 % (Lampe) und 9,4 % (Zellmer), der Gehalt an Cholesterol-3-sulfat mit 3,4 % (Lampe) und 2,1 % (Zellmer) angegeben.

Die besondere Lipidzusammensetzung ist für die Rigidität und geringe Permeabilität des Stratum corneums verantwortlich. Die hauptsächlich aus Ceramiden, Sterolen und freien Fettsäuren bestehenden Lipidschichten werden durch eine Vielzahl von Wasserstoffbrücken stabilisiert. Hinzu kommt der kondensierende Effekt durch die Einlagerung von Cholesterol in hohen Konzentrationen. Zusätzliche Festigkeit bekommen die interzellulären Lipidlamellen durch das Ceramid I, das aufgrund seiner langen Acylkette (Abbildung 4) mehrere benachbarte Lipidschichten durchspannt und somit ihren Zusammenhalt verstärkt. Möglicherweise trägt auch Cholesterol-3-sulfat zur Stabilisierung der MILS bei. Wie *Landmann* beschreibt, ermöglicht es durch seine negative Ladung die Verbindung benachbarter Lipidschichten über divalente Kationen ( $Ca^{2+}$ ) [Landmann 1991]. Diese Ansicht ist jedoch umstritten. *Serizawa* und Mitarbeiter konnten keinen Zusammenhang zwischen der Cholesterol-3-sulfat Konzentration und dem Zusammenhalt der Stratum corneum Lipidlamellen feststellen [Serizawa et al. 1992].

## 4. Material und Bestrahlungsbedingungen

### 4.1. Chemikalien und Geräte

*Chemikalien:*

**Bengal Rosa** (4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodo-fluorescein sodium salt), Sigma, St. Louis, MO, USA

**n-Butanol**, > 99,5% (GC), Fluka, Neu-Ulm

**Non-Hydroxy Fatty Acid Ceramide** (Typ III); **Hydroxy Fatty Acid Ceramide** (Typ IV), Sigma, St. Louis, MO, USA

**Chloroform**, HPLC-rein, Merck, Darmstadt

**Cholesterol**, Sigma, St. Louis, MO, USA

**Cholesterol-3-sulfat**, Sigma, St. Louis, MO, USA

**CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O**, VK Labor- und Feinchemikalien

**DCF** (2',7'-Dichlorodihydro-fluorescin diacetate), Molecular Probes, Eugene, OR, USA

**Diethylether**, Fluka, Neu-Ulm

**Ethylacetat**, HPLC-rein, Fluka, Neu-Ulm

**β-D-Glukose**, Merck, Darmstadt

**HEPES** (0,1 M); 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure, (pH 7,4), Fluka, Neu-Ulm

**Hematin**, from bovine blood, Sigma, St. Louis, MO, USA

**n-Hexan**, HPLC-rein, Fluka, Neu-Ulm

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** (30%ig), Fluka, Neu-Ulm

**HPODE** [13(S)-Hydroperoxy-(9Z,11E)-octadeca-dienoic Acid], Sigma, St. Louis, MO, USA

**HPTLC-Fertigplatten Si 60**, Merck, Darmstadt

**7-Keto-Cholesterol**, Sigma, St. Louis, MO, USA

**Kieselgel Si 60**, Merck, Darmstadt

**Methanol**, HPLC-rein, Merck, Darmstadt

**PBS** (Phosphate Buffered Saline), 0,145 M, pH 7,4; Fluka, Neu-Ulm

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	1,98 g/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,157 g/l
NaCl	8,1 g/l

**PSC-Fertigplatten**, Kieselgel 60, Merck, Darmstadt

**Scintillationscocktail**, Ultima Gold Canberra Packard GmbH, Dreieich

**Sephadex G 25 Medium**, Pharmacia, Fine Chemicals, Upsala, Schweden

**Stearinsäure**, Sigma, St. Louis, MO, USA

**1,1,3,3-Tetraethoxypropan**, Approx. 97 %, Sigma, St. Louis, MO, USA

**TMPD** (N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine), Sigma, St. Louis, MO, USA

**2-Thiobarbitursäure**, Minimum 98 %, Sigma, St. Louis, MO, USA

**Trichloressigsäure**, zur Analyse, Merck, Darmstadt

**TRIS** [Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan], 0,1 M, pH 7,4; Merck, Darmstadt

**TRITON X-100**, Serva, Feinbiochemica, Heidelberg

**6-[<sup>3</sup>H]-Thymidin**, American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO, USA

*Geräte:*

**AMD**, CAMAG, Muttenz, Schweiz

**Autosizer II C**, Malvern Instruments, Worcestershire, UK

**Differential Scanning Calorimeter**, Microcal DC-2, Northampton, MA, USA

**Clark-Elektrode**, RE K1-1N, Biolytik, Bochum

**Extrusionseinheit**, LiposoFast™ Basic und LiposoFast™ pneumatic, AVESTIN, Inc.,

Ottawa, Canada

Porengröße des Filters: 200 nm

**Fluoreszenzspektrophotometer**, F 4500, HITACHI, Inc.

$\lambda_{\text{ex}} = 515 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 553 \text{ nm}$  (TBARS)

$\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$  (DCF)

Spaltbreite: Ex 2,5 nm; Em 5,0 nm

**Glukoseoxidase-Enzymelektrode**, ESAT 6660, Medingen, Dresden

**Hochdruck-Quecksilberdampflampe**, HBO 200W, Osram, München

Filter: KG 3, UG 11, Schott, Mainz

**HPLC S 1000**, SYKAM, Gilching

DIOL-Säule (250 mm x 4 mm), Altech Associates Inc., Deerfield, IL, USA

UV-Detector, Linear 204, Linear Instruments, Reno, Nevada, USA

$\lambda_{\text{abs}} = 215 \text{ nm}$

ELSD-Detector, MK III, Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA

Drift Tube Temperatur: 73 °C

Gas-Fluß: 1,80 l/min

**HPTLC Auftragegerät**, LINOMAT II, CAMAG, Muttenz, Schweiz

**Pocketradiometer**, RM 11, Dr. Göbel UV-Elektronik GmbH, Ettlingen

**Scintillationszähler**, Wallac 1410, Berthold, Berlin

**TLC Scanner II**, CAMAG, Muttenz, Schweiz

Lampe: Wolfram;  $\lambda_{\text{abs}} = 550 \text{ nm}$

Spaltbreite: 0,3 mm; Spaltlänge: 4 mm

Monochromatorbandbreite: 30 nm

**Zellharvester**, IH-110, Wohlen, Schweiz

## **4.2. Lipide**

### **4.2.1. Lipidmischungen**

Für die im folgenden vorgestellten Untersuchungen wurden synthetische und semi-synthetische Lipide in verschiedenen Mischungsverhältnissen zu Liposomen bzw. Lipidfilmen präpariert. Die Lipidmischungen enthielten neben Cholesterol-3-sulfat (ChS), Stearinsäure (SA) und Cholesterol (Ch), die beiden kommerziell erhältlichen Ceramide aus Rinderhirn (Cer) im Verhältnis 1/1. Der Cholesterolgehalt wurde von 0 % (w/w) bis 50 % (w/w) variiert, während die Konzentrationen der anderen Membranlipide, relativ zueinander, konstant gehalten wurden (Tabelle 2). Neben den Liposomen aus synthetischen

und semi-synthetischen Lipiden wurden auch Vesikel aus humanen Stratum corneum Lipiden (hSCLL) untersucht.

Tabelle 2: Lipidzusammensetzung der untersuchten Modellmembranen.  
 Abkürzungen: Cer, Ceramide; Ch, Cholesterol; ChS, Cholesterol-3-sulfat; SA, Stearinsäure; FA, Fettsäuren; hSCLL, humane stratum corneum Lipid Liposomen.  
 Lipidzusammensetzung der hSCLL nach *Zellmer und Lasch 1997*

<b>Suspension</b>	<b>Lipidzusammensetzung (Gewichts-%)</b>			
	<b>Cer</b>	<b>Ch</b>	<b>ChS</b>	<b>SA</b>
<b>1</b>	31	<b>50</b>	4	15
<b>2</b>	40	<b>35</b>	5	20
<b>3</b>	49	<b>20</b>	6	25
<b>4</b>	55	<b>10</b>	7	28
<b>5</b>	61	<b>0</b>	8	31
<b>"hSCLL" *)</b>	20	<b>43</b>	2	20

\*) hSCLL enthalten außerdem 15 % Sterolester und Triacylglycerole

#### 4.2.2. Lipidextraktion

Lipide des menschlichen Stratum corneums wurden aus Hornhautstücken der Fußsohle nach einer modifizierten Methode von *Bligh und Dyer* gewonnen [Bligh und Dyer 1959]. Ca. 1 g Hornhaut wurde mit 30 ml Chloroform/Methanol = 1/1 (v/v) über Nacht gerührt und anschließend abfiltriert. Der Extrakt wurde gegen 10 ml 0,145 M PBS (pH 7,4) ausgeschüttelt. Auf diese Weise trennt sich eine wässrige von einer organischen Phase ab. Letztere enthält die Lipide und kann in einem Scheidetrichter von der wässrigen, pufferhaltigen Phase separiert werden. Die Lipide wurden im Stickstoffstrom getrocknet und über Nacht unter reduziertem Druck aufbewahrt. Die exakte Zusammensetzung des Extrakts wurde mit AMD unterstützter HPTLC bestimmt (Tabelle 2).

#### 4.2.3. Säulenchromatographie

Der Stratum corneum Lipidextrakt wurde säulenchromatographisch weiter aufgereinigt. Verwendet wurde eine Säule von 65 cm Länge mit 1,5 cm Durchmesser. Das Kieselgel (Si 60) wurde im Elutionsmittel in die Säule gefüllt und einige Stunden bei 4 °C equilibriert. Der Lipidextrakt (20 mg) wurde auf die Säule aufgetragen und mit Diethylether/n-Hexan = 85/15 (v/v) eluiert. Die Flußrate betrug 0,5 ml/min. Das Eluat wurden in 50 Fraktionen von jeweils ca. 1 ml aufgefangen. Die lipidhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und ihre Zusammensetzung mit AMD unterstützter HPTLC bestimmt.

#### 4.2.4. Präparative Dünnschichtchromatographie

Auf PSC-Fertigplatten (Kieselgel 60) wurden 5 mg Stratum corneum Lipidextrakt aufgetragen und die Platte mit Chloroform/Methanol = 95/5 (v/v) in einer Horizontalkammer entwickelt. In diesem Laufmittelgemisch wurden die Lipide von polaren Verunreinigungen getrennt, die auf der Auftragelinie liegen blieben. Nach der Entwicklung konnten diese polaren Substanzen aus der Platte herausgekratzt werden. Das übrige Kieselgel wurde ebenfalls von der Platte entfernt. Die Lipide wurden mit Chloroform/Methanol = 1/1 (v/v) extrahiert und das Kieselgel durch mehrfaches Zentrifugieren abgetrennt.

#### 4.2.5. Liposomen

Zur Präparation der Liposomen wurden die Lipide in Chloroform, Methanol bzw. Chloroform/Methanol = 1/1 (v/v) gelöst und in den verschiedenen Zusammensetzungen gemischt (Tabelle 2). Die Lösungsmittel wurden im Stickstoffstrom verdampft und das Lipid über Nacht unter reduziertem Druck getrocknet. Mit der Zugabe von 1 ml Puffer (Tris/HCl 0,1 M, pH 7,4) und anschließendem Vortexen wurden die Lipide hydratisiert. Durch Filterextrusion wurden Vesikel einheitlicher Größe präpariert. Die Extrusionseinheit wurde auf eine Temperatur über der Kettenschmelztemperatur der Lipide temperiert.

Die Kettenmeltschmelztemperaturen der Membranlipide wurden durch Differential Scanning Calorimetry (DSC) bestimmt. In Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung, insbesondere der Cholesterolkonzentration, unterscheiden sich die Temperaturprofile der Vesikelsuspensionen, wie Abbildung 7 zeigt. In den Liposomen ohne Cholesterin wurden drei Maxima bei 33,1 °C, 61,5 °C und 68,1 °C gefunden. In den Vesikeln mit 10 % Cholesterin kommt es zum Abflachen und einer Verschiebung der Maxima. Während das erste lokale Maximum nicht mehr auftritt, liegen die beiden anderen Temperaturmaxima bei 59,9 °C und 65,9 °C. In der Suspension mit 35 % Cholesterin wurde lediglich ein sehr flacher Übergang bei 61,1 °C gefunden.

Die Liposomen wurden bei 75 °C insgesamt 10 mal extrudiert und bis zur Verwendung im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

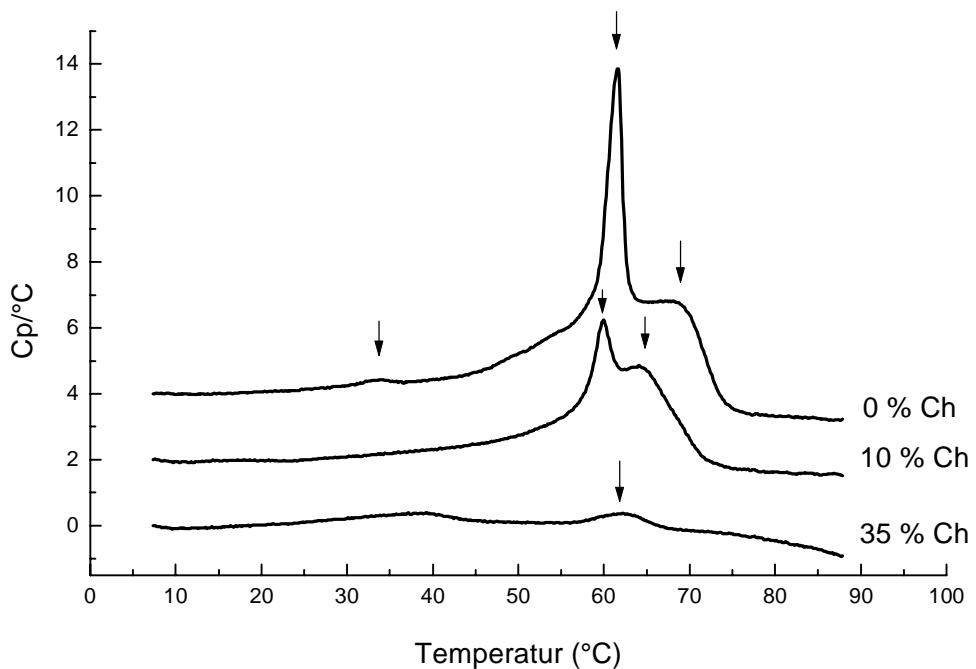


Abbildung 7: Temperaturprofile von Liposomensuspensionen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt. Die Maxima liegen bei 33,1 °C, 61,5 °C und 68,1 °C (0 % Cholesterin), bei 59,9 °C und 65,9 °C (10 % Cholesterin) und 61,1 °C (35 % Cholesterin).

Die Größenverteilung der Liposomensuspension wurde durch dynamische Lichtstreuung ermittelt. In Abbildung 8 ist die Größenverteilung der Vesikel nach der Extrusion

dargestellt. Circa 70 % aller Liposomen haben einen Durchmesser zwischen 180 nm und 280 nm.

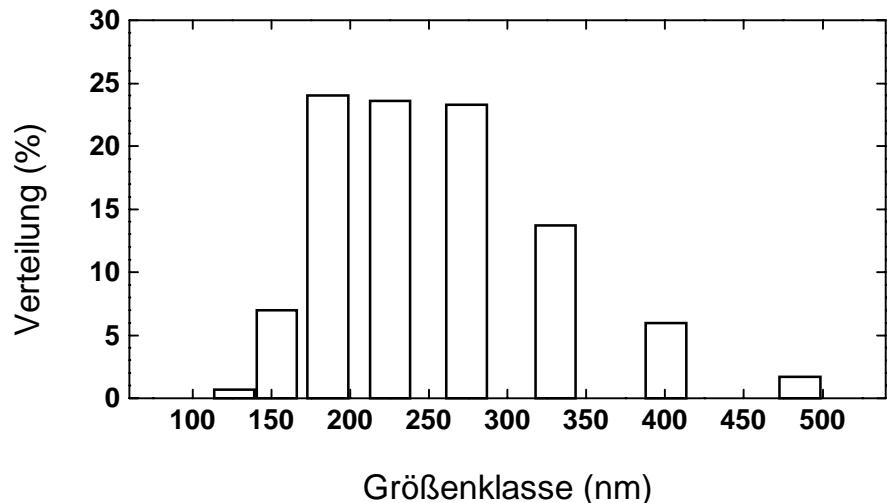


Abbildung 8: Größenverteilung der Vesikel nach Filterextrusion (Porengröße 200 nm).

#### 4.2.6. Lipidfilme

Je 10  $\mu$ l Liposomensuspension (10 mg/ml) wurden auf ein Deckgläschen pipettiert und bei Raumtemperatur angetrocknet. Die entstandenen Lipidfilme wurden bis zur Verwendung bei -18°C aufbewahrt.

## **4.3. Bestrahlungsbedingungen**

### **4.3.1. Künstlich erzeugtes UV Licht**

Als UV-Strahlungsquelle diente eine Hochdruck-Quecksilberdampflampe (HBO 200 W). Diese Lampen emittieren ein Linienspektrum, das von UV-C (238 nm) über UV-B und UV-A, bis in den sichtbaren Bereich (579 nm) reicht (Abbildung 9). Wellenlängen mit den höchsten Intensitäten sind 366 nm und 313 nm. Zur Eingrenzung des Strahlungsbereiches wurden zwei Filter verwendet (KG 3, UG 11, SCHOTT). So ließ sich aus dem breiten Spektrum ein Bereich auswählen, der von 300 nm bis 400 nm reichte (Abbildung 9). Der Abstand der Probenküvette von der Strahlungsquelle betrug 15 cm. Die Intensitäten der UV-Strahlung an dieser Stelle betrugen 52,1 mW/cm<sup>2</sup> UV-A und 0,211 mW/cm<sup>2</sup> UV-B.

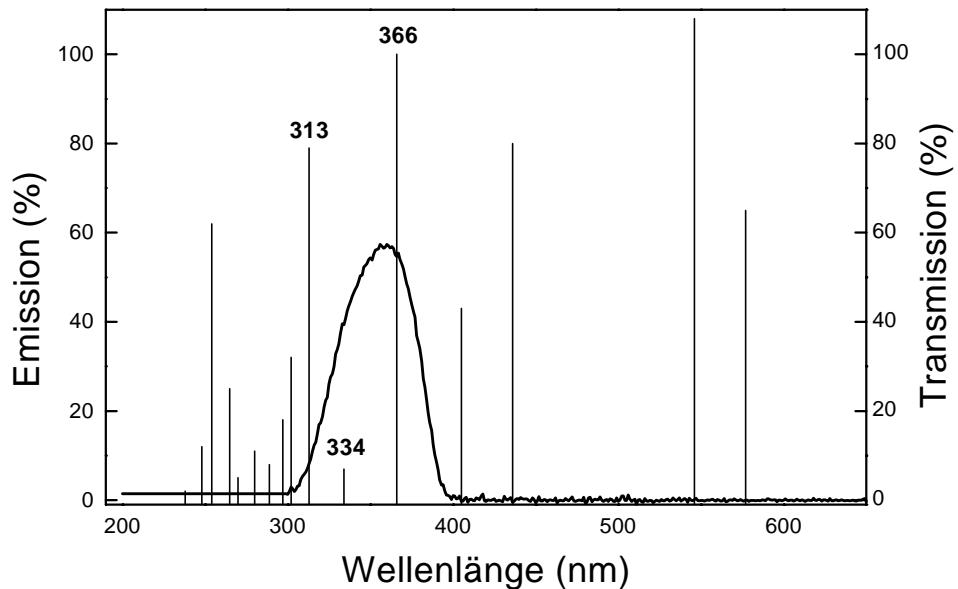


Abbildung 9: Linienemissionspektrum der Hochdruck-Quecksilberdampflampe HBO 200 W. Die Intensitäten sind relativ zur Intensität der Wellenlänge 366 nm in Prozent angegeben. Die Transmission der Filter ist ebenfalls in Prozent dargestellt. Aus der Kombination beider Filter resultiert ein effektiver Strahlungsbereich von 300 nm bis 400 nm.

#### 4.3.2. Natürliches Sonnenlicht

Die Liposomen wurden an einem sonnigen Sommertag über 12 h der natürlichen Sonnenstrahlung ausgesetzt. Die Abbildung 10 zeigt die an diesem Tag gemessene Intensität der UV Strahlung in Halle/Saale.

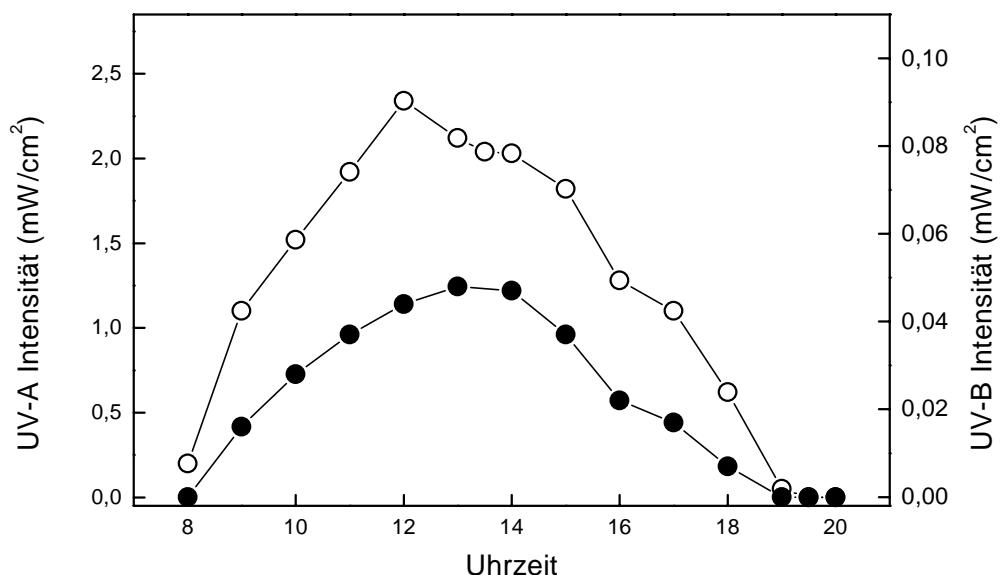


Abbildung 10: UV Strahlungsintensitäten des natürlichen Sonnenlichts an einem sonnigen Sommertag (14.08.97) in Halle/S. ( $52^\circ$  nördliche Breite,  $12^\circ$  östliche Länge). UV-A Strahlung (○), UV-B Strahlung (●).

## 5. Nachweis der UV-induzierten Oxidation an Stratum corneum Lipiden

### **5.1. Nachweis und Quantifizierung von Lipidoxidationsprodukten**

Es gibt unterschiedliche Strategien zum Nachweis der Lipidperoxidation. So lassen sich entstehende Oxidationsprodukte direkt oder über Folgereaktionen nachweisen und quantifizieren. Beispielsweise können Lipidperoxide sowohl durch ihre Reaktion mit Iodid zu elementarem Iod, als auch durch einen enzymatischen Test mittels Glutathion-Peroxidase, die GSH zu GSSG oxidiert, detektiert werden [Gutteridge und Halliwell 1990]. Weitere Spezies, die während der Lipidperoxidation entstehen, sind gasförmige Kohlenwasserstoffe, wie Ethan, das gaschromatographisch quantifiziert werden kann [Halliwell und Gutteridge 1989]. Auch der Nachweis von Aldehyden, wie 4-Hydroxy-nonenal, hat sich als Methode zur Detektion der Lipidperoxidation etabliert [Esterbauer et al. 1986].

Neben dem Nachweis von Oxidationsprodukten kann die Lipidperoxidation über den Abbau bzw. Verlust von ungesättigten Fettsäuren verfolgt werden. Chromatographische Methoden (z. B. Dünnschichtchromatographie oder HPLC) sind für die Quantifizierung dieser Verbindungen am besten geeignet [Kim und LaBella 1987, Gutteridge und Halliwell 1990].

Darüber hinaus werden verschiedene spektroskopische Methoden genutzt, um den zeitlichen Verlauf der Lipidperoxidation zu beobachten. Die im Verlauf der Oxidation von mehrfach ungesättigten Lipidketten entstehenden konjugierten Diene absorbieren ultraviolette Strahlung im Bereich von 230 bis 235 nm [Halliwell und Gutteridge 1989].

Die Oxidation von Lipiden ist mit einem Verbrauch von Sauerstoff verbunden. Die Änderung der Sauerstoffkonzentration weißt die Lipidperoxidation direkt nach [Halliwell und Gutteridge 1989].

In der vorliegenden Arbeit wurde die durch UV Licht induzierte Lipidperoxidation mit den folgenden Methoden nachgewiesen und quantifiziert. Erstens wurden Lipidoxidationsprodukte (MDA, LOOH) direkt nachgewiesen. Zweitens wurde das

Ausmaß der Oxidation indirekt bestimmt, indem die Konzentrationen von nicht-oxidierten Membranlipiden bestimmt wurden. Als dritte Nachweismethode diente die Messung des während der Oxidation verbrauchten Sauerstoffs.

#### 5.1.1. Nachweis und Quantifizierung von Malondialdehyd

Malondialdehyd (MDA) ist ein Endprodukt der Lipidperoxidation, das ausschließlich aus mehrfach ungesättigten Lipiden entsteht. Im Laufe der Oxidation von Lipidketten mit mehreren isolierten Doppelbindungen entsteht ein Peroxylradikal (Abbildung 11). Dieses kann sich zu einem zyklischen Peroxid stabilisieren, aus dem ein bi-zyklisches Endoperoxid hervorgeht. Im sauren Milieu und bei hohen Temperaturen (100 °C) wird aus den Endoperoxiden MDA freigesetzt. Die Konzentration von MDA ist ein Maß für die stattgefundene Lipidperoxidation.

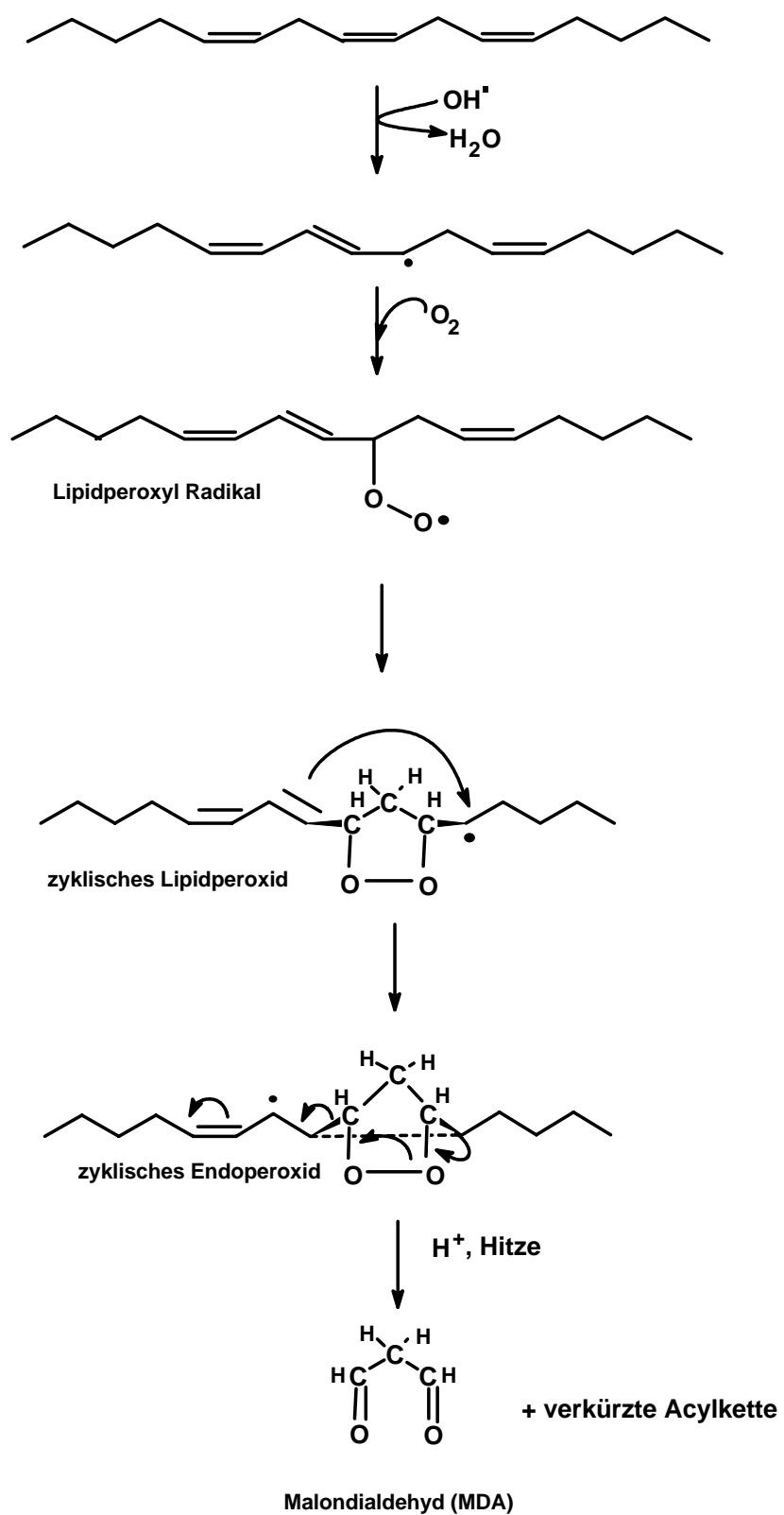


Abbildung 11: Entstehung von Malondialdehyd aus mehrfach ungesättigten Lipiden.

### 5.1.1.1. Nachweis von Malondialdehyd mit 2-Thiobarbitursäure

MDA wird durch seine Reaktion mit 2-Thiobarbitursäure (TBA) nachgewiesen. Es entsteht ein fluoreszierendes Addukt (Abbildung 12).

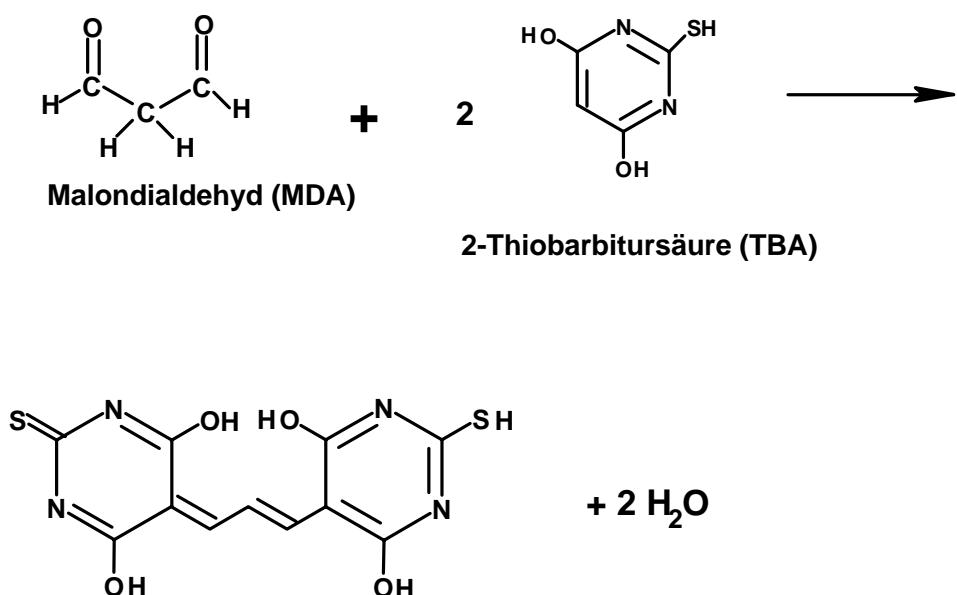


Abbildung 12: Reaktion von Malondialdehyd mit 2-Thiobarbitursäure.

Nach der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht wurde in Liposomen und Lipidfilmen die MDA Konzentration bestimmt. Je 50 µl Liposomensuspension wurden mit 100 µl Trichloressigsäure (10 %) und 150 µl 2-Thiobarbitursäure (0,67 %) über 15 Minuten bei 100 °C inkubiert. Der entstehende Fluorophor wurde mit 500 µl n-Butanol extrahiert und fluoreszenzspektrophotometrisch quantifiziert.

Die Maxima der Anregungs- und Emissionsspektren liegen bei 532 nm und 553 nm (Abbildung 13). Aufgrund der starken Überlappung von Anregungs- und Emissionsspektrum wurde zur Anregung eine Wellenlänge unterhalb des Anregungsmaximums gewählt ( $\lambda_{\text{ex}} = 515 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 553 \text{ nm}$ ). Als Eichstandard diente 1,1,3,3-Tetraethoxypropan, das unter den Reaktionsbedingungen Malondialdehyd freisetzt. Die Fluoreszenzintensität und die MDA Konzentration stehen in einer linearen Beziehung zueinander, wie die Abbildung 14 zeigt.

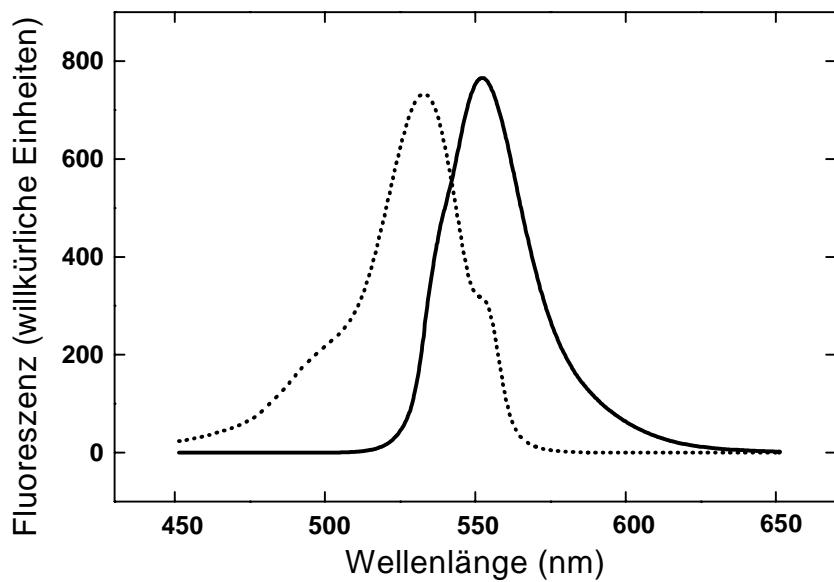


Abbildung 13: Anregungs- (····) und Emissionsspektrum (—) des MDA-TBA-Adduktes.  
Anregungsmaximum: 532 nm; Emissionsmaximum: 553 nm.

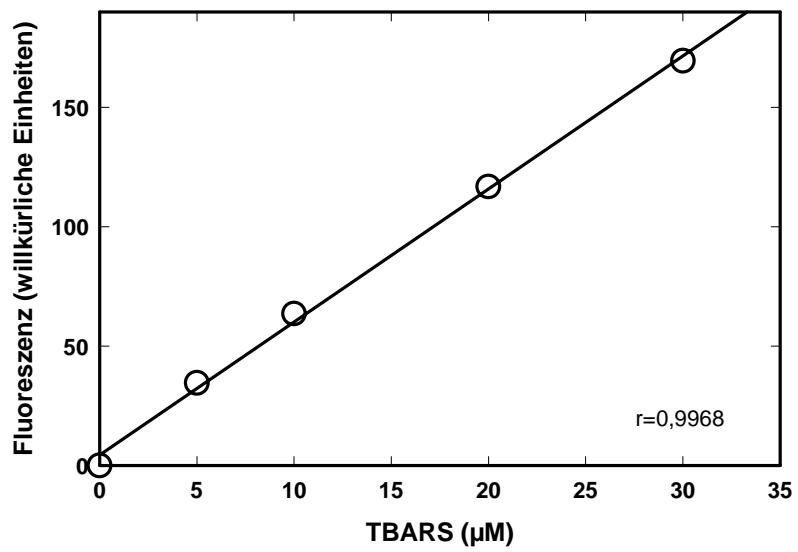


Abbildung 14: Eichkurve zum TBA-Test. Als Eichsubstanz diente 1,1,3,3-Tetraethoxypropan.

### 5.1.1.2. Weitere Nachweismöglichkeiten und biologische Bedeutung von Malondialdehyd

Alternativ zu dem vorgestellten Fluoreszenztest lässt sich MDA auch in freier Form nachweisen. Bei pH-Werten kleiner als 4,65 liegt MDA als Enol vor. Die Ausbildung einer zyklischen Struktur durch eine Wasserstoffbrückenbindung, führt zur Absorption im UV-Bereich ( $\lambda_{\text{abs}} = 245 \text{ nm}$ ) [Bird und Draper 1984, Draper und Hadley 1990].

Das Addukt aus MDA und TBA lässt sich auch photometrisch nachweisen. Der Farbstoff hat sein Absorptionsmaximum bei 532 nm (Abbildung 13). Daneben ist die Separierung und Quantifizierung des MDA-TBA-Adduktes mittels HPLC beschrieben [Montfoord et al. 1987, Bird und Draper 1984].

Stehen primäre Aminogruppen zur Verfügung, so entstehen mit MDA weitere fluoreszierende Verbindungen, wie SCHIFFsche Basen ( $\lambda_{\text{ex}} = 340\text{-}360 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 390\text{-}430 \text{ nm}$ ) und substituierte Pyridinderivate. MDA neigt außerdem zur Polymerisation. Das entstehende Polymer fluoresziert ebenfalls ( $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$ ) [Gutteridge et al. 1982]. In Abbildung 15 sind diese Reaktionsmöglichkeiten zusammengefaßt.

Die Entstehung von SCHIFFschen Basen durch die Polymerisation von Lipidoxidationsprodukten mit primären Aminogruppen von Proteinen ist auch für die Akkumulation von fluoreszierenden Verbindungen in der menschlichen Haut (Lipofuscine) verantwortlich [Dayan und Wolman 1993].

Malondialdehyd und andere Lipidoxidationsprodukte können *in vivo* mit DNA reagieren. Auf diese Weise kommt es zu Quervernetzungen der DNA Stränge, was Mutationen auslöst [Mukai und Goldstein 1976] sowie zur Bildung fluoreszierender Polymere führt [Fujimoto et al. 1984, Wang und Liehr 1995].

Lipidperoxidationsprodukte, insbesondere MDA spielen u. U. auch eine Rolle bei der Entstehung verschiedener Erkrankungen wie z. B. der Alzheimerschen Krankheit. Im Gehirn von Menschen, die an dieser Krankheit gestorben sind, wurden signifikant höhere MDA-Konzentrationen nachgewiesen als in Gehirnen von Menschen vergleichbaren Alters [Chia et al. 1983, 1984].

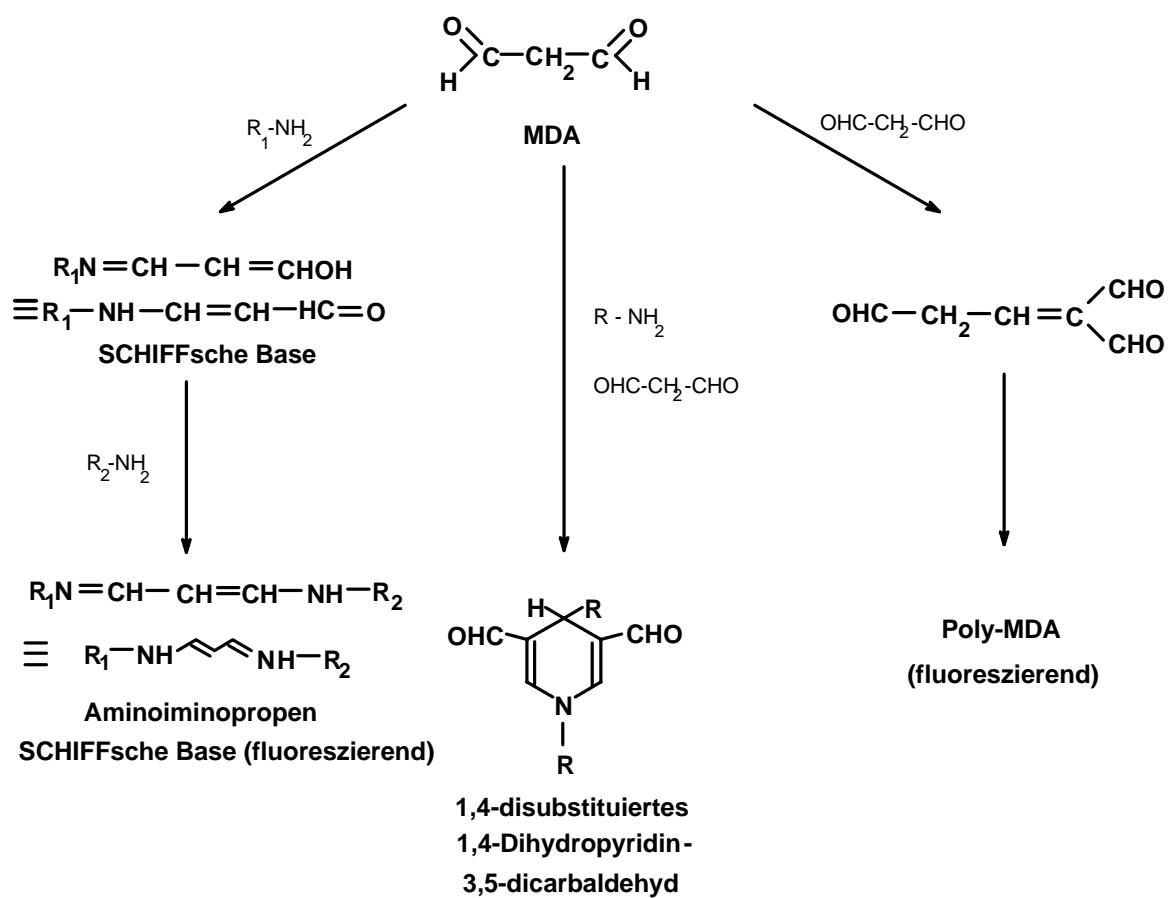


Abbildung 15: Entstehung von fluoreszierenden Produkten aus MDA und primären Aminen bzw. durch MDA-Polymerisation [Halliwell und Gutteridge 1989].

### 5.1.1.3. Entstehung von MDA in Modellmembranen durch UV Bestrahlung

Die UV-induzierte Lipidperoxidation führt zur Entstehung von MDA (Abbildungen 16 und 17). Sowohl in Liposomensuspensionen als auch Lipidfilmen steigt die MDA-Konzentration mit zunehmender Bestrahlungsdauer an. Aufgrund der vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten von MDA bezeichnet man die nachgewiesenen Verbindungen als thiobarbitursäure reaktive Substanzen (TBARS). Unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen ist TBA der Hauptreaktionspartner für MDA. Abbildung 16 zeigt die Bildung von TBARS in UV-bestrahlten Liposomensuspensionen.

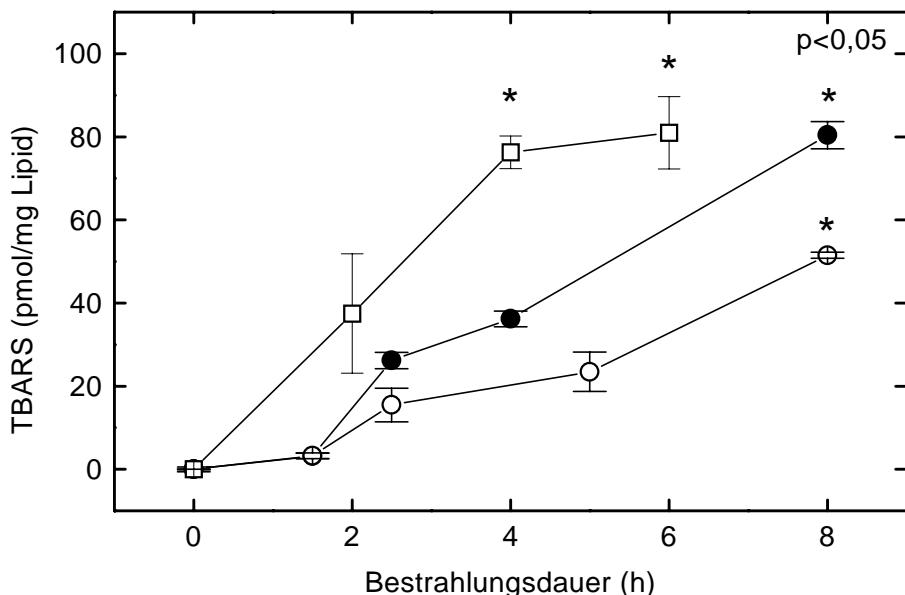


Abbildung 16: Entstehung von TBARS in Liposomensuspensionen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht: hSCLL (□), Liposomen ohne Cholesterol (●), Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol (○). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen an. Die Mittelwertsunterschiede wurden durch einfache Varianzanalyse geprüft.

Die Konzentration von TBARS, die infolge der UV-induzierten Oxidation in den Liposomensuspensionen entsteht, hängt von der Lipidzusammensetzung der Vesikelmembranen ab. In Liposomen mit hohem Cholesterolgehalt (50 %, w/w) wurde die geringste Konzentration an TBARS gemessen (○). Liposomen ohne Cholesterol bildeten während der UV-Bestrahlung höhere Konzentrationen an TBARS (●). Die TBARS-

Konzentrationen nach 8 h UV-Bestrahlung in diesen Vesikelpopulationen unterscheiden sich signifikant. In den hSCLL entsteht die höchste TBARS Konzentration (□). Bereits nach 4-stündiger Bestrahlung wird in hSCLL eine signifikant höhere TBARS-Konzentration gebildet als in den Liposomen aus synthetischen Lipiden (●, ○).

Infolge der UV Bestrahlung der Lipidfilme entstehen ebenfalls TBARS, wie die Abbildung 17 zeigt. Ebenso wie in den Liposomensuspensionen hängt die Konzentration an entstehenden TBARS von der Lipidzusammensetzung ab. In den Lipidfilmen mit 50 % (w/w) Cholesterol entstanden weniger TBARS (○) als in den Lipidfilmen ohne Cholesterol (●). In den hSCL-Filmen wurde die höchste TBARS-Konzentration nachgewiesen (□). Wie aus dem Vergleich von Abbildung 16 und 17 hervorgeht, entstehen unter identischen Bestrahlungsbedingungen in den Lipidfilmen weniger TBARS als in den Liposomensuspensionen.

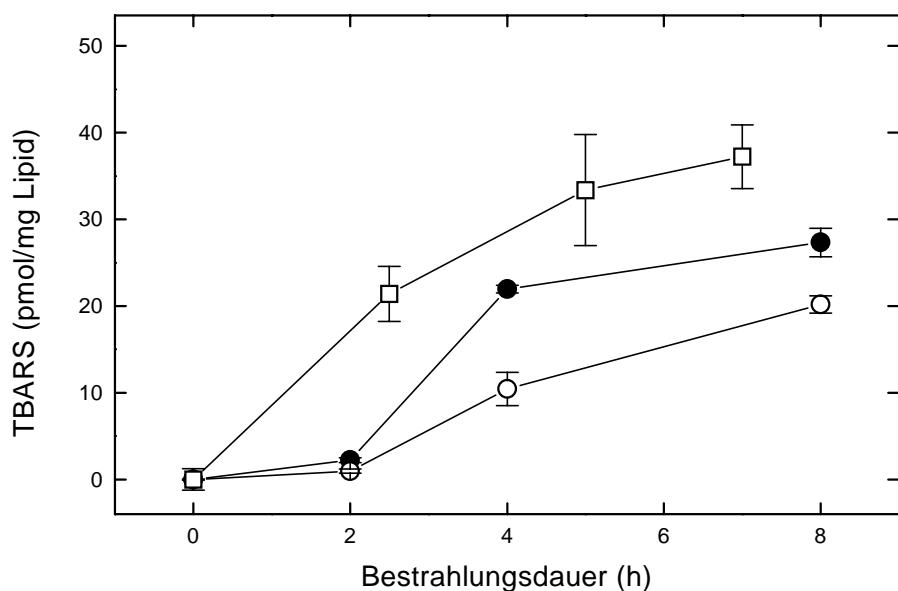


Abbildung 17: Entstehung von TBARS in Lipidfilmen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht: hSCL-Filme (□), Lipidfilme ohne Cholesterol (●), Lipidfilme mit 50 % (w/w) Cholesterol (○). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen an. Die Mittelwertsunterschiede wurden durch einfache Varianzanalyse geprüft.

Die Lipidperoxidation wurde nicht nur durch die Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht induziert, sondern auch durch Bestrahlung mit natürlichem Sonnenlicht. Abbildung 18 zeigt die TBARS-Konzentrationen in Liposomensuspensionen vor und nach einer 12-stündigen Bestrahlung mit natürlichem Sonnenlicht (Abbildung 10).

Die Konzentration der entstehenden TBARS ist abhängig von der Lipidzusammensetzung der Vesikelmembranen. In den Liposomen mit hohem Cholesterolgehalt (50%, w/w) entstehen im Verlauf der Sonnenlicht-induzierten Oxidation signifikant weniger TBARS (weiße Balken), als in den Liposomen ohne Cholesterin (schwarze Balken). In hSCLL wurde die höchste Konzentration von TBARS nachgewiesen (gestreifte Balken). Dieses Ergebnis gleicht den Befunden, die durch die Bestrahlung von Liposomen mit künstlich erzeugtem UV Licht erhalten wurden (Abbildung 16).

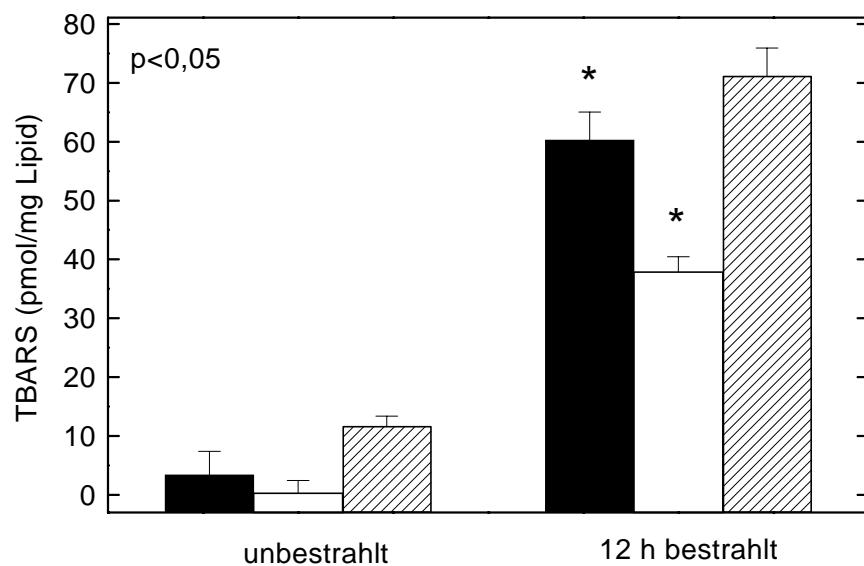


Abbildung 18: Entstehung von TBARS in Liposomensuspensionen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit natürlichem Sonnenlicht: Liposomen ohne Cholesterin (schwarze Balken), Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterin (weiße Balken), hSCLL (gestreifte Balken). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen an. Die Mittelwertsunterschiede wurden durch einfache Varianzanalyse geprüft.

### 5.1.2. Nachweis und Quantifizierung von Lipidhydroperoxiden

Lipidhydroperoxide (LOOH) entstehen als Endprodukte der Lipidperoxidation sowohl aus einfach als auch mehrfach ungesättigten Lipiden. Das durch die Reaktion eines Alkylradikals mit molekularem Triplet-Sauerstoff entstehende Peroxylradikal stabilisiert sich, durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms aus einer weiteren Lipidkette, zum Hydroperoxid (Abbildung 19). Auch aus Cholesterol, das eine einzelne Doppelbindung besitzt, können durch Oxidation Hydroperoxide entstehen.

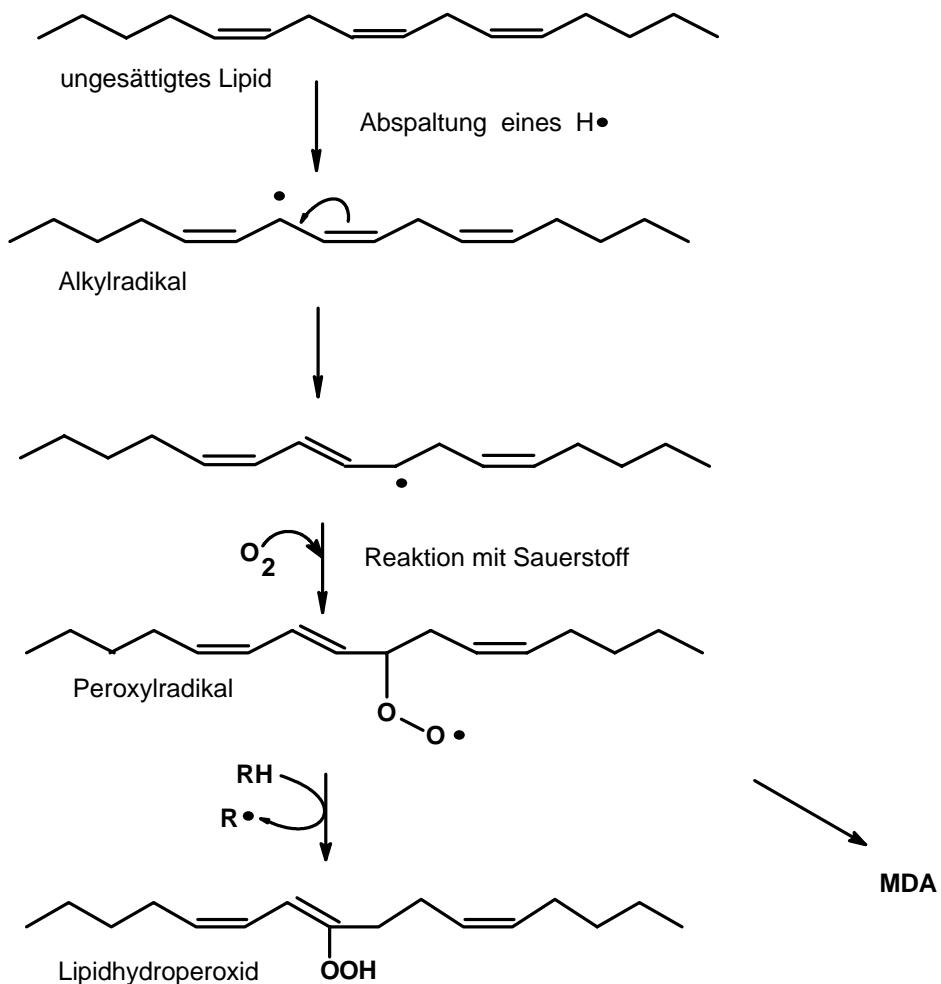


Abbildung 19: Entstehung von Lipidhydroperoxiden aus ungesättigten Lipiden.

#### 5.1.2.1. Nachweis von Lipidhydroperoxiden durch 2',7'-Dichlorofluorescein

Die LOOH wurden fluoreszenzspektrophotometrisch nachgewiesen. Der Test wurde geringfügig modifiziert nach *Cathcart* und Mitarbeitern sowie *Babo* und *Charbonneau* durchgeführt [Cathcart et al. 1984, Babo und Charbonneau 1994]. Der Fluoreszenztest beruht auf der Oxidation der nicht-fluoreszierenden Verbindung 2',7'-Dichloro-dihydrofluorescein (DCHF) zum fluoreszierenden Farbstoff 2',7'-Dichloro-fluorescein (DCF) durch im Reaktionsgemisch vorhandene Hydroperoxide (Abbildung 20). Das DCHF erhält man aus 2',7'-Dichloro-dihydro-fluorescein-diazetat (DCHF-DA) durch Verseifen mit NaOH. Dazu wurden 1 ml der 1 M ethanolischen DCHF-DA-Lösung mit 0,1 M NaOH über 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 32 ml Methanol (das 0,1 µg/ml Hematin enthält) wurde die Reaktionslösung bis zum Gebrauch auf Eis gelagert. Je 30 µl Liposomensuspension wurden mit 1,5 ml Reaktionslösung gemischt und 50 Minuten bei 50 °C inkubiert. Der entstandene Fluorophor wurde quantifiziert.

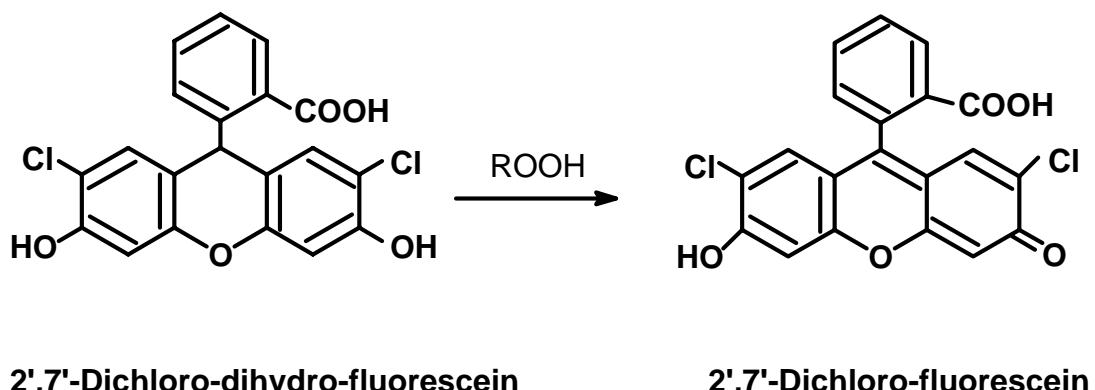


Abbildung 20: Reaktion von Lipidhydroperoxiden mit 2',7'-Dichloro-dihydro-fluorescein.

Die Maxima der Anregungs- und Emissionsspektren liegen bei 515 nm und bei 553 nm (Abbildung 21). Da sich Anregungs- und Emissionsspektrum stark überlappen wurde die Fluoreszenz bei 470 nm angeregt und am Emissionsmaximum bei 535 nm detektiert.

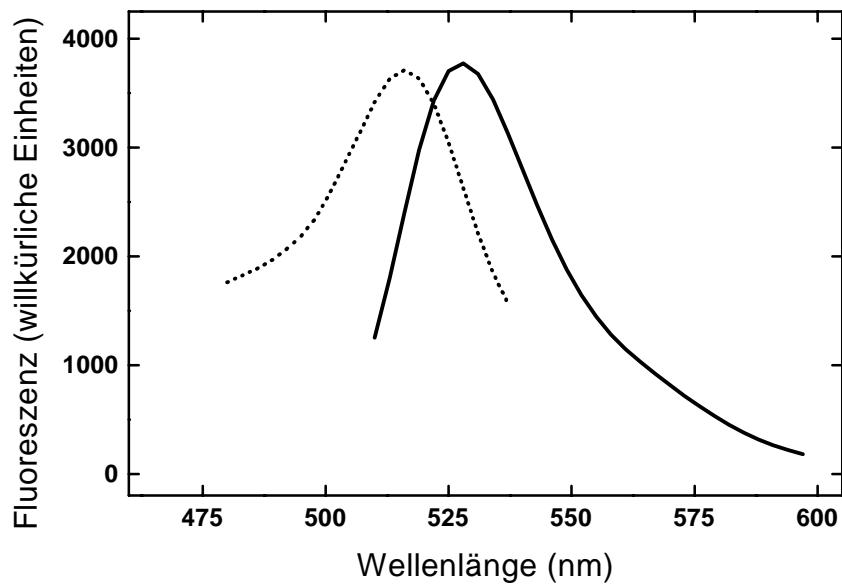


Abbildung 21: Anregungs- (-----) und Emissionsspektrum (—) des 2',7'-Dichloro-fluoresceins.  
Anregungsmaximum: 515 nm, Emissionsmaximum: 535 nm.

Als Kalibriersubstanz diente  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die Fluoreszenzintensität ist linear von der LOOH-Konzentration abhängig (Abbildung 22).

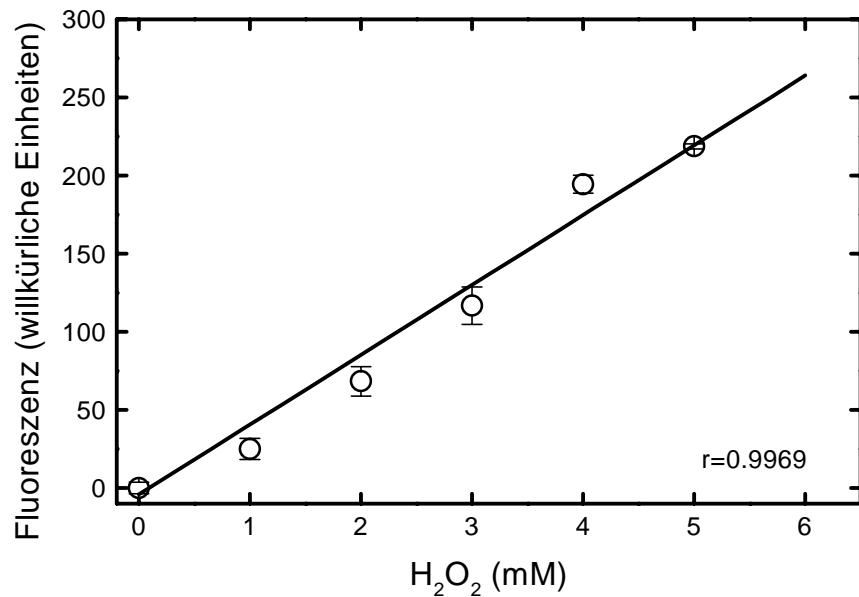


Abbildung 22: Eichkurve zum LOOH Nachweis. Als Eichsubstanz diente  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Da DCHF-DA membrangängig ist, eignet sich dieser Fluoreszenztest auch zum Nachweis intrazellulär vorkommender Hydroperoxide. Die Quantifizierung intrazellulärer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen in Endothelzellen wurde beschrieben [Royall und Ischiropoulos 1993].

#### *5.1.2.2. Weitere Methoden zum Nachweis von Lipidhydroperoxiden*

Alternativen zum Nachweis von LOOH mit DCF sind die Iodometrie, enzymatische Methoden wie der Glutathion-Peroxidase Test oder der Cyclooxygenase Test [Halliwell und Gutteridge 1989], die Chemilumineszenz [Miyazawa et al. 1989], sowie weitere photometrische Methoden [Jiang et al. 1992]. Chromatographische Methoden wie die Dünnschichtchromatographie [Girotti et al. 1985] erlauben eine Trennung verschiedener LOOH sowie deren Quantifizierung.

### 5.1.2.3. Bildung von LOOH in Modellmembranen durch UV Bestrahlung

Die UV-induzierte Lipidperoxidation führt zur Entstehung von LOOH. Ebenso wie die Entstehung von TBARS, ist auch die LOOH Bildung von der Lipidzusammensetzung der Vesikelmembranen abhängig (Abbildung 23). In Liposomen mit hohem Cholesterolgehalt (50 %, w/w) steigt die LOOH-Konzentration während der UV-Bestrahlung am stärksten (○). Geringer ist die LOOH Bildung in den Liposomen ohne Cholesterol (●). Der UV-induzierte Anstieg der LOOH-Konzentration in den hSCLL erfolgte verzögert (□) und erreichte nach ca. 7 h die LOOH-Konzentration der Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol.

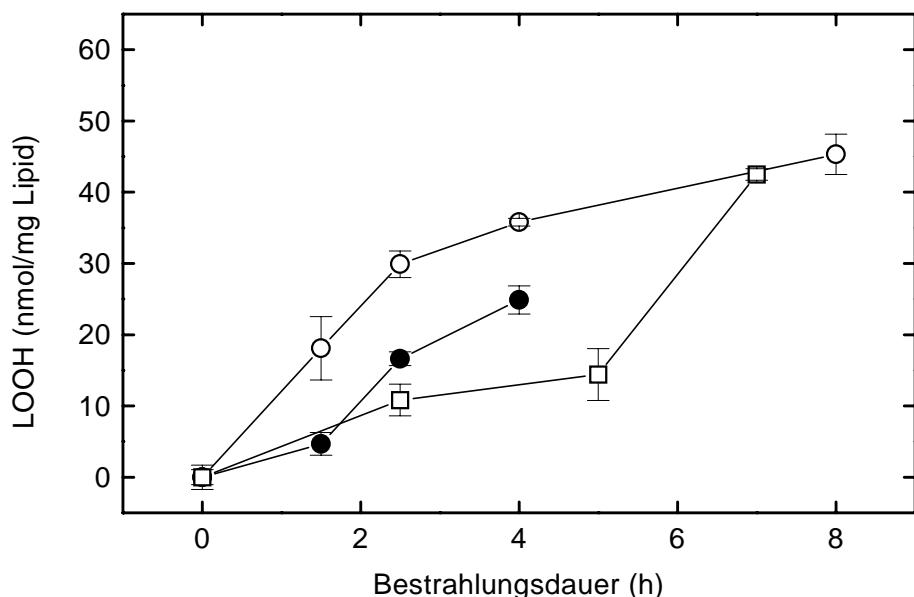


Abbildung 23: Entstehung von LOOH in Liposomensuspensionen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht: Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol (○), Liposomen ohne Cholesterol (●), hSCLL (□). Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen an. Die Mittelwertsunterschiede wurden durch einfache Varianzanalyse geprüft.

Auch in trockenen Lipidfilmen induziert UV Strahlung die Entstehung von LOOH (Abbildung 24). Wie in den Liposomensuspensionen steigt die LOOH-Konzentration in den Lipidfilmen mit hohem Cholesterolgehalt (50 %, w/w, ○) stärker als in den Filmen ohne Cholesterol (●). Dieser Unterschied ist signifikant. In den hSCL-Filmen werden

LOOH in ähnlicher Konzentration wie in den Lipidfilmen mit 50 % (w/w) Cholesterol gebildet (□).

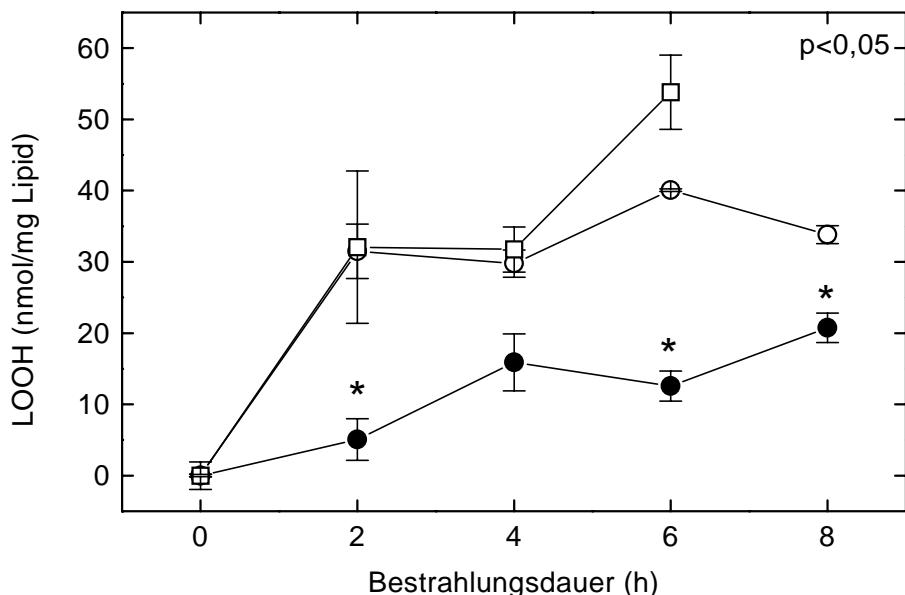


Abbildung 24: Entstehung von LOOH in Lipidfilmen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht: Lipidfilme mit 50 % (w/w) Cholesterol (○), hSCL-Filme (□), Lipidfilme ohne Cholesterol (●). Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen an. Die Mittelwertsunterschiede wurden durch einfache Varianzanalyse geprüft.

Die Bestrahlung von Liposomen mit natürlichem Sonnenlicht, induziert ebenfalls die Bildung von LOOH. Abbildung 25 zeigt die LOOH-Konzentrationen in unterschiedlichen Vesikelsuspensionen vor und nach einer 12-stündigen Bestrahlung mit natürlichem Sonnenlicht. Während in den Liposomen ohne Cholesterol (schwarze Balken), sowie den hSCL (gestreifte Balken) die LOOH-Konzentrationen nur geringfügig ansteigen, findet in den Liposomen mit 50 Gewichts-% Cholesterol eine außerordentlich starke LOOH Bildung statt (weiße Balken).

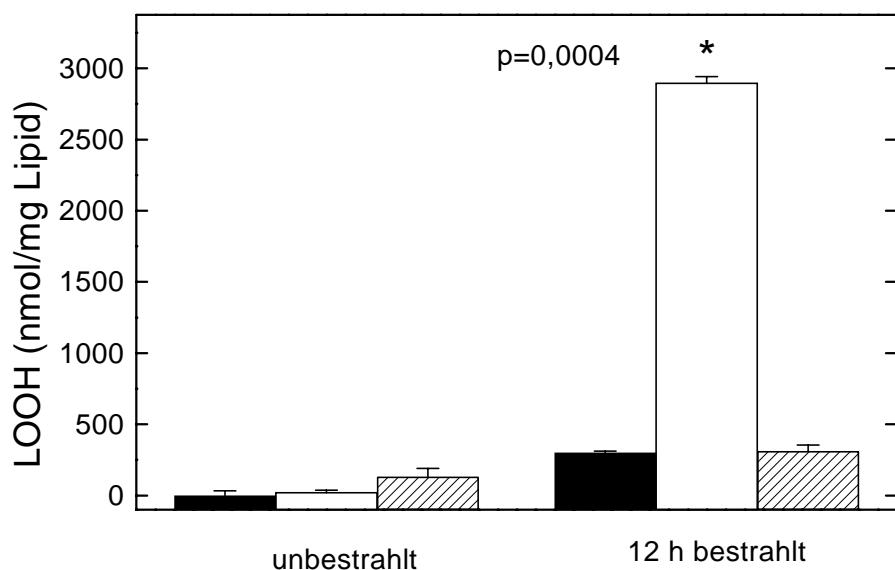


Abbildung 25: Entstehung von LOOH in Liposomensuspensionen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit natürlichem Sonnenlicht: Liposomen ohne Cholesterin (schwarze Balken), Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol (weiße Balken), hSCLL (gestreifte Balken). Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen an. Die Mittelwertsunterschiede wurden durch einfache Varianzanalyse geprüft.

## **5.2. Nachweis der UV-induzierten Lipiddegradation mit AMD unterstützter HPTLC**

Neben dem Nachweis der Oxidationsprodukte MDA und LOOH wurde die UV-induzierte Lipidperoxidation indirekt nachgewiesen. Die liposomalen Lipide wurden nach der UV-Bestrahlung mit Methanol/Chloroform = 1/1 (v/v) extrahiert und mit AMD (Automated Multiple Development) unterstützter HPTLC (High Performance Thin-Layer Chromatography) getrennt und quantifiziert. Die abnehmende Konzentration nicht-oxidierter Membranlipide ist ein Maß für das Voranschreiten der Lipidperoxidation.

### **5.2.1. AMD unterstützte HPTLC**

Mit AMD unterstützter HPTLC können sowohl die natürlichen Stratum corneum Lipidextrakte auf ihre Zusammensetzung untersucht werden, als auch bestrahlte und unbestrahlte Lipide quantifiziert, sowie von Lipoxidationsprodukten getrennt werden.

Die Lipide wurden strichförmig auf HPTLC-Fertigplatten appliziert. Der Randabstand betrug 10 mm, die Bahnbreite jeweils 6 mm und der Abstand zwischen benachbarten Bahnen 4 mm. Die Entwicklung der Platten erfolgte in einem 25-stufigen Gradienten. Im ersten Schritt wurden die Platten mit Methanol/Diethylether = 1/4 entwickelt. In den Schritten 2 bis 20 wurde der Methanolanteil der mobilen Phase sukzessive verringert und die Laufstrecke jeweils um 3 mm verlängert. Bei Schritt 20 wurden die Platten in reinem Diethylether entwickelt. Während der Schritte 21 bis 25 erfolgte die Entwicklung der Platten mit 100 % n-Hexan.

Die separierten Lipide wurden im Anschluß durch postchromatographische Derivatisierung sichtbar gemacht. Dazu wurden die HPTLC-Platten vollständig in eine Derivatisierungslösung [8 % (w/v) CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O; 10 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (v/v); 5 % (v/v) Methanol] getaucht und anschließend 30 Minuten bei 140 °C erhitzt. Diese Färbung ergibt abhängig von der Derivatisierungstemperatur und der Struktur der nachgewiesenen Lipide hell- bis dunkelbraune Banden. Worauf die Färbung beruht ist nicht geklärt.

Wahrscheinlich ist eine Komplexbildung zwischen den  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen und den Doppelbindungen der Lipide, durch Überlappungen der d-Orbitale des Kupfers mit den  $\pi$ -Orbitalen der Doppelbindungen für die Färbung verantwortlich [Hein 1971].

Die Abbildung 26 vergleicht die Farbintensitäten verschiedener Lipide, bezogen auf Cholesterol, das sich unter den Reaktionsbedingungen am intensivsten färbt.

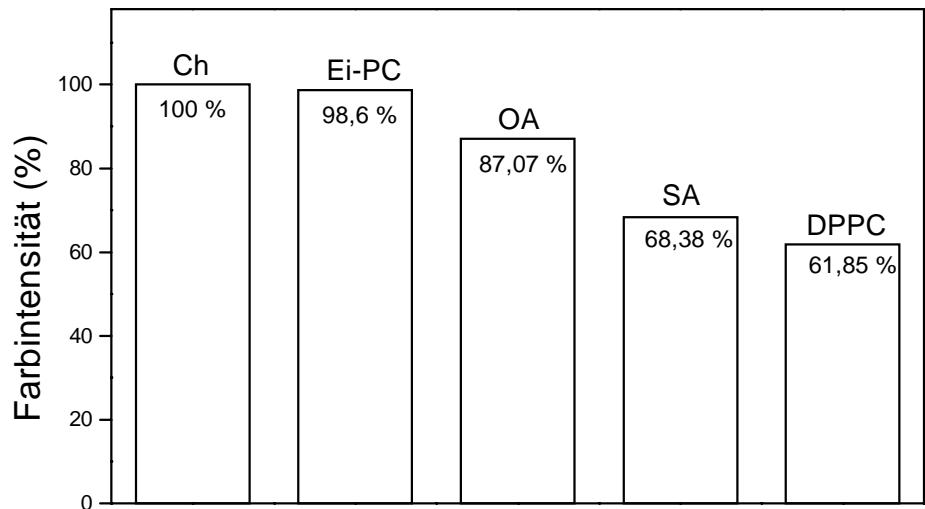


Abbildung 26: Farbintensitäten postchromatographisch derivatisierter Lipide. Die Lipidmenge betrug jeweils 10 nmol. Abkürzungen: Ch, Cholesterol; Ei-PC, aus Phosphatidylcholin aus Hühnerei; OA, Ölsäure; SA, Stearinsäure; DPPC, Dipalmitoylphosphatidylcholin

Die Quantifizierung der Substanzen erfolgte densitometrisch. Mit einem TLC Scanner wurde die Absorption jeder Bahn im Reflexionsmodus bei 550 nm gemessen. Jedem Substanzfleck entspricht ein Peak im Densitogramm. Aus den Peakhöhen und Peakflächen können über ein Standardlipidgemisch die Lipidkonzentrationen ermittelt werden. Der Standard setzte sich aus je 2 mg/ml SA, Cer III und Cer IV; 0,5 mg/ml ChS und 3,5 mg/ml Ch zusammen.

### 5.2.2. UV-induzierte Lipiddegradation in Modellmembranen

Die Abbildung 27 zeigt einen Ausschnitt aus einer HPTLC-Platte, auf der die Lipide einer Liposomensuspension (Suspension 2 in Tabelle 2) nach der UV-Bestrahlung separiert wurden. Die einzelnen Bahnen zeigen die Lipide nach unterschiedlichen Bestrahlungszeiten.

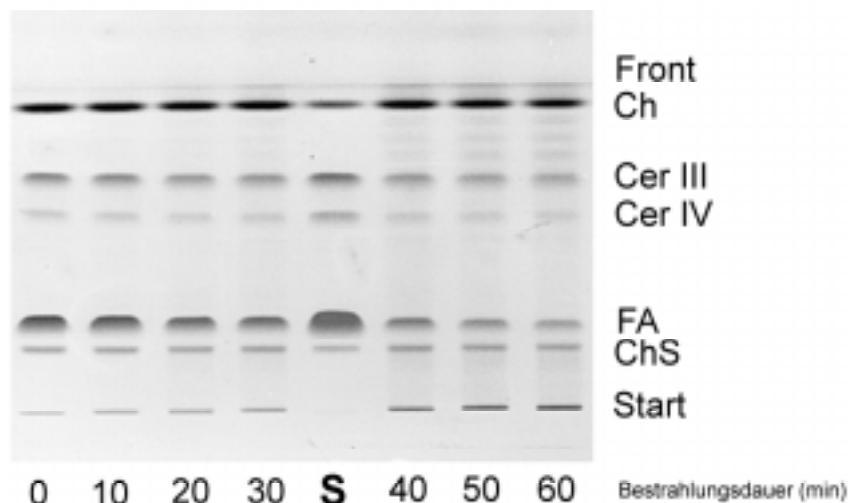


Abbildung 27: Dünnschichtchromatographische Trennung liposomaler Lipide nach der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV-Licht. Abkürzungen: Ch, Cholesterin; Cer III, Ceramid Typ III; Cer IV, Ceramid Typ IV; FA, Fettsäure; ChS, Cholesterin-3-sulfat; S, Standard lipidgemisch.

Mit zunehmender Bestrahlungsdauer werden die Lipidbanden schwächer. Gleichzeitig treten zusätzliche Banden auf, die im Verlauf der UV-Bestrahlung intensiver werden. Dies ist auf die Entstehung von Oxidationsprodukten zurückzuführen. Sichtbar sind solche Oxidationsproduktbanden zwischen den Ceramid- und der Cholesterolbande. Auch auf der Startlinie bleiben verstärkt polare Verbindungen liegen. Die Quantifizierung der Lipide erfolgte densitometrisch. In Abbildung 28 sind die Lipidkonzentrationen graphisch dargestellt.

Die Bestrahlung der Liposomen mit UV Licht induziert eine Konzentrationsabnahme der ursprünglichen Membranlipide. Diese Konzentrationsabnahme ist auf oxidative

Modifizierungen an den Lipiden zurückzuführen. Oxidierte und nicht-oxidierte Lipide unterscheiden sich in ihrem Laufverhalten auf der HPTLC-Platte. Zur Quantifizierung wurden ausschließlich die nicht-oxidierten Lipide herangezogen, während die oxidierten Lipide nicht mehr erfaßt wurden.

Die Lipidkonzentrationen der unbestrahlten Probe wurden als 100 % festgelegt. Die Abnahme der Konzentration nicht-oxidiertter Membranlipide ist von der Lipidzusammensetzung der Vesikelmembranen abhängig. In den Liposomen ohne Cholesterol (●) erfolgt die Oxidation der Membranlipide am schnellsten und stärksten. Im Vergleich dazu werden die Membranlipide in den Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol langsamer und weniger stark oxidiert (○). Die Abnahme der natürlichen Stratum corneum Lipide in den hSCLL (□) erfolgt ähnlich den Membranlipiden in den Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol.

Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Lipidzusammensetzung und dem Abbau der Membranlipide wurde bei der UV-induzierten Oxidation von Lipidfilmen festgestellt. Die Abbildung 29 zeigt den oxidativen Abbau von Lipiden in trockenen Lipidfilmen unterschiedlicher Zusammensetzung. In den Filmen ohne Cholesterol (●) werden die Lipide deutlich stärker oxidiert als in den Lipidfilmen mit 50 Gewichts-% Cholesterol (○).

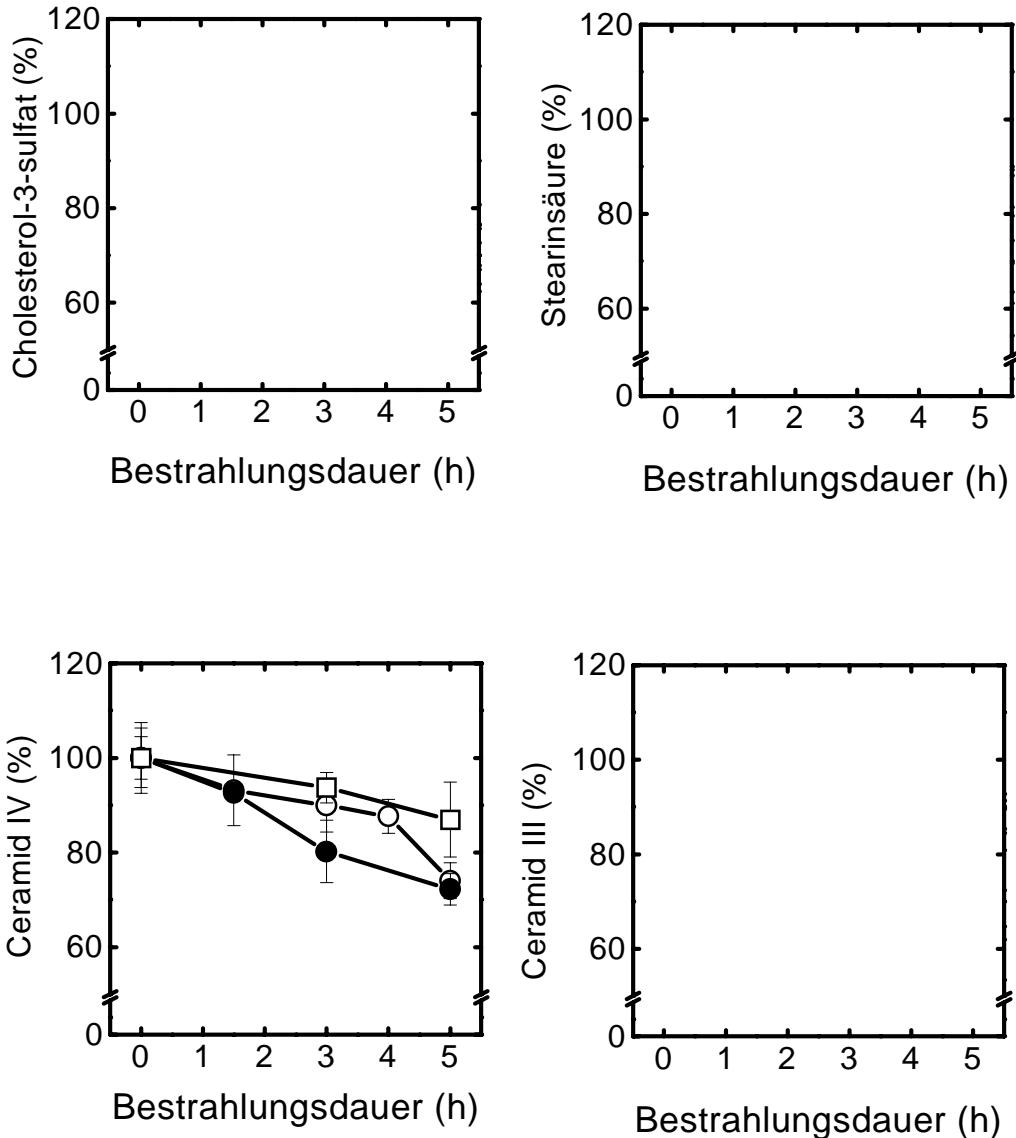


Abbildung 28: Lipidegradation in Liposomenmembranen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht: Liposomen ohne Cholesterin (●), Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterin (○), hSCLL (■). Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen an. Die Mittelwertsunterschiede wurden durch einfache Varianzanalyse geprüft.

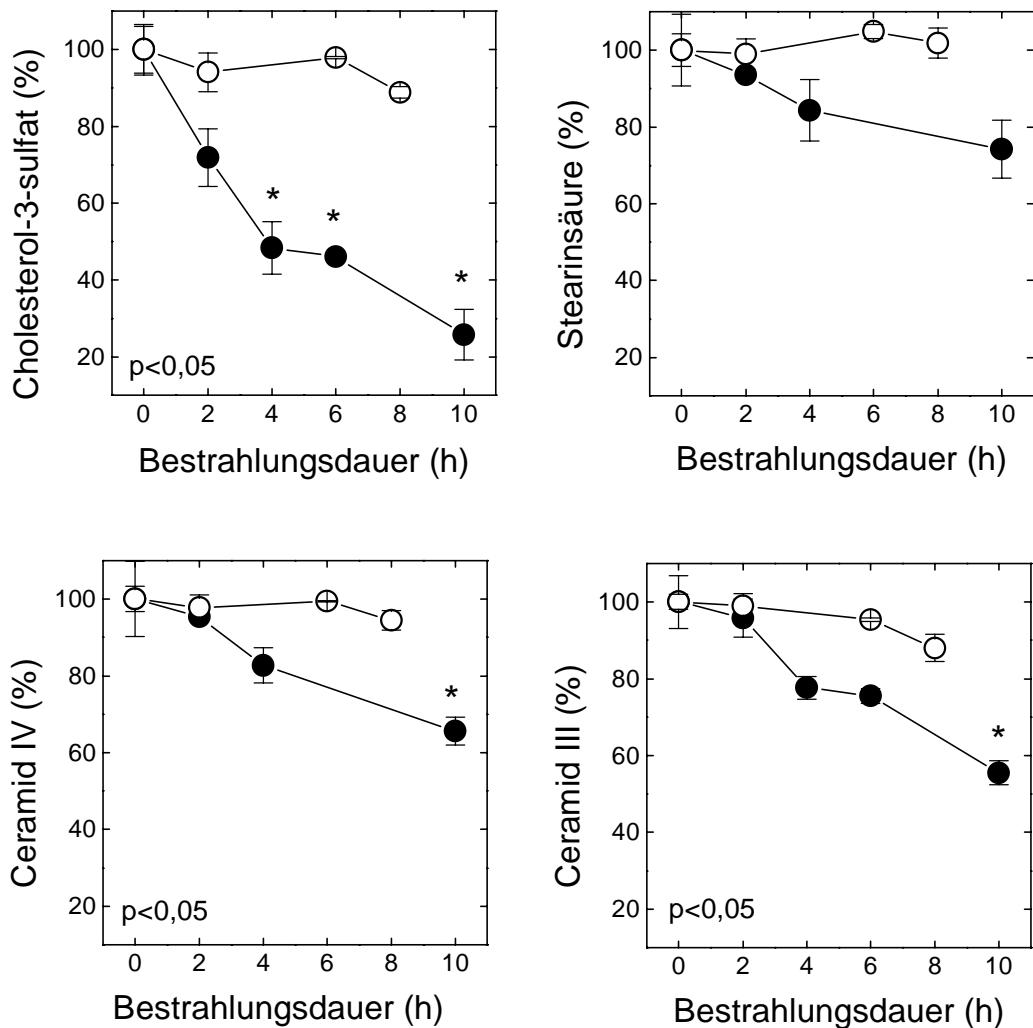


Abbildung 29: Lipiddegradation in Lipidfilmen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht: Lipidfilme ohne Cholesterin (●), Lipidfilme mit 50 % (w/w) Cholesterin (○). Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen an. Die Mittelwertsunterschiede wurden durch einfache Varianzanalyse geprüft.

### **5.3. Messung des Sauerstoff-Verbrauchs**

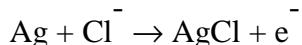
Mit den beschriebenen Methoden wurde die Lipidperoxidation zu definierten Zeitpunkten gemessen. Eine Möglichkeit die UV-induzierte Oxidation direkt zu verfolgen ist die Messung des während der Oxidation verbrauchten Sauerstoffs.

#### **5.3.1. Aufbau und Funktionsweise der Clark-Elektrode**

Der Sauerstoff-Verbrauch der durch die Bestrahlung mit UV Licht induzierten Lipidperoxidation wurde mit Hilfe einer Clark-Elektrode bestimmt. Die Elektrode enthält ein elektrochemisches Element. Dieses besteht aus einer Platin-Arbeitselektrode (Katode) und einer Silber/Silberchlorid-Gegenelektrode (Anode) sowie KCl-Elektrolytlösung und ist durch eine gaspermeable Teflonmembran von der Meßkammer, die die zu untersuchende Probe enthält, getrennt. Der in der Probe gelöste Sauerstoff diffundiert durch die Membran und wird an der Arbeitselektrode reduziert:



An der Gegenelektrode findet die folgende Reaktion statt:



Der resultierende Stromfluß ist dem Sauerstoff-Partialdruck in der Meßkammer proportional. Das Meßsignal ist unmittelbar von der Sauerstoff-Diffusion durch die Teflonmembran abhängig. Die Entstehung eines Sauerstoff- und Temperaturgradienten wurde durch kontinuierliches Rühren vermieden.

Die Kalibrierung des Clark-Sensors erfolgte mit luftgesättigtem Wasser. Die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser ist bei bekannter Temperatur (Temperierung mittels Wasserbad) und Luftdruck eine konstante Größe. Die Sauerstoffkonzentration in luftgesättigtem Wasser bei 25 °C und 1013 mbar Luftdruck beträgt 8,38 mg/l. Durch Spülen mit Stickstoff wurde der Sauerstoff aus der Kalibrierlösung verdrängt und der Stromfluß unter dieser Bedingung als Nullwert definiert. Aus beiden Meßpunkten wurde eine Eichgerade erstellt.

Um den Sauerstoff-Verbrauch in den unterschiedlichen Liposomensuspensionen vergleichen zu können, wurde die maximale Sauerstoff-Konzentration in luftgesättigtem Wasser als 100 %-Wert festgelegt. Die Basislinien wurden mit der jeweiligen Liposomensuspension ohne UV Bestrahlung aufgenommen.

Die Bestrahlung der Liposomensuspensionen erfolgte durch ein rundes Quarzglasfenster von 1 cm Durchmesser und 2 mm Dicke. Das bestrahlte Probevolumen betrug jeweils 1 ml und die Lipidkonzentration 2 mg/ml.

### 5.3.2. UV-induzierter Sauerstoff-Verbrauch in Liposomensuspensionen

Bedingt durch die Katodenreaktion besitzt die Clark-Elektrode einen eigenen Sauerstoff-Verbrauch. Bei geschlossener Meßkammer und luftgesättigtem Wasser beträgt dieser ca. 40 % pro Stunde (Abbildung 30). Findet in der Meßzelle ein weiterer Sauerstoff verbrauchender Prozeß z.B. eine Oxidation statt, addiert sich dieser Verbrauch zu dem Sauerstoff-Verbrauch der Elektrode.

Die Tabelle 3 zeigt das Ergebnis der Sauerstoffmessungen an unterschiedlichen Liposomensuspensionen während der UV Bestrahlung. In den Liposomen aus Mischungen synthetischer und semi-synthetischer Lipide wird deutlich weniger Sauerstoff verbraucht als in den hSCLL. In den Liposomen ohne Cholesterol wurde nach 25 Minuten UV Bestrahlung am wenigsten Sauerstoff verbraucht (4,1 %). Etwas höher lag der Sauerstoff-Verbrauch für den gleichen Zeitraum in den Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol (6,2 %). Die UV-induzierte Oxidation von hSCLL verbrauchte die größte Menge Sauerstoff (37,4 %).

Tabelle 3: Sauerstoff-Verbrauch in Liposomensuspensionen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV-Licht.

Suspension (Vgl. Tabelle 2)	Cholesterol-Gehalt (% w/w)	O <sub>2</sub> -Verbrauch nach 25 Min. UV Bestrahlung
1	50 %	6,2 %
5	0 %	4,1 %
hSCLL	42 %	37,4 %

Die Abbildung 30 stellt den Sauerstoff-Verbrauch während der UV-induzierten Oxidation in den unterschiedlichen Liposomensuspensionen graphisch dar. In den Liposomen aus synthetischen und semi-synthetischen Lipiden mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt wird eine nahezu gleiche Konzentration an Sauerstoff verbraucht. Während der UV-induzierten Oxidation der hSCLL wurde dagegen erheblich mehr Sauerstoff verbraucht (das 6- bis 9-Fache).

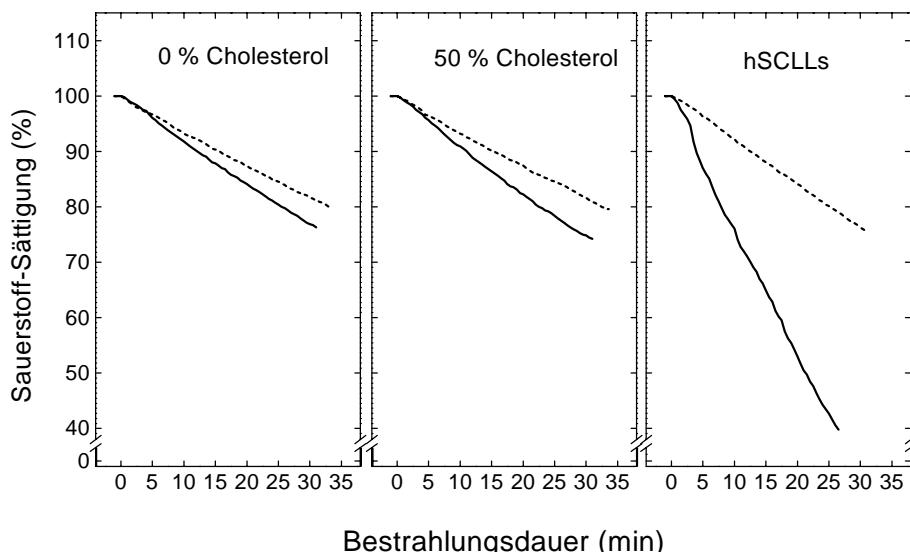


Abbildung 30: Messung des Sauerstoff-Verbrauchs in Liposomensuspensionen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht (—). Die Basislinien (-----) zeigen den Sauerstoff-Verbrauch der Clark- Elektrode. Die Differenz zwischen den beiden Kurven ist ein Maß für den Sauerstoff-Verbrauch während der Oxidation.

## **5.4. Diskussion**

Mit den vorliegenden Experimenten wurde gezeigt, daß ultraviolette Strahlung die Lipidperoxidation sowohl in Vesikelmembranen als auch in trockenen Lipidfilmen induzieren kann. Der Nachweis der Lipidperoxidation erfolgte über den qualitativen und quantitativen Nachweis von Oxidationsprodukten, der Lipiddegradation sowie des Sauerstoff-Verbrauchs.

### **5.4.1. Nachweis der UV-induzierten Oxidation an Modellmembranen aus synthetischen und semi-synthetischen Lipiden**

Die Bestrahlung von Modellmembranen mit ultraviolettem Licht führt zur Akkumulation von Oxidationsprodukten. Mit zunehmender Bestrahlungsdauer steigen die Konzentrationen von TBARS sowie LOOH in allen untersuchten Liposomenpopulationen und Lipidfilmen an. Ein Vergleich der Abbildungen 16 und 23 zeigt, daß in Liposomen mit unterschiedlicher Cholesterolkonzentration infolge der UV-Bestrahlung unterschiedliche Konzentrationen von TBARS und LOOH gebildet werden. In den Vesikeln ohne Cholesterol entstanden nach 8 h UV-Exposition  $80,4 \pm 3,3$  pmol TBARS pro mg Lipid, gegenüber  $51,5 \pm 0,7$  pmol TBARS pro mg Lipid in den Vesikeln mit 50 % (w/w) Cholesterol. In den cholesterolhaltigen Liposomen (50 %, w/w) entstanden dagegen höhere Konzentrationen von LOOH ( $35,8 \pm 0,5$  nmol LOOH pro mg Lipid nach 4 h), als in Liposomen ohne Cholesterol ( $24,8 \pm 2,0$  nmol LOOH pro mg Lipid).

Der gleiche Zusammenhang zwischen der Bildung von Oxidationsprodukten und der Cholesterolkonzentration wurde während der UV Bestrahlung von Lipidfilmen festgestellt. Die Abbildungen 17 und 24 zeigen, daß in den Lipidfilmen ohne Cholesterol nach 8 h UV Bestrahlung deutlich mehr TBARS entstehen ( $27,3 \pm 1,6$  pmol TBARS pro mg Lipid) als in den Filmen mit 50 % (w/w) Cholesterol ( $20,2 \pm 1,0$  pmol TBARS pro mg Lipid). Dagegen erfolgt die LOOH Bildung im gleichen Zeitraum in den Filmen mit 50 % (w/w)

Cholesterol stärker ( $33,8 \pm 1,3$  nmol LOOH pro mg Lipid) als in den Lipidfilmen ohne Cholesterol ( $20,7 \pm 2,1$  nmol LOOH pro mg Lipid).

Die LOOH Konzentrationen, die infolge der UV Bestrahlung gebildet werden, sind um den Faktor 500 bis 1000 mal höher als die TBARS Konzentrationen. Dies ist auf den hohen Sättigungsgrad der untersuchten Lipide zurückzuführen. Malondialdehyd und andere TBARS können, wie in Kapitel 5.1.1. beschrieben, nur aus Lipidketten mit mehr als einer Doppelbindung freigesetzt werden. Für die LOOH Entstehung ist jedoch bereits eine Doppelbindung ausreichend. Von den untersuchten Lipiden sind die semi-synthetischen (aus Rinderhirn isolierten) Ceramide teilweise ungesättigt. Der Anteil ihrer Acylketten mit mehreren Doppelbindungen ist aber sehr gering. Neben den Ceramiden enthalten die Sterole (Cholesterol und Cholesterol-3-sulfat) jeweils eine Doppelbindung. Sterole und einfach ungesättigte Ceramide können folglich ausschließlich zu Hydroperoxiden oxidiert werden. Nur aus dem geringen Anteil mehrfach ungesättigter Ceramide kann Malondialdehyd entstehen.

Mit der Änderung des Cholesterolgehaltes in den Modellmembranen wird die Konzentration einfach ungesättigter Lipide variiert. Eine Erhöhung der Cholesterolkonzentration von 0 auf 50 % (w/w) bedeutet, daß die Konzentration mehrfach ungesättigter Lipide abnimmt und die Konzentration einfach ungesättigter Lipide (Cholesterol) erhöht wird. Eine verstärkte Bildung von Hydroperoxiden während der Oxidation sollte die Folge sein. Die dargestellten Ergebnisse bestätigen diesen Zusammenhang. Sowohl in den Liposomen als auch den Lipidfilmen mit hohem Cholesterolgehalt werden höhere Konzentrationen von LOOH gebildet als in vergleichbaren Vesikeln und Lipid-Filmen ohne Cholesterol.

Die durch natürliches Sonnenlicht (Abbildung 10) induzierte Bildung von Lipidoxidationsprodukten in Liposomensuspensionen wird ebenfalls von der Cholesterolkonzentration beeinflußt. Wie aus Abbildung 18 hervorgeht, erhöht sich die Konzentration von TBARS und LOOH während einer 12-stündigen Sonnenlicht-Exposition in allen untersuchten Liposomensuspensionen. Die TBARS-Konzentration in den Vesikeln ohne Cholesterol betrug  $60,3 \pm 4,8$  pmol pro mg Lipid gegenüber  $37,8 \pm 2,6$

pmol TBARS pro mg Lipid in den Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol. Wie Abbildung 25 zeigt, führt eine hohe Cholesterolkonzentration in der liposomalen Membran andererseits zu einem ca. 10 mal höheren LOOH Anstieg ( $2894,0 \pm 48,2$  nmol/mg Lipid) als in den Vesikeln ohne Cholesterol ( $299,8 \pm 12,8$  nmol/mg Lipid).

Die durch Sonnenstrahlung induzierte Lipidperoxidation über 12 h führte in den Liposomen zu einem Anstieg der TBARS-Konzentration, vergleichbar mit dem Anstieg nach 8 h Bestrahlung mit dem künstlich erzeugten UV Licht. Die LOOH-Konzentrationen dagegen steigen erheblich höher an. In den Liposomen ohne Cholesterol wurde eine ca. 10-fache LOOH-Konzentration, in den Vesikeln mit 50 % (w/w) Cholesterol sogar eine ca. 60-fach höhere LOOH-Konzentration nach der Bestrahlung mit Sonnenlicht nachgewiesen. Die Ursache dafür ist nicht nur die längere Bestrahlungszeit, sondern vor allem das unterschiedliche Strahlungsspektrum beider UV-Quellen.

Während die verwendete UV-Lampe (Quecksilberdampflampe) ein Linienspektrum emittiert, das mit Hilfe von Filtern auf wenige definierte Wellenlängen reduziert wurde (hauptsächlich im UV-A Bereich), enthält das natürliche Sonnenlicht Strahlung jeder Wellenlänge im UV-A und UV-B Bereich (Abbildung 5). Wie die Abbildung 9 zeigt, besteht das künstlich erzeugte UV-Licht nach dem Passieren der Filter hauptsächlich aus Strahlung der Wellenlängen 366 nm, 334 nm und 313 nm. Die Strahlung mit der größten Intensität ist das UV-Licht mit 366 nm.

Die Bestrahlungsstärke mit der Einheit  $\text{W}/\text{m}^2$  bzw.  $\text{mW}/\text{cm}^2$  ist eine Energieangabe pro Zeit ( $1 \text{ W} = 1 \text{ J/s}$ ). Durch Multiplizieren der Bestrahlungsstärke mit der Zeit erhält man die applizierte Strahlungsdosis in  $\text{J}/\text{m}^2$  bzw.  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ . Aus einer 2-stündigen Bestrahlung (7200 s) mit künstlich erzeugtem UV Licht resultiert daher eine Gesamtdosis von  $375,1 \text{ J}/\text{cm}^2$ . Die UV-B Gesamt-Dosis nach 2 h Bestrahlung betrug  $1,6 \text{ J}/\text{cm}^2$ . Die Intensitäten der UV-A und UV-B Strahlung des natürlichen Sonnenlichts an einem sonnigen Augusttag sind in Abbildung 10 dargestellt. Die Flächen unter den Intensitätskurven repräsentieren die Strahlungsdosen. Durch Integration erhält man als Gesamtdosis UV-A:  $47,4 \text{ J}/\text{cm}^2$  sowie  $749,7 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  UV-B.

Durch Bestrahlung mit dem künstlich erzeugten UV Licht wurde also bereits nach 2 h eine ca. 8 mal höhere UV-A und mehr als die doppelte UV-B Dosis im Vergleich zur 12-stündigen Bestrahlung mit natürlichem Sonnenlicht appliziert. Daß die Sonnenstrahlung

dennoch zu einer erheblich stärkeren Lipidperoxidation führte (LOOH-Konzentrationen), macht deutlich, daß Strahlungsbereiche unterschiedlicher Wellenlängen unterschiedlich effektiv die Lipidperoxidation induzieren.

Neben dem direkten Nachweis von Oxidationsprodukten, wurde die UV-induzierte Lipidperoxidation auch über eine indirekte Methode nachgewiesen. Mit Hilfe AMD unterstützter HPTLC wurden die einzelnen Membranlipide nach unterschiedlich langen Bestrahlungszeiten quantifiziert. Man erhält auf diese Weise eine Aussage darüber, welcher Anteil der Membranlipide bereits oxidativ modifiziert wurde bzw. welche Menge des Lipids unverändert vorliegt. Die Abbildungen 28 und 29 zeigen die Konzentrationsabnahme von nicht-oxidierten Lipiden in Liposomen und Lipidfilmen im Verlauf der UV-Bestrahlung. Wie aus den Abbildungen hervorgeht, nimmt die Konzentration der einzelnen Membranlipide mit zunehmender Bestrahlungsdauer ab. In welchem Ausmaß dieser oxidative Abbau stattfindet, hängt von der Lipidzusammensetzung der Vesikelmembran bzw. des Lipidfilms ab. In den Modellmembranen ohne Cholesterol nimmt die Konzentration der Membranlipide schneller und stärker ab als in den Liposomen und Lipidfilmen mit 50 % (w/w) Cholesterol.

Diese Ergebnisse lassen sich mit den TBARS- und LOOH-Messungen in Einklang bringen. Wie gezeigt wurde, führt die Inkorporation von Cholesterol in hoher Konzentration in die Vesikelmembranen zur Reduktion der UV-induzierten TBARS Bildung, während gleichzeitig die LOOH Entstehung verstärkt wird (Abbildungen 16/17 und 23/24). Die erhöhte Bildung von Hydroperoxiden während der UV-Bestrahlung ist auf die verstärkte Oxidation von Cholesterol zurückzuführen. Das Cholesterol wird zu Cholesterol-Hydroperoxiden oxidiert, wodurch die übrigen Membranlipide weniger stark oxidiert werden. Dies äußert sich in einer verringerten TBARS Bildung sowie einem langsameren und geringeren oxidativen Abbau der Membranlipide.

Als dritte Methode zum Nachweis der UV-induzierten Oxidation wurde der Sauerstoff-Verbrauch quantifiziert. Mit den bisher beschriebenen Techniken wurde die UV-induzierte Oxidation sowohl an ihren Endpunkten (Oxidationsprodukte) als auch an ihrem Ausgangspunkt (Quantifizierung nicht-oxidierter Membranlipide) nachgewiesen. Die

Messung des während der Oxidation verbrauchten Sauerstoffs ist im Gegensatz dazu ein direktes Verfahren, das eine kontinuierliche Messung der Oxidation ermöglicht.

Die bevorzugte Oxidation des Cholesterol in cholesterolhaltigen Liposomen hat keinen Einfluß auf den gesamten Sauerstoff-Verbrauch (Abbildung 31). Der Sauerstoff-Verbrauch bei der UV-Bestrahlung von Liposomen ohne und mit 50 % (w/w) Cholesterol unterscheidet sich nicht signifikant. Nach 30 Minuten UV-Bestrahlung wurden 4,1 % (0 %, w/w Cholesterol) bzw. 6,2 % (50 %, w/w Cholesterol) des gelösten Sauerstoffs verbraucht. Das bedeutet, daß in An- oder Abwesenheit von Cholesterol fast die gleiche Menge Sauerstoff während der UV-Exposition verbraucht wird.

Um die Intensität von Strahlung unterschiedlicher Wellenlängenbereiche hinsichtlich ihrer Wirkung auf die menschliche Haut beurteilen zu können, hat sich in der medizinischen Forschung und Praxis die ‘Minimale Erythem Dosis’ (MED) als Maß durchgesetzt. Als MED wird, abhängig von der Wellenlänge, die Strahlungsdosis festgelegt, die gerade ein Erythem (Sonnenbrand) hervorruft. Die MED ist dabei nicht nur vom Strahlungsbereich sondern auch vom Hauttyp abhängig. Je nach Pigmentierungsgrad unterscheidet man bei hellhäutigen Menschen 4 Hauttypen [WHO 1994]. Menschen des Hauttyp I besitzen eine sehr helle Haut und helles, z.B. blondes oder rotes Haar. Sie bekommen sehr leicht einen Sonnenbrand und ihre Haut bräunt sich nicht. Der Hauttyp IV dagegen ist von vornherein stark pigmentiert, er besitzt dunkle Haare und Augen. Die Haut dieser Menschen bräunt sich immer und sie bekommen so gut wie keinen Sonnenbrand. Hauttyp II und III sind Abstufungen zwischen den Typen I und IV. Experimentell wurden folgende MED für die verschiedenen Hauttypen ermittelt [Freeman et al. 1986, Applegate 1997].

Tabelle 4      Experimentell ermittelte MED für verschiedene Hauttypen im UV-A [Applegate 1997] und UV-B Bereich [Freeman et al. 1986].

Hauttyp	MED UV-B (mJ/cm <sup>2</sup> )	MED UV-A (J/cm <sup>2</sup> )
Hauttyp I	24	6
Hauttyp II	31	7
Hauttyp III	48	10
Hauttyp IV	116	17

Die in den beschriebenen Experimenten applizierten Strahlungsdosen des natürlichen und des künstlich erzeugten UV Lichtes lassen sich wie folgt in MED ausdrücken. Angenommen wurde eine MED für den Hauttyp III.

Tabelle 5 Applizierte Strahlungsdosen unterschiedlicher Strahlungsquellen in MED, bezogen auf den Hauttyp III.

Strahlungsquelle	UV Dosis	MED
<b>Sonne</b>	(nach 12 h)	
UV-A	47,4 J/cm <sup>2</sup>	4,7
UV-B	749,7 mJ/cm <sup>2</sup>	15,6
<b>UV-Lampe</b>	(nach 2 h)	
UV-A	375,1 J/cm <sup>2</sup>	37,5
UV-B	1,6 J/cm <sup>2</sup>	33,3

#### 5.4.2. Wirkt Cholesterol als Antioxidans?

In der Literatur findet man seit den späten 70er Jahren immer wieder Hinweise auf eine antioxidative Wirkung von Cholesterol.

Zunächst hatte *Gutteridge* gezeigt, daß steigende Cholesterolkonzentrationen in Phospholipidvesikeln zu einer Reduktion der Fe<sup>2+</sup>-induzierten (Fenton-Mechanismus) Lipidperoxidation führen [Gutteridge 1978]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen *Montfoort* und Mitarbeiter, die außerdem zeigten, daß die Hemmung der Lipidperoxidation nicht linear von der Cholesterolkonzentration abhängt [Montfoort et al. 1987]. Ebenfalls durch den Fenton Mechanismus induzierten *Jacobsson-Borin* und Mitarbeiter die Lipidperoxidation in Vesikeln aus murinen Lebermikrosomenextrakten mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt [Jacobsson-Borin et al. 1994]. Auch sie fanden eine Reduzierung der Lipidperoxidation mit steigender Cholesterolkonzentration.

*Parasassi* und Mitarbeiter beschrieben eine Reduktion der Hydroperoxidbildung, induziert durch Gamma-Bestrahlung, in DOPC Vesikeln, wenn diese 30 mol-% Cholesterol enthielten [Parasassi et al. 1995]. Dieses Resultat steht im Gegensatz zu dem hier vorgestellten Ergebnis, daß mit steigendem Cholesterolgehalt, die Hydroperoxidbildung verstärkt wird. Mögliche Ursachen für diesen Widerspruch sind die unterschiedlichen Strahlungsquellen, sowie die unterschiedlichen Nachweismethoden. Die Hydroperoxide wurden in der Arbeit von *Parasassi* und Mitarbeitern mit Hilfe eines Chemilumineszenztests nachgewiesen, der in unseren eigenen Untersuchungen die Hydroperoxide des Cholesterols nicht nachgewiesen hat (Ergebnis nicht gezeigt).

Auch für Thiocholesterol wurde eine antioxidative Wirkung, anhand der verminderten Cu<sup>+</sup>-induzierten Peroxidation von Lipoproteinen (LDL), nachgewiesen [Tanaka et al. 1995]. Andere Sterole, z. B. Estrogene, zeigen ebenfalls antioxidative Wirksamkeit, wie die Arbeiten von *Sugioka* und Mitarbeitern sowie von *Mukai* und Mitarbeitern belegen [Sugioka et al. 1987; Mukai et al. 1990].

In einer hypothetischen Arbeit von *Smith* wird ein antioxidativer Effekt von Cholesterol im Blutplasma postuliert [Smith 1991]. *Smith* argumentiert, daß die hohe Empfindlichkeit von Cholesterol gegenüber ROS einen physiologischen Vorteil darstellen muß, angesichts des häufigen Vorkommens von Cholesterol in Biomembranen bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sauerstoff und ROS. Seine Hypothese basiert auf den folgenden Feststellungen:

1. Cholesterol kommt ubiquitär vor.
2. Es wird relativ leicht oxidiert, wodurch im Blutplasma ein bestimmter Spiegel an Oxysterolen vorkommt.
3. Die durch die Oxidation von Cholesterol entstandenen Oxysterole werden in der Leber metabolisiert und über die Gallenflüssigkeit sekretiert.

*Smith* betont, daß die Effektivität der antioxidativen Wirkung des Cholesterol davon abhängt, wie schnell die Oxysterole, die zytoxisch wirken, abgebaut werden. Er schließt, daß das Cholesterol im Blut eine unspezifische antioxidative Funktion übernimmt, indem es ein bevorzugtes Angriffsziel für ROS darstellt.

Diese These wird auch durch eine Arbeit von *Hernandez* und Mitarbeitern gestützt, die ein Absinken des Cholesterol- und LDL-Spiegels im Blut nach einer Ozontherapie

nachwiesen, während gleichzeitig der Oxysterol-Spiegel im Blut ansteigt [Hernandez et al. 1995].

Das Anliegen der vorliegenden Arbeit war es, die in der Literatur diskutierte Frage nach einer antioxidativen Wirkung von Cholesterol im menschlichen Stratum corneum zu beantworten. Wie gezeigt wurde, beeinflußt Cholesterol in Modellmembranen die UV-induzierte Oxidation der Membranlipide. Ist dieser Effekt jedoch als antioxidativer Effekt zu bezeichnen?

Die antioxidative Strategie von aerob lebenden Zellen umfaßt 4 Gruppen von Antioxidantien [Elstner 1990, Sies 1986, Sies 1993]. Die erste Gruppe bilden die Radikalfänger. Es handelt sich dabei, wie in Kapitel 1.2.3.2. erläutert, um relativ kleine Moleküle, die mit freien Radikalen reagieren, auf diese Weise andere Moleküle (z. B. Lipide) vor einem radikalischen Angriff schützen und anschließend regeneriert werden. Die zweite Gruppe der Antioxidantien stellen Enzyme dar, die reaktive Sauerstoffspezies unschädlich machen. Zu ihnen gehören beispielsweise die Superoxiddismutase und die Katalase. Zu den Antioxidantien zählen außerdem Elektronentransportsysteme, mit deren Hilfe oxidierte Radikalfänger regeneriert werden, z. B. Enzyme wie die Glutathion-Reduktase, die mittels NAD(P)H oxidiertes Glutathion reduziert. Die vierte Gruppe enzymatischer Antioxidantien wird häufig auch als Gruppe der sekundären Antioxidantien beschrieben. Zu ihnen gehören Enzyme, die bereits geschädigte Moleküle oder Zellbestandteile reparieren oder metabolisieren, wie z.B. DNA-Reparaturenzyme.

Das Cholesterol kommt innerhalb dieser Klassifizierung der Antioxidantien nur als Radikalfänger in Betracht. Ein Radikalfänger muß nach *Elstner* die folgenden Eigenschaften besitzen: Der Radikalfänger muß zur richtigen Zeit, am Ort der ROS Entstehung, in ausreichend hoher Konzentration vorkommen. Außerdem muß er mit ROS reagieren können [Elstner 1990]. Ein oxiderter Radikalfänger wird *in vivo* enzymatisch regeneriert. Die Recycling-Mechanismen von  $\alpha$ -Tocopherol, Ascorbat und Glutathion wurden beschrieben [Shindo et al. 1994].

Das Cholesterol erfüllt die meisten dieser Kriterien. Es kommt im Stratum corneum, dem Ort der ROS Entstehung, permanent in hoher Konzentration vor. Cholesterol wird, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, im Vergleich zu den anderen Stratum corneum

Lipiden bevorzugt oxidiert. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, daß das Cholesterol im Stratum corneum nach seiner Oxidation regeneriert wird. Zwar kommen in der Dermis und den lebenden Schichten der Epidermis Enzyme vor, die oxidierte Radikalfänger regenerieren (GSH-Px, GSSG-Red u.a.) [Fuchs et al. 1992]. Es gibt jedoch keine Hinweise darauf, daß solche Enzyme im physiologisch inaktiven Stratum corneum vorkommen und aktiv sind.

Anhand der experimentellen Befunde läßt sich folgern, daß das Cholesterol nicht als Antioxidans wirkt. Seine Wirkung ist nicht antioxidativ sondern kompetitiv zur Oxidation der übrigen Stratum corneum Lipide.

#### 5.4.3. Nachweis der UV-induzierten Oxidation an Modellmembranen aus humanen Stratum corneum Lipiden

UV Licht indiziert nicht nur in Modellmembranen aus synthetischen und semi-synthetischen Lipiden die Bildung von TBARS und LOOH sondern auch in Liposomen und Lipidfilmen aus natürlichem humanen Stratum corneum Lipidextrakt. Außerdem wurden die Konzentrationen nicht-oxidierter Membranlipide sowie der Sauerstoff-Verbrauch quantifiziert.

Obwohl die Lipidzusammensetzung der Liposomen und Lipidfilme mit 50 % (w/w) Cholesterol der Lipidzusammensetzung des menschlichen Stratum corneums ähnlich ist, unterscheiden sich die Konzentrationen von Lipidoxidationsprodukten, die infolge von UV Bestrahlung entstehen, deutlich. Wie die Abbildungen 16 und 17 zeigen, werden in den hSCLL bzw. den hSCL-Filmen durch die Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht signifikant höhere TBARS-Konzentrationen gebildet als in den vergleichbaren Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol. Aus Abbildung 18 geht außerdem hervor, daß auch die Oxidation, die durch natürliche Sonnenstrahlung induziert wurde, deutlich höhere TBARS-Konzentrationen in hSCLL erzeugt als in Vesikeln aus synthetischen Lipiden mit einem Cholesterolanteil von 50 % (w/w). Dieses Ergebnis überrascht, da nahezu ausschließlich gesättigte Lipide im menschlichen Stratum corneum vorkommen (Kapitel 1.1.3.). Die

Ursache für das gezeigte Ergebnis müssen demzufolge andere Substanzen sein, die im Stratum corneum Lipidextrakt ebenfalls vorhanden sind.

Wie Abbildung 31 zeigt, enthält der Lipidextrakt stark polare Verbindungen, die bei einer Trennung mit AMD unterstützter HPTLC im Standardgradienten auf der Auftragslinie verbleiben (Bahn 3). Bei diesen polaren Substanzen im Lipidextrakt aus der menschlichen Hornhaut handelt es sich u. a. um Polymere aus Lipiden und Proteinen, die Lipofuscine. Es ist bekannt, daß Lipofuscin oder lipofuscin-ähnliche Verbindungen im Laufe des Alterungsprozesses in der Haut und anderen Organen akkumulieren [Dayan und Wolman 1993]. Seiner chemischen Struktur nach handelt es sich beim Lipofuscin um ein heterogenes, weitverzweigtes Polymer aus SCHIFFschen Basen, die durch Reaktionen von Lipidoxidationsprodukten mit Aminogruppen von Proteinen und Peptiden entstehen.

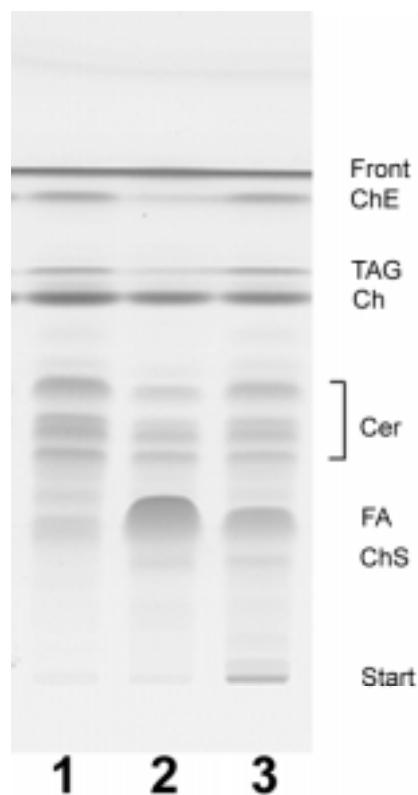


Abbildung 31: Trennung von hSCL-Extrakten mit AMD unterstützter HPTLC. Bahn 1: Säulenfraktionen 9-24; Bahn 2: Säulenfraktionen 25-36; Bahn 3: hSCL-Gesamtextrakt.  
Abkürzungen: ChE, Cholesterolester; TAG, Triacylglycerole; Ch, Cholesterol; Cer, Ceramide; FA, Fettsäuren; ChS, Cholesterol-3-sulfat. In den durch Säulenchromatographie gereinigten Fraktionen ist die Konzentration von polaren Verbindungen, die auf dem Startfleck liegen bleiben, deutlich reduziert.

Wie von *Csallany* und *Ayaz* gezeigt wurde, absorbiert Lipofuscin im ultravioletten und fluoresziert im sichtbaren Bereich [Csallany und Ayaz 1975]. Wie die Arbeiten von *Rozanowska* und Mitarbeitern sowie *Gaillard* und Mitarbeitern außerdem belegen, können Lipofuscine als Sensitizer agieren und so die Entstehung von ROS ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ) fördern [Rozanowska et al. 1995, Gaillard et al. 1995]. Infolge einer erhöhten ROS Bildung in hSCLL und hSCL-Filmen wird sowohl die Entstehung von Lipidoxidationsprodukten, wie TBARS (Abbildungen 16 und 17), als auch der Sauerstoff-Verbrauch verstärkt (Abbildung 30). Wie die Messung des während der Oxidation verbrauchten Sauerstoffs gezeigt hat, erfolgt die UV-induzierte Oxidation von hSCLL unter erheblich höherem Sauerstoffverbrauch als die Oxidation vergleichbarer Vesikel aus synthetischen und semi-synthetischen Lipiden.

Die im Extrakt der humanen Stratum corneum Lipide vorhandenen Lipofuscine interferieren u. U. direkt mit dem MDA-Nachweis. Wie in Kapitel 5.1.1.2. beschrieben, entstehen durch Reaktion primärer Aminogruppen mit MDA Polymere, die SCHIFFsche Basen enthalten [Halliwell und Gutteridge 1992]. Diese Vernetzungsprodukte sind ebenfalls fluoreszierend [Gutteridge et al. 1982]. Da Lipofuscin primäre Aminogruppen enthält, kommt es möglicherweise zu störenden Nebenreaktionen zwischen MDA und Aminogruppen, die das Ergebnis der TBARS-Messungen in hSCLL und hSCL-Filmen verfälschen könnten.

*Gildenast* und *Lasch* haben eine Methode beschrieben, Lipofuscin oder lipofuscin-ähnliche Substanzen vom Stratum corneum Extrakt abzutrennen [Gildenast und Lasch 1997]. Eine solche Reinigung des Extrakts führte zum Verschwinden der Bande auf der HPTLC Platte (Abbildung 31: Bahn 1 und 2). Die durch Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht induzierte Lipidperoxidation in hSCLL aus dem gereinigten Extrakt führte zu einer signifikant verminderten TBARS Entstehung (Abbildung 32).

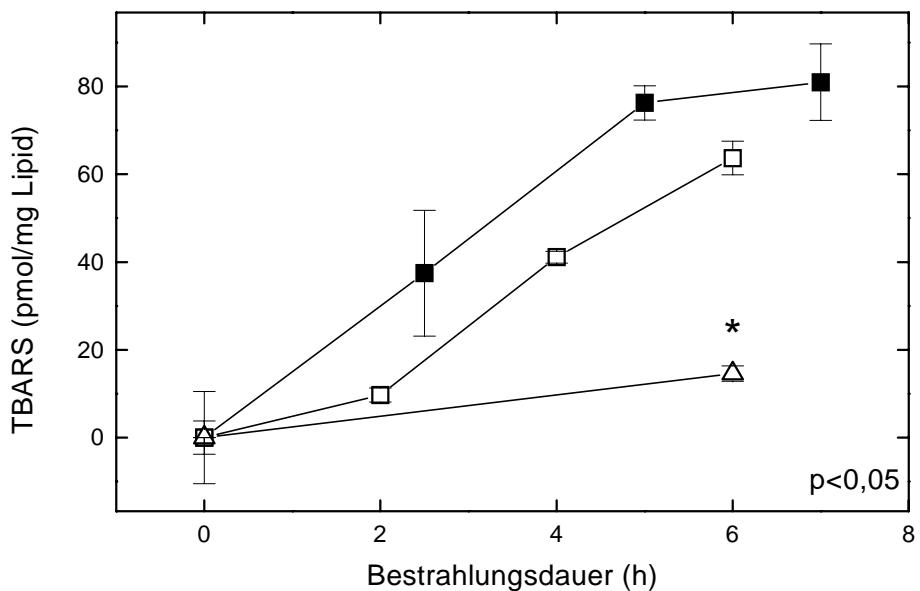


Abbildung 32: Entstehung von TBARS in hSCLL aus natürlichem Hautlipidextrakt (■), dem durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigten (□), sowie dem durch Säulenchromatographie gereinigten Lipidextrakt (Δ).

Andere Moleküle, die in der Haut vorkommen und ebenfalls als Sensitizer fungieren können, sind Riboflavine, Porphyrine oder NAD(P)H. Diese Sensitzermoleküle fördern wie das Lipofuscin die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies [Carbonare und Pathak 1992]. Möglicherweise kommen auch im Extrakt der Hautlipide solche Sensitzermoleküle oder ihre chromophoren Gruppen vor, was die UV-induzierte Oxidation dieser Lipide verstärkt.

## 6. Mechanismus der UV-induzierten Lipidperoxidation

Die Peroxidation ungesättigter Lipide kann auf zwei Wegen erfolgen. Man unterscheidet zwischen dem Typ I Mechanismus, in dessen Verlauf Radikale entstehen, und dem Typ II Mechanismus, in dem Lipide durch Singulett-Sauerstoff oxidiert werden. Die Abbildung 33 stellt beide Mechanismen gegenüber [Girotti 1990].

Die Oxidation nach Typ I wird durch die Abstraktion eines Wasserstoffatoms aus einem ungesättigten Lipid (LH) initiiert. Auf diese Weise entsteht ein Alkyradikal ( $L^\bullet$ ). Das Herausreißen eines Wasserstoffatoms aus der Lipidkette kann in der Regel nur durch bereits vorhandene Radikale erfolgen. Wie aus Abbildung 33 ersichtlich ist, können Hydroxylradikale ( $OH^\bullet$ ) durch die Reaktion von Metallionen ( $Fe^{2+}$ ) mit Sauerstoff entstehen. Alternativ dazu ist die  $OH^\bullet$  Entstehung durch die UV-Bestrahlung von bereits vorhandenen Lipidhydroperoxiden, die durch Autoxidation entstehen, beschrieben [Islomov et al. 1977, Lasch et al. 1997].

Das Alkyradikal ( $L^\bullet$ ) reagiert mit molekularem Triplett-Sauerstoff, wodurch ein Peroxylradikal entsteht ( $LOO^\bullet$ ). Dieses kann sich entweder durch die Abstraktion eines Wasserstoffatoms aus einem weiteren Lipidmolekül zum Lipid-Hydroperoxid (LOOH) oder zu einem zyklischen Peroxid stabilisieren. Aus den zyklischen Peroxiden entstehen im Falle mehrfach ungesättigter Lipide Endoperoxide, aus denen Malondialdehyd (MDA) freigesetzt werden kann (Abbildung 11).

Der Oxidationsmechanismus nach Typ II benötigt einen Sensitizer. Das nichtangeregte Sensitizermolekül im Grundzustand befindet sich im Singulett-Zustand (S). Das bedeutet, daß alle Elektronen gepaart und mit antiparallelem Spin vorkommen, so daß das Sensitizermolekül nach außen keinen Spin besitzt. Durch Absorption von Photonen (Energie) geht der Sensitizer in einen angeregten Singulettzustand ( $^1S$ ) über. Die Lebenszeit solcher angeregten Singulett-Zustände ist sehr kurz (im  $\mu$ -Sekunden Bereich). Die Deaktivierung des angeregten Sensitzers kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Er kann seine Energie als Bindungsschwingungen, als thermische Energie an Lösungsmittelmoleküle oder als Fluoreszenzstrahlung wieder abgeben. Eine weitere Möglichkeit ist die Spineinkehr des angeregten Elektrons, so daß das Sensitizermolekül in

den Triplet-Zustand ( ${}^3S$ ) übergeht (inter system crossing). Der Sensitizer im Triplet-Zustand kann seine Energie auf molekularen Sauerstoff übertragen, was zur Entstehung von Singulett-Sauerstoff ( ${}^1O_2$ ) führt. Singulett-Sauerstoff kann direkt mit ungesättigten Lipiden reagieren, wobei ebenfalls Lipidhydroperoxide entstehen [Streitwieser und Heathcock 1980].

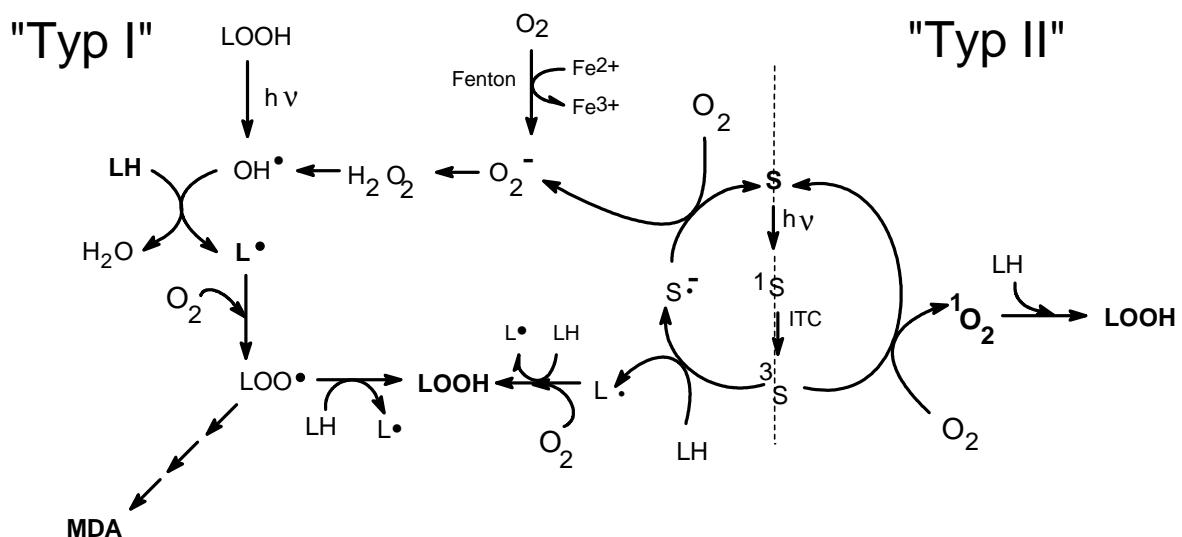


Abbildung 33: Mechanismen der Lipidperoxidation [Girotti 1990].

## **6.1. Analytik von Cholesterolloxidationsprodukten**

Eine Möglichkeit, die Oxidationsmechanismen (Typ I und Typ II) zu unterscheiden, bietet das Cholesterin. Cholesterin bildet abhängig vom Oxidationsmechanismus charakteristische Oxidationsprodukte, wie Abbildung 34 zeigt.

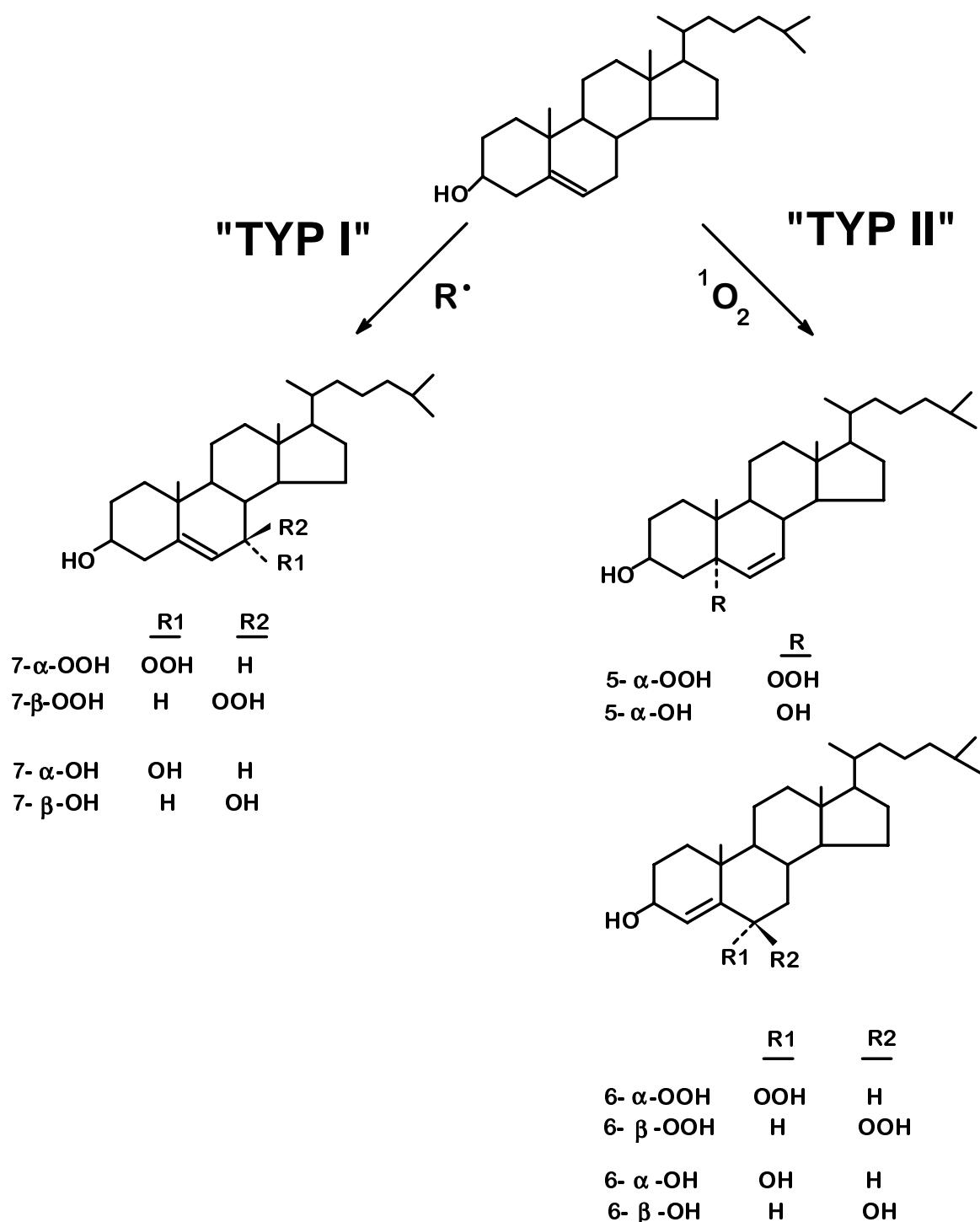
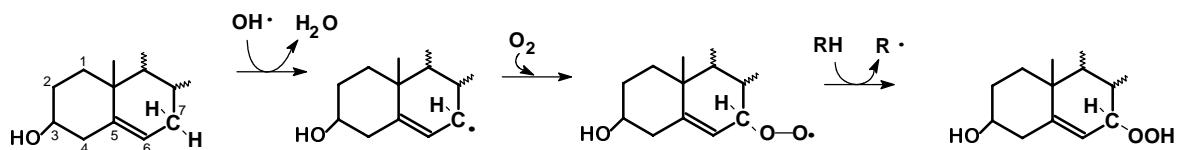
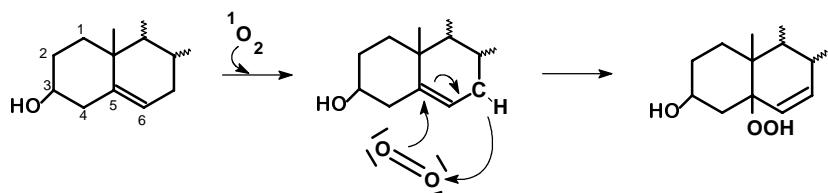


Abbildung 34: Spezifische Oxidation des Cholesterols [Girotti 1992].

Wird Cholesterol nach dem Mechanismus des Typ I oxidiert, so entstehen  $7\alpha$ - und  $7\beta$ -Cholesterol-Hydroperoxid. Der radikalische Angriff erfolgt stets in  $\alpha$ -Stellung zur C=C Doppelbindung.



Findet dagegen eine Oxidation nach Typ II (durch Singulett-Sauerstoff) statt, so entsteht vorrangig das  $5\alpha$ -Cholesterol-Hydroperoxid. Daneben werden in geringen Konzentrationen  $6\alpha$ - und  $6\beta$ -Cholesterol-Hydroperoxid gebildet. Singulett-Sauerstoff reagiert wie ein Olefin und addiert sich direkt an die Doppelbindung des Sterols.



Die Trennung und Identifizierung der Cholesteroloxidationsprodukte ermöglicht es, den Mechanismus ihrer Entstehung zu klären. Da die Hydroperoxide nicht stabil sind, untersucht man die aus ihnen hervorgegangenen Hydroxy-Verbindungen. Diese sind ebenso spezifisch für den Oxidationsmechanismus.

Im Folgenden wurde untersucht, nach welchem Mechanismus Cholesterol in den Liposomen oxidiert wurde, um Rückschlüsse auf den Mechanismus der UV-induzierten Oxidation der Stratum corneum Lipide zu ziehen.

### 6.1.1. Trennung von Oxysterolen mittels Dünnschichtchromatographie

#### 6.1.1.1. Chromatographisches System

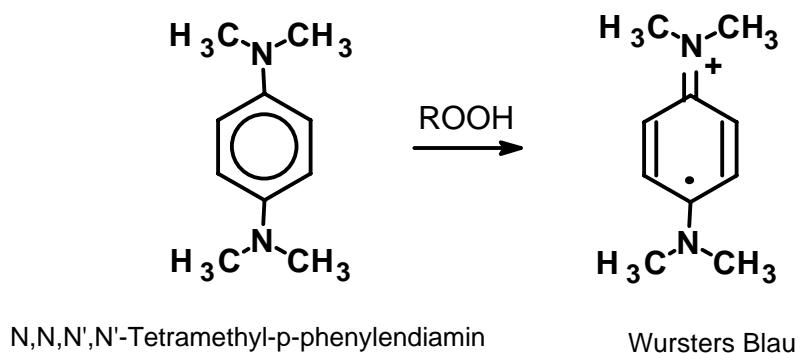
Die liposomalen Lipide wurden nach der Bestrahlung mit Chloroform/Methanol = 1/1 (v/v) extrahiert und auf HPTLC-Platten appliziert. Pro Bahn wurden Volumina zwischen 1  $\mu$ l und 10  $\mu$ l (10 mg/ml) aufgetragen und die Platten mit Ethylacetat/n-Hexan=1/1 (v/v) in einer Horizontalkammer entwickelt.

Als Referenzverbindungen für den Oxidationsmechanismus Typ I dienten 7-Keto-Cholesterol, sowie die aus ihm gewonnenen Hydroxy-Verbindungen 7 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol und 7 $\beta$ -Hydroxy-Cholesterol. Zur Identifizierung des Typ II Mechanismus dienten photochemisch gewonnenes 5 $\alpha$ -Cholesterol-Hydroperoxid bzw. 5 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol.

Die postchromatographische Derivatisierung der entwickelten HPTLC-Platten erfolgte mit CuSO<sub>4</sub>-Lösung (Kapitel 5.2.1.) bzw. TMPD-Sprühlösung.

### *TMPD-Sprühlösung:*

Zum spezifischen Nachweis von Hydroperoxiden auf HPTLC-Platten diente die Färbung mit N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylen diamin (TMPD).



1 g TMPD wurde in einer Mischung aus 50 ml Methanol, 50 ml Wasser und 1 ml Essigsäure gelöst. Die Platten wurden nach der Entwicklung mit dieser Lösung besprüht. Durch Hydroxperoxide wird TMPD zu Wurster's Blau oxidiert. Der Plattenuntergrund

färbt sich dabei zart violett, die Hydroperoxidbanden färben sich kräftig blau-violett [Jork et al. 1993]. Wie Abbildung 35 zeigt, werden durch die TMPD-Färbung (**B**) ausschließlich die Cholesterol-Hydroperoxide angefärbt.

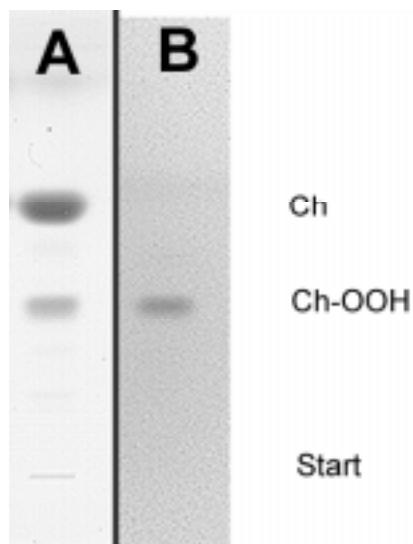


Abbildung 35: Dünnschichtchromatographische Trennung von Cholesterin und Cholesterin-Hydroperoxyden auf Si 60 HPTLC Platten mit n-Hexan/Ethylacetat = 1/1 (v/v). Die postchromatographische Derivatisierung erfolgte mit CuSO<sub>4</sub>-Lösung 30 Minuten bei 140 °C (**A**) bzw. durch TMPD-Färbung (**B**). Abkürzungen: Ch, Cholesterin; Ch-OOH, Cholesterin-Hydroperoxyde.

#### *Präparation von Oxysterol-Referenzverbindungen:*

7-Keto-Cholesterin ist als einziges der genannten Cholesteroloxidationsprodukte kommerziell erhältlich. Durch Reduktion mittels NaBH<sub>4</sub> entstehen aus 7-Keto-Cholesterin sowohl 7 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterin als auch 7 $\beta$ -Hydroxy-Cholesterin.

100  $\mu$ l des gelösten 7-Keto-Cholesterols (5 mg/ml) wurden mit 100  $\mu$ l 50 mM NaBH<sub>4</sub> (in Methanol/10 mM NaOH) über 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom verdampft und die Produkte in Methanol/Chloroform = 1/1 (v/v) aufgenommen [Girotti et al. 1987, Bachowski et al. 1988]. Das Ergebnis der Reduktion wurde dünnschichtchromatographisch geprüft (Abbildung 36).

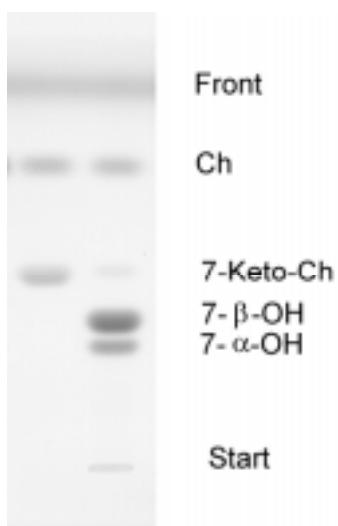


Abbildung 36: Dünnschichtchromatographische Trennung von 7-Keto-Cholesterol, 7 $\alpha$ - und 7 $\beta$ -Hydroxy-Cholesterol auf Si 60 HPTLC Platten mit n-Hexan/Ethylacetat = 1/1 (v/v). Die postchromatographische Derivatisierung erfolgte mit CuSO<sub>4</sub>-Lösung 30 Minuten bei 140 °C. Abkürzungen: 7-Keto-Ch, 7-Keto-Cholesterol; 7- $\beta$ -OH, 7 $\beta$ -Hydroxy-Cholesterol; 7- $\alpha$ -OH, 7 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol

Die Oxidation von Cholesterol durch Singulett-Sauerstoff (Mechanismus Typ II) führt zur Entstehung von Oxysterolen mit Sauerstoffgruppen am Kohlenstoffatom 5 des B-Ringes des Sterolgerüstes. Eine methanolische Lösung von Cholesterol (5 mg/ml) wurde 20 Minuten in Gegenwart von 50 mM Rose Bengal, das als Sensitizer wirkt, bestrahlt. Das Bestrahlungsspektrum umfaßte die Wellenlängen von 313 bis 577 nm (Vgl. Abbildung 11). Durch die Anwesenheit des Sensitzers entsteht Singulett-Sauerstoff in der bestrahlten Lösung. Dessen Reaktion mit Cholesterol führt zur Bildung von vorwiegend 5 $\alpha$ -Cholesterol-Hydroperoxid (Abbildung 34). Durch die Reduktion des 5 $\alpha$ -Cholesterol-Hydroperoxides mit NaBH<sub>4</sub> entsteht hauptsächlich 5 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol, wie Abbildung 37 zeigt [Girotti et al. 1987, Bachowski et al. 1988].

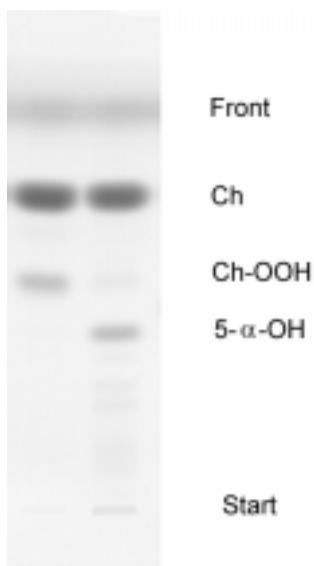


Abbildung 37: Dünnschichtchromatographische Trennung von Cholesterin-Hydroperoxyden und  $5\alpha$ -Hydroxy-Cholesterin auf Si 60 HPTLC Platten mit n-Hexan/Ethylacetat = 1/1 (v/v). Die postchromatographische Derivatisierung erfolgte mit  $\text{CuSO}_4$ -Lösung 30 Minuten bei 140 °C. Abkürzungen: Ch-OOH, Cholesterin-Hydroperoxide;  $5\alpha$ -OH,  $5\alpha$ -Hydroxy-Cholesterin.

#### 6.1.1.2. Entstehung von Cholesteroloxidationsprodukten in Liposomen durch UV-Bestrahlung

In Abbildung 38 ist die dünnschichtchromatographische Trennung von Lipiden und ihrer Oxidationsprodukte nach einer 8-stündigen Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht gezeigt. In den Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterin führte die UV-Bestrahlung zur Entstehung von vier Oxidationsprodukten. Ein Vergleich der Laufstrecken dieser Produktbanden, mit denen der mitgeführten Oxysterol-Standards ermöglichte die Zuordnung von drei Oxidationsprodukten. In den Liposomen wurden durch die UV-induzierte Oxidation neben Cholesterin-Hydroperoxyden (Ch-OOH), sowohl  $7\beta$ -Hydroxy-Cholesterin ( $7\beta$ -OH) als auch  $7\alpha$ -Hydroxy-Cholesterin ( $7\alpha$ -OH) gebildet.

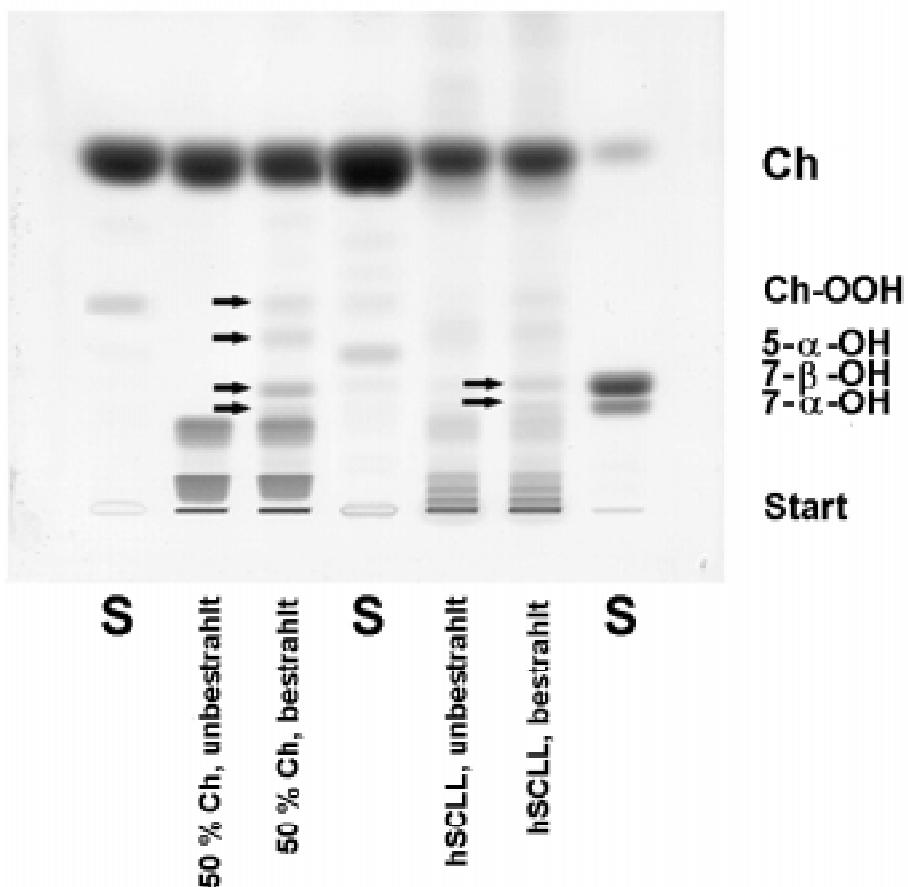


Abbildung 38: Dünnschichtchromatographische Trennung von Lipiden nach 8-stündiger Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht. Abkürzungen: Ch, Cholesterol; Ch-OOH, Cholesterol-Hydroperoxide; 7-Keto-Ch, 7-Keto-Cholesterol; 5- $\alpha$ -OH, 5 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol; 7- $\beta$ -OH, 7 $\beta$ -Hydroxy-Cholesterol; 7- $\alpha$ -OH, 7 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol; S, Oxysterol-Standard; hSCLL, humane Stratum corneum Lipid Liposomen

In den hSCLL entstanden während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht ebenfalls Oxidationsprodukte des Cholesterols. Sicher zuordnen lassen sich 7 $\beta$ -Hydroxy-Cholesterol und 7 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol. Weder in den Liposomen aus synthetischen Lipiden (50 %, w/w Cholesterol) noch in den hSCLL entstand im Verlauf der UV-induzierten Lipidperoxidation 5 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol.

Abbildung 39 zeigt die dünnschichtchromatographische Trennung von Lipiden und ihren Oxidationsprodukten, die durch die Bestrahlung von Liposomen mit natürlichem Sonnenlicht entstanden sind.

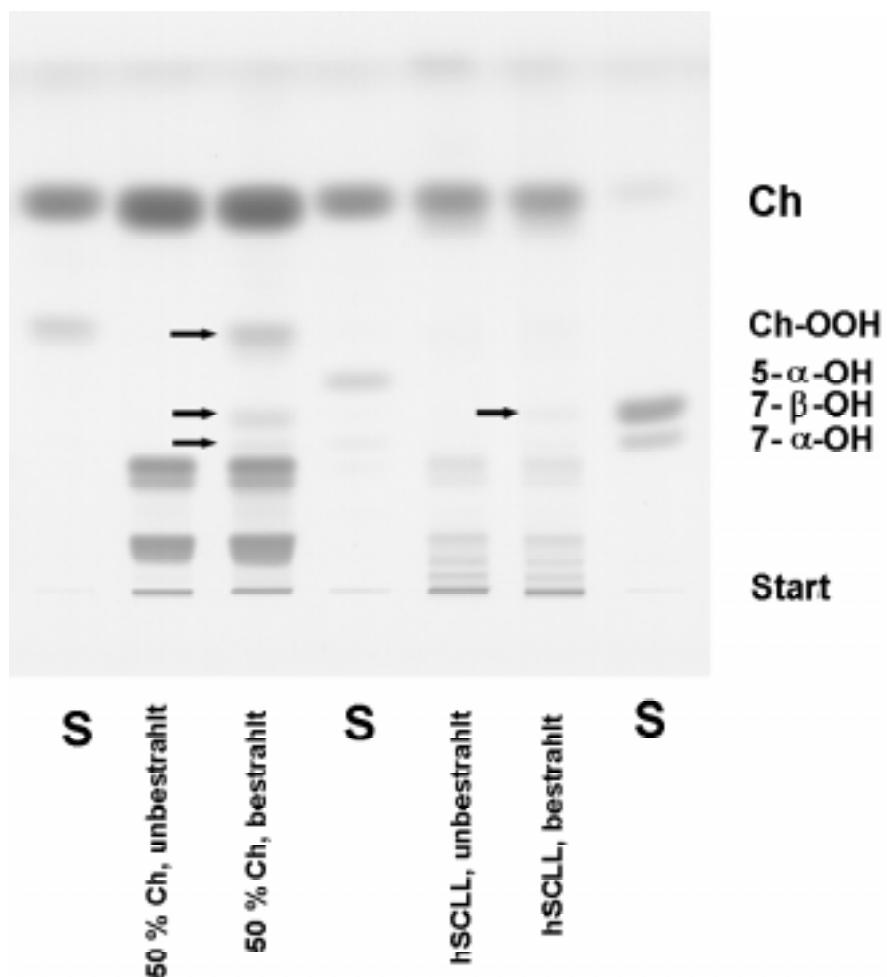


Abbildung 39: Dünnenschichtchromatographische Trennung von Lipiden nach 12-stündiger Bestrahlung mit natürlichem Sonnenlicht. Abkürzungen: Ch, Cholesterol; Ch-OOH, Cholesterol-Hydroperoxide; 5- $\alpha$ -OH, 5 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol; 7- $\beta$ -OH, 7 $\beta$ -Hydroxy-Cholesterol; 7- $\alpha$ -OH, 7 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol; S, Oxysterol-Standard; hSCLL, humane Stratum corneum Lipid Liposomen

Durch die Bestrahlung mit natürlichem Sonnenlicht entstanden in den Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol drei verschiedene Oxidationsprodukte des Cholesterols. Diese drei Produktbanden konnten durch den Vergleich der Laufstrecken mit denen der Oxysterol-Standards als Cholesterol-Hydroperoxide, 7 $\beta$ -Hydroxy-Cholesterol und 7 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol identifiziert werden. In den hSCLL entstand infolge der Sonnenlicht-Bestrahlung 7 $\beta$ -Hydroxy-Cholesterol. Dagegen wurde weder in den Vesikeln aus synthetischen und semi-synthetischen Lipiden noch in den hSCLL 5 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol

nachgewiesen. Ein Oxidationsmechanismus nach Typ II kann deshalb ausgeschlossen werden.

### 6.1.2. Trennung von Oxysterolen durch HPLC

#### *6.1.2.1. Chromatographisches System*

Als alternatives chromatographisches System zur Trennung der Stratum corneum Lipide und ihrer Oxidationsprodukte wurde die analytische HPLC angewandt. Als stationäre Phase diente eine Diolsäule. Als Elutionsmittel wurde ein Gemisch aus Ethylacetat/n-Hexan = 6/4 (v/v) verwendet. Das Probevolumen betrug jeweils 20 µl. Die Lipidkonzentration variierte zwischen 0,5 mg/ml und 1,5 mg/ml. Mit einer Flußrate von 1 ml/min wurden die unpolaren Hautlipide (Sterolester, Triacylglycerole) sowie Cholesterol und seine Oxidationsprodukte innerhalb von 20 Minuten von der Säule eluiert. Ceramide und Cholesterol-3-sulfat verblieben in diesem System auf der Säule. Diese Substanzen wurden im Anschluß an die Trennung mit reinem Ethylacetat, danach mit Ethylacetat/Ethanol = 4/1 (v/v) von der Säule gespült. Die Detektion der Lipide erfolgte parallel im UV-Detektor und einem Lichtstreuendetektor (ELSD). In Abbildung 40 ist die Trennung von Oxysterol-Standardverbindungen gezeigt.

#### *Evaporative Light Scattering Detector (ELSD):*

Die Arbeitsweise dieses Detektors beruht auf der Vernebelung des HPLC-Säuleneluats durch Stickstoff, was zur Entstehung eines Aerosols führt. Anschließend wird das Lösungsmittel verdampft, so daß sich in den Tröpfchen die nicht-flüchtigen gelösten Substanzen anreichern. Die Detektion der Probensubstanzen erfolgt durch die Streuung eines Laserstrahls durch die Probenpartikel.

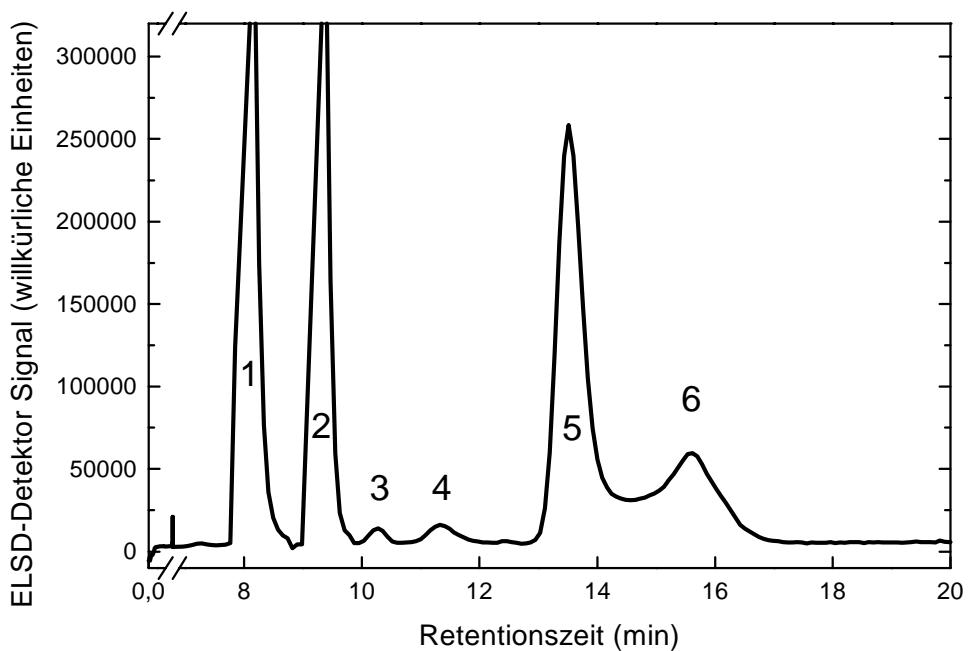


Abbildung 40: Trennung von Oxysterol-Standardverbindungen mittels analytischer HPLC. Als stationäre Phase kam eine DIOL-Säule, als mobile Phase ein Gemisch aus Ethyleacetat/n-Hexan = 6/4 (v/v) zum Einsatz. Die Flußrate betrug 1 ml/min. Die Detektion erfolgte mit einem ELSD-Detektor. Peaks: 1, Cholesterol; 2, 7-Keto-Cholesterol; 3, 5 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol; 4, Cholesterol-Hydroperoxide; 5, 7 $\beta$ -Hydroxy-Cholesterol; 6, 7 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol.

Wie das Chromatogramm in Abbildung 40 zeigt, lassen sich mit dem verwendeten chromatographischen System Cholesterol und fünf seiner Oxidationsprodukte voneinander trennen. Die Retentionszeiten der einzelnen Substanzen sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Retentionszeiten von Oxysterol-Standardverbindungen. Die Elution erfolgte mit Ethylacetat/n-Hexan = 6/4 (v/v) von einer DIOL Säule bei einer Flußrate von 1 ml/min.

Sterol/Oxysterol	Peak-Nr. (in Abb. 40)	Retentionszeit (min)
Cholesterol	1	8,01
7-Keto-Cholesterol	2	9,22
5 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol	3	10,27
Cholesterol-Hydroperoxide	4	11,33
7 $\beta$ -Hydroxy-Cholesterol	5	13,51
7 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol	6	15,61

#### 6.1.2.2. Entstehung von Cholesteroloxydationsprodukten in hSCLL durch natürliche Sonnenstrahlung

Die Abbildung 41 zeigt die Trennung der Lipide von hSCLL Extrakten vor und nach einer 12-stündigen Bestrahlung mit natürlichem Sonnenlicht. Die Analyse des Extraks bestrahlter hSCLL im Vergleich zu den unbestrahlten Vesikeln ergab zwei zusätzliche Peaks. Aufgrund der ermittelten Retentionszeit von 9,23 Minuten konnte ein Peak dem 7-Keto-Cholesterol zugeordnet, während der Peak mit der Retentionszeit von 14,3 Minuten als 7 $\beta$ -Hydroxy-Cholesterol identifiziert werden konnte.

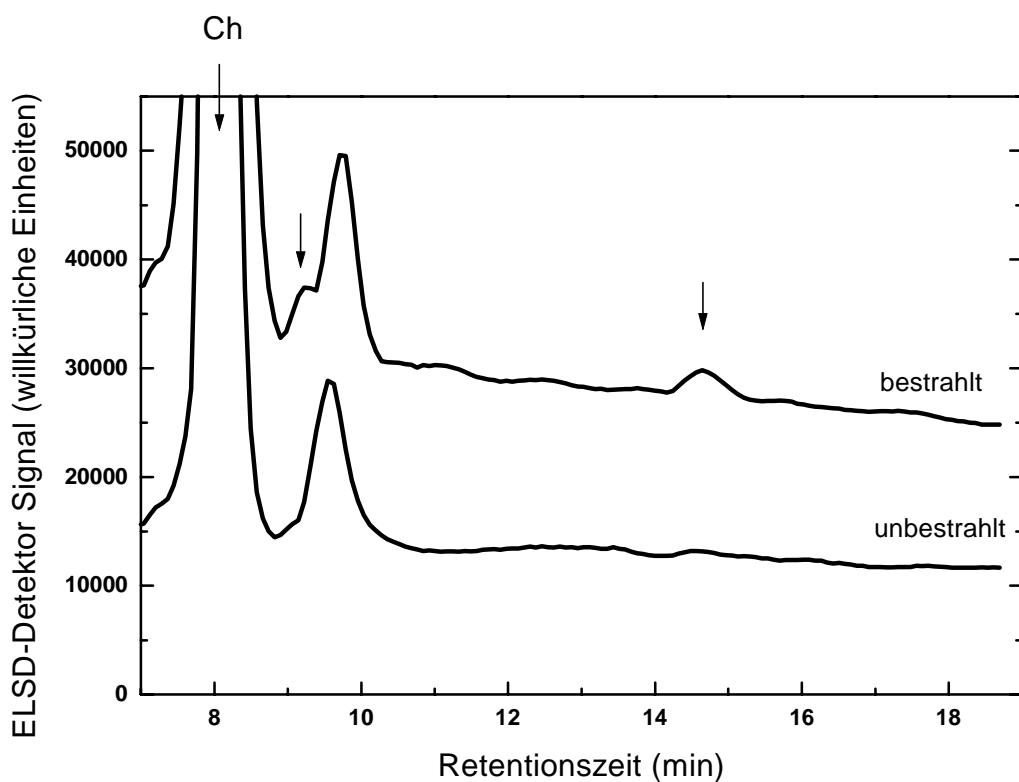
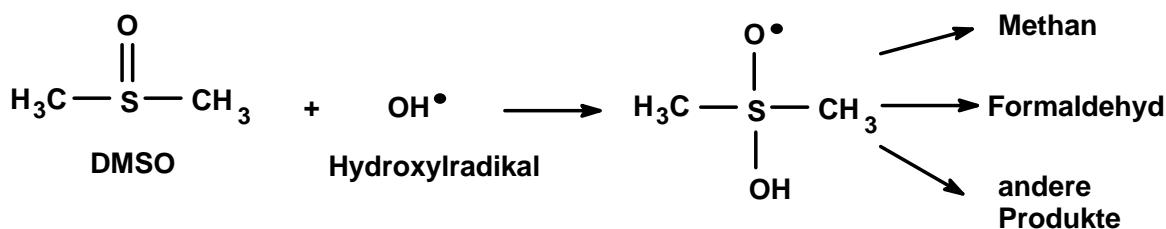


Abbildung 41: Trennung von humanen Stratum corneum Lipiden vor und nach einer 12-stündigen Bestrahlung mit natürlichem Sonnenlicht mittels HPLC. Als stationäre Phase kam eine DIOL-Säule, als mobile Phase ein Gemisch aus Ethyleacetat/n-Hexan = 6/4 (v/v) zum Einsatz. Die Flußrate betrug 1 ml/min.

## **6.2. Radikalfänger-Studien**

### **6.2.1. Dimethylsulfoxid als Hydroxylradikal-Fänger**

Die Beteiligung von Hydroxylradikalen ( $\text{OH}^\bullet$ ) am Oxidationsmechanismus (Typ I) kann durch die Reaktion mit Dimethylsulfoxid (DMSO) nachgewiesen werden [Halliwell und Gutteridge 1989]. DMSO entzieht  $\text{OH}^\bullet$  dem Reaktionsgemisch und die Oxidation wird gehemmt [Klein et al. 1981].



Die UV-induzierte Entstehung von TBARS in Liposomen ohne Cholesterol sowie in Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol wurde in An- und Abwesenheit von DMSO quantifiziert.

Tabelle 7: Entstehung von TBARS in Liposomen nach 4-stündiger Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV-Licht in Ab- und Anwesenheit von 10 vol-% DMSO.

Liposomen (Vgl. Tab. 2)	TBARS (pmol/mg Lipid)	
	ohne DMSO Mittelwert $\pm$ SD	+ 10 vol-% DMSO Mittelwert $\pm$ SD
1	$31,2 \pm 7,1$	$19,3 \pm 1,9$
5	$39,1 \pm 5,0$	$20,9 \pm 4,9$

Wie Tabelle 7 zeigt, wird die TBARS Bildung sowohl in den Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol (Suspension 1) als auch in den Liposomen ohne Cholesterol (Suspension 5) durch den Einsatz von DMSO verringert. In den Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol

werden in Gegenwart von DMSO nur 61,9 % der TBARS-Konzentration gebildet, als ohne DMSO. Die TBARS Entstehung in den Liposomen ohne Cholesterol wird durch DMSO sogar auf 53,5 % reduziert.

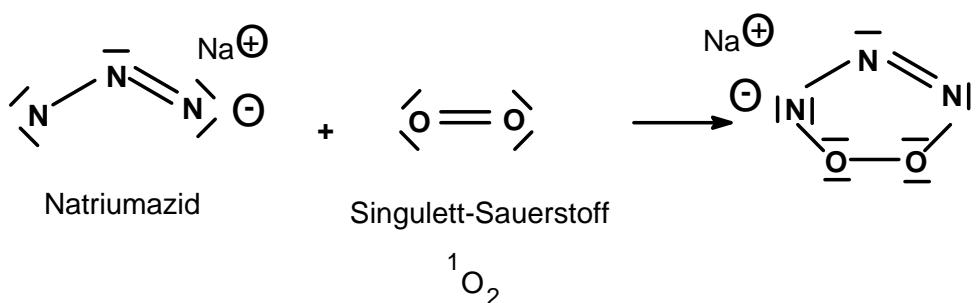
In Tabelle 8 ist der Einfluß von DMSO auf die LOOH Bildung in Liposomen ohne Cholesterol sowie Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol dargestellt. Während die LOOH Bildung in den Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol (Suspension 1) durch DMSO leicht verringert wird (auf 87,0 %), führt die Anwesenheit von DMSO zu einer Verstärkung der LOOH Entstehung in den Liposomen ohne Cholesterol (Suspension 5).

Tabelle 8: Entstehung von LOOH in Liposomen nach 2-stündiger Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV-Licht in Ab- und Anwesenheit von 10 vol-% DMSO.

Liposomen (Vgl. Tab. 2)	LOOH (nmol/mg Lipid)	LOOH (nmol/mg Lipid)
	ohne DMSO Mittelwert ± SD	+ 10 vol-% DMSO Mittelwert ± SD
1	26,5 ± 2,6	23,0 ± 4,1
5	5,1 ± 2,1	9,2 ± 2,4

### 6.2.2. Azid als Singulett-Sauerstoff-Fänger

Singulett-Sauerstoff kann durch eine (3 + 2) Cycloaddition mit Azid ( $\text{N}_3^-$ ) dem Reaktionsgemisch entzogen werden und steht dem Oxidationsmechanismus nach Typ II nicht mehr zur Verfügung [Marsh 1968]. Findet eine Oxidation nach Typ II statt, so wird diese durch den Einsatz von Azid gehemmt.



Der Einfluß von 100 mM  $\text{NaN}_3$  auf die UV-induzierte Entstehung von TBARS in Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol und in Liposomen ohne Cholesterol ist in Tabelle 9 gezeigt.

Tabelle 9: Entstehung von TBARS in Liposomen nach 4-stündiger Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV-Licht in Ab- und Anwesenheit von 100 mM  $\text{NaN}_3$ .

Liposomen (Vgl. Tab. 2)	TBARS (pmol/mg Lipid)		TBARS (pmol/mg Lipid)	
	ohne $\text{NaN}_3$ Mittelwert $\pm$ SD	+ 100 mM $\text{NaN}_3$ Mittelwert $\pm$ SD	ohne $\text{NaN}_3$ Mittelwert $\pm$ SD	+ 100 mM $\text{NaN}_3$ Mittelwert $\pm$ SD
1	31,2 $\pm$ 7,1	27,4 $\pm$ 4,1		
5	39,1 $\pm$ 5,0	86,9 $\pm$ 9,5		

In Anwesenheit von  $\text{NaN}_3$  kommt es zu einer leichten, nicht signifikanten, Verringerung der TBARS Entstehung in den Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol (Suspension 1) auf 87,99 %. Dagegen führt die UV-Bestrahlung von Liposomen ohne Cholesterol (Suspension 5) in Anwesenheit von  $\text{NaN}_3$  zu einer deutlichen Steigerung der TBARS Entstehung (auf 222,2 %).

Die Bildung von LOOH infolge der UV-induzierten Oxidation wird ebenfalls von  $\text{NaN}_3$  beeinflußt, wie aus Tabelle 10 hervorgeht. Wie die TBARS Entstehung wird auch die LOOH Bildung in den Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol (Suspension 1) durch die Anwesenheit von  $\text{NaN}_3$  leicht reduziert. Die LOOH Bildung in den Vesikeln ohne Cholesterol (Suspension 5) steigt in Gegenwart von  $\text{NaN}_3$  deutlich an.

Tabelle 10: Entstehung von LOOH in Liposomen nach 2-stündiger Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV-Licht in Ab- und Anwesenheit von 100 mM NaN<sub>3</sub>.

Liposomen (Vgl. Tab. 2)	LOOH (nmol/mg Lipid)	LOOH (nmol/mg Lipid)
	ohne NaN <sub>3</sub> Mittelwert ± SD	+ 100 mM NaN <sub>3</sub> Mittelwert ± SD
1	26,4 ± 2,6	22,9 ± 5,3
5	5,1 ± 2,1	15,4 ± 3,4

### **6.3. Diskussion**

Wie in diesem Kapitel beschrieben wurde, kann die Lipidperoxidation auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Nach welchem Mechanismus ultraviolette Strahlung die Lipidperoxidation induziert, wird in der Literatur bisher kontrovers diskutiert. Es gibt Studien, die die UV-A induzierte Entstehung von  $^1\text{O}_2$  beschreiben [Bose et al. 1989; Bose et al. 1990; Vile und Tyrrell 1995]. Durch Singulett-Sauerstoff werden die Lipide nach Typ II oxidiert. Daneben wurden aber auch Daten über die Bildung von Superoxidanionen ( $\text{O}_2^-$ ) infolge von UV-A Bestrahlung von Liposomen publiziert [Bhatia et al. 1991]. Daß endogene Sensitizermoleküle, wie NAD(P)H, durch die Bestrahlung mit natürlichem Sonnenlicht Superoxidanionen produzieren, haben Cunningham und Mitarbeiter bereits 1985 nachgewiesen [Cunningham et al. 1985]. Negre-Salvayre und Mitarbeiter zeigten, daß die UV-Bestrahlung von Cholesterin in Lipoproteinen (LDL) zur Entstehung von  $7\alpha$ - und  $7\beta$ -Hydroxy-Cholesterin führt [Negre-Salvayre et al. 1994]. Auf diese Weise wiesen sie den Oxidationstyp I nach.

Um den Mechanismus, nach dem die Lipide in unseren Experimenten oxidiert wurden, zu identifizieren, wurden zwei Methoden angewandt. Zum einen wurden die entstandenen Cholesteroloxidationsprodukte analysiert. Zum anderen wurden Radikalfänger eingesetzt, um den Einfluß bestimmter ROS zu ermitteln.

Die Analytik von Cholesteroloxidationsprodukten wurde zur Klärung des Oxidationsmechanismus ausgewählt, da das Cholesterin ohnehin in hoher Konzentration im menschlichen Stratum corneum vorkommt und außerdem die Trennung von Oxysterolen bereits umfangreich untersucht und publiziert wurde. In dieser Arbeit wurden Cholesteroloxidationsprodukte sowohl dünnenschichtchromatographisch als auch durch HPLC getrennt und durch den Vergleich mit Oxysterol-Standardverbindungen identifiziert. Das Laufmittel und die stationäre Phase für die Dünnschichtchromatographie wurde entsprechend der Arbeit von Korytowski und Mitarbeitern gewählt [Korytowski et al. 1991]. Die Oxysterol-Standardverbindungen wurden nach der Methode von Girotti und Mitarbeitern gewonnen [Girotti et al. 1987]. Wie in Abbildung 38 gezeigt, entstehen infolge der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht sowohl in den Liposomen aus

synthetischen Lipiden mit 50 % (w/w) Cholesterol als auch in den hSCLL Cholesterol-Hydroperoxide,  $7\alpha$ - und  $7\beta$ -Hydroxy-Cholesterol. Dagegen konnte weder in den hSCLL noch in den Liposomen aus synthetischen Lipiden  $5\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol nachgewiesen werden. Zum gleichen Ergebnis führte die Oxidation, die durch die Bestrahlung mit natürlichem Sonnenlicht induziert wurde. Wie aus Abbildung 39 hervorgeht, entstehen in den bestrahlten Liposomensuspensionen neben Cholesterol-Hydroperoxiden nur  $7\alpha$ - und  $7\beta$ -Hydroxy-Cholesterol.

Die gezeigten Ergebnisse belegen, daß die Oxidation nach dem Mechanismus des Typ I stattfindet. Wie aus zahlreichen Publikationen hervorgeht, können Oxysterole mit Sauerstoff-Funktionen am Kohlenstoffatom 7 nur durch die Oxidation infolge eines radikalischen Angriffs entstehen [Girotti 1990; Girotti 1992; Paillous und Fery-Forgues 1994]. Wie in der vorlegenden Arbeit gezeigt wurde, wird Cholesterol sowohl durch die Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht als auch mit natürlichem Sonnenlicht am Kohlenstoffatom 7 des Sterolgerüstes oxidiert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß in beiden Fällen die Oxidation nach dem gleichen Mechanismus abgelaufen ist.

Neben der Analytik spezifischer Oxysterole wurde der Oxidationsmechanismus durch Radikalfängerstudien charakterisiert. Durch den Einsatz von DMSO und  $\text{NaN}_3$  wurden zusätzliche Information über die am Oxidationsmechanismus beteiligten ROS gewonnen. Wie zahlreiche Arbeiten belegen, ist DMSO ein wirksamer Hydroxylradikal-Fänger [Reuvers et al. 1973, Klein et al. 1981]. Daß an dem UV-induzierten Oxidationsmechanismus der vorgestellten Experimente Hydroxylradikale beteiligt waren, wurde durch die Verringerung der Oxidation in Anwesenheit von DMSO gezeigt (Tabelle 7). Sowohl in den Liposomen ohne Cholesterol (Suspension 5) als auch in den Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterol (Suspension 1) führt die Anwesenheit von DMSO zu einer signifikanten Reduzierung der TBARS-Konzentration. Daraus folgt, daß an der Entstehung von TBARS Hydroxylradikale ( $\text{OH}^\bullet$ ) beteiligt sind. Dieses Ergebnis bestätigt das zuvor erhaltene Resultat, daß die UV-induzierte Lipidperoxidation in den untersuchten Liposomensuspensionen nach dem Mechanismus des Typ I abläuft.

Wie die Tabelle 8 zeigt, spielen Hydroxylradikale für die Entstehung von LOOH in den gleichen Vesikeln eine untergeordnete Rolle. Die LOOH Bildung wird in den Liposomen

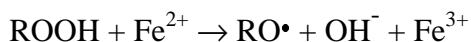
mit 50 % (w/w) Cholesterol (Suspension 1) nur leicht reduziert. Die LOOH Entstehung in den Vesikeln ohne Cholesterol (Suspension 5) wird durch die Anwesenheit von DMSO jedoch nicht vermindert sondern sogar verstärkt. Andere Spezies, beispielsweise Alkoxyradikale ( $\text{RO}^\bullet$ ) oder Superoxidanionen ( $\text{O}_2^-$ ), müssen folglich für die LOOH Entstehung nach dem Oxidationsmechanismus des Typ I verantwortlich sein.

Um zu belegen, daß die Oxidation durch Singulett-Sauerstoff (Typ II) nur eine untergeordnete Rolle spielt, wurde der Einfluß von  $\text{NaN}_3$  auf die UV-induzierte Oxidation untersucht. Die Anwesenheit von  $\text{NaN}_3$  führt zu einer Hemmung der  ${}^1\text{O}_2$  abhängigen Lipidperoxidation (Typ II) [Hasty et al. 1972, Gorman 1992]. Wie die Tabelle 9 zeigt, wird die TBARS-Konzentration, die bei der Bestrahlung von Vesikeln mit 50 % (w/w) Cholesterol (Suspension 1) entsteht, durch  $\text{NaN}_3$  kaum beeinflußt. Die leichte Reduktion der TBARS-Konzentration ist nicht signifikant. Die Bestrahlung von Liposomen ohne Cholesterol (Suspension 5) in Anwesenheit von  $\text{NaN}_3$  führt sogar zu einer Steigerung der entstehenden TBARS-Konzentration. Wie aus Tabelle 10 hervorgeht, beeinflußt  $\text{NaN}_3$  die UV-induzierte LOOH Entstehung in ähnlicher Weise, wie die TBARS Bildung. Während eine leichte Reduzierung der LOOH-Konzentration in den Vesikeln mit 50 % (w/w) Cholesterol (Suspension 1) beobachtet wurde, steigt die LOOH-Konzentration in den Liposomen ohne Cholesterol (Suspension 5) infolge der UV-Bestrahlung drastisch an. Aus diesen Ergebnissen läßt sich der Schluß ziehen, daß  ${}^1\text{O}_2$  an der UV-induzierten Lipidperoxidation in unseren Experimenten nicht beteiligt ist. Die Entstehung der Oxidationsprodukte TBARS und LOOH wird durch den  ${}^1\text{O}_2$ -Fänger  $\text{NaN}_3$  nicht oder nicht signifikant verringert. Dieses Resultat bestätigt außerdem das aus der Analytik der Cholesteroloxidationsprodukte erhaltene Ergebnis, daß die Lipidperoxidation nicht durch  ${}^1\text{O}_2$ , sondern durch Sauerstoff-Radikale initiiert wird (Oxidationsmechanismus Typ I).

Die einzelnen Schritte der Lipidperoxidation sind bereits umfangreich untersucht worden. Es gibt aber bislang keine oder nur unzureichende Daten über die primären, die Lipidperoxidation initiiierenden Ereignisse. Wie die Abbildung 33 zeigt, ist das Vorhandensein von freien Radikalen (z.B.  $\text{OH}^\bullet$ ) oder  ${}^1\text{O}_2$  Voraussetzung dafür, daß die Lipidperoxidation initiiert wird. Auf welchem Weg UV Strahlung diese ROS erzeugt, ist jedoch nicht vollständig geklärt. Ultraviolette Strahlung ist einerseits zu energiearm, um

C-H Bindungen in den Lipiden oder die O-H Bindung im Wasser zu spalten. Andererseits enthielten die Modellmembranen aus den synthetischen und semi-synthetischen Lipiden keine Photosensitizer, deren Anwesenheit zur Entstehung von  ${}^1\text{O}_2$  oder anderen ROS führen könnten.

Eine mögliche Quelle von ROS sind in den Lipiden bereits vorhandene Hydroperoxide. Ungesättigte Lipide unterliegen permanent der Autoxidation durch Luft-Sauerstoff [Elstner 1990, Smith 1981]. Die O-O Bindung in Hydroperoxiden kann durch ultraviolette Strahlung homolytisch gespalten werden [Fox und Whitesell 1995]. Auf diese Weise werden sowohl  $\text{OH}^\bullet$  als auch  $\text{RO}^\bullet$  frei gesetzt. *Islomov* und Mitarbeiter wiesen freie Radikale in UV-bestrahltem, autoxidiertem Phosphatidylcholin nach [Islomov et al. 1977]. Auch in Spuren vorhandene Metallionen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) können die Lipidperoxidation induzieren. Wie in Kapitel 2.2.3.1. beschrieben, entstehen in Anwesenheit von Metallionen im wässrigen Milieu aus  $\text{O}_2$  spontan Superoxidanionen ( $\text{O}_2^-$ ). In Anwesenheit von Metallionen, wie beispielsweise  $\text{Fe}^{2+}$ , können außerdem aus Hydroperoxiden (LOOH,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) Sauerstoff-Radikale entstehen:



Dies führt einerseits zum Abbau der durch Oxidation bereits entstandenen LOOH, andererseits wird die weitere Oxidation nach Typ I forciert.

Daß vorhandene Hydroperoxide die UV-induzierte Lipidperoxidation induzieren können, wurde außerdem experimentell bestätigt. In Liposomenmembranen aus Di-myristoyl-phosphatidyl-cholin (DMPC) wurde ein stabiles, kommerziell erhältliches Hydroperoxid (HPODE) inkorporiert und der Sauerstoff-Verbrauch während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht quantifiziert. Wie die Abbildung 42 zeigt, wird bei der UV Bestrahlung der HPODE-haltigen DMPC-Liposomen deutlich mehr Sauerstoff verbraucht, als in den DMPC Vesikeln ohne HPODE, was ein Beleg dafür ist, daß HPODE die UV-induzierte Oxidation forciert.

Daß es sich bei dem gezeigten Ergebnis um den Nachweis einer Lipidperoxidation handelt, wurde durch Kontrollexperimente gezeigt. Weder die Bestrahlung des verwendeten Puffers, noch von HPODE in Puffer führte zum Verbrauch einer äquivalenten Menge Sauerstoff. Auch bei der Bestrahlung von DMPC-Liposomen ohne HPODE nimmt die

Sauerstoff-Konzentration nicht in gleichem Maße ab. In diesen Ansätzen wurde lediglich der Eigenverbrauch von Sauerstoff der Clark-Elektrode gemessen.

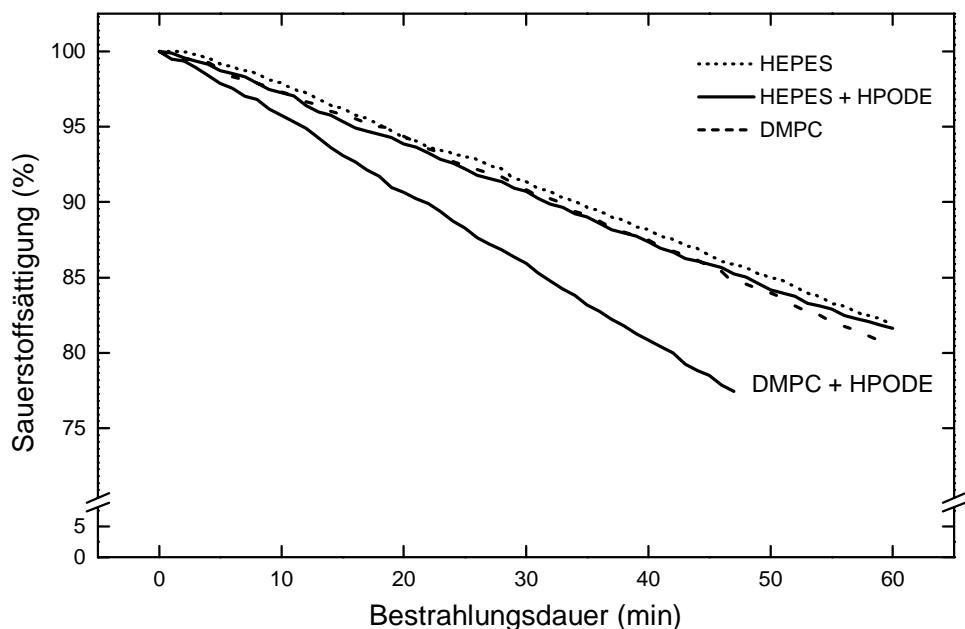


Abbildung 42: Sauerstoff-Verbrauch während der UV Bestrahlung von DMPC-Liposomen (1 mg/ml) in An- und Abwesenheit von HPODE (1,5  $\mu$ g/ml) in 0,1 M HEPES (pH 7,3).

## 7. Folgen der UV-induzierten Oxidation der Stratum corneum Lipide

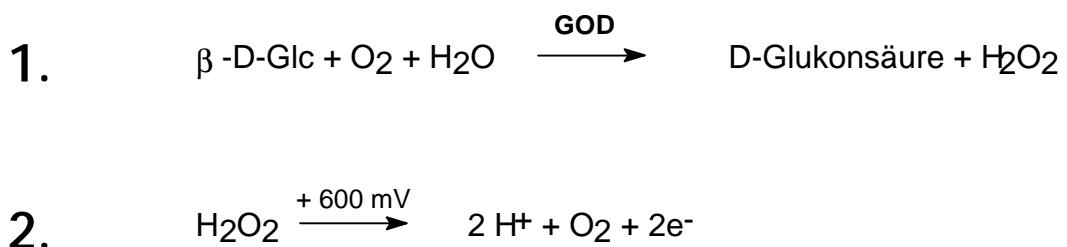
Um Hinweise auf die Auswirkung der Lipidperoxidation auf die Barriereeigenschaft der menschlichen Hornhaut zu erhalten, wurden die Folgen der UV-induzierten Oxidation der liposomalen Lipide für die Membranpermeabilität der Vesikel, sowie das Proliferationsverhalten einer Keratinozytenkultur untersucht.

### 7.1. Glukose-Efflux-Messung

#### 7.1.1. Bau und Funktionsweise der Glukoseoxidase-Enzymelektrode

Die Bestimmung der Membranpermeabilität der Liposomen erfolgte durch die Bestimmung des Glukose-Efflux aus den Vesikeln. Die Glukose wurde dazu in die Liposomen verkapselt und ihre Permeation durch die liposomale Membran als steigende Glukose-Konzentration im umgebenden Puffer nachgewiesen.

Für diese Experimente wurden die Liposomen, wie in Kapitel 4.2.5. beschrieben präpariert, wobei dem Puffer zuvor 1 M  $\beta$ -D-Glukose zugesetzt wurde. Die nicht eingeschlossene Glukose wurde durch Gelfiltration über eine Sephadex-Säule (12 cm x 3 cm) von den Vesikeln abgetrennt. Die Liposomensuspension wird dabei auf ca. 1/10 der ursprünglichen Konzentration verdünnt (ca. 1 mg/ml). Unmittelbar im Anschluß an die Filtration startete die Messung der Glukose-Konzentration im Puffer mit Hilfe einer Glukoseoxidase-Enzymelektrode. Diese enthält eine Doppelmembran, die das Enzym innerhalb der Meßzelle fixiert, durch die die Probenlösung gespült wird. Die Glukose diffundiert durch die erste Membran und wird vom Enzym zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid umgesetzt (Gleichung 1). Das  $H_2O_2$  diffundiert durch die zweite Membran und wird an einer Platinelektrode oxidiert (Gleichung 2). Der resultierende Stromfluß ist der Glukose-Konzentration in der Probenlösung proportional.



### 7.1.2. Glukose-Efflux aus Liposomen

Der Glukose-Efflux aus Liposomen ist ein Maß für die Permeabilität der Vesikelmembranen. Die Abbildung 43 vergleicht die Membranpermeabilität für Glukose von Liposomen aus synthetischen und semi-synthetischen Lipiden mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt und hSCLL.

Erwartungsgemäß ist die Permeabilität der Vesikelmembran mit 50 % (w/w) Cholesterol deutlich niedriger als die der Liposomen ohne Cholesterol. Die geringste Permeabilität zeigten die Membranen der hSCLL. Infolge der UV-Bestrahlung kommt es zur deutlichen Erhöhung der Membranpermeabilität. In allen untersuchten Suspensionen erhöht sich die Glukose-Permeation infolge der Bestrahlung mit UV Licht. Es zeigte sich außerdem, daß der kondensierende Einfluß des Cholesterol auch unter den Bestrahlungsbedingungen wirksam bleibt. In Liposomen ohne Cholesterol erfolgt der Glukose-Efflux am schnellsten, aus Liposomen mit 5 % (w/w) Cholesterol verzögert und am langsamsten aus hSCLL.

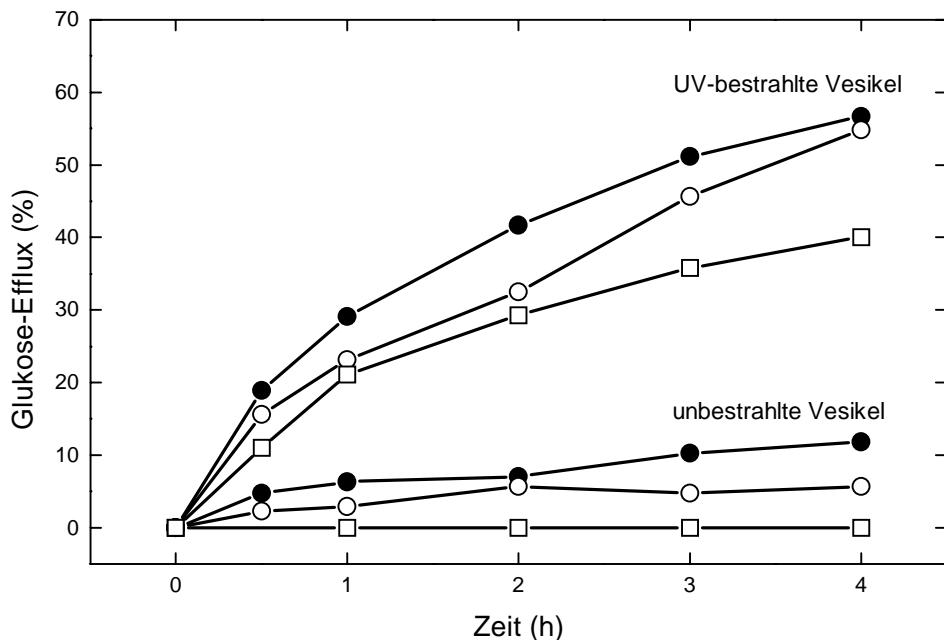


Abbildung 43: Glukose-Efflux aus Liposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht. Liposomen ohne Cholesterin (●), Liposomen mit 50 % (w/w) Cholesterin (○), hSCLL (□).

## 7.2. Einfluß der Oxidation auf das Proliferationsverhalten von humanen Keratinozyten

Wie in Kapitel 2.1.2. dargestellt, stammen die Keratinozyten aus den Keratinoblasten der Basalzellschicht der Epidermis und wandern im Laufe ihrer Differenzierung nach außen zur Hornschicht. Innerhalb des Stratum corneum liegen die Zellen als abgestorbene Corneozyten vor. In diesem differenzierten Stadium sind die Zellen verhornt und mit Keratinbündeln gefüllt. Sie besitzen keinen Stoffwechsel mehr, die meisten Zellorganellen wurden abgebaut.

Um die lebenden Keratinozyten zu beeinflussen, müssen schädigende Substanzen oder Umwelteinflüsse in die tieferen Schichten der Epidermis vordringen (Stratum granulosum, Stratum spinosum, Stratum basale). UV-Strahlung, insbesondere UV-A, gelangt durch die

Epidermis hindurch bis in die Dermis [Bruels et al. 1984]. UV-B Strahlung wird zum überwiegenden Teil in der Epidermis absorbiert (Tabelle 1).

### 7.2.1. Bestimmung der Zellproliferation

Um die Frage zu beantworten, ob Lipidoxidationsprodukte, die durch die Einwirkung von UV Licht auf die Lipidschicht des Stratum corneum entstehen, die Vitalität der benachbarten Keratinozyten beeinträchtigen, wurde eine Keratinozyten-Kultur mit Liposomen kultiviert und die Vitalität der Zellen anhand ihrer Proliferationsrate bestimmt. Verwendet wurde eine HaCaT Zelllinie (Human Adult Low Calcium High Temperature Keratinocytes). Dabei handelt es sich um immortale, nichttumorigene Keratinozyten. Jeweils 72 h vor Versuchsbeginn wurden die Zellen in Kulturplatten eingesät und bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C kultiviert. Die Zelldichte nach 72 h betrug 25 000/ml. Nach Zugabe der sterilen Liposomen zu den Zellen erfolgte eine weitere Kultivierung über 24 h. Die Zellvitalität wurde im Anschluß durch die Bestimmung der Zellproliferation bestimmt. Der Einbau des radioaktiven Nukleotids 6-[<sup>3</sup>H]-Thymidin in neu synthetisierte DNA ist ein Maß für die Zellproliferation. Eine Stunde vor dem Ablauf der zweiten Inkubationszeit wurden dem Kulturmedium 20 µl 6-[<sup>3</sup>H]-Thymidin (0,5 µCi/ml per well) zugesetzt. Nach der 24-stündigen Kultivierung wurden die Zellen mit 0,3 % Trypsin suspendiert, gewaschen, auf Filterpapierplättchen getrocknet und mit jeweils 3 ml Scintillationsflüssigkeit versetzt. In einem Flüssigkeit-Scintillations-Zähler erfolgte die Messung der Radioaktivität.

### 7.2.2. Die Wirkung von Lipiden und Lipidoxidationsprodukten auf das Proliferationsverhalten von Keratinozyten

Wie Abbildung 44 zeigt, wirken Liposomen aus natürlichem Stratum corneum Lipid Extrakt (hSCLL) in Abhängigkeit von ihrer Konzentration zytotoxisch. Ab einer Lipidkonzentration von 0,025 % im Kulturmedium ist eine signifikante Hemmung der Proliferation der HaCaT-Zellen zu beobachten.

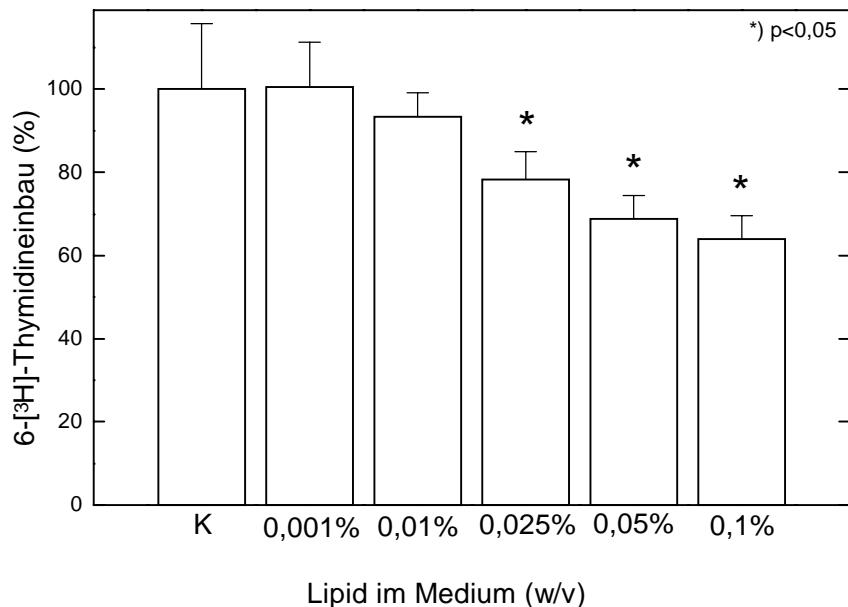


Abbildung 44: Einfluß von hSCLL unterschiedlicher Konzentration auf die Proliferationsrate der HaCaT-Zellen. Abkürzung: K, Puffer-Kontrolle. \*) Signifikanz bezüglich der Puffer-Kontrolle. Die Mittelwertsunterschiede wurden durch einfache Varianzanalyse geprüft.

Die höchste, die Proliferation der Keratinozyten nicht hemmende hSCLL-Konzentration (0,01 %), wurde für die Bestrahlungsexperimente verwendet. In Abbildung 45 ist die Zytotoxizität der hSCLL nach unterschiedlich langen Bestrahlungszeiten dargestellt. Bereits nach 30 Minuten Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht nimmt die Zytotoxizität der hSCLL signifikant zu. Die Konzentration neu synthetisierter DNA in HaCaT-Zellen, die mit diesen hSCLL kultiviert wurden, beträgt nur noch 74,8 % im Vergleich zur Puffer-Kontrolle. Mit zunehmender Bestrahlungsdauer nimmt die proliferationshemmende Wirkung der hSCLL zu. Über 5 h mit künstlich erzeugtem UV-Licht bestrahlte hSCLL reduzieren die DNA Synthese in den HaCaT-Zellen auf 35,7 %. Mit der UV-Bestrahlung einher geht die Bildung von Oxidationsprodukten, wie MDA und LOOH (Kapitel 5). Die Zytotoxizität der hSCLL korreliert linear mit den LOOH- bzw. TBARS-Konzentrationen (Abbildung 46). Die Korrelationsfunktion  $y = ax + b$  wird für die LOOH-Konzentrationsabhängigkeit durch die Parameter  $a = -1,83$  und  $b = 90,8$  und für die TBARS-Konzentrationsabhängigkeit durch die Parameter  $a = -2,49$  und  $b = 94,5$  beschrieben.

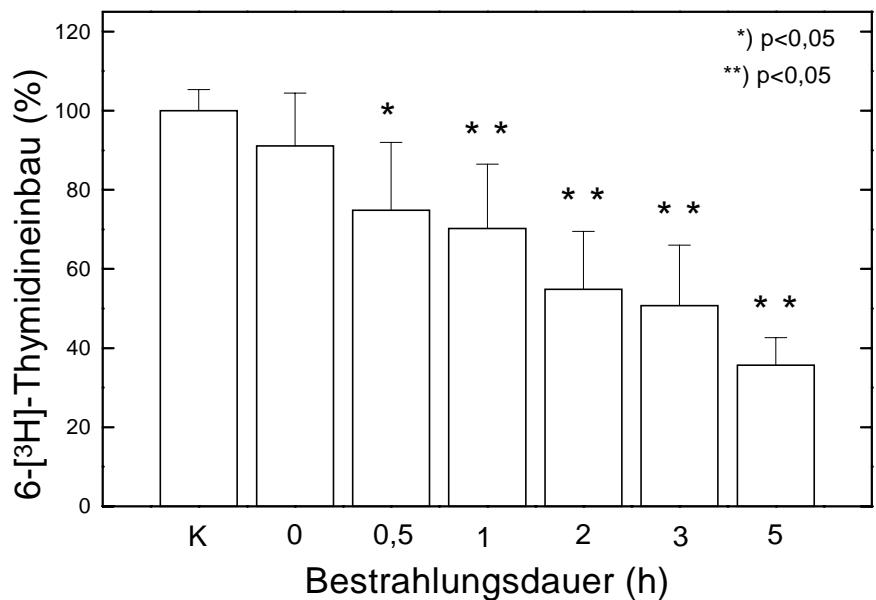


Abbildung 45: Einfluß von hSCLL nach unterschiedlichen Bestrahlungszeiten auf die Proliferationsrate der HaCaT-Zellen. Die Lipidkonzentration betrug jeweils 0,01 %. Abkürzung: K, Pufferkontrolle. \*) Signifikanz bezüglich Puffer-Kontrolle; \*\*) Signifikanz bezüglich unbestrahlter hSCLL. Die Mittelwertsunterschiede wurden durch einfache Varianzanalyse geprüft.

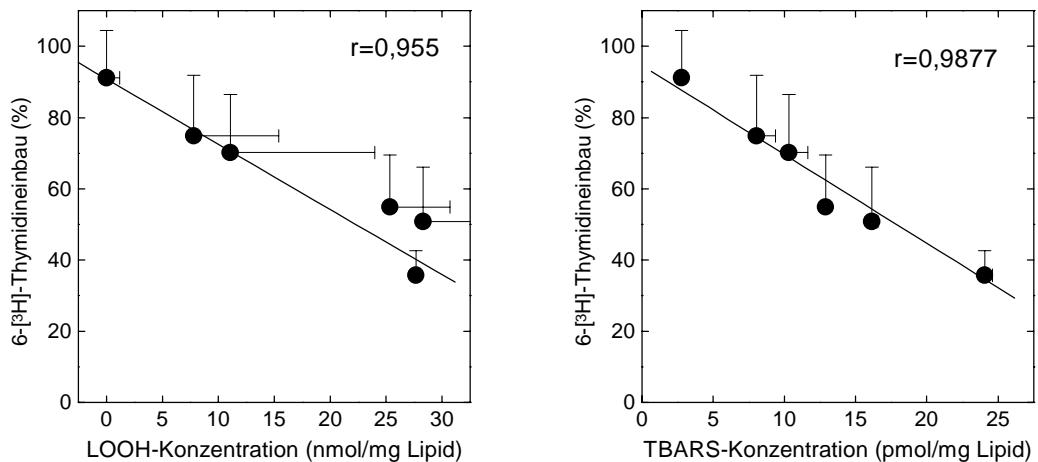


Abbildung 46: Lineare Korrelation zwischen der LOOH- und TBARS-Konzentration in UV-bestrahlten hSCLL und der Proliferationsrate der HaCaT-Zellen.

## **7.3. Diskussion**

### **7.3.1. Der Einfluß von UV-Strahlung auf die Membranpermeabilität von Modellvesikeln**

Die Permeabilität der Modellvesikel wird zum einen durch ihre Lipidzusammensetzung und zum anderen durch die UV-induzierte Oxidation der Membranlipide beeinflußt.

Auf die Abhängigkeit der Membranpermeabilität von der Cholesterolkonzentration wurde bereits in Kapitel 3 hingewiesen. Wie zahlreiche Studien belegen, erhöht Cholesterol die Packungsdichte der Lipidketten, was eine verringerte Membranpermeabilität zur Folge hat [Demel et al. 1972; Hyslop et al. 1990; Li und Das 1994; Slotte 1995]. Erwartungsgemäß sind Liposomen mit hoher Cholesterolkonzentration (50 %, w/w) weniger permeabel für Glukose als Liposomen ohne Cholesterol (Abbildung 43). Die geringste Permeabilität zeigen hSCLL. Aufgrund der strukturellen Beschaffenheit der humanen Stratum corneum Lipide (hoher Sättigungsgrad, hohe Sterolkonzentration) und ihrer Wechselwirkung untereinander (Kapitel 2.1.3. und 3.3.) entspricht auch dieses Ergebnis den Erwartungen. Die durch die Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht induzierte Peroxidation der liposomalen Lipide führt in allen untersuchten Vesikelpopulationen zu einer deutlichen Erhöhung der Membranpermeabilität. Wie Abbildung 43 zeigt, steigt der Glukose-Efflux während der UV-Bestrahlung um ca. 40-50 %.

In Kapitel 5 wurde gezeigt, daß infolge der UV-Bestrahlung in den Liposomenmembranen Lipidoxidationsprodukte (MDA und LOOH) entstehen, sowie die Konzentrationen der ursprünglichen Membranlipide abnehmen. Konsequenz dieser oxidativen Veränderungen der Modellvesikel ist der Ansteig der Membranpermeabilität.

Wie zahlreiche Untersuchungen belegen, resultieren aus den oxidativen Modifizierungen der Membranlipide Änderungen der Membraneigenschaften. Von der Peroxidation der Membranlipide sind u. a. die Fluidität und die Permeabilität der Modellmembranen beeinflußt. Wie *Bose* und *Chatterjee* zeigten, besteht eine positive lineare Korrelation zwischen der MDA-Konzentration, die infolge der UV-A induzierten Oxidation von Ei-PC-Vesikeln entsteht, und der Permeabilität dieser Liposomen [Bose und Chatterjee 1995].

In der gleichen Arbeit wiesen die Autoren nach, daß mit steigender MDA-Konzentration die Membranfluidität abnimmt.

Auch die durch Metallionen induzierte Peroxidation von Liposomenmembranen führt zum Anstieg der Membranpermeabilität. Wie aus der Arbeit von *Kunimoto* und Mitarbeitern hervorgeht, steigt die Glukose-Permeation aus Phosphatidylcholin-Liposomen während der Inkubation mit  $\text{FeSO}_4$  und Ascorbat an [Kunimoto et al. 1981]. *Zhang* und Mitarbeiter untersuchten die Permeabilität von Vesikeln aus Soya-Phosphatidylcholin während der  $\text{Cu}^{+}$ - bzw.  $\text{Fe}^{2+}$ -induzierten Oxidation [Zhang et al. 1994]. Mit zunehmender Inkubationszeit steigt der Efflux des Fluorophors Carboxyfluorescein aus den Liposomen an, was ein Indiz für die zunehmende Membranpermeabilität ist.

Neben den Studien an Modellmembranen wurde der Einfluß der Lipidperoxidation auch an Zellmembranen untersucht. Wie *Girotti* und Mitarbeiter zeigen konnten, führt die Oxidation von Erythrozytenmembranen zum Anstieg der Membranpermeabilität gegenüber Glukose-6-Phosphat [Girotti et al. 1985]. *Han* und Mitarbeiter untersuchten, wie die Membranfluidität von Erythrozyten-Ghosts durch die Oxidation der Erythrozytenmembranen beeinflußt wird [Han et al. 1992]. Sie stellten fest, daß die Lipidperoxidation eine Verringerung der Membranfluidität zur Folge hat. Einer Studie von *Gaboriau* und Mitarbeitern zufolge, werden bei menschlichen Fibroblasten durch die Bestrahlung mit UV-A Licht sowohl die Membranfluidität vermindert als auch die Permeabilität für LDH erhöht [Gaboriau 1993]. Die gleiche Untersuchung zeigt außerdem, daß Vitamin E, ein Inhibitor der Lipidperoxidation, beide Effekte verhindert. Dies belegt, daß beide Phänomene die Folge eines oxidativen Prozesses sind.

Als Ursache für die Veränderung der Membranfluidität und -permeabilität durch die Oxidation der Membranlipide können verschiedene Effekte diskutiert werden. Durch die Oxidation von Kettenlipiden entstehen kürzere Kettenbruchstücke. Wie aus Abbildung 11 hervorgeht, führt die Oxidation mehrfach ungesättigter Lipide zur Entstehung von MDA, wobei die Acylkette um jeweils drei Kohlenstoffatome verkürzt wird. Mit abnehmender Kettenlänge der Membranlipide steigt die Membranpermeabilität von Liposomen [de Gier et al. 1968].

Durch den oxidativen Verlust von Doppelbindungen an den Acylketten der Membranlipide werden die Lipiddoppelschichten außerdem rigider (verringerte Fluidität). Wie *van Duijn*

und Mitarbeiter zeigten, verursacht die Lipidperoxidation einen Anstieg der Phasenübergangstemperatur vom gelartigen zum flüssig-kristallinen Zustand einer Ei-Phosphatidylethanolamin-Dispersion, was diesen Effekt experimentell bestätigt [van Duijn et al. 1984].

Andere Folgen der Peroxidation der Lipidketten der Modellmembranen sind intra- und intermolekulare Quervernetzungen [Halliwell und Gutteridge 1992]. Auf diese Weise wird ebenfalls die Membranstruktur gestört, was eine Permeabilitätserhöhung zur Folge haben kann.

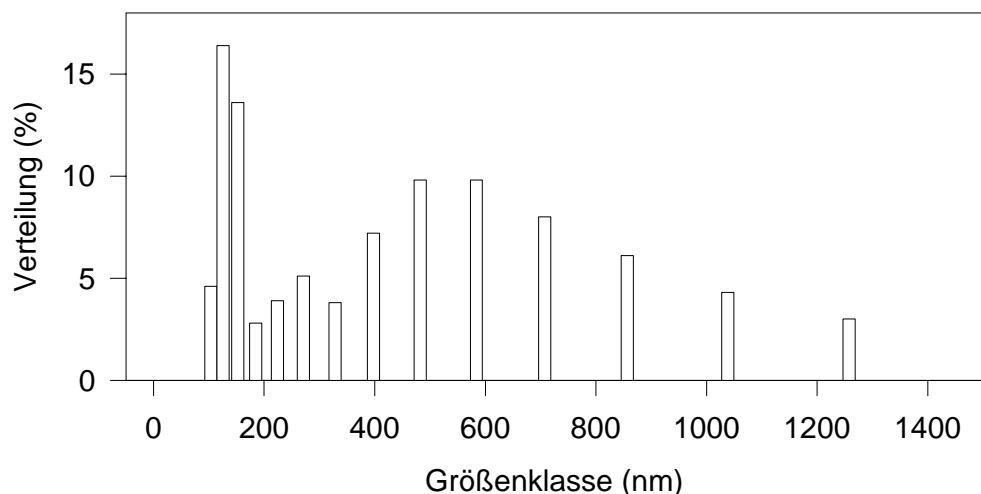


Abbildung 47: Größenverteilung der Liposomen in einer hSCLL-Suspension nach 5-stündiger Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV-Licht.

Wie in Abbildung 47 dargestellt, kommt es infolge einer 5-stündigen Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht zur Änderung der Größenverteilung der Liposomen in einer hSCLL-Suspension. Während die Vesikel vor der Bestrahlung einheitlich zwischen 180 und 280 nm groß sind (Abbildung 8), induziert die UV-Bestrahlung die Entstehung sowohl kleinerer (120-150 nm) als auch größerer Vesikel ( $> 400$  nm) oder Vesikel-Komplexe uneinheitlicher Größe.

Die Ursache für die Entstehung größerer Vesikel oder Vesikel-Komplexe sind möglicherweise Quervernetzungen zwischen den Lipiden unterschiedlicher Vesikel, die auf diese Weise aggregieren sowie Vesikelfusionen [Gast 1982]. Worauf die beobachtete Verkleinerung der Liposomen beruht, ist ungeklärt. Möglicherweise kommt es infolge der UV-induzierten Oxidation der Lipide zu einem von *Sackmann* als 'Budding' bezeichneten Phänomen [Sackmann 1994]. Danach führt die lokale Konzentration von kurzen Lipidkettenbruchstücken in der Liposomenmembran zu einer Erhöhung der Membrankrümmung an dieser Stelle. Aus dieser resultiert im Folgenden die Abschnürung kleinerer Vesikel.

Neben den UV-induzierten Veränderungen an den Kettenlipiden, unterliegen auch die Membransterole strukturellen Modifizierungen, die ihre Membraneigenschaften verändern. Untersuchungen an Modellvesikeln haben ergeben, daß Oxysterole, wie  $7\alpha$ -Hydroxy- und 7-Keto-Cholesterol, ähnlich dem Cholesterol einen kondensierenden Effekt auf die Membran ausüben [Rooney et al. 1986, Li und Das 1994, Theunissen et al. 1986]. Dieser Effekt ist jedoch weniger ausgeprägt, als bei Cholesterol. Andere Oxysterole, beispielsweise 25-Hydroxy-Cholesterol besitzen gar keinen kondensierenden Effekt, sondern wirken innerhalb der Bilayer als Spacermolekül [Li und Das 1994]. Wird ein Teil des Membran-Cholesterols durch UV-Bestrahlung oxidiert, so vermindert sich, aufgrund der strukturellen Veränderung, der kondensierende Einfluß auf die Vesikelmembran, was eine Erhöhung der Membranpermeabilität zur Folge hat.

Aus den dargestellten Ergebnissen lässt sich ein enger Zusammenhang zwischen den Membraneigenschaften von Liposomen, wie der Membranpermeabilität und der Lipidperoxidation ableiten. Die Permeabilität des menschlichen Stratum corneum beruht im Wesentlichen auf der charakteristischen Lipidzusammensetzung, wie in Kapitel 2.1.3. beschrieben. Kommt es infolge der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht zur Oxidation der Lipide im Stratum corneum, ist eine Störung der Barrierefunktion eine mögliche Folge.

### 7.3.2. Der Einfluß von Lipidoxidationprodukten auf humane Keratinozyten

Der Einfluß von UV Licht auf die Zellen der menschlichen Haut wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Studienobjekte sind sowohl Fibroblasten [Gaboriau et al. 1993, Applegate und Frenk 1995, Filipe et al. 1995] und Epidermiszellen (Keratinozyten) [Applegate und Frenk 1995, Punnonen et al. 1991a, Punnonen et al. 1991b] als auch Modelle rekonstruierter humaner Epidermis [Berner und Asselineau 1997, Doucet et al. 1996]. Das Wirkungsspektrum ultravioletter Strahlung auf die Zellen der menschlichen Haut wurde in Kapitel 2.2. ausführlich beschrieben und beeinhaltet morphologische Änderungen der Zellen, Mutationen, Oxidation von Zellbestandteilen sowie Stoffwechseländerungen (Anpassungs- und Abwehrmechanismen).

Abbildung 44 zeigt, daß bereits die unbestrahlten hSCLL konzentrationsabhängig die Proliferation der HaCaT Zellen hemmen. Dieser Effekt muß in der Lipidzusammensetzung begründet sein. Neben den Ceramiden, die die Zellproliferation inhibieren können [Geilen et al. 1996], kommen vor allem die freien Fettsäuren als zytotoxische Verbindungen in Frage [Glaesser et al. 1996]. Wie eigene Untersuchungen mit Vesikeln aus synthetischen und semi-synthetischen Lipiden ergaben, korreliert die proliferationshemmende Wirkung der Liposomen mit ihrem Fettsäuregehalt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Mit der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß nicht nur ultraviolette Strahlung humane Keratinozyten beeinflußt, sondern daß auch UV-induzierte Oxidationsprodukte der Stratum corneum Lipide mit Keratinozyten wechselwirken können. Wie aus Abbildung 45 hervorgeht, wirkt eine UV-bestrahlte hSCLL-Suspension proliferationshemmend auf eine HaCaT-Zellkultur. Mit zunehmender Bestrahlungsdauer nimmt die proliferationshemmende Wirkung der Liposomen zu. Während der UV-Bestrahlung akkumulieren in der Vesikelsuspension Lipidoxidationsprodukte. Wie die Abbildung 46 zeigt, korreliert sowohl die TBARS- als auch die LOOH-Konzentration linear mit dem proliferationshemmenden Einfluß der Liposomen.

Sowohl MDA und verschiedene LOOH, als auch andere Lipidoxidationprodukte, wie 4-Hydroxy-Nonenal sind als zellschädigend beschrieben worden und kommen als Ursache für den dargestellten proliferationshemmenden Einfluß der Liposomen in Frage. Wie *Mukai* und *Goldstein* bereits 1976 zeigten, wirkt MDA mutagen, indem es Quervernetzungen von

DNA-Molekülen hervorruft. Wie in Kapitel 5.1.1.2. beschrieben, reagiert MDA auch mit primären Aminogruppen von Proteinen. Auf diese Weise kann MDA die Schädigung von Membranproteinen der HaCaT-Zellen induzieren. Andere Aldehyde, beispielsweise 4-Hydroxy-Nonenal, reagieren bevorzugt mit freien SH-Gruppen, was ebenfalls eine Schädigung von Membranproteinen hervorruft [Vaca et al. 1988].

Neben MDA reagieren auch LOOH mit DNA Molekülen, wobei sich fluoreszierende Addukte bilden [Fujimoto et al. 1984, Frankel et al. 1987]. Daß LOOH und insbesondere Cholesterol-Hydroperoxide zytotoxisch wirken, wurde bereits mehrfach beschrieben [Smith 1981, Girotti 1992]. Eine weitere Möglichkeit der Zellschädigung durch oxidierte hSCLL besteht in der Entstehung von ROS aus LOOH. In Gegenwart freier Metallionen können aus LOOH Hydroxylradikale ( $\text{OH}^\bullet$ ) entstehen, die die Lipidperoxidation in den Zellmembranen induzieren können (Kapitel 6.3.). Worauf die proliferationshemmende Wirkung der UV-bestrahlten hSCLL im dargestellten Experiment beruht, lässt sich aus den vorliegenden Daten nicht feststellen. Sicher scheinen die Lipidoxidationsprodukte MDA und LOOH für die Zytotoxizität der Liposomen verantwortlich zu sein. Wie aus Abbildung 46 hervorgeht, korrelieren ihre Konzentrationen linear mit der proliferationshemmenden Wirksamkeit der Vesikel. Aussagen über den Schädigungsmechanismus können aus den vorliegenden Daten jedoch nicht getroffen werden.

## 8. Zusammenfassung

Die menschliche Haut ist permanent ultravioletter Strahlung ausgesetzt. Durch die Ausdünnung der stratosphärischen Ozonschicht infolge industrieller FCKW Emissionen nimmt die Intensität des UV Lichtes, das die Erdoberfläche erreicht, ständig zu. Gleichzeitig hat sich das Freizeitverhalten der Menschen in den Industriestaaten dahingehend verändert, daß die Haut immer höheren Dosen ultravioletter Strahlung ausgesetzt wird. Über die Wirkung von UV Licht auf die Dermis und Epidermis der menschlichen Haut liegen bereits umfangreiche Kenntnisse vor. Dagegen gibt es nur wenige Daten über den Einfluß von UV Strahlung auf die Lipide des menschlichen Stratum corneums.

Das Stratum corneum ist die entscheidende Barriere des Körpers gegen den Verlust von Wasser und das Eindringen körperfremder Substanzen und Mikroorganismen. Die geringe Permeabilität des humanen Stratum corneums ist vorrangig auf seine Lipidzusammensetzung zurückzuführen. Da UV Licht die Peroxidation von Lipiden induzieren kann, stellt sich die Frage, wie die Lipide des menschlichen Stratum corneum durch solare UV Strahlung oxidiert werden.

Wie die vorliegende Arbeit zeigt, hängt die UV-induzierte Oxidation der Lipide des menschlichen Stratum corneums von ihrer Zusammensetzung ab. Insbesondere das Cholesterol nimmt Einfluß auf die Art und die Konzentration der entstehenden Oxidationsprodukte. Mit steigender Cholesterolkonzentration in den untersuchten Modellmembranen steigt die Konzentration von Lipidhydroperoxiden (LOOH), die als Folge der UV-induzierten Peroxidation entstehen. Gleichzeitig nimmt die Konzentration thiobarbitursäure reaktiver Substanzen (TBARS) ab. Wie gezeigt wurde, ist Cholesterol ein bevorzugtes Angriffsziel für die UV-induzierte Oxidation in den untersuchten Modellmembranen. Die hohe Konzentration von Cholesterol im humanen Stratum corneum verhindert so die Oxidation der übrigen Lipide. Die Oxidation von Cholesterol führt zur Entstehung von Cholesterol-Hydroperoxiden, aus denen Hydroxy-Sterole hervorgehen. Da es keine Hinweise auf eine Regeneration von oxidiertem Cholesterol im

Stratum corneum gibt, kann das Cholesterol nicht als Antioxidans im klassischen Sinne bezeichnet werden.

Die UV-induzierte Oxidation von humanen Stratum corneum Lipiden verläuft nach dem Typ I Mechanismus. In dessen Verlauf entstehen Sauerstoff- und Lipidradikale. Sowohl die Analyse von Cholesteroloxidationsprodukten als auch die Untersuchungen mit ROS-Fängern erbrachten eindeutige Hinweise auf einen Typ I Mechanismus, während die Oxidation durch Singulett-Sauerstoff (Typ II) ausgeschlossen werden konnte. Ausgangspunkt für die Entstehung von Radikalen sind möglicherweise in Spuren vorhandene Lipidhydroperoxide, die unter Einwirkung von UV Licht  $\text{OH}^\bullet$  bzw.  $\text{RO}^\bullet$  freisetzen. Die ROS-Entstehung während der ultravioletten Bestrahlung von Modellmembranen aus natürlichen Stratum corneum Lipiden wird durch die Anwesenheit von Sensitizermolekülen (z. B. Lipofuscine) verstärkt. Wie nachgewiesen wurde, entstehen in Anwesenheit der Sensitizer höhere Konzentrationen von Lipidoxidationsprodukten (TBARS) in hSCLL als nach dem Entfernen des Sensitzers.

Die UV-induzierte Oxidation der Stratum corneum Lipide wirkt sich auf die Membranpermeabilität der untersuchten Vesikel aus. Eine hohe Cholesterolkonzentration in der Liposomenmembran reduziert erwartungsgemäß die Membranpermeabilität. Infolge der Oxidation kommt es aufgrund der strukturellen Veränderungen an den Membranlipiden zu einer deutlichen Erhöhung der Membranpermeabilität, was darauf schließen lässt, dass die Permeabilitätsbarriere des intakten Stratum corneums durch die Oxidation ebenfalls beeinflusst werden kann. Die Permeabilitätserhöhung der Vesikelmembranen infolge der UV-induzierten Oxidation der Membranlipide ist, wie die Oxidation selbst, von der Lipidzusammensetzung abhängig. Die Vesikel mit einer hohen Cholesterolkonzentration sind, auch nach der Oxidation der Membranlipide, weniger permeabel als die Liposomen ohne Cholesterol. Der kondensierende Effekt, den Cholesterol auf die Vesikelmembranen ausübt und damit deren Permeabilität verringert, wird folglich durch die bevorzugte Oxidation des Cholesterols nicht gestört. Die geringste Permabilität nach der UV-induzierten Oxidation wiesen Liposomen aus humanem Stratum corneum Lipidextrakt (hSCLL) auf.

Eine gestörte Barrierenfunktion der menschlichen Epidermis sowie die Akkumulation von Lipidoxidationsprodukten beeinflusst die epidermalen Zellen, die Keratinozyten. Die im

Laufe der UV Bestrahlung entstehenden Oxidationsprodukte der Stratum corneum Lipide wirken proliferationshemmend auf die Keratinozyten. In Körperregionen mit nur wenigen Stratum corneum Schichten könnten Lipidoxidationsprodukte die darunter liegenden Keratinozyten schädigen. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, nimmt die proliferationshemmende Wirkung von hSCLL mit steigender UV Bestrahlungsdauer zu. Es besteht eine lineare Korrelation zwischen der Proliferationsrate der Zellen und der Konzentration von TBARS und LOOH.

## 9. Literaturverzeichnis

Applegate LA und Frenk E: Oxidative defense in cultured human skin fibroblasts and keratinocytes from sun-exposed and non-exposed skin. *Photodermat Photoimmunol Photomed* 11, 95-101 (1995)

Applegate LA, Scaletta C, Treina G, Mascotto RE, Fourtanier A, Frenk E: Erythema Induction by ultraviolet radiation points to a possible acquired defense mechanism in chronically sun-exposed human skin. *Dermatology* 194, 41-49 (1997)

Babo S und Charbonneau M: Measurement of rat mitochondrial hydroperoxides using in situ liver perfusion of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate. *Toxicology Methods* 4(4), 224-233 (1994)

Bachowski GJ, Thomas JP, Girotti AW: Ascorbate-enhanced lipid peroxidation in photooxidized cell membranes: cholesterol product analysis as a probe of reaction mechanism. *Lipids* 23(6) (1988)

Beissert S und Granstein RD: UV-induced cutaneous photobiology. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 31(5&6), 381-404 (1995)

Bernerd F und Asselineau D: Succesive alteration and recovery of epidermal differentiation and morphogenesis after specific UVB-damages in skin reconstructed in vitro. *Developmental Biology* 183, 123-138 (1997)

Bhatia R, Viswanathan PN, Kakkar P: Liposomes as a model for studying the effect of UV radiations on biomembranes. *J Microencapsulation* 8 (3), 349-357 (1991)

Bird RP und Draper HH: Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. *Methods in Enzymology* 105, 299-305 (1984)

Black HS: Potential involement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *Photochem Photobiol* 46(2), 213-221 (1987)

Bligh EG und Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37 (8) (1959)

Bose B, Agarwal S, Chatterjee SN: UV-A induced lipid peroxidation in liposomal membrane. *Rad Environ Biophys* 28, 59-65 (1989)

Bose B und Chatterjee SN: UVA-induced peroxidation of lipid in the dried film state. *J Photochem Photobiol. B: Biol* 23, 119-123 (1994)

Bose B und Chatterjee SN: Correlation between UVA-induced changes in microviscosity, permeability and malendialdehyde formation in liposomal membrane. *J Photochem Photobiol B: Biol* 28, 149-143 (1995)

Bose B, Agarwal S, Chatterjee SN: Membrane lipid peroxidation by UV-A: Mechanism and implications. *Biotechnol Appl Biochem* 12, 557-561 (1990)

Bray RC und Cooke SA: Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem J* 139, 43-48 (1974)

Bruels WAG, Slaper H, van der Leun JC, Berrens L: Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photochem Photobiol* 40(4), 485-494 (1984)

Carbonare MD und Pathak MA: Skin photosensitizing agents in the role of reactive oxygen species in photoaging. *J Photochem Photobiol. B: Biol* 14, 105-124 (1992)

Cathcart R, Schwiers E, Ames BN: Detection of picomole levels of lipid hydroperoxides using a dichlorofluorescein fluorescent assay. *Methods in Enzymology* 105, 352-358 (1984)

Chatterjee SN und Agarwal S: Liposomes as model for study of lipid peroxidation. *Free Rad Biol Med* 4, 51-72 (1988)

Chia LS, Thompson LE, Moscarello MA: Changes in lipid phase behaviour in human myelin during maturation and aging. *FEBS* 157, 155-158 (1983)

Chia LS, Thompson LE, Moscarello MA: X-ray diffraction evidence for myelin disorder in brain from humans with Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 775, 308-312 (1984)

Connor MJ und Wheeler LA: Depletion of cutaneous glutathione by ultraviolet radiation. *Photochem Photobiol* 46(2), 239-245 (1987)

Csallany AS und Ayaz KL: Quantitative determination of organic solvent soluble lipofuscin pigments in tissues. *Lipids* 11(5), 412-417 (1975)

Cunningham ML, Krinsky NI, Giovanazzi SM, Peak MJ: Superoxide anion is generated from cellular metabolites by solar radiation and its components. *Free Rad Biol Med* 1, 381-385 (1985)

Czapski G: Reaction of OH•. *Methods in Enzymology* 105, 209-215 (1984)

Danno K und Horio T: Sunburn cells: factors involved in ist formation. *Photochem Photobiol* 45(5), 683-690 (1987)

Danno K, Horio T, Takigawa M, Imamura S: Role of oxygen intermediates in UV-induced epidermal cell injury. *J Invest Dermatol* 83, 166-168 (1984)

Dayan D und Wolman M: Lipid pigments. *Progr Histochem Cytochem* 25 (4), 33-36 (1993)

Demel RA, Bruckdorfer KR, van Deenen LLM: The effect of sterol structur on the permeability of liposomes to glucose, glycerol and Rb+. *Biochim Biophys Acta* 255, 321-330 (1972)

Doucet O, Robert C, Zastrow L: Use of a serum-free reconstituted epidermis as a skin pharmacological model. *Toxicology in vitro* 10, 305-313 (1996)

Draper HH und Hadley M: Malondialdehyde determination as Index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 186, 421-431 (1990)

van Duijn G, Verkleij AJ, de Kruijff B: Influence of phospholipid peroxidation on the phase behavior of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in aqueous dispersions. *Biochem* 23, 4969-4977 (1984)

Eichler J und Seiler T: Lasertechnik in der Medizin. Grundlagen, System, Anwendungen. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest 1991

Elias PM: Epidermal lipids, barrier function and desquamation. *J Invest Dermatol* 80, 44-49 (1984)

Esterbauer H, Benedetti A, Lang J, Fulceri R, Fauler G, Comporti M: Studies on the mechanism of 4-hydroxynonenal during microsomal lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 876, 154-166 (1986)

Elstner EF: Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin. BI-Wissenschaftsverlag Mannheim/Wien/Zürich, 1990

Epand RF und Epand RM: 25-Hydroxycholesterol promotes myelin basic protein-induced leakage of phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* 938, 131-134 (1988)

Filipe PM, Freitas JP, Castro M, Pinto R, Fernandes A, Cirne de Castro JL, Rico T, Guerra Rodrigo F: Peroxydation lipidique, production de PGE<sub>2</sub> et mortalité cellulaire induites par les UV dans des fibroblastes cutanés humains en culture. *C R Soc Biol* 189, 443-451 (1995)

Fox MA und Whitesell JK: Organische Chemie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford (1995)

Frankel EN, Neff WE, Brooks DD, Fujimoto K: Fluorescence formation from the interaction of DNA with lipid oxidation degradation products. *Biochim Biophys Acta* 919, 239-244 (1987)

Freeman SE, Gange RW, Matzinger EA, Sutherland BM: Higher pyrimidin dimes yields in skin of normal humans with higher UVB sensitivity. *J Invest Dermatol* 86, 34-36 (1986)

Frei B: Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Medicine* 97 (suppl 3A), 5-13 (1994)

Fritsch P: Dermatologie. 3. Auflage. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona (1990)

Fuchs J, Freisleben H-J, Packer L: Antioxidants in the skin. In: *Pharmacology of the Skin*. Mukhtar H, Ed., CRC Press. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo (1992)

Fuchs J, Huflejt ME, Rothfuss LM, Wilson DS, Carcamo G, Packer L: Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. *J Invest Dermatol* 93, 769-773 (1989)

Fuchs J, Huflejt ME, Rothfuss LM, Wilson DS, Carcamo G, Packer L: Acute effects of near ultraviolet and visible light on the cutaneous antioxidant defense system. *Photochem Photobiol* 50(6), 739-744 (1989)

Fuchs J und Packer L: Ultraviolet irradiation and the skin antioxidant system. *Photodermat Photoimmunol Photomed* 7, 90-92 (1990)

Fujimoto K, Neff WE, Frankel EN: The reaction of DNA with lipid oxidation products, metals and reducing agents. *Biochim Biophys Acta* 795, 100-107 (1984)

Gaboriau F, Morliere P, Marquis I, Moysan A, Geze M, Dubertret L: Membrane damage induced in cultured human skin fibroblasts by UVA irradiation. *Photochem Photobiol* 58(4), 515-520 (1993)

Gaillard ER, Atherton SJ, Eldred G, Dillon J: Photophysical studies on human retinal lipofuscin. *Photochem Photobiol* 61(5), 448-453 (1995)

Gast K, Zirwer D, Ladhoff AM, Schreiber J, Koelsch R, Kretschmer K, Lasch J: Auto-oxidation-induced fusion of lipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* 686, 99-109 (1982)

Geilen CC, Bektas M, Wieder T, Orfanos CE: The vitamin D<sub>3</sub> analogue, calcipotriol, induces sphingomyelin hydrolysis in human keratinocytes. *FEBS* 378, 88-92 (1996)

de Gier J, Mandersloot JG, Demel LLM: Lipid composition and permeability of liposomes. *Biochim Biophys Acta* 150, 666-675 (1968)

Girotti AW: Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem Photobiol* 51(4), 497-509 (1990)

Girotti AW: Photosensitized oxidation of cholesterol in biological systems: reaction pathways, cytotoxic effects and defense mechanisms. *J Photochem Photobiol. B: Biol* 13, 105-118 (1992)

Girotti AW, Bachowski GJ, Jordan JE: Lipid peroxidation in erythrocyte membranes: cholesterol product analysis in photosensitized and xanthine oxidase-catalyzed reactions. *Lipids* 23(6), 401-408 (1987)

Girotti AW, Thomas JP, Jordan JE: Lipid photooxidation in erythrocyte ghosts: sensitization of the membranes toward ascorbate- and superoxide-induced peroxidation and lysis. *Arch Biochem Biophys* 236, 238-251 (1985)

Gläßer D, Faß U, Gruner M, Thust O, Iwig M, Spindler M: Low concentrations of cis-linoleic acid induce cell damage in epithelial cells from bovine lenses. *Eur J Cell Biol* 71, 286-292 (1996)

Gregoriadis G: Liposomes as Drug Carriers. Recent Trends and Progress. John Wiley & Sons. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore (1988)

Gildenast T und Lasch J: Isolation of ceramide fractions from human stratum corneum lipid extracts by high-performance liquid chromatography. *Biochim Biophys Acta* 1346, 69-74 (1997)

Gorman AA: Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments. *J Photochem Photobiol. B: Biol* 14, 159-176 (1992)

Gutteridge JMC: The membrane effects of vitamin E, cholesterol and their acetates on peroxidative susceptibility. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol* 22(3), 563-572 (1978)

Gutteridge JMC und Halliwell B: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS* 15, 129-135 (1990)

Gutteridge JMC, Kerry PJ, Armstrong D: Autoxidized and lipoxidase-treated polyunsaturated fatty acids. Autofluorescence associated with the decomposition of lipid peroxides. *Biochim Biophys Acta* 711, 460-465 (1982)

Halliwell B und Gutteridge JMC: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219, 1-14 (1984)

Halliwell B und Gutteridge JMC: Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford (1992)

Han SK, Kim M, Park YH, Park EJ, Lee JH: Effect of lipid peroxidation on the fluidity of erythrocyte ghost and phospholipid liposomal membranes. *Arch Pharm Res* 15(4), 309-316 (1992)

Hanson DL und DeLeo VA: Long wave ultraviolet radiation stimulates arachidonic acid release and cyclooxygenase activity in mammalian cells in culture. *Photochem Photobiol* 49(4), 423-430 (1989)

Hasty N, Merkel PB, Radlick P, Kearns DR: Role of azide in singlet oxygen reactions: reaction of azide with singlet oxygen. *Tetrahedron Lett* 1, 49-52 (1972)

Hein F: Chemie der Komplexverbindungen. Chemische Koordinationslehre. S. Hirzel Verlag, Leipzig (1971)

Hernandez F, Menendez S, Wong R: Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response in cardiopathy patients treated with endovenous ozone therapy. *Free Rad Biol Med* 19 (19), 115-119 (1995)

Hersey P, MacDonald M, Henderson C, Schibeci S, D'Alessandro G, Pryor M, Wilkinson FJ: Suppression of natural killer cell activity in humans by radiation from lamps depleted of UVB. *J Invest Dermatol* 90, 305-310 (1988)

Holleman AF und Wiberg E: Lehrbuch der Anorganischen Chemie. Walter de Gruyter verlag Berlin, New York, S. 458-459 (1985)

Horio T und Okamoto H: Oxygen intermediates are involved in ultraviolet radiation-induced damage of Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 88, 699-702 (1987)

Hyslop PA, Morel B, Sauerheber R: Organization and interaction of cholesterol and phosphatidylcholine in model bilayer membranes. *Biochemistry* 29, 1025-1038 (1990)

Isler O und Brubacher G: Vitamine I. Fettlösliche Vitamine. G. Thieme Verlag Stuttgart New York S. 90-117 (1982)

Islomov AI, Azizova OA, Odinokova GG, Roshupkin DI, Remizov AN, Vladimirov YA: Free Radicals formed under UV-irradiation of oxidized phosphatidyl choline. *Biofizika* XXIV, 403-407 (1977)

Jacobsson-Borin A, Aberg F, Dallner G: Lipid peroxidation of microsomal and mitochondrial membranes extracted with n-pentane and reconstructed with ubiquinol, dolichol and cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1213, 159-166 (1994)

Jiang Z-Y, Hunt JV, Wolff SP: Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem* 202, 384-389 (1992)

Jork H, Funk W, Fischer W, Wimmer H: Dünnschichtchromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden. Band 1b. VHC, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo (1993)

Kandutsch A und Chen HW: Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by 7 $\alpha$ -Hydroxycholesterol, 7 $\beta$ -Hydroxycholesterol, and 7-Ketocholesterol. *J Biol Chem* 248 (24), 8408-8417 (1973)

Kanjilal S, Pierceall WE, Cummings KK, Kripke ML, Ananthaswamy HN: High frequency of p53 in ultraviolet radiation-induced murine skin tumors: evidence for strand bias and tumor. *Cancer Res* 53(13), 2961-2964 (1993)

Kim RS und LaBella FS: Comparison of analytical methods for monitoring autoxidation profiles of authentic lipids. *J Lipid Res* 28, 1110-1117 (1987)

Klein SM, Cohen G, Cederbaum AI: Production of formaldehyd during metabolism of dimethyl sulfoxide by hydroxyl radical generating systems. *Biochemistry* 20, 6006-612 (1981).

Kligman LH und Kligman AM: The nature of photoaging: its prevention and repair. *Photodermatol* 3, 215-227 (1986)

Korytowski W, Bachowski GJ, Girotti AW: Chromatographic separation and electrochemical determination of cholesterol hydroperoxides generated by photodynamic action. *Anal Biochem* 197, 149-156 (1991)

Koulu L, Jansen CT, Viander M: Effect of UV-A and UV-B irradiation on human epidermal Langerhans cell membrane markers defined by ATPase activity and monoclonal antibodies (OKT 6 and anti-Ia). *Photodermatol* 2(6), 339-346, (1985)

Kunimoto M, Inoue K, Nojima S: Effect of ferrous ion and ascorbat-induced lipid peroxidation on liposomal membranes. *Biochim Biophys Acta* 646, 169-178 (1981)

de Laat JMT und de Gruijl FR: The role of UVA in the aetiology of non-melanoma skin cancer. *Cancer Surveys* 26: Skin Cancer, 173-191 (1996)

Lampe MA, Williams ML, Elias PM: Human epidermal lipids: characterization and modulation during differentiation. *J Lipid Res* 24, 131-140 (1983)

Landmann L: Die Permeabilitätsbarriere der menschlichen Haut. *Pharmazie in unserer Zeit* 4, 155-163 (1991)

Lasch J, Schmitt U, Sternberg B, Schubert R: Human stratum corneum lipid based liposomes (hSCLLs). *Journal of Liposome Research* 4, 93-106 (1994)

Lasch J, Schönfelder U, Walke M, Zellmer S, Beckert D: Oxidative damage of human skin lipids. Dependence of lipid peroxidation on sterol concentration. *Biochim Biophys Acta* 1349, 171-181 (1997)

Lavker R und Kaidbey K: The spectral dependence for UVA-induced cumulative damage in human skin. *J Invest Dermatol* 108, 17-21 (1997)

Li Q-T und Das NP: Comparison of the effects of cholesterol and oxysterols on phospholipid bilayer microheterogeneity: a study of fluorescence lifetime distributions. *Arch Biochim Biophys* 315, 473-478 (1994)

March J: Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure. McCraw-Hill Book Copany New York, St. Louis, San Francisco, Toronto, London, Sydney (1968)

Melnick BC: Biochemie und Pathobiochemie des epidermalen Lipidstoffwechsels. G. Thieme Verlag Stuttgart, New York (1990)

Miyachi Y, Imamura S, Niwa Y: Decreased skin superoxide dismutase activity by a single exposure of ultraviolet radiation is reduced by liposomal superoxide dismutase pretreatment. *J Invest Dermatol* 89, 111-112 (1987)

Miyazawa T, Saeki R, Inaba H: *J Biolum Chemilum* 4, 475-478 (1989)

Montfoort A, Bezstarosti K, Groh MMJ, Metsä-Ketelä TJA: The influence of the lipid composition on the degree of lipidperoxidation of liposomes. *Biochim Int* 15(3), 525-543 (1987)

Mukai K, Daikoku K, Yokoyama S, Nakano M: Stopped-flow investigation of antioxidant activity of estrogens in solution. *Biochim Biophys Acta* 1035, 348-352 (1990)

Mukai FH und Goldstein BD: Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. *Science* 191, 868-969 (1976)

Musk P und Parsons PG: Resistance of pigmented cells to killing by sunlight and oxygen radicals. *Photochem Photobiol* 46(4), 489-494 (1987)

National Institute of Health: Sunlight, ultraviolet radiation, and the skin. NIH Consens Statement, 7(8), 1-29 (1989)

Negre-Salvayre A, Paillous N, Dousset N, Bascoul J, Salvayre R: Wavelength dependence of photoinduced peroxidation and cytotoxicity of human low density lipoproteins. *Photochem Photobiol* 55(2), 197-204 (1994)

Paillous N und Fery-Forgues S: Interest of photochemical methods for induction of lipid peroxidation. *Biochimie* 76, 355-368 (1994)

Panasenko OM, Arnold J, Schiller J, Arnold K, Sergienko VI: Peroxidation of egg yolk phosphatidylcholine liposomes by hypochlorous acid. *Biochim Biophys Acta* 1215, 259-266 (1994)

Parassassi T, Giusti AM, Raimondi M, Ravagnan G, Sapora O, Gratton E: Cholesterol protects the phospholipid bilayer from oxidative damage. *Free Rad Biol Med.* 19(4), 511-516 (1995)

Pathak MA und Stratton K: Free radicals in human skin before and after exposure to light. *Arch Biochim Biophys* 123, 468-476 (1968)

Pelle E, Maes D, Padulo GA, Kim E-K, Smith WP: An in vitro model to test relative antioxidant potential: ultraviolet-induced lipid peroxidation in liposomes. *Arch Biochim Biophys* 282(2), 234-240 (1990)

Pitts DG: Sunlight as an ultraviolet source. *Optometry and Vision Science* 67(6), 401-406 (1990)

Punnonen K, Puntala A, Jansen CT, Ahotupa M: UVB irradiation induces lipid peroxidation and reduces antioxidant enzyme activities in human keratinocytes in vitro. *Acta Dermatol Venerol (Stockh)* 71, 239-242 (1991a)

Punnonen K, Jansen CT, Puntala A, Ahotupa M: Effects of in vitro UVA irradiation and PUVA treatment on membrane fatty acids and activities of antioxidant enzymes in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 96, 255-259 (1991b)

Punnonen K, Puustinen T, Jansen CT: Ultraviolet B irradiation induces changes in the distribution and release of arachidonic acid, dihomo- $\gamma$ -linolenic acid, and eicosapentaenoic acid in human keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* 88, 611-614 (1987)

Rae V, Yoshikawa T, Bruins-Slot W, Streilein JW, Taylor JR: An ultraviolet B radiation protocol for complete depletion of human epidermal Langerhans cells. *Journal of Dermatology Surgery and Oncology* 15(11), 1199-1202 (1989)

Ramadori G: UV-Licht und Biologie der Zytokine. in: *UV-Biologie und Heliotherapie*. hrsg. von Bühring M und Jung EG. Hippokrates Verlag. Stuttgart (1992)

Reuvers AP, Greenstock CL, Borsa J, Chapman JD: Studies on the mechanism of chemical radioprotection by dimethyl sulfoxide. *Int J Rad Biol* 24(5), 533-536 (1973)

Robson KJ, Stewart ME, Michelsen S, Lazo ND, Downing DT: 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J Lipid Res* 35, 2060-2068 (1994)

Rooney M, Tamura-Lis W, Lis LJ, Yachnin S, Kucuk O, Kaufmann JW: The influence of oxygenated sterol compounds on dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer structure and packing. *Chem Phys Lipids* 41, 81-92 (1986)

Rorsman H: Pigmentbildung als Schutzfunktion der Haut. in: *Die Haut als Abwehrorgan*. hrsg. von Braun-Falco O. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. Stuttgart (1989)

Royall JA, Ischiropoulos H: Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescin and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 302, 348-355 (1993)

Rozanowska M, Jarvis-Evans J, Korytowski W, Boulton ME, Burke JM, Sarna T: Blue light-induced reactivity of retinal age pigments. In vitro generation of oxygen-reactive species. *J Biol Chem* 270(32), 18825-18830 (1995)

Sackmann E: Membrane bending energy concept of vesicle- und cell-shapes and shape-transitions. *FEBS* 346, 3-16 (1994)

Serizawa S, Osawa K, Togashi K, Yamamoto A, Ito, M, Hamanaka S, Otsuka F: Relationship between cholesterol sulfate and intercellular cohesion of the stratum corneum: demonstration using a push-pull meter and an improved high-performance thin-layer chromatographic separation system of all major stratum corneum lipids. *J Invest Dermatol* 99, 232-236 (1992)

Shindo Y, Witt E, Han D, Tzeng B, Aziz T, Nguyen L, Packer L: Recovery of antioxidants and reduction in lipid hydroperoxides in murine epidermis and dermis after acute ultraviolet radiation exposure. *Photodermat Photoimmunol Photomed* 10, 183-191 (1994)

Sies H: Biochemie des oxidativen Stress. *Angewandte Chemie* 98, 1061-1075 (1986)

Sies H: Strategies of antioxidant defense. *European J Biochem* 215, 213-219 (1993)

- Slotte JP: Direct observation of the action of cholesterol oxidase in monolayers. *Biochim Biophys Acta* 1259, 180-186 (1995)
- Smith LL: Another cholesterol hypothesis: cholesterol as antioxidant. *Free Rad Biol Med* 11, 47-61 (1991)
- Smith LL: In: *Cholesterol Autoxidation*. Plenum Press. New York, London (1981)
- Stary A, Robert C, Sarasin A: Deleterious effects of ultraviolet A radiation in human cells. *Mutation Res* 383, 1-8 (1997)
- Stillwell W, Ehringer WD, Dumaual AC, Wassall SR: Cholesterol condensation of  $\alpha$ -linolenic and  $\gamma$ -linolenic acid-containing phosphatidylcholine monolayers and bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1214, 131-136 (1994)
- Streitwieser A und Heathcock CH: In: *Organische Chemie*. Verlag Chemie. Weinheim, Deerfield Beach, Basel (1980)
- Sugioka K, Shimosegawa Y, Nakano M: Estrogen as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. *FEBS* 210 (1), 37-39 (1987)
- Tajima K und Gershfeld NL: Equilibrium studies of lecithin-cholesterol interactions. II. Phase relations in surface films: analysis of the "condensing" effect of cholesterol. *Biophys J* 22(3), 489-500 (1978)
- Tanaka M und Nakagawa M: Antioxidant activity of thiocholesterol on copper-induced oxidation of low-density lipoprotein. *Lipids* 30, 321-325 (1995)
- Theunissen JJH, Jackson RL, Kempen HJM, Demel RA: Membrane properties of oxysterols. Interfacial orientation, influence on membrane permeability and redistribution between membranes. *Biochim Biophys Acta* 860, 66-74 (1986)
- Tyrrell RM und Pidoux M: Endogeneous glutathione protects human skin fibroblasts against the cytotoxic action of UVB, UVA and near-visible radiation. *Photochem Photobiol* 44(5), 561-564 (1986)
- Tyrrell RM und Pidoux M: Correlation between endogeneous glutathione content and sensitivity of human skin cells to radiation at defined wavelenghts in the solar ultraviolet range. *Photochem Photobiol* 47(3), 405-412 (1988)
- Urban T, Hurbain I, Urban M, Clement A, Housset: Oxydants et antioxydants. Effets biologiques et perspectives therapeutiques. *Annales de Chirurgie* 49(5), 427-434 (1995)
- Vaca CE, Wilhelm J, Harms-Ringdahl M: Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutation Res* 195, 137-149 (1988)
- Vile GF und Tyrrell RM: Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J Biol Chem* 268 (20), 14678-14681 (1993)
- Vile GF und Tyrrell RM: UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Rad Biol Med* 18(4), 721-730 (1995)
- Wang M-Y und Liehr JG: Lipid hydroperoxide-induced endogenous DNA adducts in hamsters: possible mechanism of lipid hydroperoxide-mediated carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 316, 38-46 (1995)
- Williams ML, Hughes-Fulford M, Elias PM: Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and sterol synthesis by cholesterol sulfate in cultured fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 845, 349-357 (1985)
- World Health Organization: *Environmental Health Criteria 160: Ultraviolet Radiation*. Genf (1994)

Yeagle PL: Cholesterol modulation of  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase hydrolyzing activity in the human erythrocyte. *Biochim Biophys Acta* 727, 39-44 (1983)

Zellmer S und Lasch J: Individual variation of human plantar stratum corneum lipids, determined by automated multiple development of high-performance thin-layer chromatography plates. *J Chromatogr B*, 691, 321-329 (1997)

Zhang D, Yasuda T, Yu Y, Okada S: Physicochemical damage to liposomal membrane induced by iron- or copper-mediated lipid peroxidation. *Acta Med Okayama* 48, 131-136 (1994)

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AMD</b>	Automated Multiple Development
<b>Cer</b>	Ceramides
<b>Ch</b>	Cholesterol
<b>Ch-OOH</b>	Cholesterol-Hydroperoxide
<b>ChS</b>	Cholesterol-3-sulfat
<b>DC</b>	Dünnschichtchromatographie
<b>DCF</b>	2',7'-Dichlorofluorescein
<b>DCHF</b>	2',7'-Dichloro-dihydrofluorescein
<b>DCHF-DA</b>	2',7'-Dichchloro-dihydrofluorescein-diacetat
<b>DMPC</b>	Dimyristoyl-phosphatidylcholin
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DOPC</b>	Dioleyl-phosphatidylcholin
<b>DPPC</b>	Dipalmitoyl-phosphatidylcholin
<b>DSC</b>	Differential Scanning Calorimetry
<b>DT</b>	delayed tanning
<b>Ei-PC</b>	Phosphatidylcholin aus Hühnereiklar
<b>ELSD</b>	Evaporative Light Scattering Detector
<b>FA</b>	Fettsäure
<b>GSH</b>	Glutathion (reduzierte Form)
<b>GSH-Px</b>	Glutathionperoxidase
<b>GSSG</b>	Glutathion (oxidierte Form)
<b>GSSG-Red</b>	Glutathionreduktase
<b>HaCaT</b>	Human Adult Low Calcium High Temperature Keratinocytes
<b>HEPES</b>	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
<b>HMG-CoA</b>	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>HPODE</b>	13(S)-Hydroperoxy-(9Z,11E)-octadeca-dienoic Acid
<b>HPTLC</b>	High Performance Thin-Layer Chromatography
<b>hSCL</b>	human Stratum corneum Lipid
<b>hSCLL</b>	human Stratum corneum Lipid Liposomen
<b>IPD</b>	immediate pigment darkening
<b>7-Keto-Ch</b>	7-Keto-Cholesterol
<b>L<sup>•</sup></b>	Lipidradikal (Alkylradikal)
<b>LDL</b>	Low Density Lipoprotein
<b>LH</b>	Lipid

<b>LOO<sup>•</sup></b>	Lipidperoxylradikal
<b>LOOH</b>	Lipidhydroperoxid
<b>MDA</b>	Malondialdehyd
<b>MED</b>	Minimale Erythem Dosis
<b>MILLS</b>	Multilamellar Intercellular Lipid Layers
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Singulett-Sauerstoff
<b>O<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	Superoxidanionen
<b>OA</b>	Oleic Acid
<b>5<math>\alpha</math>-OH</b>	5 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol
<b>7<math>\alpha</math>-OH</b>	7 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol
<b>7<math>\beta</math>-OH</b>	7 $\beta$ -Hydroxy-Cholesterol
<b>OH<sup>•</sup></b>	Hydroxylradikal
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b><sup>1</sup>S, <sup>3</sup>S</b>	Sensitizer
<b>SA</b>	Stearic Acid
<b>SOD</b>	Superoxiddismutase
<b>TBA</b>	2-Thiobarbitursäure
<b>TBARS</b>	Thiobarbitursäure Reaktive Substanzen
<b>TMPD</b>	N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamin
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>UV</b>	ultraviolettes Licht
<b>UV-A</b>	ultraviolettes Licht (320-400 nm)
<b>UV-B</b>	ultraviolettes Licht (280-320 nm)
<b>UV-C</b>	ultraviolettes Licht (200-280 nm)

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematischer Querschnitt durch die menschliche Haut mit Epidermis, Dermis und Subcutis.
- Abbildung 2: Querschnitt durch die menschliche Epidermis.
- Abbildung 3: Charakteristische Stratum corneum Lipide.
- Abbildung 4: Ceramide des menschlichen Stratum corneums.
- Abbildung 5: Spektrum der Sonnenstrahlung vor und nach der Absorption durch die Erdatmosphäre.
- Abbildung 6: Recyclingmechanismen von nicht enzymatischen Antioxidantien.
- Abbildung 7: DSC Scan von Liposomensuspensionen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt.
- Abbildung 8: Größenverteilung der Vesikel in einer Suspension nach Filterextrusion.
- Abbildung 9: Linienemissionspektrum der Hochdruck-Quecksilberdampflampe HBO 200 W.
- Abbildung 10: UV Strahlungsintensitäten des natürlichen Sonnenlichts.
- Abbildung 11: Entstehung von Malondialdehyd aus zyklischen Peroxiden mehrfach ungesättigter Lipide.
- Abbildung 12: Reaktion von Malondialdehyd mit 2-Thiobarbitursäure.
- Abbildung 13: Anregungs- und Emissionsspektrum des MDA-TBA-Adduktes.
- Abbildung 14: Eichkurve zum TBA-Test.
- Abbildung 15: Entstehung von fluoreszierenden Produkten während der Peroxidation mehrfach ungesättigter Lipide in Gegenwart von primären Aminen.
- Abbildung 16: Entstehung von TBARS in Liposomensuspensionen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht.
- Abbildung 17: Entstehung von TBARS in Lipidfilmen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht.
- Abbildung 18: Entstehung von TBARS in Liposomensuspensionen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit natürlichem Sonnenlicht.
- Abbildung 19: Entstehung von Lipidhydroperoxiden aus ungesättigten Lipiden.
- Abbildung 20: Reaktion von Lipidhydroperoxiden mit 2',7'-Dichloro-dihydro-fluorescein.
- Abbildung 21: Anregungs- und Emissionsspektrum des 2',7'-Dichloro-fluoresceins.
- Abbildung 22: Eichkurve zum LOOH Nachweis.
- Abbildung 23: Entstehung von LOOH in Liposomensuspensionen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht.
- Abbildung 24: Entstehung von LOOH in Lipidfilmen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht.
- Abbildung 25: Entstehung von LOOH in Liposomensuspensionen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit natürlichem Sonnenlicht.
- Abbildung 26: Farbintensitäten postchromatographisch ( $\text{CuSO}_4$ -Lösung) derivatisierter Lipide.

- Abbildung 27: Dünnschichtchromatographische Trennung liposomaler Lipide nach der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV-Licht.
- Abbildung 28: Lipiddegradation in Liposomenmembranen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht.
- Abbildung 29: Lipiddegradation in Lipidfilmen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht.
- Abbildung 30: Messung des Sauerstoff-Verbrauchs in Liposomensuspensionen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht.
- Abbildung 31: Trennung von hSCL-Extrakten mit AMD unterstützter HPTLC.
- Abbildung 32: Entstehung von TBARS in hSCLL aus dem natürlichen und gereinigten Hautlipidextrakten.
- Abbildung 33: Mechanismen der Lipidperoxidation.
- Abbildung 34: Spezifische Oxidation des Cholesterols.
- Abbildung 35: Dünnschichtchromatographische Trennung von Cholesterol und Cholesterol-Hydroperoxiden.
- Abbildung 36: Dünnschichtchromatographische Trennung von 7-Keto-Cholesterol, 7 $\alpha$ - und 7 $\beta$ -Hydroxy-Cholesterol.
- Abbildung 37: Dünnschichtchromatographische Trennung von Cholesterol-Hydroperoxiden und 5 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterol.
- Abbildung 38: Dünnschichtchromatographische Trennung von Lipiden nach 8-stündiger Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht.
- Abbildung 39: Dünnschichtchromatographische Trennung von Lipiden nach 12-stündiger Bestrahlung mit natürlichem Sonnenlicht.
- Abbildung 40: Trennung von Oxysterol-Standardverbindungen mittels HPLC.
- Abbildung 41: Trennung von humanen Stratum corneum Lipiden vor und nach einer 8-stündigen Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht mittels HPLC.
- Abbildung 42: Sauerstoff-Verbrauch in DMPC-Liposomen in An- und Abwesenheit von HPODE.
- Abbildung 43: Glukose-Efflux aus Liposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung während der Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV Licht.
- Abbildung 44: Einfluß von hSCLL unterschiedlicher Konzentration auf die Proliferationsrate von HaCaT-Zellen.
- Abbildung 45: Einfluß von hSCLL nach unterschiedlichen Bestrahlungszeiten auf die Proliferationsrate von HaCaT-Zellen.
- Abbildung 46: Lineare Korrelation zwischen der LOOH- und TBARS-Konzentration in UV-bestrahlten hSCLL und der Proliferationsrate der HaCaT-Zellen.
- Abbildung 47: Größenverteilung der Liposomen in einer hSCLL-Suspension nach 5-stündiger Bestrahlung mit künstlich erzeugtem UV-Licht.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Wörtliche oder inhaltliche Zitate sind in der Arbeit als solche kenntlich gemacht.

Halle, den 7. September 1998

**Ute Schönfelder**

Ernst-von-Harnack-Hof 6  
06120 Halle/S.

Tel. + Fax: 0345/5505247

<b>Geburtstag:</b>	21. Dezember 1971
<b>Geburtsort:</b>	Grimma (Sachsen)
<b>Familienstand:</b>	ledig
<b>Ausbildung:</b>	
<b>1978-1988</b>	Polytechnische Oberschule Halle-Dölau
<b>1988-1990</b>	Erweiterte Oberschule "Thomas Müntzer" Halle
<b>1990</b>	Abitur
<b>1990-1995</b>	Biochemie-Studium an der Martin-Luther- Universität Halle/Wittenberg
<b>1995-1998</b>	Promotion an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
<b>1998-1999</b>	Zusatzstudium 'Wissenschaftsjournalismus' an der Freien Universität Berlin

Halle, den 9. September 1998