

Aus dem Lehrstuhl für Dermatologie
Prof. Dr. med. M. Berneburg
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**UV-B Strahlung induzierte
Singulett-Sauerstoff Erzeugung durch
angeregte endogene
Photosensibilisatoren und deren
Bedeutung bei zellulären
Aktivierungsmechanismen**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften

Der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Alena Knak
aus Bad Oeynhausen
2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang Bäuml
Mündlichen Prüfung: 24. Juni 2014

1. Zusammenfassung

Die Exposition von UV-Strahlung wird für eine große Anzahl von Erkrankungen der Haut und des Auges verantwortlich gemacht. Eine hohe UV-Belastung spielt z.B. bei Immunsuppression, Photo-Karzinogenese oder Lichtalterung eine Rolle. Bisher wurde die biologisch schädliche Wirkung von UV Strahlung eingeteilt in UVB Schäden, die durch die direkte Absorption von UVB Strahlung in DNS induziert werden und indirekte UVA Schäden durch die Generierung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), insbesondere Singulett-Sauerstoff. Durch UVA Anregung kann ein endogenes Molekül von seinem Grundzustand in einen energetisch höheren Zustand übergehen. Ein Photosensibilisator zeichnet sich dadurch aus, dass er, in einen metastabilen Triplett-Zustand wechseln kann, von dem aus er Energie auf andere Moleküle z.B. Sauerstoff übertragen und so Singulett-Sauerstoff generieren kann. Allerdings können verschiedene endogene Substanzen, die als Photosensibilisatoren bei UVA Anregung bekannt sind, auch UVB Strahlung absorbieren. In dieser Arbeit wird untersucht, ob verschiedene endogene Photosensibilisatoren bei UVB Anregung in der Lage sind Singulett-Sauerstoff zu erzeugen.

In der vorliegenden Doktorarbeit wird zum ersten Mal gezeigt, dass sowohl endogene als auch exogene Substanzen durch UVB Anregung Singulett-Sauerstoff erzeugen können. Zuerst sind verschiedene endogene Substanzen wie wasser- und fettlösliche Vitamine in Lösungen untersucht worden. Die Generierung von Singulett-Sauerstoff bei UVB Anregung wurde direkt durch die Detektion von Singulett-Sauerstoff Lumineszenzphotonen bei 1270 nm nachgewiesen. Es konnten mehrere endogene UVB Photosensibilisatoren identifiziert werden. Singulett-Sauerstoff kann also sowohl durch UVA als auch durch UVB Anregung von endogenen Substanzen erzeugt werden. Von den identifizierten UVB Photosensibilisatoren wurde die Effektivität, mit der sie Singulett-Sauerstoff generieren können (Singulett-Sauerstoff Quantenausbeute), ermittelt. Einige der Vitamine haben ähnlich hohe Quantenausbeuten wie Photosensibilisatoren, die zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden. Außerdem wurde nachgewiesen, dass es für die Singulett-Sauerstoff Quantenausbeute der untersuchten Vitamine ohne Bedeutung ist, ob sie mit UVA oder UVB Strahlung angeregt werden, solange die Vitamine bei den entsprechenden Anregungswellenlängen Strahlung absorbieren können. Eine Veränderung der Molekülstruktur z.B. durch eine Veränderung des pH-Wertes des Lösungsmittels kann allerdings zu einer Ver-

änderung der Singulett-Sauerstoff Quantenausbeute führen. Auch das Sonnenlicht, dem die Moleküle täglich in der menschlichen Haut ausgesetzt sind, kann zu Veränderungen der Molekülstruktur führen. Darum wurde untersucht, wie sich endogene Photosensibilisatoren bei UVB Bestrahlung verändern und welche Auswirkungen diese Veränderungen auf ihre photophysikalischen Eigenschaften haben. Einige Vitamine waren nicht photostabil bei UVB Bestrahlung und eine veränderte Singulett-Sauerstoff Quantenausbeute nach UVB Bestrahlung konnte festgestellt werden. Um einen Photosensibilisator z.B. zu therapeutischen Zwecken anwenden zu können, sollte untersucht werden wie die Generierung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff durch diesen Photosensibilisator abläuft. Deswegen wurden die Raten und Ratenkonstanten der Singulett-Sauerstoff Erzeugung sowie die für die Singulett-Sauerstoff Erzeugung wichtigen angeregten Energieniveaus für einige endogene Vitamine, die effektiv Singulett-Sauerstoff bei UVB Anregung erzeugen können, bestimmt.

Aber nicht nur endogene Substanzen können im menschlichen Körper vorhanden sein und bei UVB Anregung Singulett-Sauerstoff erzeugen. In der menschlichen Haut können sich als exogene Substanzen auch Inhaltsstoffe verschiedener Medikamente befinden und erzeugen als mögliche Nebenwirkung Lichtempfindlichkeit der Haut. Darum wurde für eine Auswahl an Medikamenten in Lösung die Singulett-Sauerstoff Erzeugung bei UVB Anregung nachgewiesen und die Singulett-Sauerstoff Quantenausbeuten bestimmt. Einige der Medikamente erzeugen Singulett-Sauerstoff mit hoher Quantenausbeute. In der menschlichen Haut können sich als exogene Substanzen auch Inhaltsstoffe von den im Alltag angewendeten Hautpflegeprodukten befinden. Dementsprechend wurden verschiedene Hautpflegeprodukte ebenfalls untersucht und einige können nachweislich Singulett-Sauerstoff bei UVB und UVA Anregung erzeugen.

Die Effektivität der Singulett-Sauerstoff Erzeugung einiger Substanzen ändert sich mit ihrer Umgebung z.B. in verschiedenen Medien oder bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Singulett-Sauerstoff Erzeugung endogener Substanzen in der menschlichen Haut kann sich also von den Ergebnissen in Lösung unterscheiden. Darum wurde nachgewiesen, dass Suspensionen mit Zellen oder Zellbestandteilen bei UVB Anregung ebenfalls Singulett-Sauerstoff produzieren. Durch direkte Lumineszenzphotonen Detektion und indirekte Quencherexperimente wurde bestätigt, dass Proteinlysate, sowie Suspensionen aus eukaryotischen und prokaryotischen Zellen Singulett-Sauerstoff generieren können. Abschließend wurde noch gezeigt, dass Schweinehaut und menschliche Haut bei UVB Anregung Singulett-Sauerstoff erzeugen und durch die UV Bestrahlung zelluläre Aktivierungsmechanismen ausgelöst werden.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	7
3. Theoretische Grundlagen	11
3.1. UV-Strahlung	11
3.2. Die Zelle	16
3.2.1. Eukaryoten	16
3.2.2. Prokaryoten	18
3.3. Die Haut	19
3.3.1. Die menschliche Haut	19
3.3.2. Schweinehaut als biologisches Modell für die menschliche Haut	22
3.3.3. Sauerstoff in der Haut und in wässrigen Lösungen	24
3.4. Singulett-Sauerstoff	25
3.4.1. Sauerstoff	25
3.4.2. Reaktive Sauerstoffspezies	26
3.4.3. Singulett-Sauerstoff	27
3.4.4. Erzeugung von Singulett-Sauerstoff	28
3.4.5. Deaktivierung von Singulett-Sauerstoff	31
3.4.6. Detektion von Singulett-Sauerstoff	32
3.5. Mathematische Grundlagen der Singulett-Sauerstoff Erzeugung und Relaxation	33
3.5.1. Modell zur Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff	33
3.5.2. Die Raten und Ratenkonstanten	36
3.5.2.1. Ohne Energierücktransfer	36
3.5.2.2. Mit Energierücktransfer	37
3.6. Quantenausbeute von Singulett-Sauerstoff	38
3.6.1. Indirekte Bestimmung der Singulett-Sauerstoff Quantenaus- beute	38
3.7. Motivation dieser Arbeit	40
4. Material und Methoden	41
4.1. Verwendete Substanzen	41
4.1.1. Referenzphotosensibilisatoren	41

4.1.2.	Endogene Substanzen	43
4.1.2.1.	wasserlösliche Vitamine	43
4.1.2.2.	fettlösliche Vitamine	47
4.1.3.	Medikamente	51
4.1.4.	Hautpflegeprodukte	55
4.1.5.	Quencher	56
4.1.6.	Siliziumdioxid	56
4.1.7.	Lösungsmittel	57
4.2.	Herstellung von homogenen und heterogenen Stoffgemischen	58
4.2.1.	Herstellung von Lösungen	58
4.2.2.	Bestimmung des pH-Wert einer Lösung	58
4.2.3.	Herstellung von Proteinlysate und Zelllysate	59
4.2.4.	Herstellung von Zellsuspensionen	60
4.3.	Herstellung von Schweinehautpräparaten	61
4.4.	Herstellung von Hautpräparaten	62
4.5.	Immunhistologische Färbung von MMP-1	63
4.6.	Messaufbau mit XeCl-Excimer Laser	63
4.7.	Messaufbau mit dem abstimmbaren Lasersystem	65
4.8.	Auswertung der Messergebnisse	67
4.9.	Messung der Singulett-Sauerstoff Lumineszenz in Barcelona	69
4.10.	Absorptionsmessungen	71
4.11.	Messung der Photostabilität	72
4.12.	Fluoreszenz und Phosphoreszenz Messungen	73
4.13.	Optoakustische Spektroskopie	74
5.	Messergebnisse und Diskussion	77
5.1.	Wasserlösliche Vitamine	77
5.1.1.	Absorption	77
5.1.2.	Absorptionswirkungsquerschnitt	78
5.1.3.	Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion von wasserlöslichen Vitaminen	84
5.1.4.	Singulett-Sauerstoff Quantenausbeuten (UVB, UVAI, UVAIL) von wasserlöslichen Vitaminen	87
5.1.5.	Photostabilität von wasserlöslichen Vitaminen	92
5.1.6.	Wechselwirkung von UVA und UVB Strahlung bei wasserlös- lichen Vitaminen	96
5.1.6.1.	PYR, PYR-HCL, PYRINE-DHCL, PYRXAL-HCL und PYR-5-PH	96
5.1.6.2.	Nicotinsäure und Nicotinamidsäure	101
5.1.7.	Pyridoxal 5'phosphat	103
5.1.7.1.	Energie vom Singulett und Triplett-Zustand	103
5.1.7.2.	Quantenausbeute für das Intersystemcrossing (ISC)	107

5.1.7.3.	Raten und Ratenkonstanten von Pyridoxal 5'phosphat in Wasser	108
5.1.7.4.	Raten und Ratenkonstanten in schwerem Wasser . .	111
5.1.8.	Nicotinsäure und Nicotinsäureamid	113
5.1.8.1.	Energie der Singulett und Triplett-Zustände	114
5.1.8.2.	Raten und Ratenkonstanten von Nicotinamidsäure .	116
5.2.	Fettlösliche Vitamine	119
5.2.1.	Absorption	119
5.2.2.	Absorptionswirkungsquerschnitt	120
5.2.3.	Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion von fettlösliche Vitamien	121
5.2.4.	Singulett-Sauerstoff Quantenausbeuten (UVB, UVA) von fettlöslichen Vitaminen	124
5.2.5.	Photostabilität von fettlöslichen Vitaminen	126
5.2.6.	Wechselwirkung von UVB und UVA Strahlung bei fettlöslichen Vitaminen	130
5.2.7.	Raten und Ratenkonstanten von Vitamin E	134
5.3.	Medikamente	136
5.3.1.	Absorption	136
5.3.2.	Absorptionswirkungsquerschnitt	138
5.3.3.	Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion von Medikamenten	138
5.3.4.	Singulett-Sauerstoff Quantenausbeuten (UVB, UVAI) von Medikamenten	142
5.3.5.	Photostabilität der Medikamente	143
5.4.	Hautpflegeprodukte	146
5.4.1.	Minimalisierung von Fehlern durch Streueffekte	146
5.4.2.	Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion von Hautpflegeprodukten	150
5.4.3.	Vergleich von zeitlich aufgelösten Singulett-Sauerstoff Signalen von Hautpflegeprodukten	153
5.5.	Suspensionen aus Zellbestandteilen	160
5.5.1.	Absorption	160
5.5.2.	Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion von Suspensionen aus Zellbestandteilen	162
5.5.3.	Photostabilität der Suspensionen aus Zellbestandteilen	166
5.6.	Suspensionen aus Bakterien	169
5.6.1.	Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion	170
5.7.	Suspensionen aus Keratinozyten	172
5.7.1.	Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion	173
5.8.	Schweinehaut	174

5.8.1. Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion von Schweinehaut	175
5.9. Menschliche Haut	178
5.9.1. Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion von menschlicher Haut	178
5.10. Nachweis von MMP-1 Expression	179
6. Zusammenfassung der Ergebnisse	185
Tabellenverzeichnis	189
Abbildungsverzeichnis	191
Literaturverzeichnis	197
7. Wissenschaftliche Publikationen	215
8. Beiträge auf wissenschaftlichen Konferenzen	217

2. Einleitung

Sonnenlicht Exposition, insbesondere die Exposition von UV Strahlung wird für eine Vielzahl von Augen- und Hautkrankheiten verantwortlich gemacht. UV Strahlung ist bekannt für die Erzeugung von Entzündungen, vorzeitige Hautalterung und Hautkrebs [TKB09]. Dies ist in der heutigen Gesellschaft von großer Bedeutung, da sich die Menschen zunehmend dem Sonnenlicht, aufgrund von Veränderungen im Freizeitverhalten und von Schönheitsidealen, ungeschützt aussetzen. Die Sonne emittiert ein kontinuierliches Spektrum an elektromagnetischer Strahlung, das aus 6 % UV-Strahlung, 52 % sichtbarem Licht und 42 % Infrarotstrahlung besteht [ORS⁺06]. Der UV Anteil des Spektrums kann unterteilt werden in UVC (Wellenlänge ≤ 280 nm), UVB (280 nm - 320 nm) und UVA (320 nm - 400 nm) Strahlung. Die UVC Strahlung wird vollständig von verschiedenen Bestandteilen der Atmosphäre wie z.B. Ozon absorbiert [GR08]. UVA und UVB Strahlung wird teilweise und zu verschiedenen Anteilen von der Atmosphäre absorbiert und das auf der Erde auftreffende Sonnenlicht enthält UVA (ungefähr 95 %) und UVB (ungefähr 5 %) Strahlung [PD06].

UV Strahlung kann zur Erzeugung von DNS Schäden, oxydativem Stress und zu Immunsuppression führen, was wiederum die Zell- und Gewebeintegrität beeinflusst [BK00] [BPMK⁺04] [KKS03] [KHS01] [Sch98] [Sch05b]. Die gefährlichste durch UV Strahlung erzeugte Krankheit ist Hautkrebs (Karzinogenese). Dieser wird eingeteilt in nicht melanozytäre Hautkrebse (Basalzellkarzinome und Stachelzellkarzinome), die etwa 90 % aller Hautkrebserkrankungen ausmachen und maligne Melanome (etwa 10 %) [BfS07]. Nicht melanozytäre Hautkrebse werden auch als weißer Hautkrebs und maligne Melanome als schwarzer Hautkrebs bezeichnet [Kre10]. Die Basalzellkarzinome und Stachelkarzinome entstehen in chronisch UV geschädigter Haut und das Risiko einer Erkrankung steigt mit der UV Lebensdosis [BfS07]. Obwohl maligne Melanome oft an UV geschützten Körperstellen entstehen, wird auch UV Strahlung für die Krankheit verantwortlich gemacht, wobei die genauen Mechanismen der Erkrankung noch unklar sind. Jährlich erkranken etwa 195.000 Menschen allein in Deutschland neu an Hautkrebs, wobei rund 24.000 an malignen Melanomen erkranken [BfS11]. In Deutschland sterben etwa 3000 Menschen jährlich an Hautkrebs, in den meisten Fällen an schwarzem Hautkrebs [Kre10].

Die Mechanismen, durch die UV Strahlung Hautkrebs erzeugen kann, sind bisher

nicht vollständig erforscht. Die biologischen Schäden durch UV Strahlung werden normalerweise eingeteilt in direkte UVB induzierte DNS Schäden und in indirekte UVA Schäden. Um Zellen oder Gewebe zu schädigen, muss die UVA oder UVB Strahlung absorbiert werden [RK06]. Die menschliche DNS kann UV Strahlung zwischen 230 nm (UVC) und 310 nm (UVB) absorbieren [Sch98] [Gru02]. Die Absorption von UVB Strahlung kann zwischen benachbarten Pyrimidinbasen einer DNS Kette Photoprodukte induzieren. Bei den erzeugten Photoprodukten handelt es sich hauptsächlich um Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und 6-4-Photoprodukte [Gru02] [Hus05]. Diese DNS Schäden lösen verschiedene DNS Reparaturmechanismen zur Wiederherstellung der normalen DNS Struktur oder den programmierten Zelltod zur Entfernung geschädigter Zellen aus [BK00] [SRV⁺00]. Erst wenn die Reparaturmechanismen fehlerhaft oder überlastet sind, folgen dauerhafte Mutationen der Erbinformationen [Hus05]. Dies führt zu dauerhaft geschädigten Zellen und kann zu Hautkrebsentstehung beitragen [BfS07]. Außerdem können die durch UVB Strahlung induzierten DNS Schäden die Induktion von immunmodulatorischer Zytokine und dadurch die Unterdrückung des Immunsystems auslösen [BK00] [Sch05b].

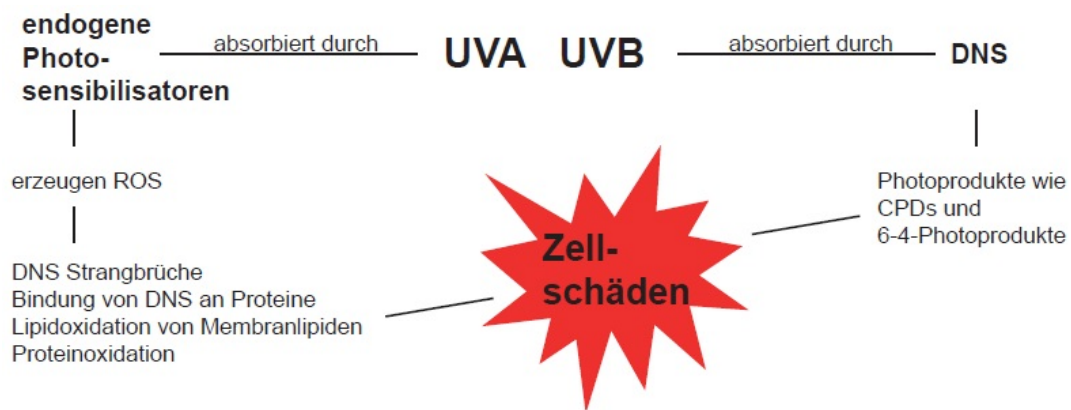


Abbildung 2.1.: Einteilung der UV Schäden in direkte UVB und indirekte UVA Schäden

UVA Strahlung hingegen wird nicht von der DNS absorbiert und kann somit keine direkten DNS Schäden verursachen. UVA Strahlung kann aber von mehreren endogenen Substanzen, welche als Photosensibilisatoren wirken, absorbiert werden. Diese endogenen Photosensibilisatoren können reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generieren [Gru02], insbesondere Singulett-Sauerstoff. ROS können oxydative Schäden in zellulären Strukturen verursachen, z.B. DNS Strangbrüche oder Bindung von DNS an Proteine. ROS können noch weitere Zellveränderungen induzieren, z.B. kann die Zellmembran durch Lipidoxidation geschädigt werden oder die Stoffwechselvorgänge können durch Modifikation von Proteinen geändert werden [JBSMN08]. UVA Strahlung kann also auch biologische Schäden erzeugen und damit in die Hautkrebsentstehung involviert sein [Gru02]. UVA Strahlung induziert außerdem Lichtalterung und die Modulation des Immunsystems in der Haut. Für die biologische Wirkung

von UVA Strahlung scheint besonders die Generierung von Singulett-Sauerstoff eine wichtige Rolle zu spielen [BK00] [KHS01] [KKS03] [HS98] [BMM⁺06] [KBS00].

Die von UVA und UVB Strahlung ausgelösten Signalwege, die zu den beschriebenen biochemischen Veränderungen in Zellen führen, werden auch als UVA und UVB Antwort bezeichnet und wurden in Keratinozyten und Fibroblasten schon detailliert untersucht [BK00] [BPMK⁺04] [KHS01] [Sch98] [Sch05b] [SRGGGB05]. Die mögliche Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch UVB Strahlung wurde bisher vernachlässigt, obwohl dies vom photophysikalischen Standpunkt durchaus möglich ist. Dazu müssen die endogenen Photosensibilisatoren UVB Strahlung absorbieren, was bei vielen Biomolekülen der Fall ist [WJJ05] [CJ05]. Oft absorbieren die endogenen Moleküle sogar mehr UVB als UVA Strahlung. Durch UVB Strahlung erzeugter Singulett-Sauerstoff könnte ebenfalls die DNS schädigen und so einen Einfluss auf die durch UVB verursachten Schäden haben [Gru02] [EMZW⁺08] und damit zu neuen Signalwegen in der UVB Antwort führen. Singulett-Sauerstoff ist außerdem in der Lage die chemische Struktur von endogenen Substanzen zu verändern. UVA und/oder UVB erzeugter Singulett-Sauerstoff könnte in Hinsicht auf die oxydative Schädigung von Zellen interagieren. Insbesondere die simultane Bestrahlung mit UVA und UVB (Sonnenstrahlung) ist zu berücksichtigen.

In dieser Arbeit werden verschiedene Themen im Zusammenhang mit der Generierung von Singulett-Sauerstoff durch UVB Anregung von endogenen Molekülen untersucht. Zum einen sollen verschiedene endogene Substanzen als UVB Photosensibilisator identifiziert werden und ihre Singulett-Sauerstoff Produktion soll quantifiziert werden (Singulett-Sauerstoff Quantenausbeute). Außerdem wird die Singulett-Sauerstoff Erzeugung durch UVB-Anregung in Zellen (*in vitro*) und in Hautmodellen (*ex vivo*) untersucht werden. Auch der Einfluss von UVA- oder UVB Bestrahlung auf die verschiedenen endogenen Substanzen (Photostabilität) wird ermittelt. Dabei soll auch eine Bestrahlung von endogenen Substanzen mit UVA und UVB in Reihe und parallel untersucht werden und der Einfluss der chemischen Veränderungen der endogenen Substanzen auf ihre Fähigkeit Singulett-Sauerstoff zu erzeugen soll ermittelt werden.

3. Theoretische Grundlagen

3.1. UV-Strahlung

UV Strahlung ist für den Menschen unsichtbare elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 100 bis 400 nm. Das Spektrum vom Sonnenlicht umfasst UV, sichtbare und infrarote Strahlung, wobei UV Strahlung ungefähr 5 % des auf die Erde auftreffenden Sonnenlichts ausmachen [Dif02]. In der Photobiologie wird die UV-Strahlung normalerweise nach ihrer biologischen Wirkung einteilt in UVA (400 - 320 nm, UVAI (340 -320 nm), UVAIL (400 - 340 nm)), UVB (320 - 290 nm) und UVC Strahlung (290 - 200 nm) [Dif91]. UVC Strahlung kommt nur in vernachlässigbaren Dosen auf der Erde vor. In der Stratosphäre formt sich die Ozonschicht, indem molekularer Sauerstoff O_2 durch UVC Strahlung geteilt und zu Ozon (O_3) rekombiniert wird [GR08], der UV Strahlung absorbieren kann. Außerdem wird UV Strahlung in der Atmosphäre durch Moleküle wie O_2 und N_2 gestreut [Dif02]]. In der Atmosphäre wird der komplette UVC Anteil des Sonnenlichts, sowie ein Großteil der UVB Strahlung absorbiert, so dass normalerweise nur UV Strahlung mit einer Wellenlänge größer als 290 nm die Erde erreicht [Gru02]. UVB und UVA Strahlung werden nach ihrer biologischen Wirkung getrennt. UVA wird im Gegensatz zu UVB Strahlung nur schlecht von Nukleinsäuren oder DNS absorbiert und verursacht bei moderater Exposition auch kein Erythem (Sonnenbrand) [Hus05], denn die Wirksamkeit von UV Strahlung zur Bildung von Erythemen hat ihr Maximum im UVB Bereich bei 297 nm. Die Grenze zwischen UVA und sichtbarer Strahlung wird durch die Sehfähigkeit des Menschen bestimmt, die unter 400 nm stark abnimmt, insbesondere bei älteren Menschen [Ehl07].

Die Wechselwirkung von UV Strahlung mit der Haut wird durch die physikalischen Parameter der Strahlungsquelle und die optischen Eigenschaften der Haut bestimmt. Die wichtigsten Parameter der Exposition sind die Wellenlänge, Bestrahlungsdauer und -stärke. Die Energie der UV Strahlung, welche pro Fläche auf die Haut auftrifft, wird als Dosis oder Strahlungsbelastung bezeichnet und in $J \cdot cm^2$ oder $J \cdot m^2$ gemessen [Dif02]. Die Rate der ankommenden UV Strahlung wird als Intensität bezeichnet und in $W \cdot cm^2$ oder $W \cdot m^2$ gemessen [Hus05]. Die jährliche in Potsdam gemessene UVA Dosis beträgt ungefähr $20,65 \text{ kJ} \cdot cm^2$ ($\approx 98 \%$) und die UVB Dosis ungefähr

$345 \text{ J}\cdot\text{cm}^2$ ($\approx 2 \%$) [FJG02]. Generell ist die Intensität und das Spektrum der auf der Erde auftreffenden UV Strahlung abhängig vom Sonnenstand, der Abmilderung durch die Atmosphäre, der Wolkendecke, der Höhenlage und der Oberflächenreflexion [DBBG⁺11]. Der Stand der Sonne hängt dabei vom Breitengrad und von der Jahres- und Tageszeit ab. Damit ist durchschnittlich der Anteil der UVA Strahlung (ungefähr 95 %) im Sonnenspektrum sehr viel höher als der der UVB Strahlung (ungefähr 5 %) [WJJ05].

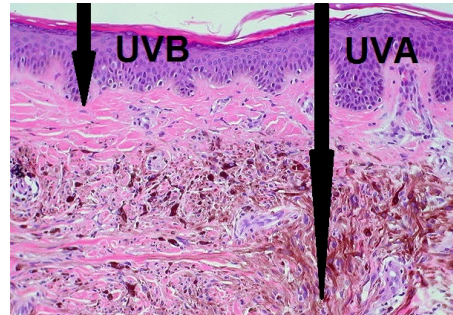


Abbildung 3.1.: Verschiedene Eindringtiefe von UVA und UVB-Strahlung in die Haut

Die UV Dosis, die eine Hautreaktion hervorruft, wird als MED (Minimale Erytheme Dosis [HY02]) bezeichnet. Die MED ist abhängig sowohl von der Wellenlänge, als auch vom Hauttyp. Der mediane MED liegt bei einer Wellenlänge von 290 nm bei $0,035 \text{ J}\cdot\text{cm}^2$ und bei 320 nm bei $2,4 \text{ J}\cdot\text{cm}^2$ [YCH⁺81]. Bei einer minimalen Erythemen Dosis bildet sich eine gerade sichtbare Veränderung der Haut, während man bei einer Dosis von 10 MED schon einen starken Sonnenbrand haben kann. Da die Dosis MED individuell sehr unterschiedlich ist, wurde noch die Standard Erytheme Dosis SED eingeführt, die den festen Wert $100 \text{ J}\cdot\text{m}^2 = 0,01 \text{ J}\cdot\text{cm}^2$ hat [HY02]. Es wird angenommen, dass sich bei einer Dosis von 4 SED bei nicht gebräunter, weißer Haut ein moderates Erythem bildet, doch bei vorgebräunter Haut noch kein Erythem zu sehen ist [Dif02].

Auf Haut bzw. Gewebe auftreffende UV Strahlung wird reflektiert, gebeugt, gestreut und absorbiert, wobei mehrere Wechselwirkungen in Kombination auftreten können.

Reflexion:

Von der auf der Erde auftreffenden UV Strahlung wird normal unter 10 % reflektiert [Dif02]. An der Hautoberfläche findet Reflexion auf Grund des Unterschiedes zwischen den Brechungsindizes der Luft ($n_D = 1,0$) und der Stratum Corneum ($n_D = 1,55$) statt. Normal wird von der ankommenden UV Strahlung zwischen 4 - 7 % reflektiert [AP98]. Die restliche auf der Hautoberfläche auftreffende UV-Strahlung un-

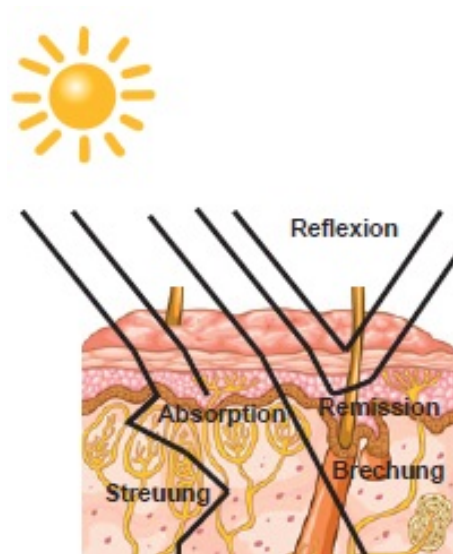


Abbildung 3.2.: Schematische Darstellung von UV Strahlung, die auf Gewebe trifft und in Gewebe eindringt

terliegt in ihrer Ausbreitungsrichtung einer Brechung nach dem Brechungsgesetz von Snellius. Dementsprechend werden die Photonen, die in das Medium mit dem höheren Brechungsindex eindringen, zum Lot bezüglich der Oberfläche gebrochen [RK13]. Da die Hautoberfläche nicht eben ist, kommt es zu diffuser Reflexion und ebenso wird die in die Haut eindringende Strahlung diffus gebrochen und dadurch aufgefächert [AP98]. In den verschiedenen Hautschichten kann nun die verbleibende, eingedrungene Strahlung absorbiert oder gestreut werden.

Um eine biologische Wirkung zu erzielen, muss die UV-Strahlung das Stratum Corneum passieren, um lebende Zellen zu erreichen. Danach kann die Strahlung von verschiedenen Chromophoren und Strukturen des Gewebes gestreut oder absorbiert werden. Da die Haut bei jedem Menschen variieren kann in Aufbau und Dicke der Stratum Corneum, wie auch in vorhandenen Chromophoren und Strukturen, sind die biologischen Auswirkungen von UV-Strahlung individuell sehr unterschiedlich [AP98].

Streuung:

Die Streuung in der Haut ist von Bedeutung, da sie die Volumenverteilung der Strahlungsintensität im Gewebe bestimmt [RK13]. Allgemein wird die Streuung durch den Streukoeffizienten μ_s (cm^{-1}) beschrieben, wobei der Kehrwert die mittlere freie Weglänge bis zum nächsten Streuobjekt ist [RK13]. Dabei hängt die Streuung der Strahlung von der Größe und Form der Inhomogenitäten, an denen gestreut wird,

von der Wellenlänge und vom Unterschied der Brechungsindizes zwischen Medium und Inhomogenität ab [AP98]. Streuende Gewebestrukturen können makroskopisch (Muskelfasern, Hautschichten), mikroskopisch (Zellen, intrazelluläre Strukturen) oder submikroskopisch (Makromoleküle) sein [RK13]. Allgemein wird zwischen Rayleigh-Streuung und Mie-Streuung je nach Größenverhältnis von Streuzentrum und Wellenlänge unterschieden [AP98]. Wird Licht an Mikropartikel oder Gewebestrukturen in der Größenordnung der Wellenlänge der Strahlung gestreut, so tritt eine teilweise kohärente Streuung auf [Dem09]. Diese wird als Mie-Streuung ($d \geq \lambda$) bezeichnet und ist überwiegend vorwärts gerichtet. Atome oder Moleküle, die sehr viel kleiner als die Wellenlänge der Strahlung sind, streuen umgekehrt proportional zur 4. Potenz der Wellenlänge. Diese Streuung, auch Rayleigh-Streuung ($d \ll \lambda$) genannt, ist generell schwach, isotrop [AP98] und der Streuanteil steigt mit kürzerer Wellenlänge. Für UV-Strahlung steigt also der Anteil der Rayleigh-Streuung, insbesondere für UVB Strahlung. In Gewebe kommen beide Formen der Streuung vor, wobei die Mie-Streuung häufiger ist als die Rayleigh-Streuung [AP98]. Beide Theorien können nicht exakt die Streuung in biologischem Gewebe erklären, weshalb als Maß für die Streurichtung der Anisotropiefaktor g eingeführt wird. Dieser beschreibt die bevorzugte Streurichtung ($g = 1$ vorwärts, $g = 0$ isotrope Streuung, $g = -1$ rückwärts). In Abbildung 3.3 ist der Streukoeffizient μ_s und der Anisotropiefaktor g für die Wellenlängen 300 bis 2400 nm dargestellt. Zwischen 600 und 1500 nm liegt der Anisotropiefaktor g von Gewebe über 0,8, die Streuung ist also stark vorwärtsgerichtet. Für 300 nm liegt der Anisotropiefaktor g ungefähr bei 0,5, da die isotrope Rayleigh-Streuung ($g = 0$) für kürzere Wellenlängen eine größere Rolle spielt.

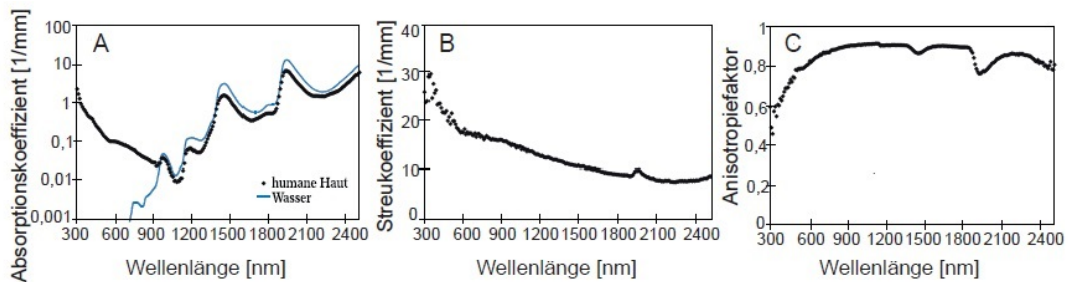


Abbildung 3.3.: Der Absorptionskoeffizient μ_a (A), Streukoeffizient μ_s (B) und Anisotropiefaktor g (C) bestimmt mittels Streulichtmessung und inverser Monte-Carlo Simulation [RBSM99]

Absorption:

Die Absorption in einem Medium kann durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben werden.

$$T = \frac{I}{I_0} = \exp(-\mu_a l)$$

Dabei ist T die Transmission, I die Intensität nach durchlaufen des Medium, I_0 die ursprüngliche Intensität, μ_a der Absorptionskoeffizient und l die optische Weglänge. Die Absorption in Gewebe wird also durch den wellenlängenabhängigen Absorptionskoeffizienten μ_a beschrieben (siehe Abbildung 3.3), wobei der Kehrwert $1/\mu_a$ die Eindringtiefe der Strahlung in Gewebe charakterisiert [RK13].

Die auf die Haut auftreffende UV Strahlung wird also zum Großteil absorbiert und die Eindringtiefe der UV Strahlung ist wellenlängenabhängig. UVB Strahlung wird fast vollständig in der Epidermis absorbiert, wobei nur noch 14 % der auftreffenden UVB Strahlung die tiefere Epidermis erreichen, während UVA tiefer eindringt und ungefähr 50 % der auftreffenden UVA Strahlung die Dermis erreicht [WJJ05]. Die UV Strahlung kann von verschiedenen Chromophoren und Molekülen der Haut absorbiert werden, so dass der Anteil der absorbierten Strahlung von der molekularen Zusammensetzung der Hautschichten zusammenhängt.

In der Epidermis befinden sich zahlreiche Chromophore, die eine hohe Absorption im UVB Bereich haben, wie Urocaninsäure (Absorptionsmaximum: 277 nm), DNS und Tryptophan [AP98]. In der Epidermis befindet sich darüber hinaus noch Melanin, eine endogene farbgebende Substanz, die auch sehr stark im UV Bereich absorbiert [Hus05]. In der Epidermis wird UV Strahlung also hauptsächlich absorbiert und damit stellt sie einen Schutz vor eindringender UV Strahlung dar. Im Gegensatz dazu gibt es in der Dermis nur wenige absorbierende Moleküle wie Hämoglobin oder Bilirubin und die UV Strahlung wird hauptsächlich durch Streuung abgeschwächt [AP98].

Durch die absorbierte Energie werden die Moleküle angeregt und verschiedene Reaktionen können ablaufen. Bei manchen Molekülen der Haut kann die im UVB Bereich aufgenommene Energie direkt zu einer biologischen Wirkung führen. Beispiele sind die DNS, die hauptsächlich UVB Strahlung absorbiert, wodurch es zu DNS Schäden kommen kann, oder Proteine, die ein Absorptionsmaximum bei 280 nm [ORS⁺06] haben und die durch UV Absorption inaktiviert oder in ihrer Funktion beeinträchtigt werden können. Auch indirekte biologische Schäden können erzeugt werden, wenn die eingestrahlte UV Energie von einem endogenen Photosensibilisator aufgenommen wird und dieser seine Energie auf molekularen Sauerstoff überträgt und dadurch reaktive Sauerstoffspezies erzeugt. Dies wird detailliert in Kapitel 3.4 beschrieben.

3.2. Die Zelle

Die Zelle ist per Definition die kleinste Einheit der Struktur, der Vermehrung und der Funktion eines Organismus und damit die elementare Einheit der biologischen Organisation [Bus03]. Alle Zellen haben dieselben Fähigkeiten, die sie als Lebewesen auszeichnen: Vermehrung durch Zellteilung, Stoff- und Energiewechsel, Reaktion auf Reize, Wachstum und Entwicklung. Dabei unterscheidet man zwei verschiedenen Zelltypen, die prokaryotische und die eukaryotische Zelle [Bus03]. Zu den Prokaryoten gehören Bakterien und Algen und zu den eukaryotischen Lebewesen gehören Pflanzen, Pilze, Tiere und der Mensch. Die wichtigsten Unterschiede zwischen Prokaryoten und Eukaryoten sind in Tabelle 3.1 ([Bus03]) aufgeführt.

Prokaryoten	Eukaryoten
Kernäquivalent (Nukleoid)	Zellkern mit Zellplasma
1 Chromosom	mehr als ein Chromosom
keine Zellorganellen	Zellorganellen
gerine Kompartimentierung, kein endoplasmatisches Retikulum	komplizierte Kompartimentierung mit endoplasmatischem Retikulum
1 bis 30 μm	1000 bis 100000 μm

Tabelle 3.1.: Übersicht über die wichtigsten Unterschiede zwischen Prokaryoten und Eukaryoten

3.2.1. Eukaryoten

Eukaryoten sind die grundlegende strukturelle und funktionelle Einheit von Pflanzen, Pilzen, Tieren und Menschen. Der menschliche Körper besteht in etwa aus 10^{15} eukaryotischen Zellen [DLM95]. Die meisten eukaryotischen Zellen von Pflanzen oder Tieren haben eine Größe von 10 bis 15 μm , aber es gibt auch Nervenzellen, welche länger als ein Meter sind, wie beispielsweise die Nervenzelle im Hals einer Giraffe [BKH00]. In Abbildung 3.4 A ist der schematische Aufbau einer eukaryotischen Zelle dargestellt.

Der wichtigste Unterschied von Eukaryoten zu Prokaryoten ist, dass Eukaryoten einen Zellkern besitzen, eine Region, die von einer komplizierten Membranstruktur, der Kernhülle umgeben ist [Kar05]. Der meist kugelförmige Kern ist das größte Zellorganell und kann bis zur Hälfte des totalen Zellvolumen einnehmen [DLM95]. Er ist umgeben von der Kernhülle, die aus zwei Membranen besteht, die von Kernporen durchsetzt sind, um den Austausch von Makromolekülen zwischen dem Zytoplasma

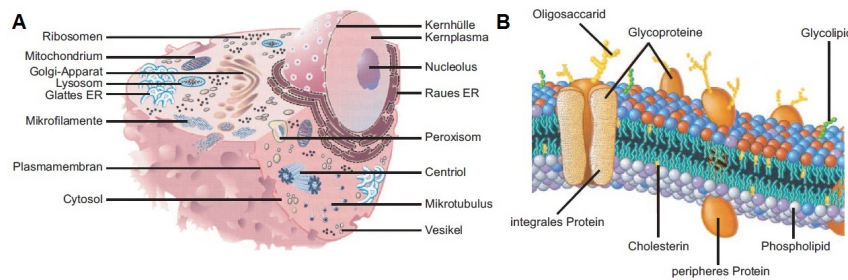


Abbildung 3.4.: A: Schematische Darstellung einer eukaryotischen Zelle vom Tier, wobei die Organellen nicht im richtigen Maßstab dargestellt sind [Kar05], B: die schematische Darstellung der Plasmamembran von eukaryotischen Zellen [Kar05]

der Zelle und dem Kernplasma sicher zustellen [BKH00]. Im Zellkern liegen die Chromosomen, beim Menschen 22 Chromosomen Paar und das XX bzw. XY Paar, welches das Geschlecht bestimmt [DLM95].

Weitere Zellorganellen sind die Mitochondrien (wichtig für die Zellatmung und Energiegewinnung der Zelle [BKH00]), Lysomen (enthalten Enzyme, welche biologische Moleküle wie Proteine, Kohlenhydrate und Fette abbauen können), raues und glattes endoplasmatisches Retikulum (raues ER: Synthese von Proteinen, glattes ER: Synthese von Lipiden und Steroiden [BKH00]), der Golgi-Apparat (modifiziert Proteine) und Ribosomen (Zuständig für Proteinsynthese [DLM95]). Es gibt noch weitere Zellorganellen (siehe Abbildung 3.4 A), die jetzt nicht detaillierter beschrieben werden.

Die Zelle wird von einer Zellwand (Plasmamembran) umschlossen, welche schematisch in Abbildung 3.4 B dargestellt ist. Diese Zellwand trennt das Innere der Zelle von ihrer Umgebung und bewahrt das Innere. Die Plasmamembran besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht, die eine Permeabilitätsbarriere für die meisten wasserlöslichen Moleküle ist [BKH00]. Phospholipide haben einen hydrophilen Kopf und zwei hydrophobe Enden. In der Doppelschicht sind die hydrophoben Enden einander zugewandt, während die hydrophilen Köpfe nach außen zeigen, entweder zum Inneren der Zelle oder zur äußeren Umgebung gewandt [BKH00] (siehe Abbildung 3.4 B). In diese Doppelschicht sind Proteine an- oder eingelagert, wobei sie unterschiedlich weit in die Membran hinreichen und manche sogar hindurchgehen. Die Membranproteine orientieren sich so, dass ihre hydrophoben Enden im inneren der Plasmamembran liegen, während ihre hydrophilen Enden an der Oberfläche der Membran sind.

3.2.2. Prokaryoten

Prokaryoten sind zelluläre Lebewesen, die keinen Zellkern besitzen. Sie besitzen nur ein Chromosom, das im Zytoplasma eingebettet frei in der Zelle liegt [Bus03]. Bakterien sind kleiner als eukaryotische Zellen, wobei sie normal einen Durchmesser von 0,2 bis 2,5 μm haben und eine Länge von 1 bis maximal 10 μm [MH99]. Der charakteristische Aufbau eines Bakteriums ist schematisch in Abbildung 3.5 dargestellt. Die Struktur einer Bakterienzelle ist wesentlich einfacher, da es keine Unterteilung in Kompartimente gibt und die Zellorganellen (z.B. Mitochondrien) fehlen. Die DNS (eine einzige ringförmige, doppelsträngige DNS) liegt frei im Zytoplasma und ist an einer Stelle an die Zytoplasmamembran angeheftet (Nukleoid). Sie besitzen freie Ribosomen, die für die Proteinsynthese verantwortlich sind.

Ein Charakteristikum von Bakterien ist, dass das Zytoplasma von einer festen Zellwand umschlossen ist, die sich zusammensetzt aus der Zytoplasmamembran, der Zellwand und zusätzlich manchmal einer Kapsel. Sie hat die Aufgabe eines Stützelements, Schutz vor Schwankungen des osmotischen Drucks und Permeabilitätsbarriere für größere Moleküle. Die Zellwand verhindert, dass die Zelle durch den in ihrem Inneren herrschenden osmotischen Druck platzt. Manche Bakterien besitzen noch eine oder mehrere Flagellen (Geißel), einen extrazellulären, wendelförmigen Faden, der zur Fortbewegung dient.

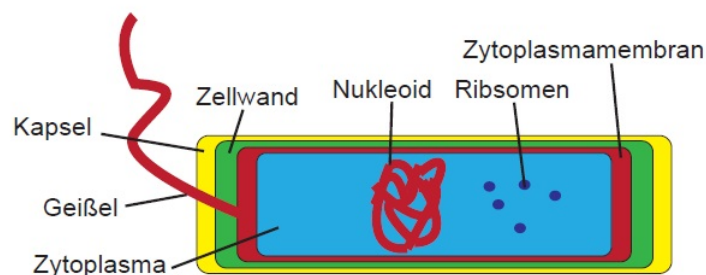


Abbildung 3.5.: Schematischer Aufbau eines Bakteriums

Allgemein kann man Bakterien auf Grund ihrer unterschiedlich aufgebauten Zellwände in zwei Gruppen einteilen. Da diese Unterschiede im Zellwandaufbau zu unterschiedlichem Färbeverhalten bei Färbung nach Gram führt, werden die Bakterien in gram-positive und gram-negative Bakterien eingeteilt. Bakterien lassen sich mit einem Kristallviolett-Jod-Komplex anfärben. Bei gram-positiven Bakterien kann die Farbe nicht durch Alkohol entfernt werden, während sich gram-negative Bakterien durch Alkohol entfärben lassen [Bus03].

Die Zytoplasmamembran, die das Zytoplasma umschließt, ist bei allen Bakterien

durch eine doppelschichtige Lipidschicht aufgebaut [MH99]. Die Lipidgrenzschicht ist in beide Richtungen hydrophil (wasseranziehend) während sich in der Mitte der Doppelschicht hydrophobe (wasserabweisende) Fettsäureketten befinden. Die Zytoplasmamembran ist die osmotische Schranke eines Bakteriums in die zahlreiche Proteinmoleküle eingelagert sind, die als Transportmoleküle für die Zufuhr und Abgabe von gelösten Substanzen sorgen [Bus03]. An die Zytoplasmamembran lagert sich die Zellwand an, die sowohl bei gram-positiven und gram-negativen Bakterien aus einer Murein- oder Peptidoglykanschicht besteht. Die Mureinschicht besteht aus netzwerkartig angelagerten Zucker-Eiweißmolekülen, die durch Peptid-Seitenketten querverbunden sind. Bei gram-negativen Bakterien ist diese Schicht nur ca. 5-10 nm dick, während sie bei gram-positiven Bakterien bis zu 80 nm dick sein kann. Bei gram-positiven Bakterien befinden sich in der dicken Mureinschicht zusätzlich noch Teichonsäuren. Aufgrund dieser dicken Mureinschicht kann der Alkohol nicht die Farbe aus den gram-positiven Bakterien waschen. Bei gram-negativen Bakterien ist an die dünne Mureinschicht ohne Teichonsäuren ein zweiter periplasmatischer Raum und eine zweite Lipid- Membran angelagert. Diese Lipid-Membran kann durch Alkohol aufgelöst werden und die dünne Mureinschicht wird frei, aus der dann die Farbe der Gram-Färbung ausgewaschen werden kann.

3.3. Die Haut

3.3.1. Die menschliche Haut

Die menschliche Haut (Cutis) ist mit einer Oberfläche von etwa 2 m^2 und einer Masse von 3,5 bis 10 kg eines der größten Organe des Menschen [CKS92]. Die Funktion der Haut ist vor allem die eines mechanischen, chemischen und immunologischen Schutzorgans. Sie besteht aus der Oberhaut (Epidermis), der Lederhaut (Dermis) und der fettreichen Unterhaut (Subkutis) [CKS92].

Je nach Lokalisation, Alter und Geschlecht variiert die Dicke der Epidermis zwischen 30 und $300\text{ }\mu\text{m}$ [Jun98]. Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, bestehend aus den Schichten Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum [CKS92] [Wit07]. Etwa 90 % der Zellen in der Epidermis sind Keratinozyten [Sch05a]. Die Keratinozyten wandern durch die verschiedenen Epidermisschichten und durchlaufen dabei einen Differenzierungsprozess, bis sie als tote Corneozyten, die mit Keratin gefüllt sind, in der Stratum corneum ankommen und dort abgebaut werden (Hautschuppen, 10^8 Corneoyten pro Tag [Fri09]). Der gesamte Differenzierungsprozess, der zu einer Erneuerung der Epidermis führt,

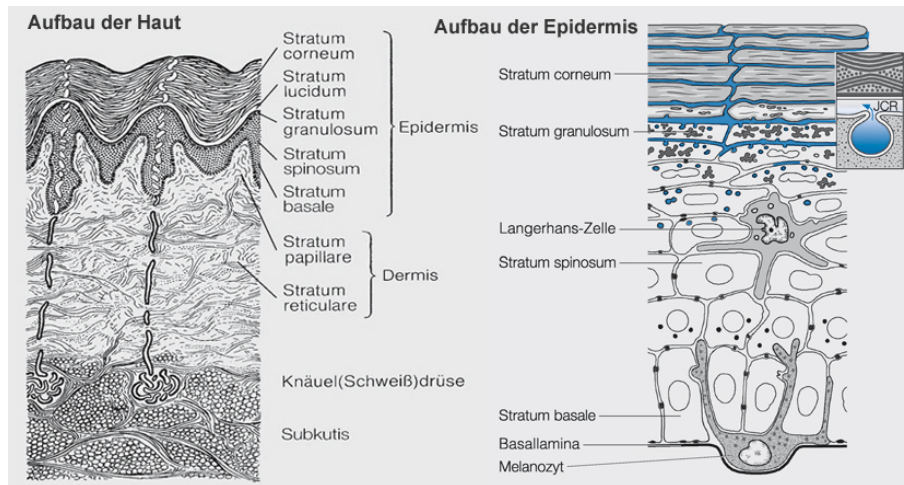


Abbildung 3.6.: Die Abbildung zeigt den Aufbau der Haut (links) und speziell den Aufbau der Epidermis (rechts) [Wit07]

dauert ungefähr 4 Wochen (28 Tage) [Sch05a] [Mey96]. Schädliche Veränderungen der Keratinozyten z.B. durch UV Strahlung werden für die Entstehung von nicht-melanomen Hautkrebsen verantwortlich gemacht [You97]. Die nahezu restlichen 10 % der Zellen bestehen aus Langerhans-Zellen, Melanozyten und Merkelzellen [Fri09]. Die Melanozyten sind mit 1-2 % die zweithäufigste Zelle in der Epidermis und liegen im Stratum basale auf der Verbindungsschicht zur Dermis [MS08]. Sie synthetisieren Melanin (in der Regel Mischmelanine aus Phäomelanin und Eumelanin [WJJ05]) und geben dieses in Melanosomen an die umliegenden Keratinozyten ab, wobei auf ein Melanozyt ungefähr 36 Keratinozyten kommen [BH03]. Die Synthese von Melanin wird durch UV-Strahlung aktiviert und erfolgt ungefähr 24-72 Stunden nach der UV Exposition mit einem Wirkungsmaximum im UVB Bereich [TH06]. Anormale Zellteilung von Melanozyten könnte Ursache für die Entstehung von malignen Melanomen sein [You97].

Die unterste Schicht der Epidermis, die Stratum Basale, ist einschichtig mit hochprismatischen Keratinozyten und es kommen viele Mitosen vor [Sch05a]. Aus Mitose der Stammzellen entstehen die basalen Keratinozyten, die durch die weiteren Epidermisschichten migrieren [Sch05a]. Die Keratinozyten der Stratum Basale sind miteinander über Desmonen (Haftplatten), die sich aus einem intrazellulärem und extrazellulärem Anteil zusammensetzten, verbunden. Sie sind in Form von Trajektorien angeordnet, so dass eine netzartige Struktur entsteht (siehe Abbildung 3.7), die Druck- und Scherkräften standhalten kann [CKS92]. Während die Keratinozyten die verschiedenen Epidermisschichten durchlaufen, werden die Desmononen gelöst und mit anderen Keratinozyten neu verbunden [Jun98]. Der epidermale Extrazellularraum ist ein schmales Spaltsystem mit Glykosaminoglykanen gefüllt und bis

in die Stratum Granulosum durchlässig, um die Epidermis mit Nahrung zu versorgen [Fri09]. Der weitere Differenzierungsprozess der Keratinozyten kann eingeteilt werden in Synthese-, Transformations- und Terminalstadium. In der Stratum Spinosum findet ein intensiver Syntheseprozess statt. Es werden Profilaggrin, das ein Bestandteil der Keratohyalin granula (Abbildung 3.7 KHG) ist und Odland-Körperchen (Abbildung 3.7 LG) synthetisiert. In der Stratum Granulosum findet der Transformationsprozess, die Umwandlung von lebenden Keratinozyten zu toten Corneozyten, statt [Jun98]. Die Odland-Körperchen, die aus polaren Lipiden wie Phospholipiden, Cholesterin, Sphingomyelin und Glykosylceramiden bestehen [Mad03] [Fei07], werden in der Stratum Granulosum als Vesikel in den extrazellulären Raum abgegeben. Die Odland-Körperchen geben ihren Inhalt am Übergang zur Stratum Corneum an den extrazellulären Raum ab, wobei die polaren Lipide enzymatisch in weniger polare Barriere lipide (Ceramide, Cholesterin, freie Fettsäuren) umgewandelt werden [Fri09]. In der Stratum Granulosum befinden sich außerdem Keratohyalin granula und der Abbau der Zellkerne und Organellen beginnt [Bon08]. Die Stratum corneum ist normalerweise eine 10 μm dünne Hornschicht, aber an Hand- und Fußflächen kann sie 100 μm dick sein [Fri09]. In der Stratum Corneum sind kernlose Corneozyten lokalisiert. Sie sind mit Keratinfilamenten gefüllt, aber haben keine Organellen und keinen Zellkern mehr, sind also biologisch tote Zellen [Ruw07]. Diese werden von dem "cornified envelope", einer unlöslichen Proteinhülle eingehüllt, welche mit dem "Lipid envelope", einer außen anliegenden Schicht aus Lipiden (hauptsächlich Ceramide) verbunden ist. Im extrazellulären Raum befinden sich Lipid Lamellen, also geordnete Lipidschichten, die aus Ceramiden (45- 51 % Massenanteil), Cholesterin (25-27 % Massenanteil), freien Fettsäuren (10-20 % Massenanteil) und weniger als 5 % anderen Lipiden bestehen [Mad03] [PHK⁺03]. Diese Lipid Lamellen (Barriere lipide) schließen den Interzellularraum wasserdicht ab und schützen den Körper so vor Austrocknung [Mad03]. An der oberen Stratum Corneum kommt es dann zur Abstoßung der obersten, verhornten Hautschichten unter Bildung von Hautschuppen.

Die Dermis hat komplexe biologische Aufgaben, wie die Ernährung der Epidermis und Bereitstellung von Abwehrzellen, außerdem ist sie für die mechanische Festigkeit der Haut verantwortlich [CKS92]. Sie ist mit der Epidermis über die Junktionzone verbunden. Die Zellen in der Dermis sind Fibroblasten, Mastzellen und andere Gewebezellen [Fri09], die vereinzelt eingebettet in einem Netz aus verknüpften Kollagenfaserbündeln liegen [Ruw07]. Die Zellen und Fasern werden von einer gelartigen Grundsubstanz umschlossen, wobei man die Fasern und Grundsubstanz als extrazelluläre Matrix der Dermis bezeichnet [Fri09]. Die Dermis kann eingeteilt werden in die dünne, zell- und gefäßreiche Stratum papillare und die dicke, faserreiche Stratum reticulare. In beiden Schichten befindet sich ein ausgedehntes Blutgefäßsystem, ein parallel zur Hautoberfläche gelegener Plexus, einmal ein subepidermaler Plexus und ein Plexus der tief in der Stratum reticulare liegt [CKS92].

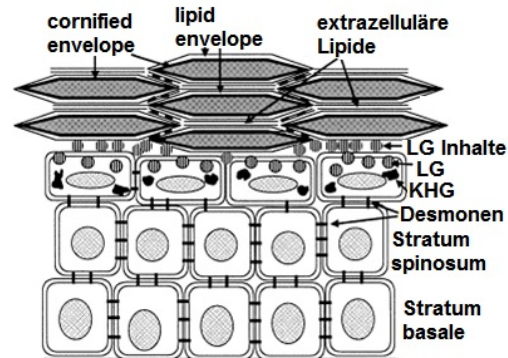


Abbildung 3.7.: Schematische Darstellung der Epidermis mit den Veränderungen der Lipid Strukturen während der epidermalen Differenzierung

Die Stratum papillare ist aus feinmaschigen, kollagenen und elastischen Fasern, zahlreichen Fibroblasten und reichlich ungeformter Grundsubstanz aufgebaut [Rie03]. Die Stratum papillare streckt fingerförmige, papillenförmige Ausläufer (Papillen) gegen die Epidermis vor, wodurch eine Austausch- und Haftungsfläche entsteht. Die Versorgung der Epidermis erfolgt über haarnadelförmige Kapillarschlingen, wobei jede Papille von einer eigenen Kapillarschlinge versorgt wird [CKS92]. Die breite Stratum reticulare besteht aus dicken Kollagenfaserbündeln, die in Form eines Scherengitters angeordnet sind und nur wenigen Fibroblasten und Blutgefäßen. Die Kollagenfasern setzen sich aus Kollagenfibrillen zusammen, die in der Dermis hauptsächlich aus Kollagen Typ I und selten auf Kollagen Typ III bestehen und für die mechanische Stabilität der Dermis verantwortlich sind [Jun98].

Die Subcutis (Unterhaut) besteht aus lockerem Bindegewebe, elastischen Fasern und Fettgewebe und ist das Bindeglied zwischen Dermis und den innenliegenden Muskeln oder Knochen, das eine Verschiebung der Haut ermöglicht [Rie03]. In der Subcutis liegen Nerven, Gefäße, Haarwurzeln, Drüsen und stellenweise Muskelzellen, doch hauptsächlich besteht sie aus Fetteinlagerungen. Die Fetteinlagerungen dienen der Energiespeicherung, der Wärmeisolation und an manchen Stellen der Polsterung (Ferse).

3.3.2. Schweinehaut als biologisches Modell für die menschliche Haut

Da die Haut des Hausschweins der menschlichen Haut in Aufbau, Biochemie und grundlegenden, stoffwechselphysiologischen Vorgängen ähnelt, wird sie in immer größerem Maße verwendet, um dermatologische Probleme zu erforschen [MN76]

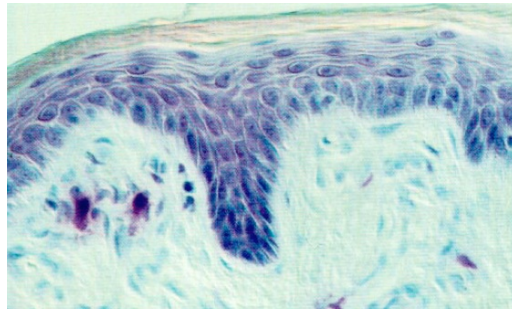


Abbildung 3.8.: Epidermis eines Hausschweins (Deutsches Edelschwein) [Mey96]

[MWB⁺08]. Doch obwohl die Haut des Hausschweins in Anatomie und Histochemie der des Menschen ähnelt, gibt es auch viele Unterschiede. So sind auf der einen Seite die Haut des Menschen und des Hausschweins durch feine, einschneidende Linien, die charakteristische Muster bilden und wenig Behaarung gekennzeichnet, doch andererseits sind die Haare des Hausschweins deutlich grober als die des Menschen [MY64].

Das Hausschwein besitzt eine relativ dicke Epidermis, die mit 70-140 μm deutlich breiter ist, als die Epidermis von Ratten, Pferden und Hunden (10-90 μm) und darin der Epidermis des Menschen ähnelt [Rie03]. Außerdem ist sie auch in verschiedene Schichten gegliedert und der Differenzierungsprozess der Hautzellen dauert beim Hausschwein 30 Tage (Mensch: 28 Tage) [Mey96]. Ähnlichkeiten wurden außerdem bei der Untersuchung von glycosphingolipiden und Ceramiden in der Epidermis von Mensch und Schwein festgestellt [SM00]. Auch die histochemische Untersuchung von Enzymen in der Schweinehaut spiegelte die Enzymverteilung in menschlicher Haut wieder [MN76]. Insgesamt ähnelt die Epidermis vom Schwein sehr der vom Menschen, bis auf die dicke, sehr kompakte Stratum corneum beim Schwein [MY64] und einer größeren Anzahl von Langerhanszellen beim Menschen [Mey96].

Die Dermis beider Spezies sind dick, mit einem ähnlichen Papillarsystem und einem hohen Gehalt an elastischen Fasern [SM00]. Auch die Anordnung Kollagenfibrillen und Kollagenfaserbündeln in der Schweinedermis entspricht den Beobachtungen in menschlicher Dermis [MNR82]. Doch die Dermis des Schweines ist im Gegensatz zur menschlichen Dermis nur schwach durchblutet und auch die Haarfollikel des Schweins sind nur schwach durchblutet, wodurch die Haare des Schweins so gut wie kein Mark besitzen [MY64]. Außerdem haben Menschen meist ekkrine Schweißdrüsen und Schweine nur apokrine Drüsen [SM00].

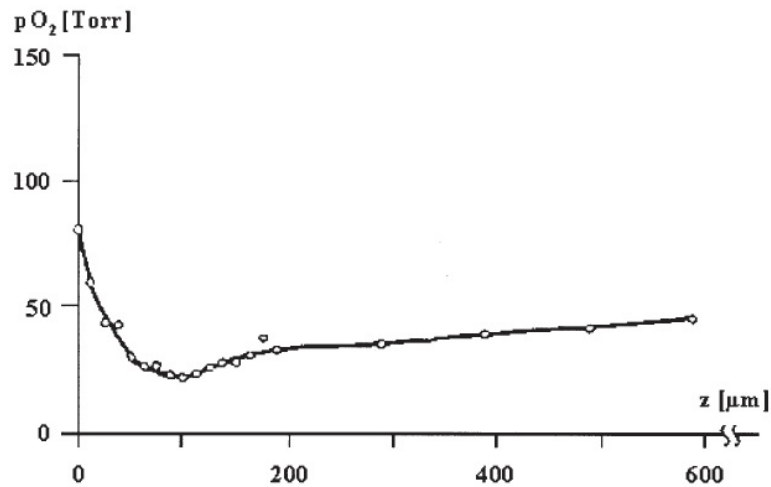


Abbildung 3.9.: Der Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks, gemessen mit reduzierter atmosphärischer Sauerstoffzufuhr und erhöhter Sauerstoffversorgung durch das Blut [SSA⁺02]. Auf der x-Achse ist die Tiefe z der Haut in μm aufgetragen, wobei 0 die Hautoberfläche ist.

3.3.3. Sauerstoff in der Haut und in wässrigen Lösungen

In dieser Arbeit soll die Generierung von Singulett-Sauerstoff durch UVB Anregung untersucht werden. Die Voraussetzung für die Entstehung von angeregtem Singulett-Sauerstoff ist das Vorhandensein von Sauerstoff im Grundzustand. Aus diesem Grund ist es von Interesse, ob die UVB absorbierenden Moleküle in der Haut von Sauerstoff im Grundzustand umgeben sind.

Die Haut ist neben den Augen und Lungen das einzige Organ, das in direktem Kontakt mit Sauerstoff aus der Atmosphäre steht [SMA04]. Schon im 19. Jahrhundert wurde festgestellt, dass die Haut in der Lage ist, Sauerstoff aus der Atmosphäre aufzunehmen. Dieses Phänomen wurde als Hautatmung bekannt [SAS⁺00]. Dabei macht der durch die Haut aufgenommene Sauerstoff nur ungefähr 1 % des gesamten vom menschlichen Organismus aufgenommenen Sauerstoffs aus und spielt für die Sauerstoffversorgung des Organismus kaum eine Rolle [SAS⁺00]. Doch er spielt eine Rolle für die Sauerstoffversorgung der Haut. Alle Schichten der Epidermis und Dermis, außer der Stratum corneum verbrauchen Sauerstoff in verschiedenen Mengen [SSA⁺02]. Dabei wird der Sauerstoff hauptsächlich in zelldichten Regionen der Haut verbraucht, wo es entweder viele Keratinozyten oder Fibroblasten gibt, oder wenn die Zellaktivität der Keratinozyten und Fibroblasten erhöht ist [SMA04]. Die Haut kann sowohl über das Blut als auch über den aufgenommen, atmosphärischen

Sauerstoff mit Sauerstoff versorgt werden. Der im Blut transportierte Sauerstoff diffundiert von den Gefäßsystemen der Dermis dem Sauerstoffpartialdruckgefälle folgend in das umliegende Gewebe [SMA04]. In Abbildung 3.9 ist der in Haut gemessene Sauerstoffpartialdruck abgebildet, wobei bei der Messung der Sauerstoffpartialdruck auf der Hautoberfläche auf 78 Torr reduziert wurde (normal ungefähr 160 Torr = 0,213 bar) und die Sauerstoffversorgung durchs Blut erhöht war. Unter diesen Bedingungen verläuft der Sauerstoffpartialdruck P_{O_2} wie in Abbildung 3.9 mit einem Minimum bei ungefähr 100 μm unter der Hautoberfläche [SSA⁺02]. Unter normalen Bedingungen liegt das Minimum des Sauerstoffpartialdrucks P_{O_2} vermutlich tiefer und man geht von einer Sauerstoffversorgung durch hauptsächlich atmosphärischen Sauerstoff in eine Tiefe bis zu 400 μm aus [SSA⁺02]. Der atmosphärische Sauerstoff wird auch durch Diffusion entlang dem Sauerstoffpartialdruckgefälle aufgenommen, wobei die stratum corneum als wesentliche Diffusionsbarriere anzusehen ist [SMA04]. In der Haut kann der Sauerstoffpartialdruck nach den Messungen im Jahr 1987 (Abbildung 3.9) also weniger als 20 Torr betragen und in Zellen ist er sogar noch niedriger, z.B. ungefähr 6 Torr in Herzzellen [Sch01].

Gewebe	Sauerstoffpartialdruck P_{O_2} [Torr]
Milz	66 [VKO89]
Unterhaut	50 [VKO89]
Haut	< 20 [BESLL87]
Herzzelle	6 [Sch01]

Tabelle 3.2.: Der Sauerstoffpartialdruck in verschiedenen Geweben

3.4. Singulett-Sauerstoff

3.4.1. Sauerstoff

Sauerstoff gehört zur VI Hauptgruppe der Elemente, der Chalkogene, und wird durch das Symbol O und die Ordnungszahl 8 beschrieben. Elementarer Sauerstoff kommt in der Natur in zwei Modifikationen vor: dem Ozon O_3 und dem hier näher untersuchten molekularen Sauerstoff O_2 [Mor96].

Die Eigenschaften und Verhaltensweisen von Sauerstoff sind auf seine elektronische Struktur zurückzuführen, denn im Gegensatz zu den meisten Molekülen hat Sauerstoff einen Triplett-Zustand als Grundzustand [Ogi10]. Elementarer Sauerstoff hat eine gefüllte s-Schale und 6 Elektronen in der Valenzschale, die mit der Elektronenkonfiguration s_2p_4 angeordnet sind [LKK05]. Ein Atom strebt aber nach einem

stabilsten Zustand, der erreicht ist, wenn seine Valenzschale maximal gefüllt ist. Bei Sauerstoff wäre dies der Fall, wenn es acht Valenzelektronen in seiner äußersten Schale hätte. Aus diesem Grund verbindet sich das O-Atom oft mit einem anderen O-Atom zum O_2 -Molekül. Dabei teilen sich die beiden Sauerstoffatome durch eine Doppelbindung zwei Elektronenpaare (kovalente Bindung). Da Sauerstoff ein kleines, symmetrisches Atom ist, können die Elektronenzustände des Moleküls O_2 durch Linearkombinationen der Atomorbitale von O beschrieben werden. Dabei erhält man aus zwei Atomorbitalen von O zwei Molekülorbitale von O_2 , das bindende Molekülorbital mit geringerer potentieller Energie und das anti-bindende Molekülorbital mit höherer potentieller Energie. Aus den Orbitalen der Valenzschale erhält man dann wie in Abbildung 3.10 sichtbar aus den gefüllten 2s-Orbitalen die Molekülorbitale σ_{2s} und σ_{2s}^* und aus den 2p Orbitalen die Molekülorbitale σ_{2p_x} , $\sigma_{2p_x}^*$, π_{2p_y} , $\pi_{2p_y}^*$, π_{2p_z} und $\pi_{2p_z}^*$ [LKK05]. Die σ -Orbitale werden aus Atomorbitalen mit der magnetischen Quantenzahl $m_l = 0$ gebildet, während die π -Orbitale aus Atomorbitalen mit $|m_l| = 1$ gebildet werden. Dabei sind die σ -Orbitale rotationssymmetrisch um die Molekülachse, mit einem Drehimpuls um die Molekülachse von Null, während die π -Orbitale in der Molekülachse eine Knotenebene haben (Abbildung 3.10). Die Besetzung der Molekülorbitale ist bestimmt durch die Hundsche Regel und das Pauli-Prinzip. Dabei werden die Molekülorbitale mit der niedrigsten potentiellen Energie zuerst besetzt, wobei sich nur maximal 2 Elektronen mit antiparallelem Spin in einem Molekülorbital aufhalten dürfen [LKK05]. Daraus ergibt sich ein Grundzustand für O_2 mit zwei ungepaarten Elektronen in den $\pi_{2p_y}^*$ und $\pi_{2p_z}^*$ Orbitalen, die einen parallelen Spin haben. Mit zwei ungepaarten Elektronen in der äußeren Schale, die beide denselben Spin haben, ist Sauerstoff ein Diradikal [PHF⁺06]. Da Sauerstoff eine relativ kleine Kernladungszahl $Z = 8$ besitzt, können die Elektronenzustände durch LS-Kopplung genähert werden. Damit ist der Gesamtspin gleich der Spins der Valenzelektronen $S = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 1$ und die Spinmultiplizität $2S + 1 = 3$. Der Grundzustand von Sauerstoff ist also ein Triplett-Zustand und wird mit 3O_2 oder mit ${}^3\Sigma_g^-$ bezeichnet. Dabei bezeichnet 3 die Spinmultiplizität des Zustandes, g steht für eine gerade Parität, das Symbol Σ steht für einen Gesamtdrehimpuls von Null und das - beschreibt, dass die Gesamtwellenfunktion bezüglich einer Spiegelung in einer Spiegelebene, welche die Kernverbindungsachse enthält, ihr Vorzeichen verändert.

3.4.2. Reaktive Sauerstoffspezies

Als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder Sauerstoffradikale bezeichnet man Atome oder Moleküle mit mindestens einem ungepaarten Elektron. Falls sie mehrere ungepaarte Elektronenpaare besitzen, werden sie als Diradikale, Triradikale usw. bezeichnet. ROS können für die normalen Zellfunktionen benötigt werden, da sie Teil der Signalprozesse von Zellen sind [PHF⁺06]. Aber in hohen Konzentrationen

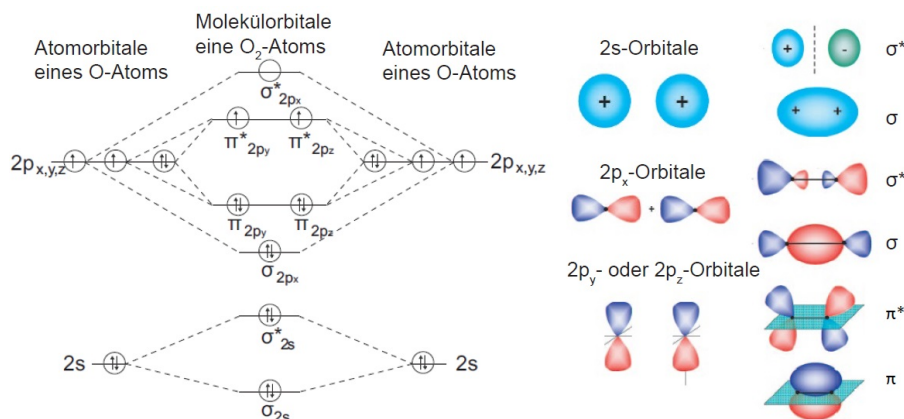


Abbildung 3.10.: Schematische Darstellung der Atom- und Molekülorbitale von Sauerstoff [Reg10]

sind sie für den Organismus schädlich und spielen bei oxidativem Stress und damit bei verschiedenen Zellschäden und Krankheiten eine wesentliche Rolle. ROS bewirken unter anderem oxidative Schäden wie Proteinoxidation und Lipidperoxidation. Sie können aber auch die RNS und DNS von Zellen schädigen [PHF⁺06].

Zu den ROS gehören freie Radikale wie das Superoxid-Anion O_2^- , das Hydroxyl-Radikal $OH\cdot$ und das Peroxylradikal $ROO\cdot$. Außerdem gehören zu den nicht freien ROS stabile molekulare Oxidanten wie Wasserstoffperoxid H_2O_2 , Ozon (O_3) sowie angeregte Sauerstoffmoleküle (Singulett-Sauerstoff 1O_2 [Gul12]). Singulett-Sauerstoff ist demnach kein Radikal, sondern ein hoch reaktives Oxidant, die auch zu der Gruppe der ROS gehören [JBRKN08].

3.4.3. Singulett-Sauerstoff

Sauerstoff hat als niedrigste angeregte Zustände zwei Singulett-Zustände, die sich vom Sauerstoff-Grundzustand nur durch die Anordnung der Elektronen in den anti-bindenden π^* -Orbitalen unterscheiden [DC02]. Diese beiden angeregten Zustände sind Singulett-Zustände, da die Spins der Valenzelektronen entgegen der Hundschen Regel antiparallel ausgerichtet sind. Durch die anti-parallelen Valenzelektronen haben beide Singulett-Zustände einen Gesamtspin von $S = 0$ und eine Spinnmultiplizität von $2S + 1 = 1$. Der energetisch etwas niedrigere, stabilere angeregte Sauerstoff mit einer Anregungsenergie von $94 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ wird auch Singulett-Sauerstoff (1O_2) genannt [Ogi10]. Die Anregungsenergie von $94 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ entspricht 0,97 eV und die Übergangswellenlänge ist 1270 nm. Die beiden angeregten Zustände unterscheiden sich dadurch, ob sich die beiden Valenzelektronen in einem (1O_2 mit Termsymbol

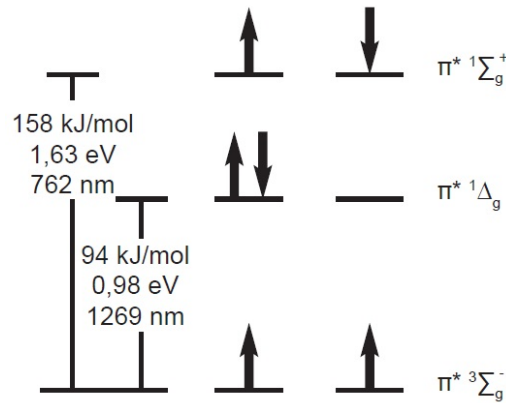


Abbildung 3.11.: Die Energiezustände von Sauerstoff-Atom im Grundzustand und in den ersten beiden angeregten Zuständen mit den dazugehörigen Anregungsenergien

$^1\Delta_g$) oder in beiden π^* -Orbitalen (Termsymbol: $^1\Sigma_g^+$) befinden. Der $^1\Sigma_g^+$ -Zustand ist energetisch höher mit einer Anregungsenergie von $158 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ [DC02]. Die Übergangswellenlänge vom $^1\Sigma_g^+$ -Zustand in den Grundzustand beträgt 762 nm [SS03]. Da er energetisch instabiler ist, relaxiert er sehr schnell in den 1O_2 - oder Grundzustand und hat ungestört (nicht in Medium) nur eine Lebensdauer von 11,3 s, während der $^1\Delta_g$ -Zustand langlebig ist mit einer Lebensdauer von 72 Minuten [SS03]. Das liegt daran, dass der Übergang vom $^1\Delta_g$ -Zustand in den Grundzustand Spin-Verboten ist [DC02]. In Lösung verkürzt sich die Lebensdauer von elektronisch angeregten Zuständen, da sie z.B. durch Kollisionen mit Lösungsmolekülen deaktiviert werden können. Der $^1\Delta_g$ -Zustand hat in Lösung eine Lebensdauer von 10^{-3} bis 10^{-6} s, während der $^1\Sigma_g^+$ -Zustand nur eine Lebensdauer von 10^{-11} bis 10^{-9} hat [DC02]. Beide Singulett-Zustände haben eine gerade Parität (g), aber Singulett-Sauerstoff ($^1\Delta_g$) besitzt einen Gesamtdrehimpuls von zwei, während der $^1\Sigma_g^+$ -Zustand einen Gesamtdrehimpuls von Null hat.

3.4.4. Erzeugung von Singulett-Sauerstoff

1O_2 kann auf verschiedene Arten erzeugt werden, z.B. chemisch aus anderen Sauerstoffverbindungen oder photochemisch mit Hilfe eines anderen Moleküls, das man als Photosensibilisator bezeichnet. Die photochemische Erzeugung von 1O_2 wird wiederum eingeteilt in Typ I und Typ II Reaktionen.

Bei der photochemischen Erzeugung Typ II von 1O_2 wird Energie vom angeregten Photosensibilisator auf Sauerstoff im Grundzustand übertragen, wodurch dieser

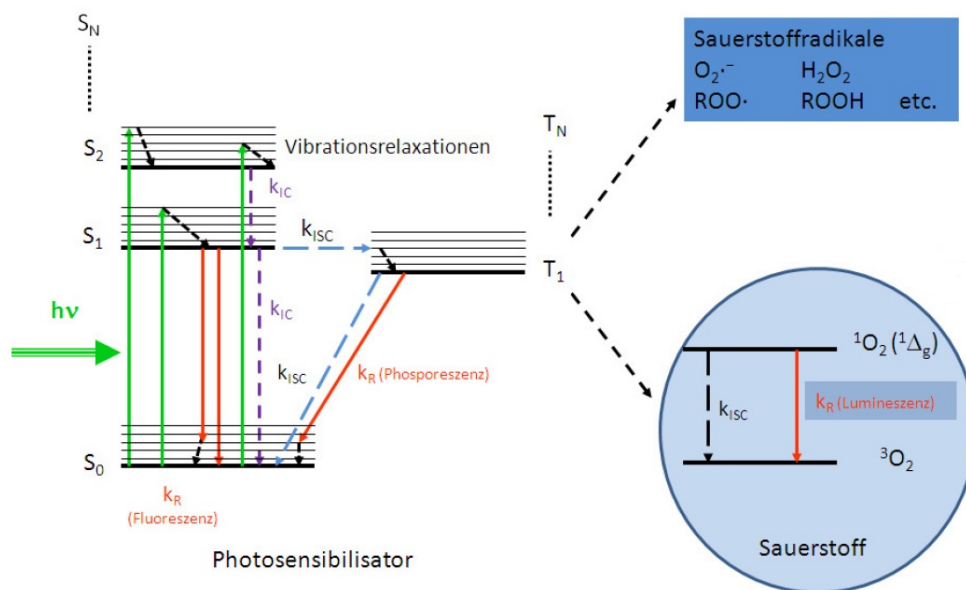


Abbildung 3.12.: Schematische Darstellung der Singulett-Sauerstoff Erzeugung

in einen angeregten Zustand wechselt. In Abbildung 3.12 ist schematisch die 1O_2 Generierung durch Energieübertrag von einem Photosensibilisator dargestellt. Die Voraussetzung für 1O_2 Erzeugung ist die Absorption von adäquater Strahlung durch den Photosensibilisator, um diesen anzuregen. Der Photosensibilisator wird durch die Absorption eines Photons ($h \cdot \nu$) in einen angeregten Singulett-Zustand S_1 oder S_N angeregt. Da die elektronischen Übergänge so schnell verlaufen, dass sich in dieser Zeit der Kernabstand wegen der hohen Kernmasse nicht verändert, sind der S_1 bzw. S_N -Zustand nach dem Frank-Condon Prinzip schwingungsangeregt ($\nu \neq 0$). Dieser Zustand relaxiert aber innerhalb von Pikosekunden durch interne Konversion (internal conversion: IC) auf den S_1 bzw. S_N -Zustand mit $\nu = 0$. Ist der Photosensibilisator in einen S_N -Zustand angeregt worden, relaxiert dieser durch IC schnell in den S_1 -Zustand [DC02]. Der S_1 -Zustand hat eine Lebensdauer im Nanosekunden Bereich und relaxiert dann, indem er entweder strahlungslos durch IC oder strahlend durch Abgabe von Fluoreszenz-Photonen in den Grundzustand S_0 übergeht oder strahlungslos durch Intersystem Crossing (ISC) auf den Triplett-Zustand T_1 des Photosensibilisators übergeht. Dieser T_1 -Zustand kann wieder schwingungsangeregt ($\nu \neq 0$) sein. Der Übergang zwischen Singulett- und Triplett-Zuständen ist quantenmechanisch verboten. Dieses Verbot kann im Photosensibilisator aufgrund des Schweratomeffekts gelockert sein, da in diesen Atomen die Spin-Bahn-Kopplung stärker ist und damit der Spin S keine gute Quantenzahl mehr ist. Außerdem kann das Verbot des Übergangs durch das Ausbilden von Ringströmen im Photosensibilisator gelockert sein. In Lösungen ist dieses Verbot zusätzlich durch Stöße mit anderen Molekülen, wie den Lösungsmittel-Molekülen, gelockert. Der Triplett T_1 -Zustand

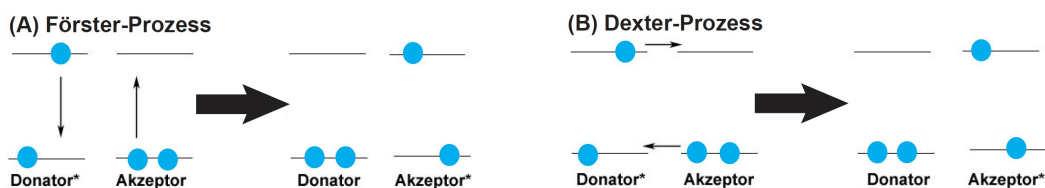


Abbildung 3.13.: In (A) ist der Energietransfer bei Försterprozess dargestellt und in (B) der Elektronenaustausch bei Dexter-Prozess

kann wieder in den S_0 -Grundzustand des Photosensibilisators relaxieren, entweder strahlungslos durch ISC oder strahlend durch Abgabe von Phosphoreszenz-Photonen. Dieser Übergang vom T_1 in den S_0 -Zustand ist wieder Spin-Verboten [SS03], wodurch der T_1 -Zustand metastabil ist mit Lebensdauern im Mikrosekunden Bereich [DC02]. Wenn die Energie des T_1 -Zustandes über der Anregungsenergie von 1O_2 liegt (0,97 eV), was für viele organische Photosensibilisatoren der Fall ist [SS03], so kann die Energie des T_1 -Zustandes auch auf ein O_2 -Molekül übertragen werden, welches dann in den 1O_2 -Zustand übergeht. Der mögliche Übergang auf den $^1\Sigma_g^+$ -Zustand wird nicht betrachtet, da dieser in Lösung schnell in den 1O_2 -Zustand relaxiert [Ogi10]. Der Übergang von Energie vom T_1 -Zustand des Photosensibilisators auf Sauerstoff im Grundzustand ist genauso wie der Übergang vom S_1 -Zustand des Photosensibilisators auf Sauerstoff im Grundzustand Spin-erlaubt [SS03].

Man unterscheidet bei dem nichtstrahlenden intermolekularen Energietransfer-Prozess vom T_1 -Zustand auf Sauerstoff zwischen dem Dexter-Prozess und dem Förster-Prozess.

Beim Dexter-Prozess kommt es zwischen zwei Molekülen zum Austausch von Elektronen, wobei sich das eine Elektron in einem angeregten und das andere sich in einem nicht angeregten Zustand befindet [VRW07]. Der Photosensibilisator (Donator) gibt also ein angeregtes Elektron an den Sauerstoff (Akzeptor) ab und empfängt dafür vom Sauerstoff ein nicht angeregtes Elektron. Ein solcher Elektronenaustausch ist nur möglich, wenn sich die Wellenfunktionen der Moleküle überlappen und hat damit eine sehr kurze Reichweite. Der Abstand zwischen den Molekülen muss unter 1 nm sein [VRW07]. Da die Wellenfunktionen der Moleküle exponentiell mit dem Abstand r abnehmen, ist der Dexter-Prozess proportional zu e^{-r} . In biologischen Systemen oder Systemen in denen die Moleküle durch Lösungsmittelmoleküle voneinander getrennt sind, ist der Dexter-Prozess nur von untergeordneter Bedeutung.

Beim Förster-Prozess ist das Überlappen des Emissionsspektrums des Photosensibilisators mit dem Absorptionsspektrum von Sauerstoff nötig [VRW07]. Außerdem gilt der Förster-Prozess normal nur für Singulett-Singulett Übergänge, d.h. der Spin

muss erhalten bleiben ($\Delta S = 0$) [Eng03]. Doch in Lösungen und biologischen Systemen ist durch die Kollision mit anderen Molekülen diese Auswahlregel gelockert und der Förster-Prozess von Bedeutung [Reg10]. Verantwortlich für den Energietransfer beim Förster-Prozess ist die Wechselwirkung des Coulomb-Potentials zwischen dem elektronisch angeregten Photosensibilisator im T_1 -Zustand und 3O_2 , wobei die wichtigste dieser Wechselwirkungen die Dipol-Dipol-Wechselwirkung ist. Förster berechnete die Energietransferrate dieser Dipol-Dipol-Wechselwirkung und ermittelte, dass sie mit der inversen sechsten Potenz der Distanz zwischen den Molekülen abnimmt (Energietransferrate $\propto r_{-6}$) [HW06]. Die Dipol-Dipol Wechselwirkung hat also eine viel größere Reichweite als der Dexter-Prozess, so dass ein Förster-Energietransfer zwischen Molekülen mit einer Entfernung bis zu 10 nm möglich ist.

Bei photodynamischen Reaktionen vom Typ I handelt es sich um Ladungstransfer-Prozesse. Vom angeregten Photosensibilisator werden Elektronen an ein Substratmolekül übertragen, oder häufiger vom Substratmolekül an den Photosensibilisator und so werden Radikale erzeugt. Wenn ein Elektron vom Photosensibilisator im T_1 -Zustand auf molekularen Sauerstoff übertragen wird, entsteht das Superoxid Anion, das wiederum in der Lage ist chemisch zu reagieren und andere Radikale zu erzeugen [Ogi10]. Auf diesem Weg kann nach mehreren Reaktionen auch 1O_2 entstehen.

3.4.5. Deaktivierung von Singulett-Sauerstoff

Sobald 1O_2 erzeugt wurde, kann er auch auf verschiedene Weise deaktiviert werden und wieder in seinen Grundzustand wechseln. Der Übergang von 1O_2 zu 3O_2 ist als elektronischer Dipolübergang Spin-verboten [SS03]. Dies erklärt die lange Lebensdauer von ungestörtem 1O_2 . In Lösungen wird das Verbot vom elektronischen Dipolübergang von 1O_2 zu 3O_2 durch Stöße von Molekülen gelockert, außerdem kann 1O_2 auch nicht strahlend relaxieren, indem es Energie über einen Dexter oder Försterprozess abgibt.

Generell unterscheidet man physikalisches Quenchen, wobei 1O_2 mit einem Molekül M kollidiert, dabei seine Energie abgibt und in den 3O_2 -Zustand relaxiert, ohne dass Sauerstoff verbraucht wird oder Photoprodukte geformt werden und chemisches Quenchen, bei dem der 1O_2 mit dem Molekül M reagiert und ein neues Produktmolekül entsteht [DC02]. Im weiteren Verlauf der Arbeit ist mit Quenchen physikalisches Quenchen gemeint. Beim physikalischen Quenchen unterscheidet man noch zwischen Eigenquenchen oder Eigenlöschung, falls das Sauerstoffmolekül im 1O_2 -Zustand seine Energie an ein Sauerstoffmolekül im 3O_2 -Zustand abgibt. Gibt das angeregte Sauerstoffmolekül seine Energie an ein anderes Molekül, das kein Sauerstoff ist, ab, so wird es als Fremdlöschung oder einfach quenchen bezeichnet. Ein geeigneter Quen-

cher in wässrigen Lösungen ist zum Beispiel Natriumazid (NaN_3), der ausführlich in Kapitel 4.1.5 beschrieben wird.

Wird ein $^1\text{O}_2$ Molekül chemisch gequenchet, so ist dieser Prozess irreversibel, da entweder Sauerstoff verbraucht wird und/oder Photoproducte entstehen. Dies wird in dieser Arbeit einfach als chemische Reaktion oder Oxidieren bezeichnet. $^1\text{O}_2$ ist hochreaktiv, d.h. es reagiert sehr leicht mit anderen Substanzen. Da $^1\text{O}_2$ besonders elektrophil ist, bevorzugt es elektronenreiche Reaktionspartner [JBRKN08]. Einige elektronenreiche Substanzen wie ungesättigte Kohlenwasserstoffmoleküle, Phenole, Amine oder Sulfide sind allgegenwärtig in Membran-Lipiden, Proteinen und DNS, wodurch $^1\text{O}_2$ diese Biomoleküle oxidieren kann [JBRKN08]. Dabei bilden sich reaktive Sauerstoffmetabolite mit der allgemeinen Formel R-OOH. Bei der Oxidation von Lipiden bilden sich beispielsweise Lipidhydroperoxide mit der Formel LOOH. Auch Proteine können durch $^1\text{O}_2$ geschädigt werden, da dieser die Aminosäuren-Seitenketten und das Protein-Grundgerüst oxidieren kann. Dies ist abhängig von den Aminosäuren in den Seitenketten, da nur ein Teil der 20 essentiellen Aminosäuren durch $^1\text{O}_2$ oxidiert werden kann [Reg10]. Die durch $^1\text{O}_2$ geschädigten Proteine können für die Funktion von Zellen und Haut von Bedeutung sein.

3.4.6. Detektion von Singulett-Sauerstoff

$^1\text{O}_2$ kann sowohl direkt als auch indirekt detektiert werden. Beim indirekten Nachweis von $^1\text{O}_2$ werden Reaktionsprodukte von $^1\text{O}_2$ analysiert und auf diesem Weg wird die Generierung von $^1\text{O}_2$ nachgewiesen. Eine beliebte Methode ist das Verlängern oder Verkürzen der $^1\text{O}_2$ -Lebensdauer, wodurch die dazugehörigen Schäden von Zellstrukturen erhöht oder verkleinert werden, was über verschiedene Zellparameter detektiert werden kann [Ogi83]. Die Lebensdauer von $^1\text{O}_2$ kann durch verschiedene Quencher wie NaN_3 verkürzt werden [BME⁺00] oder durch den Gebrauch von manchen Lösungsmitteln wie Deuterium Oxid (D_2O) verlängert werden [Ogi10] [Ogi83]. Hierbei muss aber beachtet werden, dass die benutzten Quencher wirklich intrazellulären $^1\text{O}_2$ erreichen können, nicht toxisch sein dürfen und nicht andere Moleküle außer $^1\text{O}_2$ in großem Maße beeinflussen, sonst ist dieser Quencher nicht für in vitro und in vivo Experimente geeignet [Ogi10]. Eine weitere Methode ist die Nutzung von sogenannten Reporter-Molekülen. Es gibt Reportermoleküle deren optischen Eigenschaften wie z.B. Fluoreszenz sich ändern, wenn sie mit $^1\text{O}_2$ interagieren [Ogi10]. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass Reportermoleküle benötigt werden, die vielleicht nicht in lebende Zellen eindringen können oder toxisch sind.

Der direkte Nachweis durch die zeitlich aufgelöste Detektion von $^1\text{O}_2$ Lumineszenz-Photonen gilt als die spezifischste Methode der $^1\text{O}_2$ Detektion [JBRKN08]. Bei die-

ser Methode wird die Lumineszenz-Strahlung bei ungefähr 1270 nm, die durch den strahlenden Übergang von 1O_2 zu 3O_2 freigesetzt wird, detektiert. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass keine Reporter-Moleküle benötigt werden und sie sowohl in Lösungen als auch in vitro und in vivo angewendet werden kann [BRK⁺11]. Allerdings hat der strahlende Übergang von 1O_2 zu 3O_2 einen extrem niedrigen Einsteinkoeffizient von $A = 2,3 \cdot 10^{-4}$ [SS03], wodurch die Lumineszenz-Ausbeute dieses Übergangs extrem niedrig ist (10^{-7}). Außerdem hat 1O_2 je nach Lösungsmittel oder Umgebung oft eine sehr kurze Lebensdauer. Man benötigt also eine hochempfindliche, zeitaufgelöste Emissionsspektroskopie, um die 1O_2 -Lumineszenz-Photonen zu detektieren. Dies können spezielle Photomultiplier, die hochempfindlich im Infrarot-Bereich sind, sein. Der direkte Nachweis von 1O_2 durch die Detektion von 1O_2 Lumineszenz wird noch ausführlich in Kapiteln 4.6 und 4.7 beschrieben.

3.5. Mathematische Grundlagen der Singulett-Sauerstoff Erzeugung und Relaxation

3.5.1. Modell zur Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff

Um die Zeitabhängigkeit des Photosensibilisator- T_1 -Zustands und des Singulett-Sauerstoff-Zustands theoretisch zu beschreiben, wurde das Modell von Parker et al. [PS84] verwendet, das von Baier et al. [BFP⁺07] erweitert wurde. Das Energieniveauschema, auf dem das verwendete gekoppelte Differentialgleichungssystem beruht, ist in Abbildung 3.14 dargestellt.

Das Energieniveauschema stellt die Erzeugung von 1O_2 durch Energieübertrag vom T_1 -Zustand des Photosensibilisators und die Relaxation von 1O_2 und dem T_1 -Zustand mit den dazugehörigen Raten k_i und Ratenkonstanten k_{ij} dar. Die Raten und Ratenkonstanten stellen die Häufigkeit der jeweiligen Relaxation dar.

- k_{T_1} : Rate der Deaktivierung des Photosensibilisator-Triplett-Zustands T_1 durch das Lösungsmittel
- $k_{T_1S_0}$: Ratenkonstante der Deaktivierung des Photosensibilisator-Triplett-Zustands T_1 durch den Photosensibilisator im Grundzustand

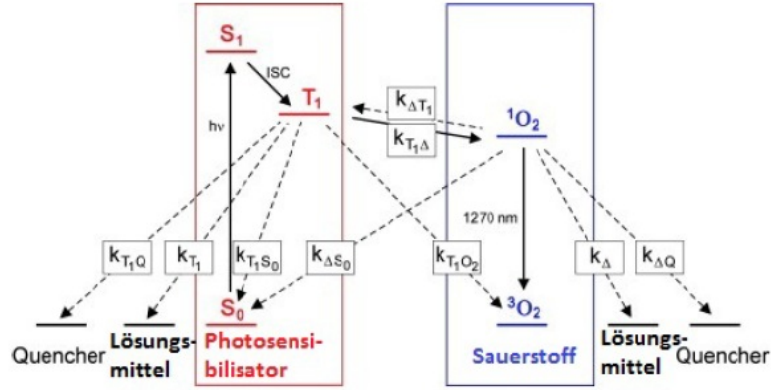


Abbildung 3.14.: Schematisches Energieniveaudiagramm zur Erzeugung von 1O_2 durch Energietransfer vom T_1 -Zustand des Photosensibilisators mit allen vorhandenen Raten und Ratenkonstanten [Bai05]

- k_{T_1Q} : Ratenkonstante der Deaktivierung des Photosensibilisator-Triplett-Zustands T_1 durch den Quencher
- k_{Δ} : Rate der Deaktivierung von 1O_2 durch das Lösungsmittel
- $k_{\Delta Q}$: Ratenkonstante der Deaktivierung von 1O_2 durch den Quencher
- $k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}$: Ratenkonstanten der Deaktivierung des Photosensibilisator-Triplett-Zustands T_1 durch Sauerstoff; $k_{T_1\Delta}$ generiert 1O_2 und $k_{T_1O_2}$ generiert keinen 1O_2
- $k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}$: Ratenkonstanten der Deaktivierung von 1O_2 durch den Photosensibilisator; $k_{\Delta T_1}$ generiert einen Photosensibilisator-Triplett-Zustand T_1 und $k_{\Delta S_0}$ generiert keinen Photosensibilisator-Triplett-Zustand T_1
- $k_{T_1\Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$: Grad des Energierücktransfers von 1O_2 auf den Photosensibilisator

Aus dem abgebildeten Energieschema lässt sich ein gekoppeltes Differentialgleichungssystem ableiten, das den zeitlichen Verlauf der Konzentration der Triplett-Zustände T_1 $[T_1]$ und der Konzentration von Singulett-Sauerstoff $[^1O_2]$ wiedergibt. Es werden gekoppelte Differentialgleichungen ermittelt, die die zeitliche Abhängigkeit der Besetzungsdichten des Triplett-Zustandes T_1 des Photosensibilisators und des 1O_2 -Zustandes darstellen.

Mit der Startbedingung, dass für $t = 0 \mu s$ die Besetzung des T_1 -Zustandes ab-

geschlossen ist und verschiedenen Näherungen, durch die sich das Differentialgleichungssystem vereinfachen lässt, erhält man folgendes Differentialgleichungssystem [Bai05]:

$$\begin{aligned}\frac{d[T_1]}{dt} &= -K_{T_1}[T_1] + k_{\Delta T_1}[^1O_2][P] \\ \frac{d[^1O_2]}{dt} &= -K_{\Delta}[^1O_2] + k_{T_1\Delta}[O_2][T_1]\end{aligned}\tag{3.1}$$

mit:

$$K_{T_1} = k_{T_1} + (k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta})[O_2] + k_{T_1S_0}[P] + k_{T_1Q}[Q]\tag{3.2}$$

$$K_{\Delta} = k_{\Delta} + (k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1})[P] + k_{\Delta Q}[Q]\tag{3.3}$$

Dieses vereinfachte Differentialgleichungssystem (Gleichung 3.1) kann analytisch gelöst werden. Dazu wird die Differentialgleichung der $\frac{d[^1O_2]}{dt}$ -Konzentration nach der Zeit abgeleitet und die dabei entstehende zeitliche Ableitung von $[T_1]$ wird durch die Differentialgleichung $\frac{d[T_1]}{dt}$ ersetzt. Man erhält nun eine Differentialgleichung zweiter Ordnung, die mit dem Lösungsansatz 1O_2 ist proportional zu $e^{-\beta t}$ gelöst werden kann. Für β erhält man so zwei linear unabhängige Lösungen:

$$\beta_{1,2} = \frac{1}{2} \cdot [K_{T_1} + K_{\Delta} \pm \sqrt{(K_{T_1} - K_{\Delta})^2 + 4k_{T_1\Delta}[O_2]k_{\Delta T_1}}], \quad \text{mit } \beta_1 > \beta_2\tag{3.4}$$

Die allgemeine Lösung der Differentialgleichung ist dann:

$$[^1O_2] = Ae^{-\beta_1 t} + Be^{-\beta_2 t}\tag{3.5}$$

Die Konstanten A und B müssen über die Anfangsbedingungen bestimmt werden. Dabei wird angenommen, dass zur Zeit $t = 0$ die Besetzung des T_1 -Zustandes abgeschlossen ist, während noch kein 1O_2 erzeugt wurde. Damit sind die Anfangsbedingungen $[^1O_2](t=0) = 0$ und $[T_1](t=0) > 0$ und es ergibt sich für die zeitliche Entwicklung der 1O_2 -Konzentration die folgende Gleichung:

$$[^1O_2](t) = \frac{[T_1]_{t=0} k_{T_1 \Delta} [O_2]}{\beta_1 - \beta_2} (e^{-\beta_2 t} - e^{-\beta_1 t}) \quad (3.6)$$

$[^1O_2](t)$ ist proportional zum experimentell bestimmten Lumineszenzsignal bei 1270 nm und β_1 und β_2 entsprechen dabei der Anstiegs- und Abklingrate der 1O_2 -Konzentration $[^1O_2]$. Ist also $\beta_1 > \beta_2$, so ist der Anstieg der 1O_2 -Konzentration durch β_1 bestimmt und der Abfall der Singulett- Sauerstoff Konzentration durch β_2 .

3.5.2. Die Raten und Ratenkonstanten

Durch den verwendeten Versuchsaufbau, der in den Kapiteln 4.6 und 4.7 beschrieben wird, kann die zeitliche Entwicklung der 1O_2 -Konzentration ($[^1O_2](t)$) bestimmt werden. Der theoretische Verlauf der 1O_2 -Konzentration wird durch Gleichung 3.6 beschrieben, die verwendet wird, um die ermittelten 1O_2 Signale zu fitten und dadurch β_1 und β_2 zu bestimmen, indem man sie mit der Anstiegsrate k_r und der Abklingrate k_d des Lumineszenzsignals gleichsetzt. Nun können durch die Variation der Photosensibilisator-, der Sauerstoff- und der Quencherkonzentration die Raten und Ratenkonstanten des Ratengleichungsmodells aus Abbildung 3.14 bestimmt werden. Die Raten und Ratenkonstanten hängen über die Gleichungen 3.2, 3.3 und 3.4 mit β_1 und β_2 zusammen. ls aus Abbildung 3.14 bestimmt werden. Die Raten und Ratenkonstanten hängen über die Gleichungen 3.2, 3.3 und 3.4 mit β_1 und β_2 zusammen.

3.5.2.1. Ohne Energierücktransfer

Falls der Energieabstand zwischen dem 1O_2 -Zustand und dem T_1 -Zustand des Photosensibilisators zu groß ist, findet kein Energierücktransfer (ohne Rücktransfer, oR, $k_{\Delta T_1} = 0$) statt. Damit ergeben sich folgende Gleichungen:

$$K_{T_1, oR} = K_{T_1} = k_{T_1} + (k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta})[O_2] + k_{T_1 S_0}[P] + k_{T_1 Q}[Q] \quad (3.7)$$

$$K_{\Delta, oR} = k_{\Delta} + k_{\Delta S_0}[P] + k_{\Delta Q}[Q] \quad (3.8)$$

mit

$$\beta_{1,2} = \frac{1}{2} \cdot [K_{T_1} + K_{\Delta} \pm [K_{T_1} - K_{\Delta, oR}], \beta_1 > \beta_2 \quad (3.9)$$

Die Anstiegs- und Abklingraten nehmen nun eine einfache Form an:

$$\beta_1 = \begin{cases} K_{T_1} & \text{wenn } K_{T_1} > K_{\Delta,oR} \\ K_{\Delta,oR} & \text{wenn } K_{T_1} < K_{\Delta,oR} \end{cases} \quad (3.10)$$

$$\beta_2 = \begin{cases} K_{\Delta,oR} & \text{wenn } K_{T_1} > K_{\Delta,oR} \\ K_{T_1} & \text{wenn } K_{T_1} < K_{\Delta,oR} \end{cases} \quad (3.11)$$

Eine detaillierte Beschreibung zur Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten ohne Energierücktransfer ist in der Literatur zu finden [Bai05] [Reg10].

3.5.2.2. Mit Energierücktransfer

Wenn $k_{\Delta T_1} > 0$ ist, kann der Triplett-Zustand des Photosensibilisators auch durch Energietransfer vom 1O_2 Zustand erzeugt werden. Dies ist nur der Fall, wenn beide Zustände ein ähnliches Energieniveau besitzen. Bei einer Energierückkopplung ($k_{\Delta T_1} > 0$) ist die Ermittlung der Raten und Ratenkonstanten schwieriger, da die Gleichungen für β_1 und β_2 nicht vereinfacht werden können und gegeben sind durch:

$$\beta_{1,2} = \frac{1}{2} \cdot [K_{T_1} + K_{\Delta} \pm \sqrt{(K_{T_1} - K_{\Delta})^2 + 4k_{T_1\Delta}[O_2]k_{\Delta T_1}}] \quad (3.12)$$

für $\beta_1 > \beta_2$

K_{Δ} hängt mit $K_{\Delta,oR}$ über die Gleichung 3.3 zusammen und es gilt:

$$K_{\Delta} = K_{\Delta,oR} + k_{\Delta T_1}[P] \quad (3.13)$$

Bei einem System mit Energierücktransfer lassen sich nur die Raten und Ratenkonstanten k_{T_1} , $k_{T_1 S_0}$, $k_{T_1 Q}$, k_{Δ} und $k_{\Delta Q}$ eindeutig ermitteln. Die restlichen Raten lassen sich darstellen durch die Summe $k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}$ und $k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta}$, sowie das Produkt $k_{T_1 \Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$. Die genaue Ermittlung dieser Raten, Ratenkonstanten, Summen und Produkte ist in der Literatur erklärt [Bai05] [Reg10].

3.6. Quantenausbeute von Singulett-Sauerstoff

Die 1O_2 Quantenausbeute Φ_Δ bezeichnet die Effektivität, mit der ein durch Absorption von Strahlung angeregter Photosensibilisator 1O_2 generiert. Bei der Erzeugung von 1O_2 ist zum einen Φ_T die T_1 -Quantenausbeute des Photosensibilisators, also die Effektivität, mit der durch Absorption von Strahlung in einen Singulett-Zustand angeregte Photosensibilisatoren durch ISC in den Triplett-Zustand wechseln, von Bedeutung. Und zum anderen die Rate $k_{T_1\Delta}$, mit der der Energietransfer vom T_1 -Zustand auf Sauerstoff zur Erzeugung von 1O_2 beschrieben wird. Mit diesem Prozess in Konkurrenz stehen alle Prozesse, welche Energie vom T_1 -Zustand auf Sauerstoff übertragen ohne 1O_2 zu erzeugen ($k_{T_1O_2}$) und alle Prozesse die den Triplett-Zustand T_1 entleeren ohne das ein Energieübertrag auf Sauerstoff stattfindet ($k_{T_1S_0}$) [DC02]. Die 1O_2 Quantenausbeute eines Photosensibilisators kann direkt oder indirekt bestimmt werden, wobei in dieser Arbeit nur die indirekte Methode verwendet wurde.

3.6.1. Indirekte Bestimmung der Singulett-Sauerstoff Quantenausbeute

Die 1O_2 Quantenausbeute eines Photosensibilisators $\Phi_\Delta^?$ kann bestimmt werden durch den Vergleich mit einem Referenz-Photosensibilisator mit bekannter Quantenausbeute Φ_Δ^{Ref} . Dabei wird die Lumineszenz der beiden Photosensibilisatoren verglichen und man benötigt das Verhältnis:

$$\frac{\Phi_\Delta^?[O_2]}{\Phi_\Delta^{Ref}[O_2]} \quad (3.14)$$

Für einen Photosensibilisator ohne Energierücktransfer ($k_{\Delta T_1}=0$) ergibt sich die 1O_2 Quantenausbeute zu:

$$\Phi_\Delta = \frac{\Phi_{T_1} \cdot k_{T_1\Delta} \cdot [O_2]}{K_{T_1}} \quad (3.15)$$

Die Energie der Lumineszenz ist proportional zum Zeit-Integral über das Lumineszenz-Signal von 1O_2 und lässt sich wie folgt darstellen [Bai05]:

$$E_L([O_2]) = \int ({}^1O_2) = \frac{[T_1]_0 \cdot k_{T_1\Delta} \cdot [O_2]}{K_\Delta \cdot K_{T_1}([O_2])} = \frac{[T_1]_0 \cdot \Phi_\Delta}{K_\Delta \cdot \Phi_{T_1}} \quad (3.16)$$

Die Besetzung $[T]_0$ des Triplettzustandes hängt von der Besetzung des Singulett-Zustandes $[S_1]_0$ und der Triplett-Quantenausbeute Φ_{T_1} über die Beziehung $[T_1]_0 = \Phi_{T_1} \cdot [S_1]_0$ ab. Damit ergibt sich für die 1O_2 Quantenausbeute:

$$\Phi_\Delta = \frac{E_L \cdot K_\Delta}{[S_1]_0} \quad (3.17)$$

Wenn sowohl im System der untersuchten wie auch der Referenzsubstanz gleiche Bedingungen herrschen, d.h. gleiches Lösungsmittel, gleiche Sauerstoff-Konzentration, sowie eine geringe Sensibilisator-Konzentration, um Eigenquenchen zu vermeiden, dann gilt $K_\Delta^? = K_\Delta^{Ref}$. Außerdem ist die Besetzung des S_1 -Zustandes zum Zeitpunkt $t = 0$ proportional zur Anzahl der absorbierten Photonen n_{abs} , die mit der absorbierten Energie des anregenden Laserpulses durch die Formel $n_{abs} = \frac{E_{A,abs}}{h\nu}$ zusammenhängt. Wenn die Anregungspulse des Lasers die gleiche Wellenlänge ($\lambda^? = \lambda^{Ref}$) haben, so gilt $\nu^? = \nu^{Ref}$ und das Verhältnis der 1O_2 Quantenausbeuten lässt sich darstellen durch:

$$\frac{\Phi_\Delta^?[O_2]}{\Phi_\Delta^{Ref}[O_2]} = \frac{\frac{E_L^?}{E_{A,abs}^?}}{\frac{E_L^{Ref}}{E_{A,abs}^{Ref}}} = \frac{S^?}{S^{Ref}} \quad (3.18)$$

Mit Hilfe dieser Formel wurden die 1O_2 Quantenausbeuten in dieser Arbeit ermittelt. Die Lumineszenz-Signale wurden für verschiedene absorbierte Energien $E_{A,abs}$ gemessen. Die absorbierte Energie $E_{A,abs}$ lässt sich aus der Absorption A der Photosensibilisatoren und der auftreffenden Laserleistung bestimmen. Sowohl die Absorption A konnte durch eine Variation der Photosensibilisator-Konzentration, als auch die auftreffende Laserleistung durch verschiedene Filter variiert werden. Um die Lumineszenz-Energie E_L zu ermitteln, wurden die Photonen der Lumineszenz-Signale summiert. Das Verhältnis von E_L zu $E_{A,abs}$ wurde graphisch aufgetragen und die Steigung S der Ausgleichsgeraden durch die Messpunkte wurde bestimmt. Durch den Vergleich der Steigungen von untersuchtem und Referenz-Photosensibilisator konnte dann die 1O_2 Quantenausbeute mit Formel 3.18 bestimmt werden.

3.7. Motivation dieser Arbeit

Die Exposition von UV Strahlung ist verantwortlich für eine Vielzahl von Erkrankungen der Haut und des Auges. Eine durch UV Strahlung ausgelöste Krankheit ist Hautkrebs, an der alleine in Deutschland jedes Jahr etwa 3000 Menschen sterben. Bisher wurde angenommen, dass UVB Strahlung direkt die menschliche DNS schädigt, da UVB von der DNS absorbiert wird und so zwischen benachbarten Pyrimidinbasen einer DNS-Kette Photoprodukte induzieren kann. Falls die DNS Schäden nicht komplett repariert werden können, sind dauerhafte Mutationen der Erbinformation die Folge, die zu dauerhaften Schäden der Zelle führen und zur Hautkrebsentstehung beitragen können. UVA Strahlung kann indirekte DNS Schäden auslösen, indem sie von endogenen Molekülen, die als Photosensibilisator wirken, absorbiert wird. Diese Photosensibilisatoren induzieren die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff und anderen reaktiven Sauerstoffspezies, die ebenfalls die DNS der Zelle schädigen können. Doch auch UVB Strahlung kann von Proteinen und vielen weiteren Biomolekülen absorbiert werden, zumeist besser als UVA Strahlung.

Das Ziel dieser Dissertation ist herauszufinden, ob zelluläre Substanzen auch bei UVB Anregung Singulett-Sauerstoff produzieren und damit die strikte Trennung zwischen UVA und UVB Effekten in der Haut gerechtfertigt ist. UVB Strahlung könnte neben den direkten DNS Schäden durch endogene Photosensibilisatoren zusätzlich indirekte biologische Schäden auslösen durch die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff. Die Singulett-Sauerstoff Generierung durch endogene Substanzen in Lösungsmitteln bei UVB Anregung soll nachgewiesen und quantifiziert werden. Dazu wird die Singulett-Sauerstoff Quantenausbeute der identifizierten Photosensibilisatoren bestimmt und mit der Quantenausbeute für UVA Anregung verglichen. Die photophysikalischen Eigenschaften einer Substanz ändern sich, sobald das Molekül seine Struktur ändert. Bei UVB Bestrahlung können Moleküle direkt durch die Absorption der Strahlung oder durch Reaktionen mit anderen Molekülen z.B. Sauerstoff verändert werden. Darum wird die Photostabilität der identifizierten Photosensibilisatoren untersucht und für nicht photostabile Substanzen sollen mögliche Veränderungen ihrer photophysikalischen Eigenschaften bestimmt werden. Dies kann erste Rückschlüsse auf die Wechselwirkung von UVB und UVA Strahlung im Sonnenlicht und deren Auswirkungen geben. In der Dissertation sollen nicht nur endogene, sondern auch exogene Substanzen, die sich in der menschlichen Haut befinden können, wie Medikamente oder Bestandteile von Hautpflegeprodukten untersucht werden. Da die Umgebung eines Photosensibilisators sich auf seine Fähigkeit Singulett-Sauerstoff zu generieren auswirkt, wird zunächst die Singulett-Sauerstoff Generierung in Suspensionen mit Zellbestandteilen, prokaryotischen und eukaryotischen Zellen bei UVB Anregung untersucht. Abschließend soll Singulett-Sauerstoff Generierung in Hautpräparaten nachgewiesen werden.

4. Material und Methoden

4.1. Verwendete Substanzen

4.1.1. Referenzphotosensibilisatoren

Zum Kalibrieren der Messaufbauten werden bekannte Photosensibilisatoren verwendet, deren Eigenschaften und 1O_2 Quantenausbeuten schon untersucht und bekannt sind. Sie werden außerdem benötigt, um die 1O_2 Quantenausbeute der untersuchten endogenen Substanzen indirekt zu ermitteln.

Perinaphthenon (PN)

PN ist ein a,b-ungesättigtes Keton, das aus drei aromatischen Ringen besteht. Die molekulare Struktur von PN (Abbildung 4.1) lässt sich durch die Summenformel $C_{13}H_8O$ beschreiben. PN ist nahezu unpolar und seine molare Masse beträgt $180,21 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Bei PN ist vom niedrigsten S_1 -Zustand ($n\pi^*$) durch ISC sowohl der T_2 ($n\pi^*$) als auch der niedrigste Triplett-Zustand T_1 ($\pi\pi^*$) erreichbar, wobei der S_1 nach T_1 Prozess dominiert [DDS⁺09]. Der T_1 Zustand von PN liegt energetisch bei $186 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (1,92 eV) und hat eine Triplett Ausbeute von etwa eins [FN01]. Dies ist eine Erklärung für die hohe 1O_2 Quantenausbeute von PN, welche in Ethanol $0,93 \pm 0,08$ [MJC⁺96] beträgt und in den meisten anderen Lösungsmitteln etwa 0,95 [FN01]. Außerdem ist PN ein schlechter Quencher von 1O_2 [STDW94]. Damit ist es ein sehr effizienter Photosensibilisator und wurde deshalb als Referenzfarbstoff in Ethanol verwendet, da PN gut in Ethanol löslich ist. Es wurde von Acros Organic (Belgien) mit einer Reinheit von 97 % bezogen.

sulfoniertes Perinaphthenon (PNS)

PNS besteht aus drei aromatischen Ringen und kann durch Sulfonation von PN abgeleitet werden. PNS löst sich sowohl in H_2O wie auch in D_2O und hat eine molare Masse von $260,27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Die Struktur von PNS, die durch die Summenformel $C_{13}H_8O_4S$ beschrieben werden kann, ist in Abbildung 4.1 dargestellt. PNS hat wie

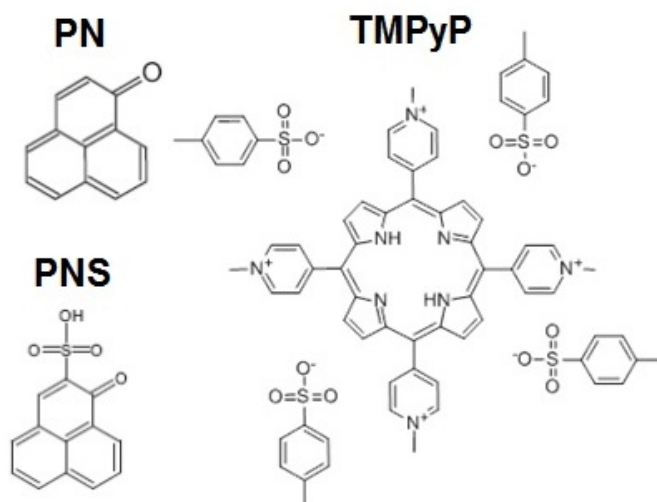


Abbildung 4.1.: molekulare Struktur der Referenz-Photosensitizer

PN zwei Triplett-Zustände, die energetisch unter dem S_1 -Zustand liegen, was zu einer Effektivität von nahezu 100 % bei der Besetzung des Triplet-Zustands führt [NGT93]. PNS ist ein sehr effizienter und häufig untersuchter Photosensibilisator, dessen 1O_2 Quantenausbeute in H_2O zu 0.97 ± 0.06 [MJC⁺96] und in D_2O zu ungefähr eins [Oli91] bestimmt wurde. PNS wurde vom Institut für Chemie der Universität Regensburg (Lehrstuhl Prof. König) mit einer Reinheit von mindestens 95 % synthetisiert.

5,10,15,20-Tetrakis(1-methyl-4-pyridino)-porphyrin tetra-(p-toluenesulfonate) (TMPyP)

TMPyP (Abbildung 4.1), das durch die Summenformel $C_{72}H_{66}N_8O_{12}S_4$ beschrieben werden kann, hat ein Molekulargewicht von $1363,63 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Das Grundgerüst von TMPyP ist ein Porphin-Ring, der aus 4 Pyrrol-Ringen gebildet wird, die über Methinbrücken miteinander verknüpft sind. So entsteht ein stabiles, planares Molekül, das über ein ausgedehntes konjugiertes π -Elektronensystem verfügt, das für die intensive Färbung verantwortlich ist [Loi06]. Der Porphin-Ring ist somit die farbgebende Komponente in TMPyP und auch in vielen Naturfarbstoffen wie Hämoglobin und Chlorophyll [Mor96]. An den Porphin-Ring sind 4 Pyridin-Ringe mit einem positiv geladenen Stickstoff-Atom kovalent gebunden. Außerdem sind 4 Toluensulfonate, die negativ geladen sind, an die Pyridin-Ringe gebunden, so dass TMPyP neutral ist. TMPyP löst sich in Wasser, D_2O und Ethanol und die 1O_2 Quantenausbeute in H_2O ist $0,77 \pm 0.04$ [BML⁺07]. Es wurde mit einer Reinheit von 97 % von Sigma-Aldrich (Deutschland) bezogen. nares Molekül, das über ein ausgedehntes konjugiertes π -Elektronensystem verfügt, das für die intensive Färbung verantwort-

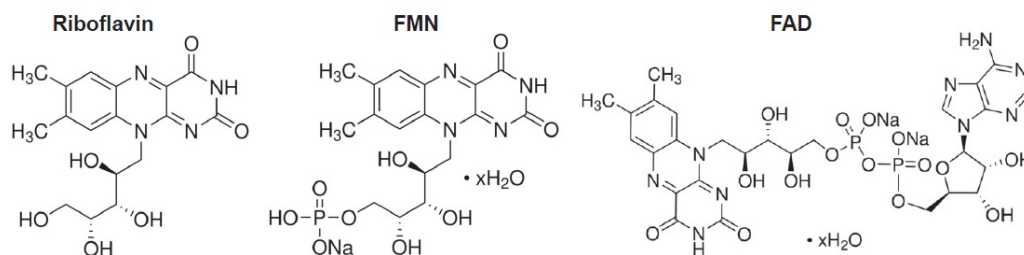


Abbildung 4.2.: molekulare Struktur der untersuchten Flavine

lich ist [Loi06]. Der Porphin-Ring ist somit die farbgebende Komponente in TMPyP und auch in vielen Naturfarbstoffen wie Hämoglobin und Chlorophyll [Mor96]. An den Porphin-Ring sind 4 Pyridin-Ringe mit einem positiv geladenen Stickstoff-Atom kovalent gebunden. Außerdem sind 4 Toluensulfonate, die negativ geladen sind, an die Pyridin-Ringe gebunden, so dass TMPyP neutral ist. TMPyP löst sich in Wasser, D_2O und Ethanol und die 1O_2 Quantenausbeute in H_2O ist $0,77 \pm 0,04$ [BML⁺07]. Es wurde mit einer Reinheit von 97 % von Sigma-Aldrich (Deutschland) bezogen.

4.1.2. Endogene Substanzen

4.1.2.1. wasserlösliche Vitamine

Riboflavin

Flavine sind eine Gruppe natürlicher gelber Farbstoffe, denen das Ringsystem des Isoalloxazin, bestehend aus drei organischen Ringen, zu Grunde liegt. Die verschiedenen Flavine unterscheiden sich durch den Rest, der sich am mittleren organischen Ring am Stickstoffatom (N) befindet. Riboflavin hat eine C5-Ribityl-Kette als am Stickstoffatom ankoppelnden Rest [Kar94]. Riboflavin, das zum Vitamin-B-Komplex (Vitamin B_2) gehört, ist in den prosthetischen Gruppen der Flavoproteine enthalten, denn es dient als Vorstufe für die Flavin-Koenzyme FAD und FMN. Man findet es in Hautzellen, da Flavoproteine sowohl in der Plasmamembran als auch in den Mitochondrien der Zellen vorkommen [WJJ05]. Die Herstellerdaten von Riboflavin (Struktur in Abbildung 4.2) sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Riboflavin ist löslich in H_2O ($65 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) und D_2O . Es kann 1O_2 erzeugen [JCP87], [HKM06] und seine 1O_2 Quantenausbeute in H_2O bei UVA-Anregung (355 nm) ist $0,54 \pm 0,07$ [Bai05].

Flavin-Mononukleotid (FMN)

FMN oder Riboflavin-5'-phosphat (Abbildung 4.2) ist die phosphorylierte Form von Riboflavin und gehört zu den Koenzymen [CJ05]. Es ist Teil der Flavoproteine, zum Beispiel von NADH-Dehydrogenase, das eines der wichtigsten Flavoproteine der Atmungskette der Zelle ist. FMN und FAD dienen also als Elektronenüberträger, die reversibel oxidiert und reduziert werden können. Die Herstellerdaten von FMN sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die $^1\text{O}_2$ Quantenausbeute von FMN in H_2O bei UVA-Anregung (355 nm) ist $0,51 \pm 0,07$ [Bai05]. FMN ist gut H_2O ($92 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) und D_2O löslich.

Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)

FAD ist ein Kondensationsprodukt von FMN und AMP (Adenosinmonophosphat) [CJ05] und kann somit auch von Riboflavin abgeleitet werden. Im menschlichen Körper enthalten die meisten Flavoproteine FAD (nicht FMN) [Kar94], das für den Elektronentransport zuständig ist. Die Herstellerdaten von FAD (Struktur in Abbildung 4.2) sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. FAD ist gut löslich in H_2O ($5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) und D_2O und seine $^1\text{O}_2$ Quantenausbeute in H_2O bei UVA-Anregung (355 nm) ist $0,07 \pm 0,01$ [Bai05].

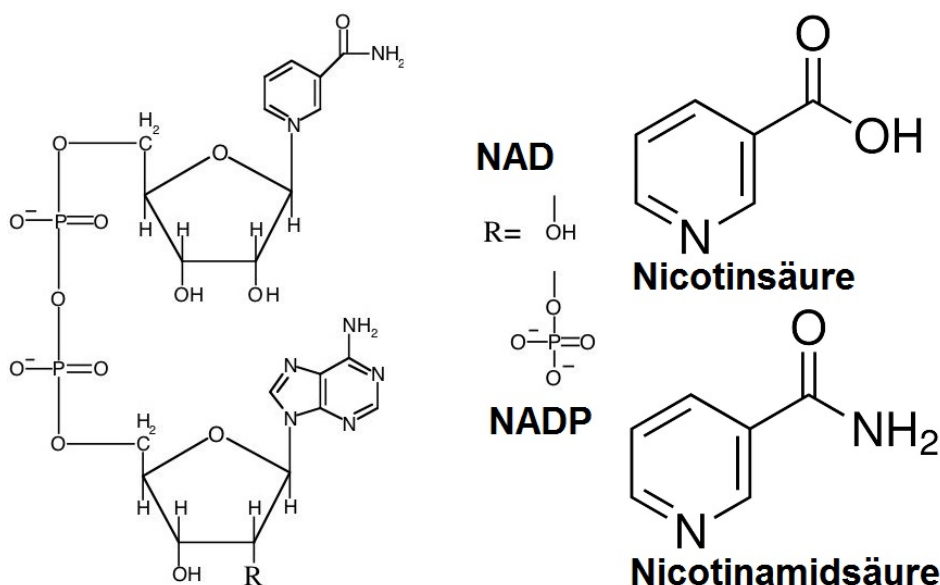


Abbildung 4.3.: molekulare Struktur von Niacin und ihrer biologisch wirksamen Formen NAD und NADP

Niacin (Nicotinsäure und Nicotinamidsäure)

Nicotinamidsäure und Nicotinsäure werden als Niacin zusammengefasst und gehören zu den Vitaminen (Vitamin B_3) [CJ05]. Chemisch handelt es sich um einfache

Pyridin-Derivate [Kar94]. Die biologisch wirksame Form sind die wasserstoffübertragenden Koenzyme NAD^+ und $NADP^+$ [Löf08]. Niacin kommt natürlich in Cerealien, Fleisch und Milch vor [CJ05] und ein Mangel von Niacin äußert sich in der Hautkrankheit Pellagra (Dermatitis, Dementia) [Geh04]. Nicotinsäure kann sich in Nicotinamidsäure umwandeln und umgekehrt [Geh04] und beide können aus Tryptophan synthetisiert werden. 50 % des Niacin Bedarfes wird durch Tryptophan in der Leber produziert und nur die restlichen 50 % müssen durch die Nahrung aufgenommen werden [Dam].

Nicotinsäure ist chemisch gesehen eine heterozyklische Carbonsäure mit einem pK_a von 4,9 [NKS05] und besteht aus einem Pyridinring, der mit einer Carboxygruppe (COOH) substituiert ist. Nicotinsäure (Abbildung 4.3) wurde mit einer Reinheit von 98 % vom Institut für Chemie der Universität Regensburg (Lehrstuhl Prof. König) synthetisiert.

Nicotinamidsäure ist das Amid der Nicotinsäure. Es ist in der Lage oxidative Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies zu verhindern, indem es die Oxidation sowohl von Lipiden wie auch von Proteinen verhindert [KD99]. Es ist somit ein bekannter Antioxidant und ebenfalls ein effizienter 1O_2 Quencher. Die Reaktionsrate von Nicotinamid und 1O_2 beträgt $1,8 \cdot 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [KD96]. Nicotinamidsäure (Abbildung 4.3) wurde vom Institut für Chemie der Universität Regensburg mit einer Reinheit von 98 % synthetisiert.

Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD)

NAD kann im Körper aus dem Vitamin B_3 (Niacin) gebildet werden [Geh04]. In NAD ist der Pyridin-Ring von Nicotinamidsäure mit Ribose verknüpft und diese wiederum über eine Diphosphorsäure mit Adenosin [Kar94], so dass sich die Struktur aus Abbildung 4.3 ergibt. Wegen der positiven Ladung, die der Pyridin-Ring trägt, wird die oxidierte Form von NAD oft auch mit NAD^+ abgekürzt [Kar94]. NAD ist ein Wasserstoff transportierendes Koenzym, das an zahlreichen Redoxreaktionen des Stoffwechsels der Zelle beteiligt ist. Dabei dient NAD^+ dem Organismus meist als Oxidationsmittel und wird dabei selbst reduziert zu NADH. NADH, dient als Wasserstofflieferant in der Atmungskette der Zellen, wo es oxidiert wird, um ATP (Energieeinheiten der Zellversorgung) zu erzeugen [Ehl07]. Die Herstellerdaten von NAD (Struktur in Abbildung 4.3) sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. NAD ist gut in H_2O und D_2O löslich, doch für UVA-Bestrahlung in H_2O ließ sich keine 1O_2 Erzeugung nachweisen [Bai05].

Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP)

NADP (Abbildung 4.3) ist auch ein Wasserstoff transportierendes Koenzym, das

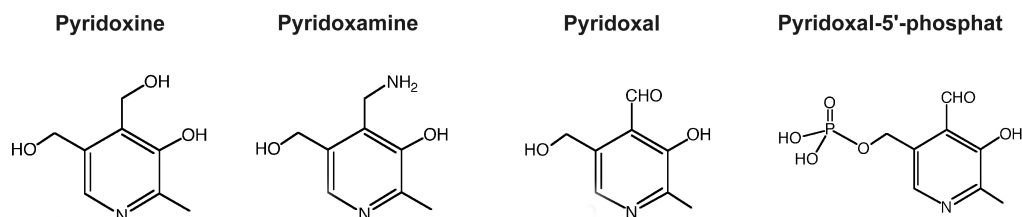


Abbildung 4.4.: molekulare Struktur der verschiedenen untersuchten Vitamine aus der B₆-Gruppe

aus Vitamin B₃ gebildet werden kann und aus NAD durch Phosphorylation entsteht [Geh04]. Im Gegensatz zum NAD hat NADP einen dritten Phosphorsäure-Rest am Adenosin des Dinucleoids [Kar94]. NADP dient dem Organismus hauptsächlich als Reduktionsmittel, d.h. es kommt meist in seiner reduzierten Form NADPH vor und wird durch die Abgabe von zwei Elektronen und einem Proton zu $NADP^+$ oxidiert. So dient NADPH als Wasserstofflieferant in der Biosynthese, d.h. bei der Erzeugung von z.B. Aminosäuren oder Nukleinsäuren [Ehl07]. Die Herstellerdaten von NADP sind in Tabelle 4.1 dargestellt. NADP ist gut in H_2O und D_2O löslich, doch für UVA-Bestrahlung in H_2O ließ sich keine 1O_2 Erzeugung nachweisen [Ehl07].

Vitamin B₆

Vitamin B₆ ist der Sammelbegriff für drei sehr ähnliche chemische Verbindung Pyridoxol/Pyridoxin (Alkohol), Pyridoxal (Aldehyd) und Pyridoxamin (Amin). Die Stoffe können vom Stoffwechsel ineinander überführt werden und besitzen dieselbe biologische Aktivität. Die drei Stoffe unterscheiden sich dabei durch ihren Substituent an Position 4, der bei Pyridoxin CH_2OH , bei Pyridoxamin CH_2NH_2 und bei Pyridoxal CHO ist [WJJ05]. Die molekulare Struktur der Moleküle ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Vitamin B₆ ist in der Haut vorhanden und ein Mangel äußert sich in Hautveränderungen wie Dermatitis [CJ05] und eine Überdosis Vitamin B₆ kann Photosensitivität der Haut auslösen [WJJ05]. Vitamin B₆ kann durch 1O_2 abgebaut werden, wodurch Vitamin B₆ ein effektiver 1O_2 Quencher ist [BLE⁺00]. Vitamin B₆ ist nachweislich in der Lage 1O_2 bei Anregung im UVA-Bereich (355 nm) zu generieren, wobei Pyridoxin eine Quantenausbeute von $0,28 \pm 0,04$, Pyridoxamin von $0,06 \pm 0,02$ und Pyridoxal von $0,44 \pm 0,06$ hat [DKK95]. In dieser Arbeit wurden Pyridoxin (PYR), Pyridoxinhydrochlorid (PYR-HCL), Pyridoxalhydrochlorid (PYRXAL-HCL) und Pyridoxaminedihydrate (PYRINE-DHCL) untersucht. Die Herstellerdaten sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Pyridoxin, Pyridoxamin und Pyridoxal sind die Vorstufen für die Wirkungsform Pyridoxal-5'-phosphat (PYR-5-P) [CJ05]. PYR-5-P ist die aktive Form von Vitamin

B_6 , die als prothetische Gruppe von mehr als 50 Pyridoxal-Enzymen, die in die Synthese und den Stoffwechsel von Aminosäuren involviert sind, wirkt [DKK94]. PYR-5-P wirkt als Koenzym im Aminosäurestoffwechsel beispielsweise bei der Transaminierung, der Decarboxylierung und der Eliminierung [CJ05], [Löf08]. PYR-5-P kann auf der einen Seite durch 1O_2 abgebaut werden (1O_2 Quencher) [BLE⁺00], aber generiert auch 1O_2 bei UVA-Anregung bei 355 nm mit einer Quantenausbeute von $0,56 \pm 0,07$ [DKK94]. Die Herstellerdaten vom untersuchten Pyridoxal-5'-phosphathydrat (PYR-5-PH) sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Name	molekulare Formel	Reinheit [%]	molekulare Masse [$g \cdot mol^{-1}$]	Firma
Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	99	376.37	Sigma Aldrich
FMN	$C_{17}H_{20}N_4NaO_9P$	85	478.33	Sigma Aldrich
FAD	$C_{27}H_{31}N_9O_{15}P_2NA_2$	95	829.5	Sigma Aldrich
PYR	$C_8H_{11}NO_3$	98	169.18	Sigma Aldrich
PYR-HCL	$C_8H_{11}NO_3$ $*HCl$	cell culture	205.64	Sigma Aldrich
PYR-5-PH	$C_8H_{10}NO_6P$ $*H_2O$	cell culture	247.14	Sigma Aldrich
PYRINE-DHCL	$C_8H_{12}N_2O_2$ $*2HCl$	cell culture	241.11	Sigma Aldrich
PYRXAL-HCL	$C_8H_9NO_3 * HCl$	99	203.62	Sigma Aldrich
Nicotin-säure	$C_6H_5NO_2$	98	123.11	Department of Chemistry
Nicotin-amidsäure	$C_6H_6N_2O$	98	122.12	Department of Chemistry
NAD	$C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$ xH_2O	96.5	663.43	Sigma Aldrich
NADP	$C_{21}H_{28}N_7O_{17}P_3$ xH_2O	96	743.41	Sigma Aldrich

Tabelle 4.1.: Übersicht über die untersuchten wasserlöslichen Vitamine

4.1.2.2. fettlösliche Vitamine

Vitamin A

Vitamin A bezeichnet mehrere chemische Verbindungen, die dieselbe biologische Funktion haben. Vitamin A umfasst Retinol, Retinal und Retinsäure, die durch

enzymatisch katalysierte Reaktionen ineinander überführt werden können [CJ05]. Vitamin A kann durch tierische Nahrungsmittel wie Leber oder Eigelb aufgenommen werden [CJ05]. Außerdem können Carotine (Provitamin A), die in pflanzlicher Nahrung vorkommen, in Vitamin A umgewandelt werden [PKQS99]. Vitamin A ist im menschlichen Körper verantwortlich für Wachstum, Funktion und Aufbau von Haut und Schleimhäuten, sowie für den Sehvorgang. In der Haut beeinflusst Vitamin A den epidermalen Zellwachstum, die epidermale Differentiation und die Versorgung der Zellen [FXY+07]. Retinal ist außerdem ein Bestandteil vom Sehpurpur (Sehpigment in der menschlichen Netzhaut), das ein Protein aus Opsin und 11-cis-Retinal ist [Löf08]. Bei Lichteinfall wird 11-cis-Retinal in All-trans-Retinal umgewandelt, das sich dann in der Retina sammelt [RHBR12]. Ein Mangel an Vitamin A kann unter anderem zur Nachtblindheit und Schäden an der Augenhornhaut führen [CJ05]. In dieser Arbeit wurde All-trans-Retinal (Vitamin A) untersucht. All-trans-Retinal kann durch die Bestrahlung mit sichtbarem Licht abgebaut werden und es kommt zu Photoabbauprodukten mit einem Absorptionsmaximum im UVA Bereich [RHBR12]. Außerdem kann all-trans-Retinal bei UVA Anregung 1O_2 erzeugen und in der Literatur wurden Werte für die 1O_2 Quantenausbeute von $0,31 \pm 0,02$ [RHBR12] und von 5 % [RG99], [FXY+07] veröffentlicht. Die Herstellerdaten von all-trans-Retinal (Abbildung 4.5) sind in Tabelle 4.2 aufgelistet.

Vitamin D

Vitamin D ist eine Gruppe von fettlöslichen Prohormonen, die von Steroiden abstammen [FBB⁺12]. Im Menschen sind die Hauptvertreter Vitamin D_3 (Cholecalciferol) und Vitamin D_2 (Ergocalciferol). Cholecalciferol und Ergosterol werden auch unter dem Begriff Calciferol zusammengefasst [CJ05]. Vitamin D ist eigentlich kein Vitamin, da es nicht über die Nahrung aufgenommen werden muss, sondern in ausreichenden Mengen im menschlichen Körper synthetisiert werden kann, wenn dieser genügend Sonnenlicht bekommt. Ein Mangel an Vitamin D kann bei Kindern zu Rachitis und außerdem zu Osteoporose, erhöhter Entzündungsgefahr und zu einem geschwächten Immunsystem führen [FBB⁺12] [Löf08]. Vitamin D ist wichtig für die Mineralisierung der Knochen, es reguliert den Kalziumgehalt im Blut und modelliert das Immunsystem [ELL⁺12].

Ergocalciferol (Vitamin D_2) kann aus dem Steroid Ergosterol durch UVB Bestrahlung gewonnen werden [Löf08]. Dementsprechend findet die Produktion von Ergocalciferol in der Haut statt, die der Sonnenstrahlung ausgesetzt ist [FBB⁺12]. Es wird im Körper in die aktive Form Calcitriol umgewandelt. Die Herstellerdaten von Ergocalciferol (Abbildung 4.5) sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

Cholecalciferol (Vitamin D_3) wird durch UVB Bestrahlung der menschlichen Haut gewonnen. In der menschlichen Haut ist genügend 7-Dehydrocholesterol vorhanden,

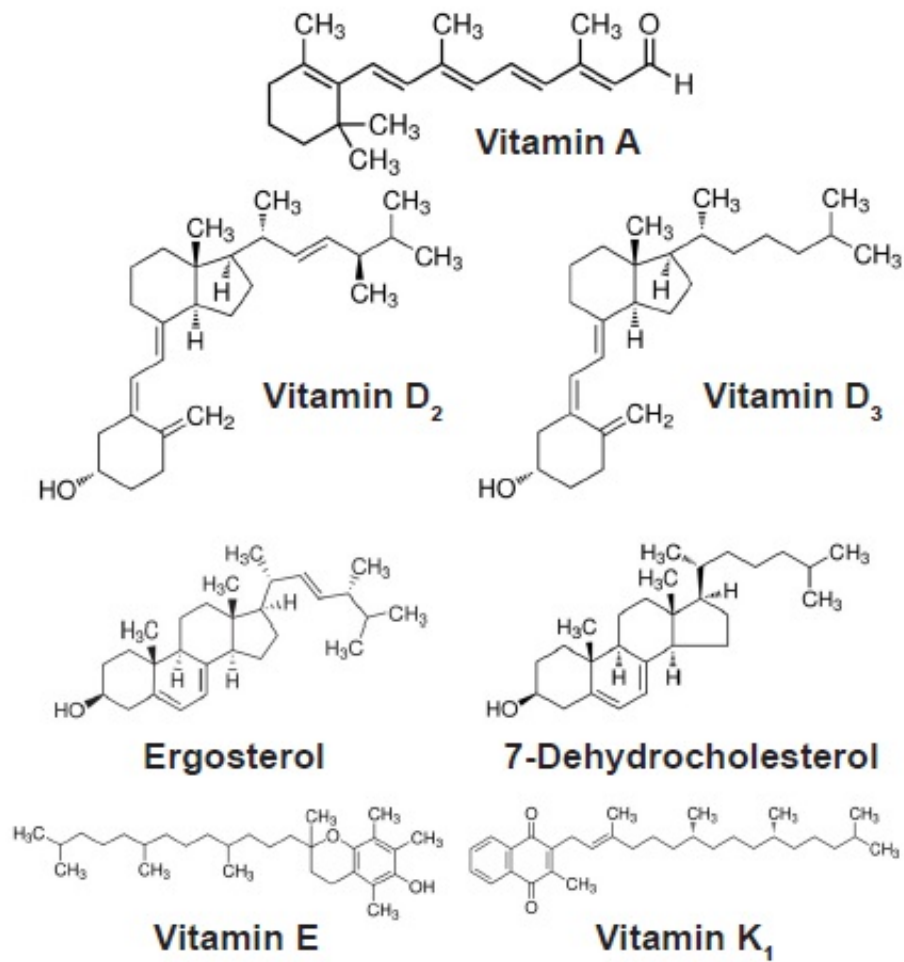


Abbildung 4.5.: Struktur der verschiedenen fettlöslichen Vitamine

dessen Steranskelett durch UVB Strahlung aufgebrochen wird und durch eine weitere Isomerisation entsteht Vitamin D_3 [Löf08]. Danach wird Vitamin D_3 weiter verstoffwechselt in seine aktive Form [Löf08]. Vitamin D_3 wird nicht wie lange angenommen nur von Tieren synthetisiert, sondern auch Pflanzen sind in der Lage Vitamin D_3 zu synthetisieren [FBB⁺12]. Die Herstellerdaten von Cholecalciferol (Abbildung 4.5) sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

7-Dehydrocholesterol ist Bestandteil der tierischen und menschlichen Haut und die Vorstufe von Cholecalciferol (Vitamin D_3) [FBB⁺12]. Es befindet sich hauptsächlich in der Stratum basale und Stratum Spinosum der Epidermis. Durch UVB Strahlung wird der B-Ring des Steranskelett von 7-Dehydrocholesterol aufgebrochen und schlussendlich entsteht Vitamin D_3 [Löf08]. 7-Dehydrocholesterol (Struktur: Abbildung 4.5, Herstellerdaten: Tabelle 4.2) hat dieselbe Summenformel und molare Masse wie Cholecalciferol.

Ergosterol Ergosterol ist ein Steroid und kann durch UVB Strahlung in Ergocalciferol (Vitamin D_2) umgewandelt werden [Löf08]. Ergosterol (Struktur: Abbildung 4.5, Herstellerdaten: Tabelle 4.2) hat dieselbe Summenformel und molare Masse wie Ergocalciferol.

Name	molekulare Formel	Reinheit [%]	molekulare Masse [$g \cdot mol^{-1}$]	Firma
Retinal all trans	$C_{20}H_{28}O$	98	284,44	Sigma Aldrich
Ergocalciferol	$C_{28}H_{44}O$	98	396,65	Sigma Aldrich
Cholecalciferol	$C_{27}H_{44}O$	98	384,64	Sigma Aldrich
Alpha-tocopherol	$C_{29}H_{50}O_2$	98	430,72	Sigma Aldrich
Vitamin K_1	$C_{31}H_{46}O_2$	99	450,7	Sigma Aldrich
Ergosterol	$C_{28}H_{44}O$	95	396,65	Sigma Aldrich
7-Dehydrocholesterol	$C_{27}H_{44}O$	98	384,64	Sigma Aldrich

Tabelle 4.2.: Übersicht über die untersuchten fettlöslichen Vitamine

Vitamin E

Vitamin E ist ein Oberbegriff für acht verschiedene fettlösliche Substanzen, die eingeteilt werden können in Tocopherole und Tocotrienole, die jeweils in einer α -, β -, γ -, δ -Form vorkommen [Nik13]. Das in der menschlichen Haut am häufigsten vorkommende Vitamin E ist α -Tocopherol, das z.B. zehnmal häufiger ist als γ -Tocopherol [TEM07]. Wenn in dieser Arbeit Vitamin E erwähnt wird, ist α -Tocopherol (Struktur: Abbildung 4.5, Herstellerdaten: Tabelle 4.2) gemeint. Vitamin E kann nicht

im menschlichen Körper synthetisiert werden, sondern muss mit der Nahrung aufgenommen werden, wobei es sich in Ölen, Gemüse und Nüssen befindet [TEM07]. Im menschlichen Körper sammelt sich Vitamin E in den Lipiddoppelschichten von Membranen an [CJ05]. Seine Hauptaufgabe ist die eines kettenbrechenden Antioxidants [WKR⁺03]. α -Tocopherol reagiert mit Radikalen wie Peroxid-Radikalen oder 1O_2 , wodurch die Radikalkette unterbrochen wird und so die Lipide in den Membranen geschützt werden [SS95]. Um Membranlipide vor Radikalen zu schützen, genügt ein Vitamin E Molekül auf 1000 Membranlipidmoleküle [CJ05]. In der menschlichen Haut ist die Vitamin E Konzentration in der Epidermis mit $31 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ dreimal so hoch wie in der Dermis ($12,2 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$) [TEM07]. Wobei der Vitamin E Gehalt der Haut von der Hautstelle, an der gemessen wird, abhängt und durch topisch aufgetragenes Vitamin E, z.B. in Creme, erhöht werden kann [RZ99]. Die höchste Vitamin E Konzentration in der Epidermis ist in der unteren Stratum Corneum mit $76 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ und die geringste Vitamin E Konzentration ist mit $6,5 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ in der obersten Schicht der Stratum Corneum [TTP98]. Durch die Bestrahlung mit UV Strahlung kann die Vitamin E Konzentration in der Haut um bis zu 50 % abgebaut werden, wobei Vitamin E direkt durch UV-Strahlung (Absorptionsmaximum bei 290 nm) oder indirekt durch Reaktionen mit ROS und 1O_2 abgebaut werden kann [TEM07], [TTP98]. 1O_2 kann also durch Vitamin E gequenchet werden, sowohl chemisch als auch physikalisch. Dabei dominiert das physikalische Quenchen von 1O_2 und Vitamin E hat ein Quenchrates von $280 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, während das chemische Quenchen zu Oxidationsprodukten wie Tocopheryl Quinon führt [KDMMS90]. Aber Vitamin E kann bei einer Anregung im UVB Bereich (308 nm) auch 1O_2 generieren mit einer 1O_2 Quantenausbeute von $0,17 \pm 0,025$ in Methanol [DBCP06].

Vitamin K_1

Der Bedarf an Vitamin K_1 (Struktur: Abbildung 4.5, Herstellerdaten: Tabelle 4.2) kann zu 50 % aus Eigenproduktion im Darm gedeckt werden, die anderen 50 % müssen über die Nahrung, vor allem durch grünes Gemüse, aufgenommen werden [CJ05]. Vitamin K_1 existiert in Z und E Isomeren, wobei in den meisten Lösungsmitteln die Z Isomere überwiegen [HHKW03]. Vitamin K_1 kann durch UV-Bestrahlung photooxidiert werden und Photoprodukte sind beispielsweise 1,3-Quinon Methide [HHKW03].

4.1.3. Medikamente

Tetracyclin

Tetracyclin gehört zu den Tetracyclinen, eine Gruppe von Breitband-Antibiotika,

denen dasselbe 4-Ring-System zugrunde liegt. Tetracyclin kann zur Bekämpfung von grampositiven, gramnegativen und zellwandlosen Bakterien verwendet werden und wird therapeutisch hauptsächlich bei Infektionen der Atemwege, der Harnorgane und bei Akne verwendet. Eine der wichtigsten Nebenwirkungen ist, dass Tetracyclin bei einer Bestrahlung im UVA Bereich phototoxisch sein kann [SS07]. Außerdem kann Tetracyclin 1O_2 bei UVA Anregung generieren [PMR⁺02]. Die molekulare Struktur von Tetracyclin ist in Abbildung 4.6 dargestellt und die Herstellerangaben sind in Tabelle 4.3 aufgelistet.

Name	molekulare Formel	Reinheit [%]	molekulare Masse [g/mol]	Firma
Tetracyclin	$C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot H_2O$	98	444.43	Sigma Aldrich
Doxycyclin hyclate	$C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl \cdot 0.5H_2O \cdot 0.5C_2H_6O$	98	512.94	Sigma Aldrich
Norfloxacin	$C_{16}H_{18}FN_3O_3$	98	319.33	Sigma Aldrich
Enoxacin	$C_{15}H_{17}FN_4O_3$	95	320.32	Sigma Aldrich
Levofloxacin	$C_{18}H_{20}FN_3O_4$	98	361.37	Sigma Aldrich
Azathioprin	$C_9HN_7O_2S$	98	277.26	Sigma Aldrich
6 Thioguanin	$C_5H_5N_5S$	98	167.19	Sigma Aldrich

Tabelle 4.3.: Übersicht über die untersuchten Medikamente

Doxycycline hyclate

Doxycycline (Struktur: Abbildung 4.6) gehört zu den Tetracyclinen und ist ein Breitband-Antibiotikum für Mensch und Tier [MSG⁺98]. Doxycycline wird zum Beispiel zur Behandlung von Atemwegserkrankungen, Infektionen des Magen-Darm-Trakts, Dermatitis periorale sowie Akne benutzt. Außerdem wird es zur Malaria-Prophylaxe eingesetzt. Doxycycline kann als Nebenwirkung phototoxisch sein, wobei sich bei 3 % aller Patienten mit einer Dosis von $100 \text{ mg} \cdot \text{Tag}^{-1}$ eine Phototoxizität entwickelt [SS07]. Das Doxycycline 1O_2 produzieren kann, wurde schon indirekt nachgewiesen [GS].

Norfloxacin

Norfloxacin (Struktur: Abbildung 4.6) ist ein Breitband-Antibiotikum aus der Familie der Fluorchinolone, das hauptsächlich zur Therapie von Harnwegsinfektionen verwendet wird. Norfloxacin wurde 1980 synthetisiert, wobei das Fluor-Atom an Position 6 die Potenz von Norfloxacin gegen gram-negative Bakterien verbesserte [ME09]. Als Nebenwirkung verursacht es Lichtempfindlichkeit. Die Phototoxizität von Norfloxacin wird verknüpft mit DNS-Schäden durch ROS, insbesondere durch 1O_2 [ME09]. Norfloxacin kann 1O_2 generieren mit einer Quantenausbeute von 0,081

in Deuterium Oxid Phosphat Buffer Lösung [MSC98].

Enoxacin

Enoxacin (Struktur: Abbildung 4.6) ist ein Breitband-Antibiotikum der Fluorchinolon-Familie, das gegen Harnwegsinfektionen verwendet wurde, aber inzwischen auf dem US-Markt nicht mehr erhältlich ist. Eine Nebenwirkung von Enoxacin ist Phototoxizität, die in Verbindung gebracht wird mit DNS-Schäden durch ROS [UAR⁺97]. Enoxacin kann sowohl 1O_2 als auch Superoxidanionen produzieren [UAR⁺97]. In Deuterium Oxid Phosphat Buffer Lösung hat Enoxacin eine 1O_2 Quantenausbeute von 0,061 [MSC98].

Levofloxacin

Levofloxacin (Struktur: Abbildung 4.6) ist ein Breitband-Antibiotikum der Fluorchinolon-Familie, das in Deutschland zum Beispiel bei bakteriellen Infektionen der Atemwege, des Magen-Darm-Trakts oder der Harnwege verwendet wird. Eine Nebenwirkung von Levofloxacin bei oraler Einnahme kann Lichtempfindlichkeit sein [SS07].

Azathioprin

Azathioprin (Struktur: Abbildung 4.6) gehört zu den Immunsuppressiva und unterdrückt das Immunsystem [MOR⁺07]. Es wird nach Organtransplantationen zur Vorbeugung gegen Abstoßungsreaktionen des Körpers und zur Behandlung verschiedener Erkrankungen, die mit einer Störung der Immunreaktion einhergehen (z.B. multiple Sklerose), verwendet. Es wird auch immer öfter bei entzündlichen Erkrankungen, wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verschrieben [Kar07]. Azathioprin-Patienten, also Langzeitüberlebende einer Organtransplantation bekommen häufig Hautkrebs [MOR⁺07] [OPZ⁺05]. Im menschlichen Körper wird Azathioprin umgewandelt in 6-Mercaptopurin, das dann verstoffwechselt wird zu 6-Thioguanin [ZZS⁺11]. Die DNA von mit Azathioprin behandelten Patienten enthält dementsprechend 6-Thioguanin, das Analogon der Guanin-Base, das besonders schnell oxidiert werden kann [DK09].

6-Thioguanin

6-Thioguanin (Struktur: Abbildung 4.6) ist ein Analogon der Nukleinbase Guanin und wird außerdem als Arzneistoff in der Chemotherapie zur Behandlung von Krebserkrankungen verwendet [ZZS⁺11]. Die Einnahme von 6-Thioguanin führt dazu, dass in der DNA Guanin-Basen durch 6-Thioguanin ersetzt werden. Auch die Einnahme von Azathioprin führt dazu, dass sich 6-Thioguanin anstatt von Guanin in der DNA befindet [DK09]. 6-Thioguanin kann im Gegensatz zu Guanin Strahlung

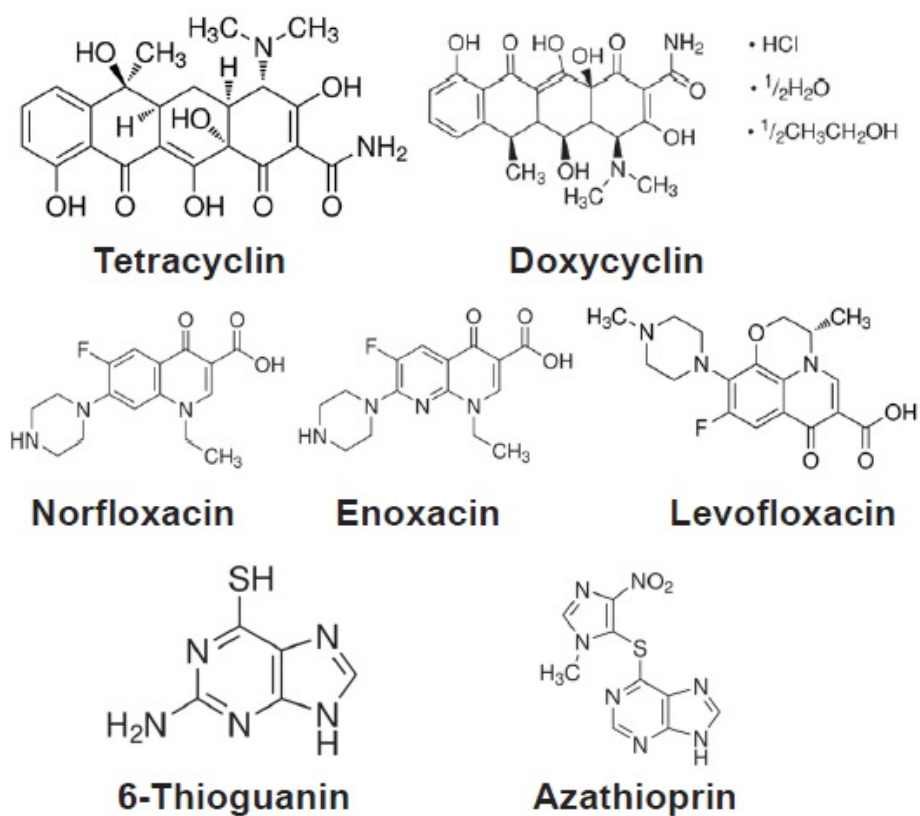


Abbildung 4.6.: Struktur der verschiedenen untersuchten Medikamente

im UVA Bereich absorbieren mit einem Absorptionsmaximum bei 342 nm [OPZ⁺05]. Außerdem wird 6-Thioguanin leicht oxidiert, zum Beispiel durch reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) [DK09]. Aber 6-Thioguanin kann auch als Photosensibilisator fungieren und ROS, insbesondere 1O_2 durch UVA Anregung erzeugen [ZZS⁺11].

4.1.4. Hautpflegeprodukte

Notation	Beschreibung
Creme1	Tagescreme mit Vitamin E und Kaktusfeige
Creme2	Q10 Anti-Falten Tagescreme
Creme3	Nachtcreme mit Olivenöl
Creme4	Hautpflegecreme
Creme5	Creme für Babys mit Mandelöl
Creme6	Q10 Anti-Falten Creme
Creme7	Cell Energy Tageselixier mit LSF 15
Creme8	Hautpflegecreme mit Traubenöl
Creme9	Tages- und Nachtcreme
Creme10	Basissalbe mit weißem Vaseline
Creme11	Weißes Vaseline
Creme12	Creme mit gelben Vaseline
Creme13	Pflegecreme mit Mandelöl und Glycerin
Sonnencreme1	Sonnencreme mit Karotin, LSF 6
Sonnencreme2	Markensonnencreme, LSF 20
Sonnencreme3	günstige Sonnencreme, LSF 20
Sonnencreme4	Anti-ageing Sonnencreme, LSF 20

Tabelle 4.4.: Übersicht über die untersuchten Hautpflegeprodukte

Es wurden auch verschiedene Hautpflegeprodukte (Cremes, Salben, Emulsionen und Sonnencremes) auf ihre Fähigkeit 1O_2 bei UVB-Anregung zu generieren, getestet. Hautpflegeprodukte werden gewöhnlich topisch angewendet und sollen dann in die Haut eindringen, wobei die gewünschte Eindringtiefe von der Wirkung des Hautpflegeprodukts abhängt. Anti-ageing Produkte beispielsweise haben als Wirkungsziele Keratinozyten in der Epidermis und Kollagen in der Dermis, weshalb sie bis in die Dermis der Haut penetrieren können müssen [PLR⁺12]. Die verschiedenen untersuchten Hautpflegeprodukte wurden durch eine Notation gekennzeichnet und in Tabelle 4.4 wurden sämtliche Notationen mit den dazugehörigen Beschreibungen des Hautpflegeprodukts aufgelistet.

4.1.5. Quencher

Als Quencher bezeichnet man eine Substanz, die angeregte Zustände in Molekülen wie z.B. Sauerstoff deaktivieren kann. Der Quencher geht dabei in einen elektronisch angeregten Zustand über, während das gequenchte Molekül in den Grundzustand übergeht. Ein 1O_2 Quencher kann den 1O_2 -Zustand von Sauerstoff deaktivieren, wodurch sich die 1O_2 Abklingdauer verkürzt. Dies kann als indirekter Nachweis für die tatsächliche Entstehung von 1O_2 verwendet werden. Mit einem Quencher ist in dieser Arbeit ein 1O_2 Quencher gemeint.

Natriumazid

Als wasserlöslicher Quencher wird in dieser Arbeit Natriumazid (NaN_3) verwendet, der eine molare Masse von $65,01 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ hat und von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) mit einer Reinheit von 99 % bezogen wird. In wässrigen Lösungsmitteln dissoziiert NaN_3 in ein Natrium-Kation Na^+ und in das für 1O_2 funktionelle N_3^- . NaN_3 kann sowohl in H_2O , D_2O als auch PBS gelöst werden. Es ist ein sehr effizienter Quencher und die Ratenkonstante für 1O_2 Quenchen in H_2O von NaN_3 beträgt $0,58 \text{ } \mu\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ [Kil01].

4.1.6. Siliziumdioxid

Bei verschiedenen Experimenten muss ausgeschlossen werden, dass Streustrahlung ein 1O_2 Lumineszenz ähnliches Signal erzeugt und zu Verwechselungen führt. Dafür werden Experimente mit bestrahlten Streukörpern in Lösungsmitteln durchgeführt. Als Streukörper wird Siliziumdioxid (SiO_2) verwendet. SiO_2 ist in stabiler, fester Form ein Mineral, das als Quarz bezeichnet wird und Hauptbestandteil von Sand ist. SiO_2 ist nur schwer löslich in wässrigen Lösungen und ist dadurch bei den durchgeführten Experimenten nicht gelöst. SiO_2 hat eine molekulare Masse von $60,08 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ und wird mit einer Reinheit von 99 % von Sigma Aldrich bezogen. Die einzelnen SiO_2 Partikel haben eine Größe zwischen 0,5 bis $10 \text{ } \mu\text{m}$, wobei 80 % der Partikel nur 1 bis $5 \text{ } \mu\text{m}$ groß sind. Da die Wellenlänge der zu streuenden Laserstrahlung im UV-Bereich liegt (280 - 400 nm), sind die Partikel Durchmesser in etwa in der Größenordnung der Wellenlänge oder größer. Es handelt sich also um Mie-Streuung, die hauptsächlich vorwärts gerichtet ist.

4.1.7. Lösungsmittel

Für viele Messungen werden die Substanzen in einem Lösungsmittel gelöst. Die wasserlöslichen Substanzen werden in D_2O , H_2O und PBS gelöst, während die fettlöslichen Substanzen in Ethanol gelöst werden.

Name	Abkürzung	Singulett-Sauerstoff Abklingdauer [μs]	Sauerstoffsättigung [μM]
Deuterium Oxid	D_2O	67 ± 3 [EKM ⁺ 02]	238 [Bai05]
Wasser	H_2O	$3,5 \pm 0,5$ [Bai05]	270 [Bai05]
Ethanol	EtOH	14 ± 2 [Bai05]	1850 [Bai05]

Tabelle 4.5.: Übersicht über die verschiedenen, verwendeten Lösungsmittel

Deuteriumoxid

Deuteriumoxid (D_2O) oder schweres Wasser hat eine molekulare Masse von $20.029 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Alle untersuchten wasserlöslichen Substanzen konnten in D_2O gelöst werden. Die 1O_2 Abklingdauer in D_2O beträgt $66 \mu s$ [Ogi83] bzw. $67 \pm 3 \mu s$ [EKM⁺02] und ist damit länger als in H_2O . Die Sauerstoffsättigung in D_2O kann abgeschätzt werden, da sie 88 % der Sauerstoffsättigung von H_2O entspricht und damit bei $238 \mu M$ liegt [Bai05]. Der pD-Wert von D_2O bei 25°Celsius entspricht 7,43. Bei Messungen mit dem XeCl-Excimer Laser sind die Lumineszenz Signale sehr schwach, weshalb D_2O anstatt von H_2O als Lösungsmittel verwendet wird, denn die zeitlich längeren Signale können besser ausgewertet werden.

Wasser

Wasser (H_2O) hat eine molekulare Masse von $18,0153 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Die 1O_2 Abklingdauer in H_2O ist $3,5 \pm 0,5 \mu s$ [Bai05] und damit kürzer als in D_2O . Um zeitlich aufgelöste 1O_2 Signale in H_2O zu detektieren, müssen die Messungen also besonders präzise sein. In unseren Experimenten gehen wir bei luftgesättigten H_2O Lösungen bei Raumtemperatur (20°C) von einer Sauerstoffsättigung von $270 \mu M = 100\%$ aus. Der pH-Wert von reinem Wasser bei 25°Celsius entspricht 7.

Ethanol

Ethanol (EtOH) ist bekannt als der Alkohol, welcher in alkoholischen Getränken verwendet wird. Ethanol hat die molekulare Formel C_2H_5OH und alle untersuchten fettlöslichen Substanzen konnten in Ethanol gelöst werden. Die 1O_2 Abklingdauer

in Ethanol beträgt $14 \pm 2 \mu\text{s}$ [Bai05]. Die Sauerstoffkonzentration in Ethanol bei einer gesättigten Lösung liegt bei $1850 \mu\text{M}$ [Bai05].

4.2. Herstellung von homogenen und heterogenen Stoffgemischen

4.2.1. Herstellung von Lösungen

Ein homogenes Gemisch, das aus mindestens zwei chemischen Stoffen besteht, heißt Lösung. Die hier verwendeten Lösungen bestehen aus dem zu lösenden endogenen Photosensibilisatoren und dem entsprechenden Lösungsmittel und eventuell noch einem Quencher z.B. NaN_3 . Dazu wird die entsprechende Pulvermenge des endogenen Photosensibilisator mit einer Analysewaage CP255D (Sartorius, Göttingen, Deutschland) bis auf $0,01 \text{ mg}$ genau unter Zuhilfenahme eines Aluminiumschiffchens (Weighing Boats, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) abgewogen. Die Pulvermenge ist so gewählt, dass eine Stammlösung mit einer bestimmten Konzentration (meist 1 mM) in einem Falcon angerührt werden kann. Die entsprechende Menge Lösungsmittel wird mittels einer Pipette hinzugefügt. Das Gemisch wird geschüttelt und in ein Ultraschallbad gegeben, bis sich der Photosensibilisator vollständig gelöst hat. Um die jeweils gewünschte Konzentration an Lösung zu erhalten, wird ein Teil der Stammlösung mit der entsprechenden Menge Lösungsmittel verdünnt.

4.2.2. Bestimmung des pH-Wert einer Lösung

Lösungen können eingeteilt werden in neutrale Lösungen, Säuren und Basen. Als Säuren bezeichnet man Moleküle die Protonen abgeben können und dementsprechend Protonendonatoren sind. Und eine Base kann Protonen aufnehmen und ist ein Protonenakzeptor. Der pH-Wert von H_2O ist ein Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung. Er ist definiert als negativer Zehnerlogarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität. In verdünnten Lösungen entspricht der pH-Wert in Näherung dem negativen Zehnerlogarithmus der Stoffmengenkonzentration H_3O^+ : $\text{pH} = -\lg(c(\text{H}_3\text{O}^+))$ [Atk94].

Bei 25°Celsius ist der pH-Wert von reinem Wasser 7 (neutral) und bei Körpertemperatur (37°Celsius) entspricht der pH-Wert von reinem Wasser 6,84 [Atk94]. Es handelt sich um saure wässrige Lösung wenn der pH-Wert <7 ist und um basische

wässrige Lösung, wenn der pH-Wert >7 ist. Das Lösungsmittel D_2O) hat bei 25 °Celsius einen pD-Wert von 7,43 (neutral). Für die menschliche Haut wurde lange Zeit angenommen, dass der pH-Wert zwischen 5,0 und 6,0 liegt [LPB⁺06]. Doch der pH-Wert der Haut ist abhängig vom Kontakt der Haut mit Seife, Wasser und kosmetischen Produkten, die meist basisch sind. Neue Messungen vom natürlichen pH-Wert der Haut 24h nach dem letzten Kontakt mit Seife, Wasser und kosmetischen Produkten haben einen pH-Wert der Haut unter 5,0 ergeben [LPB⁺06] [SAB⁺08].

Der pH-Wert einer Lösung wird mit einem pH-Meter (pH-metro-potenciómetro BASIC 20, CRISON Instruments S.A., Barcelona, Spanien) gemessen. Ein pH-Meter misst den pH-Wert über eine Spannungsdifferenz. Ein Glaskolben, der an ein Manometer angeschlossen ist, wird in die zu messende Lösung getaucht. Dieser Kolben besteht aus einem äußeren Mantel, der Bezugselektrode und einer inneren Messelektrode. Es bildet sich ein elektrisches Potential an der Messelektrode aus, das in direktem Zusammenhang mit der H^+ -Ionen Konzentration der Lösung steht. Aus der Potentialdifferenz zur Bezugselektrode entsteht eine elektrische Spannung, die den pH-Wert abbildet. Das benutzte pH-Meter wird vor jeder Messung kalibriert mit drei Referenzsubstanzen mit den pH-Werten 7,00, 4,01 und 9,21 und kann pH-Werte zwischen -2 und 19 mit einer Genauigkeit von $\pm 0,01$ messen.

Um den pH-Wert einer Lösung zu ändern, muss man Säure oder Base zu der neutralen Lösung hinzufügen. In dieser Arbeit werden Tropfen von verdünnter Schwefelsäure (Sigma Aldrich) oder Essigsäure (Sigma Aldrich) in die Lösung gegeben, um einen pH-Wert unter 7 in H_2O zu erreichen. Um eine Lauge zu erzeugen, werden Tropfen von Natriumhydroxid (Sigma Aldrich) zum Lösungsmittel hinzu gegeben.

4.2.3. Herstellung von Proteinlysate und Zelllysate

Der Zerfall einer Zelle durch Schädigung oder Auflösung der äußeren Zellmembran wird als Lyse bezeichnet und das Ergebnis dieses Zerfalls als Lysat. Um sich langsam komplizierten Strukturen wie Zellen und Haut anzunähern, wurde Proteinlysate und Zelllysate auf seine Fähigkeit Singulett-Sauerstoff zu generieren, untersucht.

Zu einer bestimmten Menge (ca. 6 Millionen) von Zellen (Keratinocyten), die sich in einem 50 ml Falcon (Greiner Bio-One, Sollingen, Deutschland) befinden, wird 1 ml PBS gegeben und durchgemischt. Die so gewonnene Zellsuspension wird in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Eppi, Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) gegeben und dann bei 3000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf Vertrieb, Deutschland). Danach wird der Überstand mit Hilfe einer Pipette entfernt und zu dem zurückbleibenden Zellpellet wird 500 μ l RIPA

Lysispuffer (Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer) gegeben. Das Zellpellet muss gut resuspendiert werden und danach im Kühlraum (4 °C) 15 Minuten lang mit 600 Umdrehungen pro Minute geschüttelt werden. Die so gewonnene Lösung wird als Zelllysats bezeichnet und besteht aus Proteinen und den restlichen Zellbestandteilen. Sie kann nun verwendet oder für spätere Verwendung eingefroren werden (-20 °C) werden. Für die Herstellung von reinem Proteinlysats muss das Zelllysats nochmal zentrifugiert werden. Dazu wird die Zentrifuge auf 4 °C runter gekühlt und 10 Minuten mit 13000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nun kann man den Überstand in ein weiteres 2 ml Reaktionsgefäß füllen. Hierbei handelt es sich dann um reines Proteinlysats, welches verwendet oder für spätere Verwendung eingefroren werden kann.

4.2.4. Herstellung von Zellsuspensionen

Eine Suspension ist ein heterogenes Stoffgemisch aus einer Flüssigkeit und darin gleichmäßig, fein verteilten Festkörpern.

Bakterien

Um Bakterienversuche durchführen zu können, werden Bakteriensuspensionen von *E. coli* und *S. aureus* hergestellt, wobei die Herstellung der Suspensionen für beide untersuchten Bakterien gleich ist. Als erstes werden Bakterien des jeweiligen Bakterienstamm angeimpft. Dabei wird eine Kolonie des jeweiligen Bakterienstamms mit einer sterilen Impf-Öse aus einem bereits kultivierten Agar-Medium (Müller-Hinton-Agar-Medium, Oxoid, Wesel, Deutschland) herausgestrichen und in ein Reagenzglas mit 5 ml Nährmedium (Müller-Hinton-Medium, Oxoid, Wesel, Deutschland) gegeben. Ein weiteres Reagenzglas mit 5 ml Nährmedium ohne Bakterien dient als Kontrolle. Für ca. 18 Std. werden die Kontrolle und die Bakterienlösungen im Brutschrank bei 37 °C vermehrt. Um die Sauerstoffzufuhr im Medium während der Vermehrung zu gewährleisten, werden die Bakterienlösungen und die Kontrolle auf einer Rüttelplatte mit 180 Umdrehungen pro Minute deponiert. Nach der Vermehrung, wenn sich die Bakterien in der stationären Phase befinden, werden die Bakteriensuspensionen in ein Falcon umgefüllt und für 10 Minuten in der Zentrifuge bei 3000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Danach wird der Überstand (Müller-Hinton-Medium) mit einer Pipette abgenommen und das übrig gebliebene Bakterienpellet mit dem entsprechenden Lösungsmittel resuspendiert. Mit Hilfe des Absorptionsspektrometers (siehe Kapitel 4.10) wird die optische Dichte (OD) der Bakterienlösung bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Über die OD kann die Bakterienanzahl in der Lösung bestimmt werden. Die Bakterienlösung wird nun solange verdünnt, bis die OD bei 600 nm ungefähr 0,6 beträgt.

Keratinozyten

Zur Herstellung von Eukaryonten-Suspensionen werden Keratinozyten (Kapitel 3.2.1), die am häufigsten in der Epidermis vorkommenden Zellen, verwendet. Die verwendeten Keratinozyten (ATCC, Manassas, USA) werden in Gewebekulturschalen (BD, Heidelberg, Germany) unter Standardkulturbedingungen (37 °C, 8 % CO₂) in Brutschränken gezüchtet. Als Kulturmedium wird Dermal Cell Basal Medium (ATCC, Manassas, USA) mit Keratinocyte Growth Kit und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (Gibco, Eggenstein) verwendet. Das Medium wird dreimal pro Woche gewechselt. Zur Zellernte wird der Überstand abgesaugt und die Keratinozyten mit PBS gespült. Danach werden die Zellen mit Trypsin-EDTA (ATCC, Manassas, USA) in PBS für wenige Minuten bei 37 °C inkubiert. Dadurch soll das Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden erreicht werden. Die Trypsinaktivität wird durch die Zugabe von Trypsin Neutralizing Solution gestoppt. Zur Trennung der abgelösten Zellen vom Überstand wird dieser samt der abgelösten Zellen mit einer Pipette abgenommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben. Dies wird nun mit 1200 Umdrehungen/Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wird der Überstand mit einer Pipette abgesaugt. Nun wird das verwendete Lösungsmittel PBS hinzugefügt und resuspendiert und in der Neubauer Zählkammer gezählt. Die Zellsuspensionen hatten eine Konzentration von 5 bis $7 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter Suspension.

4.3. Herstellung von Schweinehautpräparaten

Die Schweinehaut wurde von einem Metzger (Stierstorfer, Wenzenbach, Deutschland) bezogen, direkt nach dem Schlachten abgeholt und dann entsprechend weiterverarbeitet. Zuerst werden mit einem Langhaar-Rasierer die Borsten auf der Hautoberfläche abrasiert. Um letzte abrasierte Borstenreste zu entfernen, wird die Schweinehaut mit Wasser abgespült. Danach wird die an die Dermis anschließende Fettschicht mit einem Skalpell (Feather Safety Razor Co. Ltd, Osaka, Japan) erst grob entfernt und danach noch abgeschabt, bis man überall die Dermis-Schicht erkennen kann. Nun wird die Schweinehaut abgewaschen, um letzte Fettreste zu entfernen und dann in eine große Petrischale (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland), die mit PBS gefüllt ist, gebettet. In einer separaten trockenen Petrischale schneidet man mit einem Skalpell den Rand (ca. 2 mm) des großen Schweinehautstück ab. Die Schweinehaut wird mit der Epidermis nach oben in eine mit PBS gefüllte Petrischale gelegt, um die Epidermis mit 70 % Ethanol-Lösung mindestens 30 Sekunden lang zu desinfizieren. Danach zerteilt man die Schweinehaut in gleich große Schweinehautstücken von ca. 2x2 cm, die in mit PBS gefüllte Petrischalen (94 mm Durchmesser, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) gebettet werden. Nun wird Agarlö-

sung hergestellt, indem man 1,5 g Agar (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) abwiegt (Analysewaage CP255D, Sartorius, Göttingen, Deutschland) und mit 150 ml destilliertem Wasser mischt. Diese Lösung wird in einem hitzebeständigen Gefäß in die Mikrowelle gestellt und bis zum aufkochen erhitzt. Zur abgekühlten (ca. 25-40 °C) Agar-Lösung gibt man 16,68 ml HEPES-Puffer. Der HEPES-Puffer (pH von 7,55) wurde aus 40g NaCl (Natriumchlorid), 1,5 g KCl (Kaliumchlorid), 11,9 g HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), 10 g Glucose und 450 ml destilliertem Wasser hergestellt. Nun werden die Schweinehautstückchen einzeln in kleine Petrischalen (60 mm Durchmesser, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland), mit der Epidermis nach oben schauend, gelegt und die handwarme Agar-HEPES-Puffer Lösung dazugegeben, bis die Seitenränder der Schweinehaut bedeckt sind, aber die Epidermis noch unbedeckt bleibt. Nachdem die Agar-Hepes-Puffer Lösung sich verfestigt hat (ca. 2 Minuten) liegt die Schweinehaut fest in der Petrischale und kann in den Laseraufbau eingebaut werden.

4.4. Herstellung von Hautpräparaten

Gesunde Hautstücke (periläsionale Haut), die in der Dermatologie der Uniklinik Regensburg operativ entfernt wurden, werden nach der OP in eine Kochsalzlösung gegeben und am selben Tag zu Hautpräparaten weiterverarbeitet, wenn sie eine Mindestgröße von 1 cm² hatten. Zuerst werden die Hautstücke in mit PBS gefüllte Petrischalen (94 mm Durchmesser, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) gebettet und gereinigt. Danach wird die an die Dermis anschließende Fettschicht mit einem Skalpell (Feather Safety Razor Co. Ltd, Osaka, Japan) erst grob entfernt und danach noch abgeschabt, bis man überall die Dermis erkennen kann. Die von der Fettschicht befreiten Hautstückchen werden wieder in eine mit PBS gefüllte Petrischale gegeben und gewaschen. Nun wird eine Agarlösung hergestellt (siehe Kapitel 4.3). Jedes Hautstück wird mit der Epidermis nach oben in eine kleine Petrischale (60 mm Durchmesser, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) gelegt. Die handwarme Agar-HEPES-Puffer Lösung wird dazugegeben, bis die Seitenränder der Hautstücken bedeckt sind, aber die Epidermis noch unbedeckt bleibt. Nachdem die Agar-Hepes-Puffer Lösung sich verfestigt hat (ca. 2 Minuten) liegt die Haut fest in der Petrischale und kann in den Laseraufbau aus Kapitel 4.7 eingebaut werden.

4.5. Immunhistologische Färbung von MMP-1

Aus einer Hautprobe (Spindelecke) wird eine Stanze (Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main, Deutschland) von einem 3 mm^2 Durchmesser herausgestochen, in Formalin fixiert und bei Raumtemperatur gelagert. Die übrige Hautprobe wird in eine Petrischale mit HEPES-Agar eingebettet (Kapitel 4.4). Diese Petrischale kann in den Messaufbau (Kapitel 4.7) eingebaut werden und mit dem Laser bei den Wellenlängen 308 nm, 320 nm und 355 nm mit verschiedenen UV-Dosen bestrahlt werden. Danach wird die Petrischale mit der Hautprobe für 24 Stunden in einen Brutschrank (37 °Grad, hohe Luftfeuchte) gelegt. Nach 24 Stunden im Brutschrank wird eine weitere 3 mm^2 Stanze aus der Probe entfernt, in Formalin fixiert und bei Raumtemperatur gelagert.

Danach erfolgt die Einbettung von beiden Gewebeproben in Paraffin. Dazu werden die Gewebeproben über Nacht entwässert und dann in einen Paraffin-Block eingebettet, indem sie mit heißem Paraffin übergossen werden. Die Paraffin-Blöcke werden mit einem Microtome (Microm International, Walldorf, Deutschland) bei Raumtemperatur in $3\text{ }\mu\text{m}$ breite Schnitte geschnitten. Die Schnitte werden mit einer Pinzette in ein ca. 40 °C warmes Wasserbad mit destilliertem Wasser gegeben, danach auf einen beschrifteten, superfixierenden Objektträger (Superfrost Plus, ThermoScientific) gelegt und über Nacht getrocknet. Die Objektträger werden bis zur Färbung bei Zimmertemperatur gelagert. Die immunhistologische Färbung nach MMP-1 wird mit dem Kit ZytoChem Plus HRP-Kit Rabbit (ZYTOMED Systems GmbH, Berlin, Deutschland) über Nacht durchgeführt. Für die Gegenfärbung wird Mayers's Hä-malaun verwendet. Die fertigen Proben können jetzt mit einem Mikroskop (Axiostar plus, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) betrachtet werden.

4.6. Messaufbau mit XeCl-Excimer Laser

Der für den Nachweis von $^1\text{O}_2$ Erzeugung verwendete Messaufbau ist in Abbildung 4.7 dargestellt. Für die optische Anregung wird ein XeCl-Excimer Laser (Medolas, Max 20), der Strahlung bei einer Wellenlänge von 308 nm emittiert, verwendet. Alle Excimerlaser sind gepulste Laser, wobei die für die Experimente verwendete Laserpulsenergie 1 mJ beträgt und die Wiederholrate des Lasers 150 Hz ist.

Die emittierte Laserstrahlung wird durch einen Lichtleiter direkt auf die Probe, die sich in einer Quarzglas-Küvette befindet (QS-101, Helma Optik, Jena, Germany), geleitet. Die in der Küvette erreichte Laserintensität beträgt $7 \pm 1\text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$,

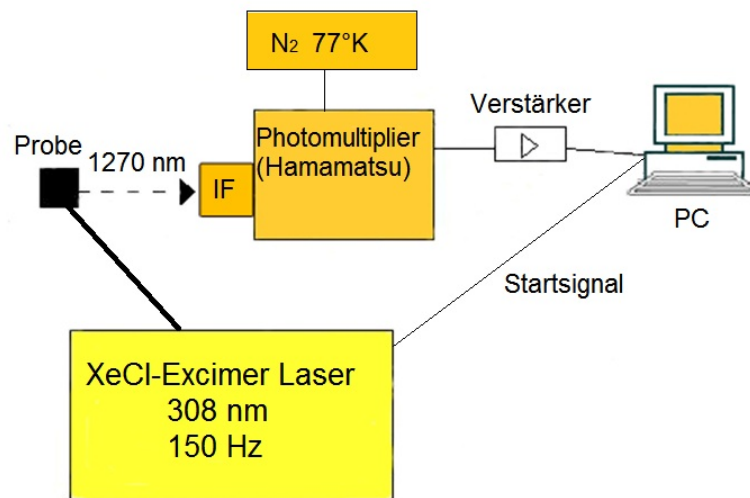


Abbildung 4.7.: Messaufbau mit dem XeCl-Excimerlaser

wobei 2 cm^2 der Küvette ausgeleuchtet werden. Das $^1\text{O}_2$ Lumineszenzsignal wird aus einer Rückwärtsrichtung in Bezug auf den Anregungsstrahl detektiert. Die Lumineszenzstrahlung wird auf die aktive Fläche eines Photomultipliers (R5509-42, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching) abgebildet. Vor dem Photomultiplier ist ein 600 nm Cut-off Filter eingebaut, um ein besseres Signal-Rausch Verhältnis zu erhalten. Um das Lumineszenzsignal abhängig von der Wellenlänge zu bestimmen, werden Interferenzfilter (siehe Tabelle 4.6) mit verschiedenen maximalen Transmissionen, die eine Bandbreite von 10 nm haben, verwendet. Diese werden nacheinander in den Messaufbau eingebaut und mit jedem Interferenzfilter wird ein Lumineszenz Signal detektiert. Die aktive Fläche ($3 \times 8 \text{ mm}^2$) der InP/InGaAsP-Kathode des Photomultipliers muss auf $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt sein, um das thermische Rauschen zu verringern. Dies geschieht durch flüssigen Stickstoff (N_2 , 77°K). Die vom Photomultiplier detektierten Lumineszenzsignale werden durch einen Verstärker (HFAC-26GHz White Band Amplifier, Becker & Hickl GmbH, Berlin, Deutschland) elektronisch verstärkt und dann an die Messkarte im PC weitergeleitet. Die Messkarte mit einer maximalen Zeitauflösung von 1 ns misst die Zeit zwischen dem Startsignal des Laserpulses und dem Lumineszenzsignal des Photomultipliers. Um den zeitlichen Verlauf der $^1\text{O}_2$ Lumineszenz zu bestimmen, wird das Verfahren des Einzelphotonzählens (single photon counting) verwendet. Zur Erfassung eines zeitlich aufgelösten $^1\text{O}_2$ Signals werden die Lumineszenzphotonen von 5000 Laserpulsen aufsummiert.

zentrale Wellenlänge	Halbwertsbreite	max. Transmission	Firma
1150,1 nm	9,8 nm	45,2%	Ealing
1201,6 nm	9,5 nm	38,1%	Ealing
1249,7 nm	9,6 nm	45,1%	Ealing
1260,1 nm	9,8 nm	42,0%	LOT
1270,6 nm	10,0 nm	49,1%	LOT
1280,3 nm	10,1 nm	52,1%	LOT
1299,3 nm	10,6 nm	49,6%	Ealing
1353,6 nm	12,1 nm	45,3%	Ealing
1401,5 nm	12,7 nm	52,0%	Ealing

Tabelle 4.6.: Übersicht über die verwendeten Interferenzfilter [Reg10]

4.7. Messaufbau mit dem abstimmbaren Lasersystem

Für die Untersuchung von 1O_2 Erzeugung durch UV-Strahlung, sowohl im UVB, als auch im UVA-Bereich, wurde ein abstimmbares Lasersystem erworben und in den bestehenden Messaufbau integriert. Der Messaufbau ist schematisch in Abbildung 4.8 dargestellt. Das zur Anregung der Proben verwendete abstimmbare Lasersystem basiert auf einem Nd:YAG Pumplaser (NL220). Dieser erzeugt einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 1064 nm, der durch Second Harmonic Generation (SHG) und Third Harmonic Generation (THG) frequenzverdoppelt (532 nm) und frequenzverdreifacht (355 nm) wird. Der Pumplaserstrahl hat also eine Wellenlänge von 355 nm, eine Pulsdauer von ungefähr 7 ns und eine Pulsenergie kleiner 3,15 mJ bei einer Repetitionsrate von 1 kHz. Dieser Laserstrahl wird geteilt, wobei er entweder zum Laserausgang für 355 nm oder in den Optischen Parametrischen Oszillator (OPO) geleitet wird. Der OPO besteht aus zwei Bariumborat-Kristallen (Typ II), die sich durch eine besonders hohe Nichtlinearität auszeichnen und einem Resonator aus zwei Spiegeln. Ein Optischer Parametrischer Oszillator kann Laserstrahlung über einen weiten Spektralbereich abstimmbaar machen, indem der Anregungslaserstrahl (355 nm) auf einen nichtlinearen Kristall trifft, was zu einer Abwärtskonvertierung der Anregungsfrequenz (ϖ_A) in zwei Strahlen mit niedrigerer Frequenz, der Signalfrequenz (ϖ_s) und der Idlerfrequenz (ϖ_i) führt, unter Erfüllung der Energieerhaltung ($\varpi_A = \varpi_s + \varpi_i$) [EZ11]. Um die Signal- und Idlerfrequenz zu verstärken, müssen die optischen Wellen in Phase gehalten werden ($\Delta_A = k_A - k_s - k_i = 0$). Durch die Drehung des Kristalls kann diese Phasenübereinstimmungsbedingung geändert werden und die Signal- und Idlerfrequenz können über einen weiten Spektralbereich abgestimmt werden [EZ11]. Der zweite Kristall ist nötig, um den Strahl wieder in die gewünschte Richtung zu leiten. Der im Lasersystem vorhandene OPO erzeugt Laserstrahlung

von 400 nm bis 2600 nm mit einer Effizienz von 20 %. Wenn Frequenzen im UV-Bereich erwünscht sind, wird die Strahlung aus dem OPO weitergeleitet an SH1 (Second Harmonic) oder SFG (Sum Frequency Generation), welche beide aus einem Typ I Bariumborat-Kristall bestehen. Der SH1-Kristall erzeugt die Second Harmonic des OPO-Signals und deckt den Wellenlängenbereich von 225 nm - 299 nm ab. Der SFG-Kristall erzeugt die Frequenzsumme des OPO-Signals und ist für die Wellenlängen von 300 nm bis 399,95 nm zuständig. Für die Generation einer Frequenzsumme werden zwei Eingangssignale benötigt, das OPO-Signal (ω_1) und Laserstrahlung vom Nd:YAG Laser (ω_2 , 1064 nm), um Strahlung mit höherer Frequenz zu erhalten ($\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$). Die Bariumborat-Kristalle sind wasseranziehend und müssen auf einer konstanten Temperatur von ca. 50 °C gehalten werden.

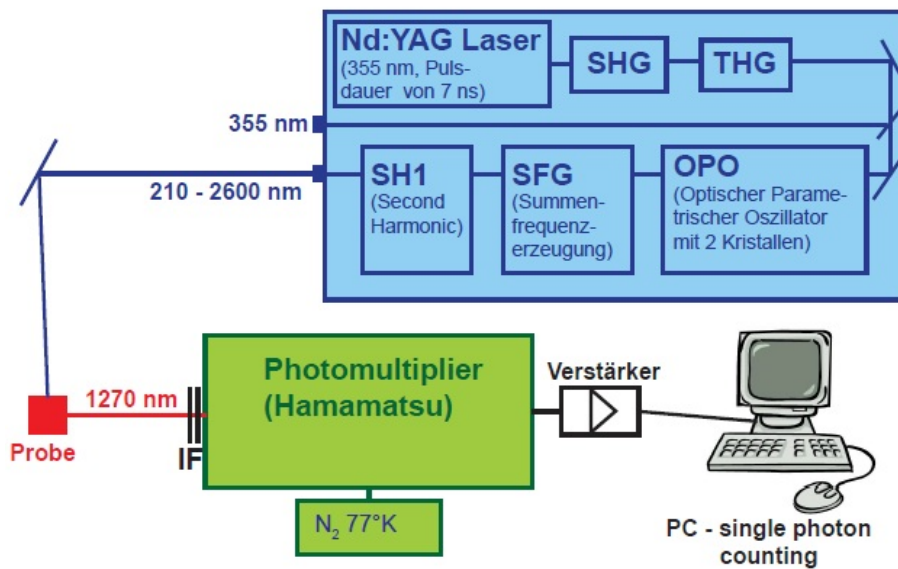


Abbildung 4.8.: Messaufbau mit dem abstimmbaren Lasersystem

Per PC-Steuerung kann die gewünschte Ausgangswellenlänge zwischen 210 nm und 2600 nm gewählt werden, die dann am Laserausgang emittiert und durch Spiegel auf die zu bestrahlende Probe, die sich in einer Quarzglasküvette (QS-101, Helma Optik, Jena, Germany) befindet, geleitet wird. Die Ausgangsleistung des Lasers ist abhängig von der emittierten Wellenlänge (z.B. 290 nm: 15 mW, 310 nm: 61,8 mW, 350 nm: 45,2 mW). Das Lumineszenzsignal wird mit einem Photomultiplier (siehe oben), dessen aktive Fläche auf -80 °C gekühlt wurde, detektiert. Die vom Photomultiplier detektierten Lumineszenzsignale werden wieder durch den Verstärker elektronisch verstärkt und dann an die Messkarte im PC weitergeleitet. Diese Messkarte hat eine maximale Zeitauflösung von 100 ps und misst die Zeit zwischen dem Startsignal, erzeugt durch einen Triggerausgang an der Lasersteuerung, und den auf dem Photomultiplier auftreffenden ¹O₂ Lumineszenzphoton. Um den zeitlichen Verlauf der

$^1\text{O}_2$ Lumineszenz zu bestimmen, wird wieder das Verfahren des Einzelphotonzählens (single photon counting) verwendet. Dazu wird jedes auf dem Photomultiplier detektierte Photon in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zum Startsignal des Laserpulses erfasst. Die Anzahl der Kanäle mit der gemessen wird und die zeitliche Breite eines Kanals werden vor der Messung festgelegt. Die Zeitspanne nach dem Startsignal kann durch das Produkt der Kanalanzahl und der Kanalbreite bestimmt werden. Die detektierten Photonen erhöhen also abhängig vom zeitlichen Abstand zum Startsignal den Zähler des entsprechenden Kanals um eins. Diese Einzelmessung wird nun wiederholt und die statistische Verteilung der detektierten Photonen wird zur Weiterverarbeitung in einer ASCII-Datei gespeichert.

4.8. Auswertung der Messergebnisse

Zeitaufgelöste Messung:

Die mit der Single-Photon-Counting-Messkarte gemessenen Daten werden automatisch als ASCII-Files auf dem PC gespeichert. Um die Daten weiter zu bearbeiten und auszuwerten, wird das Auswerteprogramm Mathematica (Mathematica 8.0, Wolfram Research, Champaign, USA) verwendet. Um die Counts pro Kanal darzustellen, müssen die gemessenen Zeiten durch die Zeitauflösung Δt der Kanäle geteilt werden. Danach kann man je nach Höhe und Qualität des Messsignals über mehrere Kanäle aufsummieren, um ein besser auswertbares Signal zu erhalten. Nun bestimmt man, ab welchem Kanal das Hintergrundrauschen beginnt und zieht das mittlere Hintergrundrauschen vom Signal ab. Zum fitten wird ein Fitbereich ausgewählt, indem Mathematica versucht mit der Levenberg-Marquard-Fitroutine die Abweichung zwischen den Messpunkten und der Fitkurve zu minimieren. Die Levenberg-Marquard-Fitroutine die Mathematica verwendet, lautet:

$$N_t = A \cdot (e^{\frac{x-x_0}{t_1}} - e^{\frac{x-x_0}{t_2}}) \quad (4.1)$$

Die Parameter A , x_0 , t_1 und t_2 werden von einem vorgegebenen Startwert aus so lange variiert, bis die mittlere Abweichung zwischen den Messpunkten und der Fitkurve minimal ist. Die mittlere quadratische Abweichung wird dann später unter dem ausgewerteten Signal dargestellt und deren Symmetrie zur eingezeichneten Achse bestätigt, dass die Fitparameter richtig gewählt wurden. In Abbildung 4.9 ist ein typisches Messsignal einer Lumineszenzmessung mit Fitkurve und der darunter dargestellten mittleren quadratischen Abweichung abgebildet. Bei der Fitroutine in Mathematica werden nicht die Raten β_1 und β_2 verwendet (siehe Kapitel 3.5.1), sondern direkt die

Zeiten $t_1=t_R=1/\beta_1$ und $t_2=t_D=1/\beta_2$, welche die Anstiegs- (rise time) und Abklingzeit (decay time) darstellen. Über die von Mathematica errechneten Werte für t_1 und t_2 können dann die Raten β_1 und β_2 bestimmt werden. Der Parameter x_0 verschiebt die Fitkurve horizontal bezüglich der Messkurve, um den Beginn des Lumineszenzsignals möglichst genau zu ermitteln. Außerdem wird noch das Integral der Fitkurve, welches proportional zur Lumineszenzenergie ist, berechnet und angegeben.

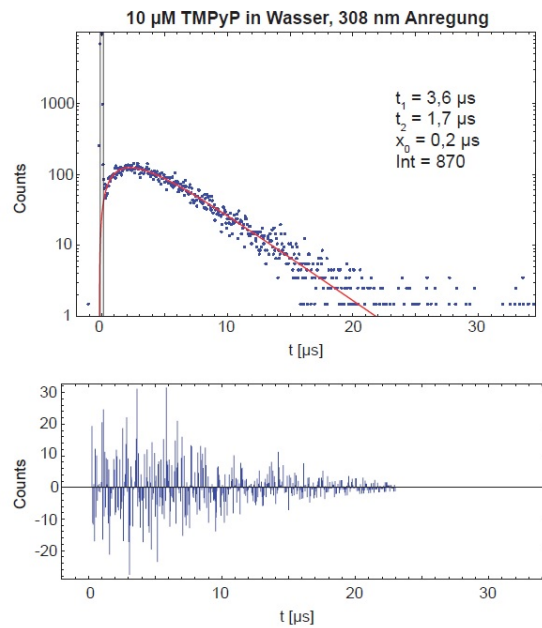


Abbildung 4.9.: Ein Lumineszenzsignal von TMPyP in Wasser

Spektral aufgelöste Messung:

Hierzu werden zeitaufgelöste Messungen mit unterschiedlichen Interferenzfiltern im Spektralbereich 1150 nm - 1400 nm, welche in Tabelle 4.6 näher beschrieben wurden, detektiert. Alle Messungen werden als ASCII-Files auf dem PC gespeichert. Um die verschiedenen Messreihen in einer Datei weiterzuverarbeiten wird das Auswertprogramm Mathematica (Mathematica 8.0, Wolfram Research, Champaign, USA) verwendet. Dort kann man die detektierten Daten für jeden Interferenzfilter einlesen. Für jede Einzelmessung wird der Laserpuls ermittelt, um dann über alle detektierten Photonen nach dem Laserpuls zu summieren. Die Summe aller Photonen wird für jeden Interferenzfilter berechnet. Danach werden die Summen gegen die Wellenlängen der Interferenzfilter aufgetragen und mit einer Lorenzfunktion gefittet.

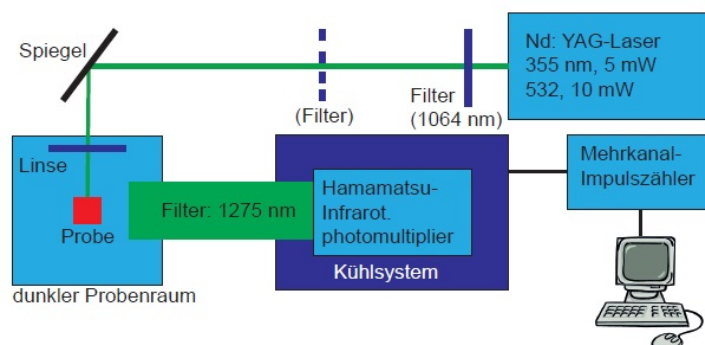


Abbildung 4.10.: schematischer Messaufbau zur $^1\text{O}_2$ Lumineszenz Messung

4.9. Messung der Singulett-Sauerstoff Lumineszenz in Barcelona

Auch am Institut Químic de Sarrià, Universidad Ramon Llull in Barcelona in der Arbeitsgruppe von Prof. Santi Nonell werden $^1\text{O}_2$ Lumineszenz Signale und Quantenausbeuten durch die Messung von zeitaufgelöster Lumineszenz im Infrarotbereich (1275 nm) bestimmt. Der benutzte Messaufbau ist schematisch in Abbildung 4.10 dargestellt.

Der zur Anregung der Proben benutzte Laser ist ein Dioden-gepumpter Nd:YAG Laser (FTSS355-Q, Crystal Laser, Berlin, Deutschland), der eine Pulsrepeditionsrate von 10 kHz hat. In dieser Arbeit werden emittierte Laserpulse bei 355 nm mit einer Laserleistung von 5 mW und einer Laserpulsenergie von $0,5 \mu\text{J}$ pro Puls für die Anregung der Proben verwendet. Um infrarote Strahlung der Laseremission bei 1064 nm auszuschließen, ist ein Filter (Edmund Optics, York, Großbritannien) nach dem Ausgang des Nd:YAG Lasers in den Laserstrahl eingebaut. Ein weiterer Filter zur Verringerung der anregenden Laserleistung kann optional eingebaut werden. Durch einen verstellbaren Spiegel wird der Laserstrahl durch eine schmale Öffnung in den Probenraum geleitet, der durch einen Deckel geschlossen und dadurch abgedunkelt werden kann. Im dunklen Probenraum wird der Laserstrahl durch eine Linse auf die in der Mitte des Raumes positionierte Probe fokussiert. Die von der Probe emittierte Lumineszenz wird in einem rechten Winkel zum Laserstrahl detektiert. Durch eine spezielle Optik an Linsen und einen Filter bei 1275 nm (CVI Laser Optics Melles Griot, Albuquerque, USA) werden die $^1\text{O}_2$ Lumineszenz Photonen zur Detektionseinheit geleitet. Detektiert werden die Lumineszenzphotonen von einem infrarotempfindlichen Photomultiplier (Model H9170-45, Hamamatsu Photonics, Japan). Durch ein Vakuum-Kühlsystem wird dieser Photomultiplier auf -60

°C abgekühlt. Der Photomultiplier arbeitet in einem Photon-Counting Modus und das Signal des Photomultipliers wird an einen PicoQuant Nanoharp 250 Mehrkanal-Impulsmesser (PicoQuant, Berlin, Deutschland) geleitet. Der PicoQuant Nanoharp 250 hat 262144 Kanäle mit einer minimalen Kanalbreite von 4 ns. Für die Messungen in dieser Arbeit werden 1064 Kanäle mit einer Kanalbreite von 64 ns gewählt. Die Messzeit für ein Lumineszenz-Signal wird so gewählt, dass das Signal-Rausch-Verhältnis optimal ist.

Auswertung der Messergebnisse und Bestimmung der 1O_2 Quantenausbeute

Die mit PicoQuant gemessenen zeitaufgelösten Photon-Histogramme werden am Computer mit PicoQuant FluoFit 4.0 weiter ausgewertet. Die zeitaufgelösten Photon-Histogramme werden am Computer mit PicoQuant FluoFit 4.0 weiter ausgewertet. Wenn die Abklingdauer vom 1O_2 größer ist, als die Abklingdauer vom Triplett-Zustand des Photosensitizers, dann ist die Rate $\beta_2 = \frac{1}{\tau_\Delta}$ und $\beta_1 = \frac{1}{\tau_{T_1}}$. Der zeitliche Verlauf des bei 1275 nm gemessenen Lumineszenz-Signals lässt sich nun mit der folgenden Formel fitten, um Anstiegs- und Abklingdauer des Signals zu ermitteln:

$$S_t = A \cdot (e^{\frac{-t}{\tau_\Delta}} - e^{\frac{-t}{\tau_{T_1}}}) \quad (4.2)$$

Wobei A die Amplitude des Signals bei $t = 0$ ist, τ_Δ die Abklingdauer von 1O_2 und τ_{T_1} die Abklingdauer vom Triplett-Zustand des Photosensibilisators ist. Die Quantenausbeute Φ_Δ von 1O_2 ist die Anzahl von generierten 1O_2 Molekülen pro vom Photosensibilisator absorbierten Photonen. Die 1O_2 Φ_Δ ist proportional zu der Amplitude des 1O_2 Signals, für die gilt:

$$A = k \cdot \Phi_\Delta = \Phi_\Delta \cdot \frac{\tau_\Delta}{\tau_\Delta - \tau_{T_1}} \cdot E_{abs} \quad (4.3)$$

Die 1O_2 Lumineszenz kann über den Vergleich der Amplituden der 1O_2 Signale mit einer Referenzsubstanz bestimmt werden. Wenn die Referenzsubstanz und die zu untersuchende Substanz dieselbe absorbiert Energie E_{abs} haben, gilt für Φ_Δ :

$$\Phi_\Delta^? = \Phi_\Delta^{Ref} \cdot \frac{A^?}{A^{Ref}} \cdot \frac{(\frac{\tau_\Delta}{\tau_\Delta - \tau_{T_1}})^{Ref}}{(\frac{\tau_\Delta}{\tau_\Delta - \tau_{T_1}})^?} \quad (4.4)$$

4.10. Absorptionsmessungen

Ein Molekül kann durch seine chemische Struktur, die zu charakteristischen Energieniveaus führt, charakterisiert werden. Ein Molekül absorbiert nur dann, wenn es auf Strahlung mit geeigneter Energie bzw. Wellenlänge trifft. Die Energiezufuhr sorgt dafür, dass das Molekül angeregt und in einen energiereicheren Zustand überführt wird. Darum kann man ein Molekül durch sein Absorptionsspektrum charakterisieren. Um die Absorption eines Moleküls zu messen, wird es in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und in eine Küvette transferiert. Die Absorptionsspektren werden mit einem Einstrahl-Spektralphotometer (DU600, Beckmann Instruments GmbH, München, Deutschland) erstellt, das Strahlung in einem Wellenlängenbereich von 190 nm bis 1100 nm emittieren kann. Um die Transmission der gelösten Moleküle zu bestimmen, muss eine Küvette mit dem entsprechenden Lösungsmittel (Blanc) vorher ausgemessen und als Offset von der Messung der Moleküllösung subtrahiert werden. Der Transmissionswert T ist in Prozent gegeben und die Absorption A des Moleküls kann berechnet werden mit $A = 100 \% - T$.

Mit dem Spektralphotometer kann auch der Absorptionswirkungsquerschnitt σ , also die Wahrscheinlichkeit mit der Photonen absorbiert werden, bestimmt werden. σ ist eine Materialkonstante und konstant für verschiedene Konzentrationen eines gelösten Moleküls. Eine Änderung führt zu der Annahme, dass das Molekül aggregiert, beispielsweise eine Dimerisation durchläuft oder eine andere wechselseitige Beeinflussung stattfindet. σ ergibt sich aus dem Lambert-Beerschen Gesetz $T = e^{-\sigma \cdot N \cdot d}$. Dabei ist d die Dicke der Küvette und N die Anzahl der Teilchen pro Volumeneinheit. σ kann somit beschrieben werden durch die Formel:

$$\sigma = -\frac{\ln(T)}{N \cdot d} \quad (4.5)$$

Für N lässt sich $N = N_A \cdot c$ einsetzen, wobei N_A [mol^{-1}] die Avogadro-Konstante und c [mol] die Stoffmengenkonzentration des untersuchten Moleküls ist. Damit ergibt sich für σ :

$$\sigma = -\frac{\ln(T)}{N_A \cdot d \cdot c} \quad (4.6)$$

Mit der mit gemessenen Transmission T , der Stoffmengenkonzentration des untersuchten Moleküls c und der Dicke der Küvette d lässt sich also σ ermitteln.

In Barcelona wird ein Spektrometer (UV-Vis-NIR Varian Cary 6000i Spectrophotometer) benutzt, um Absorptionsspektren zu messen.

4.11. Messung der Photostabilität

Gelöste Moleküle können sich, während sie mit UVB Strahlung beleuchtet werden, chemisch verändern, z.B. durch Photooxidation. Das chemisch veränderte Molekül kann völlig andere Eigenschaften haben als das ursprüngliche, wie ein verändertes Absorptionsverhalten oder eine unterschiedliche 1O_2 Quantenausbeute. Darum wird die Photostabilität der Moleküle bei UVB Bestrahlung ebenfalls untersucht.

Bestrahlung mit UVB-Lampe

Wenn ein Molekül bei UVB Bestrahlung nicht stabil ist, dann können die Änderungen im Absorptionsspektrum und die möglichen resultierenden Änderungen in der chemischen Struktur des Moleküls analysiert werden. Für die UVB Bestrahlung wird ein FLX-20M Transluminator (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) benutzt. Die vier UVB Lichtröhren des Transluminators haben einen Output von 8 Watt und ein Emissionsmaximum bei 312 nm. Die endogenen Moleküle werden in den entsprechenden Lösungsmitteln gelöst und die Lösung in eine Küvette transferiert. Der Transluminator hat eine Schublade, in die die abgedichteten Küvetten hineingelegt und beleuchtet werden. Die UVB Dosis, die die Küvette erreicht, kann am Transluminator in $J \cdot cm^{-2}$ justiert werden. Die ganze Küvette wird mit dieser UVB Dosis gleichmäßig von einer Seite beleuchtet. Als geringe UVB-Dosis wird z.B. $0,27 J \cdot cm^{-2}$, die ungefähr 1 MED bei 312 nm entspricht [YCH⁺81], ampliziert. Eine hohe UVB-Dosis ist z.B. eine UVB-Wochendosis ($6,62 J \cdot cm^{-2}$ [FJG02]). Für die eingestrahlte UVB-Dosis wird ein Fehler von 1 % angenommen. Vor und nach der UVB Bestrahlung wird mit dem Spektrometer das Absorptionsspektrum des gelösten Moleküls bestimmt, um die möglichen Veränderungen im Absorptionsverhalten und damit in der Molekülstruktur zu entdecken. Ein Molekül gilt als photostabil für eine UVB Dosis, wenn sich das Absorptionsspektrum im gesamten Spektralbereich nicht verändert bei einer Bestrahlung mit dieser UVB Dosis.

4.12. Fluoreszenz und Phosphoreszenz Messungen

Um die Fluoreszenz Anregungs- und Emissionsspektren eines Moleküls zu bestimmen wird das Fluorimeter (Fluoromax-4 Spectrofluorometer, Horriba Scientific, Edison, New Jersey, USA) der Arbeitsgruppe von Prof. Santi Nonell am Institut Químic de Sarrià, Universidad Ramon Llull in Barcelona verwendet. In Abbildung 4.11 ist der schematische Aufbau dieses Fluorimeters abgebildet.

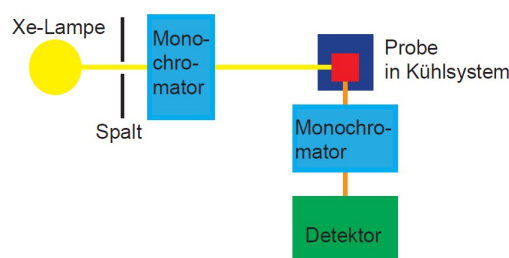


Abbildung 4.11.: Der schematische Aufbau des Fluorimeters

Die Probe, die sich in einem schmalen Glaskolben in der Mitte des abdunkelbaren Probenraums befindet, wird mit einer 150 Watt Xe-Lampe angeregt. Der Strahl der Lampe kann durch einen Spalt räumlich begrenzt werden. Mit dem Anregungsmonochromator wird die Anregungswellenlänge zwischen 200 und 950 nm festgelegt. Der Anregungsstrahl trifft auf die Probe und regt diese an. Die Fluoreszenz wird in einem rechten Winkel zum Anregungsstrahl gemessen. Die Fluoreszenz oder gegebenenfalls Phosphoreszenz trifft zuerst auf einen Emissionsmonochromator, durch den die Emissionswellenlänge festgelegt ist und wird dann am Detektor mit Photon-Zähl-Modus detektiert. Der Detektor kann Photonen zwischen 185 und 840 nm detektieren. Es können die Fluoreszenz und/oder Phosphoreszenzphotonen bei Zimmertemperatur oder bei 77 Kelvin detektiert werden. Um die Probe auf 77 Kelvin runter zu kühlen, wird flüssiger Stickstoff in die Kühleinrichtung geschüttet.

Um die Fluoreszenz Quantenausbeute zu bestimmen wird Quinine Sulfate in 1N H_2SO_4 als Standard Referenz benutzt mit einer Quantenausbeute von 0,546 [Eat98]. Quinine Sulfate wird so in 1N H_2SO_4 gelöst, dass es die gleiche optische Dichte bei der Anregungswellenlänge hat, wie die zu untersuchende Substanz. Nun wird mit dem Fluorimeter das Emissionsspektrum der Fluoreszenz für die Substanz und für die Referenz für dieselbe spektrale Breite bestimmt. Mit der folgenden Formel kann danach die Fluoreszenz Quantenausbeute der unbekannten Substanz ϕ_u bestimmt werden [Eat98]:

$$\phi_u = \frac{A_s F_u n_u^2}{A_u F_s n_s^2} \cdot \phi_s \quad (4.7)$$

Mit der Fluoreszenz Quantenausbeute der Referenz ϕ_s , der optischen Dichte A, dem Brechungsindex des Lösungsmittels n (Wasser: 1,333; H_2SO_4 : 1,418) und der integrierten Fläche des Fluoreszenzemissionsspektrums F.

4.13. Optoakustische Spektroskopie

Die Laser-induzierte optoakustische Spektroskopie (LIOAS) beruht auf dem optoakustischen Effekt, der besagt, dass Lichtenergie in akustische Energie (Schall) umgewandelt werden kann. In Abbildung 4.12 ist schematisch dargestellt, wie durch einen Laserstrahl eine Druckwelle entsteht, die dann detektiert werden kann und an einem Oszilloskop sichtbar gemacht wird.

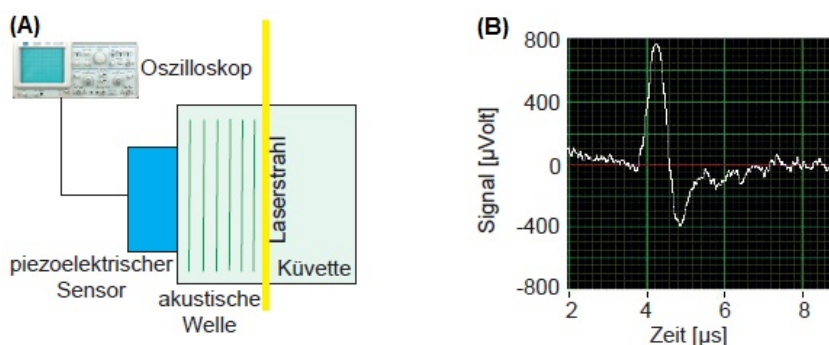


Abbildung 4.12.: In (A) ist schematisch die Detektion einer laserinduzierten Druckwelle dargestellt und in (B) ein auf dem Oszilloskop betrachtetes optoakustisches Signal von BBBN

In der Arbeitsgruppe von Prof. Santi Nonell (Institut Químic de Sarrià, Barcelona) wird ein Nd:YAG Laser (Surelite I-10, Continuum, Santa Clara, Kalifornien, USA) bei seiner dritten Harmonischen (355 nm) zur Anregung der Proben verwendet. Der Laser hat eine Repetitionsrate von 10 Hz und die Pulse haben eine Pulsbreite von 5 ns und eine Energie von 1 bis 10 mJ/Puls. Die Laserenergie wird durch Filter und Spalte reduziert, so dass die maximale Energie, die die Probe erreicht, 0,00072 J = 100 % beträgt. Durch den Laserstrahl werden die Moleküle in der Lösung angeregt und können ihre Energie durch verschiedene strahlende oder nicht-strahlende Übergänge wieder abgeben. Die eingestrahlte Laserenergie E_a kann bei

nicht-strahlenden Übergängen als Wärme an das Medium oder bei strahlenden Prozessen als Fluoreszenz oder Phosphoreszenz abgeben werden. Für E_a gilt [BH92]:

$$E_a = \alpha \cdot E_a + \Phi_F \cdot E_F + \Phi_{st} \cdot E_{st} \quad (4.8)$$

Der erste Term gibt den Anteil α von E_a wieder, der als Wärme an das Medium abgegeben wird. Der zweite Term ist die Energie, die in Form von Fluoreszenz abgegeben wird und der dritte Term gibt die Energie wieder, die nicht innerhalb der experimentellen Beobachtungszeit abgegeben wird. Falls es keine anderen langlebigen Transiente gibt, ist es die Energie, die zunächst im langlebigen Triplett-Zustand gespeichert wird. So kann die Quantenausbeute Φ_{T_1} des Triplett-Zustandes, die die Effizienz wiedergibt, mit der durch inter-system-crossing der Triplett-Zustand T_1 besetzt wird, bestimmt werden.

$$\Phi_{T_1} = \frac{(1 - \alpha) \cdot E_a - \Phi_F \cdot E_F}{E_{T_1}} \quad (4.9)$$

Wenn also die Energien des ersten angeregten Singulett- und Triplett-Zustandes E_F und E_{T_1} und die Fluoreszenz-Quantenausbeute Φ_F bekannt sind, kann mit Hilfe der optoakustischen Spektroskopie α bestimmt werden und dadurch Φ_{T_1} . α wird über den Vergleich mit einer Referenz-Substanz bestimmt, die nicht fluoresziert, keine langlebigen Transiente hat und 100 % der absorbierten Energie als Wärme an das Medium abgibt ($\alpha=1$) [GV03]. Eine solche Referenz-Substanz, die bei der Anregungswellenlänge 355 nm absorbiert, ist Brilliant Black BN.

Die zu untersuchende Substanz und Brilliant Black BN werden in 4 bis 5 verschiedenen Konzentrationen in PBS gelöst. Die Absorption der Lösung wird bestimmt und danach wird für jede Lösung das optoakustische Signal für 11 verschiedene Energien zwischen 5 bis 100 % ermittelt. Ein Signal von Brilliant Black BN ist in Abbildung 4.12 B zu sehen. Um die Amplitude dieses Signal zu bestimmen, werden die Beträge der Amplitude der ersten positiven und negativen Signalwelle addiert. Die Amplituden werden graphisch gegen die entsprechenden Energien aufgetragen und die Steigungen der ermittelten Durchschnittsgeraden werden danach graphisch gegen die entsprechenden Absorptionen der Lösungen aufgetragen. Mit Hilfe der Steigung der Durchschnittsgeraden H dieses Graphen lässt sich α der zu untersuchenden Substanz (un) ermitteln:

$$\alpha = \frac{H_{un}}{H_{BBBN}} \quad (4.10)$$

5. Messergebnisse und Diskussion

5.1. Wasserlösliche Vitamine

5.1.1. Absorption

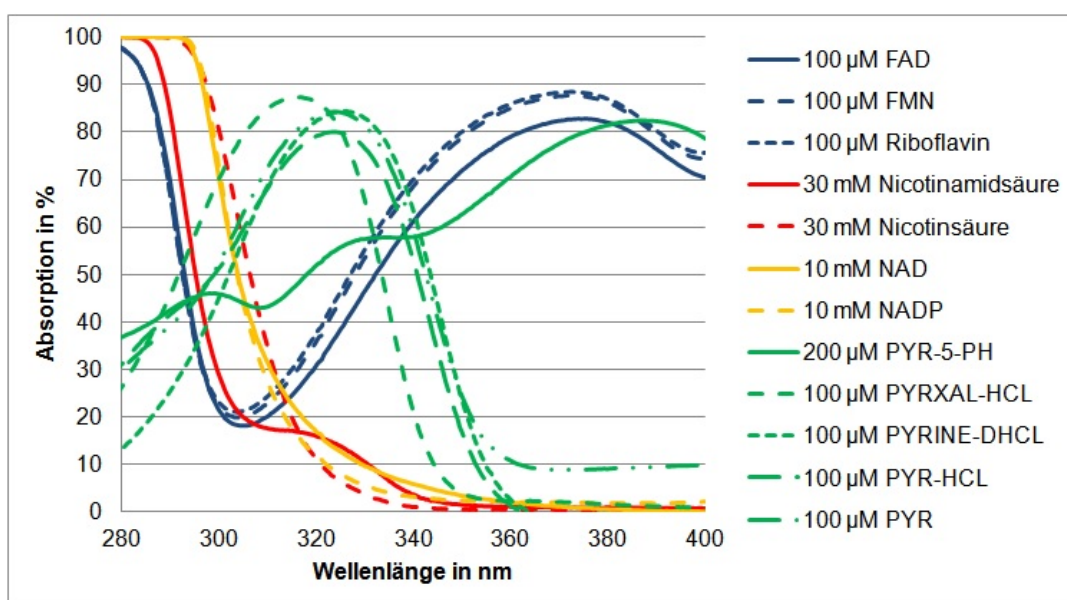


Abbildung 5.1.: Absorptionsspektren der untersuchten wasserlöslichen Vitamine

Die Voraussetzung für die photodynamische Generierung von 1O_2 ist die Absorption von Strahlung. Viele Moleküle konvertieren absorbierte Strahlung in Hitze, doch ein Charakteristika von Photosensibilisatoren ist ihre Fähigkeit, nach der Absorption von Strahlung durch ISC in einen langlebigen Triplett-Zustand zu wechseln. Von diesem Triplett-Zustand (Lebensdauer im Mikrosekunden Bereich) kann effizient Energie auf molekularen Sauerstoff transferiert werden und so kann 1O_2 erzeugt werden.

Für alle untersuchten wasserlöslichen Substanzen ist ein Absorptionsspektrum in D_2O bestimmt worden (siehe Kapitel 4.10), die in Abbildung 5.1 dargestellt sind.

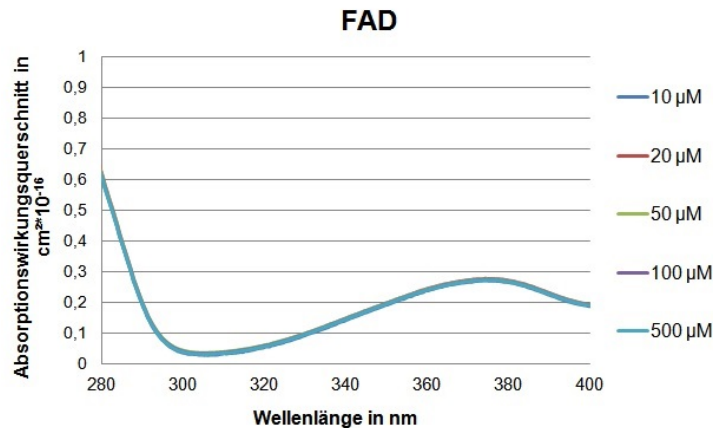
Da bei den meisten Experimenten die Vitamine mit einer Wellenlänge von 308 nm angeregt werden, wird eine Vitamin-Konzentration in wässriger Lösung (D_2O und/oder H_2O) gesucht, bei der die Absorption der Lösung bei mindestens 20 % bei 308 nm liegt. Dies ist eine ausreichende Absorption um effizient 1O_2 bei dieser Anregungswellenlänge zu erzeugen. In Tabelle 5.1 sind die wasserlöslichen Vitamine mit ihrer Absorption bei 308 nm und der entsprechenden Vitamin-Konzentration in wässriger Lösung dargestellt. Nicotinamid hat bei einer Konzentration von 30 mM nur eine Absorption von 19 %, aber in Kapitel 5.1.3 wird gezeigt, dass diese Absorption ausreichend ist, um ein 1O_2 Signal zu erzeugen. Für alle anderen Vitamine sind geringere Konzentrationen gefunden worden, bei denen die Vitamine mehr als 20 % absorbieren, wobei der Fehler des Absorptionsspektrometers ± 1 % beträgt.

Substanz	Konzentration	Absorption bei 308 nm in %	
		D_2O	H_2O
Riboflavin	100 μ M	22 ± 1	21 ± 1
FMN	100 μ M	21 ± 1	21 ± 1
FAD	100 μ M	19 ± 1	20 ± 1
PYR	50 μ M	41 ± 1	41 ± 1
PYR-HCL	50 μ M	34 ± 1	35 ± 1
PYR-5-PH	100 μ M	27 ± 1	29 ± 1
PYRINE-DHCL	50 μ M	39 ± 1	38 ± 1
PYRXAL-HCL	40 μ M	46 ± 1	47 ± 1
Nicotinsäure	30 mM	40 ± 1	nicht ermittelt
Nicotinamidsäure	30 mM	19 ± 1	nicht ermittelt
NAD	10 mM	35 ± 1	nicht ermittelt
NADP	10 mM	33 ± 1	nicht ermittelt

Tabelle 5.1.: Absorption der wasserlöslichen Vitamine bei 308 nm

5.1.2. Absorptionswirkungsquerschnitt

Mit der Transmission T , die das Absorptionsspektrometer misst, kann der Absorptionswirkungsquerschnitt σ wie in Kapitel 4.10 beschrieben, bestimmt werden. σ ist eine Materialkonstante. Für die verschiedenen wasserlöslichen Vitamine ist σ für verschiedene Konzentrationen berechnet worden. So kann bestimmt werden, ob die Molekülkonzentration in der Lösung einen Einfluss auf σ hat und damit das Molekül vermutlich ab einer bestimmten Konzentration aggregiert. Dies könnte Einfluss haben auf die Eigenschaft des Moleküls 1O_2 zu erzeugen, da das aggregierte Molekül andere Eigenschaften besitzen kann.

Abbildung 5.2.: σ für verschiedene Konzentrationen von FAD

Die meisten Vitamine zeigen für verschiedene Konzentrationen keine Veränderung des Absorptionswirkungsquerschnitts im UV Bereich. In Abbildung 5.2 ist σ für verschiedene Konzentrationen von FAD exemplarisch abgebildet. Es wird deutlich, dass sich σ für Konzentrationen im Bereich zwischen 10 und 500 μM im gesamten spektralen Bereich nicht verändert. Auch bei den Vitaminen FMN, Nicotinsäure, Nicotinamidsäure, NAD, NADP, PYR und PYRINE-DHCL kann keine Veränderung von σ für den untersuchten Konzentrationsbereich festgestellt werden.

Doch bei den Vitaminen PYR-HCL, PYRXAL-HCL und PYR-5-PH aus der B_6 -Gruppe ist für verschiedene Konzentrationen eine Änderung von σ festgestellt worden. Die σ für verschiedene Konzentrationen sind in Abbildung 5.3 dargestellt. Für PYR-HCL und PYRXAL-HCL sind bei einer Konzentrationen von 10 μM drei Peaks bei 220 nm, 250 nm und 330 nm sichtbar. Für höhere Konzentrationen werden diese drei Peaks weniger ausgeprägt, während ein neuer Peak bei ungefähr 280 nm entsteht. 10 μM PYR-5-PH hat zwei deutliche Peaks bei 220 und 380 nm. Bei höheren Konzentrationen von PYR-5-PH sind diese beiden Peaks weniger ausgeprägt, dafür entsteht ein neuer Peak bei ungefähr 280 nm. Es könnte sein, dass die Moleküle für höhere Konzentrationen aggregieren oder dass sich wegen der erhöhten Konzentration von PYR-HCL, PYRXAL-HCL und PYR-5-PH der pH- bzw. pD- Wert der Lösung ändert und damit die Struktur der Moleküle, denn die Vitamine der B_6 -Gruppe haben pH sensitive Seitengruppen und verändern sich bei verschiedenen pH-Werten [BLE⁺00].

Der normale pH-Wert von H_2O ist 7,0 und von D_2O 7,4 bei 25 ° Raumtemperatur. Durch die erhöhte Konzentration an den unterschiedlichen Formen von Vitamin B_6 , erhöht sich auch der Anteil der HCL,H und DHCL Moleküle im Lösungsmittel. Der Hydrochlorid-Rest der Vitamine (HCl) kann mit Wasser (H_2O) reagieren und es

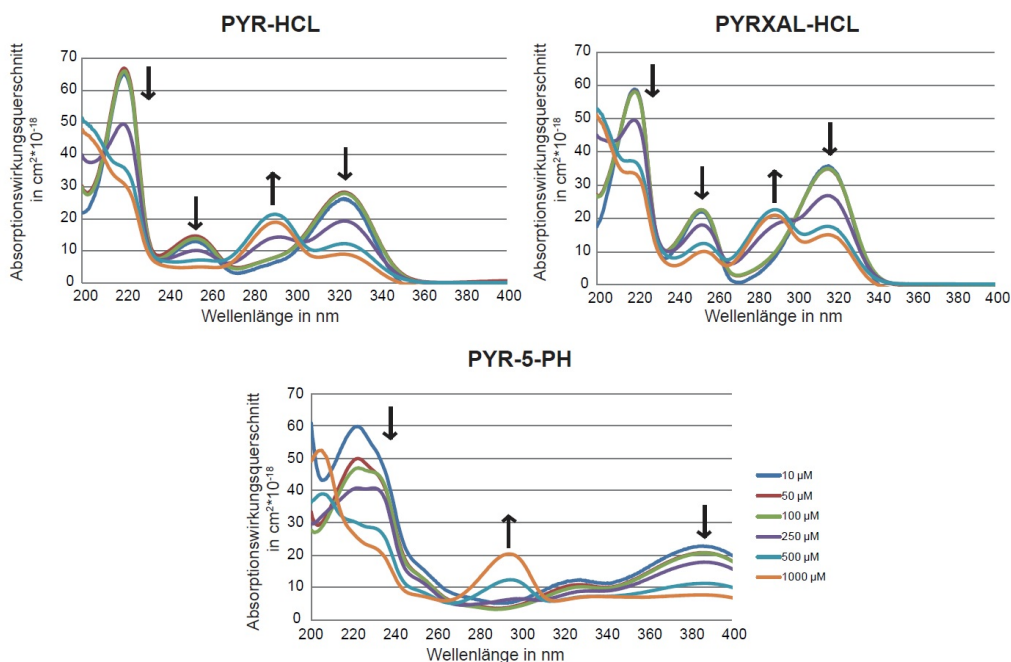


Abbildung 5.3.: σ für verschiedene Konzentrationen von PYR-HCL, PYRXAL-HCL und PYR-5-PH

entsteht Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure) [Atk94]. Darum sinkt der pH bzw. pD Wert der Lösung mit steigender Konzentration von Vitamin B_6 .

In Abbildung 5.4 sind die unterschiedlichen Strukturen, die Pyridoxin (PYR), Pyridoxal (PYRXAL) und Pyridoxal 5'phosphat (PYR-5-P) bei unterschiedlichen pH Werten annehmen kann, dargestellt. PYR und PYRXAL sind in Säure ($\text{pH} < 5.0$, 4.2) positiv geladen, in Basen ($\text{pH} > 8.96$, 8.66) negativ geladen und dazwischen gibt es eine elektrisch neutrale Form. PYRXAL hat allerdings eine Halbacetalform in sauren und neutralen Medien, aber in Basen existieren freie Aldehyde [WC68]. Durch NMR Experimente in Barcelona ist nachgewiesen worden, dass PYRXAL in neutralem Medium in Halbacetalform, in saurem Medium in einer positiv geladenen Halbacetalform und in Basen in einer negativ geladenen nicht-Halbacetalform vorliegt. PYR-5-P kann positiv, positiv und negativ, negativ, doppelt negativ und dreifach negativ geladen sein. Die Konstante pK_a beschreibt den Gleichgewichtszustand, wenn in der Lösung von beiden Strukturformen die gleiche Menge vorhanden ist. Die pK_a Konstanten für PYR sind 5,0 und 8,96, für PYRXAL 4,2 und 8,66 und für PYR-5-P 2,5, 4,14, 6,2 und 8,69 [BLE⁺00]. In Lösungen mit einem pH-Wert von 5 gibt es also genau gleich viele PYR mit einem geladenem Stickstoff, das mit einem Wasserstoffatom oder Deuteriumatom verbunden ist (PH^+) und ohne (P). Das lässt sich mathematisch durch den pK_a zeigen:

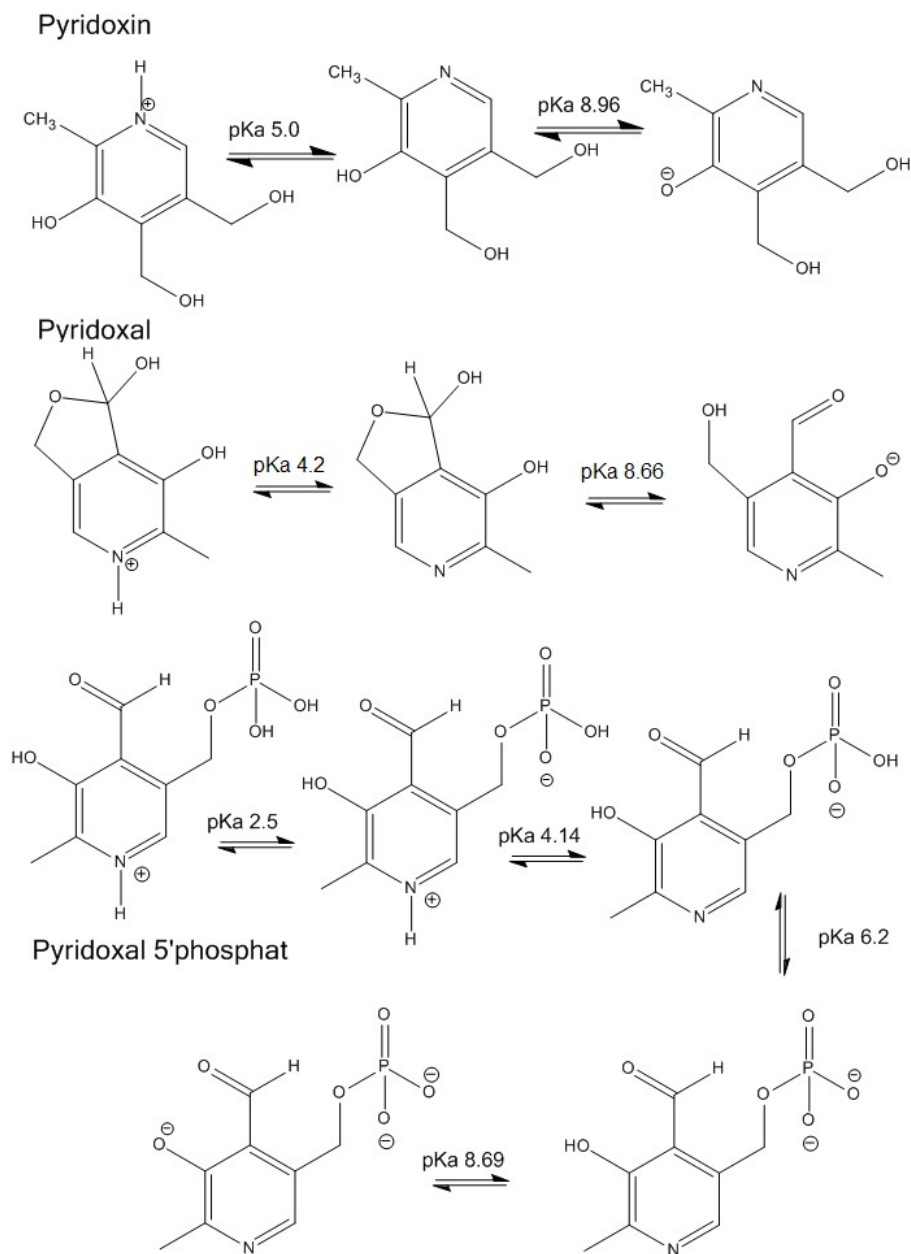


Abbildung 5.4.: Die Veränderung der Moleküle Pyridoxin, Pyridoxal und Pyridoxal 5'phosphat bei unterschiedlichen pH-Werten

$$pK_a = -\lg\left(\frac{c(H_3O^+) * c(P)}{c(PH^+)}\right) = -\lg(c(H_3O^+)) - \lg\left(\frac{c(P)}{c(PH^+)}\right) = pH - \lg\left(\frac{c(P)}{c(PH^+)}\right)$$

Für eine gleich große Konzentration an PYR mit Proton (PH^+) und PYR (P) ist also der $pK_a = pH$ und dieser pH-Wert ist 5. Durch die Erhöhung der Konzentration von PYR-HCL kann die Lösung einen so niedrigen pH-Wert bekommen, dass die zwei unterschiedlichen Formen von PYR im Absorptionsspektrum erkennbar sind. Um diese Theorie zu bestätigen werden von PYR, PYRXAL-HCL und PYR-5-PH Absorptionsspektren in PBS mit unterschiedlichen pH-Werten aufgenommen. Dazu wird eine Lösung von 200 μ M PYR, PYRXAL-HCL und PYR-5-PH in PBS hergestellt. Der pH-Wert der Lösung ist mit dem in Kapitel 4.2.2 beschriebenen pH-Meter ermittelt worden. PYR und PYRXAL haben jeweils zwei pK_a und wurden darum bei drei verschiedenen pH-Werten gemessen, die jeweils möglichst entfernt von den pK_a s sind, damit hauptsächlich eine Strukturform in der Lösung vorhanden ist. Von allen Lösungen wird ein Absorptionsspektrum gemessen. PYR-5-P hat vier verschiedene pK_a (2,5, 4,14, 6,2 und 8,69) und darum sind Absorptionsspektren bei einem pH-Wert von 1,5, 3,4, 5,1, 7,3 und 10,5, die jeweils möglichst entfernt von den pK_a s sind, damit hauptsächlich eine Strukturform in der Lösung vorhanden ist, gemessen worden. Von allen Lösungen wird ein Absorptionsspektrum gemessen. PYR-5-P hat vier verschiedene pK_a (2,5, 4,14, 6,2 und 8,69) und darum sind Absorptionsspektren bei einem pH-Wert von 1,5, 3,4, 5,1, 7,3 und 10,5 gemessen worden.

In Abbildung 5.5 sind die Absorptionsspektren für verschiedene pH-Werte zwischen den pK_a -Werten für PYR, PYRXAL-HCL und PYR-5-PH in PBS-Lösung dargestellt. Es ist erkennbar, dass sich die Absorptionsspektren mit dem pH-Wert in der PBS Lösung ändern. Für PYR und PYRXAL-HCL sind drei verschiedene Absorptionsspektren für die drei unterschiedlichen pH-Werte, die zu den drei unterschiedlichen Formen von PYR bzw. PYRXAL gehören (siehe Abbildung 5.4) erkennbar. Für PYR-5-PH zeigt Abbildung 5.5 deutlich vier unterschiedliche Absorptionsspektren, denn die Absorptionsspektren für pH 5,1 und 7,3 sind im Rahmen der Fehlergenauigkeit gleich. Ob nun eine oder zwei OH-Gruppen des Phosphat-Rest ihr Proton abgegeben haben, scheint sich also nicht auf die Absorption von PYR-5-P auszuwirken (siehe Abbildung 5.4).

In Abbildung 5.5 hat PYR in einer Lösung mit pH 7,1 Absorptionsmaxima bei etwa 220 nm, 250 nm und 340 nm, während es in einer Lösung mit pH 2,0 nur ein Maximum bei 290 nm besitzt. Wenn dies nun mit den σ für verschiedenen Konzentrationen von PYR-HCL in Abbildung 5.3 verglichen wird, ist erkennbar, dass für Konzentrationen bis 100 μ M PYR-HCL Peaks bei etwa 210 nm, 250 nm und 330 nm vorhanden sind und damit dem Absorptionsspektrum von PYR bei einem

pH von 7,1 gleicht. Es kann also angenommen werden, dass für Konzentrationen bis $100\ \mu\text{M}$ PYR-HCL Pyridoxin hauptsächlich in seiner ungeladenen Form vorliegt (siehe Abbildung 5.4). Für große Konzentrationen ($1000\ \mu\text{M}$) an PYR-HCL hat σ in Abbildung 5.3 ein zusätzliches Maximum bei $290\ \text{nm}$, das auch in dem Absorptionsspektra von PYR bei einem pH von 2,0 vorhanden ist (Abbildung 5.5). Auch für PYRXAL und PYR-5-P ist beim Vergleich der Abbildungen 5.3 und 5.5 erkennbar, dass für Konzentrationen bis $100\ \mu\text{M}$ σ jeweils der Absorption der neutralen Molekülform entspricht, während bei hohen Konzentrationen scheinbar auch protonisierte Molekülformen von PYRXAL bzw. PYR-5-P in der Lösung vorhanden sind.

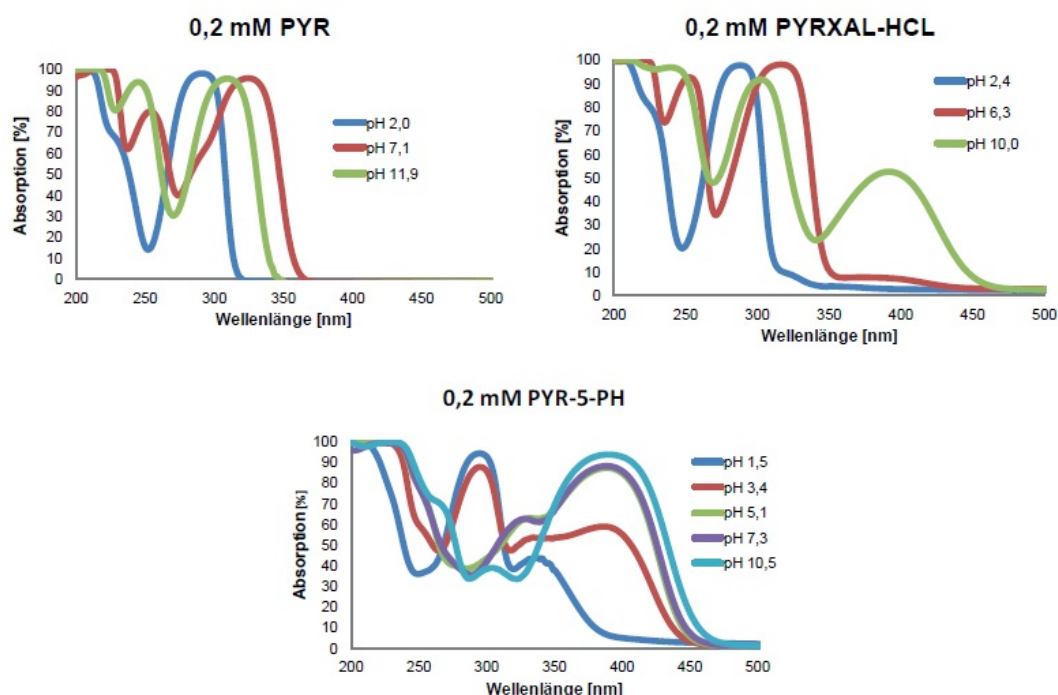


Abbildung 5.5.: Die Absorptionsspektra von PYR bei einem pH-Wert von 2,0, 7,1 und 11,9, von PYRXAL-HCL bei einem pH-Wert von 2,4, 6,3 und 10 und von PYR-5-PH bei einem pH-Wert von 1,5, 3,4, 5,1, 7,3 und 10,5

Die mögliche Änderung der Molekülstruktur mit dem pH-Wert der Lösung muss bei der Messung von $^1\text{O}_2$ Lumineszenz berücksichtigt werden. Es soll die $^1\text{O}_2$ Erzeugung der neutralen Molekülform von PYR, PYRXAL und PYR-5-P ermittelt werden und nicht von anderen durch den pH-Wert veränderten Substanzen. Für PYR-HCL, PYRXAL-HCL und PYR-5-PH werden deshalb nur Konzentrationen bis $100\ \mu\text{M}$ für die Messung von $^1\text{O}_2$ Lumineszenz verwendet, da bis einschließlich zu dieser Konzentration keine Veränderungen von σ zu beobachten sind, die darauf schließen lassen würden, dass sich der pH-Wert in der Lösung verändert hat, so dass es Auswirkungen auf die pH empfindlichen Seitengruppen von PYR, PYRXAL

und PYR-5-P hat. Natürlich hat auch PYRINE pH-Wert empfindliche Reste und pK_a Werte von 3,37, 8,01 und 10,13 [BLE⁺00]. Da sich σ für PYRINE-DHCL für Konzentrationen bis 1 mM nicht verändert, wird davon ausgegangen, dass bis zu dieser Konzentration hauptsächlich PYRINE in seiner neutralen Form in der Lösung vorhanden ist.

5.1.3. Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion von wasserlöslichen Vitaminen

Nachdem für alle untersuchten wasserlöslichen Vitamine eine Konzentration gefunden worden ist, bei der sie im UVB-Bereich (308 nm) ausreichende absorbieren (siehe Tabelle 5.1), soll festgestellt werden, ob sie bei UVB-Anregung 1O_2 erzeugen können. Dafür werden die Vitamine mit dem XeCl-Excimer Laser bei 308 nm angeregt. Der dazu verwendete Messaufbau wird in Kapitel 4.6 beschrieben. Da der XeCl-Excimer Laser eine sehr geringe Laserintensität von $7 \pm 1 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ hat, wird das 1O_2 Signal in D_2O ermittelt, denn in D_2O beträgt die Abklingdauer von 1O_2 66 μs [Ogi83]. Für zeitlich aufgelöste 1O_2 Signale wird ein Interferenzfilter bei 1270 nm mit einer Bandbreite von 30 nm verwendet und über 10000 Laserpulse summiert. Es konnten für alle untersuchten Substanzen außer NAD und NADP zeitlich aufgelöste 1O_2 Signale detektiert werden. Um zu bestätigen, dass es sich bei diesen Signalen wirklich um 1O_2 Lumineszenz handelt, werden unabhängig davon noch Lumineszenz Signale spektral aufgelöst detektiert.

Um 1O_2 nachzuweisen, wird Lumineszenz spektral aufgelöst in D_2O detektiert. Dazu werden verschiedene Interferenzfilter aus Tabelle 4.6 in den Messaufbau eingebaut und die Lumineszenz bei einer Anregung von 308 nm mit dem XeCl-Excimer Laser gemessen. Für eine Messung werden 5000 Laserpulse aufaddiert. Die ermittelten Signale werden ausgewertet (Kapitel 4.8) und in Abbildung 5.6 dargestellt. In Abbildung 5.6 sind die ermittelten Werte der Photonenzahl normiert und durch eine Lorenzfunktion gefittet worden. Es ist für alle Vitamine ein Peak des spektral aufgelösten 1O_2 Signals zwischen 1270 und 1280 nm erkennbar, was mit der Übergangsenergie von 1O_2 in D_2O von 1274 nm (0,975 eV) gut übereinstimmt [BFP⁺07].

Mit dem neuen Lasersystem, das in den Messaufbau integriert worden ist (Kapitel 4.7), können sowohl in D_2O als auch in H_2O gut auswertbare, zeitlich aufgelöste 1O_2 Signale ermittelt werden. Bei Anregung bei 308 nm kann eine Laserintensität von bis zu $45 \pm 3 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ in der Küvette erreicht werden. Mit einem zusätzlichen Filter vor der Küvette, um mögliche Strahlung im nicht UVB-Bereich auszuschließen, beträgt die Laserintensität in der Küvette bei 308 nm noch $29 \pm 2 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$. Bei

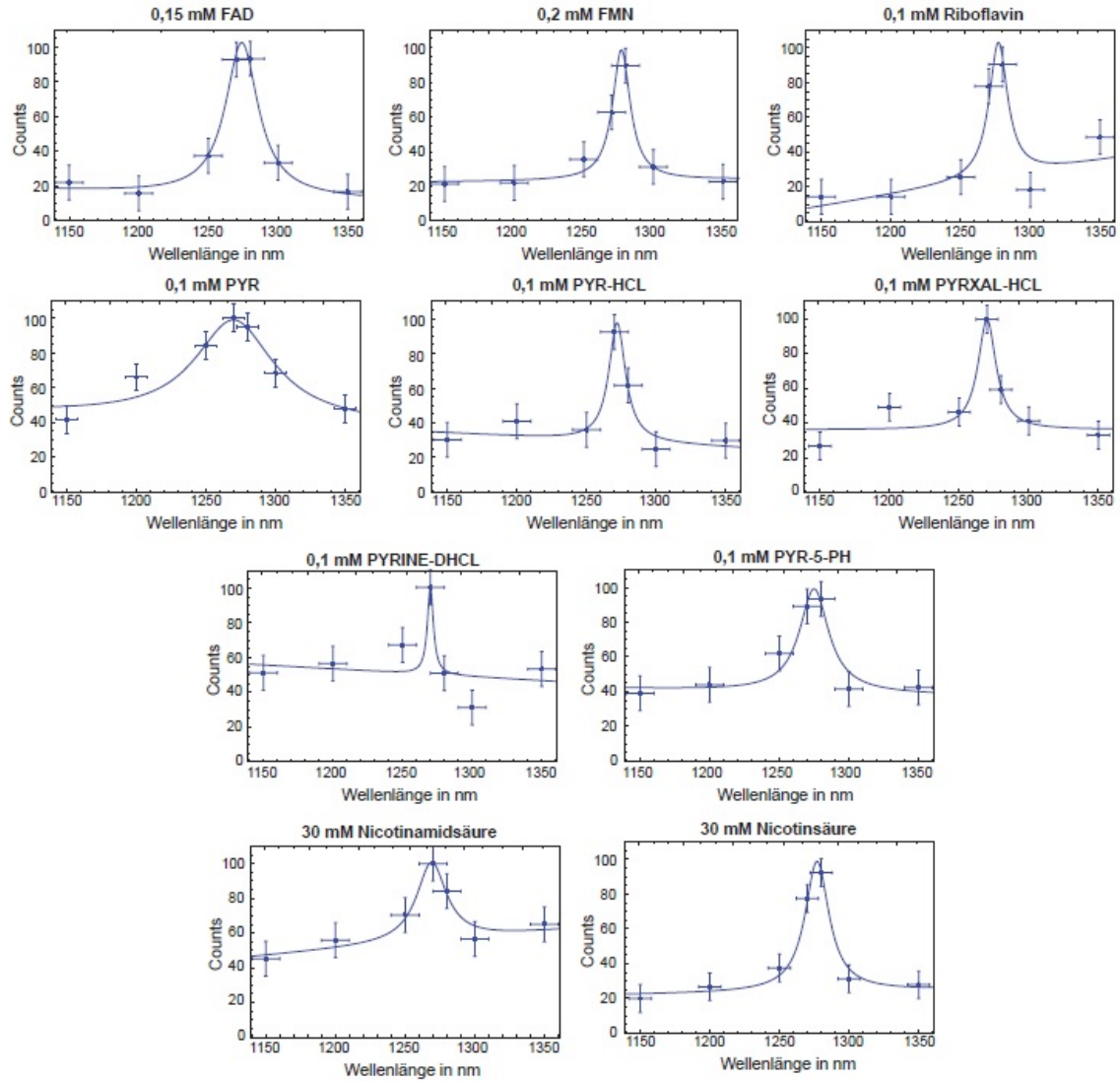


Abbildung 5.6.: spektral aufgelöst detektierte 1O_2 Signale von wasserlöslichen Vitaminen

dieser Laserintensität wird für alle Substanzen ein zeitlich aufgelöstes 1O_2 Signal bestimmt und wie in Kapitel 4.8 ausgewertet. Die gefitteten Abklingzeiten der 1O_2 Signale sind in Tabelle 5.2 dargestellt.

Substanz	H_2O		D_2O	
	Konzentration	τ [μs]	Konzentration	τ [μs]
Riboflavin	100 μM	$3,4 \pm 0,4$	100 μM	64 ± 7
FMN	100 μM	$3,5 \pm 0,4$	100 μM	64 ± 7
FAD	100 μM	$3,8 \pm 0,4$	100 μM	64 ± 7
PYR	100 μM	$3,5 \pm 0,4$	100 μM	51 ± 6
PYR-HCL	100 μM	$3,3 \pm 0,4$	100 μM	58 ± 6
PYR-5-PH	100 μM	$3,6 \pm 0,4$	100 μM	58 ± 6
PYRINE-DHCL	100 μM	$3,2 \pm 0,4$	100 μM	56 ± 6
PYRXAL-HCL	100 μM	$3,5 \pm 0,4$	100 μM	53 ± 6
Nicotinsäure	-	-	25 mM	67 ± 7
Nicotinamidsäure	-	-	25 mM	66 ± 7

Tabelle 5.2.: Die gefittete 1O_2 Abklingdauer τ in Vitaminlösungen in H_2O und D_2O

Für das Vitamin Riboflavin und die vom ihm ableitbaren Koenzyme FMN und FAD sind in H_2O und D_2O gut auswertbare, zeitlich aufgelöste 1O_2 Signale detektiert worden und die Anstiegs- und Abklingzeiten der Signale sind bestimmt worden. Die gefitteten Abklingzeiten (Tabelle 5.2) von Riboflavin, FMN und FAD stimmen mit der 1O_2 Abklingdauer in H_2O ($3,5 \pm 0,5 \mu s$ [Bai05]) und in D_2O ($67 \pm 3 \mu s$ [EKM+02]) überein. Für alle drei Substanzen wurden auch schon 1O_2 Signale bei einer Anregung im UVA Bereich detektiert [Bai05]. Für die Vitamine aus der B_6 -Gruppe (PYR, PYR-HCL, PYR-5-PH, PYRINE-DHCL und PYRXAL-HCL) sind sowohl in H_2O als auch in D_2O zeitlich aufgelöste 1O_2 Signale detektiert und die Anstiegs- und Abklingzeiten bestimmt worden. Für die Signale in H_2O stimmen die gefitteten Abklingzeiten gut mit der 1O_2 Abklingdauer in H_2O ($3,5 \pm 0,5 \mu s$ [Bai05]) überein. Die Abklingdauer der 1O_2 Signale in D_2O von PYR-HCL und PYR-5-PH stimmt im Rahmen der Messgenauigkeit mit der Abklingdauer von 1O_2 in D_2O ($67 \pm 3 \mu s$ [EKM+02]) überein. Doch die gefitteten Abklingzeiten von PYR, PYRINE-DHCL und PYRXAL-HCL stimmen nicht mehr mit der Abklingdauer von 1O_2 in D_2O überein, sondern sind kürzer. Ein Grund für die verkürzten Abklingdauern der 1O_2 Signale in D_2O der Vitamine der B_6 -Gruppe könnte sein, dass diese Vitamine bekannt dafür sind 1O_2 in D_2O zu quenchern mit Raten zwischen $5,5 \cdot 10^7 M^{-1} s^{-1}$ und $7,5 \cdot 10^7 M^{-1} s^{-1}$ [BLE+00]. Außerdem passen die gemessenen Abklingdauern der Vitamine der B_6 -Gruppe in D_2O gut dem Literaturwert von $55 \pm 5 \mu s$ für die Abklingzeit der Vitamine der B_6 -Gruppe in D_2O [DKK94] bei Anregung im UVA Bereich überein. Für Nicotinsäure und Nicotinamidsäure ist weder für UVA noch für UVB Anregung ein Literaturnachweis über 1O_2 Erzeugung gefunden worden. Dass

diese beiden Substanzen 1O_2 erzeugen, wird also in dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen. Die 1O_2 Signale in H_2O sind allerdings so schwach, dass die Anstiegs- und Abklingzeiten nicht gefittet werden konnten. Aber die ermittelten Abklingdauern der 1O_2 Signale in D_2O (Tabelle 5.2) stimmen sowohl für Nicotinsäure als auch für Nicotinamidsäure mit der 1O_2 Abklingdauer in D_2O überein.

5.1.4. Singulett-Sauerstoff Quantenausbeuten (UVB, UVAI, UVAII) von wasserlöslichen Vitaminen

Die 1O_2 Quantenausbeute Φ_Δ beschreibt, welcher Anteil der von den endogenen Vitaminen absorbierten Photonen zur Erzeugung von 1O_2 führt. Die Quantenausbeute Φ_Δ kann indirekt über den Vergleich mit Referenzsubstanzen bestimmt werden. Diese Methode wird in Kapitel 3.6.1 beschrieben. Als wasserlösliche Referenzsubstanzen werden PNS mit einem Φ_Δ von $0,97 \pm 0,06$ in H_2O [MJC⁺96] und TMPyP mit einem Φ_Δ in H_2O von $0,77 \pm 0,04$ [BML⁺07] verwendet. Die in Tabelle 5.3 aufgeführten Vitamine und die Referenzsubstanzen werden in drei bis fünf unterschiedlichen Konzentrationen in H_2O gelöst. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass die Absorption bei der entsprechenden Anregungswellenlänge nicht unter 5 % und nicht über 60 % betrug. Zunächst wird die 1O_2 Quantenausbeute Φ_Δ für UVB Anregung mit der Wellenlänge 308 nm bestimmt. Die Laserintensität bei 308 nm wird durch einen Filter auf 70 % der ursprünglichen Intensität reduziert. Die absorbierte Energie E_{Abs} der Vitamine und Referenzsubstanzen wird über die gemessene Absorption bei 308 nm und die eingestrahlte Laserenergie bei 308 nm bestimmt. Danach werden die 1O_2 Lumineszenz Signale der gelösten Vitamine und Referenzsubstanzen gemessen. Die Lumineszenzenergie E_{Lum} wird mit der Summe aller detektierten Lumineszenzphotonen des 1O_2 Signals (Anzahl der Lumineszenzphotonen) gleichgesetzt. Mit der bekannten Quantenausbeute der Referenzsubstanz kann über den Vergleich der Steigungen $\frac{E_{Lum}}{E_{Abs}}$ die gesuchte Quantenausbeute bestimmt werden. In Abbildung 5.7 sind die Steigungen $\frac{E_{Lum}}{E_{Abs}}$ beispielhaft für FAD und die Referenzsubstanzen PNS und TMPyP eingezeichnet und berechnet. Aus dem Vergleich dieser Steigungen kann mit den bekannten Quantenausbeuten von PNS und TMPyP in H_2O die Quantenausbeute von FAD in H_2O bestimmt werden.

In Tabelle 5.3 sind für alle wasserlöslichen Vitamine, bei denen im Lösungsmittel H_2O gut auswertbare 1O_2 Signale gemessen werden können, die 1O_2 Quantenausbeute bei einer Anregung von 308 nm in der zweiten Spalte von links dargestellt. Außerdem ist für diese Substanzen noch die 1O_2 Quantenausbeute für die Anregung im UVAII Bereich bei 330 nm (dritte Spalte von links) und im UVAI Bereich bei 370 nm (ganz rechte Spalte) auf die gleiche beschriebene Weise ermittelt und in Tabelle

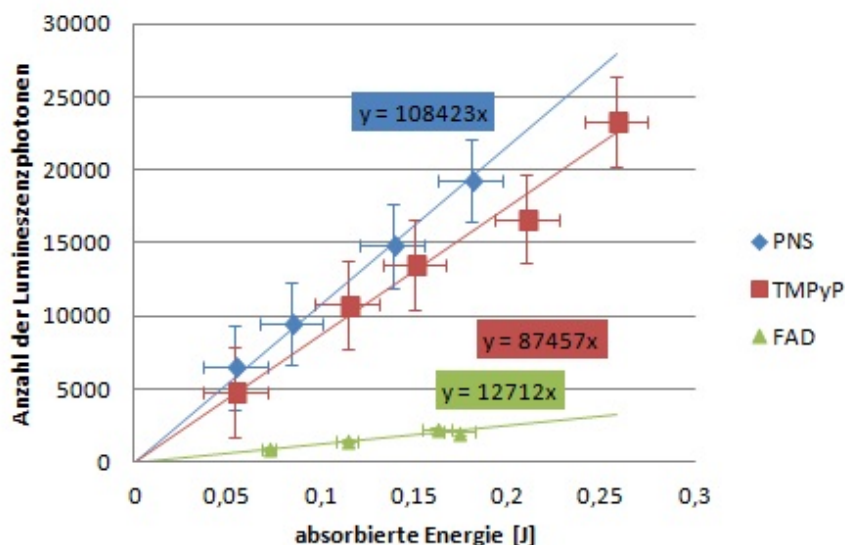


Abbildung 5.7.: Die Bestimmung der Quantenausbeute von FAD durch den Vergleich der Steigungen von Lumineszenzenergie pro absorbierte Energie mit den Referenzsubstanzen PNS und TMPyP

5.3 dargestellt worden. Der angenommene Fehler der ermittelten $^1\text{O}_2$ Quantenausbeuten beträgt 10 % für Quantenausbeuten über 0,10. Für kleinere Quantenausbeuten wird wegen dem großen Unterschied in der Effektivität der $^1\text{O}_2$ Erzeugung zwischen Referenzsubstanzen und zu untersuchender Substanz ein Fehler von 20 % angenommen.

Substanz	308 nm	330 nm	370 nm
Riboflavin	$0,61 \pm 0,07$	$0,64 \pm 0,07$	$0,58 \pm 0,06$
FMN	$0,58 \pm 0,06$	$0,64 \pm 0,07$	$0,58 \pm 0,06$
FAD	$0,16 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,02$
PYR	$0,11 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,02$	-
PYR-HCL	$0,07 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,01$	-
PYR-5-PH	$0,16 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,02$
PYRINE-DHCL	$0,06 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,01$	-
PYRXAL-HCL	$0,08 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,02$	-

Tabelle 5.3.: $^1\text{O}_2$ Quantenausbeuten Φ_{Δ} der wasserlöslichen Vitamine bei einer Anregungswellenlänge von 308, 330 und 370 nm in H_2O

Riboflavin hat eine $^1\text{O}_2$ Quantenausbeute von $0,61 \pm 0,07$ für eine Anregungswellenlänge von 308 nm. Dieser Wert stimmt im Rahmen der Fehlergenauigkeit mit den ermittelten Werten für Anregung bei 330 und 370 nm überein. Außerdem stimmt er

mit dem in der Literatur gefundenen Wert von $0,54 \pm 0,07$ bei Anregung mit 355 nm überein [Bai05]. Auch bei FMN stimmt die Quantenausbeute bei einer Anregung von 308 nm von $0,58 \pm 0,06$ mit den ermittelten Werten für eine Anregung von 330 nm und 370 nm und dem Literaturwert von $0,51 \pm 0,07$ [Bai05] innerhalb der Messgenauigkeit überein. FAD hat eine Quantenausbeute von $0,16 \pm 0,02$ bei einer Anregung bei 308 nm, was im Rahmen der Messgenauigkeit mit den ermittelten Quantenausbeuten bei einer Anregung von 330 und 370 nm übereinstimmt. In der Literatur wird für FAD eine Quantenausbeute von $0,07 \pm 0,01$ [Bai05] angegeben. Dieser Wert ist deutlich kleiner, als die in den Messungen ermittelten Quantenausbeuten.

Bei einer Wellenlänge von 370 nm kann für die Vitamine PYR, PYR-HCL, PYRXINE-DHCL und PYRXAL-HCL wegen zu geringer Absorption keine 1O_2 Quantenausbeute ermittelt werden. Die ermittelten Quantenausbeuten bei einer Anregung von 308 und 330 nm stimmen aber für alle Substanzen im Rahmen der Fehlergenauigkeit überein. PYR-5-PH absorbiert sowohl bei 370, 330 und 308 nm und die ermittelten Quantenausbeuten stimmen innerhalb der Messgenauigkeit überein. In der Literatur werden die 1O_2 Quantenausbeuten für die Vitamine der B_6 Gruppe bei Anregung im UVA-Bereich (355 nm) in D_2O untersucht [DKK95] [DKK94]. Nur der Literaturwert von Pyridoxamin ($0,06 \pm 0,02$) [DKK95] stimmt im Rahmen der Fehlergenauigkeit mit den ermittelten Quantenausbeuten für eine Anregung bei 308 und 330 nm überein. Die Literaturwerte für Pyridoxin ($0,28 \pm 0,04$) [DKK95], Pyridoxal ($0,44 \pm 0,06$) [DKK95] und Pyridoxal-5-phosphat ($0,56 \pm 0,07$) [DKK94] stimmen nicht mit den ermittelten 1O_2 Quantenausbeuten überein. Die gemessenen Quantenausbeuten sind alle deutlich kleiner als die Werte in der Literatur.

Um auszuschließen, dass der Unterschied in den Quantenausbeuten durch das Lösungsmittel D_2O bzw. H_2O verursacht wird, ist die 1O_2 Quantenausbeute für die Vitamine der B_6 Gruppe nochmal im Lösungsmittel D_2O mit einer Anregungswellenlänge von 308 nm untersucht worden und in Tabelle 5.4 sind die ermittelten 1O_2 Quantenausbeuten aufgelistet. Die Quantenausbeuten in D_2O stimmen für alle Substanzen außer PYR im Rahmen der Messgenauigkeit mit den ermittelten Quantenausbeuten in H_2O bei einer Anregung von 308 nm überein. Die Quantenausbeute von PYR ist mit $0,05 \pm 0,01$ in D_2O deutlich kleiner als $0,11 \pm 0,02$ in H_2O . Dies kann aber darauf zurückgeführt werden, dass bei der angewendeten Methode der Quantenausbeuten Ermittlung über den Vergleich mit einer Referenz-Substanz das Quenchen von 1O_2 berücksichtigt wird. Die Lumineszenzenergie wird über die Summe aller Photonen eines Lumineszenz-Signals gebildet. So ist für ein Signal mit einer verkürzten 1O_2 Abklingdauer z.B. von 51 μs von PYR (siehe Tabelle 5.2) die Summe der Photonen natürlich im Verhältnis kleiner als bei einem Signal, dass eine typische 1O_2 Abklingdauer (67 ± 3 [EKM⁺02]) in D_2O hat. Die Vitamine der B_6 Gruppe sind alle bekannte 1O_2 Quencher, aber die Ratenkonstante des Quenchens ändert sich mit

dem pD der Lösung und ist für basische Lösungen größer und für saure Lösungen um ein vielfaches kleiner als in Lösungen mit einem pD von 6,2 [BLE⁺00]. Aus diesem Grund ist für PYR, das in D_2O (pD von 7,4) gelöst ist, die Quenchrage besonders hoch im Gegensatz zu PYR-HCL, PYR-5-PH, PYRXAL-HCL und PYRINE-DHCL, die auf Grund ihrer Restgruppe alle in D_2O mit einem pD unter 7,4 gelöst sind. Dies spiegelt sich in der am stärksten verkürzten 1O_2 Lebensdauer in D_2O (siehe Tabelle 5.2) und in einer geringeren 1O_2 Quantenausbeute in D_2O wieder.

Substanz	308 nm
Nicotinsäure	$0,05 \pm 0,01$
Nicotinamidsäure	$0,64 \pm 0,07$
PYR	$0,05 \pm 0,01$
PYR-HCL	$0,08 \pm 0,02$
PYR-5-PH	$0,12 \pm 0,02$
PYRINE-DHCL	$0,05 \pm 0,01$
PYRXAL-HCL	$0,06 \pm 0,02$

Tabelle 5.4.: 1O_2 Quantenausbeuten Φ_Δ der wasserlöslichen Vitamine bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm in D_2O

Die ermittelten Werte sowohl in D_2O als auch in H_2O sind also für alle Vitamine der B_6 -Gruppe außer PYRINE-DHCL deutlich kleiner als die gefundenen Werte in der Literatur (Pyridoxin ($0,28 \pm 0,04$), Pyridoxal ($0,44 \pm 0,06$), Pyridoxal-5-phosphat ($0,56 \pm 0,7$) [DKK95] [DKK94]). Dies kann vielleicht mit den unterschiedlichen Methoden der Ermittlung der 1O_2 Quantenausbeute erklärt werden. Die Literaturwerte sind über den Vergleich der Lumineszenz-Signal Amplituden mit Referenzsubstanzen bestimmt worden [DKK95], während in dieser Arbeit die Lumineszenz-Energie über die Summe aller Lumineszenzphotonen bestimmt worden ist, wodurch sich das Quenchen von 1O_2 durch die Substanz in der Quantenausbeute widerspiegelt. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Quantenausbeuten bei unterschiedlichen pH bzw. pD Werten bestimmt worden sind. Die Quantenausbeuten in dieser Arbeit sind mit Konzentrationen an PYR, PYR-HCL, PYRINE-DHCL und PYRXAL-HCL in H_2O so bestimmt worden, dass der pH-Wert der Lösung nicht unter den pK_a -Wert der entsprechenden Substanz sank (siehe Kapitel 5.1.2). Somit war der pH-Wert der Lösung zwischen 7 (reines H_2O) bzw. 7,4 (reines D_2O) und pH gleich pK_a -Wert der entsprechenden Substanz. Für die Literaturwerte wird nicht angegeben bei welchem pD-Wert sie gemessen worden sind. Da die Substanzen sich mit dem pD-Wert ändern, ist anzunehmen, dass die verschiedenen Substanzen auch verschiedene Quantenausbeuten haben. Falls die Literaturwerte bei anderen pD-Werten bestimmt worden sind, wäre dies eine Erklärung für die großen Abweichungen.

Um zu bestätigen, dass sich der pH-Wert einer Lösung auf die 1O_2 Erzeugung ei-

pH-Wert	Quantenausbeute Φ_{Δ} von PYR-5-PH
1,5	$0,27 \pm 0,06$
3,3	$0,09 \pm 0,02$
5,1	$0,16 \pm 0,04$
7,3	$0,16 \pm 0,04$
10,5	$0,05 \pm 0,02$

Tabelle 5.5.: 1O_2 Quantenausbeuten Φ_{Δ} von in PBS gelöstem PYR-5-PH bei verschiedenen pH-Werten bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm

ner pH-empfindlichen Substanz auswirken kann, ist die 1O_2 Quantenausbeute von PYR-5-PH bei unterschiedlichen pH-Werten gemessen worden. Dazu werden Lösungen von 200 μM PYR-5-PH in PBS hergestellt und mit dem pH-Meters (Kapitel 4.2.2) wurde der pH-Wert der Lösungen bestimmt. Es werden fünf 200 μM PYR-5-PH Lösungen mit einem pH von 1,5, 3,3, 5,1, 7,3 und 10,5 hergestellt. Diese pH-Werte wurden ausgewählt, da sie genau zwischen den pK_a Werten von PYR-5-PH liegen [BLE⁺00]. Die Quantenausbeute ist mit dem in Kapitel 4.9 beschriebenen Messaufbau durch den Vergleich mit der Referenz-Substanz TMPyP bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm bestimmt worden. Dazu wird die Absorption von den PYR-5-PH Lösungen mit verschiedenen pH-Werten bei 355 nm bestimmt. Danach wird TMPyP so in PBS gelöst, dass es eine identische Absorption bei 355 nm hat. Für diese fünf PYR-5-PH und TMPyP Lösungen mit identischer Absorption bei 355 nm, wird das 1O_2 Signal bestimmt (Kapitel 4.9). Danach werden die Amplituden der ausgewerteten PYR-5-PH und der entsprechenden TMPyP Signal verglichen und wie in Kapitel 4.9 beschrieben, die Quantenausbeute berechnet. Die für die verschiedenen pH-Werte ermittelten Quantenausbeuten von PYR-5-PH sind in Tabelle 5.5 dargestellt. Für die pH-Werte 5,1 und 7,3 in der Lösung sind die gleichen Quantenausbeuten mit $0,16 \pm 0,04$ bestimmt worden. Dieser Wert stimmt auch überein mit den Messungen der 1O_2 Quantenausbeute bei Anregungswellenlängen von 308 nm, 330 nm und 370 nm (siehe Tabelle 5.3). In Tabelle 5.5 ist aber auch erkennbar, dass sich die 1O_2 Quantenausbeute mit dem pH-Wert der Lösung ändert und in extrem basische Lösungen (pH von 10,5) ist die 1O_2 Quantenausbeute mit $0,05 \pm 0,02$ sehr klein. Für extrem saure Lösungen (pH von 1,5) war die 1O_2 Quantenausbeute von PYR-5-PH mit $0,27 \pm 0,06$ ziemlich hoch. Die 1O_2 Quantenausbeute von PYR-5-PH ist also eindeutig vom pH-Wert der Lösung abhängig und dies sollte beim Vergleich mit Literaturwerten auch immer berücksichtigt werden.

Die 1O_2 Quantenausbeute von Nicotinsäure und Nicotinamidsäure in D_2O ist bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm bestimmt worden. Für die Anregungswellenlängen 330 nm (UVAII) und 370 nm (UVAI) absorbierten die beiden Substanzen für Konzentrationen bis 30 mM nicht (siehe Abbildung 5.1), weshalb bei diesen An-

regungswellenlängen keine 1O_2 Quantenausbeute bestimmt werden kann. Die ermittelten Quantenausbeuten für eine Anregung bei 308 nm in D_2O sind in Tabelle 5.4 dargestellt. Nicotinsäure hat eine Quantenausbeute von $0,05 \pm 0,01$ und Nicotinamidsäure eine von $0,64 \pm 0,07$. Beide Substanzen waren bisher nicht als endogene UVA-Photosensibilisator bekannt und in der Literatur sind keine Werte zur 1O_2 Quantenausbeute von Vitamine B_3 gefunden worden. Beide Substanzen erzeugen aber bei UVB Anregung 1O_2 und Nicotinamid mit eine Quantenausbeute von $0,64 \pm 0,07$ auch sehr effektiv.

5.1.5. Photostabilität von wasserlöslichen Vitaminen

Wenn sich die Struktur eines Moleküls verändert, kann sich damit auch seine Fähigkeit 1O_2 zu erzeugen verändern. So ist für die Vitamine der B_6 Gruppe bereits festgestellt worden, dass sie ihre Struktur verändern können, wenn sich der pH-Wert der Lösung ändert und dass die veränderten Moleküle eine andere 1O_2 Quantenausbeute haben (siehe Kapitel 5.1.4). Die Struktur eines Moleküls kann sich aber auch durch Bestrahlung der Moleküle verändern (Photobleaching). UVB Strahlung hat die Fähigkeit die Struktur von Molekülen zu verändern. Damit ändert sich mit der UVB Bestrahlung gegebenenfalls auch die Fähigkeit der Vitamine durch 1O_2 Erzeugung zelluläre Schäden zu verursachen und damit ihre biologische Wirkung. Deshalb wird die Photostabilität der verschiedenen wasserlöslichen Vitamine bei breitbandiger UVB Bestrahlung untersucht. Dafür werden die in wässriger Lösung gelösten Vitamine, wie in Kapitel 4.11 beschrieben, mit verschiedenen UVB Dosen bestrahlt. Vor und nach der Bestrahlung wird das Absorptionsspektrum der Lösung gemessen (siehe Kapitel 4.10), um mögliche Veränderungen der Absorption zu ermitteln und damit mögliche Veränderungen der Molekülstruktur. Bei den Messungen werden UVB Dosen zwischen 0 und $6,62 \pm 0,07 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ auf die Lösungen in der Quarzglasküvette appliziert. Ein Molekül wird als photostabil betrachtet, wenn sich sein Absorptionsspektrum im gesamten Spektralbereich im Rahmen der Messgenauigkeit nicht verändert.

In Abbildung 5.8 sind die Absorptionsspektren der wasserlöslichen Vitamine nach der Bestrahlung mit 0, 0,27, 0,95 und $6,62 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB dargestellt. Dabei entspricht $0,95 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ einer durchschnittlichen UVB Tagesdosis in Potsdam [FJG02]. Nur Nicotinamidsäure kann in einem Spektralbereich von 280 bis 400 nm als photostabil bis zu UVB Dosen von $6,62 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ betrachtet werden. Für Riboflavin, FMN und Nicotinsäure konnten für eine UVB Dosis bis $0,95 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ keine Änderungen des Absorptionsspektrums im Rahmen der Messgenauigkeit festgestellt werden. Für eine UVB Dosis von $6,62 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ hat sich das Absorptionsspektrum verändert. Diese Moleküle sind also nur photostabil im Spektralbereich von 280 bis 400 nm

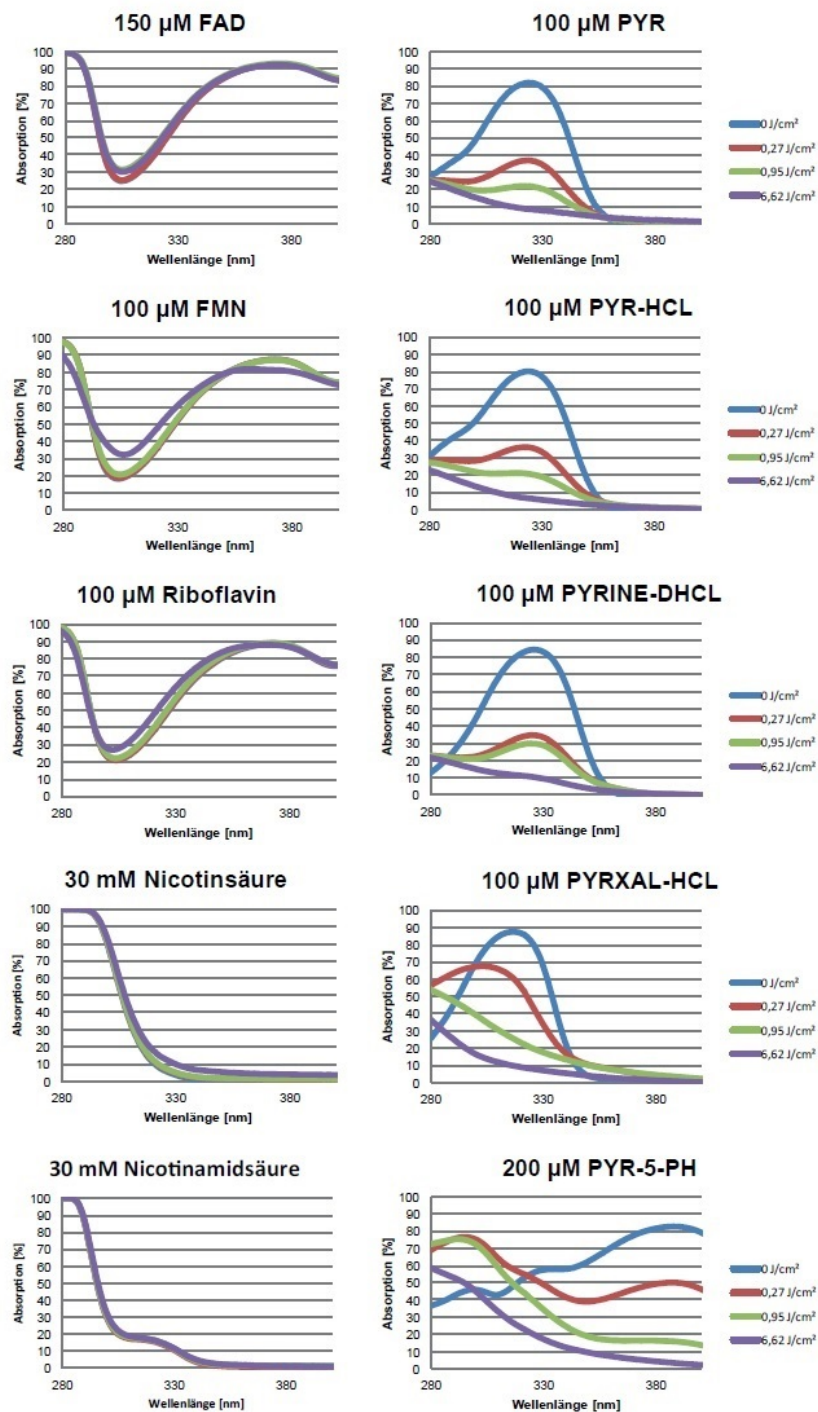


Abbildung 5.8.: Die Absorptionsspektren der wasserlöslichen Vitamine nach Bestrahlung mit verschiedenen UVB Dosen

bis zu einer UVB Dosis von $0,95 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$. FAD war im Rahmen der Messgenauigkeit photostabil in einem Spektralbereich von 280 nm bis 400 nm bis zu einer UVB Dosis von $0,27 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$. Für eine UVB Dosis von $0,95 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ ist eine Veränderung des Absorptionsspektrum sichtbar. Das Flavine durch Bestrahlung mit Licht photoabgebaut werden können, ist in der Literatur bekannt [Gör]. Doch die Effektivität des Photoabbau durch Licht in der Gegenwart von Sauerstoff ist für FMN und Riboflavin gering [Gör]. Dies passt sehr gut mit den Messergebnissen der UVB-Photostabilität der Flavine überein, da FMN und Riboflavin für UVB Dosen bis $0,95 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ photostabil im UV-Spektralbereich sind. Abbauprodukte von Riboflavin können Lumiflavin und Lumichrome sein [HKM06]. Alle Vitamine der B_6 Gruppe sind nicht photostabil. Sogar für eine UVB-Dosis von $0,27 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ ist eine deutliche Veränderung im UV-Spektralbereich für alle Vitamine der B_6 Gruppe sichtbar. Dass die Vitamine der B_6 Gruppe nicht photostabil sind, kann dadurch erklärt werden, dass sie durch $^1\text{O}_2$ oxidiert werden [BLE⁺00].

Name	Absorption bei 308 nm [%]		Absorption bei 355 nm [%]	
	$0 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$	$1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$	$0 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$	$1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$
UVB				
Riboflavin	23	24	84	85
FMN	21	21	83	82
FAD	26	32	88	89
PYR	66	19	8	5
PYR-HCL	65	21	6	4
PYR-5-PH	43	61	67	17
PYRXINE-DHCL	65	24	9	6
PYRXAL-HCL	83	32	2	9
Nicotinsäure	41	42	0	1
Nicotinamidsäure	17	17	1	1

Tabelle 5.6.: Veränderungen der Absorption der wasserlöslichen Vitamine nach Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB. Ein Anstieg der Absorption $\geq 2 \%$ ist in rot und ein Abfall in blau markiert.

Um einen genaueren Einblick zu bekommen, wie sich die Absorption der wasserlöslichen Vitamine verändert, wenn sie mit UVB bestrahlt werden, sind die Absorptionsspektren vor und nach der Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB ausgewertet worden. In Tabelle 5.6 sind die Veränderungen der Absorption für die Wellenlängen 308 nm (UVB) und 355 nm (UVA) dargestellt worden. Ein Anstieg der Absorption nach UVB Bestrahlung wird durch eine rote Zahl und eine Abnahme durch eine blaue Zahl hervorgehoben. Da bei der Messung der Absorption ein Fehler von 1 % angenommen wird, werden erst Anstiege und Abnahmen ab 2 % hervorgehoben. Für die Vitamine Nicotinamidsäure, Nicotinsäure, Riboflavin und FMN kann für die Be-

strahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB keine Veränderung der Absorption bei 308 und 355 nm festgestellt werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen für die Bestrahlung mit $0,95 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB in Abbildung 5.8 überein. Für FAD werden nur Veränderungen in der Absorption bei 308 nm festgestellt. Die Absorption der Vitamine der B_6 Gruppe hat sich sowohl bei 308 als auch bei 355 nm deutlich verändert, was durch die Oxidation dieser Vitamine durch $^1\text{O}_2$ erklärt werden kann. Für PYR, PYR-HCL und PYRINE-DHCL ist die Absorption sowohl bei 308 nm als auch bei 355 nm gesunken. Für PYR-5-PH stieg die Absorption bei 308 nm an und für PYRXAL-HCL bei 355 nm.

Name	Absorption UVB (280-320 nm)	Absorption UVA (320-400 nm)
UVB	$1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$	$1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$
Riboflavin	+ 3 %	+ 2 %
FMN	unverändert	unverändert
FAD	+ 8 %	+ 2 %
PYR	- 60 %	- 70 %
PYR-HCL	- 58 %	- 70 %
PYR-5-PH	+ 50 %	- 69 %
PYRXINE-DHCL	- 51 %	- 62 %
PYRXAL-HCL	- 41 %	- 47 %
Nicotinsäure	+ 1 %	unverändert
Nicotinamidsäure	unverändert	+ 5 %

Tabelle 5.7.: Veränderungen der Absorption der wasserlöslichen Vitamine nach Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB im gesamten UVB bzw. im gesamten UVA Bereich in %.

Um die Veränderungen im ganzen UVA bzw. UVB Bereich zu betrachten, werden die Absorptionsspektren vor und nach der Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB gemessen und dann werden alle Werte der Absorption im UVA bzw. UVB Spektralbereich summiert. Die Differenz der Summen vor und nach der Bestrahlung wird gebildet und daraus wird die prozentuale Veränderung zum Ursprungswert berechnet. Die prozentuale Veränderung der Absorption im UVA bzw. UVB Bereich ist in Tabelle 5.7 dargestellt worden. Erwartungsgemäß sind die Veränderungen der Absorption im UVA und UVB Bereich für Nicotinamidsäure, Riboflavin, FMN und FAD nur sehr gering oder unter 1 % (unverändert). Für Nicotinamidsäure wird im UVA Bereich ein Anstieg der Absorption um 5 % ermittelt. Der Anstieg um 5 % lässt sich dadurch erklären, dass die Absorption von Nicotinamidsäure im UVA Bereich nahezu Null ist und sich dadurch auch minimale Veränderungen der Absorption, die in den Fehlergrenzen liegen (unter 1 %) prozentual bemerkbar machen. Dieser Anstieg widerspricht also nicht der Tatsache, dass Nicotinamidsäure photostabil im

gesamten UV Bereich für UVB Dosen bis $6,62 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ ist (siehe Abbildung 5.8). Für alle Vitamin B_6 können deutliche Veränderungen in der Absorption sowohl in gesamten UVB als auch im UVA Bereich festgestellt werden. Für PYR, PYR-HCL, PYRINE-HCL und PYRXAL-HCL ist die Absorption in beiden Spektralbereichen deutlich gesunken, aber für PYR-5-PH ist die Absorption im UVB Bereich deutlich angestiegen.

Die Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB führt also für die Vitamine der B_6 Gruppe zu deutlich veränderten Absorptionsspektren. Diese Vitamine werden durch die Bestrahlung verändert und vermutlich durch $^1\text{O}_2$ oxidiert, wodurch neue Moleküle mit veränderten Absorptionsspektren entstehen. Diese Moleküle können andere photo-physikalischen Eigenschaften besitzen und damit auch eine unterschiedliche Effektivität in der Erzeugung von $^1\text{O}_2$ haben. Auch die Absorptionsspektren der Vitamine Riboflavin und FAD werden durch die Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB verändert und neue Photoabbauprodukte mit veränderter Absorption sind entstanden, allerdings in einem geringeren Ausmaß. FMN, Nicotinsäure und Nicotinamidsäure sind für UVB Dosen bis $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ photostabil im gesamten UV Bereich.

5.1.6. Wechselwirkung von UVA und UVB Strahlung bei wasserlöslichen Vitaminen

5.1.6.1. PYR, PYR-HCL, PYRINE-DHCL, PYRXAL-HCL und PYR-5-PH

Die Vitamine der B_6 Gruppe haben bei der Bestrahlung mit der UVB-Lampe schon bei einer UVB-Dosis von $0,27 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ ihr Absorptionsspektrum verändert (siehe Abbildung 5.8) und bei einer Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ hat sich die Absorption sowohl im UVA als auch im UVB Bereich deutlich verändert (siehe Tabelle 5.6). Bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm stieg die Absorption nach einer Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ für PYR-5-PH deutlich an, während sie für die anderen anderen Vitamine der B_6 Gruppe deutlich gesunken ist. Durch die Bestrahlung können die Vitamine der B_6 Gruppe photooxidiert werden und Photoabbauprodukte entstehen [BLE⁺00]. Um zu bestimmen, ob die Photoabbauprodukte tatsächlich durch Oxidation der Vitamine der B_6 Gruppe entstehen, wird die Sauerstoffsättigung während der Bestrahlung mit UVB gemessen. Dafür ist eine $50 \text{ } \mu\text{M}$ Vitamin Lösung in H_2O hergestellt und in den Messaufbau (Kapitel 4.7) integriert worden. Der Laserstrahl hat eine Wellenlänge von 308 nm und eine Laserintensität von $36 \pm 4 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-1}$.

In Abbildung 5.9 ist der Sauerstoffverbrauch von mehreren Vitaminen der B_6 Gruppe bei Laserbestrahlung mit 308 nm für 20 Minuten dargestellt. Für die Vitamine kann eindeutig ein Sauerstoffverbrauch festgestellt werden. Die Sauerstoffsättigung zu Beginn der Messung ist in allen Vitamin-Lösungen bei etwa 127 % und ist dann nach 20 Minuten Bestrahlung mit 308 nm um mindestens 20 % (PYRINE-DHCL) und höchstens 30 % (PYR-HCL) gesunken. Die Sauerstoffabnahme ist relativ gleichmäßig, jedoch nicht linear. Die Vitamine der B_6 Gruppe verbrauchen also Sauerstoff bei der Bestrahlung mit UVB (308 nm). Die Abnahme der Sauerstoffsättigung ist eine Bestätigung dafür, dass die Vitamine bei der Bestrahlung mit UVB mit Sauerstoff bzw. 1O_2 reagieren und Oxidationsprodukte entstehen, so wie es schon in der Literatur beschrieben wurde [BLE⁺00]. Diese Photoprodukte können nun andere physikalische Eigenschaften wie die Vitamine haben z.B. ein anderes Absorptionsspektrum oder eine unterschiedliche Effektivität 1O_2 zu erzeugen.

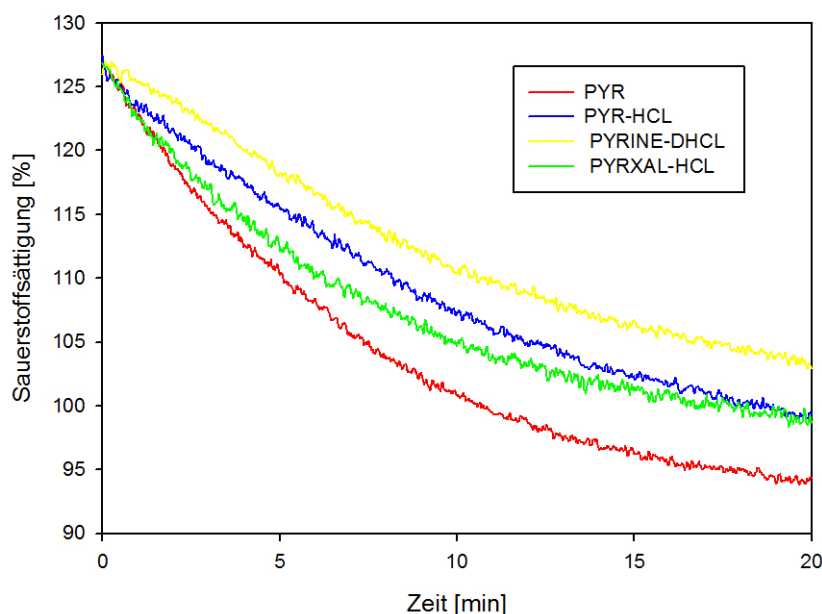


Abbildung 5.9.: Der Sauerstoffverbrauch von den Vitaminen der B_6 Gruppe bei Bestrahlung mit 308 nm für 20 Minuten

Deshalb wird für alle Vitamine der B_6 Gruppe das 1O_2 Signal bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm vor und nach der Bestrahlung mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB spektral aufgelöst detektiert. Dazu werden 100 μM Lösungen von PYR, PYR-HCL, PYRINE-DHCL und PYRXAL-HCL und eine 200 μM Lösung PYR-5-PH in H_2O hergestellt und in jeweils zwei Quarzglasküvetten gefüllt. Eine dieser Quarzglasküvetten wird in den in Kapitel 4.7 beschriebenen Messaufbau integriert. Die Sauerstoffsättigung der luftgesättigten Lösung wird mit dem Sauerstoffsensor bestimmt. Danach wird

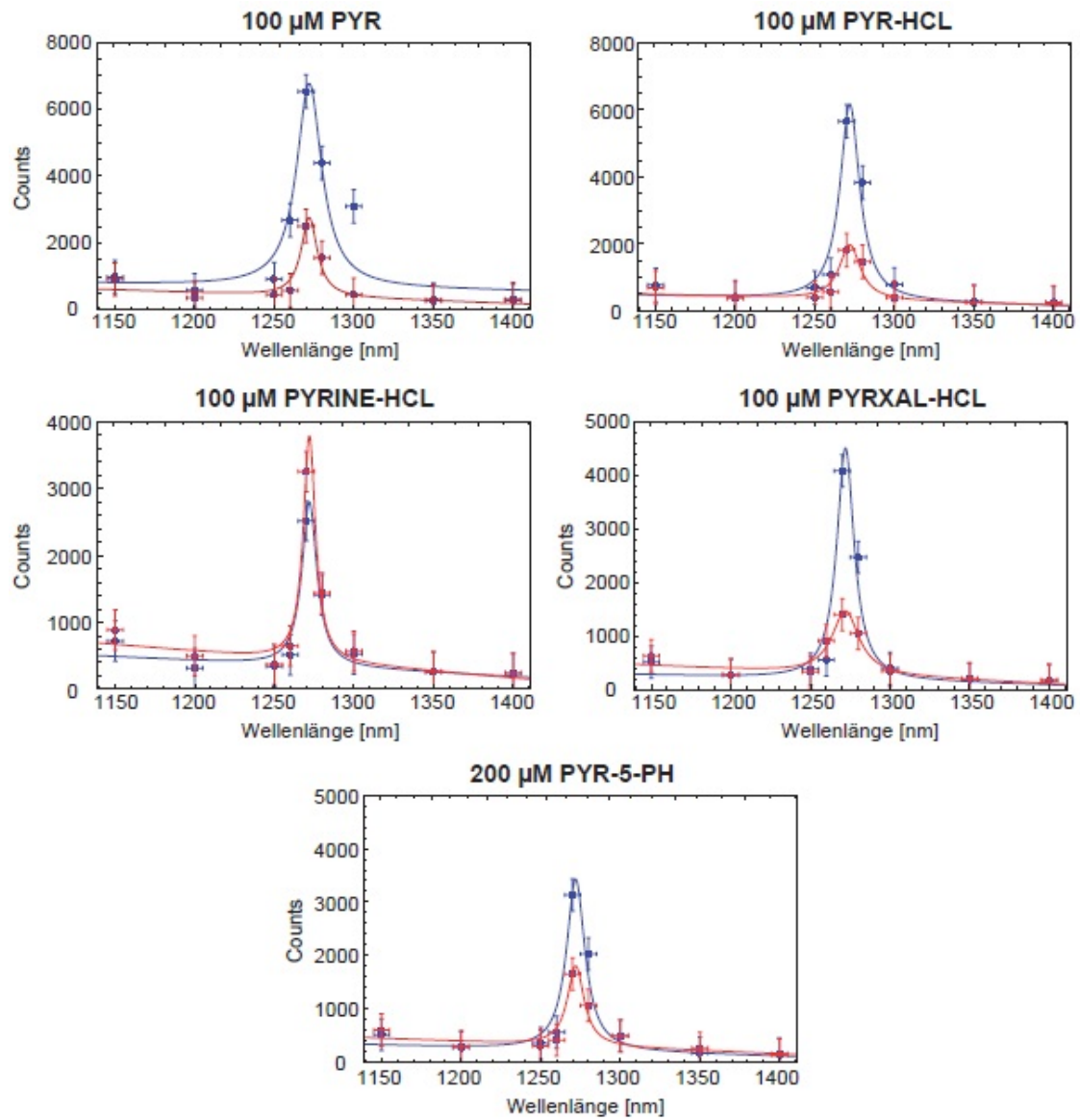


Abbildung 5.10.: Spektral aufgelöste 1O_2 Signal der Vitamine der B_6 vor (blaue Linie) und nach (rote Linie) der Bestrahlung mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm

ein 1O_2 Signal bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm spektral aufgelöst detektiert. Es wird eine zeitliche Auflösung von 3,2 ns gewählt und für das Signal werden 20000 Laserpulse aufsummiert. Die Laserintensität bei 308 nm entspricht $36 \pm 4 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$. Die Lumineszenz-Signale werden wie in Kapitel 4.8 beschrieben ausgewertet und die gefittete Lorentzkurve ist in Abbildung 5.10 durch die blaue Linie dargestellt. Die andere Küvette wird mit dem UVB Transluminator (siehe Kapitel 4.11) mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ bestrahlt. Die bestrahlte Lösung wird dann in den Messaufbau integriert und der Sauerstoffgehalt in der Lösung wird solange erhöht, bis er der luftgesättigten Lösung entspricht. Danach wird für die bestrahlte Lösung das Lumineszenz-Signal spektral aufgelöst bestimmt und das ausgewertete Signal ist in Abbildung 5.10 als rote Linie dargestellt. Abbildung 5.10 zeigt, dass für PYR-5-PH zwar die Absorption nach der Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB von 43 % auf 61 % (siehe Tabelle 5.6) angestiegen ist, aber das spektral aufgelöste Lumineszenz-Signal nach der Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB schwächer ist. Das Maximum der gefitteten Lorentz-Kurve ist von circa 3700 gezählten Lumineszenz-Photonen vor der Bestrahlung auf circa 2000 gezählte Lumineszenz-Photonen nach der Bestrahlung gesunken. Für PYRINE-DHCL ist durch die Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB die Absorption auf etwa ein Drittel (24 %) der ursprünglichen Absorption (65 %) gesunken, doch das spektral aufgelöste Lumineszenz-Signal nach der Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB ist höher als das spektral aufgelöste Lumineszenz-Signal der unbestrahlten Lösung (siehe Abbildung 5.10). Das Maximum der gefitteten Lorentz-Kurve ist von circa 2800 gezählten Lumineszenz-Photonen vor der Bestrahlung auf circa 3800 gezählte Lumineszenz-Photonen angestiegen. Für die Vitamine PYR, PYR-HCL und PYRXAL-HCL ist durch die Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB sowohl die Absorption bei 308 nm als auch die Intensität des spektral aufgelösten Lumineszenz-Signals bei einer Anregung bei 308 nm gesunken. Allerdings korreliert nur für PYR-HCL die Abnahme der Absorption von 65 % auf 21 % mit dem Verlust an Lumineszenz-Signal von etwa 6200 Lumineszenzphotonen bei 1270 nm auf 2000 Lumineszenzphotonen nach der Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB. Die durch UVB Strahlung entstanden Photoprodukte haben für PYR, PYRINE-DHCL, PYRXAL-HCL und PYR-5-PH offensichtlich nicht nur eine andere Absorption, sondern die UVB Bestrahlung hat außerdem die Fähigkeit der Vitamin-Lösungen 1O_2 zu erzeugen, verändert. Diese Veränderung korreliert nicht mit dem Anstieg bzw. der Abnahme der Absorption. Die durch UVB Bestrahlung entstehenden Photoprodukte von PYR, PYRINE-DHCL, PYRXAL-HCL und PYR-5-PH haben also offensichtlich eine andere Effektivität mit der sie 1O_2 generieren können wie die ursprünglichen Vitamine.

Darum ist die 1O_2 Quantenausbeute Φ_Δ von den mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB bestrahlten Vitamin- B_6 -Lösungen bei einer Anregung bei 308 nm ermittelt und mit den Quantenausbeuten der unbestrahlten Vitamin- B_6 -Lösungen bei einer Anregung bei 308 nm verglichen worden. Dafür sind zwei verschieden konzentrierte Vitamin- B_6 -Lösungen in H_2O hergestellt und danach mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB im UVB-Transluminator

(siehe Kapitel 4.11) bestrahlt worden. Von den bestrahlten Lösungen wird die Absorption bestimmt. Die absorbierte Laserenergie wird mit Hilfe der Laserintensität bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm von $36 \pm 4 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ bestimmt. Die mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB bestrahlten Lösungen werden nun in den Messaufbau (Kapitel 4.7) integriert und die Sauerstoffsättigung in den Lösungen ist auf 100 % eingestellt worden. Danach werden zeitaufgelöste Lumineszenz-Signale mit einer zeitlichen Auflösung von 3,2 ns und mit 20000 Laserpulsen bestimmt. Nun kann über den Vergleich mit den Referenz-Substanzen PNS und TMPyP mit bekanntem Φ_{Δ} wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben, die $^1\text{O}_2$ Quantenausbeute Φ_{Δ} der bestrahlten Lösungen bestimmt werden.

Substanz	308 nm	
	0 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB	1 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB
PYR	$0,11 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,01$
PYR-HCL	$0,07 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,02$
PYRINE-DHCL	$0,06 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,02$
PYRXAL-HCL	$0,08 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,02$
PYR-5-PH	$0,16 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,02$

Tabelle 5.8.: Die ermittelten Quantenausbeuten Φ_{Δ} der Vitamine der B_6 -Gruppe bei einer Anregung von 308 nm vor und nach der breitbandigen Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB

In Tabelle 5.8 sind die Quantenausbeuten von unbestrahltem und von mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB vorbestrahltem PYR, PYR-HCL, PYRINE-DHCL, PYRXAL-HCL und PYR-5-PH dargestellt. Es ist erkennbar, dass sich die $^1\text{O}_2$ Quantenausbeute durch die Vorbestrahlung verändern kann. PYR und PYR-5-PH können nach einer Vorbestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB eindeutig weniger effizient $^1\text{O}_2$ erzeugen als davor. Für PYRINE-DHCL, PYRXAL-HCL und PYR-HCL kann keine eindeutige Veränderung der $^1\text{O}_2$ Quantenausbeute durch die Vorbestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB im Rahmen der Fehlergenauigkeit festgestellt werden.

UVB Strahlung kann also nicht nur die Absorption und damit die Molekülstruktur von endogenen Molekülen verändern, sondern auch ihre Fähigkeit bzw. Effizienz $^1\text{O}_2$ zu erzeugen. Dies sollte noch genauer untersucht werden, insbesondere die Veränderungen endogener Moleküle durch parallele UVA und UVB Bestrahlung (Sonnenlicht).

5.1.6.2. Nicotinsäure und Nicotinamidsäure

Die Vitamine der B_3 Gruppe, Nicotinsäure und Nicotinamidsäure verändern sich bei einer Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB nicht (siehe Abbildung 5.8). Wenn Nicotinsäure und Nicotinamidsäure für 20 Minuten mit dem Laser mit einer Laserintensität von $35 \pm 4 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ bei einer Wellenlänge von 308 nm bestrahlt werden, verändert sich auch die Sauerstoffsättigung in der Lösung im Rahmen der Fehlergenauigkeit nicht. Doch wenn Nicotinsäure und Nicotinamidsäure mit einer UVB Dosis von $13 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB bestrahlt werden, sind Veränderungen im Absorptionsspektrum sichtbar.

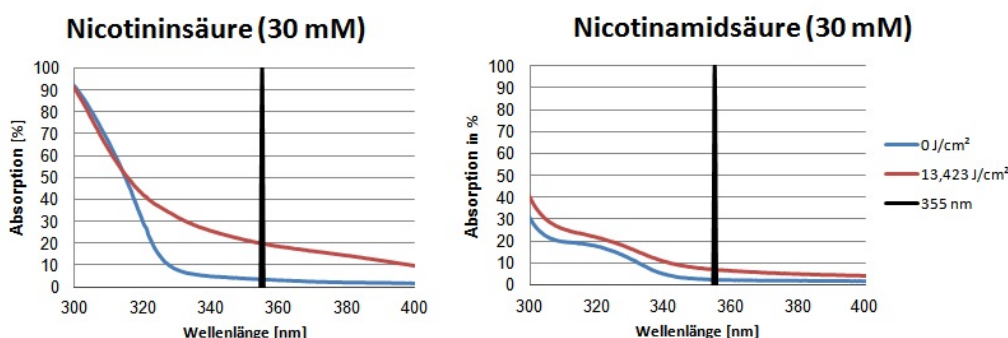


Abbildung 5.11.: Absorptionsspektren von Nicotinsäure (rechts) und Nicotinamidsäure (links) vor und nach der Bestrahlung mit $13 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB

In Abbildung 5.11 sind die Absorptionsspektren von Nicotinsäure und Nicotinamidsäure vor und nach der Bestrahlung mit $13 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB dargestellt. Es wird deutlich, dass sich nach einer UVB Dosis von $13 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ die Absorptionsspektren verändert haben. Bei einer Wellenlänge von 355 nm im UVA Bereich absorbieren Nicotinsäure und Nicotinamidsäure nach der Vorbestrahlung mit $13 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB Strahlung, obwohl die Absorption von unbestrahlter Nicotinsäure und Nicotinamidsäure bei 355 nm nicht nachweisbar ist ($\leq 1 \%$). Die Absorption von Nicotinsäure und Nicotinamidsäure bei 355 nm nach einer Vorbestrahlung mit $13 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB beträgt 19 % bzw. 5 %.

Darum wird das $^1\text{O}_2$ Signal von Nicotinsäure und Nicotinamidsäure vor und nach der Bestrahlung mit $13 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm spektral aufgelöst detektiert. 30 mM Lösungen in D_2O werden in zwei Quarzglasküvetten gefüllt. Eine dieser Quarzglasküvetten wird in den in Kapitel 4.7 beschriebenen Messaufbau integriert. Die Sauerstoffsättigung wird mit dem Sauerstoffsensor bestimmt und dann wird ein spektral aufgelöstes $^1\text{O}_2$ Signal detektiert. Die Anregungswellenlänge ist 355 nm, die zeitliche Auflösung 25,6 ns und die Laserintensität bei 355 nm entspricht $33 \pm 4 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$. Die Lumineszenz-Signale werden durch eine Lorenzkurve gefittet, die in Abbildung 5.12 durch die blaue Linie dargestellt

ist. Die andere Küvette wird mit dem UVB Transluminator (siehe Kapitel 4.11) mit $13 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB bestrahlt und danach in den Messaufbau integriert. Der Sauerstoffgehalt in der Lösung wird hochreguliert, bis er dem der luftgesättigten Lösung entspricht. Danach wird für die bestrahlte Lösung das Lumineszenz-Signal spektral aufgelöst bestimmt und das ausgewertete Signal ist in Abbildung 5.12 als rote Linie dargestellt.

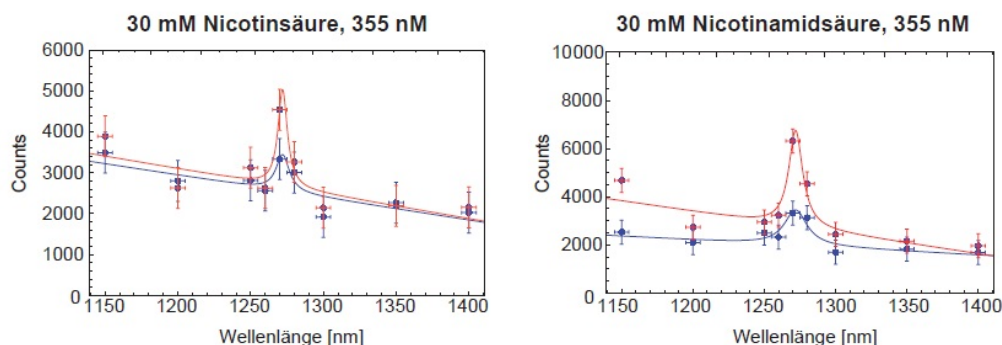


Abbildung 5.12.: Spektral aufgelöste $^1\text{O}_2$ Signal Nicotinsäure und Nicotinamidsäure vor (blaue Linie) und nach (rote Linie) der Bestrahlung mit $13 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm

Die spektral aufgelösten $^1\text{O}_2$ Signale von unbestrahlter Nicotinsäure und Nicotinamidsäure sind in Abbildung 5.12 durch blaue Linien gekennzeichnet und weisen ein Maximum um 1270 nm auf. Wenn allerdings die Fehlerbalken der einzelnen Signale betrachtet werden, ist erkennbar, dass dieses Lumineszenz-Signal nicht eindeutig ist. Die spektral aufgelösten $^1\text{O}_2$ Signale, nachdem die Nicotinsäure und Nicotinamidsäurelösungen mit $13 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB bestrahlt worden sind (rote Linie), haben ein eindeutiges Maximum zwischen 1270 und 1280 nm. Nicotinsäure und Nicotinamidsäure können also nach einer UVB-Vorbestrahlung $^1\text{O}_2$ im UVA Bereich erzeugen, obwohl unbestrahlte Nicotinsäure und Nicotinamidsäure im UVA Bereich weder eindeutig absorbiert noch $^1\text{O}_2$ erzeugt haben. Durch die UVB-Bestrahlung entstehen also Photoabbauprodukte mit von den ursprünglichen Substanzen unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften. Diese Photoabbauprodukte von Nicotinsäure bzw. Nicotinamidsäure produzieren $^1\text{O}_2$ bei einer Anregung im UVA Bereich (355 nm).

Die $^1\text{O}_2$ Quantenausbeute Φ_Δ von bestrahlten Nicotinsäure und Nicotinamidsäure Lösungen werden bestimmt, um abschätzen zu können, wie effektiv eine Lösung aus Nicotinsäure bzw. Nicotinamidsäure und seinen Photoabbauprodukten $^1\text{O}_2$ bei UVA Anregung erzeugen kann. Es wurden drei verschieden konzentrierte Lösungen von Nicotinsäure bzw. Nicotinamidsäure in D_2O hergestellt und danach mit $13 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB im UVB-Transluminator (siehe Kapitel 4.11) bestrahlt. Die bestrahlten Lösungen werden in den Messaufbau (Kapitel 4.7) integriert und die Sau-

erstoffsättigung in den Lösungen wird auf 100 % eingestellt. Nun kann über den Vergleich mit den Referenz-Substanzen PNS und TMPyP die 1O_2 Quantenausbeute Φ_Δ der bestrahlten Lösungen bestimmt werden. In Tabelle 5.9 sind die ermittelten Quantenausbeuten für mit $13 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB vorbestrahlten Nicotinsäure- bzw. Nicotinamidsäure-Lösungen aufgelistet. Nicotinsäure-Lösungen haben nach einer UVB-Vorbestrahlung eine Quantenausbeute von $0,08 \pm 0,02$ für die Erzeugung von 1O_2 durch UVA-Strahlung. Unbestrahlte Nicotinsäure hat bei einer Anregung bei 308 nm nur eine Quantenausbeute von $0,05 \pm 0,01$ (siehe Tabelle 5.4). Und vorbestrahlte Nicotinamidsäure erzeugt 1O_2 mit einer Effektivität von $0,18 \pm 0,02$ durch UVA Anregung, während unbestrahlte Nicotinamidsäure eine Quantenausbeute bei Anregung bei 308 nm von $0,64 \pm 0,07$ hat. Durch die Bestrahlung mit $13 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB sind also Photoabbauprodukte von Nicotinsäure und Nicotinamidsäure entstanden, die bei einer Wellenlänge von 355 nm Strahlung absorbieren und 1O_2 erzeugen können. Die Effektivität mit der sie 1O_2 erzeugen können, unterscheidet sich aber von den Quantenausbeuten der ursprünglichen Substanzen. Ein nächster Schritt wäre die Bestimmung der entstandenen Photoabbauprodukte z.B. durch HPLC und dann die photophysikalische Untersuchung dieser Photoabbauprodukte.

Substanz	Quantenausbeute bei 355 nm
Nicotinsäure	$0,08 \pm 0,02$
Nicotinamidsäure	$0,18 \pm 0,02$

Tabelle 5.9.: Die ermittelten Quantenausbeuten Φ_Δ von Nicotinsäure und Nicotinamidsäure bei einer Anregung von 355 nm nach der Bestrahlung $13 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ breitbandigem UVB

5.1.7. Pyridoxal 5'phosphat

PYR-5-PH hat aus der Gruppe der untersuchten B_6 Vitamine am effektivsten 1O_2 generiert. Aus diesem Grund wird der Triplett-Zustand von PYR-5-PH näher untersucht und die kompletten Raten- und Ratenkonstanten der 1O_2 Erzeugung werden sowohl in H_2O als auch D_2O bestimmt.

5.1.7.1. Energie vom Singulett und Triplett-Zustand

Zunächst ist die emittierte Fluoreszenz und Phosphoreszenz sowohl bei Zimmertemperatur als auch bei 77 Kelvin untersucht worden. Fluoreszenz ist gewöhnlich schon

bei Raumtemperatur sichtbar, während Phosphoreszenz bei vielen organischen Substanzen erst bei tiefen Temperaturen detektierbar wird. Sowohl Fluoreszenz als auch Phosphoreszenz sind Prozesse, die in Konkurrenz stehen mit nicht strahlenden Übergängen, die durch Stöße des Moleküls mit Lösungsmittelmolekülen induziert werden. Allerdings hat der für die Phosphoreszenz wichtige Triplett-Zustand eine viel längere Lebensdauer (im μs Bereich) als der Singulett-Zustand (im ns Bereich), der für Fluoreszenz entscheidend ist. Dadurch wird der Triplett-Zustand bei Zimmertemperatur effizient durch Stöße mit Lösungsmittelmolekülen deaktiviert und Phosphoreszenz ist meist nicht detektierbar [Val02]. Bei sinkenden Temperaturen nimmt sowohl die Fluoreszenz als auch die Phosphoreszenz zu, da durch das gefrorene Lösungsmittel keine Stöße mehr mit Lösungsmittelmolekülen stattfinden. Allerdings nimmt die Quantenausbeute der Fluoreszenz nur um das 10-fache zu, während die Quantenausbeute der Phosphoreszenz um ein 1000-faches ansteigt [Val02]. Aus diesem Grund wird die Fluoreszenz und Phosphoreszenz bei Zimmertemperatur und bei 77 Kelvin untersucht.

Dazu wird PYR-5-PH in Ethanol gelöst, da sich die Lösungsmittel H_2O und D_2O beim Gefrieren ausdehnen und darum den Glaskolben zerstören würden, während sich Ethanol, wie die meisten Flüssigkeiten, nicht beim Gefrieren ausdehnt sondern zusammenzieht. Um PYR-5-PH in Ethanol zu lösen, werden 2,47 mg PYR-5-PH in Pulverform abgewogen und in 20 ml Ethanol gelöst. Dies entspricht einer $500\text{ }\mu\text{M}$ Lösung. Um ein vollständiges lösen von PYR-5-PH zu erreichen, wird die Lösung noch 15 Minuten in ein Ultraschallbad gegeben. Danach ist PYR-5-PH gelöst und die Stammlösung von $500\text{ }\mu\text{M}$ wird verdünnt, um eine $10\text{ }\mu\text{M}$ Lösung von PYR-5-PH in Ethanol herzustellen.

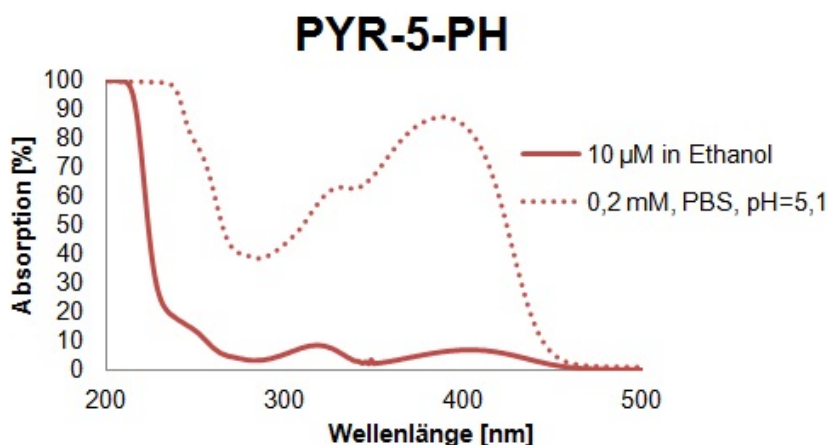


Abbildung 5.13.: Das Absorptionsspektrum von $10\text{ }\mu\text{M}$ PYR-5-PH in Ethanol (rote Linie) und zum Vergleich das Absorptionsspektrum von $10\text{ }\mu\text{M}$ PYR-5-PH in PBS mit einem pH-Wert von 5 (gestrichelte rote Linie)

Das Absorptionsspektrum von $10\ \mu\text{M}$ PYR-5-PH in Ethanol wird mit dem Absorptionsspektrometer ermittelt und dann ist solange tropfenweise Schwefelsäure hinzugefügt worden, bis das Absorptionsspektrum in Ethanol dem von PYR-5-PH gelöst in PBS bei einem pH-Wert von 5 gleicht, da die menschliche Haut einen natürlichen pH-Wert von durchschnittlich 4,9 hat [SAB⁺08]. In Abbildung 5.13 ist das Absorptionsspektrum von $10\ \mu\text{M}$ PYR-5-PH in Ethanol (rote Linie) dargestellt und zum Vergleich ist das Absorptionsspektrum von $200\ \mu\text{M}$ PYR-5-PH in PBS mit einem pH-Wert von 5 (gestrichelte rote Linie) eingefügt. Es ist erkennbar, dass die Absorptionsspektren bei ähnlichen Wellenlängen Maxima und Minima haben, die auf Grund der unterschiedlichen Konzentrationen unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Danach wird die Lösung in einen schmalen Glaskolben gefüllt und in den Messaufbau aus Kapitel 4.12 integriert. Aufgrund des Absorptionsspektrum von PYR-5-PH (Abbildung 5.13) wird mit einer Wellenlänge von 315 nm angeregt, denn bei dieser Wellenlänge ist ein Absorptionsmaximum von $10\ \mu\text{M}$ PYR-5-PH, aber die optische Dichte ist noch unter 0,1, eine Voraussetzung für die Benutzung des Messaufbaus. Die emittierten Photonen sind in einem Wellenlängenbereich von 335 nm bis 600 nm detektiert worden.

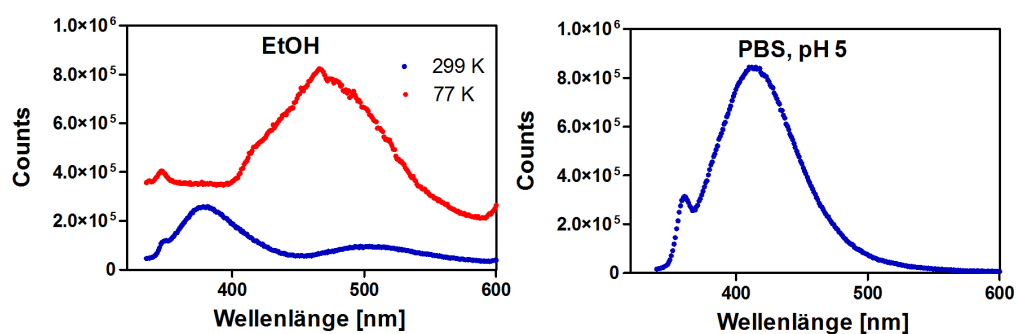


Abbildung 5.14.: A: die detektierten Fluoreszenz und Phosphoreszenz Photonen bei Anregung von $10\ \mu\text{M}$ PYR-5-PH in Ethanol bei 315 nm in einem Wellenlängenbereich von 335 bis 600 nm bei Zimmertemperatur (blaue Linie) und 77 Kelvin (rote Linie); B: das detektierte Emissionsspektrum bei Anregung von $10\ \mu\text{M}$ PYR-5-PH in PBS (pH 5) bei 320 nm in einem Wellenlängenbereich von 340 bis 600 nm bei Zimmertemperatur

Die detektierten Fluoreszenz und Phosphoreszenz Photonen bei Anregung von $10\ \mu\text{M}$ PYR-5-PH in Ethanol bei 315 nm in einem Wellenlängenbereich von 335 bis 600 nm sind in Abbildung 5.14 A dargestellt. Zunächst wird eine Messung bei Zimmertemperatur durchgeführt (blaue Linie) und danach wird die Probe auf 77 Kelvin gekühlt und eine weitere Messung wird durchgeführt (rote Linie). Bei der Messung bei Zimmertemperatur ist ein eindeutiger Peak bei 377 nm zu erkennen, der hoch

ist, verglichen zu dem schwachen, zweiten Peak bei 503 nm. Der hohe Peak kann Fluoreszenz-Photonen zugeordnet werden, denn bei Zimmertemperatur ist Fluoreszenz deutlich stärker als Phosphoreszenz. Wenn die gleiche Messung bei 77 Kelvin durchgeführt wird (rote Linie), ist ein deutlicher Peak bei 470 nm zu erkennen, während in dem Bereich zwischen 350 und 400 nm zwar eine erhöhte Menge an Photonen detektiert worden ist, aber kein eindeutiger Peak erkennbar ist. Der Peak bei 470 nm wird Phosphoreszenz-Photonen zugeordnet. Die Fluoreszenz wird in dem erhöhten Bereich zwischen 350 und 400 nm vermutet, kann aber nicht genau zugeordnet werden, da kein Peak sichtbar ist. Der kleine Peak bei etwa 340 nm, der sowohl bei Zimmertemperatur als auch bei 77 Kelvin zu erkennen ist, ist nicht von Bedeutung, da es sich um Raman-Streuung handelt [ZK98]. Dies ist durch eine zweite Messung bei einer Anregungswellenlänge von 305 nm bestätigt worden, bei der sich der Peak auch um 10 nm verschoben hat.

In Abbildung 5.14 B ist das Emissionsspektrum von 10 μ M PYR-5-PH in PBS mit einem pH von 5 dargestellt. Um dieses Emissionsspektrum zu erzeugen, ist die Lösung bei Raumtemperatur bei 320 nm angeregt worden und die emittierten Photonen werden zwischen 340 und 600 nm detektiert. Ein klares Maximum bei 405 nm ist erkennbar, das der Fluoreszenz zugeordnet wird. Dies wird bestätigt, indem das Fluoreszenz-Signal zeitaufgelöst gemessen wird mit dem in Kapitel 4.9 beschriebenen Messaufbau. Zur Anregung der Probe ist allerdings ein Laser (PicoQuant GmbH), der bei 290 nm emittiert, verwendet worden und die emittierten Photonen werden zunächst durch einen Monochromator (9055, Science Tech Inc.) geleitet, der die Wellenlänge bestimmt, bei der die Fluoreszenz zeitaufgelöst bestimmt wird. Detektiert werden die Photonen von einem Photomultiplier (H5783-P01 Hamamatsu), der sensibel für UV und sichtbare Strahlung ist. Die maximale Fluoreszenz von PYR-5-PH in PBS (pH 5) ist zwischen 400 und 430 nm detektiert worden mit einer Lebensdauer von 0.45 ± 0.05 ns.

Energie-Zustand	Energie in $\text{kJoule} \cdot \text{mol}^{-1}$	Wellenlänge in nm
Singlett-Zustand S_1	292 ± 14	410 ± 20
Triplett-Zustand T_1	255 ± 12	470 ± 24

Tabelle 5.10.: Die ermittelten Energien vom ersten angeregten Singulett- und Triplett-Zustand von PYR-5-PH und die dazugehörigen Wellenlängen

Mit den Emissionsmaxima von PYR-5-PH, die Fluoreszenz oder Phosphoreszenz zugeordnet werden können, kann die jeweilige Energie des ersten angeregten Singulett- und Triplett-Zustandes berechnet werden. Für die Fluoreszenz ist in PBS (pH 5) ein Maximum bei 410 nm bei Zimmertemperatur ermittelt worden. Die Phosphoreszenz von PYR-5-PH ist nur für 77 Kelvin in EtOH bei 470 nm detektiert worden. In Tabelle 5.10 sind die ermittelten Energien für den Singulett-Zustand S_1 , der fluo-

resziert und für den Triplett-Zustand T_1 , der Phosphoreszenz emittiert, dargestellt. Für den Singulett-Zustand S_1 ist ein Energieniveau von $292 \text{ kJoule} \cdot \text{mol}^{-1}$ bei einer Messgenauigkeit von 10 % ermittelt worden und für den Triplett-Zustand T_1 eine Energie von $255 \text{ kJoule} \cdot \text{mol}^{-1}$.

5.1.7.2. Quantenausbeute für das Intersystemcrossing (ISC)

Die Quantenausbeute für die Besetzung des Triplett-Zustandes kann durch LIOAS (Kapitel 4.13) mit der folgenden Formel bestimmt werden.

$$\Phi_{T_1} = \frac{(1 - \alpha) \cdot E_a - \Phi_F \cdot E_F}{E_{T_1}} \quad (5.1)$$

Die Energien vom Singulett- und Triplettzustand E_F und E_{T_1} sind in Tabelle 5.10 aufgelistet worden. Um die Intersystemcrossing-Quantenausbeute auf den Triplett-Zustand (Φ_{T_1}) von PYR-5-PH zu bestimmen, muss noch α per LIOAS ermittelt werden und die Fluoreszenz Quantenausbeute von PYR-5-PH bei derselben Wellenlänge, die für die Anregung in LIAOS genutzt wird (355 nm).

Die Fluoreszenzquantenausbeute von PYR-5-PH in PBS wird wie in Kapitel 4.12 beschrieben über den Vergleich mit der Standard Referenz Quinine Sulfate in 1N H_2SO_4 bestimmt. Die Fluoreszenz-Emissionsspektren werden mit dem Fluorimeter für PYR-5-PH in PBS (pH 5) und Quinine Sulfate (QS) in 1N H_2SO_4 , die mit derselben optischen Dichte gelöst sind ($A_u=A_s$), bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm bestimmt. Dann wird die Fläche F unter dem Fluoreszenz-Emissionspektrum für PYR-5-PH und QS berechnet. Mit dem Brechungsindex des Lösungsmittels n (Wasser: 1,333; H_2SO_4 : 1,418) und der Fluoreszenz Quantenausbeute von QS $\phi_S=0,546$ [Eat98] wird die Fluoreszenz Quantenausbeute von PYR-5-PH bestimmt zu $0,01 \pm 0,005$.

Die ins Medium abgegebene Wärme α wird wie in Kapitel 4.13 beschrieben, über den Vergleich mit der Referenz Substanz BNNN ($\alpha=1$) ermittelt. Die Amplitude des LIOAS Signal wird für verschiedene Energien zwischen 5 und 100 % (0,00072 J) bestimmt für verschiedene Absorptionen von PYR-5-PH in PBS (pH von 5). Von den am Oszilloskop angezeigten LIOAS Spannungssignalen werden die Amplituden ermittelt. Diese werden graphisch gegen die entsprechenden eingestrahelten Energien aufgetragen und die Steigung der Durchschnittsgerade wird ermittelt (Abbildung 5.15 A). Um den Fehler zu reduzieren, werden für die graphische Auswertung nur die Amplituden der Signale für eine Energie bis zu 70 % verwendet. Dies wird analog für

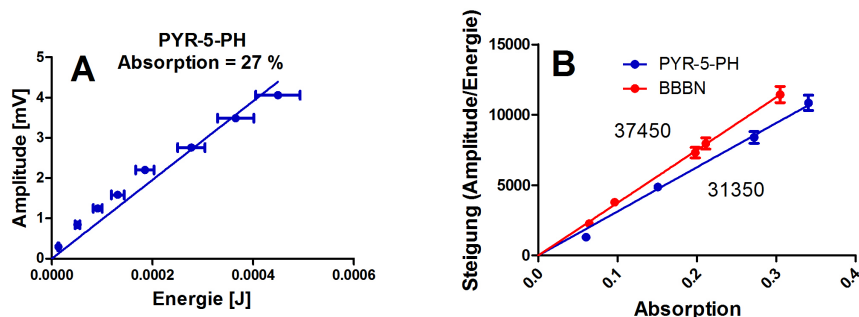


Abbildung 5.15.: A: Die Amplituden des LIOAS Signal für verschiedene eingestrahlte Laserenergien für PYR-5-PH in PBS (pH=5) mit einer Absorption von 0,27. B: Die aus den Amplituden pro Energie Graphen ermittelten Steigungen aufgetragen gegen die Absorption für PYR-5-PH und die Referenz BBBN

die Referenz Substanz BBBN durchgeführt. Danach werden die so ermittelten Steigungen gegen die entsprechenden Absorptionen der PYR-5-PH und BBBN Lösungen aufgetragen und wieder werden die Steigungen der Durchschnittsgeraden berechnet (Abbildung 5.15 B). Durch den Vergleich der Steigungen von PYR-5-PH und BBBN wird für PYR-5-PH $\alpha = 0,839$ bestimmt. Damit kann die Quantenausbeute der Besetzung des Triplett-Zustand von PYR-5-PH bestimmt werden zu $\Phi_{T_1} = 0,20 \pm 0,03$. Dieser Wert steht im Einklang mit der ermittelten 1O_2 Quantenausbeute von $0,16 \pm 0,04$ in PBS (pH von 5, $\lambda = 355$ nm), $0,16 \pm 0,02$ in H_2O ($\lambda = 308$ nm) und $0,12 \pm 0,02$ in D_2O ($\lambda = 308$ nm) (Kapitel 5.1.4), da Φ_{T_1} für die Besetzung des Triplett-Zustandes größer sein muss als die 1O_2 Quantenausbeute.

5.1.7.3. Raten und Ratenkonstanten von Pyridoxal 5'phosphat in Wasser

In diesem Abschnitt werden die Raten und Ratenkonstanten (Kapitel 3.5.2) von in H_2O gelöstem PYR-5-PH bestimmt. In der Lösung befindet sich außerdem molekularer Sauerstoff, dessen Konzentration mit einem Sauerstoffsensor bestimmt wird. Um die Raten und Ratenkonstanten zu bestimmen, wird eine Variation der Sauerstoff-, PYR-5-PH- und Quencherkonzentration durchgeführt. Bei der Variation der Quencherkonzentration befindet sich zusätzlich der Quencher NaN_3 (Kapitel 4.1.5) in der Lösung. In Abbildung 5.16 A,B,C,D,E und F sind die ermittelten Anstiegsraten β_1 als Kreise und die Abklingraten β_2 als Rechtecke in Abhängigkeit von der Sauerstoff-, PYR-5-PH- oder NaN_3 -Konzentration dargestellt. Die ermittelten Er-

gebnisse für die Raten und Ratenkonstanten von PYR-5-PH in H_2O sind in Tabelle 5.11 dargestellt.

Bei der Sauerstoffvariation ist eine PYR-5-PH-Konzentration von $100 \mu M$ in H_2O verwendet worden. Die Laserintensität hat $30 \pm 3 mW \cdot cm^{-2}$ bei einer Laseranregungswellenlänge von $\lambda = 308 nm$ betragen. Die Sauerstoffsättigung in der PYR-5-PH-Lösung wird ausgehend von 100 %, was einer Sauerstoffkonzentration von $[O_2] = 270 \mu M$ in H_2O entspricht, auf 5 %, was $[O_2] = 13,5 \mu M$ entspricht, verringert. Die Abbildung 5.16 A und B zeigen die ermittelten Anstiegs- und Abklingraten β_1 und β_2 gegen die Sauerstoffkonzentration aufgetragen, mit einem Fehler von 10 % für die Raten β_1 und β_2 und einem absoluten Fehler von $2,7 \mu M$ für die Sauerstoffkonzentration. In Abbildung 5.16 B ist zwar eine Aufspaltung der Anstiegs- und Abklingraten β_1 und β_2 erkennbar, aber die Energierückkopplung, die durch das Produkt $k_{T_1\Delta} \cdot k_{\Delta T_1} = 0,0099 \pm 0,001 \mu s^{-2} mM^{-2}$ abschätzt wird, ergibt einen vernachlässigbar geringe Energierückkopplung. Der Schnittpunkt der beiden Hilfsgeraden $K_{\Delta,OR}$ und K_{T_1} liegt bei einer Sauerstoffkonzentration von $(0,14 \pm 0,02) mM$. Die Steigung der Rate β_1 bei großen Sauerstoffkonzentrationen lässt sich angeben durch $k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}$ und lässt sich durch Extrapolation bestimmen zu $(2,0 \pm 0,2) \mu s^{-1} mM^{-1}$. Die Steigung beschreibt die Deaktivierung des T_1 -Zustands durch molekularen Sauerstoff im Grundzustand und durch die Erzeugung von 1O_2 .

Die PYR-5-PH Variation ist bei einer Laserintensität von $33 \pm 4 mW \cdot cm^{-2}$ ($\lambda = 308 nm$) durchgeführt worden. Die Konzentration von PYR-5-PH in H_2O ist von $25 \mu M$ bis zu $500 \mu M$ erhöht worden bei einer Sauerstoffsättigung von 30 % ($81 \mu M$, Abbildung 5.16 D) und bei einer Sauerstoffsättigung von 100 % ($270 \mu M$, Abbildung 5.16 E). Diese Sauerstoffkonzentrationen sind ausgewählt worden, da sie beide weit genug vom Schnittpunkt ($140 \mu M$), den man in der Sauerstoffvariation ermittelt hat, entfernt liegen und so bei kleinen Schwankungen im Sauerstoffbereich die Raten dennoch eindeutig zugeordnet werden können. In Abbildung 5.16 D beschreibt die obere Linie die Triplet-Abklingdauer K_{T_1} , während die untere Linie K_{Δ} beschreibt. Durch Extrapolation ergibt sich für die y-Achsenschnittpunkte $K_{T_1}([PYR-5-PH] = 0) = (0,54 \pm 0,06) \mu s^{-1}$ und $K_{\Delta}([PYR-5-PH] = 0) = (0,29 \pm 0,03) \mu s^{-1}$. Damit ergibt sich für die 1O_2 Abklingdauer in Wasser $\tau_{\Delta} = (3,5 \pm 0,5) \mu s$, das im Rahmen der Fehlergenauigkeit mit dem Literaturwert $\tau_{\Delta} = (3,5 \pm 0,5) \mu s$ [Reg10] übereinstimmt. 1O_2 kann auch durch PYR-5-PH gequenchet werden, was durch die Summe der Ratenkonstanten $k_{\Delta T_1} + k_{\Delta S_0} = (0,03 \pm 0,01) \mu s^{-1} mM^{-1}$ beschrieben wird. Die ermittelte 1O_2 Quenchingratenkonstante von PYR-5-PH ist kleiner aber in der Größenordnung vom Literaturwert, der in D_2O bestimmt wurde [BLE⁺00].

Bei der NaN_3 -Variation ist eine PYR-5-PH-Konzentration in H_2O von $0,1 mM$ bei einer Sauerstoffsättigung von 100 % ($270 \mu M$, Abbildung 5.16 F) und bei 30 % ($81 \mu M$, Abbildung 5.16 E) verwendet worden. Die NaN_3 -Konzentration in der Lösung

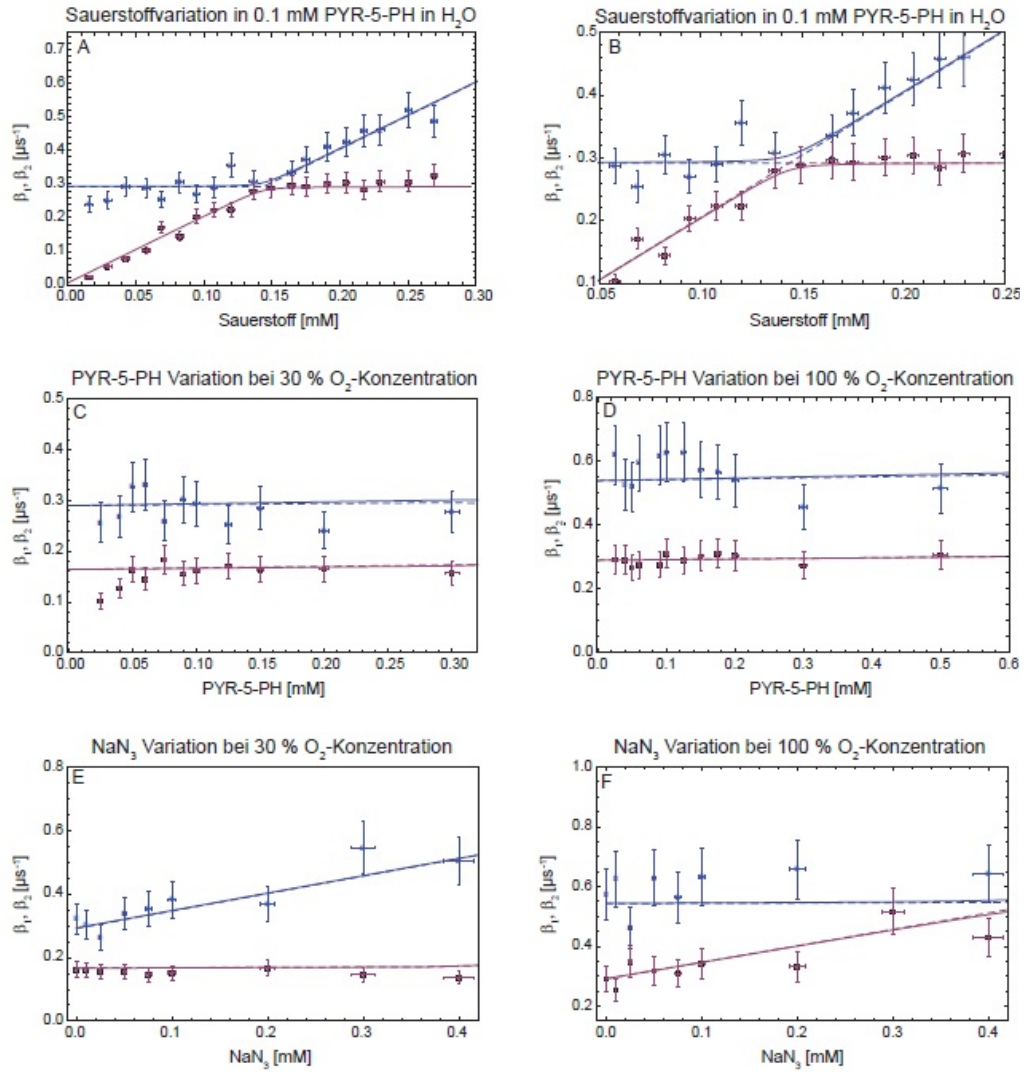


Abbildung 5.16.: Die ermittelten Abklingzeiten der Lumineszenzsignale von PYR-5-PH bei einer Variation der Sauerstoffkonzentration bei 0,1 mM PYR-5-PH (A,B), bei einer Variation der PYR-5-PH Konzentration bei 30 % (C) und 100 % (D) Sauerstoffsättigung und bei einer Variation der Quencherkonzentration bei 30 % (E) und 100 % (F) Sauerstoffsättigung in Wasser sind dargestellt

k_{T_1}	$0,003 \mu s^{-1}$
k_{Δ}	$\frac{1}{3,45} \mu s^{-1}$
$k_{T_1 S_0}$	$0,03 \mu s^{-1} mM^{-1}$
$k_{T_1 Q}$	$0,02 \mu s^{-1} mM^{-1}$
$k_{\Delta Q}$	$0,55 \mu s^{-1} mM^{-1}$
$k_{T_1 \Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$	$0,0099 \mu s^{-1} mM^{-1}$
$k_{T_1 \Delta} + k_{T_1 O_2}$	$1,989 \mu s^{-1} mM^{-1}$
$k_{\Delta T_1} + k_{\Delta S_0}$	$0,03 \mu s^{-1} mM^{-1}$

Tabelle 5.11.: Die ermittelten Raten und Ratenkonstanten von PYR-5-PH in H_2O

ist von 0 mM bis zu 0,5 mM erhöht worden. In den Abbildungen 5.16 E und F lässt sich erkennen, dass nicht nur der 1O_2 durch NaN_3 gequenchet wird, sondern auch der T_1 -Zustand von PYR-5-PH, allerdings weniger effektiv. Für eine Sauerstoffkonzentration von 0,27 mM gilt das β_2 dieselbe Steigung wie die Hilfsgerade $K_{\Delta, oR}$ hat, wodurch die Ratenkonstante $k_{\Delta Q}$ durch Extrapolation zu $(0,55 \pm 0,06) \mu s^{-1} mM^{-1}$ bestimmt worden ist. Dies stimmt im Rahmen der Fehlertoleranz mit dem Literaturwert für die Quenching Ratenkonstante für NaN_3 ($k_{\Delta Q} = (0,5 \pm 0,1) \mu s^{-1} mM^{-1}$) in H_2O überein [Fel09]. Die Ratenkonstante $k_{T_1 Q}$ kann bestimmt werden zu $(0,02 \pm 0,01) \mu s^{-1} mM^{-1}$. NaN_3 quenchet also 1O_2 30 mal so effektiv wie den Triplett-Zustand von PYR-5-PH.

5.1.7.4. Raten und Ratenkonstanten in schwerem Wasser

Da in dieser Arbeit Experimente mit PYR-5-PH gelöst in H_2O und D_2O durchgeführt werden und das Lösungsmittel Einfluss auf die photophysikalischen Eigenschaften einer Substanz haben kann, sind die Raten und Ratenkonstanten auch in D_2O untersucht worden. Dazu ist eine Variation der Sauerstoffkonzentration (5.17 A), eine Variation der PYR-5-PH Konzentration bei 30 % und 100 % (5.17 B) Sauerstoffsättigung und eine Quenchervariation bei 30 % und 100 % (5.17 C) Sauerstoffsättigung durchgeführt worden. Die ermittelten Raten und Ratenkonstanten sind in Tabelle 5.12 zusammengefasst worden und ein Fehler von 10 % wird angenommen.

Bei der Variation der Sauerstoff- und NaN_3 -Konzentration ist eine PYR-5-PH-Konzentration von 100 μM in D_2O verwendet worden. Die Laserintensität ist $23 \pm 3 mW \cdot cm^{-2}$ bei einer Anregung bei 308 nm. In Abbildung 5.17 A ist erkennbar, dass der Schnittpunkt an dem die Raten β_1 und β_2 ihre Bedeutung wechseln bei einer Sauerstoffsättigung unter 3 % liegt. Dadurch konnte keine PYR-5-PH und NaN_3 Variation bei einer Sauerstoffkonzentration unterhalb des Schnittpunktes durchgeführt werden. Diese Variationen sind deshalb bei 30 % und 100 % (5.17 B und C)

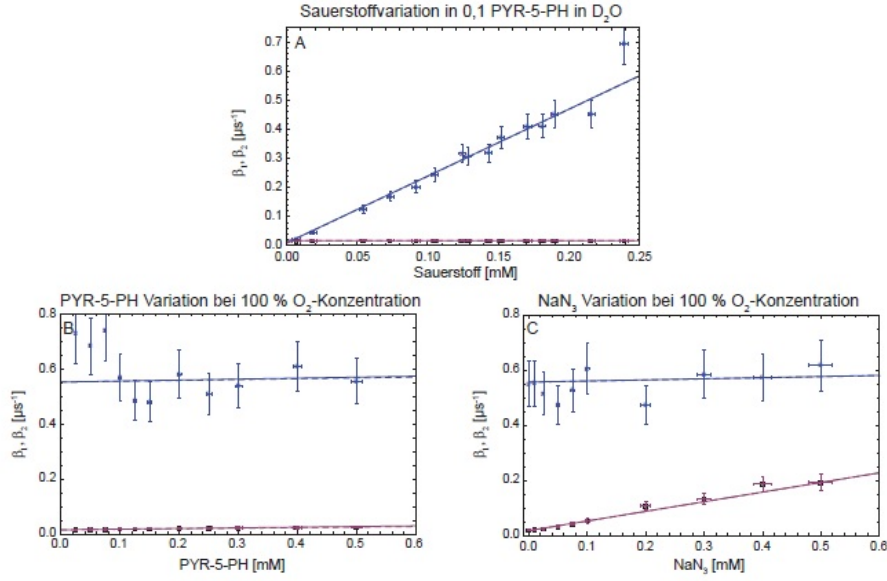


Abbildung 5.17.: Die ermittelten Abklingzeiten der Lumineszenzsignale von PYR-5-PH bei einer Variation der Sauerstoffkonzentration bei 0,1 mM PYR-5-PH (A), bei einer Variation der PYR-5-PH Konzentration bei 100 % (B) Sauerstoffsättigung und bei einer Variation der Quencherkonzentration bei 100 % (C) Sauerstoffsättigung in schwerem Wasser sind dargestellt

durchgeführt worden. Auch in D_2O scheint der Energierücktransfer vernachlässigbar klein mit $k_{T_1\Delta} \cdot k_{\Delta T_1} = (0,01 \pm 0,001) \mu s^{-2} mM^{-2}$. Die Abklingdauer von 1O_2 ist mit $(66 \pm 7) \mu s$ deutlich länger als in H_2O und stimmt mit den in der Literatur vorhandenen Werten überein [BFP⁺07] [Ogi83]. Die Abklingdauer des Triplett-Zustandes von PYR-5-PH hat in D_2O ebenfalls eine doppelt so lange Abklingdauer wie in H_2O . Das Lösungsmittel scheint sich also auch auf die Abklingdauer des Triplett-Zustandes auszuwirken. 1O_2 kann auch durch PYR-5-PH gequenchet werden mit der Summe der Ratenkonstanten $k_{\Delta T_1} + k_{\Delta S_0} = (0,03 \pm 0,01) \mu s^{-1} mM^{-1}$. Die ermittelte 1O_2 Quenchingratenkonstante von PYR-5-PH ist kleiner aber in der Größenordnung vom Literaturwert [BLE⁺00]. Die Variation der NaN_3 -Konzentration ergibt Ratenkonstanten von $(0,35 \pm 0,04) \mu s^{-1} mM^{-1}$ für das Quenchen von NaN_3 . Außerdem kann NaN_3 auch den Triplett-Zustand von PYR-5-PH quenchen mit einer Ratenkonstante von $(0,04 \pm 0,01) \mu s^{-1} mM^{-1}$ in D_2O .

k_{T_1}	$0,006 \mu s^{-1}$
k_{Δ}	$\frac{1}{66} \mu s^{-1}$
$k_{T_1 S_0}$	$0,03 \mu s^{-1} mM^{-1}$
$k_{T_1 Q}$	$0,04 \mu s^{-1} mM^{-1}$
$k_{\Delta Q}$	$0,35 \mu s^{-1} mM^{-1}$
$k_{T_1 \Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$	$0,0099 \mu s^{-1} mM^{-1}$
$k_{T_1 \Delta} + k_{T_1 O_2}$	$1,989 \mu s^{-1} mM^{-1}$
$k_{\Delta T_1} + k_{\Delta S_0}$	$0,03 \mu s^{-1} mM^{-1}$

Tabelle 5.12.: Die ermittelten Raten und Ratenkonstanten von PYR-5-PH in D_2O

5.1.8. Nicotinsäure und Nicotinsäureamid

Nicotinsäure ist eine Monocarbonsäure mit einem pK_a von 4,9 [NKS05] und kann damit seine Struktur aufgrund des pH-Wertes einer Lösung ändern. Dies ist vor allem interessant, da Nicotinsäure selbst eine Säure ist und durch eine Änderung der Nicotinsäurekonzentration in wässriger Lösung sich auch der pH-Wert der Lösung ändert. Damit könnten sich die photophysikalischen Eigenschaften von Nicotinsäure, insbesondere die Fähigkeit 1O_2 zu erzeugen, mit der Konzentration ändern. Mit dem in Kapitel 5.1.3 beschriebenen pH-Meter wird der pH-Wert einer 30 mM wässrigen Nicotinsäurelösung bestimmt. 30 mM ist die Konzentration, bei der für Nicotinsäure die 1O_2 Generierung nachgewiesen wurde (Kapitel 5.1.3). Bei dieser Konzentration hat die Nicotinsäurelösung einen pH-Wert von 4,06. Damit liegt der pH-Wert unter dem pK_a von 4,9 und Nicotinsäure liegt in der entsprechenden Form vor.

Ob Nicotinamidsäure auch ein pH-empfindliches Molekül ist, konnte in der Literatur nicht ermittelt werden. Dementsprechend wird zunächst davon ausgegangen, dass Nicotinamidsäure pH-empfindlich sein könnte und vermutlich einen ähnlichen pK_a Wert wie Nicotinsäure hat. Allerdings ist Nicotinamidsäure keine Säure und eine 30 mM Nicotinamidlösung in PBS hat einen pH Wert von 7.

Um festzustellen, ob sich die photophysikalischen Eigenschaften von Nicotinsäure und Nicotinamidsäure mit dem pH-Wert verändern, ist zunächst wie in Kapitel 4.10 beschrieben, der Absorptionswirkungsquerschnitt σ für 300 μM Nicotinsäure bzw. Nicotinamidsäure Lösungen mit den pH-Werten 3 und 7 bestimmt worden und in Abbildung 5.18 dargestellt. Es ist erkennbar, dass sich σ mit dem pH-Wert sowohl für Nicotinsäure als auch für Nicotinamidsäure verändert hat. Bei Nicotinsäure lässt sich das durch die Veränderung des Moleküls mit dem pH-Wert mit einem pK_a von 4,9 erklären. Offensichtlich verändert sich auch das Molekül Nicotinamidsäure mit dem pH-Wert und scheint einen pK_a Wert zwischen 7 und 3 zu haben.

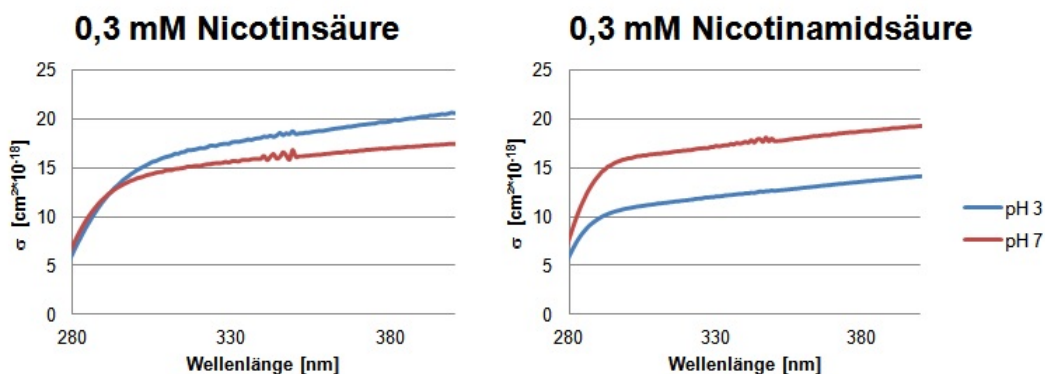


Abbildung 5.18.: Die optische Dichte von Nicotinsäure und Nicotinamidsäure im UVB und UVA Bereich für unterschiedliche pH Werte

5.1.8.1. Energie der Singulett und Triplett-Zustände

Die Energie der Singulett- und Triplett-Zustände von Nicotinsäure und Nicotinamidsäure werden in Medien mit unterschiedlichen pH-Werten ermittelt, da sich die Moleküle mit dem pH-Wert verändern können und somit auch veränderte photo-physikalische Eigenschaften haben können. Dafür werden Emissionsspektren von Nicotinsäure und Nicotinamidsäure in Medien mit unterschiedlichen pH-Werten mit dem in Kapitel 4.12 Fluorimeter bei Raumtemperatur und 77 Kelvin durchgeführt. 300 μM Nicotinsäure und Nicotinamidsäure werden in Ethanol gelöst und es sind durch Zugabe von Säuren oder Basen saure und basische Lösungen hergestellt worden. Die Fluoreszenz und Phosphoreszenz Photonen sind bei Anregung bei 285 nm in einem Wellenlängenbereich von 305 bis 500 nm detektiert und in Abbildung 5.19 A (Nicotinamidsäure) und B (Nicotinsäure) dargestellt worden. Zunächst ist eine Messung bei Zimmertemperatur durchgeführt worden (dunkelblaue Linie = saure Lösung, dunkelrote Linie = basische Lösung). Dann werden die Proben auf 77 Kelvin gekühlt und eine weitere Messung wird durchgeführt (hellblaue Linie = saure Lösung, hellrote Linie = basische Lösung). Bei den Messung bei Zimmertemperatur ist sowohl für saure als auch für basische Vitamin B_3 Lösungen ein Peak bei 343 nm zu erkennen. Dieser Peak kann Fluoreszenz-Photonen zugeordnet werden, denn bei Zimmertemperatur ist Fluoreszenz deutlich stärker als Phosphoreszenz. Der kleine Peak bei etwa 320 nm ist nicht von Bedeutung, da es sich um Raman-Streuung handelt [ZK98]. Dies ist durch eine zweite Messung bei einer anderen Anregungswellenlänge bestätigt worden.

Wenn die gleiche Messung bei 77 Kelvin durchgeführt wird, ist für Nicotinamidsäure (Abbildung 5.19 A) in saurem Medium (hellblaue Linie) ein Peak bei 392 nm und in basischem Medium (hellrote Linie) ein Peak bei 410 nm zu erkennen,

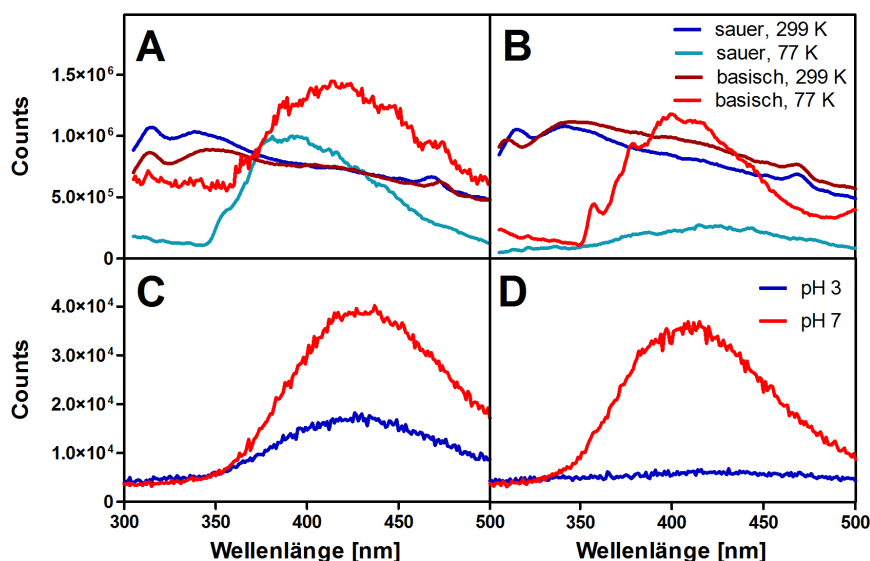


Abbildung 5.19.: Die Emissionsspektren von Nicotinsäure gelöst in Ethanol (B) und PBS (D) und Nicotinamidsäure gelöst in Ethanol (A) und PBS (C) in saurer und basischer Lösung

der höher ist als der Peak im sauren Medium. Für Nicotinsäure (Abbildung 5.19 B) ist in saurem Medium (hellblaue Linie) ein Peak bei 425 nm zu erkennen, der viel kleiner ist als der Peak in basischem Medium (hellrote Linie) bei 405 nm. Die bei 77 Kelvin ermittelten Peaks werden Phosphoreszenz zugeordnet. Die mit diesen Peaks ermittelten Singulett- und Triplett-Zustandsenergien sind in Tabelle 5.13 zusammengefasst. Für Nicotinamidsäure ergibt sich ein Singulett-Zustand bei $349 \pm 17 \text{ kJoule} \cdot \text{mol}^{-1}$ und ein Triplett-Zustand bei $400 \pm 20 \text{ kJoule} \cdot \text{mol}^{-1}$. Die Singulett- und Triplett-Energien von Nicotinsäure sind im Rahmen der Messgenauigkeit identisch.

Substanz	Energie-Zustand	Energie [kJoule·mol ⁻¹]	Wellenlänge [nm]
Nicotinsäure	S_1 -Zustand	349 ± 17	343 ± 17
Nicotinsäure	T_1 -Zustand	288 ± 14	415 ± 21
Nicotinamidsäure	S_1 -Zustand	349 ± 17	343 ± 17
Nicotinamidsäure	T_1 -Zustand	300 ± 15	400 ± 20

Tabelle 5.13.: Die ermittelten Energien vom ersten angeregten Singulett- und Triplett-Zustand von Nicotinsäure und Nicotinamidsäure und die dazugehörigen Wellenlängen

Bei den Messungen ist allerdings ein pH-abhängiger Unterschied in der Höhe der Emissionspeaks, sowohl für Nicotinsäure als auch für Nicotinamidsäure aufgefallen. Aus diesem Grund ist eine weitere Messung der Emissionsspektren von $300\ \mu\text{M}$ Nicotinsäure und Nicotinamidsäure gelöst in PBS mit einem pH von 3 und 7 bei Raumtemperatur durchgeführt worden. Die Proben sind bei 280 nm angeregt worden und die emittierten Photonen sind in einem Wellenlängenbereich von 300 bis 500 nm detektiert worden. In Abbildung 5.19 C (Nicotinamidsäure) und D (Nicotinamidsäure) sind die Emissionsspektren für einen pH Wert von 3 (blaue Linie) und 7 (rote Linie) dargestellt. Es wird deutlich, dass sich zwar mit dem pH-Wert nicht die Position des Emissionspeak ändert, aber seine Intensität, insbesondere für Nicotinsäure. Die Effektivität der Fluoreszenz von Vitamin B_3 hängt also von dem pH-Wert der Lösung ab. Dies könnte sich auch auf die Fähigkeit von Vitamin B_3 $^1\text{O}_2$ zu generieren auswirken.

5.1.8.2. Raten und Ratenkonstanten von Nicotinamidsäure

Die Raten und Ratenkonstanten werden für Nicotinamidsäure, das mit 0,64 eine besonders hohe $^1\text{O}_2$ Quantenausbeute hat, bestimmt. Dafür wird Nicotinamidsäure in schwerem Wasser (D_2O) gelöst, da wegen der langen $^1\text{O}_2$ Abklingdauer in D_2O in diesem Lösungsmittel besonders gut $^1\text{O}_2$ Lumineszenz detektiert werden kann. Die Lösungen bestehen aus Nicotinamidsäure, dem Lösungsmittel D_2O und molekularem Sauerstoff, dessen Konzentration über einen Sauerstoffsensor bestimmt wird. Bei der Variation der Quencherkonzentration befindet sich zusätzlich noch der Quencher NaN_3 in der Lösung. Bei allen Messungen ist die Laserintensität $28 \pm 3\ \text{mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ bei einer Anregung bei 308 nm. In Abbildung 5.20 A,B,C,D und E sind die ermittelten Anstiegsraten β_1 als Kreise und die Abklingraten β_2 als Rechtecke in Abhängigkeit von der Sauerstoff-, Nicotinamidsäure- oder NaN_3 -Konzentration dargestellt. Für die ermittelten Raten und Ratenkonstanten ist ein Fehler von 10 % angenommen worden und sie sind in Tabelle 5.14 zusammengefasst worden.

Bei der Sauerstoffvariation ist eine Nicotinamidsäure-Konzentration von 25 mM in D_2O verwendet worden und die Sauerstoffsättigung in Lösung ist ausgehend von 100 %, was einer Sauerstoffkonzentration von $238\ \mu\text{M}$ in D_2O entspricht, auf 2 % reduziert worden. Abbildung 5.20 A zeigt die ermittelten Anstiegs- und Abklingraten β_1 und β_2 gegen die Sauerstoffkonzentration aufgetragen, mit einem Fehler von 10 % für die Raten β_1 und β_2 und einem absoluten Fehler von $2,4\ \mu\text{M}$ für die Sauerstoffkonzentration. In Abbildung 5.20 A ist keine Aufspaltung der Anstiegs- und Abklingraten β_1 und β_2 erkennbar. Dies wird durch eine Energierückkopplung ($k_{T_1\Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$), die in etwa Null ist, bestätigt. Der Schnittpunkt der beiden Hilfsgeraden $K_{\Delta,OR}$ und K_{T_1} liegt bei unter 2 % Sauerstoffsättigung. Die Steigung der Rate

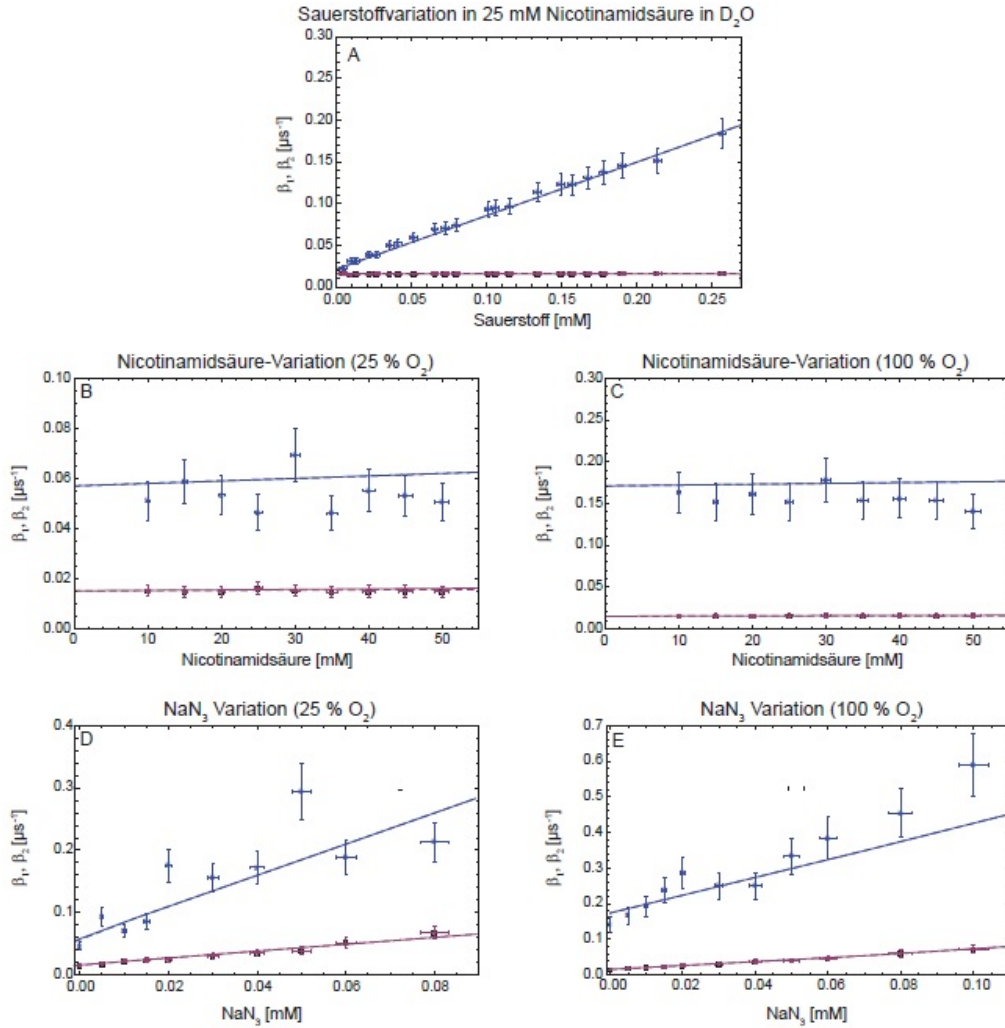


Abbildung 5.20.: Die ermittelten Abklingzeiten der Lumineszenzsignale von Nicotinamidsäure bei einer Variation der Sauerstoffkonzentration bei 25 mM Nicotinamidsäure (A), bei einer Variation der Nicotinamidsäure-Konzentration bei 25 % (B) und bei 100 % (C) Sauerstoffsättigung und bei einer Variation der Quencherkonzentration bei 25 % (D) und bei 100 % (E) Sauerstoffsättigung in D_2O sind dargestellt

β_1 bei großen Sauerstoffkonzentrationen lässt sich angeben durch $k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}$ und lässt sich durch Extrapolation bestimmen zu $(0,64 \pm 0,07) \mu s^{-1} mM^{-1}$.

Die Nicotinamidsäure Variation kann nicht bei einer Sauerstoffsättigung unter 2 % durchgeführt werden, da der verwendete Sauerstoffsensor bei so geringen Sauerstoffkonzentrationen nicht exakt genug misst. Deshalb ist die Nicotinamidsäure Variation bei einer Sauerstoffsättigung von 25 % und bei 100 % (5.20 B und C) durchgeführt worden. In Abbildung 5.20 B beschreibt die obere Linie die Triplett-Abklingdauer K_{T_1} , während die untere Linie K_{Δ} beschreibt. Durch Extrapolation ergibt sich für die y-Achsenschnittpunkte $K_{T_1}([Nicotinamidsäure]=0) = (0,56 \pm 0,06) \mu s^{-1}$ und $K_{\Delta}([Nicotinamidsäure]=0) = (0,015 \pm 0,002) \mu s^{-1}$. Damit ergibt sich für die 1O_2 Abklingdauer in D_2O von $\tau_{\Delta} = (67 \pm 7) \mu s$, was im Rahmen der Fehlergenauigkeit mit dem Literaturwert $\tau_{\Delta} = 66 \mu s$ [Ogi83] übereinstimmt. Die Rate k_{T_1} gibt die Deaktivierung vom T_1 -Zustand von Nicotinamidsäure durch das Lösungsmittel an, kann zu $(0,019 \pm 0,002) \mu s^{-1}$ bestimmt werden und entspricht einer theoretischen Triplett-Abklingdauer in D_2O von $(53 \pm 6) \mu s$.

k_{T_1}	$0,019 \mu s^{-1}$
k_{Δ}	$\frac{1}{66} \mu s^{-1}$
$k_{T_1S_0}$	$0,0001 \mu s^{-1} mM^{-1}$
k_{T_1Q}	$2,5 \mu s^{-1} mM^{-1}$
$k_{\Delta Q}$	$0,55 \mu s^{-1} mM^{-1}$
$k_{T_1\Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$	$1 \cdot 10^{-7} \mu s^{-1} mM^{-1}$
$k_{T_1\Delta} + k_{T_1O_2}$	$0,64 \mu s^{-1} mM^{-1}$
$k_{\Delta T_1} + k_{\Delta S_0}$	$0,0002 \mu s^{-1} mM^{-1}$

Tabelle 5.14.: Die ermittelten Raten und Ratenkonstanten von Nicotinamid in D_2O

Bei der NaN_3 -Variation ist eine Nicotinamidsäure-Konzentration von 25 mM bei einer Sauerstoffsättigung von 25 % und 100 % (Abbildung 5.20 D und E) verwendet worden. Die NaN_3 -Konzentration in der Lösung ist von 0 mM bis zu 0,1 mM erhöht worden. In den Abbildungen 5.20 D und E lässt sich erkennen, dass nicht nur der 1O_2 durch NaN_3 gequencht wird, sondern auch der T_1 -Zustand von Nicotinamidsäure. Für eine Sauerstoffkonzentration von 0,238 mM gilt, dass β_2 dieselbe Steigung wie die Hilfsgerade $K_{\Delta,OR}$ hat, wodurch die Ratenkonstante $k_{\Delta Q}$ durch Extrapolation zu $(0,55 \pm 0,06) \mu s^{-1} mM^{-1}$ bestimmt worden ist. Die Ratenkonstante k_{T_1Q} kann bestimmt werden zu $(2,5 \pm 0,3) \mu s^{-1} mM^{-1}$. NaN_3 quencht also den Triplett-Zustand von Nicotinamidsäure fünf mal so effektiv wie 1O_2 . Ein guter Quencher sollte 1O_2 viel effektiver quenchen als den Triplett-Zustand des Photosensitizers. Aus diesem Grund ist NaN_3 kein guter Quencher für Nicotinamidsäure. Um Nicotinamidsäure noch detaillierter zu untersuchen, sollte ein anderer wasserlöslicher Quencher gefunden werden, der nicht den Triplett-Zustand von Nicotinamidsäure quencht.

5.2. Fettlösliche Vitamine

5.2.1. Absorption

Da die Voraussetzung für die photodynamische Erzeugung von 1O_2 die Absorption von einer entsprechenden Anregungsstrahlung ist, wird für alle untersuchten fettlöslichen Vitamine ein Absorptionsspektrum im UVB und UVA Bereich bestimmt. Insbesondere wird die Absorption bei den in den Experimenten verwendeten Anregungswellenlängen 308 nm im UVB Bereich und 355 nm im UVA Bereich ermittelt. Die verschiedenen fettlöslichen Vitamine und ihre Vorstufen sind in Kapitel 4.1.2.2 näher beschrieben worden. Sie werden im Lösungsmittel Ethanol gelöst und das Absorptionsspektrum wird wie in Kapitel 4.10 beschrieben, bestimmt. In Abbildung 5.21 sind die Absorptionsspektren der fettlöslichen Vitamine graphisch dargestellt. Es ist erkennbar, dass alle untersuchten Substanzen im UVB-Bereich absorbieren. Nur Vitamin A und Vitamin K_1 absorbieren auch im gesamten UVA Bereich. Vitamin D_2 und Vitamin D_3 absorbieren noch in geringem Maße im UVA II Bereich (320 - 340 nm) und Ergosterol sogar noch in sehr geringem Maße bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm.

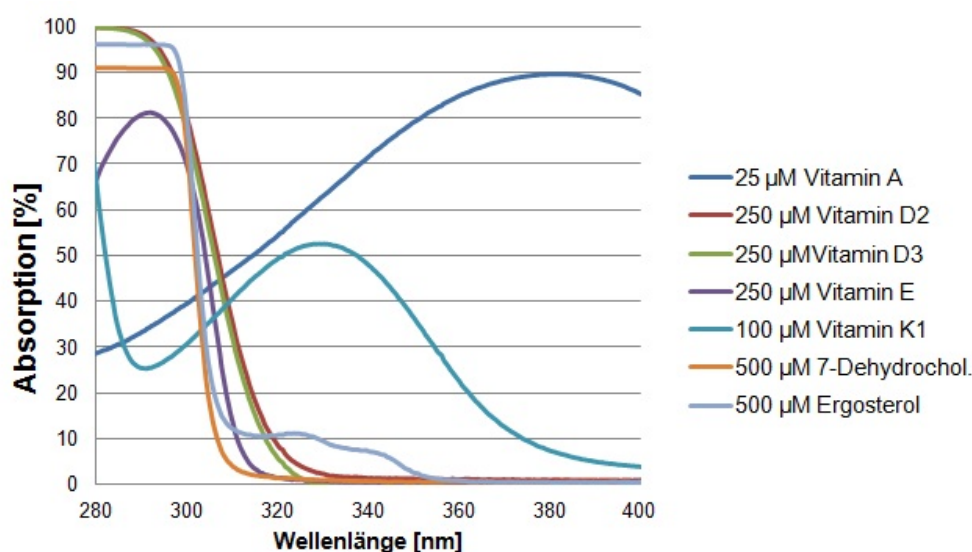


Abbildung 5.21.: Die Absorptionsspektren der verschiedenen untersuchten fettlöslichen Vitamine

In Tabelle 5.15 sind die genauen Werte für die Absorption bei 308 nm (UVB) und 355 nm (UVA) für die verschiedenen untersuchten fettlöslichen Vitaminen bei

Name	Konzentration in μM	308 nm [%]	355 nm [%]
Vitamin A	25	45 ± 1	82 ± 1
Vitamin D_2	250	44 ± 1	-
Vitamin D_3	250	40 ± 1	-
Vitamin E	250	23 ± 1	-
Vitamin K_1	100	39 ± 1	29 ± 1
Ergosterol	500	14 ± 1	2 ± 1
7-Dehydrocholesterol	500	7 ± 1	-

Tabelle 5.15.: Die Absorption der verschiedenen fettlöslichen Vitamine in Ethanol bei 308 und 355 nm in %

den entsprechenden Konzentrationen in Ethanol aufgelistet. Alle untersuchten fettlöslichen Vitamine absorbieren bei der in den Experimenten verwendeten Anregungswellenlänge (308 nm) für UVB induzierte $^1\text{O}_2$ Erzeugung. Ergosterol und 7-Dehydrocholesterol absorbieren allerdings bei einer Konzentration von 500 μM nur 14 bzw. 7 %. Alle anderen Vitamine absorbieren in dem für eine effektive $^1\text{O}_2$ Erzeugung günstigen Bereich von 20 bis 80 %. Die Vitamine A und K_1 absorbieren auch bei einer Wellenlänge von 355 nm (UVA), bei der für die anderen Vitamine keine ausreichende Absorption festgestellt werden kann. Der Fehler des Absorptionsspektrometers beträgt ± 1 %.

5.2.2. Absorptionswirkungsquerschnitt

Für die fettlöslichen Vitamine A, D_2 , D_3 , E und K_1 wird im UVB und UVA Spektralbereich der Absorptionswirkungsquerschnitt σ , wie in Kapitel 4.10 beschrieben, bestimmt. σ wird in einem Konzentrationsbereich, der um die Konzentration, bei der das Vitamin effektiv UVB (308 nm) absorbiert, liegt. Für Vitamin A wird σ für Konzentrationen von 5 bis 100 μM und für Vitamin E von 10 bis 500 μM bestimmt. So kann zum Beispiel ein Aggregieren der Moleküle in diesem Konzentrations- und Spektralbereich ausgeschlossen werden. Für die untersuchten fettlöslichen Vitamine ist in den entsprechenden Konzentrationsbereichen in einem Spektralbereich von 280 nm bis 400 nm im Rahmen der Messgenauigkeit keine Änderung von σ festgestellt worden.

5.2.3. Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion von fettlösliche Vitaminen

Die fettlöslichen Vitamine werden mit einer Konzentration in Ethanol gelöst, bei der für die Vitamine eine Absorption bei 308 nm nachweisbar ist ($\geq 5\%$). Die gelöste Substanz wird dann mit einer Pipette in eine Quarzglasküvette umgefüllt und in den in Kapitel 4.7 beschriebenen Messaufbau eingefügt. Um 1O_2 Generierung im UVB Bereich nachzuweisen, werden die gelösten Substanzen mit einer Laserwellenlänge von 308 nm angeregt.

In Abbildung 5.22 sind für alle untersuchten fettlöslichen Vitamine und ihre Vorstufen die spektral aufgelöst detektierten 1O_2 Signale dargestellt. Für alle untersuchten Substanzen ist ein klares Maximum der gefitteten Lorenzkurve zwischen 1270 und 1280 nm erkennbar. Dies ist ein Nachweis für 1O_2 Lumineszenz, da die Übergangsenergie von 1O_2 in Ethanol 0,975 eV (entspricht 1274 nm) beträgt [Bai05]. Ein zusätzliches zeitaufgelöstes 1O_2 Signal bei 1270 nm wird für alle Substanzen aufgenommen. Jedoch kann nur für die Vitamine A und E ein zeitaufgelöstes Signal detektiert werden, was intensiv genug ist, um gemäß dem Standard-Modell (siehe Kapitel 4.8) gefittet zu werden. In Abbildung 5.23 sind oben die zeitaufgelösten 1O_2 Signale von Vitamin A und E dargestellt. Für beide Substanzen kann eine Anstiegs- und Abklingdauer des Signals gefittet werden (rote Linie). Für Vitamin A beträgt die Abklingdauer $14 \pm 2 \mu s$ bei einem angenommenen Fehler von 10 % für die Messgenauigkeit. Diese Abklingdauer stimmt überein mit der Abklingdauer von 1O_2 in Ethanol, die $14 \pm 2 \mu s$ beträgt [Bai05]. Die Abklingdauer von Vitamin E beträgt $9 \pm 1 \mu s$, was eindeutig kürzer ist, als die Abklingdauer von 1O_2 in Ethanol. Dies kann damit zusammenhängen, dass Vitamin E ein effektiver 1O_2 Quencher ist [DB-CP06, KDMMS90, SS95, WKR⁺03]. Vitamin E kann also 1O_2 effektiv deaktivieren und dadurch seine Abklingdauer verkürzen.

Substanz	Ethanol	
	Konzentration	τ
Vitamin A	15 μM	14 ± 2
Vitamin D_2	250 μM	13 ± 2
Vitamin D_3	250 μM	12 ± 2
Ergosterol	500 μM	14 ± 2
7-Dehydrocholesterol	350 μM	14 ± 2
Vitamin E	250 μM	9 ± 1
Vitamin K_1	100 μM	13 ± 2

Tabelle 5.16.: Die gefittete 1O_2 Abklingdauer τ in Lösungen aus fettlöslichen Vitaminen in Ethanol

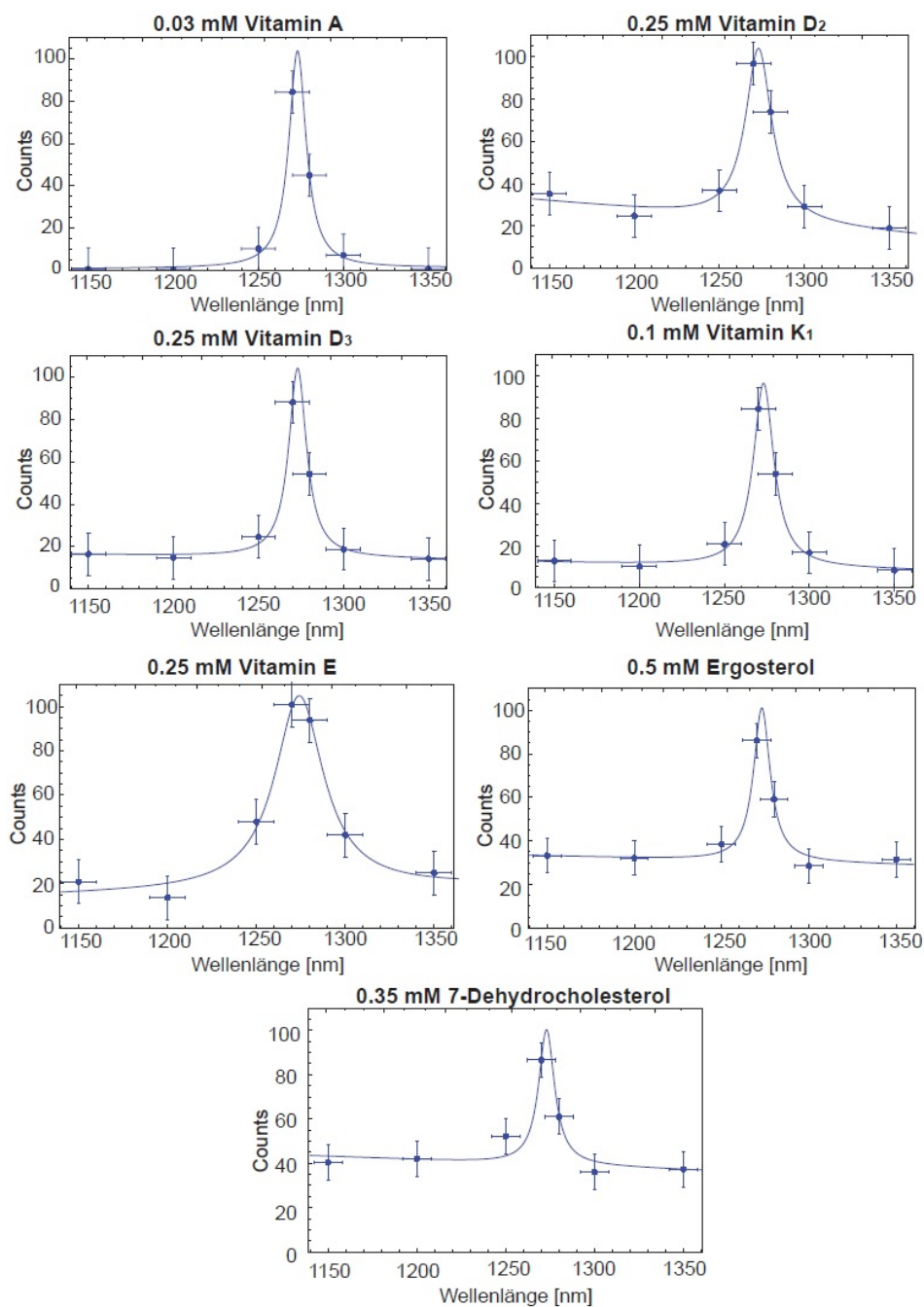


Abbildung 5.22.: Spektral aufgelöste $^1\text{O}_2$ Signale der fettlöslichen Vitamine in Ethanol

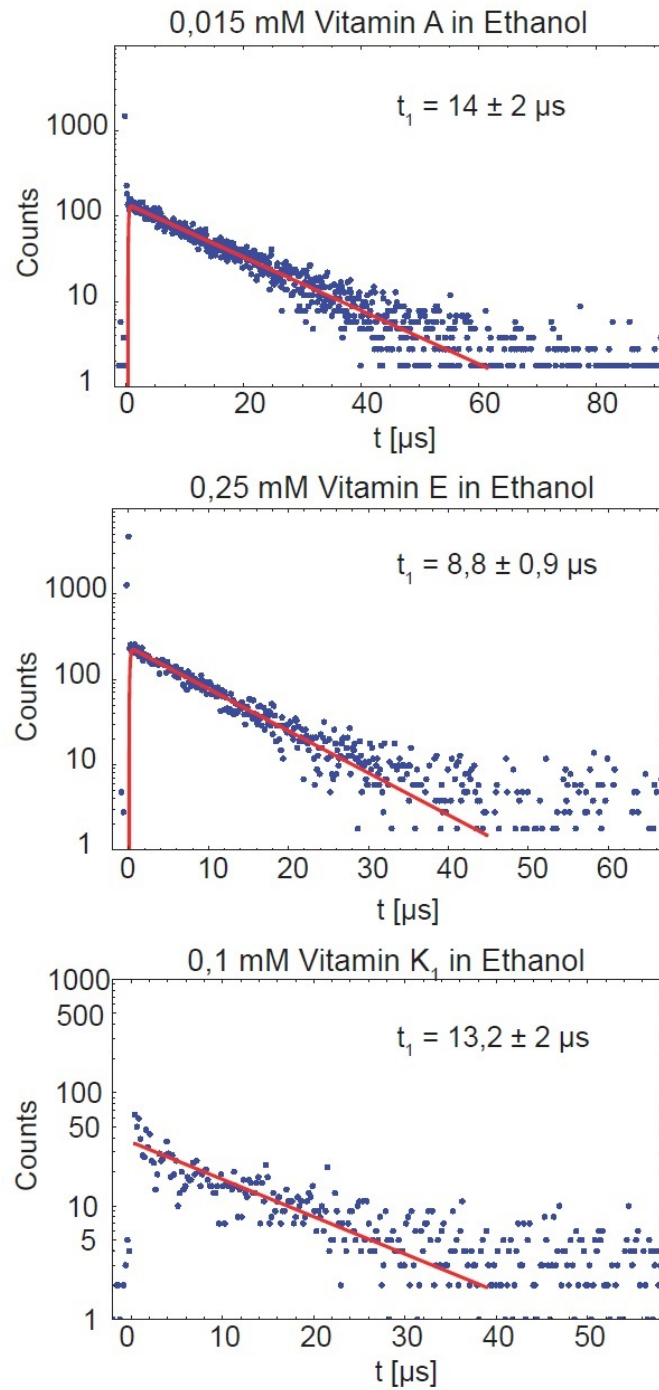


Abbildung 5.23.: Zeitaufgelöste $^1\text{O}_2$ Signale von Vitamin A, E und K_1

Die Lumineszenzsignale der Vitamine D_2 , D_3 und K_1 , sowie ihrer Vorstufen Ergosterol und 7-Dehydrocholesterol sind so schwach, dass keine Anstiegszeit der Signale ermittelt werden kann. Die Abklingdauer der Signale kann aber gefittet werden und in Abbildung 5.23 unten ist beispielhaft das Lumineszenzsignal von Vitamin K_1 mit der gefitteten Abklingdauer von $13 \pm 2 \mu\text{s}$ dargestellt. Für alle untersuchten fettlöslichen Vitamine sind die Abklingdauern des $^1\text{O}_2$ Signals in Ethanol in Tabelle 5.16 zusammengefasst worden.

5.2.4. Singulett-Sauerstoff Quantenausbeuten (UVB, UVA) von fettlöslichen Vitaminen

Nachdem nachgewiesen ist, dass die verschiedenen untersuchten fettlöslichen Vitamine und ihre Vorstufen bei UVB Anregung $^1\text{O}_2$ generieren können, wird für sie die $^1\text{O}_2$ Quantenausbeute Φ_Δ , wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben, über den Vergleich mit den in Ethanol löslichen Referenz-Photosensibilisatoren PN und TMPyP ermittelt.

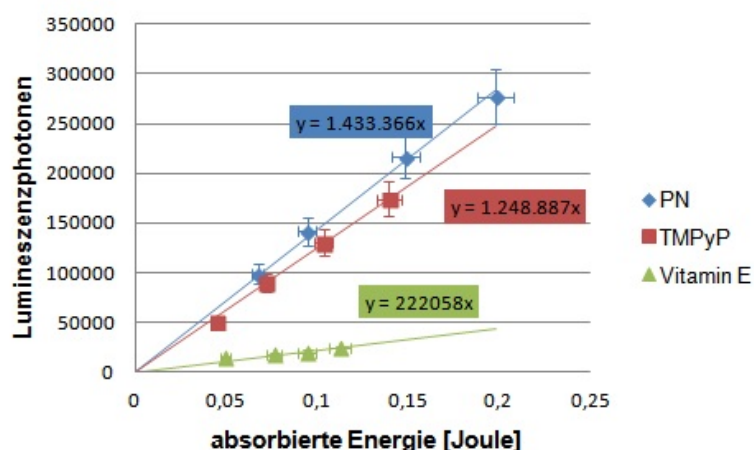


Abbildung 5.24.: Graphische Auftragung der absorbierten Energie gegen die Lumineszenzenergie von Vitamin E und den Referenz-Substanzen PN und TMPyP

Um verschiedene absorbierte Energien $E_{A,abs}$ zu erhalten, werden die Substanzen mit verschiedenen Konzentrationen in Ethanol gelöst, so dass sie zwischen 5 und 50 % bei 308 nm absorbieren. Die absorbierte Energie wird über die Absorption A und die auf die Probe eingestrahlte Laserenergie bestimmt. In den Laserstrahl ist ein zusätzlicher UV-Filter eingebaut worden, der die Laserintensität auf etwa 70 % des ursprünglichen Wertes reduziert. Die auf die Lösung auftreffende Laserintensität ist $30 \pm 5 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-1}$. Nun wird die Summe aller Lumineszenzphotonen eines

Lumineszenz-Signals ermittelt, da die Zahl der Photonen proportional zur Lumineszenzenergie E_L ist. In Abbildung 5.24 ist beispielhaft die Steigung $\frac{\text{Lumineszenzphotonen}}{E_{A,abs}}$ für die Referenz-Substanzen PN und TMPyP und das fettlösliche Vitamin E dargestellt. Aus dem Vergleich dieser Steigungen kann Φ_Δ von Vitamin E bestimmt werden. In Tabelle 5.17 sind die entsprechenden Φ_Δ für die untersuchten fettlöslichen Vitamine bei einer Anregung von 308 nm aufgeführt. Sie variieren von $0,007 \pm 0,005$ für Vitamin D_3 bis zu $0,15 \pm 0,02$ für Vitamin E. Für geringe Φ_Δ unter 0,1 wird aufgrund der kleinen Signale ein Fehler von 20 % angenommen, ansonsten wird ein Fehler der Messungen von 10 % angenommen.

Substanz	308 nm	355 nm
Vitamin A	$0,06 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,02$
Vitamin D_2	$0,02 \pm 0,01$	-
Vitamin D_3	$0,007 \pm 0,005$	-
Vitamin E	$0,15 \pm 0,02$	-
Vitamin K_1	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$
Ergosterol	$0,03 \pm 0,01$	-
7-Dehydrocholesterol	$0,03 \pm 0,01$	-

Tabelle 5.17.: Die Quantenausbeute Φ_Δ der verschiedenen fettlöslichen Vitamine bei 308 und 355 nm

Für Vitamin A und Vitamin K_1 , die auch eine hohe Absorption im gesamten UVA Spektralbereich haben (siehe Abbildung 5.21), ist Φ_Δ auch für eine Anregungswellenlänge von 355 nm bestimmt worden. So kann untersucht werden, ob es für die Effektivität der 1O_2 Erzeugung von Bedeutung ist, ob die Anregungswellenlänge im UVB oder UVA Bereich liegt. Die ermittelten Φ_Δ für Anregung bei 355 nm sind in Tabelle 5.17 dargestellt. Sie stimmen mit den ermittelten Φ_Δ für UVB Anregung im Rahmen der Messgenauigkeit überein. Ob die Anregungswellenlänge zur 1O_2 Generierung im UVA oder UVB Bereich liegt, scheint sich also nicht auf die Effektivität der 1O_2 Generierung auszuwirken.

In der Literatur sind nur Angaben zu Φ_Δ von Vitamin A und E gefunden worden. Dementsprechend sind für die anderen Vitamine keine Vergleiche mit Literaturangaben gemacht worden. Bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm ist für in Methanol gelöstes Vitamin A $\Phi_\Delta = 0,05$ [RG99], [FXY⁺07]. Dieser Wert passt im Rahmen der Messgenauigkeit sowohl mit den Messergebnissen für UVB Anregung ($0,06 \pm 0,02$) als auch mit denen für UVA Anregung ($0,07 \pm 0,02$) überein. Allerdings ist Φ_Δ von Vitamin A in Benzol gelöst über den Vergleich mit der Referenz-Substanz Tetraphenylporphyrin (TPP) zu 30 ± 4 % bestimmt worden, was nicht mit den ermittelten Werten übereinstimmt [RWB⁺]. Grund dafür könnte die Referenz-Substanz TPP sein, für die Φ_Δ von 0,63 angenommen wird [RWB⁺]. In der Literatur schwankt der

Wert für Φ_{Δ} von TPP in Benzol aber zwischen 0,41 und 0,89 [RG99]. Für in Methanol gelöstes Vitamin E ist für Anregung mit 308 nm ein Literaturwert von $0,17 \pm 0,025$ gefunden worden [DBCP06]. Dieser Wert korreliert innerhalb der Fehlergenauigkeit der Messungen mit den Messergebnissen für Vitamin E ($0,15 \pm 0,02$).

5.2.5. Photostabilität von fettlöslichen Vitaminen

Die Absorption von Strahlung durch fettlösliche Vitamine und damit ihre Fähigkeit 1O_2 zu erzeugen, ist abhängig von der molekularen Struktur der Vitamine, die durch UVB Strahlung verändert werden kann. Deshalb ist die Photostabilität der verschiedenen fettlöslichen Vitamine bei breitbandiger UVB Bestrahlung untersucht worden. Dafür werden die in Ethanol gelösten Vitamine, wie in Kapitel 4.11 beschrieben, mit dem Transluminator mit verschiedenen UVB Dosen bestrahlt. Vor und nach der Bestrahlung wird das Absorptionsspektrum der Lösung gemessen, um mögliche Veränderungen der Absorption zu ermitteln und damit mögliche Veränderungen der Molekülstruktur der Vitamine. Bei den Messungen werden UVB Dosen zwischen 0 und $6,62 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ auf die Lösungen in der Quarzglasküvette appliziert. Ein Molekül wird als photostabil betrachtet, wenn sich sein Absorptionsspektrum im gesamten Spektralbereich im Rahmen der Messgenauigkeit nicht verändert.

In Abbildung 5.25 sind die Absorptionsspektren der fettlöslichen Vitamine nach Bestrahlung zwischen 0 und $6,62 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB in einem Spektralbereich von 200 bis 600 nm dargestellt. Für Vitamin A ist erkennbar, dass die Absorption mit steigender UVB Bestrahlungsdosis im Spektralbereich zwischen 300 und 500 nm sinkt, während sie im UVC Bereich ansteigt. Es ist bei Vitamin A schon bei einer Bestrahlungsdosis von $0,27 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ eine Veränderung im Absorptionsspektrum erkennbar. Vitamin A ist also nicht photostabil bei UVB Bestrahlung. In der Literatur findet man ähnliche Ergebnisse für die Bestrahlung von Vitamin A mit sichtbarem Licht [RHBR12]. In diesem Fall sank ebenfalls das Absorptionsmaximum bei 380 nm und bei kürzeren Wellenlängen kam es zu einem relativen Anstieg, was zu der Vermutung führt, dass Vitamin A Photoabbauprodukte hat, die bei kürzeren Wellenlängen absorbieren [RHBR12]. Vitamin D_2 und D_3 sind im Rahmen der Messgenauigkeit photostabil in einem Spektralbereich von 200 bis 600 nm für eine Bestrahlungsdosis bis $0,27 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$. Bei einer höheren Bestrahlungsdosis von $0,95 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ wird erkennbar, dass die Absorption von Vitamin D_2 und D_3 im UVB und UVC Bereich sinkt. Vitamin E und K_1 sind nicht photostabil in einem Spektralbereich von 200 bis 600 nm. Schon bei einer Bestrahlungsdosis von $0,27 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB sind deutliche Veränderungen im Absorptionsspektrum sichtbar. Das Absorptionsmaximum von Vitamin E bei 290 nm verschwindet bei zunehmender UVB Bestrahlung, während die Absorption im UVC und UVA Bereich zunimmt. Bei Vitamin K_1 steigt für eine Bestrahlungsdosis

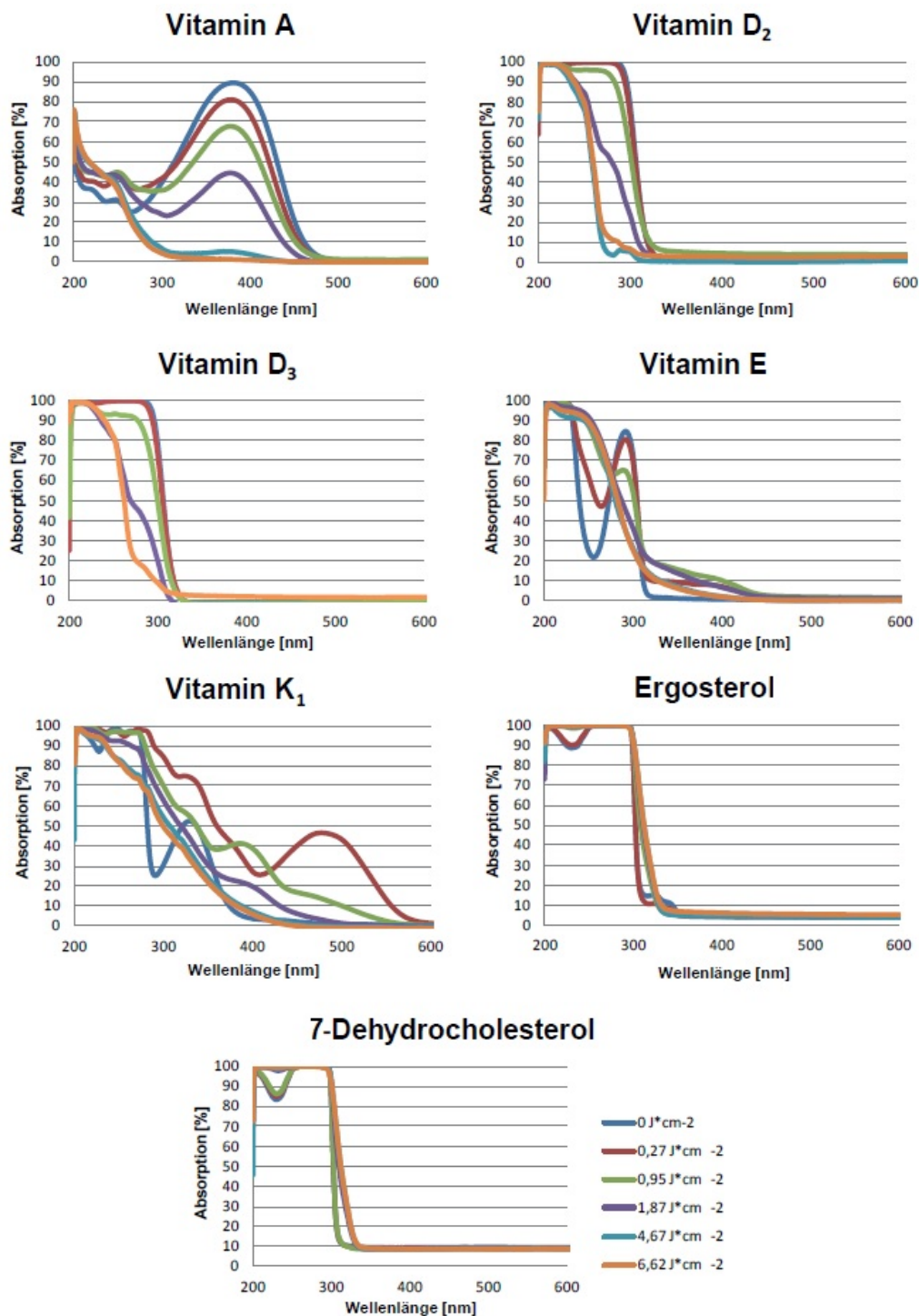


Abbildung 5.25.: Die Absorptionsspektren der fettlöslichen Vitamine nach UVB Bestrahlung zwischen 0 und $6,62 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ in einen Spektralbereich von 200 bis 600 nm

von $0,27 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB die Absorption zwischen 300 und 600 nm deutlich an, aber mit steigender UVB Bestrahlung nimmt die Absorption in diesem Spektralbereich wieder ab und nur die Absorption im UVB Bereich bleibt erhöht. Die Absorption von Ergosterol im UVB Bereich steigt bei einer Bestrahlungsdosis von $0,95 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ an. Ein Erhöhen der Bestrahlungsdosis führt zu keiner weiteren Veränderung im Rahmen der Messgenauigkeit. 7-Dehydrocholesterol ist photostabil in einem Spektralbereich von 200 bis 600 nm für eine Bestrahlungsdosis bis $0,95 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ im Rahmen der Messgenauigkeit. Für eine Bestrahlungsdosis von $1,87 \text{ J/cm}^2$ erhöht sich die Absorption im UVB Bereich. Ein weiteres Erhöhen der Bestrahlungsdosis führt zu keinen weiteren Veränderungen. Alle fettlöslichen Vitamine sind also nicht photostabil für eine UVB-Dosis von $6,62 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ in einem Spektralbereich von 200 bis 600 nm. Die Veränderungen im Absorptionsspektrum und die dafür benötigte UVB-Dosis sind aber für jedes Vitamin unterschiedlich.

Name	Absorption bei 308 nm [%]		Absorption bei 355 nm [%]	
	$0 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$	$1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$	$0 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$	$1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$
UVB				
Vitamin A	45	37	82	61
Vitamin D_2	44	31	1	5
Vitamin D_3	40	23	0	0
Ergosterol	15	47	2	2
7-Dehydrocholesterol	7	8	0	0
Vitamin E	23	29	0	14
Vitamin K_1	38	60	29	38

Tabelle 5.18.: Veränderungen der Absorption der fettlöslichen Vitamine nach Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB. Ein Anstieg der Absorption $\geq 2 \%$ ist in rot und ein Abfall in blau markiert.

$1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ ist in etwa die tägliche UVB Strahlungsdosis in Potsdam (Deutschland) [FJG02]. In Tabelle 5.18 ist die Absorption bei den Wellenlängen 308 nm (UVB) und 355 nm (UVA) für die fettlöslichen Vitamine vor und nach der Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ breitbandiger UVB Strahlung dargestellt. Wenn die Absorption nach der UVB Bestrahlung um mehr als 2 % angestiegen ist, wird dies durch einen roten Absorptionswert dargestellt und wenn die Absorption um mehr als 2 % gesunken ist, durch einen blauen. Für alle untersuchten Substanzen außer 7-Dehydrocholesterol löst die Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB eine Veränderung der Absorption um mehr als 2 % bei 308 nm und/oder 355 nm aus. Die Absorption von Vitamin A bei 308 und 355 nm sinkt nach der Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB, doch für Vitamin E und Vitamin K_1 steigt die Absorption sowohl bei 308 also auch bei 355 nm an. Für 7-Dehydrocholesterol veränderte sich die Absorption bei beiden Wellenlängen durch die Bestrahlung nicht.

In Tabelle 5.19 ist der Unterschied zwischen der Absorption der fettlöslichen Vitamine vor und nach der Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB für den gesamten UVB und UVA Bereich in % dargestellt. Dafür wird jeweils das Integral der Absorption von 280 bis 320 und von 320 bis 400 nm vor und nach der Bestrahlung gebildet. Der Zugewinn oder Verlust an Absorption nach der Bestrahlung wird dann in Prozent vom ursprünglichen Absorptionsintegral umgerechnet und ist in der Tabelle 5.19 dargestellt.

Name	Absorption UVB (280-320 nm)	Absorption UVA (320-400 nm)
UVB	$1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$	$1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$
Vitamin A	- 8 %	- 26 %
Vitamin D_2	- 20 %	+ 448 %
Vitamin D_3	- 28 %	- 100 %
Ergosterol	+ 19 %	- 13 %
7-Dehydrocholesterol	0 %	- 7 %
Vitamin E	- 11 %	+ 1047 %
Vitamin K_1	+ 93 %	+ 66

Tabelle 5.19.: Veränderungen der Absorption fettlöslicher Vitamine nach Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB im gesamten UVB bzw. im gesamten UVA Bereich in %.

Die Absorption von Vitamin A und D_3 nimmt im UVA und UVB Bereich durch die Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB ab und für Vitamin K_1 nimmt sie in beiden Bereichen zu. Für Vitamin D_2 und E nimmt die Absorption im UVB Bereich ab, aber die Absorption im UVA Bereich steigt an, obwohl die Absorption im UVA Bereich vor der Bestrahlung gegen Null tendierte. Für Ergosterol steigt die Absorption im UVB Bereich nach der Bestrahlung an und sinkt im UVA Bereich, während sich die Absorption im UVB Bereich bei der Bestrahlung von 7-Dehydrocholesterol nicht verändert und im UVA Bereich ebenfalls abnimmt.

Alle Vitamine und ihre Vorstufen verändern sich also bei UVB Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ und Photoprodukte entstehen. Für Vitamin A ist schon festgestellt worden, dass die Photoprodukte von Vitamin A auch $^1\text{O}_2$ erzeugen können mit nahezu derselben Effektivität wie Vitamin A selbst [RHBR12]. Auch für Vitamin E sind schon Veränderungen im Absorptionsspektrum nach Bestrahlung mit einer Blitzlampe festgestellt worden und z.B. Tocoperoxyl-Radikale sind als Photoprodukte von Vitamin E identifiziert worden [NMS⁺03]. Außerdem erzeugt Vitamin E, das topisch auf Mäusehaut aufgetragen und dann mit UVB bestrahlt wird, nicht nur die typischen Produkte von Reaktionen mit Peroxyl-Radikalen, sondern durch die Absorption von UVB Strahlung entstehen auch Dihydroxy-Dimere und Spirodimere als Photoprodukte [KSKL99]. In der Literatur ist auch schon bekannt, dass Vitamin K_1

nicht photostabil ist. Die Photoprodukte, die bei Bestahlung von Vitamin K_1 entstehen, hängen von den Reaktionsbedingungen (Lösungsmittel, Sauerstoffkonzentration usw.) ab und identifizierte Photoprodukte sind 1,2-Quinon Methid Tautomere und 1,3-Quinon Methid Tautomere [HHKW03]. Von den Photoprodukten von Vitamin E und K_1 ist allerdings noch nicht bekannt, ob sie auch 1O_2 erzeugen können.

5.2.6. Wechselwirkung von UVB und UVA Strahlung bei fettlöslichen Vitaminen

Um gegenseitige Beeinflussung von UVB und UVA Strahlung auf fettlösliche Vitamine und ihre Fähigkeit 1O_2 zu erzeugen, zu untersuchen, werden als Beispiele die Vitamine E und K_1 intensiver untersucht. Beide Vitamine verändern bei der Bestrahlung mit einer UVB Dosis von $0,27 J \cdot cm^{-2}$ ihr Absorptionsspektrum (Abbildung 5.25). Nach einer Bestrahlung mit $1 J \cdot cm^{-2}$ bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm steigt die Absorption sowohl von Vitamin E (von 23 % auf 29 %) als auch von Vitamin K_1 (38 % auf 60 %) an (Tabelle 5.19). Die molekulare Struktur der Vitamine hat sich also durch die Bestrahlung mit UVB verändert und Photoprodukte sind entstanden. Um zu bestimmen, ob diese Photoprodukte teilweise durch Oxidation der Vitamine entstanden sind, wird der Sauerstoffverbrauch während der Bestrahlung mit UVB gemessen. Dafür ist eine 250 μM Vitamin E und eine 100 μM Vitamin K_1 Lösung hergestellt und in den Messaufbau (Kapitel 4.7) integriert worden. Der Laserstrahl hat eine Laserintensität von $36 \pm 4 mW \cdot cm^{-1}$ (308 nm).

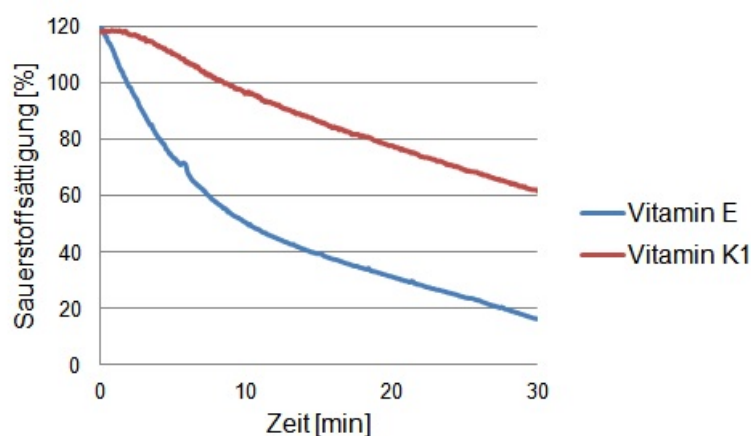


Abbildung 5.26.: Der Sauerstoffverbrauch von Vitamin E und Vitamin K_1 bei der Bestrahlung mit 308 nm, 100 % Sauerstoffsättigung entsprechen 1850 μM Sauerstoff in Ethanol

In Abbildung 5.26 ist erkennbar, dass bei der Bestrahlung der Vitamine mit 308 nm Sauerstoff verbraucht wird. Für Vitamin E sinkt die Sauerstoffsättigung bei einer Bestrahlung von 30 Minuten von 120 % auf 16 % und für Vitamin K_1 von 118 % auf 61 %. Diese Abnahme ist ein weiteres Indiz dafür, dass die beiden Vitamine bei der Bestrahlung mit UV mit Sauerstoff reagieren und vermutlich Oxidationsprodukte entstehen. Diese Photoprodukte haben andere physikalische Eigenschaften, z.B. eine andere Absorption wie die Ausgangsstoffe. Die Fähigkeit der Vitamine 1O_2 zu erzeugen könnte sich also auch verändern.

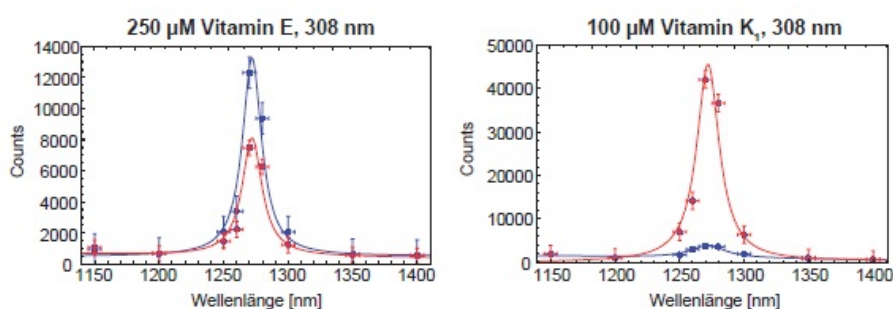


Abbildung 5.27.: Spektral aufgelöste 1O_2 Signal vor (blaue Linie) und nach (rote Linie) der Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm

Darum ist für beide Substanzen das 1O_2 Signal bei 308 nm vor und nach der Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB spektral aufgelöst detektiert worden. Dazu werden zwei 250 μM Lösungen Vitamin E und 100 μM Lösungen Vitamin K_1 in Ethanol hergestellt und in jeweils zwei Quarzglasküvetten gefüllt. Die eine Quarzglasküvette wird in den Messaufbau (Kapitel 4.7) integriert und ein Sauerstoffgehalt von etwa 100 % Sauerstoffsättigung wird mit dem Sauerstoffsensor bestimmt. Die Laserintensität bei 308 nm entspricht $37 \pm 4 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$. Die ermittelten Lumineszenz-Signale werden wie in Kapitel 4.8 beschrieben ausgewertet und die gefittete Lorentzkurve ist in Abbildung 5.27 durch die blaue Linie dargestellt. Die jeweils zweite Küvette wird mit dem UVB Transluminator (siehe Kapitel 4.11) mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ bestrahlt. Die bestrahlte Lösung wird dann in den Messaufbau integriert und die Sauerstoffsättigung in der Lösung wird auf etwa 100 % erhöht. Danach wird für die bestrahlte Lösung das spektral aufgelöste Lumineszenz-Signal bestimmt und das ausgewertete Signal ist in Abbildung 5.27 als rote Linie dargestellt. In Abbildung 5.27 ist erkennbar, dass für Vitamin E zwar die Absorption nach der Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB von 23 % auf 29 % angestiegen ist, aber das spektral aufgelöste Lumineszenz-Signal nach der Bestrahlung schwächer geworden ist. Das Maximum der gefitteten Lorentz-Kurve ist von circa 13000 gezählten Lumineszenz-Photonen vor der Bestrahlung auf circa 8000 gezählte Lumineszenz-Photonen nach der Bestrahlung gesunken. Für Vitamin K_1 steigt nach der Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB sowohl die Absorption (38 %

auf 60 %), als auch das gemessene spektral aufgelöste Lumineszenz-Signal an. Doch während sich die Absorption nicht mal verdoppelt hat, ist das Lumineszenz-Signal von einem Maximum der Lorenzkurve bei circa 5000 Lumineszenzphotonen zu einem Maximum von circa 45000 Lumineszenz-Photonen angestiegen.

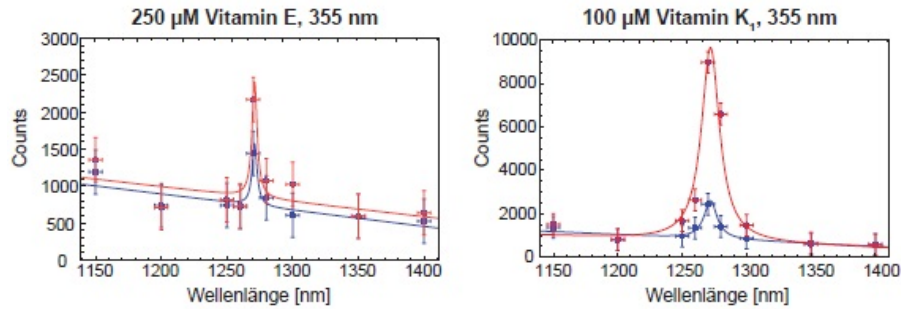


Abbildung 5.28.: Spektral aufgelöste 1O_2 Signal vor (blaue Linie) und nach (rote Linie) der Bestrahlung mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm

Wenn Vitamin E und K_1 mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB bestrahlt werden, verändert sich die Absorption auch bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm. Für Vitamin E, das im Rahmen der Fehlergenauigkeit bei 355 nm nicht absorbiert, kann nach der Bestrahlung eine Absorption von 14 % festgestellt werden und bei Vitamin K_1 steigt die Absorption durch die Bestrahlung um etwa 24 % an. Deswegen wird für beide Vitamine auch für eine Anregungswellenlänge von 355 nm ein 1O_2 Lumineszenz Signal spektral aufgelöst ermittelt. Dafür wird auch die unbestrahlte und die bestrahlte Vitamin-Lösung in den Messaufbau aus Kapitel 4.7 integriert und die Sauerstoffsättigung in der Lösung wird auf circa 100 % eingestellt. Die Laserintensität bei 355 nm entspricht $24 \pm 3 mW \cdot cm^{-2}$. In Abbildung 5.28 sind die spektral aufgelösten Lumineszenz-Signale vor (blaue Linie) und nach (rote Linie) der Bestrahlung mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB von Vitamin E und Vitamin K_1 dargestellt. Für beide Vitamine hat das Maximum des gefitteten Lumineszenz-Signal zugenommen. Für Vitamin K_1 ist das Maximum des gefitteten Signals von 2500 Lumineszenzphotonen auf 9500 Lumineszenzphotonen angestiegen, was einem Anstieg um 280 % entspricht, aber die Absorption ist durch die Bestrahlung mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB nur um 24 % angestiegen. Vitamin E hat unbestrahlt nicht nachweisbar bei 355 nm absorbiert.

Sowohl für Vitamin E als auch für Vitamin K_1 löst die Bestrahlung mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB eine Veränderung der Absorption bei den Wellenlängen 308 und 355 nm aus, sowie eine veränderte 1O_2 Generierung bei 308 und 355 nm. Durch Bestrahlung mit UVB können Vitamin E und K_1 verändert werden und Photoprodukte entstehen [KSKL99, HHKW03]. Die durch UVB Strahlung entstanden Photoprodukte haben eine andere Absorption wie Vitamin E bzw. K_1 . Außerdem verändert sich durch die

UVB Bestrahlung die Fähigkeit der Vitamin-Lösungen 1O_2 zu erzeugen. Die durch UVB Bestrahlung entstehenden Photoprodukte haben also offensichtlich eine andere Effektivität, mit der sie 1O_2 generieren können, wie die ursprünglichen Vitamine.

Um dies zu überprüfen wird die 1O_2 Quantenausbeute Φ_Δ von den mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB bestrahlten Vitamin-Lösungen ermittelt und mit den Quantenausbeuten von unbestrahlten Vitamin E und K_1 Lösungen verglichen. Die 1O_2 Quantenausbeuten Φ_Δ werden jeweils für eine Anregungswellenlänge von 308 und 355 nm bestimmt. Dafür sind drei verschieden konzentrierte Vitamin E bzw. Vitamin K_1 Lösungen hergestellt und danach mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB im UVB-Transluminator (siehe Kapitel 4.11) bestrahlt worden. Von den bestrahlten Lösungen wird mit dem Absorptionsspektrometer wie in Kapitel 4.10 beschrieben, die Absorption bestimmt. Bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm beträgt die Laserintensität $36 \pm 4 mW \cdot cm^{-2}$ und bei 355 nm $24 \pm 3 mW \cdot cm^{-2}$. Die mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB bestrahlten Lösungen werden in den Messaufbau (Kapitel 4.7) integriert und die Sauerstoffsättigung in den Lösungen wird auf circa 100 % eingestellt. Danach wird ein zeitaufgelöstes Lumineszenz-Signal gemessen, und die Summe der detektierten Lumineszenz-Photonen entspricht der Lumineszenz-Energie. Nun kann über den Vergleich mit den Referenz-Substanzen PN und TMPYP mit bekanntem Φ_Δ wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben, die 1O_2 Quantenausbeute Φ_Δ der bestrahlten Lösungen bestimmt werden.

Substanz	308 nm		355 nm	
	$0 J \cdot cm^{-2}$ UVB	$1 J \cdot cm^{-2}$ UVB	$0 J \cdot cm^{-2}$ UVB	$1 J \cdot cm^{-2}$ UVB
Vitamin E	$0,15 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,01$	-	$0,05 \pm 0,01$
Vitamin K_1	$0,02 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,02$

Tabelle 5.20.: Die ermittelten Quantenausbeuten Φ_Δ von Vitamin E und K_1 bei 308 und 355 nm und die Quantenausbeuten Φ_Δ von mit $1 J \cdot cm^{-2}$ breitbandigem UVB vorbestrahlten Vitamin E und K_1 bei 308 und 355 nm

In Tabelle 5.20 sind die ermittelten Φ_Δ von bestrahlten und unbestrahlten Vitamin E und K_1 für Anregungswellenlängen von 308 und 355 nm aufgelistet. Es ist erkennbar, dass sich die Quantenausbeute Φ_Δ durch die Bestrahlung mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB sowohl für Vitamin E als auch für Vitamin K_1 verändert hat. Unbestrahltes Vitamin E bei einer Anregung von 308 nm hat ein Φ_Δ von $0,15 \pm 0,02$, aber für die bestrahlte Lösung kann nur ein Φ_Δ von $0,05 \pm 0,01$ ermittelt werden, sowohl für eine Anregung bei 355 nm als auch bei 308 nm. Dies lässt vermuten, dass die Photoprodukte von Vitamin E weniger effektiv 1O_2 generieren können wie Vitamin E selbst. Bei Vitamin K_1 hingegen beträgt Φ_Δ für eine unbestrahlte Vitamin K_1 Lösung $0,02 \pm 0,01$, aber die bestrahlte Lösung hatte sowohl für eine Anregungswellenlänge von 308 und 355

nm ein Φ_{Δ} von etwa $0,10 \pm 0,02$. Die Photoprodukte von Vitamin K_1 scheinen also effektiver 1O_2 erzeugen zu können, als Vitamin K_1 selbst.

5.2.7. Raten und Ratenkonstanten von Vitamin E

Vitamin E hat von den untersuchten fettlöslichen Vitaminen die höchste 1O_2 Quantenausbeute, aber Vitamin E ist auch ein effektiver 1O_2 Quencher. Darum werden in diesem Kapitel die Raten und Ratenkonstanten für in Ethanol gelöstes Vitamin E bestimmt. Die Lösungen bestehen aus Vitamin E, dem Lösungsmittel Ethanol und molekularem Sauerstoff, dessen Konzentration über einen Sauerstoffsensor bestimmt wird. Die Raten und Ratenkonstanten werden durch eine Variation der Sauerstoff- und der Vitamin E Konzentration bestimmt. Eine Quenchervariation ist nicht durchgeführt worden, da kein geeigneter Quencher vorhanden war. Der 1O_2 Quencher NaN_3 ist nicht in Ethanol löslich. Ein typischer in Ethanol löslicher Quencher ist Vitamin E selbst, aber da es bei UVB Anregung 1O_2 generieren kann, ist es kein geeigneter Quencher im UVB Bereich. Die Laserintensität bei einer Anregung bei 308 nm beträgt $33 \pm 4 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$. In Abbildung 5.29 A,B und C sind die ermittelten Anstiegsraten β_1 als Kreise und die Abklingraten β_2 als Rechtecke in Abhängigkeit von der Sauerstoff- und der Vitamin E Konzentration dargestellt. Für die ermittelten Raten und Ratenkonstanten ist ein Fehler von 10 % angenommen worden und sie sind in Tabelle 5.21 zusammengefasst worden.

Bei der Sauerstoffvariation ist eine Vitamin E Konzentration von $250 \mu\text{M}$ in Ethanol verwendet worden und die Sauerstoffsättigung in der Lösung ist ausgehend von 20 %, was einer Sauerstoffkonzentration von $[O_2] = 370 \mu\text{M}$ in Ethanol entspricht, auf 1 % ($[O_2] = 18,5 \mu\text{M}$) reduziert worden. Für Sauerstoffkonzentrationen über 20 % konnte die Anstiegsrate der Signale nicht mehr korrekt gefittet werden, da sie bei hohen Sauerstoffkonzentrationen zu klein wird. Darum ist auf höhere Sauerstoffkonzentrationen verzichtet worden. Die Abbildung 5.29 A zeigt die ermittelten Anstiegs- und Abklingraten β_1 und β_2 gegen die Sauerstoffkonzentration aufgetragen, mit einem Fehler von 10 % für die Raten β_1 und β_2 und einem absoluten Fehler von $18,5 \mu\text{M}$ für die Sauerstoffkonzentration. In Abbildung 5.29 A ist keine Aufspaltung der Anstiegs- und Abklingraten β_1 und β_2 für eine Sauerstoffsättigung ≥ 1 % zu erkennen und die Energierückkopplung $k_{T_1\Delta} \cdot k_{\Delta T_1} = (0,001 \pm 0,0001) \mu\text{s}^{-2}\text{mM}^{-2}$ ist vernachlässigbar gering. Der Schnittpunkt der beiden Hilfsgeraden $K_{\Delta,OR}$ und K_{T_1} liegt unter einer Sauerstoffsättigung von 1 %. Die Steigung der Rate β_1 bei großen Sauerstoffkonzentrationen lässt sich angeben durch $k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}$ und lässt sich durch Extrapolation bestimmen zu $(12 \pm 2) \mu\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$. Die Steigung beschreibt die Deaktivierung des T_1 -Zustands durch molekularen Sauerstoff im Grundzustand und durch die Erzeugung von 1O_2 . Man kann erkennen, dass der Triplett-Zustand von

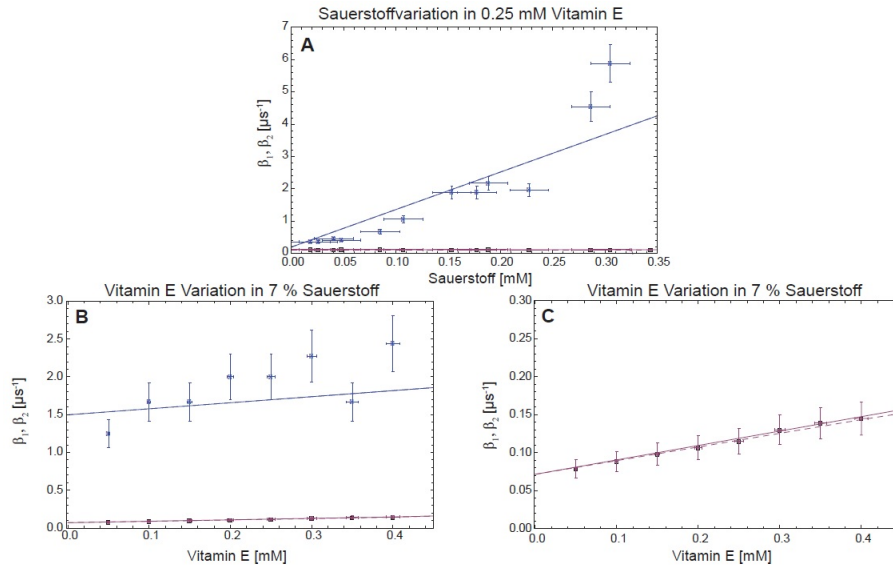


Abbildung 5.29.: Die ermittelten Abklingzeiten der Lumineszenzsignale von Vitamin E bei einer Variation der Sauerstoffkonzentration bei 0,25 mM Vitamin E (A) und bei einer Variation der Vitamin E Konzentration bei 7 % Sauerstoff (B und C) in Ethanol sind dargestellt

Vitamin E effektiv durch Sauerstoff gequencht wird. Das lässt sich durch die hohe 1O_2 Quantenausbeute von Vitamin E und durch seine Fähigkeit mit Sauerstoff zu reagieren (Abbildung 5.26) erklären.

k_{T_1}	$0,001 \mu s^{-1}$
k_{Δ}	$\frac{1}{14} \mu s^{-1}$
$k_{T_1 S_0}$	$0,19 \mu s^{-1} mM^{-1}$
$k_{T_1 \Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$	$0,001 \mu s^{-1} mM^{-1}$
$k_{T_1 \Delta} + k_{T_1 O_2}$	$11,6 \mu s^{-1} mM^{-1}$
$k_{\Delta T_1} + k_{\Delta S_0}$	$0,19 \mu s^{-1} mM^{-1}$

Tabelle 5.21.: Die ermittelten Raten und Ratenkonstanten von Vitamin E in Ethanol

Bei der Variation der Vitamin E Konzentration ist die Konzentration von $50 \mu M$ bis zu $500 \mu M$ erhöht worden bei einer Sauerstoffsättigung von 14 % ($259 \mu M$) und von 7 % ($130 \mu M$, Abbildung 5.29 B und C). In Abbildung 5.29 B beschreibt die obere Linie die Triplett-Abklingdauer K_{T_1} , während die untere Linie K_{Δ} beschreibt, die noch mal detaillierter in Abbildung 5.29 C dargestellt ist. Durch Extrapolation ergibt sich für die y-Achsenschnittpunkte $K_{T_1}([VitaminE] = 0) = (1,5 \pm 0,2) \mu s^{-1}$ und $K_{\Delta}([VitaminE] = 0) = (0,07 \pm 0,01) \mu s^{-1}$. Damit ergibt sich für die 1O_2 Abklingdauer in Ethanol $\tau_{\Delta} = (14 \pm 2) \mu s$ bei einer Sauerstoffsättigung von 7 %, was im Rahmen der Fehlergenauigkeit mit dem Literaturwert $\tau_{\Delta} = (14 \pm 2) \mu s$ in

Ethanol [Bai05] übereinstimmt. 1O_2 wird auch effektiv durch Vitamin E gequencht, was durch die Summe der Ratenkonstanten $k_{\Delta T_1} + k_{\Delta S_0} = (0,19 \pm 0,02) \mu s^{-1} mM^{-1}$ beschrieben wird. Die ermittelte 1O_2 Quenchingratenkonstante ($1,9 \cdot 10^8 M^{-1} s^{-1}$) von Vitamin E liegt im Rahmen der Quenchingratenkonstanten, die in der Literatur für Vitamin E gefunden werden [KDMMS90] [Nik13] [SS95].

5.3. Medikamente

Es werden auch verschiedene Medikamente untersucht, die in Zusammenhang mit einer erhöhten Lichtempfindlichkeit oder sogar Phototoxizität gebracht werden [SS07], [ME09], [OPZ⁺05]. Die Wirkstoffe von bestimmten Medikamenten (z.B. Antibiotika) können sich nach systemischer Gabe für eine gewisse Zeit in der Haut einlagern. Nach der Einlagerung in die Haut, können diese Wirkstoffe unter UV-Strahlung reaktive Sauerstoffspezies, darunter auch 1O_2 , erzeugen [BRK⁺11]. Dieser Effekt ist seit langem als kutane Lichtsensibilisierung bekannt [Bor85]. Die untersuchten Medikamente sind detailliert in Kapitel 4.1.3 beschrieben.

5.3.1. Absorption

Zunächst wird die Absorption der verschiedenen Medikamente sowohl im UVA als auch im UVB Bereich untersucht. In Abbildung 5.30 sind die Absorptionsspektren der untersuchten Medikamente in einem Wellenlängenbereich von 280 bis 400 nm dargestellt. Diese Absorptionsspektren sind wie in Kapitel 4.10 beschrieben, gemessen worden. Dazu sind die verschiedenen Medikamente in H_2O oder D_2O gelöst worden, so dass eine 25 μM Tetracyclin, Doxycyclin, Enoxacin, Levofloxacin und Norfloxacin Lösung, eine 50 μM Azathioprin und eine 100 μM 6-Thioguanin Lösung entstand. Von Norfloxacin und Enoxacin ist bekannt, dass diese Substanzen wasserlöslich sind [MSC98] und auch die anderen Medikamente lassen sich in wässriger Lösung lösen. In Abbildung 5.30 ist erkennbar, dass die verschiedenen Medikamente bei dieser Konzentration in wässriger Lösung sowohl im UVB als auch im UVA-Bereich absorbieren. 6-Thioguanin hat ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum im UVA Bereich bei 340 nm, was mit Literaturwerten übereinstimmt [OPZ⁺05].

In Tabelle 5.22 sind für die entsprechende Medikament Konzentration in wässriger Lösung die Absorption in % für die Wellenlängen 308 (UVB) und 330 nm (UVA) aufgelistet. Diese Wellenlängen werden später genutzt, um durch die Anregung der Medikamente 1O_2 im UVB und UVA Bereich zu erzeugen. Dafür ist eine Absorption

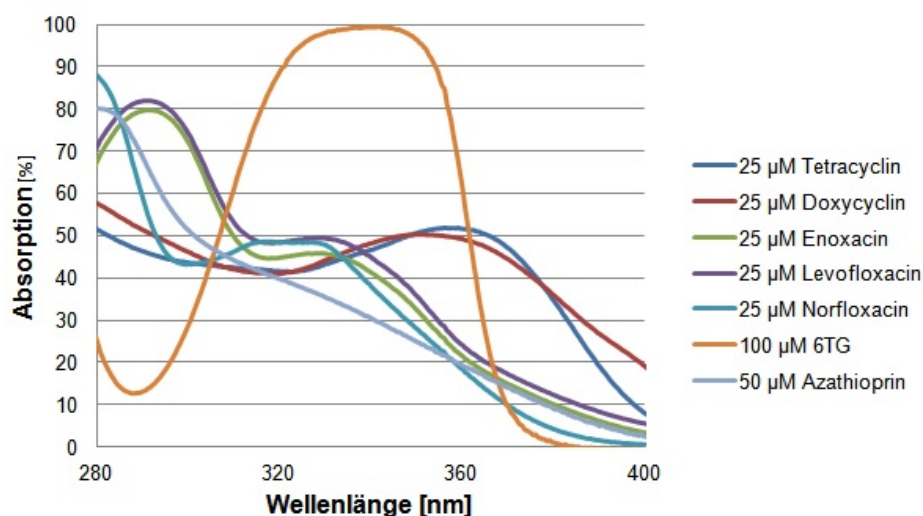


Abbildung 5.30.: Absorptionsspektren der verschiedenen untersuchten Medikamente

Name	Konzentration in μM	308 nm [%]	330 nm [%]
Tetracyclin	25	43 ± 1	43 ± 1
Doxycyclin	25	43 ± 1	44 ± 1
Norfloxacin	25	46 ± 1	48 ± 1
Enoxacin	25	53 ± 1	45 ± 1
Levofloxacin	25	56 ± 1	51 ± 1
Azathioprin	50	45 ± 1	35 ± 1
6-Thioguanin	100	55 ± 1	98 ± 1

Tabelle 5.22.: Die Absorption der verschiedenen Medikamente bei 308 und 330 nm in %

zwischen 20 und 80 % geeignet. Bei einer Anregung bei 308 nm haben die 25 μM Tetracyclin, Doxycyclin, Enoxacin, Levofloxacin und Norfloxacin Lösungen, die 50 μM Azathioprin und die 100 μM 6-Thioguanin Lösung eine geeignete Absorption. Auch bei UVA Anregung sind diese Konzentrationen geeignet, da die Absorption bei einer Anregung von 330 nm zwischen 20 und 80 % liegt, außer für das Medikament 6-Thioguanin. 100 μM 6-Thioguanin hat bei einer Wellenlänge von 330 nm eine Absorption von fast 100 %, weshalb für die Anregung mit 330 nm eine geringere Konzentration von 6-Thioguanin in wässriger Lösung verwendet wird.

5.3.2. Absorptionswirkungsquerschnitt

Für die verschiedenen Medikamente ist der Absorptionswirkungsquerschnitt σ in einem Wellenlängenbereich von 280 bis 400 nm für Konzentrationen zwischen 5 und 100 μM ermittelt worden, da die folgenden Messungen in diesem Konzentrationsbereich durchgeführt werden. Die Messung von σ wird in Kapitel 4.10 beschrieben.

In Abbildung 5.31 sind die σ der verschiedenen Medikamente für verschiedene Konzentrationen in einem Wellenlängenbereich von 280 bis 400 nm abgebildet. Im Rahmen der Messgenauigkeit stimmen die σ für die verschiedenen Konzentrationen in diesem Wellenlängenbereich überein. Eine Veränderung des in diesem Konzentrationsbereich z.B. durch Aggregation kann also ausgeschlossen werden.

5.3.3. Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion von Medikamenten

Um die Erzeugung von $^1\text{O}_2$ bei UVB Anregung experimentell zu belegen, werden 25 μM Tetracyclin, Doxycyclin, Enoxacin, Levofloxacin und Norfloxacin, 50 μM Azathioprin und 100 μM 6-Thioguanin in $D_2\text{O}$ gelöst und in eine Quarzglasküvette gefüllt. Diese Lösungen werden in den in Kapitel 4.7 beschriebenen Messaufbau integriert und mit dem abstimmbaren Lasersystem bei einer Wellenlänge von 308 nm angeregt. Die Laserintensität bei 308 nm ist $29 \pm 2 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-1}$. Die spektral aufgelöst detektierten Lumineszenz-Signale werden wie in Kapitel 4.8 beschrieben, ausgewertet, auf ihren Maximalwert normiert und mit einer Lorentzfunktion gefittet. In Abbildung 5.32 sind die spektral aufgelöst detektierten $^1\text{O}_2$ Signale der verschiedenen Medikamente abgebildet. Für alle Medikamente ist ein deutlicher Peak zwischen 1270 und 1280 nm erkennbar, was mit der Übergangsenergie von $^1\text{O}_2$ in $D_2\text{O}$ von 1274 nm gut übereinstimmt [BFP⁺07].

Für ein zeitlich aufgelöstes $^1\text{O}_2$ Signal wird ein 1270 nm Filter mit einer Bandbreite von 10 nm vor dem Photomultiplier eingebaut. Die zeitlich aufgelösten $^1\text{O}_2$ Signale für die verschiedenen in $D_2\text{O}$ gelöste Medikamente sind in Abbildung 5.33 dargestellt. Die Signale werden wie in Kapitel 4.8 beschrieben, gefittet und die entsprechenden Abkling- und Anstiegszeiten t_1 und t_2 sind ermittelt worden. Für alle Signale können Abklingzeiten für das $^1\text{O}_2$ Signal zwischen 61 und 68 μs bestimmt werden. Diese passen überein mit der $^1\text{O}_2$ Abklingdauer in $D_2\text{O}$ von 66 μs [Ogi83].

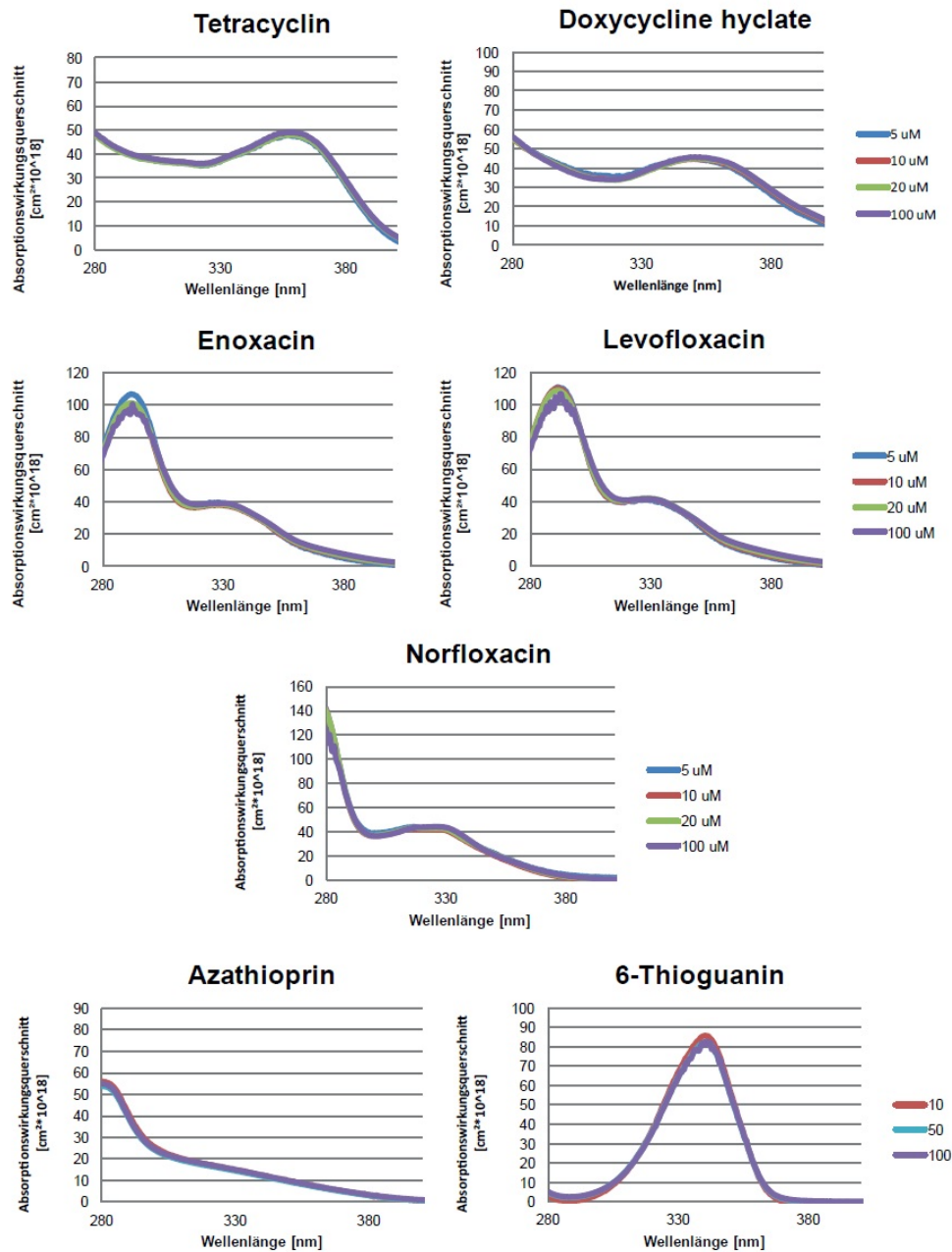


Abbildung 5.31.: σ der untersuchten Medikamente für Konzentrationen zwischen 5 und 100 μM

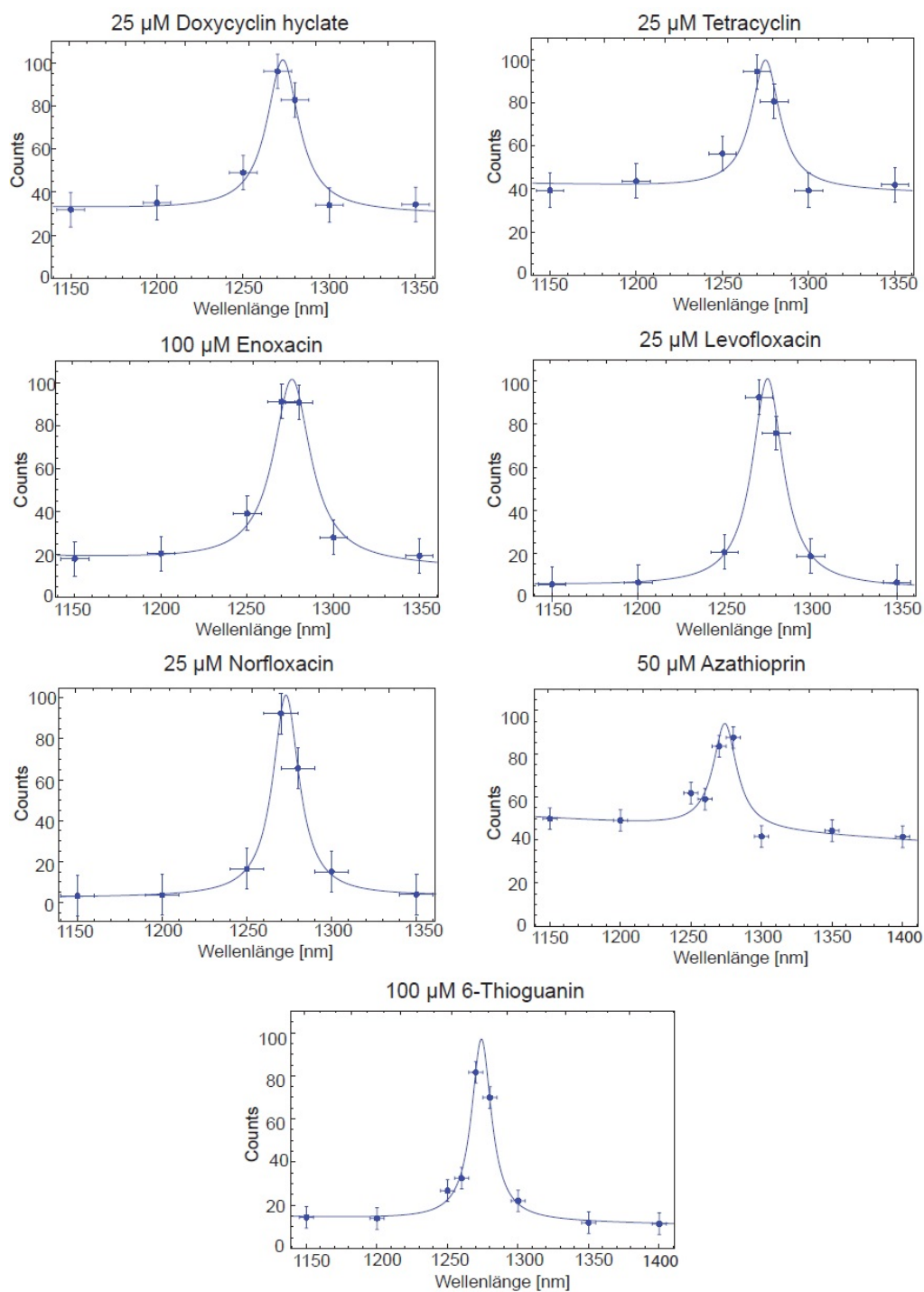


Abbildung 5.32.: Spektral aufgelöst detektierte Lumineszenzsignale der untersuchten Medikamente

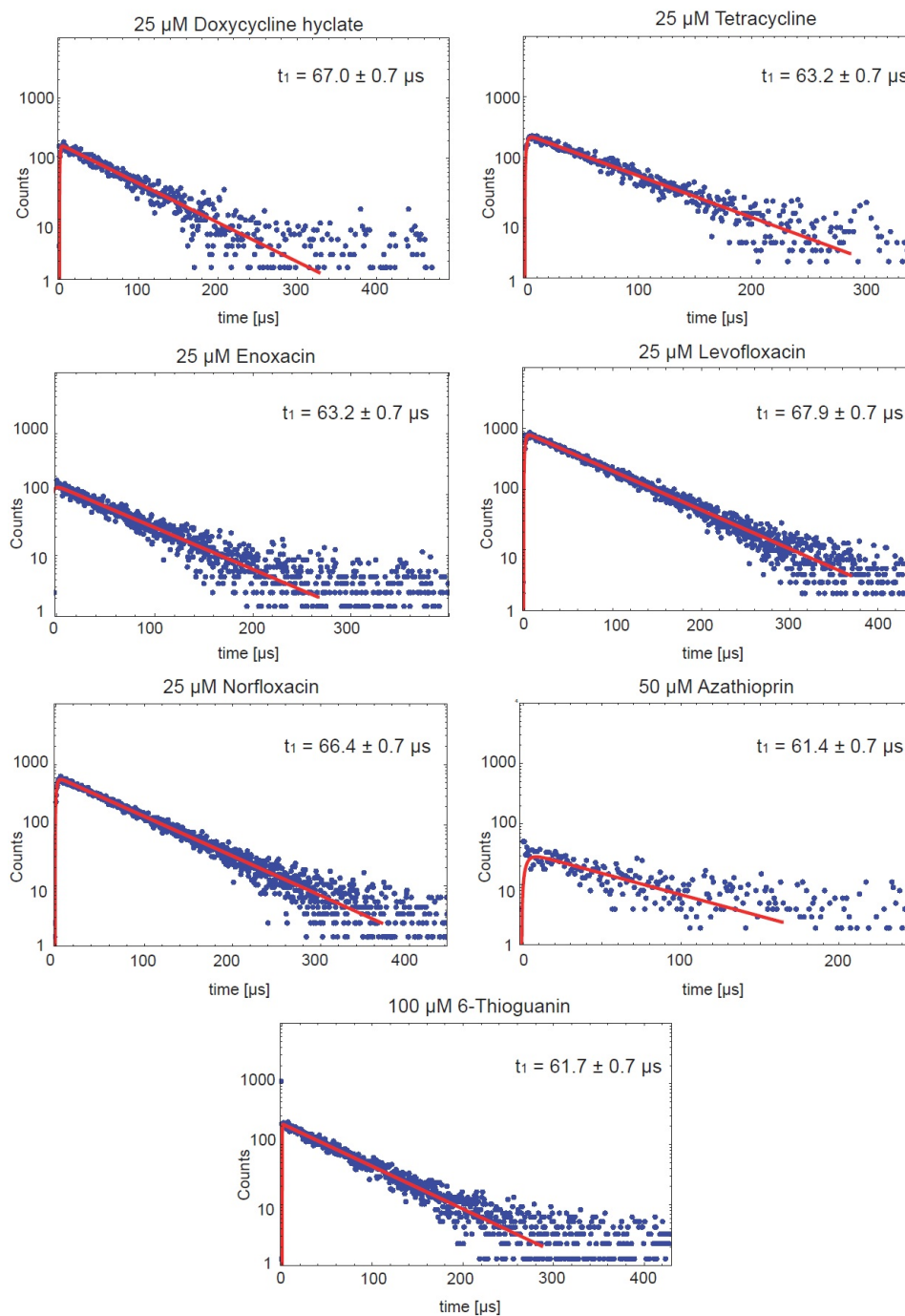


Abbildung 5.33.: Zeitlich aufgelöste Lumineszenzsignale der untersuchten Medikamente

5.3.4. Singulett-Sauerstoff Quantenausbeuten (UVB, UVAI) von Medikamenten

Nachdem sichergestellt ist, dass alle untersuchten Medikamente 1O_2 bei UVB Anregung generieren können, wird die Effektivität dieser 1O_2 Produktion ermittelt. Die 1O_2 Quantenausbeute wird wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben, über den Vergleich mit den zwei Referenz-Photosensibilisatoren PNS und TMPyP, die ebenfalls in D_2O gelöst sind, ermittelt. Für verschiedene absorbierte Energien $E_{A,abs}$ wird die Summe der Lumineszenzphotonen, die proportional ist zur Lumineszenzenergie E_L ermittelt und über den Vergleich mit den Referenzsubstanzen PNS und TMPyP wird die Quantenausbeute bestimmt. In Tabelle 5.23 sind die entsprechenden Quantenausbeuten für die untersuchten Medikamente bei einer Anregung von 308 nm aufgeführt. Sie variieren von $0,01 \pm 0,005$ für Azathioprin bis zu $0,12 \pm 0,02$ für Levofloxacin.

UVB und UVA Strahlung haben oft eine unterschiedliche biologische Wirkung [BK00] [BH03] [CMW⁺]. Eine mögliche Begründung wären unterschiedliche Quantenausbeuten für die Anregung mit UVA und UVB Strahlung. Darum wird die 1O_2 Quantenausbeute auch bei UVA Anregung ermittelt. Dabei wird mit 330 nm (UVAI) angeregt, da alle untersuchten Medikamente bei 330 nm noch effektiv absorbieren (siehe Tabelle 5.22), während bei langwelligeren Wellenlängen im UVA Bereich die Absorption einiger Medikamente nachlässt (Abbildung 5.30). Die Quantenausbeuten bei 330 nm werden genauso ermittelt wie die Quantenausbeuten bei 308 nm, nur das jetzt die Medikamente und Referenzsubstanzen mit 330 nm angeregt werden. Die ermittelten Quantenausbeuten für eine Anregung bei 330 nm für die untersuchten Medikamente sind in Tabelle 5.23 aufgeführt. Im Rahmen der Fehlergenauigkeit entsprechen die Quantenausbeuten für eine UVAI Anregung den Quantenausbeuten bei UVB Anregung.

Name	308 nm	330 nm
Tetracyclin	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$
Doxycyclin	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$
Norfloxacin	$0,08 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$
Enoxacin	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$
Levofloxacin	$0,12 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,02$
Azathioprin	$0,01 \pm 0,005$	$0,01 \pm 0,005$
6 Thioguanin	$0,09 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$

Tabelle 5.23.: Die 1O_2 Quantenausbeuten der verschiedenen Medikamente bei 308 und 330 nm in luftgesättigtem D_2O

Für in luftgesättigtem D_2O gelöstem Tetracyclin und Doxycyclin wird sowohl bei der Anregung im UVB als auch im UVAI Bereich eine 1O_2 Quantenausbeute von

$0,02 \pm 0,01$ ermittelt. Das entspricht dem in der Literatur gefundenen Wert für die 1O_2 Quantenausbeute von Tetracyclin und Doxycyclin [MSG⁺98]. Norfloxacin in D_2O gelöst hat eine 1O_2 Quantenausbeute von $0,08 \pm 0,01$ bzw. $0,07 \pm 0,01$ für Anregung im UVB bzw. UVAI Bereich. Das korreliert mit dem Literaturwert für in D_2O Phosphat Buffer gelöstes Norfloxacin von 0,081 [MSC98]. Für in D_2O Phosphat Buffer gelöstes Enoxacin wird ein Literaturwert für die 1O_2 Quantenausbeute von 0,061 gefunden [MSC98], der nicht mit dem gemessenen Wert für Enoxacin von $0,03 \pm 0,01$ übereinstimmt. Für Levofloxacin und Azathioprin sind keine Werte für eine 1O_2 Quantenausbeute in der Literatur gefunden worden. Die quantitative 1O_2 Erzeugung ist erstmals in dieser Arbeit ermittelt worden. Für Levofloxacin in D_2O wird eine Quantenausbeute von $0,12 \pm 0,02$ und für Azathioprin eine Quantenausbeute von $0,01 \pm 0,005$ ermittelt. Für 6-Thioguanin in D_2O ist eine 1O_2 Quantenausbeute zwischen $0,09 \pm 0,01$ und $0,07 \pm 0,01$ für UV Anregung ermittelt worden. In der Literatur werden für die 1O_2 Quantenausbeute Werte von $0,58 \pm 0,08$ bzw. $0,56 \pm 0,18$ gefunden [ZZS⁺11]. Allerdings sind diese Quantenausbeuten nicht über den Vergleich von direkt gemessenen zeitaufgelösten Lumineszenz-Signalen mit einer Referenzsubstanz, sondern indirekt per 1O_2 -Trapping über den Vergleich mit der Referenzsubstanz TCPP ($\phi_\Delta = 0,53$) ermittelt worden. Es sind außerdem andere Lösungsmittel (D_2O Tris Buffer, NaOH D_2O) und andere Anregungswellenlängen (337 nm, 340 nm) benutzt worden, als bei den Messungen in dieser Arbeit. Dies könnten Gründe für eine Abweichung der ermittelten Ergebnisse sein.

Die untersuchten Medikamente können alle 1O_2 erzeugen und einige haben sogar 1O_2 Quantenausbeuten über 0,1. Damit könnte der erzeugte 1O_2 teilweise verantwortlich sein für die kutane Lichtsensibilisierung durch diese Medikamente.

5.3.5. Photostabilität der Medikamente

Für die gleichbleibende Erzeugung von 1O_2 ist es von Bedeutung, dass sich die als Chromophore agierenden Moleküle nicht verändern. Deshalb wird die Photostabilität der verschiedenen Medikamente bei UVB Bestrahlung getestet. Dafür werden die gelösten Medikamente mit einem breitband UVB Transluminator (Kapitel 4.11) bestrahlt. Ein Molekül wird als stabil betrachtet, wenn sich sein Absorptionsspektrum im gesamten Spektralbereich im Rahmen der Messgenauigkeit für die applizierte UVB Dosis nicht verändert.

In Abbildung 5.34 sind die Absorptionsspektren der verschiedenen Medikamente in einem Spektralbereich von 200 bis 500 nm nach den verschiedenen applizierten UVB Dosen dargestellt. Für 25 μM Tetracycline, Doxycycline, Enoxacin und Norfloxacin haben sich die Absorptionsspektren für UVB Dosen bis zu $0,95 J \cdot cm^{-2}$ im Rahmen

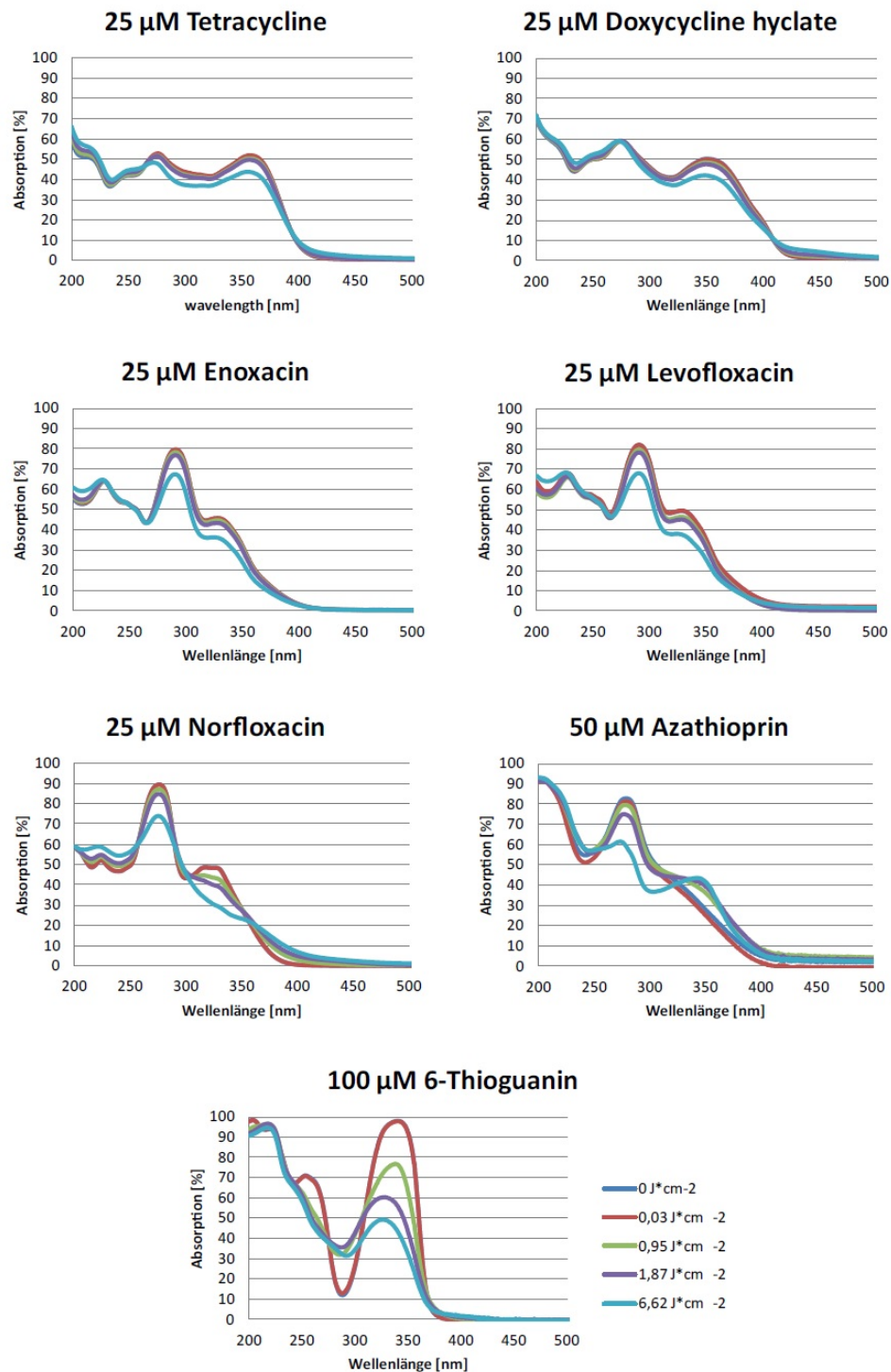


Abbildung 5.34.: Absorptionsspektren der untersuchten Medikamente nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB Dosen

der Messgenauigkeit nicht verändert. Diese Medikamente sind stabil für UVB Dosen unter $0,95 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$. Für eine UVB Dosis von $6,62 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ ist eine deutliche Veränderung der Absorption dieser Medikamente sichtbar. Für diese UVB Dosis sind sie also nicht stabil. Für $25 \text{ } \mu\text{M}$ Norfloxacin, $50 \text{ } \mu\text{M}$ Azathioprin und $100 \text{ } \mu\text{M}$ 6-Thioguanin können auch schon deutliche Veränderungen der Absorption nach Bestrahlung mit UVB Dosen von $0,95 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ festgestellt werden. Diese Medikamente sind auch für geringe UVB Dosen instabil.

Name	Absorption bei 308 nm		Absorption bei 355 nm	
	$0 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$	$1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$	$0 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$	$1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$
Tetracyclin	43	42	52	51
Doxycyclin	43	42	50	48
Norfloxacin	45	44	23	25
Enoxacin	53	51	26	26
Levofloxacin	56	53	29	26
Azathioprin	49	48	25	34
6 Thioguanin	49	53	80	49

Tabelle 5.24.: Veränderungen der Absorption der Medikamente nach Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB. Ein Anstieg der Absorption $\geq 2 \%$ ist in rot und ein Abfall in blau markiert.

In Tabelle 5.24 sind die Veränderungen der Absorption der Medikamente für die Wellenlängen 308 nm (UVB) und 355 nm (UVA) nach der Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ dargestellt. Man kann erkennen, dass sich die Absorption von $25 \text{ } \mu\text{M}$ Tetracyclin, Doxycyclin, Enoxacin und Norfloxacin um nicht mehr als 2 % bei beiden Wellenlängen verändert, während für $25 \text{ } \mu\text{M}$ Norfloxacin, $50 \text{ } \mu\text{M}$ Azathioprin und $100 \text{ } \mu\text{M}$ 6-Thioguanin deutliche Veränderungen in der Absorption festgestellt werden können. Die Absorption von Azathioprin steigt bei 355 nm um 9 % an nach der Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$, während die Absorption von 6-Thioguanin bei 355 nm um 31 % abfällt.

Durch die Bestrahlung mit UVB kann sich also die molekulare Struktur der Medikamente verändern, wodurch sie eine andere Absorption haben. Auch andere photophysikalische Eigenschaften, wie die Fähigkeit $^1\text{O}_2$ zu generieren, können sich verändert haben. Ein nächster Schritt wäre die Untersuchung der $^1\text{O}_2$ Erzeugung der durch UVB Bestrahlung entstandenen Moleküle, um festzustellen, ob die Fähigkeit der Medikamente $^1\text{O}_2$ zu erzeugen mit der UVB Strahlung ab oder zunimmt. Das könnte Aufschluss darüber geben, ob die kutane Lichtsensibilisierung durch die Medikament bei längerer UVB Exposition ab oder zunimmt.

5.4. Hautpflegeprodukte

Bei den untersuchten Hautpflegeprodukten handelt es sich um verschiedene Cremes, Salben, Emulsionen oder Sonnencremes, die mit den entsprechenden Notationen aus Tabelle 4.4 bezeichnet werden. Hautpflegeprodukte werden topisch auf die Haut aufgetragen und ihre Inhaltstoffe penetrieren die Epidermis und Dermis je nach Wirkungsziel [PLR⁺12]. Verschiedenen Bestandteile der Hautpflegeprodukte können sich also entweder extrazellulär oder in Zellen der Epidermis und Dermis befinden. Versuche mit einem Vitamin E haltigem Waschmittel führten beispielsweise zu deutlich Vitamin E reicheren Hautbarrierelipiden als im Vergleich mit Vitamin E freiem Waschmittel [EMTP⁺05]. Durch das Vitamin E im Waschmittel ist auch der Vitamin E Gehalt in Hautbestandteilen gestiegen. Vitamin E, Vitamin A und Vitamin B₃, die alle effektiv ¹O₂ bei UVB Bestrahlung generieren können (Kapitel 5.6.1), sind in vielen weiteren Hautpflegeprodukten zu finden [FHR⁺10] [RZ99]. Auch andere häufige Bestandteile von Hautpflegeprodukten, wie z.B. freie Fettsäuren, können ¹O₂ generieren [RMK⁺13]. Es stellt sich die Frage, ob durch die Anwendung von Hautpflegeprodukten Inhaltstoffe auf die Haut aufgebracht werden oder in der Haut deponiert werden, die unter UV-Bestrahlung durch z.B. Sonnenlicht ¹O₂ erzeugen können. Ein solcher in der Epidermis oder Dermis generierter ¹O₂ könnte mit anderen Hautkomponenten reagieren und diese z.B. schädigen [BK00] [KHS01] [KKS03]. Dadurch könnte ein zusätzliches Schädigungspotential gegeben sein. Damit ist es von Interesse, ob verschiedene Hautpflegeprodukte bei direkter Anregung durch UV Strahlung, insbesondere UVB Strahlung, ¹O₂ produzieren. Um dies zu messen, wird das entsprechende Hautpflegeprodukt auf eine 0,5 mm vertiefte Quarzglasplatte gestrichen, glatt gestrichen und mit einem entsprechenden Quarzglasdeckel abgedichtet (Kapitel 5.4.2).

5.4.1. Minimalisierung von Fehlern durch Streueffekte

Hautpflegeprodukte sind im Gegensatz zu den vorher untersuchten gelösten Substanzen keine homogenen Lösungen sondern heterogene Stoffgemische, die aus verschiedensten Molekülen bestehen. Lösungen bilden eine Phase, was bedeutet, dass physikalische Parameter wie z.B. der Brechungsindex für die gesamte Lösung gleich ist. Ein heterogenes Stoffgemisch aus verschiedenen Molekülen mit unterschiedlicher Löslichkeit (hydrophob, hydrophil) zeichnet sich dadurch aus, dass die Stoffe, aus denen es gemischt ist, noch in ihrer eigenen Phase sind. Heterogene Stoffgemische sind also mehrphasig und haben dementsprechend auch mehrere Brechungsindices. Eine Hautcreme ist eine Emulsion, ein sehr feines Gemisch von nicht mischbaren Stoffen. Es handelt sich also um ein mehrphasiges System mit verschiedensten Brechungs-

indices. In einem Hautpflegeprodukt befinden sich also verschiedenste potentielle Streukörper. Diese Streukörper haben verschiedene Größen und dementsprechend kommt es zu unterschiedlicher Streuung (z.B. Mie- oder Rayleigh- Streuung, siehe Kapitel 3.1). Durch dieses komplexe Streuverhalten von mehrphasigen Stoffgemischen, wird die einfallende Laser-Strahlung in der mit Hautcreme bestrichenen Quarzglasplatte mehrfach gestreut und reflektiert. In Gewebe ist es möglich, dass die einfallende UV-Strahlung inelastisch gestreut wird (Raman-Streuung) und sich dadurch Photonenenergie verringert bzw. die Wellenlänge größer wird [Tuc07]. Im UV-Bereich ist der Anteil der Raman-Streuung im Vergleich zu anderen optischen Prozessen zwar gering [Tuc07], aber der verwendete Photomultiplier ist empfindlich genug, um die dabei entstehende Streustrahlung zu detektieren. Außerdem ist die anregende Laserstrahlung nicht vollständig monochromatisch. Bedingt durch den Laseraufbau können auch andere Wellenlängen als die Anregungswellenlänge in ganz geringem Maße vorhanden sein, die aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Photomultipliers detektiert werden können. Dadurch kann es zu Verwechslungen mit 1O_2 Lumineszenz Photonen kommen.

Aus diesem Grund werden vor den eigentlichen Experimenten einige Messungen durchgeführt, um den Unterschied zwischen einem Signal von 1O_2 Lumineszenz und von Streustrahlung zu untersuchen. Dazu wird der in Kapitel 4.1.1 beschriebene Referenzphotosensibilisator TMPyP in H_2O gelöst. Diese Lösung wird dann mit Streukörpern versetzt und in die 0,5 mm tiefe Quarzglasplatte gefüllt. Als Streukörper wird Siliziumdioxid (Kapitel 4.1.6) verwendet. Die Siliziumdioxid Partikel haben zu 80 % eine Größe zwischen 1-5 μm . Darum sollte die auftreffend Laserstrahlung (308 nm) hauptsächlich in vorwärts Richtung gestreut werden, da es sich um Mie-Streuung handeln sollte. Es werden drei verschiedene Mengen an Streukörpern in TMPyP Lösung in H_2O untersucht. Zuerst wird eine reine 100 μM TMPyP in H_2O Lösung in der 0,5 mm tiefen Quarzglasplatte bestrahlt (Abbildung 5.35 A). Danach werden jeweils 25 und 50 mg Siliziumdioxid auf die Quarzglasplatte gestrichen und mit einer 100 μM TMPyP in H_2O Lösung aufgefüllt (Abbildung 5.35 B, C). Zum Schluss wird die gesamte 0,5 mm tiefe Quarzglasplatte mit Siliziumdioxid aufgefüllt, das entspricht 100 mg (Abbildung 5.35 D). Für jede dieser Mengen an Siliziumdioxid Streupartikeln wird das Lumineszenzsignal bei Anregung bei 308 nm sowohl zeit- als auch spektral aufgelöst gemessen.

In Abbildung 5.35 ist erkennbar, dass sich die abgebildeten Signale verändern. Je mehr Streukörper sich in in der 100 μM TMPyP Lösung befinden, umso mehr steigt die Signalintensität bei 1150 nm an und nimmt gleichzeitig bei 1280 nm ab. Für Streukörper alleine sollte keine 1O_2 Lumineszenz detektierbar sein, da Siliziumdioxid keinen 1O_2 generieren kann (Nachweis später). In Abbildung 5.35 D wird deutlich, dass das spektral aufgelöst detektierte Signal von 100 mg Siliziumdioxid nicht mehr fitbar ist, da das Signal bei 1150 nm extrem hoch ist und das Signal

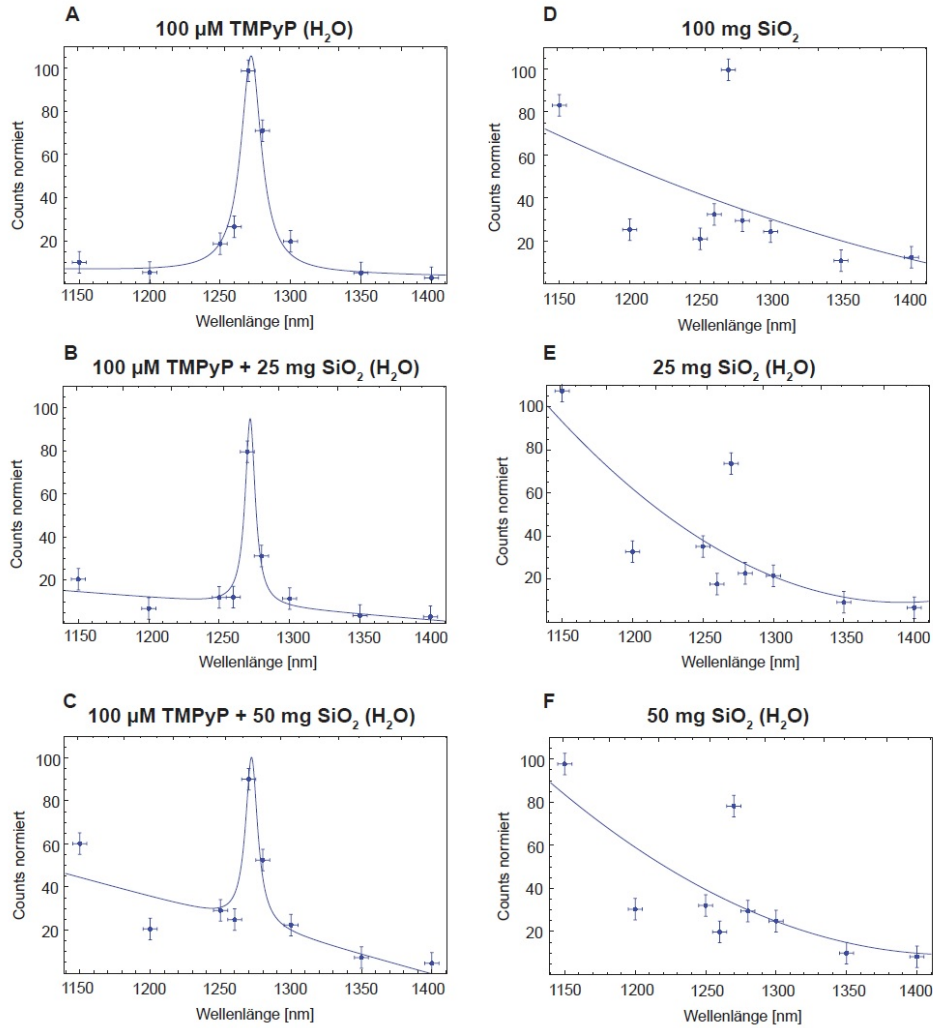


Abbildung 5.35.: A, B, C: Spektral aufgelöst detektierte Lumineszenz Signale von TMPyP Lösungen (H_2O) mit Streukörpern (Siliziumdioxid). D: Das Signal von Siliziumdioxid alleine. E, F: Die spektral aufgelöst detektierten Signale von reinem H_2O mit Siliziumdioxid. Zum Vergleich ist die Skala der Photonencounts normiert auf den Maximalwert

bei 1280 nm extrem niedrig. Allerdings ist das Signal bei 1270 nm immer noch das höchste der Signale und das Signal bei 1150 nm hat nur 80 % dieser Intensität. Um einen besseren Vergleich zu haben, werden sowohl 25 als auch 50 mg Siliciumdioxid mit reinem H_2O in der 0,5 mm Quarzglasplatte gemischt und die entsprechenden zeit- und spektral aufgelösten Signale detektiert. Da Siliciumdioxid und H_2O keinen 1O_2 generieren, werden die detektierten Photonen einer Streustrahlung zugeordnet. Die spektral aufgelösten detektierten Signale sind in Abbildung 5.35 E und F dargestellt und es ist erkennbar, dass bei diesen Signalen die höchste Intensität für 1150 nm gemessen wird, während das Signal bei 1270 nm nur 80 % dieser Intensität hat. Insgesamt sind diese Signale nicht mit einer Lorentzfunktion mit einem Maximum zwischen 1269 und 1280 nm fitbar. Während für Suspensionen mit TMPyP, der 1O_2 produziert, auswertbare Lumineszenz Signale spektral aufgelöst detektiert werden (Abbildung 5.35 A, B, C), können die detektierten Signale von Streukörpern allein und in Suspension (Abbildung 5.35 D, E, F) nicht mit einer Lorenz-Funktion gefittet werden. Diese Signale werden einer Streustrahlung zugeordnet, die sich durch erhöhte Photonendetektion bei 1150 und 1270 nm auszeichnet, nicht aber bei 1280 nm.

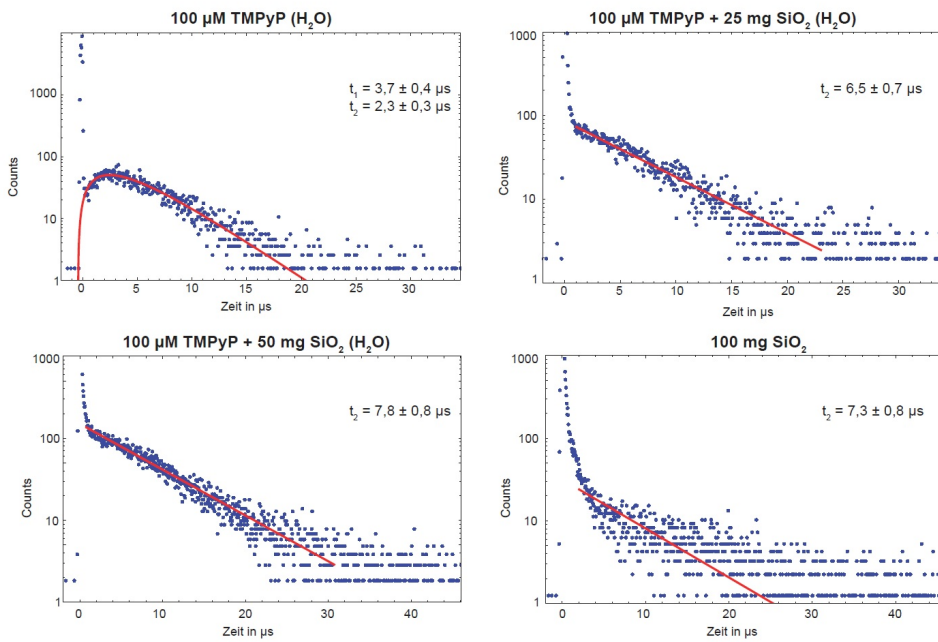


Abbildung 5.36.: Zeitlich aufgelöste Lumineszenz Signale von TMPyP Lösungen mit Streukörpern

In Abbildung 5.36 sind die zeitlich aufgelösten Emissionssignale der 100 μM TMPyP Suspensionen mit verschiedenen Streukörperanteilen dargestellt. Beim zeitlich aufgelösten Signal kann die Anstiegszeit schon für Suspensionen mit 25 mg Siliciumdioxid

nicht mehr gefittet werden, da das Signal keinen Anstieg mehr hat, sondern direkt nach dem verbreiteten Laserpeak abfällt. Wenn die Anzahl der Streukörper noch weiter erhöht wird, ist das zeitaufgelöste Signal weiter aufgefächert und der Anteil des Signalrauschens steigt von circa 5 Counts auf 10 Counts an. Für Streukörper alleine verläuft das Abklingen des Signals ähnlich wie eine Exponential-Funktion. Außerdem steigt die Abklingzeit von $3,7 \pm 0,4 \mu\text{s}$, die mit der $^1\text{O}_2$ Abklingzeit in H_2O übereinstimmt [Bai05], an auf eine Abklingzeit von $7,3 \pm 0,8 \mu\text{s}$. Um auszuschließen, dass die als Streukörper verwendeten Siliciumdioxid Partikel selbst $^1\text{O}_2$ erzeugen können, werden die Signale von 25 mg Siliciumdioxid vermisch mit H_2O und D_2O in einer 0,5 mm Quarzglasplatte gemessen. Das Streusignal von Siliciumdioxid hat sowohl in H_2O als auch in D_2O Abklingzeiten von $8,1 \pm 0,9$ bzw. $10 \pm 1 \mu\text{s}$, die mehr als doppelt so groß sind wie die $^1\text{O}_2$ Abklingdauer in H_2O [Bai05], aber kleiner als die $^1\text{O}_2$ Abklingdauer in D_2O [Ogi83]. Es handelt sich bei den detektierten Signalen von Siliciumdioxid also nicht um $^1\text{O}_2$ Lumineszenz, sondern um Streustrahlung.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass bei heterogenen Stoffgemischen, wie den Hautpflegeprodukten, der Nachweis von $^1\text{O}_2$ mittels Lumineszenz schwieriger sein wird als bei reinen Lösungen.

5.4.2. Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion von Hautpflegeprodukten

Für die verschiedenen Hautpflegeprodukte werden die Signale zeitlich und spektral aufgelöst detektiert. Dazu wird das entsprechende Hautpflegeprodukt auf eine 0,5 mm vertiefte Quarzglasplatte gestrichen, glatt gestrichen und mit einem entsprechenden Quarzglasdeckel abgedichtet. Es wird eine möglichst dünne Quarzglasplatte verwendet, um eine möglichst dünne Schicht vom Hautpflegeprodukt zu haben, damit die Streustrahlung möglichst gering ist. Diese Quarzglasplatte wird in dem Messaufbau (Kapitel 4.7) bei 308 nm angeregt. Die mittlere Laserintensität bei 308 nm mit eingebauten UV Filter liegt bei $29 \pm 3 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ auf der Quarzglasplatte. Die $^1\text{O}_2$ Lumineszenz Signale werden zeitlich aufgelöst bei 1270 nm und spektral aufgelöst bei Wellenlängen von 1150 bis 1400 nm detektiert. Die $^1\text{O}_2$ Lumineszenz Signale werden mit den ermittelten Signalen aus den Streustrahlung Experimenten (Abbildung 5.35, 5.36) verglichen. Streustrahlung kann die Lumineszenz von $^1\text{O}_2$ stark verändern. Sie könnte sogar mit $^1\text{O}_2$ Lumineszenz verwechselt werden. Um den eindeutigen Nachweis von $^1\text{O}_2$ Erzeugung zu ermöglichen, werden im folgenden Messsignale verworfen, die gewissen Kriterien nicht genügen. Nur spektral aufgelöst detektierte Signale, die dem spektral aufgelöst detektiertem Signal von reiner

TMPyP Lösung gleichen, werden als 1O_2 Signale akzeptiert. Das bedeutet, dass nur spektral aufgelöst detektierte Signale, die keine erhöhte Intensität bei 1150 nm, aber eine erhöhte Intensität bei 1280 nm haben, akzeptiert werden.

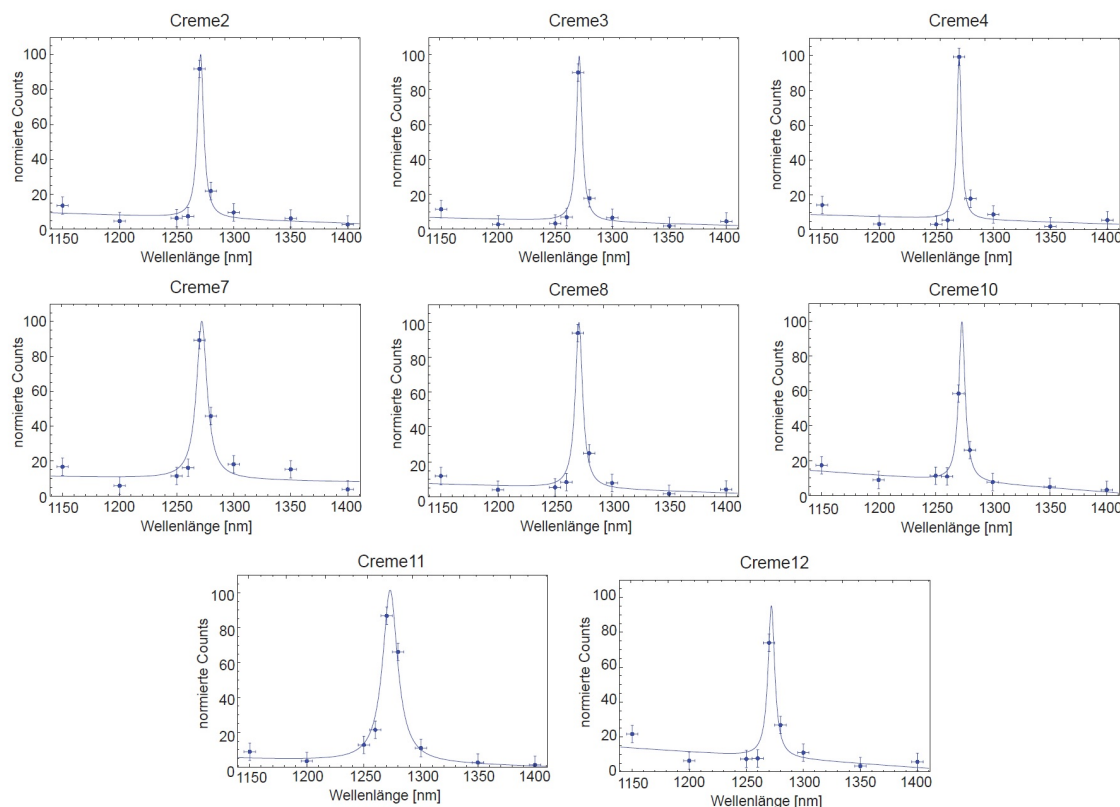


Abbildung 5.37.: Spektral aufgelöste 1O_2 Signale von den verschiedenen untersuchten Hautpflegeprodukten

Nach diesem Ausschlussprinzip kann für acht der untersuchten Hautpflegeprodukte spektral aufgelöst 1O_2 detektiert werden. Die Signale sind in Abbildung 5.37 dargestellt. Die gefittete Lorentzkurve der spektral aufgelöst detektierten 1O_2 Signale hat ein Maximum zwischen 1270 und 1280 nm. Zusätzlich werden für diese acht Hautpflegeprodukte die zeitaufgelöst detektierten 1O_2 Signale bei 1270 nm ausgewertet, wobei jedoch für die meisten nur eine Abklingzeit des Signals gefittet werden konnte, da wegen der Streuung kein Signalanstieg sichtbar war. Die zeitaufgelösten 1O_2 Signale der vier effektivsten Hautpflegeprodukte sind in Abbildung 5.38 dargestellt.

Für die Cremes 10 und 11 kann sowohl eine Anstiegs- also auch eine Abklingzeit gefittet werden. Das ist ein Zeichen dafür, dass sich ein Photosensibilisator in der entsprechenden Creme befindet, dessen Triplett-Zustand eine Abklingzeit hat und der 1O_2 generiert, der wiederum eine Abklingdauer hat. Die Anstiegszeiten liegen bei

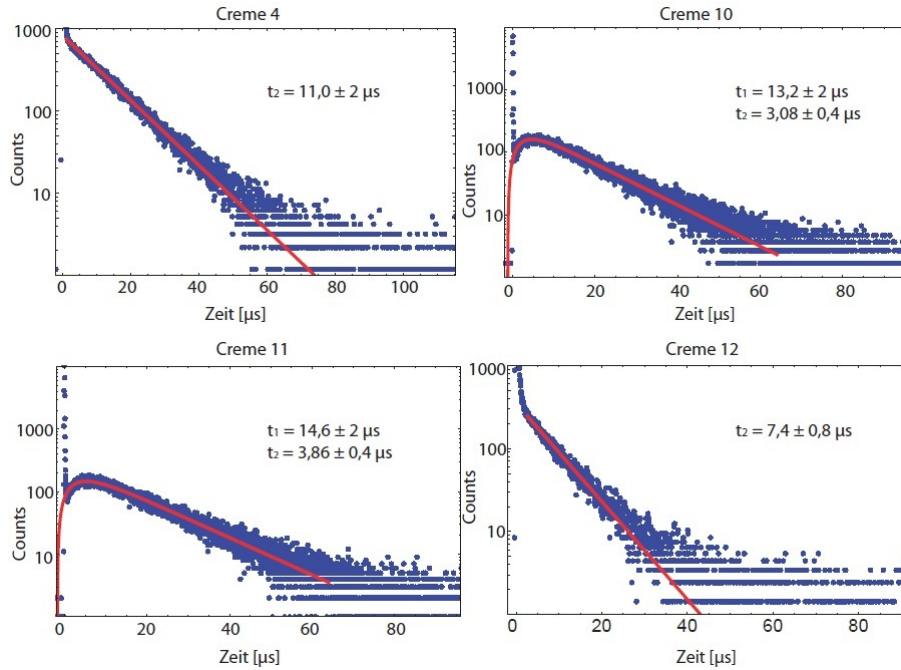


Abbildung 5.38.: Zeitaufgelöste 1O_2 Signale der untersuchten Cremes 4, 10, 11 und 12

$3,1 \pm 0,4$ bzw. $3,9 \pm 0,4 \mu s$ und die Abklingzeiten bei 13 ± 2 bzw. $15 \pm 2 \mu s$. Diese Abklingzeiten müssen jetzt noch dem Photosensibilisator Triplett-Zustand und 1O_2 zugeordnet werden. 1O_2 hat in Lipiden eine Abklingzeit von $14 \pm 3 \mu s$ [Bai05], was mit den Abklingzeiten der Signale von Creme 10 und 11 übereinstimmen würde. Da diese Cremes hauptsächlich aus Alkanen, die zu den nicht veresterbaren Lipiden gehören, bestehen (Nachweis später), kann die Abklingzeiten der Signale von Creme 10 und 11 1O_2 zuordnen werden und die Anstiegszeit des Signals dementsprechend dem Abklingen des Triplett-Zustands. Für die Cremes 4 und 12 kann keine Anstiegszeit gefittet werden. Ein möglicher Grund wäre, dass der 1O_2 durch Substanzen mit Doppelbindungen chemisch generiert wird [RMK⁺13] und nicht durch einen Photosensibilisator. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Anstiegszeit des Signals so kurz ist, dass es durch das Störsignal von der Streustrahlung überdeckt wird. Das Signal von Creme 4 hat eine Abklingzeit von $11 \pm 2 \mu s$, die im Rahmen der Fehlergenauigkeit auch mit der 1O_2 Abklingdauer in Lipiden übereinstimmen würde [Bai05] und die Creme 12 hat eine Abklingzeit von $7,4 \pm 0,8 \mu s$. 1O_2 kann durch einen Photosensibilisator generiert werden, was typische Lumineszenzsignale mit Anstiegs- und Abklingzeiten zur Folge hat, wie bei Creme 10 und 11 [BRK⁺11]. Außerdem kann 1O_2 durch Moleküle mit Doppelbindungen z.B. Fettsäuren chemisch generiert werden, wodurch die Lumineszenzsignale eine Abkling- aber keine Anstiegszeit haben [BRK⁺11] [RMK⁺13].

5.4.3. Vergleich von zeitlich aufgelösten Singulett-Sauerstoff Signalen von Hautpflegeprodukten

Da für die verschiedenen Hautpflegeprodukte die Absorption bei 308 nm nicht bestimmt werden kann, ist es nicht möglich eine 1O_2 Quantenausbeute zu bestimmen. Stattdessen wird für jede Creme ein zeitaufgelöstes 1O_2 Signal bei einer Anregung von 308 nm mit identischer Laserintensität ($30 \pm 3 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$) gemessen und die gezählten Photonen dieses Signals werden aufsummiert und verglichen. In Tabelle 5.25 sind die acht 1O_2 erzeugenden Cremes mit der Anzahl der Photonen ihrer Lumineszenz-Signale aufgelistet. Die Unterschiede in der Anzahl der Photonen pro Signal liegt aber nicht nur in dessen Höhe, sondern auch in den unterschiedlichen Abklingzeiten, die die Signale von verschiedenen Cremes hatten. Die 1O_2 Signale von Cremes 4, 10 und 11 haben die höchste Photonenanzahl aber auch die längsten Abklingzeiten. In der dritten Spalte von Tabelle 5.25 ist die Anzahl der Photonen darum durch die Abklingzeit des jeweiligen Signals dividiert worden. Und in Spalte 4 ist die Anzahl der Photonen pro Signallänge auf den Maximalwert für Creme 4 mit 11932 ± 1193 Photonen/Abklingzeit normiert worden. Man erkennt, dass Creme 4, 10 und 11 die intensivsten 1O_2 Signale haben, gefolgt von Creme 12. Da die Photonenanzahl mit der Anzahl der erzeugten 1O_2 Moleküle korreliert, erzeugt damit Creme 4 am meisten 1O_2 unter Bestrahlung mit UVB (308 nm).

Creme	Photonenanzahl	Photonenanzahl / Abklingzeit	auf Maximum normalisierte Werte
Creme2	14608	1826	0,15
Creme3	19509	2787	0,23
Creme4	131257	11932	1
Creme7	18391	2829	0,24
Creme8	15181	1380	0,12
Creme10	127438	9803	0,82
Creme11	130356	8690	0,73
Creme12	42725	7121	0,60

Tabelle 5.25.: Vergleich der zeitaufgelösten Singulett-Sauerstoff Signale (Fehler von 10 %) bei Anregung von verschiedenen Cremes bei 308 nm

Das gleiche wird wiederholt für eine Laseranregung bei 355 nm. Wieder wird das Lumineszenz-Signal der acht verschiedenen Cremes gemessen und die Photonen aufsummiert (Tabelle 5.26, 2. Spalte), durch die Abklingzeit dividiert (Tabelle 5.26, 3. Spalte) und auf den Maximalwert von Creme 4 normiert (Tabelle 5.26, 4. Spalte). Die Laserintensität beträgt $20 \pm 2 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ bei 355 nm und ist damit niedriger als die Laserintensität bei 308 nm. Dementsprechend wird bei den Lumineszenz-Signalen bei 355 nm eine geringere Photonenausbeute erwartet. Dies ist bei den

Signalen für Creme 4, 10, 11 und 12 auch deutlich zu erkennen. Doch die Signale der anderen Cremes sind fast genauso intensiv wie die Signale bei 308 nm. Dies liegt vermutlich daran, dass bei kleinen Lumineszenz-Signalen der Fehler durch Rauschen viel stärker ins Gewicht fällt. Jedoch lässt sich auch bei einer Anregung bei 355 nm erkennen, dass wieder die Cremes 4, 10, 11 und 12 die intensivsten $^1\text{O}_2$ Signale produzieren.

Creme	Photonen- anzahl	Photonenanzahl /Abklingzeit	auf Maximum normalisierte Werte
Creme2	15902	1893	0,32
Creme3	19357	2420	0,40
Creme4	71208	5934	1
Creme7	17308	1731	0,29
Creme8	16801	1866	0,31
Creme10	61194	4707	0,79
Creme11	50934	3918	0,66
Creme12	27692	3956	0,67

Tabelle 5.26.: Vergleich der zeitaufgelösten Singulett-Sauerstoff Signale (Fehler von 10 %) bei Anregung von verschiedenen Cremes bei 355 nm

Um die Bestandteile von den Cremes 4, 10, 11 und 12 näher zu untersuchen, sind in Zusammenarbeit mit dem Institut für Chemie der Universität Regensburg Protonen-Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Messungen und Gaschromatographie Massenspektroskopie Analysen (GCMS-Analysen) durchgeführt worden. Für die Protonen-NMR werden hohe Probenkonzentrationen von 50 mg Creme in 0,6 ml Lösungsmittel CDCl_3 (99,9 % Reinheit, Deutero GmbH, Kastellaun, Deutschland) verwendet. In Abbildung 5.39 ist das Protonen-NMR-Spektrum von Creme 10 (A) und Creme 11 (B) und in Abbildung 5.40 von Creme 4 (A) und 12 (B) dargestellt worden. Durch entsprechend beschriftete Kreise sind die für Alkane, Cholesterolstrukturen oder Doppelbindungen typischen Bereiche in einem Protonen-NMR hervorgehoben worden.

In Abbildung 5.39 A ist erkennbar, dass Creme 10 hauptsächlich aus Alkanen besteht, mit mehreren scharfen Peaks im NMR Spektrum zwischen 0,8 ppm und 1,55 ppm. Der für Alkane typische Bereich in einem Protonen-NMR Spektrum liegt zwischen 0,5 und 2 ppm. Dies ist typisch für eine Creme, die zu 95 % aus weißem Vaseline besteht (Herstellerangaben). Creme 11, die auch aus weißem Vaseline besteht (Herstellerangaben) hat ein ähnliches NMR Spektrum wie Creme 10 mit scharfen Peaks zwischen 0,8 und 1,55 ppm, die im für Alkane typischen Bereich liegen (Abbildung 5.39 B). Bei Creme 10 und Creme 11 sind unter den scharfen Peaks schwächere, breitere Resonanzen zu erkennen, die auf Cholesterolstrukturen hindeuten.

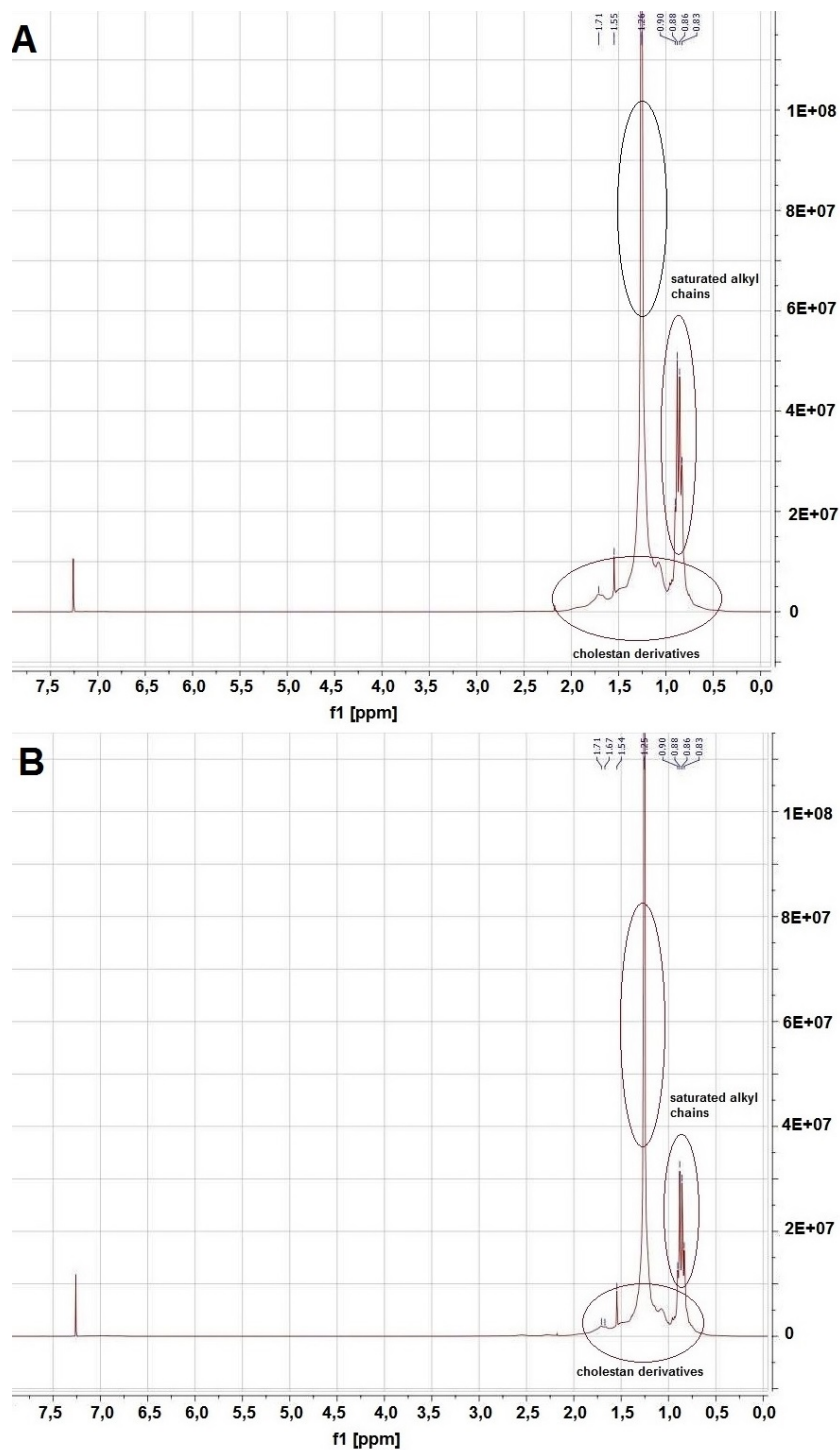


Abbildung 5.39.: Protonen-NMR von Creme 10 (A) und 11 (B)

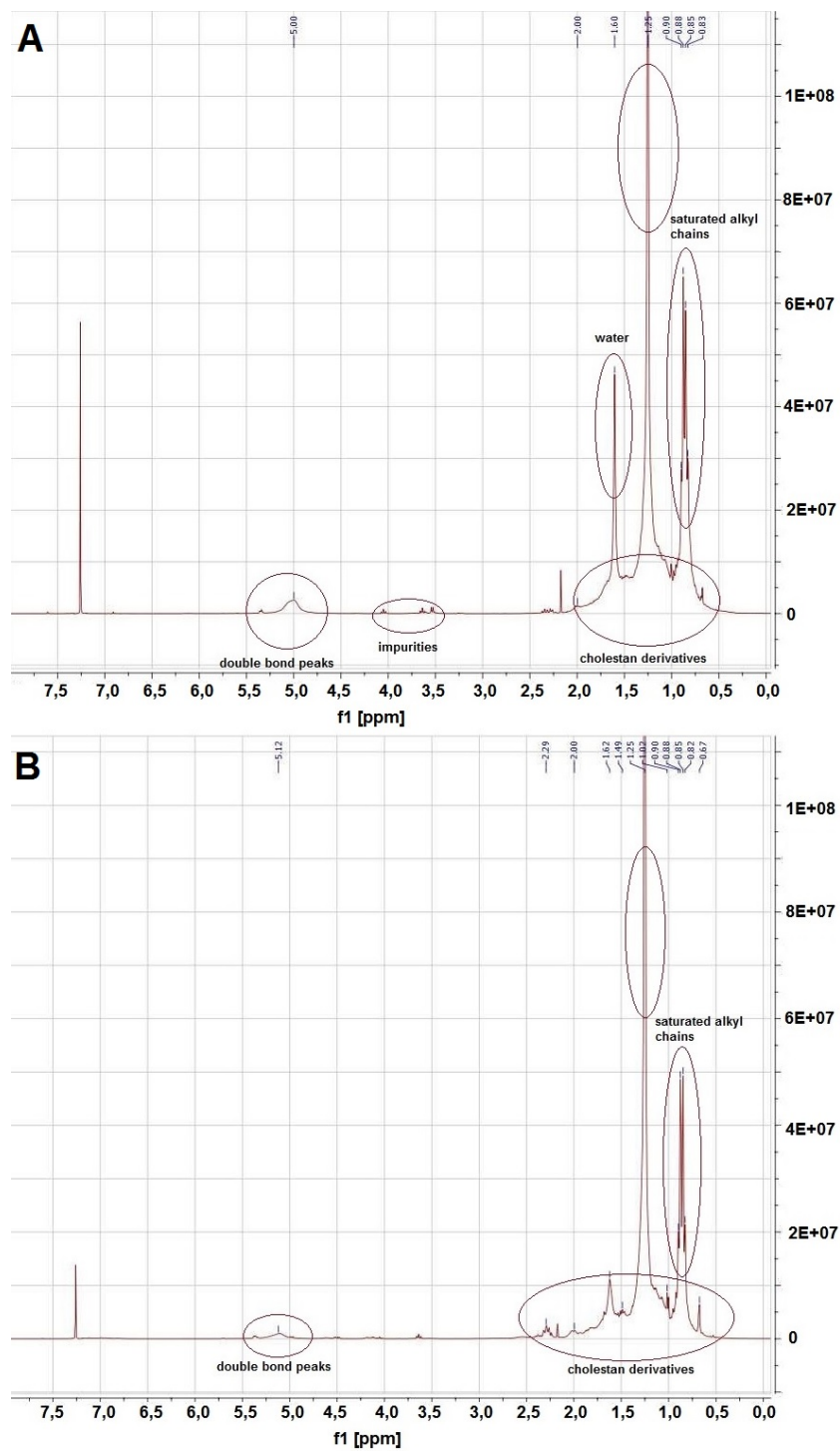


Abbildung 5.40.: Protonen-NMR von Creme 4 (A) und 12 (B)

Das Protonen-NMR von Creme 4 (Abbildung 5.40 A) zeigt auch scharfe Peaks und schwächere, breitere Resonanzen in einem Bereich von 0,5 bis 2 ppm, was auf Alkane und Cholesterolstrukturen hindeutet. Außerdem hat Creme 4 einen Peak bei 5,0 ppm, der auf Substanzen mit Doppelbindungen hindeutet. Substanzen mit Doppelbindungen sind theoretisch in der Lage 1O_2 durch Abgabe von Elektronen (Typ I Reaktionen) zu erzeugen, was schon für verschiedenen Fettsäure und Lipide nachgewiesen wurde [RMK⁺13]. Es sind auch kleine Peaks in einem Bereich von 3,5 bis 4,2 ppm erkennbar, die auf Verunreinigungen der Creme hindeuten. Das Protonen-NMR von Creme 12 (Abbildung 5.40 B) zeigt zusätzlich zu den für Alkane typischen scharfen Peaks zwischen 0,5 und 2 ppm noch ein Peak bei 2,3 ppm, das auf Isoalkane hinweist, da es im typischen Verschiebungsbereich liegt. Außerdem gibt es einen Peak bei 5,1 ppm, der im für Doppelbindungen typischen Bereich liegt.

Um die Inhaltstoffe der Cremen detaillierter zu untersuchen sind noch GCMS-Analysen durchgeführt worden und die ermittelten Spektren sind per Datenbankvergleich über die Gesamtmasse und die Frakmentierungsmuster analysiert worden. Die Ionisierungsmethode der Einzelspektren war Electron Ionisation (EI). In Abbildung 5.41 sind die GC-Spektren von Creme 10 (A) und 11 (B) und in Abbildung 5.42 von Creme 4 (A) und 12 (B) dargestellt. Die GCMS-Analyse von Creme 10 (GC-Spektrum in Abbildung 5.41 A) ergibt das einheitlichste GC-Spektrum an Peaks, die durch ein regelmäßiges Delta in der Retentionszeit einen einheitlichen Abstand zueinander haben (Sägezahnmuster). Durch den Datenbankvergleich kann bestätigt werden, dass die einheitlichen Peaks im GC-Spektrum von Creme 10 zu gesättigten Alkanen gehören. Creme 10 besteht also fast nur aus gesättigten Alkanen und ansonsten sind noch minimale Spuren von Cholesterol vorhanden, das im GC-Spektrum durch einen kleinen Peak bei einer Retentionszeit von 21,9 Minuten sichtbar ist und über den Datenbankvergleich mit dem Frakmentierungsmuster als Cholesterol identifiziert wurde. Cholesterol (Abbildung 5.43) kann durch Sauerstoff photooxidiert werden und ein typisches Photoprodukt ist Cholesta-3,5-dien-7-one, das im UVB-Bereich absorbieren kann [ORK99]. Auch für Creme 11 ist durch GCMS-Analyse und Datenbankvergleich über die Frakmentierungsmuster bestätigt worden, dass die Creme hauptsächlich aus Alkanen besteht. Im GC-Spektrum (Abbildung 5.41) ist unter dem Peak-Muster der Alkane (Sägezahnmuster) aber einen Bauch erkennbar, der kleine Peaks hat, die zu Verunreinigungen gehören. Diese Verunreinigungen deuten nicht nur auf Isoalkane, sondern auch auf ungesättigte Verbindungen und möglicherweise auch Aromate hin. Aromate sind in der Lage 1O_2 photophysikalisch über einen Triplett-Zustand zu erzeugen. Das würde das 1O_2 Signal von Creme 11 mit Anstiegs- und Abklingzeit erklären. Und da gesättigte Alkane nicht mit 1O_2 reagieren, ist das 1O_2 Signal von Creme 11 ungequencht.

In Abbildung 5.42 ist das GC-Spektrum von Creme 12 (B) dargestellt. Es sind die regelmäßigen Peaks (Sägezahnmuster) der gesättigten Alkane sichtbar, sowie einige

5. Messergebnisse und Diskussion

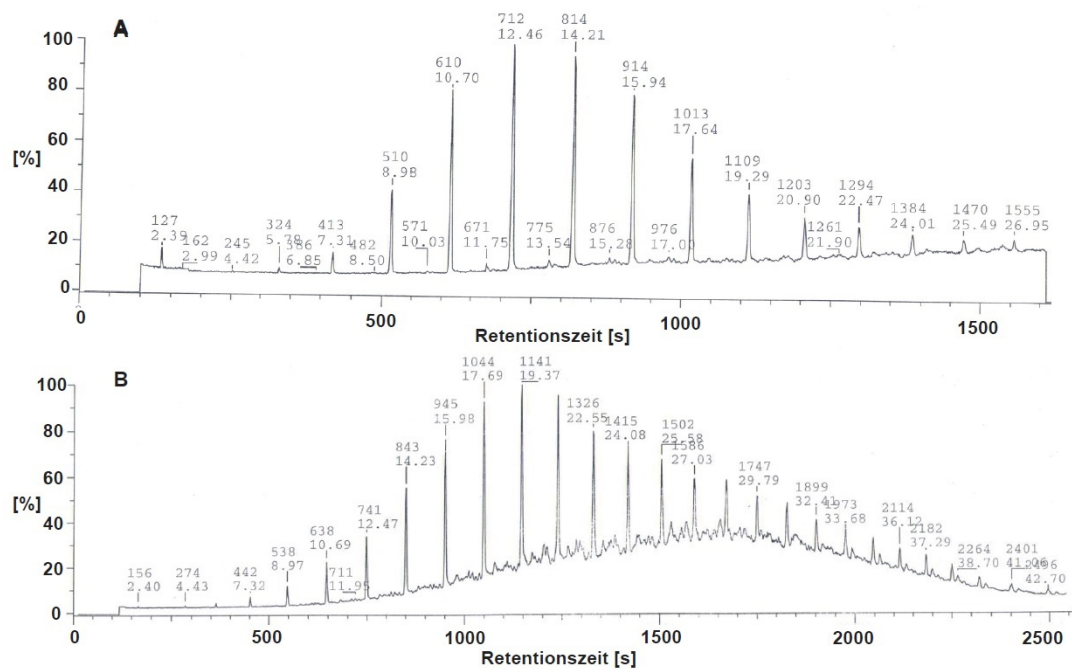


Abbildung 5.41.: Das GC-Spektrum von Creme 10 (A) und Creme 11 (B)

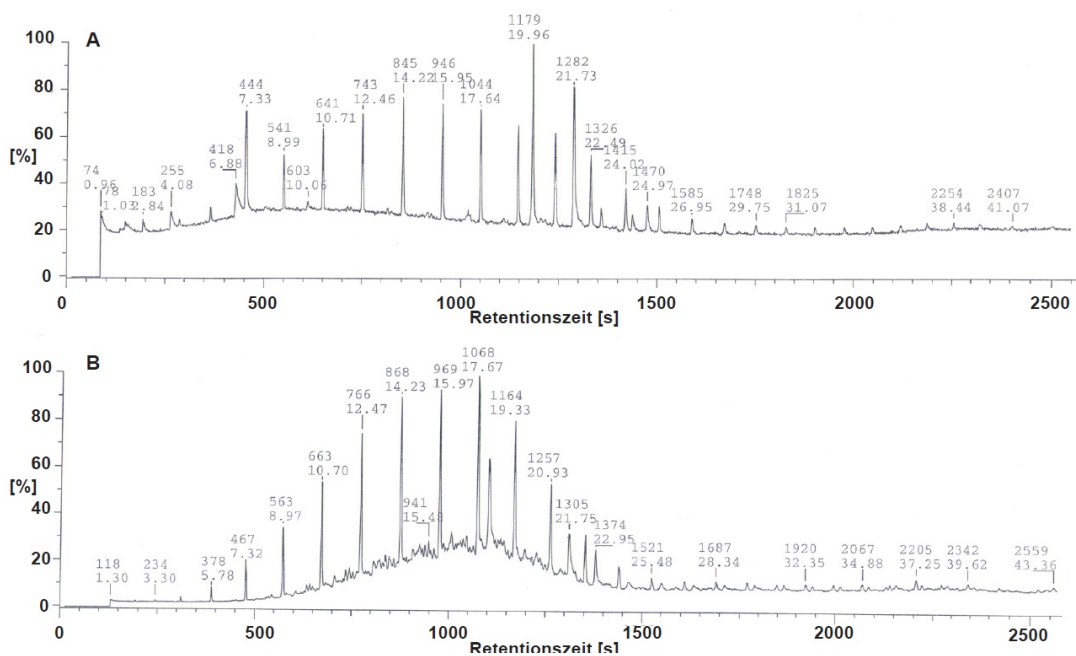


Abbildung 5.42.: Das GC-Spektrum von Creme 4 (A) und Creme 12 (B)

Peaks dazwischen, die auf weitere Substanzen hindeuten. Für den Peak bei einer Retentionszeit von 18,17 min ergibt sich durch Abgleich der MS-Spektren mit den Frakmentierungsmustern der Datenbank als weitere Substanz Cholesta-3,5-dien (Cholestan). Cholesta-3,5-dien (Struktur in Abbildung 5.43, Absorptionsmaximum bei 235 nm [LC57]) deutet auf Cholesterol hin, da Cholesterol beim Prozess der GCMS-Analyse Wasser abgibt und das Derivat Cholesta-3,5-dien bildet sich. Außerdem wurden Spuren von Cholesterol (Peak bei einer Retentionszeit von 21,75 min in Abbildung 5.42 B, Struktur in Abbildung 5.43, Absorptionsmaximum bei 205 nm [ORK99]) und Cholesta-3,5-dien-7-one (Peak bei einer Retentionszeit von 22,95 min in Abbildung 5.42 B, Struktur in Abbildung 5.43, Absorptionsmaximum bei 280 nm [ORK99]) gefunden. Cholesta-3,5-dien-7-one ist ein typisches Derivat von photooxidiertem Cholesterol und könnte damit durch Bestrahlung von Cholesterol entstehen [ORK99]. Es kann im UVB Bereich absorbieren und durch seine Doppelbindung könnte es durch chemische Reaktionen 1O_2 produzieren. Dies erklärt das 1O_2 Signal von Creme 12 ohne Anstiegszeit, da chemische Reaktionen zu schnell verlaufen, als dass man diese Zeit auf der μ s-Skala auflösen könnte. Außerdem kann Cholesterol durch 1O_2 oxidiert werden [ORK99], wodurch sich die verkürzte Abklingdauer vom 1O_2 Signal von Creme 12 mit $7,4 \pm 0,8 \mu$ s erklären lassen würde.

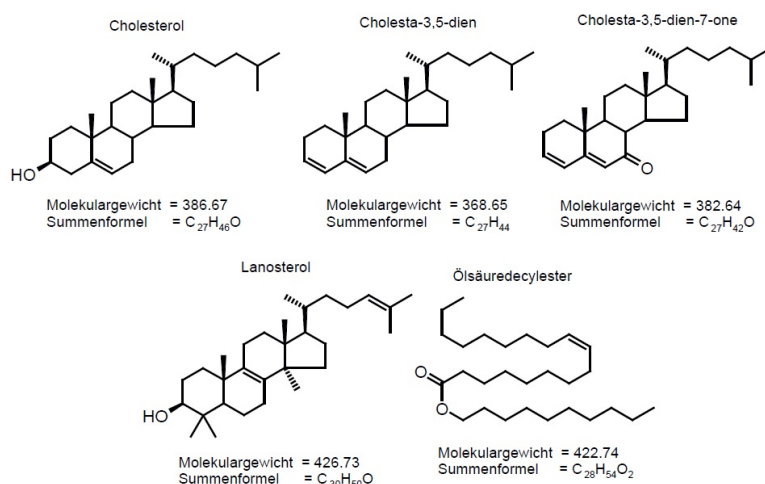


Abbildung 5.43.: In den Cremes per GCMS-Analyse und Datenbankvergleich der Frakmentierungsmuster identifizierte Substanzen

Für Creme 4 ist in Abbildung 5.42 A erkennbar, dass das GC-Spektrum nicht nur die regelmäßigen Peaks der gesättigten Alkane sondern einige weitere Peaks bei Retentionszeiten von 19,96, 21,73 und 24,97 min enthält. Der Datenbankabgleich ergibt außer Alkanen noch Spuren von Cholesterol, Lanosterol (Peak bei einer Retentionszeit von 24,97 min, Abbildung 5.43) und Ölsäuredecylester (Peak bei einer Retentionszeit von 19,96 min, Abbildung 5.43) als Creme-Bestandteile an. Lanosterol hat ein Absorptionsmaximum bei etwa 245 nm und absorbiert auch noch im

UVB Bereich [MS79] während Ölsäure ein Absorptionsmaximum im UVC Bereich hat, allerdings noch bis in den UVB Bereich (300 nm) absorbiert [ASB83]. Ölsäuredecylester und Lanosterol könnten wegen ihrer Doppelbindungen durch chemische Reaktionen 1O_2 produzieren. Dies würde das 1O_2 Signal von Creme 4 ohne Anstiegszeit erklären, da chemische Reaktionen quasi instantan ablaufen.

In den Cremes 4, 10, 11 und 12 befinden sich also durchaus Substanzen, die in der Lage sein könnten, 1O_2 zu produzieren. Allerdings befinden sich auch in den anderen untersuchten Cremes laut Inhaltsstoff-Verzeichnis zum Teil dieselben oder andere Substanzen, die 1O_2 produzieren können. Man kann bei der GCMS-Analyse leider keine Aussagen über die Menge der identifizierten Bestandteile machen. Daher ist derzeit noch unklar, warum ausgerechnet diese Cremes besonders effektiv 1O_2 generieren.

5.5. Suspensionen aus Zellbestandteilen

Um sich langsam komplizierten Strukturen wie Zellen und Haut anzunähern, wird Proteinlysate und Zelllysate auf seine Fähigkeit 1O_2 zu generieren, untersucht. Lysat bezeichnet dabei das Ergebnis einer Zersetzung einer Zelle durch Schädigung oder Auflösung der äußeren Zellmembran. Bei Proteinlysate handelt es sich um bei einer Lyse freigesetzte Proteine in Lösungsmittel, nachdem die restlichen Zellbestandteile wegcentrifugiert wurden. Bei einem Zelllysate handelt es sich um eine Suspension aus Proteinen, Lösungsmittel und den restlichen Zellbestandteilen. Wie Proteinlysate und Zelllysate hergestellt werden, ist in Kapitel 4.2.3 detailliert beschrieben.

5.5.1. Absorption

Proteinlysate und Zelllysate sind Suspensionen und keine Lösungen. Darum sind sie mehrphasig und haben mehrere Brechungsindices. Wenn Strahlung auf die Suspension fällt, wird sie abgeschwächt, wobei jedoch nicht das Lambert-Beer Gesetz von Lösungen gilt, denn die Strahlung wird nicht nur absorbiert, sondern zusätzlich durch mehrere Brechungsindices gestreut. Wenn das Lösungsmittel H_2O als Blanc verwendet wird, wird dadurch nur die Reflektion der Quarzglasküvette und die Streuung durch das Lösungsmittel abgezogen. Man kann also kein Absorptionsspektrum von Proteinlysate und Zelllysate bestimmen, sondern nur ein Abschwächungsspektrum, wobei sich die Abschwächung zusammensetzt aus Absorption und Streuung mit dem Extinktionskoeffizient $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ [Tuc07]. Dieses Abschwächungsspektra

kann mit Hilfe des Absorptionsspektrometers (Kapitel 4.10) für Proteinlysate und Zelllysate in H_2O hergestellt werden. Dafür werden das Proteinlysate und Zelllysate in H_2O verdünnt und dann in eine Quarzglaszelle gegeben.

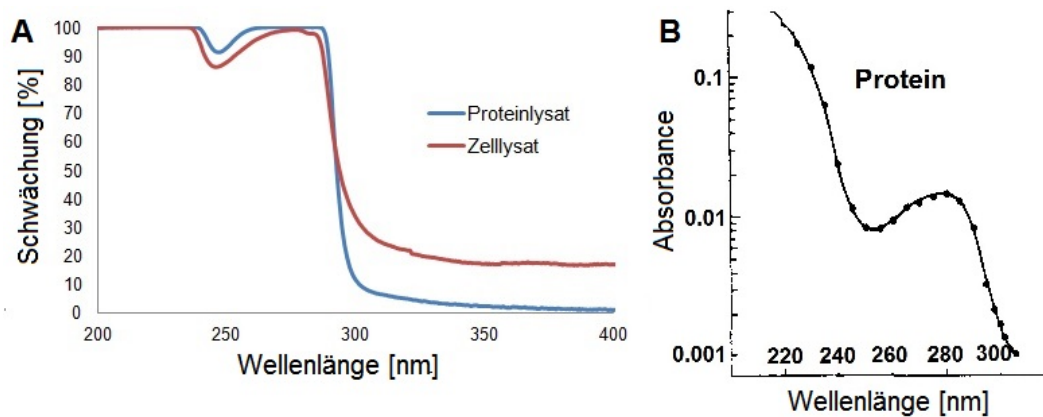


Abbildung 5.44.: A: Die Abschwächung von Strahlung durch Proteinlysate und Zelllysate in H_2O , B: Absorption von Proteinen [Har80]

In Abbildung 5.44 A sind die gemessenen Schwächungsspektren von Proteinlysate und Zelllysate dargestellt. Es ist erkennbar, dass in Proteinlysate im UVA Bereich zwischen 320 und 400 nm die Strahlung kaum abgeschwächt wird, umso geringer je langwelliger die UVA Strahlung ist. Zwischen 320 nm und 300 nm im UVB Bereich ist die Abschwächung dann um die 10 %, aber ab 300 nm steigt die Abschwächung an und im UVC-Bereich von 280 bis 200 nm wird die Strahlung in Proteinlysate mit fast 100 % abgeschwächt, außer bei dem Minimum bei 250 nm, wo die Abschwächung auf 85 % abfällt. Dass Proteinlysate ein Absorptionsmaximum zwischen 250 und 300 nm hat, kann dadurch erklärt werden, dass die stärksten Chromophore, aus denen Proteine aufgebaut sind, die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin sind [PD06]. Tryptophan ist mit 1,3 % Anteil in Proteinen zwar seltener, hat aber ein Absorptionsmaximum bei 280 nm [CJ05]. Tyrosin ist mit 3,2 % häufiger und hat ein Absorptionsmaximum bei 275 nm [CJ05]. In Abbildung 5.44 B ist zum Vergleich das Absorptionsspektrum von Protein, das ein Maximum bei 280 nm und ein Minimum bei 250 nm hat [Har80]. Es ist erkennbar, dass sich die Spektren von Protein und Proteinlysate gleichen mit Maxima und Minima bei denselben Wellenlängen. Auch das Zelllysate hat ein Maximum zwischen 250 und 300 nm im Abschwächungsspektrum, das auch auf die in der Suspension vorhandenen Proteine zurückzuführen ist (Abbildung 5.44). Aber die Abschwächung zwischen 320 und 400 nm im UVA Bereich erscheint deutlich höher als für Proteinlysate. Das kann an einer erhöhten Abschwächung von Strahlung im Zelllysate durch Streuung liegen. Im Proteinlysate wird die Strahlung durch Proteine, die deutlich kleiner sind als die Wellenlänge der Strahlung (< 10 nm [Ack01]), gestreut. Es handelt sich also um Rayleigh-Strahlung.

Im Zelllysats sind noch andere Zellbestandteile vorhanden, wodurch es auch Streuzentren in der Größenordnung oder größer als die Wellenlänge der Strahlung gibt und daher zusätzlich Resonanz- und Mie-Streuung auftritt [Ack01]. Durch die erhöhte Anzahl verschiedener Streuzentren kommt es zu einer erhöhten Abschwächung der Strahlung durch Streuung im Zelllysats.

Substanz	Schwächung in % bei		
	308 nm	300 nm	290 nm
Proteinlysats	7	11	83
Zelllysats	25	33	70

Tabelle 5.27.: Abschwächung von Strahlung durch Proteinlysats und Zelllysats bei verschiedenen Wellenlängen

In Tabelle 5.27 sind die Abschwächungswerte in % für die Wellenlängen 290, 300 und 308 nm von Proteinlysats und Zelllysats aufgeführt, da bei diesen Wellenlängen 1O_2 Erzeugung nachgewiesen werden soll. 290 nm ist ausgewählt worden, da hier Proteine gut absorbieren (Abbildung 5.44 B). Allerdings hat der anregende Laser (Kapitel 4.7) bei 290 nm eine sehr geringe Laserleistung von 15 mW (Herstellerangabe). Deshalb werden außerdem die Wellenlängen 300 und 308 nm, bei denen Proteine zwar nur wenig absorbieren, aber die Laserleistung mehr als doppelt so hoch ist, ausgewählt.

5.5.2. Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion von Suspensionen aus Zellbestandteilen

Um 1O_2 Signale spektral aufgelöst zu messen, wird das Proteinlysats und das Zelllysats in D_2O verdünnt. D_2O wird als Lösungsmittel verwendet, um bessere 1O_2 Signale detektieren zu können, da 1O_2 in D_2O eine viel längere Abklingdauer hat als in H_2O [Bai05]. Von dieser verdünnten Stammlösung werden 1,5 ml zusammen mit 1,5 ml D_2O in eine Quarzglasküvette gegeben. Die Quarzglasküvette wird in den in Kapitel 4.7 beschriebenen Messaufbau integriert und 1O_2 wird mit Interferenz-Filtern zwischen 1150 und 1400 nm (Tabelle 4.6) spektral aufgelöst detektiert und wie in Kapitel 4.8 beschrieben ausgewertet. Die ausgewerteten 1O_2 Signale sind in Abbildung 5.45 für die drei Anregungswellenlängen 290, 300 und 308 nm (siehe Kapitel 5.5.1) dargestellt durch die blauen Messpunkte inklusive der gefitteten Lorentzkurve (blauen Linie).

Um zu belegen, dass es sich bei den gemessenen Signalen tatsächlich um 1O_2 Lumineszenz handelt, wird jeweils eine zweite Messung durchgeführt mit dem Quencher

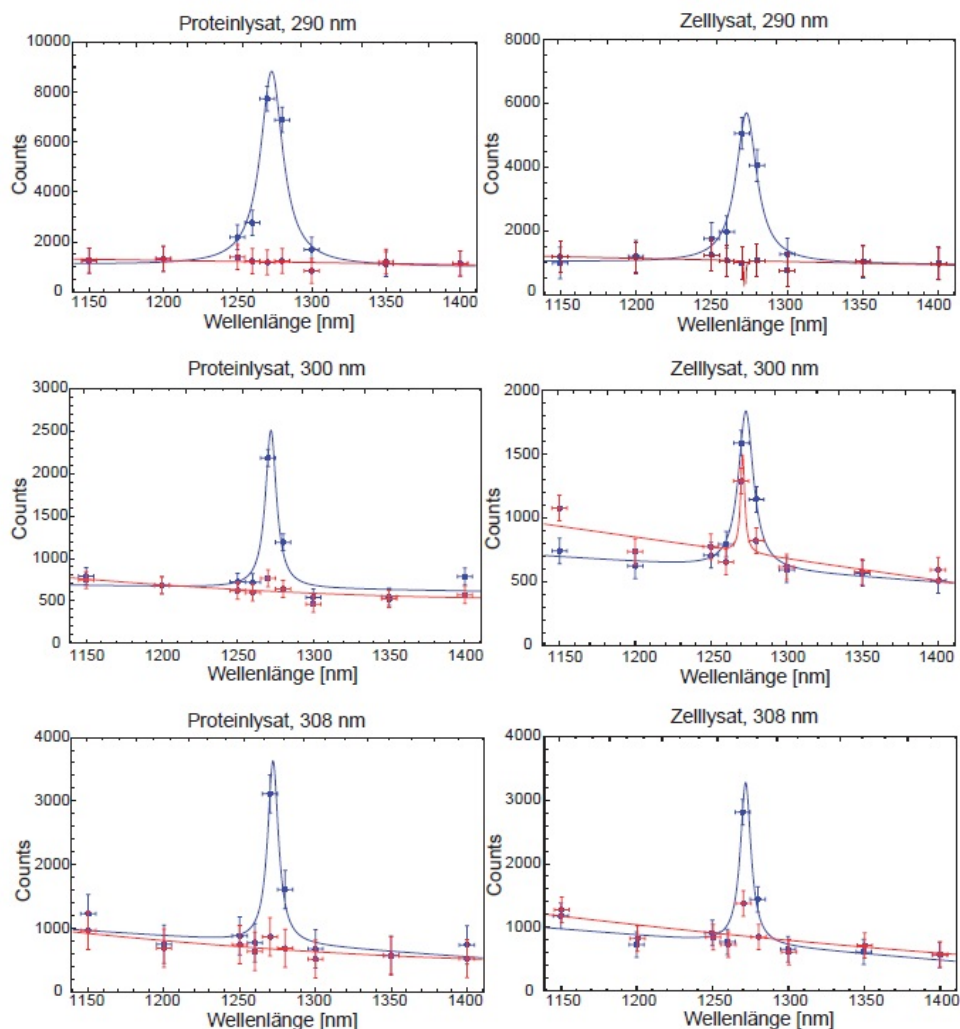


Abbildung 5.45.: Die $^1\text{O}_2$ Lumineszenz Signale von Proteinlysate und Zelllysate in D_2O gelöst bei Anregungswellenlängen von 290 nm, 300 nm und 308 nm spektral aufgelöst detektiert und mit einer Lorentzkurve gefittet (blaue Linie). Außerdem das $^1\text{O}_2$ Signal einer gleich konzentrierten Proteinlysate bzw. Zelllysate Suspension in D_2O mit zusätzlich 20 mM Natriumazid bei den gleichen Anregungswellenlängen spektral aufgelöst detektiert (rote Linie).

NaN_3 (Kapitel 4.1.5) in der Lösung. In eine Quarzglasküvette werden nun 1,5 ml der verdünnten Stammlösung von Proteinlysate oder Zelllysate in D_2O gefüllt und zusätzlich 1,5 ml von einer 40 mM konzentrierten NaN_3 Lösung in D_2O . Dementsprechend ist die Konzentration des Protein- oder Zelllysates die gleiche wie in der Messung ohne NaN_3 , nur das nun zusätzlich 20 mM NaN_3 in der Lösung sind. Die Quarzglasküvette wird in den Messaufbau integriert und $^1\text{O}_2$ wird wie zuvor bei den gleichen Anregungswellenlängen von 290, 300 und 308 nm spektral aufgelöst detektiert. Das mit einer Lorenzkurve gefittete $^1\text{O}_2$ Signal in Anwesenheit von NaN_3 für Proteinlysate und Zelllysate ist in Abbildung 5.45 durch eine rote Linie und rote Messpunkte dargestellt.

Für Proteinlysate in Anwesenheit von 20 mM NaN_3 kann für alle drei Anregungswellenlängen kein $^1\text{O}_2$ Signal spektral aufgelöst detektiert werden, obwohl in Abwesenheit von NaN_3 bei den gleichen Anregungswellenlängen klare $^1\text{O}_2$ Signale detektiert worden sind. Proteinlysate erzeugt also eindeutig $^1\text{O}_2$ für Anregungswellenlängen im UVB Bereich. Für Zelllysate wird in Anwesenheit von 20 mM NaN_3 bei 290 nm kein $^1\text{O}_2$ Signal spektral aufgelöst detektiert. Für 300 und 308 nm ist ein abgeschwächtes $^1\text{O}_2$ Signal im Vergleich zu dem Signal in Abwesenheit von NaN_3 (blaue Linie) zu erkennen. Auch Zelllysate erzeugt also eindeutig $^1\text{O}_2$ im UVB Bereich.

Sowohl für Protein- als auch für Zelllysate sind zeitaufgelöste $^1\text{O}_2$ Signale in D_2O und H_2O bei einer Anregungswellenlänge von 290 nm detektiert in Abbildung 5.46 dargestellt.

Die zeitaufgelösten $^1\text{O}_2$ Signale von Protein- und Zelllysate in H_2O haben eine gefittete Abklingdauer von $4,2 \pm 0,5 \mu\text{s}$ und $3,8 \pm 0,4 \mu\text{s}$. Dies könnte die Abklingzeit von $^1\text{O}_2$ sein, da die Abklingdauer von $^1\text{O}_2$ in H_2O normal $3,5 \pm 0,5 \mu\text{s}$ beträgt [Bai05]. Die gefitteten Anstiegszeiten des Signals sind $0,6 \pm 0,1 \mu\text{s}$ und $0,7 \pm 0,1 \mu\text{s}$. Im Lösungsmittel D_2O hatten die $^1\text{O}_2$ Signale von Protein- und Zelllysate deutlich längere Abklingdauern von $32 \pm 4 \mu\text{s}$ und $33 \pm 4 \mu\text{s}$ und auch die Anstiegszeiten haben sich etwas verlängert. Eine verlängerte Abklingdauer in D_2O gegenüber H_2O ist eine weitere indirekte Standardmethode zum Nachweis von $^1\text{O}_2$. Allerdings sind die ermittelten $^1\text{O}_2$ Abklingdauern kürzer als die in D_2O übliche $^1\text{O}_2$ Abklingdauer von $67 \pm 3 \mu\text{s}$ [EKM⁺02]. Dies kann erklärt werden durch die Eigenschaft von Proteinen $^1\text{O}_2$ mit Ratenkonstanten im Bereich von $10^7 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ zu quenchen, wobei ihre Fähigkeit zu quenchen von den Aminosäuren abhängt, aus denen sie zusammengesetzt sind [MEKL75].

Proteinlysate und Zelllysate können also effektiv $^1\text{O}_2$ generieren durch Anregung im UVB Bereich. Dies ist nachgewiesen worden sowohl direkt durch zeit- und spektral aufgelöste $^1\text{O}_2$ Lumineszenz Messungen, als auch indirekt durch Verwendung vom $^1\text{O}_2$ Quencher NaN_3 und durch Verwendung des Lösungsmittels D_2O , das zu einer

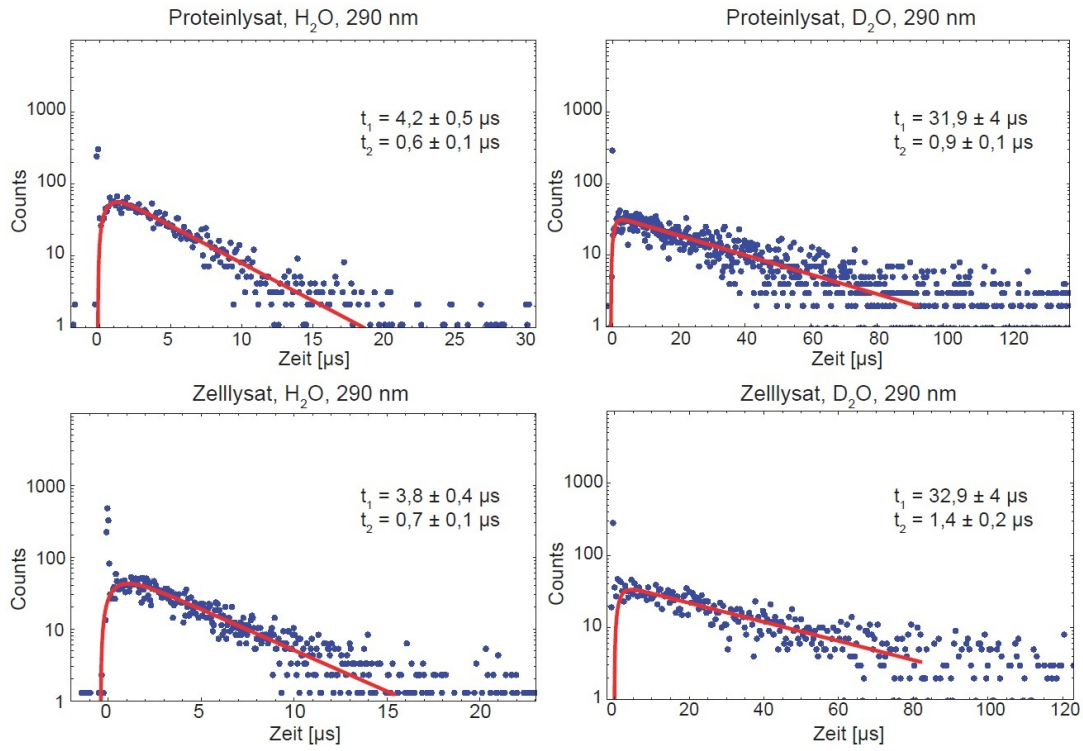


Abbildung 5.46.: Zeitaufgelöstes $^1\text{O}_2$ Signal von Proteinlysate und Zelllysate Suspension in H_2O und D_2O bei einer Anregungswellenlänge von 290 nm

längeren 1O_2 Abklingdauer führt. Vermutlich wird der 1O_2 in den Lysaten durch die Proteine bzw. durch Bestandteile von den Proteinen generiert. Vitamine wie FMN, FAD und Vitamin B_6 sind prosthetische Gruppe von Proteinen, die im Zellstoffwechsel bzw. Aminostoffwechsel essentiell sind [CJ05]. Diese Vitamine können effektiv 1O_2 generieren (siehe Kapitel 5.1.4). Im Zelllysate sind zusätzlich zu Proteinen noch andere Zellbestandteile wie z.B. Fettsäuren und Lipide vorhanden. Diese sind auch in der Lage 1O_2 zu generieren [RMK⁺13] [Reg10].

5.5.3. Photostabilität der Suspensionen aus Zellbestandteilen

Außerdem wird die Photostabilität bei UVB Bestrahlung der Protein- und Zelllysate Suspensionen untersucht. Die Protein- und Zelllysate Suspensionen werden dazu in eine Quarzglasküvette gefüllt und verschlossen. Danach wird die Quarzglasküvette mit dem UVB Transluminator (Kapitel 4.11) mit verschiedenen UVB Dosen zwischen 0 und $13,2 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ bestrahlt und die Abschwächungsspektren nach der Bestrahlung gemessen (Kapitel 4.10).

In Abbildung 5.47 sind die Abschwächungsspektren von Protein- und Zelllysate nach der Bestrahlung mit verschiedenen UVB Dosen dargestellt. Für kleine UVB Dosen bis zu $0,03 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ ist sowohl Protein- als auch Zelllysate im gesamten Spektralbereich von 200 bis 350 nm im Rahmen der Messgenauigkeit photostabil. Aber für hohe UVB Dosen wie 6,6 oder $13,2 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ sind Veränderungen des Abschwächungsspektra um bis zu 10 % sichtbar. Die Abschwächung beim Minima bei 250 nm steigt an und sowohl Zelllysate als auch Proteinlysate beginnt bei längeren Wellenlängen bis in den UVA Bereich Strahlung abzuschwächen.

In Tabelle 5.28 sind für die verschiedenen genutzten Anregungswellenlängen zur 1O_2 Erzeugung (290, 300 und 308 nm) im UVB Bereich und für eine Wellenlänge im UVA Bereich (330 nm) die Abschwächung von Strahlung durch Proteinlysate und Zelllysate vor und nach der Bestrahlung mit 1 und $13 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB aufgelistet. Es ist erkennbar, dass sich für eine UVB Dosis von $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ (durchschnittliche UVB Tagesdosis in Potsdam) höchstens minimale Veränderungen in der Abschwächung bei den verschiedenen Wellenlängen ergeben. Aber für eine hohe UVB Dosis von $13 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ steigt die Abschwächung sowohl für Proteinlysate als auch bei Zelllysate bei allen Wellenlängen an. Sogar im UVA Bereich (330 nm), wo Proteinlysate und Zelllysate ohne Vorbestrahlung nicht absorbieren, ist nach einer UVB Bestrahlung mit $13 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ auch eine UVA Abschwächung von 3 % nachweisbar.

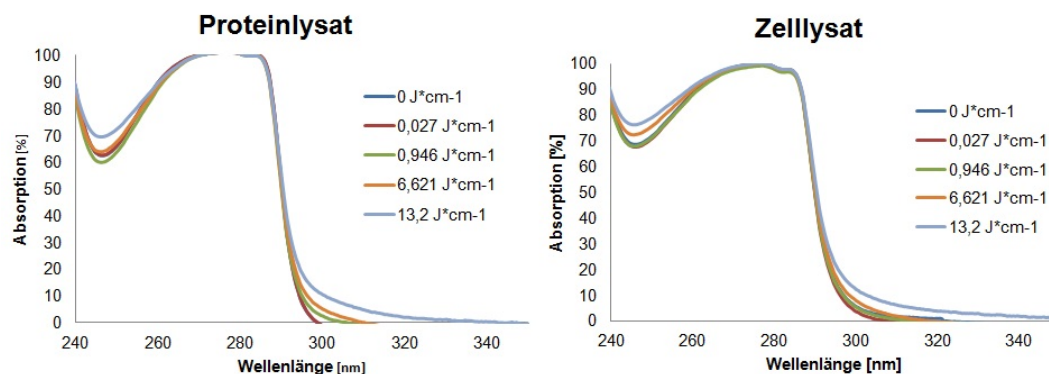


Abbildung 5.47.: Abschwächung von Strahlung durch Proteinlysate und Zelllysate nach der Bestrahlung mit verschiedenen UVB Dosen

	Abschwächung durch Proteinlysate [%]			Abschwächung durch Zelllysate [%]		
$J \cdot cm^{-2}$	0	1	13	0	1	13
290 nm	50	48	55	49	48	54
300 nm	1	3	11	6	6	12
308 nm	0	0	7	2	1	7
330 nm	0	0	2	0	0	3

Tabelle 5.28.: Veränderungen der Abschwächung von Strahlung durch Proteinlysate und Zelllysate nach Bestrahlung mit 1 und 13 $J \cdot cm^{-2}$ UVB. Ein Anstieg der Abschwächung ≥ 2 % ist in rot und ein Abfall in blau markiert.

Um herauszufinden, ob die Veränderungen der Abschwächungsspektren von Proteinlysate und Zelllysate durch die Oxidation von den Proteinen bzw. den Proteinen und anderen Zellbestandteilen verursacht wird, ist der Sauerstoffverbrauch während der Bestrahlung mit UVB gemessen worden. Dafür wird das Protein- bzw. Zelllysate in eine luftdicht verschließbare Quarzglasküvette gefüllt und in den Messaufbau aus Kapitel 4.7 integriert. Die Sauerstoffkonzentration wird mit einem Sauerstoffsensor in der Küvette oberhalb des Laserstrahls gemessen. Für eine möglichst gleichmäßige Sauerstoffverteilung in der Quarzglasküvette wird ein Rührfisch hinzugefügt, der die Suspension permanent während der Bestrahlung durchmischt. Die Wellenlänge, mit der bestrahlt wird, ist 308 nm und die Laserintensität bei dieser Wellenlänge beträgt $30 \pm 3 \text{ mW} \cdot cm^{-2}$.

In Abbildung 5.48 ist der Verlauf der Sauerstoffkonzentration in der Protein- bzw. Zelllysatsuspension während der Bestrahlung bei 308 nm für 45 Minuten dargestellt. Die Sauerstoffkonzentration in der Protein- bzw. Zelllysatsuspension nimmt während der UVB Bestrahlung ab. In der Proteinlysatsuspension fällt die Sauer-

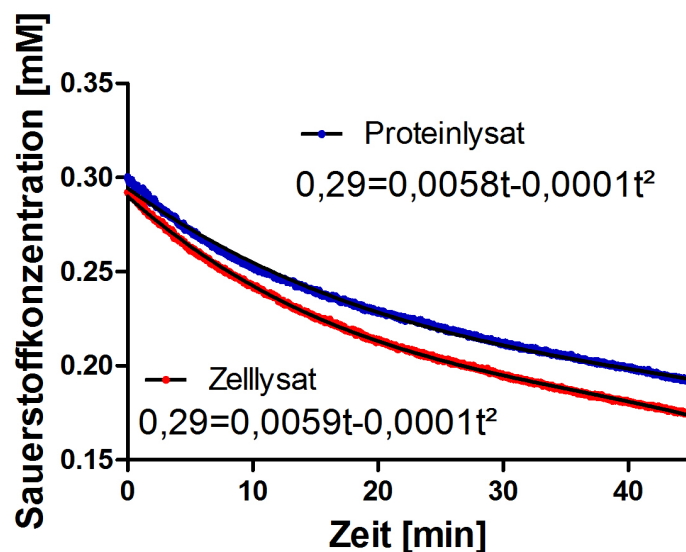


Abbildung 5.48.: Sauerstoffverbrauch von Proteinlysate und Zelllysate bei UVB Bestrahlung bei 308 nm für 45 Minuten

stoffkonzentration von 0,3 mM auf 0,19 mM ab nach einer Bestrahlung von 45 Minuten bei 308 nm und in der Zelllysatsuspension fällt die Sauerstoffkonzentration von 0,29 mM auf 0,17 mM ab bei dergleichen Bestrahlung. Die Sauerstoffkonzentration sinkt also um 0,11 mM in der Proteinlysatsuspension und um 0,12 mM in der Zelllysatsuspension. Dieser Sauerstoffverbrauch während der Bestrahlung mit UVB Strahlung deutet darauf hin, dass Bestandteile der Protein- und Zelllysatsuspensionen oxidiert werden. Dies kann auch eine Erklärung für die Veränderungen im Abschwächungsspektrum der Protein- bzw. Zelllysatsuspension nach der Bestrahlung mit UVB sein. Um besser zu verstehen, welche Art von chemischen Reaktionen abläuft, ist die Kurve vom Sauerstoffverbrauch während der Bestrahlungszeit durch ein Polynom gefittet worden und die gefittete Gleichung ist bis zum quadratischen Term in Abbildung 5.48 in der jeweiligen Legende aufgeführt. Die höheren Terme waren vernachlässigbar klein. Man erkennt das hauptsächlich chemische Reaktionen nullter Ordnung, die durch den linearen Polynomterm beschrieben werden, ablaufen. Dies ist typisch für Reaktionen, die nicht von der Stoffkonzentration abhängig sind, wie z.B. photochemische Reaktionen, die nur von der Bestrahlungsintensität abhängig sind. Allerdings laufen nicht nur Reaktionen nullter Ordnung ab, sondern auch Reaktionen höherer Ordnung, die von den Stoffkonzentrationen der beteiligten Reaktionspartner abhängig sind. Die Ordnung der weiteren Reaktionen kann nicht bestimmt werden, da die Stoffkonzentration der verschiedenen möglichen Reaktionspartner die sich im Protein- bzw. Zelllysate befinden, nicht bekannt ist. Eine mögliche Erklärung ist, dass durch die Oxidation der Proteine, die Proteinstruktur verän-

dert ist und noch weitere Reaktionen neben der Oxidation von Proteinen ablaufen können.

Suspensionen bestehend aus verschiedenen Proteinen mit und ohne die restlichen Zellbestandteile können also effektiv 1O_2 generieren bei Anregung im UVB Bereich. Außerdem sind diese Suspensionen bei Bestrahlung mit hohen UVB Dosen (z.B. $13 J \cdot cm^{-2}$) nicht photostabil und ihre Abschwächung von Strahlung in einem Bereich zwischen 200 und 350 nm verändert sich. Eine wahrscheinliche Erklärung könnte die Oxidation von Bestandteilen dieser Suspensionen sein, denn bei ihrer Bestrahlung mit UVB (308 nm) wird Sauerstoff verbraucht.

5.6. Suspensionen aus Bakterien

Um sich komplexen Strukturen wie der menschlichen Haut anzunähern, wird die Generierung von 1O_2 durch Zellen in Suspension untersucht. In diesem Kapitel wird die 1O_2 Erzeugung durch Bakterien behandelt. Bakterien sind Prokaryonten, die in Kapitel 3.2.2 detailliert beschrieben werden. In dieser Arbeit werden zwei verschiedenen Bakterien verwendet.

Escherichia coli (E. coli): *E. Coli* ist ein stäbchenförmiges Bakterium, das sich mit Hilfe von Geißeln fortbewegt. Die Stäbchen haben einen Durchmesser bis zu $1,5 \mu m$ und eine Länge von 2 bis $6 \mu m$. Es gehört zu den im Darm vorkommenden Escherichia Bakterien und ist gram-negativ. Im menschlichen Darm ist es ein Produzent von Vitaminen, insbesondere von Vitamin K und normal nicht krankheitsauslösend. Es gibt aber pathogene Stämme und die sind die häufigste Ursache von menschlichen Infektionskrankheiten.

Staphylococcus aureus (S. aureus): *S. Aureus* ist ein kugelförmiges Bakterium, das zu den Staphylokokken und damit zu den gram-positiven Kokken gehört. Sie sind zwischen $0,8$ und $1,2 \mu m$ groß und bei geeigneten äußeren Bedingungen lagern sie sich traubenförmig zusammen. *S. Aureus* kommt fast überall in der Natur, auch auf der Haut und in den oberen Atemwegen von 20 bis 50 % aller Menschen vor [MH99], aber löst meist keine Krankheitssymptome aus. *S. Aureus* wird normal durch Schmierinfektion übertragen, wobei Infektionsquelle vor allem andere Menschen sind [MH99]. Aus der Nase kann der Erreger auch über Tröpfchenübertragung verbreitet werden [MH99].

5.6.1. Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion

Die Bakteriensuspensionen werden für alle Versuche frisch hergestellt (Kapitel 4.2.4). Um die Erzeugung von $^1\text{O}_2$ durch UV-Anregung zu verifizieren, werden die Bakterienlösungen in den in Kapitel 4.7 beschriebenen Versuchsaufbau integriert. Um nachzuweisen, dass es sich bei den gemessenen Lumineszenz Signalen um $^1\text{O}_2$ Lumineszenz handelt, wird zunächst ein Lumineszenz Signal von den Bakterien im Lösungsmittel D_2O mit einer bestimmten optischen Dichte (OD) spektral aufgelöst detektiert und anschließend das Lumineszenz Signal von einer Bakteriensuspension mit derselben OD, damit die gleiche Anzahl von Bakterien in der Suspension vorhanden ist, aber in einer Lösung aus dem Quencher Natriumazid (NaN_3) und D_2O . Dafür werden die wie in Kapitel 4.2.4 beschriebenen Bakteriensuspensionen in D_2O mit einer OD von 0,6 bei einer Wellenlänge von 600 nm hergestellt. Diese Bakterienlösungen werden nun mit entweder reinem D_2O oder mit NaN_3 und D_2O so verdünnt, dass zwei Bakteriensuspensionen mit gleicher OD entstehen, eine in reinem D_2O und die andere mit 40 mM NaN_3 in D_2O .

Diese Bakteriensuspensionen mit und ohne 40 mM NaN_3 in D_2O werden in eine Küvette mit Rührfisch gegeben und in den in Kapitel 4.7 beschriebenen Messaufbau integriert. Die Küvette wird mit dem abstimmbaren Laser bei den Wellenlängen 308, 320 und 355 nm angeregt, da bei diesen Wellenlängen im UVB bzw. UVA Bereich die Laserleistung besonders hoch ist. Für jede Anregungswellenlänge wird wie in Kapitel 4.8 beschrieben ein $^1\text{O}_2$ Signal spektral aufgelöst gemessen. Sowohl für *E. Coli* als auch für *S. Aureus* Suspensionen sind $^1\text{O}_2$ Signale für die Anregungswellenlängen 308 nm, 320 nm und 355 nm mit (rote Linie) und ohne (blaue Linie) den Quencher NaN_3 spektral aufgelöst detektiert und danach mit einer Lorenzfunktion gefittet worden. Diese spektral aufgelöst detektierten Signale sind in Abbildung 5.49 abgebildet.

Für reine *E. Coli* Suspensionen in D_2O ist für alle Anregungswellenlängen ein spektral aufgelöst detektiertes Signal mit einem Maximum des Lorenzfit zwischen 1270 und 1280 nm ermittelt worden (blaue Linien). Dieses Maximum korreliert mit der Übergangsenergie von $^1\text{O}_2$ in D_2O [BFP⁺07]. Für *E. Coli* Suspensionen mit 40 mM NaN_3 ist für die Anregungswellenlängen 308 und 320 nm kein $^1\text{O}_2$ Signal spektral aufgelöst detektiert worden (rote Linien). Für eine Anregungswellenlänge von 355 nm ist auch für *E. Coli* Suspensionen mit NaN_3 ein $^1\text{O}_2$ Signal spektral aufgelöst detektiert worden, dass allerdings nur 60 % der Intensität des Signals ohne NaN_3 hat. *E. Coli* kann also $^1\text{O}_2$ generieren für Anregungswellenlängen im UVA und UVB Bereich. Für reine *S. Aureus* Suspensionen sind auch bei allen Anregungswellenlängen $^1\text{O}_2$ Signal spektral aufgelöst detektiert worden (blaue Linie). Die Zugabe von 40

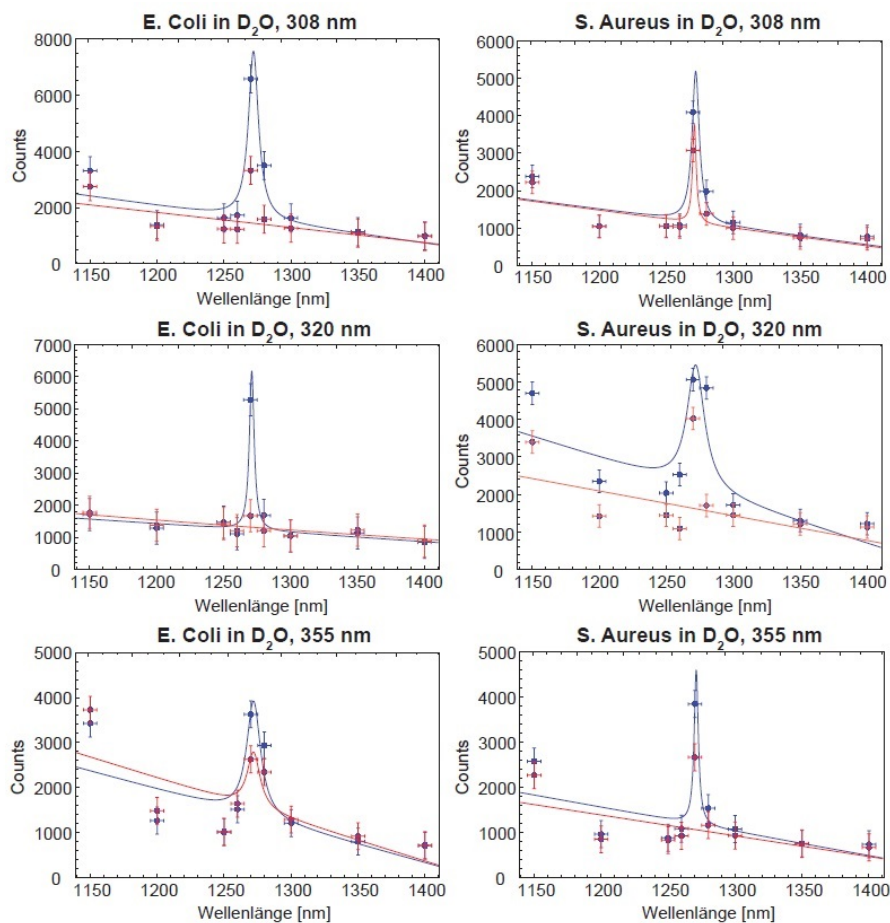


Abbildung 5.49.: Spektral aufgelöst detektierte $^1\text{O}_2$ Signale von Bakteriensuspensionen in D_2O mit (rote Linie) und ohne (blaue Linie) Quencher (40 mM NaN_3) bei Anregungswellenlängen von 308, 320 und 355 nm

mM NaN_3 in *S. Aureus* Suspensionen führt zu einem weniger intensiven $^1\text{O}_2$ Signal, aber $^1\text{O}_2$ Lumineszenz kann spektral aufgelöst detektiert werden (rote Linie). Auch *S. Aureus* scheint $^1\text{O}_2$ bei UV Anregung zu generieren, aber die $^1\text{O}_2$ Signale sind weniger intensiv als die Signale von *E. Coli* die unter gleichen Bedingungen detektiert worden sind und lassen sich auch weniger effektiv durch NaN_3 quenchen.

Die $^1\text{O}_2$ Lumineszenz Signale von *E. Coli* und *S. Aureus* Suspensionen sind auch zeitaufgelöst im Lösungsmittel D_2O und H_2O bei einer Anregung bei 308 nm detektiert worden. Die $^1\text{O}_2$ Signale von *S. Aureus* Suspension haben eine Abklingzeit von $2,2 \pm 0,3 \mu\text{s}$ in H_2O und von $30 \pm 3 \mu\text{s}$ in D_2O . Für die Signale von *E. Coli* in H_2O werden Abklingzeiten von $2 \pm 0,2 \mu\text{s}$ ermittelt und in D_2O von $34 \pm 4 \mu\text{s}$. Diese Abklingzeiten sind kürzer als die $^1\text{O}_2$ Abklingzeit in den jeweiligen Lösungsmitteln [Bai05] [EKM⁺02], doch das lässt sich dadurch erklären, dass $^1\text{O}_2$ durch die Bakterien in der Suspension gequencht werden könnte. Doch die Abklingdauer der $^1\text{O}_2$ Signale von *E. Coli* und *S. Aureus* sind beide in D_2O länger als in H_2O , was eine weitere indirekte Standardmethode zum Nachweis von $^1\text{O}_2$ ist. *E. Coli* und *S. Aureus* können also $^1\text{O}_2$ bei Anregung im UV-Bereich erzeugen. Allerdings sind die $^1\text{O}_2$ Signale vom gram-negativen *E. Coli* unter gleichen Anregungsbedingungen immer intensiver als die Signale vom gram-positiven *S. Aureus* (siehe z.B. 5.49). Es gibt in Bakterien also Substanzen die als Photosensibilisatoren fungieren können. Dies könnten zum Beispiel verschiedene Vitamine sein, denn in Bakterien kommen teilweise dieselben Vitamine wie in menschlichen Hautzellen vor [Got86]. Vitamin K und Nicotinsäure sind Bestandteile von *E. Coli* und Nicotinsäure kommt auch in *S. Aureus* vor [PP45] [BK62]. Diese Vitamine erzeugen nachweislich $^1\text{O}_2$ (Kapitel 5.1.3 und 5.2.3).

5.7. Suspensionen aus Keratinozyten

Keratinozyten sind eukaryotische Zellen. Der Aufbau und die Funktionsweise von eukaryotischen Zellen ist in Kapitel 3.2.1 detailliert beschrieben. Dabei sind Keratinozyten in der Epidermis vorkommende Zellen, die von epidermalen Stammzellen abstammen und dann durch die verschiedenen Schichten der Epidermis differenzieren. Dieser Vorgang wird ausführlich in Kapitel 3.3.1 beschrieben. Keratinozyten werden verwendet um $^1\text{O}_2$ Erzeugung in eukaryotischen Zellen nachzuweisen, da es die häufigsten Zellen in der menschlichen Epidermis sind. Die Eindringtiefe von UVB Strahlung ist zudem auf die Epidermis beschränkt, nur wenig Strahlung in diesem Spektralbereich kann tiefer eindringen [WJJ05].

5.7.1. Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion

Die Keratinozyten-Suspensionen werden wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben, für alle Versuche frisch hergestellt. Für die Detektion von 1O_2 Lumineszenz in Suspensionen aus Keratinozyten werden 23,5 Millionen Zellen pro Milliliter in PBS hergestellt. Diese Suspension wird halbiert und eine Hälfte wird mit reinem PBS gemischt, so dass eine Suspension mit etwa 12 Millionen Zellen pro Milliliter entsteht und die andere Hälfte wird mit einer Lösung aus PBS und dem Quencher NaN_3 gemischt, so dass eine Suspension mit etwa 12 Millionen Zellen pro Milliliter und 50 mM NaN_3 in PBS entsteht.

Diese Keratinozyten-Suspensionen mit und ohne 50 mM NaN_3 in PBS werden in eine Küvette mit Rührfisch gegeben und in den in Kapitel 4.7 beschriebenen Messaufbau integriert. Die Küvette wird mit dem abstimmbaren Laser bei der Wellenlängen 308 nm und 320 nm angeregt. Die Laserintensität bei 308 nm beträgt $33 \pm 4 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-1}$ und bei 320 nm $20 \pm 2 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-1}$. Die Lumineszenz wird mit den Filtern aus Tabelle 4.6 spektral aufgelöst detektiert, wobei die Suspension in der Küvette regelmäßig gewechselt wird, um sicherzustellen, dass die Keratinozyten durch die Bestrahlung nicht verändert oder sogar zerstört worden sind.

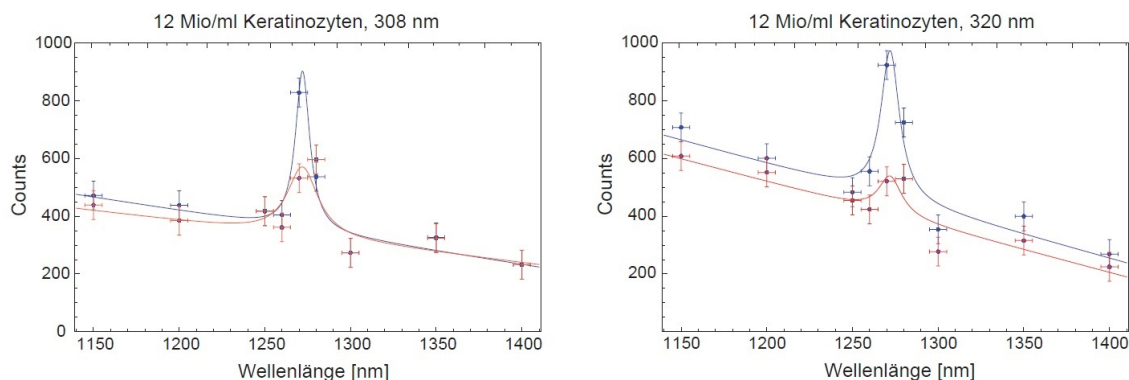


Abbildung 5.50.: Spektral aufgelöst detektierte 1O_2 Signale von Keratinozyten-Suspensionen (12 Millionen Zellen pro ml) mit (rot) und ohne (blau) 50 mM NaN_3 bei 308 nm (links) und 320 nm (rechts)

In Abbildung 5.50 sind die ausgewerteten spektral aufgelöst detektierten Lumineszenz-Signale bei 308 nm (links) und 320 nm (rechts) dargestellt. Die blauen Messpunkte stellen die Signale von reinen Keratinozyten-Suspensionen in PBS da und die roten Messpunkte die Signale von Keratinozyten-Suspensionen mit dem Quencher NaN_3 (50 mM). Die blaue und rote Linie sind dann die jeweiligen gefitteten Lorentz-

Kurven. Man erkennt, dass die in die Messpunkte gefitteten Lorenz-Kurven der Lumineszenz-Signale von reinen Keratinozyten-Suspensionen (blaue Linien) sowohl für die Anregung bei 308 nm als auch bei 320 nm ein Maximum zwischen 1270 nm und 1280 nm haben. Das ist ein typischer Nachweis von 1O_2 Lumineszenz, denn die Übergangsenergie von 1O_2 in H_2O liegt bei 0,98 eV [Bai05]. Für die Anregung bei 320 nm ist das Maximum des spektral aufgelöst detektierten Signals etwas höher als für die Anregung bei 308 nm, obwohl die Laserintensität bei dieser Wellenlänge niedriger ist. Scheinbar wird 1O_2 durch Anregung der Keratinozyten bei 320 nm effektiver generiert als bei 308 nm. Außerdem erkennt man in Abbildung 5.50, dass durch die Zugabe von dem 1O_2 Quencher NaN_3 das Lumineszenz-Signal bei 1270 nm weniger intensiv ist. Das quenchern mit NaN_3 ist eine weitere Nachweismethode von 1O_2 [BRK⁺11].

In Keratinozyten befinden sich verschiedene Substanzen wie Proteine und Vitamine, die in Lösung oder Suspension 1O_2 bei UVB Anregung erzeugen können (Kapitel 5.1, Kapitel 5.2, Kapitel 5.5). In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass auch Keratinozyten durch Anregung im UVB Bereich (308 und 320 nm) 1O_2 erzeugen können. Damit ist zweifelsfrei gezeigt, dass UVB Strahlung in Keratinozyten und damit auch in Haut 1O_2 erzeugen kann. UVA und UVB Strahlung kann verschiedene zellbiologische Effekte erzeugen, wie die Freisetzung von MMP-1 [BSJ⁺08], die Erzeugung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) und 6-4-Photoprodukten (6-4P) [Gru02] [Hus05] [PD06] oder die Generierung von 8-Hydroxy-Guanin (8-oxoG) [PD06]. Während die DNA Photoprodukte CPD und 6-4P durch direkte UVB Absorption der DNA ausgelöst werden, wurde für oxidierte DNA Photoprodukte wie 8-oxoG UVA Strahlung verantwortlich gemacht wurde [PD06]. Die Ergebnisse in diesem Kapitel zeigen allerdings, dass auch UVB Strahlung 1O_2 in Zellen erzeugen kann und damit auch für oxidierte DNA Photoprodukte verantwortlich sein könnte.

5.8. Schweinehaut

Schweinehaut ist ein geeignetes Modell, um zu untersuchen, ob UVB-Anregung von Haut zur Generierung von 1O_2 führt. Die verschiedenen Gründe, warum sich Schweinehaut als Modell für menschliche Haut eignet und die Gemeinsamkeiten und Unterschiede, sind ausführlich in Kapitel 3.3.2 beschrieben.

5.8.1. Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion von Schweinehaut

Die Schweinehaut wird für alle Experimente nach Schlachtung innerhalb weniger Stunden, wie in Kapitel 4.3 beschrieben, zu messbaren Präperaten weiterverarbeitet, so dass alle Experimente noch am selben Tag durchgeführt werden können.

Es werden aus der Schweinehaut mehrere Präparate mit einer Größe von 2x2 cm hergestellt. So können Experimente mit und ohne Zusatz vom Quencher NaN_3 durchgeführt werden. NaN_3 quencht effektiv 1O_2 (Kapitel 4.1.5) und der Rückgang von Lumineszenzphotonen bei 1270 nm durch Zugabe von NaN_3 ist eine indirekte Nachweismethode von 1O_2 . Allerdings muss sich NaN_3 , um 1O_2 quenchen zu können, am Entstehungsort von 1O_2 befinden. In einer Lösung kann man das durch die Zugabe einer hohen Konzentration an NaN_3 relativ leicht realisieren. Allerdings ist es bisher nicht geklärt, wo genau in Schweinehaut 1O_2 generiert wird. Sicher ist aber, dass das NaN_3 die Schweinehaut penetrieren muss, um den in der Schweinehaut erzeugten 1O_2 quenchen zu können. Um die Erzeugung von 1O_2 in Schweinehaut durch Anregung im UV Bereich nachzuweisen, werden dementsprechend zwei 1O_2 Signale von demgleichen Schweinehautstück spektral aufgelöst detektiert, wobei eine Schweinehautprobe mit NaN_3 inkubiert worden ist. Dafür werden die Schweinehautpräparate wie in Kapitel 4.3 hergestellt. Nachdem man das Schweinehautstück in zwei 2x2 cm kleine Schweinehautstückchen zerteilt hat, wird ein Schweinehautstück in eine Lösung mit 100 mM NaN_3 in PBS für 45 Minuten eingelegt, während das andere Schweinehautstück in reinem PBS für 45 Minuten liegt. Erst danach werden beide Schweinehautstücke mit Hilfe von Agar-HEPES-Puffer Lösung in Petrischalen befestigt, die in den Messaufbau (Kapitel 4.7) eingebaut werden.

Die Petrischale wird in den Messaufbau an der Stelle eingebaut, wo normal die Proben-Halterung ist (Abbildung 4.8). Sie wird so ausgerichtet, dass der auftreffende Laserstrahl auf die Epidermis der Schweinehaut trifft. Das 1O_2 Signal wird wie in Kapitel 4.8 beschrieben, spektral aufgelöst gemessen und ausgewertet. Das 1O_2 Signal wird sowohl für das in reinem PBS als auch für das in 100 mM NaN_3 in PBS eingelegte Schweinehautstückchen bei der selben Anregungswellenlänge spektral aufgelöst detektiert. Dieses Experiment wird für eine Anregungswellenlänge von 308 nm (UVB) mit einer Laserintensität von $35 \pm 4 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-1}$ und für eine Anregungswellenlänge von 355 nm (UVA) mit einer Laserintensität von $23 \pm 3 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-1}$ durchgeführt.

In Abbildung 5.51 (a) und (b) ist das spektral aufgelöst detektierte 1O_2 Lumineszenz Signal für in reinem PBS eingelegte Schweinehautstückchen bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm (a) und 355 nm (b) dargestellt. Ein klares Maximum zwischen

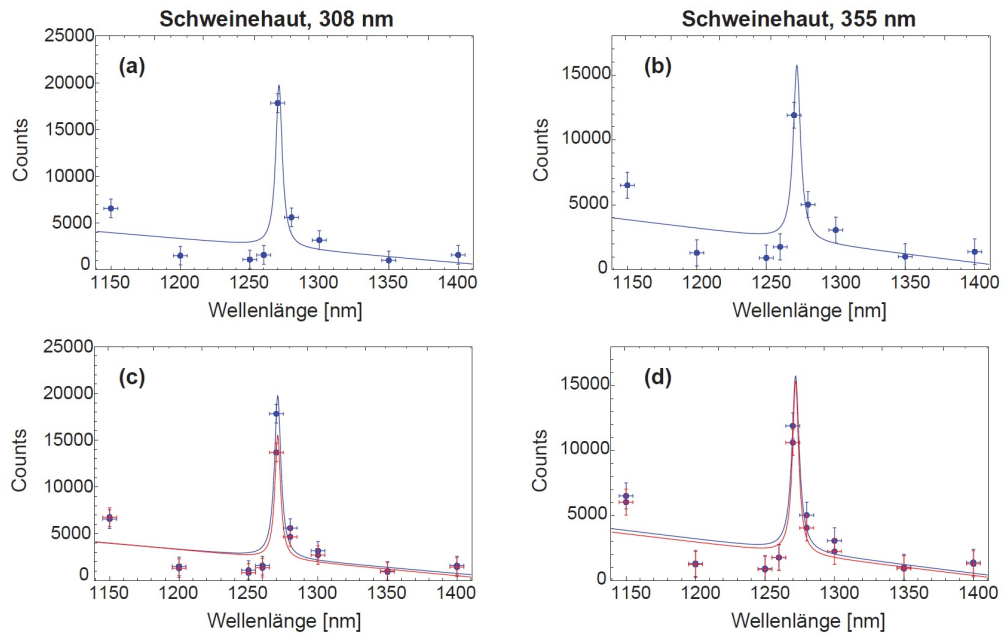


Abbildung 5.51.: In (a) und (b) sind die spektral aufgelöst detektierten 1O_2 Lumineszenz Signale für eine Anregung mit 308 und 355 nm dargestellt. In (c) und (d) sind dieselben Lumineszenz Signale für eine Anregung mit 308 und 355 nm dargestellt (blaue Linie) und die spektral aufgelöst detektierten 1O_2 Lumineszenz Signale der in NaN_3 eingelegten Schweinehautstückchen für dieselbe Anregung (rote Linie).

1270 und 1280 nm ist erkennbar, was ein Nachweis von 1O_2 Lumineszenz ist. In Abbildung 5.51 (c) und (c) ist das spektral aufgelöst detektierte 1O_2 Lumineszenz Signal für in 100 mM NaN_3 in PBS eingelegte Schweinehautstückchen (rote Linie) für eine Anregung von 308 nm (c) und 355 nm (d) dargestellt. Außerdem ist zum direkten Vergleich das 1O_2 Lumineszenz Signal von in reinem PBS eingelegten Schweinehautstückchen bei der selben Anregungswellenlänge (blaue Linie) abgebildet.

In Abbildung 5.51 (c) ist erkennbar, dass das 1O_2 Lumineszenz Signal für eine Anregung bei 308 nm für das in NaN_3 eingelegte Schweinehautstückchen schwächer ist, als das Signal für das in reinem PBS eingelegte Schweinehautstückchen. Beide Schweinehautstücken (2x2 cm) stammen vom selben Stück Schweinehaut, so dass die Unterschiede im Lumineszenz-Signal nicht auf Unterschiede in der Schweinehaut zurückzuführen sind, sondern allein auf das Einlegen in NaN_3 . Bei 1270 nm wird für das in reinem PBS eingelegte Schweinehautstückchen eine Lumineszenz-Signal mit 18000 Photonen gemessen, während es für das in NaN_3 eingelegte Schweinehautstückchen nur noch 13500 Photonen waren. Dies entspricht einer Abschwächung des Lumineszenz-Signals bei 1270 nm von 25 %. In Abbildung 5.51 (d) ist die Anzahl der Photonen für das gemessene Lumineszenz-Signal bei 1270 nm von 12000 für das in PBS eingelegte Schweinehautstückchen auf 11500 für das in NaN_3 eingelegte Schweinehautstückchen gesunken. Dies entspricht einer Abschwächung des Lumineszenz-Signals bei 1270 nm von 5 %. Diese Abschwächung ist allerdings im Rahmen der Fehlergenauigkeit (10 % Fehler) nicht aussagekräftig.

Die Messung bei einer Anregung von 308 nm mit und ohne NaN_3 ist für ein anderes Schweinehautstück wiederholt worden. Diesmal ist die Anzahl der Photonen von 14500 für ein in reines PBS eingelegtes Schweinehautstück auf 12800 Photonen für ein in NaN_3 eingelegtes Schweinehautstück gesunken, was einer Abnahme um 12 % entspricht.

Dass Haut 1O_2 bei einer Anregung von 355 nm (UVA) erzeugen kann, ist schon in der Literatur bekannt [BMM⁺07]. In dieser Arbeit kann ein 1O_2 Signal spektral aufgelöst für eine Anregung von 355 nm detektiert werden, allerdings hat die Inkubation mit NaN_3 keinen nachweisbaren Effekt auf die 1O_2 Erzeugung. Dass 1O_2 durch Anregung von Schweinehaut im UVB Bereich generiert werden kann, ist in dieser Arbeit zum ersten Mal nachgewiesen worden. Es kann ein 1O_2 Lumineszenz-Signal spektral aufgelöst detektiert werden. Außerdem kann durch die Inkubation der Schweinehaut mit dem Quencher NaN_3 ein quenchen der 1O_2 Lumineszenz bei 1270 nm nachgewiesen werden. Schweinehaut generiert also 1O_2 auch für Anregung im UVB-Bereich (308 nm).

5.9. Menschliche Haut

Der Aufbau und die Funktionsweise von menschlicher Haut wird ausführlich in Kapitel 3.3.1 beschrieben. Die Hautpräparate sind vor jedem Experiment frisch hergestellt worden wie in Kapitel 4.4 beschrieben.

5.9.1. Zeitlich und spektral aufgelöste Singulett-Sauerstoff Detektion von menschlicher Haut

Das menschliche Haut 1O_2 bei UVA Anregung generieren kann, wurde schon nachgewiesen [BMM⁺07]. Nun soll untersucht werden, ob menschliche Haut auch bei Anregung im UVB Bereich 1O_2 erzeugt. Dazu werden die hergestellten Hautpräparate (Kapitel 4.4) in den Messaufbau (Kapitel 4.7) integriert, so dass der auftreffende Laserstrahl auf die Stratum Corneum der Epidermis trifft. Die 1O_2 Lumineszenz wird zeit- und spektral aufgelöst detektiert und dann wie in Kapitel 4.8 beschrieben, ausgewertet. Anregungswellenlängen im UVB Bereich sind 308 nm mit einer Laserintensität von $38 \pm 4 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-1}$ und 320 nm mit einer Laserintensität von $23 \pm 3 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-1}$.

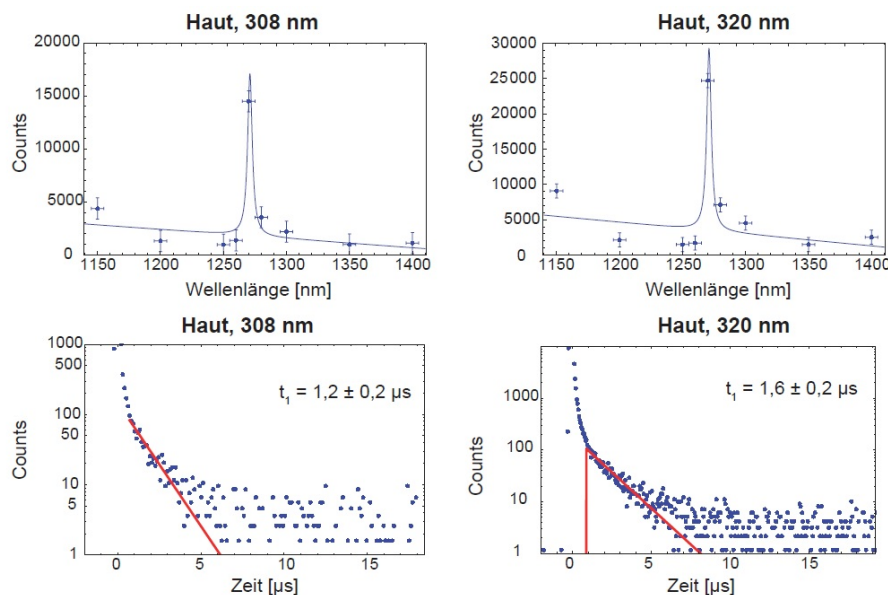


Abbildung 5.52.: Die Singulett-Sauerstoff Signale von menschlicher Epidermis zeitlich (unten) und spektral aufgelöst (oben) detektiert für Anregungswellenlängen von 308 nm (links) und 320 nm (rechts).

Für Anregung bei 308 und 320 nm kann 1O_2 spektral aufgelöst detektiert und mit einer Lorenzkurve gefittet werden (Abbildung 5.52). Die gefittete Lorenzkurve hat ein Maximum zwischen 1270 und 1280 nm, was mit der Übergangsenergie von 1O_2 übereinstimmt [JBRKN08]. Bei den gleichen Anregungswellenlängen kann auch ein zeitaufgelöstes 1O_2 Signal gemessen werden (Abbildung 5.52). Die gefitteten Abklingzeiten des 1O_2 Signals können bestimmt werden zu $1,2 \pm 0,2 \mu s$ für Anregung bei 308 nm und zu $1,6 \pm 0,2 \mu s$ bei 320 nm. Diese Abklingzeiten stimmen überein mit 1O_2 Abklingzeiten, die in mit Photosensibilisatoren inkubierten Zellen gemessen wurden [JBSMN08]. Die menschliche Haut ist anscheinend auch bei UVB Anregung der Lage 1O_2 zu generieren. Dieser durch UVB Anregung generierte 1O_2 könnte für zellulären Aktivierungsmechanismen durch UVB Strahlung von Bedeutung sein. Bisher wurde die Erzeugung von Photoprodukten in DNS-Ketten nach der Absorption von UVB durch DNS für die UVB ausgelösten Signalwege verantwortlich gemacht [BSSK02] [DDP+08].

5.10. Nachweis von MMP-1 Expression

Hautzellen reagieren auf UV Strahlung mit der Freisetzung von dem Enzym Matrix-Metalloprotease-1 (MMP-1), das in den Fibroblasten der Dermis produziert wird und zum enzymatischen Abbau von Kollagen in der Dermis führt und so Faltenbildung beim Photoaging induzieren kann [Ruw07]. Sowohl UVA als auch UVB Bestrahlung kann eine Erhöhung der MMP-1 Expression in der Haut auslösen [BSJ+08]. MMP-1 regt dann die Hydrolyse von Kollagen Fibrillen in der extrazellulären Matrix an und führt so zum Abbau von Kollagen. Die MMP-1 Expression wird durch mehrere Signalwege reguliert, wobei UVA und UVB Strahlung MMP-1 Expression über mehrere verschiedene Signalwege auslösen [BSJ+08] [SRGGGB05]. Ein möglicher Signalweg ist der Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Signalweg, für den verschiedene charakteristische Aktivierungsmuster nach UVA und UVB Bestrahlung nachgewiesen werden können [SRGGGB05]. In *in-vitro* Experimenten wurde gezeigt, dass Bestrahlung von Fibroblasten mit UVA als auch mit UVB zur Freisetzung von MMP-1 führt, allerdings über unterschiedliche Signalwege [BSJ+08]. Aufgrund der begrenzten Eindringtiefe kurzweiliger UV-Strahlung erreicht UVB Strahlung die in der Dermis liegenden Fibroblasten unter natürlichen Umständen kaum [WJJ05]. Experimente mit humanen Keratinozyten zeigten jedoch, dass sowohl UVB als auch UVA Bestrahlung von Keratinozyten zur Freisetzung von MMP-1 führen kann [Kru01]. Allerdings spielen in Keratinozyten unterschiedliche Transkriptionsfaktoren bei UVA und UVB induzierter MMP-1 Freisetzung eine Rolle [Kru01]. Außerdem wurde gezeigt, dass die UVB Bestrahlung von epidermalen Keratinozyten indirekt zu einer MMP-1 Produktion in dermalen Fibroblasten führen kann [XY-

ZG06]. Die verschiedenen Wege auf denen UVA und UVB Strahlung die Freisetzung von MMP-1 induzieren sind also sehr komplex. In diesem Kapitel soll gezeigt werden, dass die Bestrahlung mit UVB in einem *ex-vivo* Haut-Modell (periläsionale Haut, die im Rahmen von operativen Eingriffen entnommen wurde) zu einer Freisetzung von MMP-1 führt. Dafür wird eine UVB Dosis, die ausreicht, um ein $^1\text{O}_2$ Signal in menschlicher Haut zu erzeugen, verwendet. Zusätzlich wird die MMP-1 Freisetzung für drei verschiedene Wellenlängen im UVB und UVA Bereich (308, 320 und 355 nm) untersucht, um festzustellen, ob bei der Bestrahlung mit verschiedenen Wellenlängen Unterschiede bei der MMP-1 Freisetzung im *ex-vivo* Haut-Modell detektiert werden können.

Um die Freisetzung von MMP-1 zu untersuchen, werden operativ entfernte periläsionale Hautstücke mit einem Durchmesser $\geq 1 \text{ cm}^2$ wie in Kapitel 4.5 beschrieben, vorbereitet. Hautproben werden mit einer Stanze vor der Bestrahlung und 24 Stunden nach der Bestrahlung (Inkubation im Brutschrank) entnommen. Die Hautproben werden zum Nachweis von MMP-1 immunhistologisch gefärbt und mit Mayers's Hämalaun gegengefärbt. Um einen guten Kontrast zu bekommen, wurde der MMP-1-Antikörper mit (1:200) verdünnt. Danach können mit Hilfe eines Licht-Mikroskops die durch MMP-1 Expression gefärbten Hautareale identifiziert werden.

Zunächst werden drei verschiedene Hautstücke mit Laser-Strahlung bei drei verschiedenen Wellenlängen aus dem UVB (308 und 320 nm) und UVA (355 nm) Bereich mit einer Energiedosis von 0,2 J bestrahlt. Dies ist die Energiedosis, die nötig ist, um eine zeitaufgelöstes $^1\text{O}_2$ Signal in menschlicher Haut bei UVB Anregung zu detektieren (siehe Kapitel 5.9.1). Die untersuchte Hautprobe wird durch eine Stanze (Durchmesser: 3 mm) entnommen und hat damit eine Fläche von $0,07 \text{ cm}^2$. Da die mittlere tägliche UVB Dosis in Potsdam $0,95 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ beträgt [FJG02], entspricht die Energie von 0,2 J bei einer Probenfläche von $0,07 \text{ cm}^2$ einer UVB Dosis von 3 Tagen. Zur Bestrahlung wurde die in einer Petrischale fixierte Haut in den Messaufbau (Kapitel 4.7) integriert und mit einer Energiedosis von 0,2 Joule bei der jeweiligen Wellenlänge bestrahlt.

In Abbildung 5.53 sind Negativ- und Positiv-Kontrolle der immunhistologischen Färbung dargestellt. Als positive Kontrolle wurde Plazenta gefärbt (Abbildung 5.53 rechts). Es werden deutlich die rosa-rot eingefärbten Areale um die blau eingefärbten Zellen herum erkannt, die eine erhöhte MMP-1 Expression anzeigen. Die Negativ-Kontrolle (Abbildung 5.53 links) enthält keine rosa-rot eingefärbten Areale, sondern ist lediglich mit Mayers's Hämalaun gegengefärbt. Das Stratum Corneum ohne Zellen, die Epidermis mit blau gefärbten Zellen (Keratinocyten) und darunter die breite Dermis mit einer geringeren Anzahl von blau gefärbten Zellen (Fibroblasten) werden sichtbar.

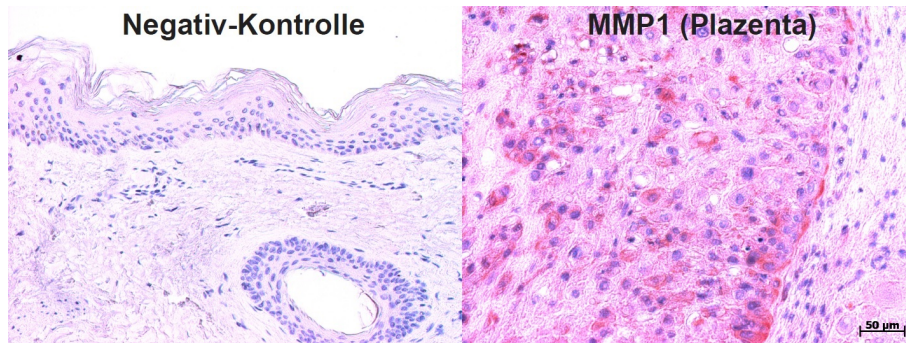


Abbildung 5.53.: Links: Negativ-Kontrolle, die ohne Zugabe vom MMP-1 Antikörper gefärbt wurde. Rechts: MMP-1 positiv gefärbte Plazenta.

In Abbildung 5.54 sind die gefärbten histologischen Schnitte der Hautproben vor und nach der Bestrahlung mit 0,2 Joule UVB (308 und 320 nm) und UVA (355 nm) dargestellt. Auf der linken Seite von Abbildung 5.54 befinden sich jeweils die unbestrahlten Hautproben, die nur blau gefärbte Zellen zeigen. Es kann keine MMP-1 Expression nachgewiesen werden. Vor der Bestrahlung war dementsprechend die MMP-1 Expression in dem entsprechenden Hautstück nicht erhöht. In Abbildung 5.54 rechts sind die gefärbten histologischen Schnitte der Hautproben nach der Bestrahlung mit 0,2 Joule dargestellt. Die schwarzen Pfeile in den Abbildungen deuten auf rosa-rot gefärbte Areale hin, die eine erhöhte MMP-1 Expression anzeigen. Nach einer Bestrahlung mit 0,2 Joule bei 308 nm lässt sich nur in der Dermis eine erhöhte MMP-1 Expression feststellen. In der Epidermis können keine rosa-roten Areale identifiziert werden. UVB Strahlung wird fast komplett in der Epidermis absorbiert und erreicht damit die Fibroblasten in der Dermis nicht [WJJ05]. Doch die MMP-1 Freisetzung in der Dermis bei Bestrahlung mit 308 nm könnte durch indirekte Effekte, bei denen UVB Bestrahlung von epidermalen Keratinozyten zu MMP-1 Freisetzung in dermalen Fibroblasten führt, erklärt werden [XYZG06]. Für eine UVB Dosis von 0,2 Joule bei 320 nm können sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis mehrere rosa-rot gefärbte Areale sichtbar gemacht werden. 320 nm liegt genau an der Grenze zwischen dem UVB und UVA Bereich und ist demnach die UVB-Strahlung, die am tiefsten in die Haut eindringen kann. Für 0,2 Joule bei 355 nm werden in der Dermis rosa-rot gefärbte Areale entdeckt, die auf eine erhöhte MMP-1 Expression hinweisen. In der Epidermis können auch rosa-rote Areale identifiziert werden, die sich allerdings mit bräunlich gefärbten Arealen überschneiden. Eine bräunliche Farbe bei immunhistologischen Färbungen nach MMP-1 deutet auf eine erhöhte Melanin Expression hin. Melanin wird in den Melanozyten der unteren Epidermis synthetisiert und an die Keratinozyten weitergeleitet [MS08].

Durch eine Bestrahlung mit 0,2 Joule, einer Energiedosis die ausreicht um $^1\text{O}_2$ Signale zu detektieren, wird die MMP-1 Expression in der Haut erhöht. Allerdings

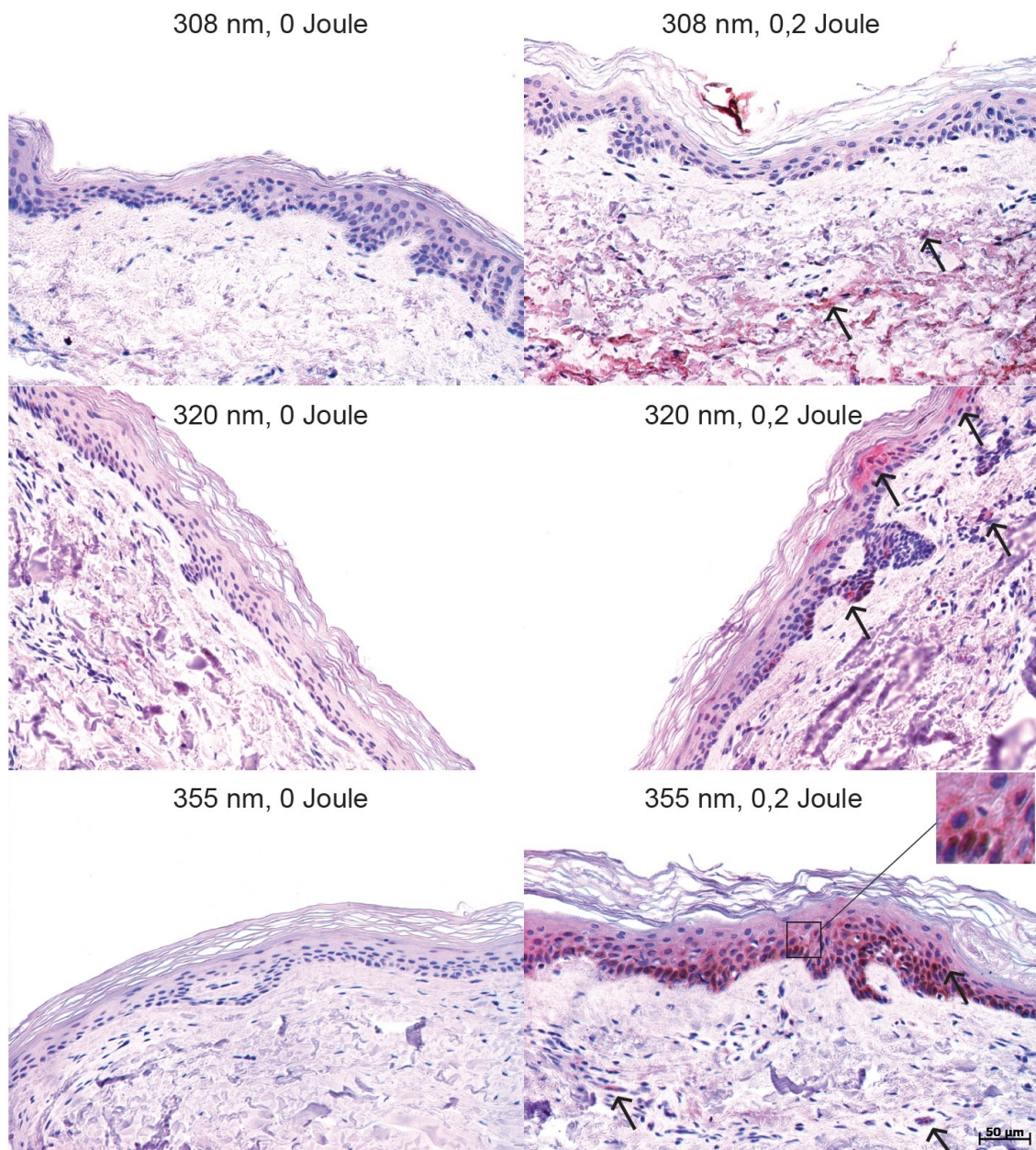


Abbildung 5.54.: Histologische Schnitte, die bei verschiedenen Wellenlängen mit 0,2 Joule bestrahlt wurden und danach immunhistologisch gefärbt worden sind. Die schwarzen Pfeile deuten auf Areale mit erhöhter MMP-1 Expression. Unten rechts wurde ein histologischer Schnitt vergrößert dargestellt, damit die bräunliche und die rosa-rote Färbung besser zu erkennen ist.

war bei diesen drei exemplarischen Messungen die MMP-1 Expression bei 308 nm nur leicht, während sich bei 320 und 355 nm die MMP-1 Expression durch viele und große rot-rosa gefärbte Hautareale deutlich gezeigt hat. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Wellenlänge der einfallenden Strahlung für die MMP-1 Expression von Bedeutung ist. Das wäre in Übereinstimmung mit *in vitro* Experimenten, die für die MMP-1 Expression unterschiedliche Signalwege bei UVA oder UVB Bestrahlung von Keratinozyten und Fibroblasten bestimmt haben [Kru01] [BSJ⁺08].

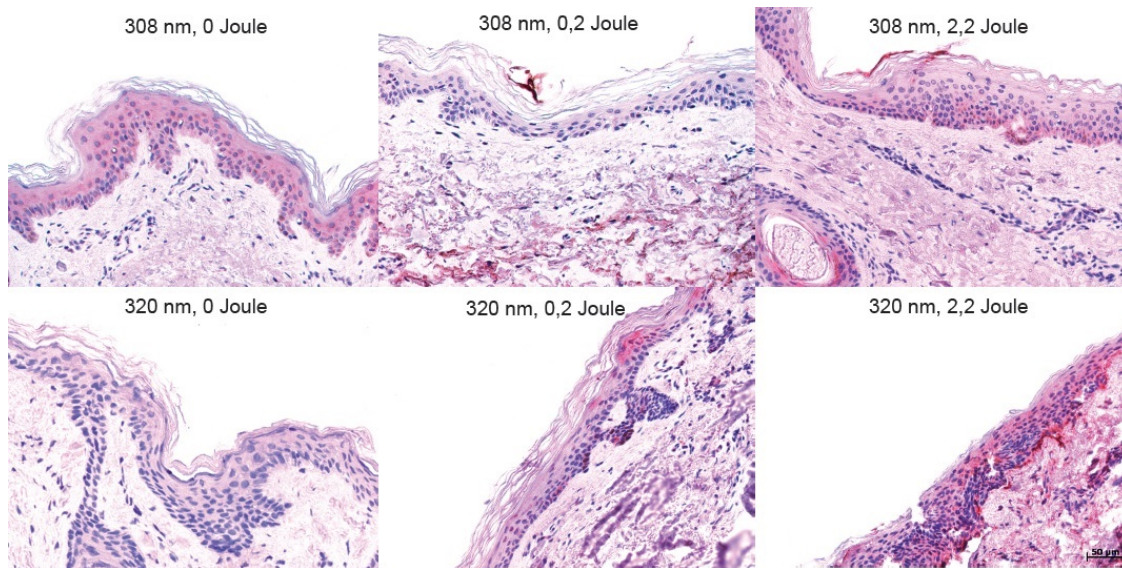


Abbildung 5.55.: Links: unbestrahlte histologische Schnitte; Mitte: histologische Schnitte, die bei 308 nm und 320 nm mit 0,2 Joule UVB bestrahlt wurden; Rechts: histologische Schnitte, die bei 308 nm und 320 nm mit 2,2 Joule UVB bestrahlt wurden

Zusätzlich ist die MMP-1 Expression bei Bestrahlung im UVB Bereich (308 und 320 nm) noch bei einer höheren Energiedosis von 2,2 Joule untersucht worden, um zu untersuchen, wie die Erhöhung der MMP-1 Expression von der eingestrahlten Energiedosis abhängt. In Abbildung 5.55 sind die eingefärbten histologischen Schnitte vor und nach einer Bestrahlung mit 2,2 Joule bei 308 und 320 nm dargestellt und zusätzlich zum Vergleich die histologischen Schnitte, die mit 0,2 Joule bei 308 und 320 nm bestrahlt wurden aus Abbildung 5.54. Die unbestrahlten histologischen Schnitte sind in Abbildung 5.55 links abgebildet und zeigen keine MMP-1 positiven Areale. Allerdings hat der histologische Schnitt des Hautstückes, das mit 308 nm bestrahlt wird (Abbildung 5.55 links oben), eine rotbräunlich gefärbte Epidermis. Diese Verfärbung wird vermutlich durch Melanin in der Epidermis verursacht, das sich bei der immunhistologischen Färbung bräunlich verfärbt. In Abbildung 5.55 rechts sind die bestrahlten Hautstücke dargestellt. Für eine Bestrahlung mit 2,2 Joule bei 320 nm ist erkennbar, dass sich viele Areale in der Dermis und Epidermis rosa-rot ge-

färbt haben durch eine erhöhte Expression an MMP-1. Wenn man die histologischen Schnitte, die mit 0,2 und 2,2 Joule UVB bei 320 nm bestrahlt wurden, vergleicht, wird deutlich, dass die rot-rosa gefärbten Areale in dem mit 2,2 Joule bestrahlten Hautstück häufiger und größer sind als in dem mit 0,2 Joule bestrahlten Hautstück. Bei einer Bestrahlung mit 2,2 Joule bei 308 nm (Abbildung 5.55 rechts oben) lässt sich durch rosa-rot gefärbte Areale auch eine Erhöhung der MMP-1 Expression feststellen. Wenn diese Abbildung mit der Abbildung von 0,2 Joule UVB bei 308 nm verglichen wird, ist erkennbar, dass bei der höheren UVB Dosis von 2,2 Joule MMP-1 positive Areale sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis zu erkennen sind, während bei 0,2 Joule nur in der Dermis MMP-1 positive Areale erkennbar sind. Bei Bestrahlung der Hautstücke mit UVB Strahlung bei 308 und 320 nm wurde MMP-1 in den durchgeführten Messungen bei Bestrahlung mit 320 nm effektiver freigesetzt (mehr positiv gefärbte Areale in den histologischen Schnitten). Dies ist in Korrelation mit der $^1\text{O}_2$ Erzeugung in Keratinozyten, wo Anregung bei 320 nm zu einer effektiveren $^1\text{O}_2$ Erzeugung führte als Anregung bei 308 nm (Kapitel 5.7).

In diesem Kapitel wird exemplarisch gezeigt, dass durch die Bestrahlung bei den Wellenlängen 308 nm, 320 nm und 355 nm *ex vivo* in Hautproben MMP-1 Expression induziert wird. Die durch die Färbung sichtbar gemachten Areale der MMP-1 Expression waren allerdings für die unterschiedlichen Wellenlängen unterschiedlich stark ausgeprägt, was ein Indiz dafür sein könnte, dass die Freisetzung von MMP-1 von der eingestahlten Wellenlänge abhängig ist.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Eine große Anzahl von Erkrankungen der Haut und des Auges können durch eine übermäßige Sonnenlicht Exposition entstehen, wobei insbesondere die im Sonnenlicht enthaltene UV Strahlung für ihre biologisch schädliche Wirkung bekannt ist. Die UV Strahlung der Sonne besteht zu 95 % aus UVA Strahlung, die die menschliche Haut bis in die tieferen Schichten der unteren Dermis durchdringen kann. Die restlichen 5 % sind aus dem UVB Bereich und können die Haut nur bis in die untere Epidermis penetrieren. Bisher wurde angenommen, dass UVB Strahlung direkt von der zellulären DNS absorbiert wird und so zur Entstehung von Photoprodukten führt. UVA Strahlung, die kaum von der DNS absorbiert wird, kann von endogenen Photosensibilisatoren absorbiert werden und so zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen. ROS, insbesondere Singulett-Sauerstoff, werden für die schädlichen biologischen Auswirkungen von UVA Strahlung verantwortlich gemacht. Photophysikalisch betrachtet ist die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch UVB Strahlung ebenfalls möglich, insbesondere da viele endogene UVA Photosensibilisatoren auch UVB Strahlung absorbieren, oft sogar in größerem Ausmaß als UVA Strahlung. Demnach könnte durch UVB generierter Singulett-Sauerstoff eine zusätzliche Rolle bei oxydativen Schäden von Zellen und Gewebe spielen.

Die Singulett-Sauerstoff Erzeugung von endogenen Substanzen bei UV- insbesondere UVB Anregung wurde direkt durch die zeitlich und spektral aufgelöste Detektion von Singulett-Sauerstoff Lumineszenz bei 1270 nm nachgewiesen. Für die Anregung der endogenen Substanzen im UV-Bereich wurde ein im gesamten UV Bereich abstimmbarer Laser verwendet und die extrem schwache Singulett-Sauerstoff Lumineszenz wurde von einem hochempfindlichen Infrarot-Photomultiplier detektiert. Durch einen externen Sensor konnte die Sauerstoffkonzentration während der Singulett-Sauerstoff Detektion in Lösungen bestimmt werden.

In einfachen Lösungen wurden verschiedene endogene Vitamine als mögliche Photosensibilisatoren bei UVB Anregung untersucht. Ein paar der Vitamine sind bekannte UVA Photosensibilisatoren, während für die anderen noch nie untersucht wurde, ob sie Singulett-Sauerstoff erzeugen können, da sie keine UVA Strahlung absorbieren. Als Lösungsmittel wurden H_2O und D_2O für lipophobe und Ethanol für lipophile Vitamine verwendet. Die meisten untersuchten Vitamine konnten als endogene UVB

Photosensibilisatoren identifiziert werden und ihre Singulett-Sauerstoff Quantenausbeute wurde über den Vergleich mit den Referenzsubstanzen TMPyP, PNS oder PN ermittelt. Die Effektivität, mit der endogene Photosensibilisatoren Singulett-Sauerstoff erzeugen, ist sehr unterschiedlich und Quantenausbeuten zwischen 0,7 % für Vitamin D_3 und 64 % für Nicotinamidsäure konnten für UVB Anregung bestimmt werden. Die Quantenausbeuten wurden zusätzlich bei UVA Anregung gemessen, um zu überprüfen, ob die Wellenlänge der Anregungsstrahlung einen Einfluss auf die Effektivität der Singulett-Sauerstoff Erzeugung hat. Bei den untersuchten Substanzen und Wellenlängen konnte kein Einfluss auf die Singulett-Sauerstoff Quantenausbeute entdeckt werden. Allerdings wurden unterschiedliche Singulett-Sauerstoff Quantenausbeuten für verschiedene Lösungsmittel und verschiedene pH-Werte des Lösungsmittel gemessen. Die Umgebung des endogenen Photosensibilisators, der durch das Lösungsmittel und dessen pH-Wert festgelegt ist, spielt also eine wichtige Rolle für die Effektivität der Singulett-Sauerstoff Erzeugung. Daher kann ein Vitamin, das sich in einer Hautzelle befindet, eine andere Singulett-Sauerstoff Quantenausbeute haben, wie dasselbe Vitamin in Lösung. Außerdem können Vitamine noch topisch auf die Haut aufgetragen werden, wenn sie sich z.B. in Hautpflegeprodukten befinden und dort wieder aufgrund ihrer Umgebung mit einer anderen Effektivität Singulett-Sauerstoff erzeugen.

UVB Bestrahlung von endogenen Substanzen kann auch zu Veränderungen der Molekülstruktur der endogenen Substanzen führen. Die Moleküle können entweder direkt durch die Absorption der Strahlung verändert werden oder durch Reaktionen mit anderen Molekülen wie z.B. Sauerstoff. Die Photostabilität von allen identifizierten endogenen UVB Photosensibilisatoren bei UVB Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen wurde untersucht. Nach der Bestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB, das einer durchschnittlichen UVB Tagesdosis in Potsdam entspricht, veränderte sich für einige Vitamine z.B. FMN das Absorptionsspektrum im gesamten UV Bereich nicht und diese Moleküle wurden als photostabil für diese UVB Dosis eingestuft. Die meisten Vitamine sind jedoch nicht photostabil bei dieser UVB Dosis und ihre Absorption im UV Bereich hat sich durch die UVB Bestrahlung verändert. Die durch UVB Strahlung veränderten Moleküle können von den ursprünglichen Molekülen verschiedene photochemische und photophysikalische Eigenschaften besitzen. Darum wurde für verschiedene nicht-photostabile Vitamine die Singulett-Sauerstoff Quantenausbeute nach einer Vorbestrahlung mit $1 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ UVB ermittelt. Diese Quantenausbeuten unterschieden sich von den ursprünglichen Singulett-Sauerstoff Quantenausbeuten und die durch UVB Bestrahlung entstandenen veränderten Moleküle können entweder mehr oder weniger effektiv Singulett-Sauerstoff generieren. Außerdem konnte für einige durch UVB Bestrahlung geänderte Moleküle eine Singulett-Sauerstoff Erzeugung für eine Anregung in einem neuen Spektralbereich, bei dem die Moleküle vor der Bestrahlung nicht absorbierten, entdeckt werden. Die bei *in vitro* Experimenten entdeckte Wechselwirkung von UVA und UVB Strahlung (molecular crosstalk)

könnte z.B. auch durch Bestrahlung veränderte Moleküle in den Zellen mit anderer Singulett-Sauerstoff Quantenausbeute und damit einem anderen biologisch schädigenden Potential bewirkt werden. Die Veränderung von Molekülen könnte auch unter paralleler Bestrahlung von UVA und UVB im Sonnenlicht eintreten und sollte bei der Interpretation der Rolle von UVA und UVB Strahlung für Hautschäden *in vivo* berücksichtigt werden.

Die wasserlöslichen Vitamine PYR-5-PH und Nicotinamidsäure sind identifizierte UVB Photosensibilisatoren mit hohen Singulett-Sauerstoff Quantenausbeuten. Um besser zu verstehen, warum diese Vitamine effektiv Singulett-Sauerstoff erzeugen können, wurden die Energien, die für die Singulett-Sauerstoff Erzeugung wichtigen angeregten Singulett- und Triplett-Zustände, bestimmt. Außerdem konnten durch die Variation der Sauerstoff-, Vitamin- und Quencherkonzentration die relevanten Raten und Ratenkonstanten für die Generierung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff in einfachen Lösungen bestimmt werden. Das fettlösliche Vitamin E ist ein bekannter Singulett-Sauerstoff Quencher, der oft als Antioxidantien eingesetzt wird. In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass Vitamin E auch effektiv Singulett-Sauerstoff mit einer Quantenausbeute von 15 % erzeugt. Darum wurden die Raten und Ratenkonstanten der Singulett-Sauerstoff Erzeugung auch für Vitamin E in einfachen Lösungen ohne Quencher bestimmt.

In Lösungen wurden außerdem verschiedene Medikamente untersucht, die sich bei systemischer Anwendung in der menschlichen Haut einlagern und zu kutaner Lichtsensibilisierung führen können. Für diese Medikamente in Lösung wurde erstmalig nachgewiesen, dass sie sowohl bei UVB als auch bei UVA Anregung Singulett-Sauerstoff generieren können mit Quantenausbeuten zwischen 1 und 12 %. Damit können diese Substanzen ebenfalls zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff in der Haut unter UV Bestrahlung beitragen.

Da für viele reguläre Bestandteile von Hautpflegeprodukten wie Vitamine oder Fettsäuren nachgewiesen wurde, dass sie Singulett-Sauerstoff generieren können, wurden außerdem verschiedene Hautpflegeprodukte selbst untersucht. Für acht verschiedene Hautpflegeprodukte konnte sowohl bei UVB als auch bei UVA Anregung Singulett-Sauerstoff Generierung nachgewiesen werden. Die vier Hautpflegeprodukte, die am effektivsten Singulett-Sauerstoff erzeugten, wurden außerdem durch Protonen-NMR und GCMS-Analyse untersucht. Verschiedene Bestandteile, die potentiell Singulett-Sauerstoff erzeugen können, wie Cholesterol Derivate, Ölsäuredecylester und Lanosterol, wurden identifiziert.

Die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff in menschlichem Gewebe ist viel komplexer als die Singulett-Sauerstoff Erzeugung in Lösungen und die Kinetik des erzeugten Singulett-Sauerstoffs hängt vom Ort der Erzeugung ab. Um die Generierung von

Singulett-Sauerstoff in Zell-Suspensionen bei UVB Anregung zu verstehen, wurden als Zwischenschritt Proteinlysate Suspensionen untersucht. Durch die zeitlich und spektral aufgelöste Detektion von Singulett-Sauerstoff Lumineszenz in Proteinlysate Suspensionen mit und ohne den Quencher Natriumazid konnte nachgewiesen werden, dass Singulett-Sauerstoff durch UVB Anregung von Proteinlysate Suspensionen entstehen kann. Durch UVB Bestrahlung von Proteinlysate Suspensionen wird nicht nur Singulett-Sauerstoff erzeugt, sondern die Moleküle in der Suspension können durch die UVB Bestrahlung verändert werden, was durch ein verändertes Absorptionsspektrum nach einer UVB Bestrahlung mit $6 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ nachgewiesen werden konnte.

Für die Untersuchung von Zell-Suspensionen wurden sowohl eukaryotische Zellen (Keratinocyten) als auch prokaryotische Zellen (*E. Coli* und *S. Aureus*) verwendet. Die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff in Zellen bei UVB Anregung ohne zusätzlichen Photosensibilisator konnte durch die zeitlich und spektral aufgelöste Detektion von Singulett-Sauerstoff Lumineszenz in den Zell-Suspensionen mit und ohne den Quencher Natriumazid nachgewiesen werden.

Abschließend wurde die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch UVB Anregung in der Haut belegt. Dazu wurden zunächst Schweinehautpräparate und danach Präparate von menschlicher Haut untersucht. Die Präparate wurden in den bestehenden Messaufbau integriert und die bei UVB Anregung entstehende Singulett-Sauerstoff Lumineszenz konnte zeitlich und spektral aufgelöst detektiert werden. Zusätzlich wurden menschliche Hautpräparate mit unterschiedlichen UV-Dosen im UVB Bereich (308 und 320 nm) und im UVA Bereich (355 nm) bestrahlt, Hautproben wurden vor und nach der Bestrahlung entnommen und immunhistologisch gefärbt, um die Freisetzung von dem Enzym Matrix-Metalloprotease-1 (MMP-1) durch die Bestrahlung abschätzen zu können. Hautzellen reagieren auf UV Strahlung mit der Freisetzung von MMP-1, das zur Zerstörung von Kollagen in der Dermis führt und so Hautalterung induzieren kann. Mit Hilfe der immunhistologisch gefärbten Hautpräparate konnte gezeigt werden, dass bei einer Bestrahlung mit 0,2 Joule sowohl im UVA als auch im UVB Bereich MMP-1 freigesetzt wurde.

Durch die vorliegenden Ergebnisse wurde erstmals klar gezeigt, dass sowohl körpereigene Substanzen als auch Substanzen, die im Rahmen der Hautpflege oder der medizinischen Therapie der Haut zugefügt werden, unter UVB Bestrahlung Singulett-Sauerstoff erzeugen können. Dieser erzeugte Singulett-Sauerstoff scheint die gleichen zellbiologischen Effekte, die schon von UVA bekannt sind, hervorzurufen, was exemplarisch durch die Aktivierung von MMP-1 gezeigt werden konnte. Damit ist die bisherige strikte Trennung der Wirkung von UVA und UVB Strahlung auf die Haut nicht mehr haltbar.

Tabellenverzeichnis

3.1.	Übersicht über die wichtigsten Unterschiede zwischen Prokaryoten und Eukaryoten	16
3.2.	Der Sauerstoffpartialdruck in verschiedenen Geweben	25
4.1.	Übersicht über die untersuchten wasserlöslichen Vitamine	47
4.2.	Übersicht über die untersuchten fettlöslichen Vitamine	50
4.3.	Übersicht über die untersuchten Medikamente	52
4.4.	Übersicht über die untersuchten Hautpflegeprodukte	55
4.5.	Übersicht über die verschiedenen, verwendeten Lösungsmittel	57
4.6.	Übersicht über die verwendeten Interferenzfilter [Reg10]	65
5.1.	Absorption der wasserlöslichen Vitamine bei 308 nm	78
5.2.	Die gefittete 1O_2 Abklingdauer τ in Vitaminlösungen in H_2O und D_2O .	86
5.3.	1O_2 Quantenausbeuten Φ_Δ der wasserlöslichen Vitamine bei einer Anregungswellenlänge von 308, 330 und 370 nm in H_2O	88
5.4.	1O_2 Quantenausbeuten Φ_Δ der wasserlöslichen Vitamine bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm in D_2O	90
5.5.	1O_2 Quantenausbeuten Φ_Δ von in PBS gelöstem PYR-5-PH bei verschiedenen pH-Werten bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm	91
5.6.	Veränderungen der Absorption der wasserlöslichen Vitamine nach Bestrahlung mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB. Ein Anstieg der Absorption $\geq 2 \%$ ist in rot und ein Abfall in blau markiert.	94
5.7.	Veränderungen der Absorption der wasserlöslichen Vitamine nach Bestrahlung mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB im gesamten UVB bzw. im gesamten UVA Bereich in %.	95
5.8.	Die ermittelten Quantenausbeuten Φ_Δ der Vitamine der B_6 -Gruppe bei einer Anregung von 308 nm vor und nach der breitbandigen Bestrahlung mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB	100
5.9.	Die ermittelten Quantenausbeuten Φ_Δ von Nicotinsäure und Nicotinamidsäure bei einer Anregung von 355 nm nach der Bestrahlung $13 J \cdot cm^{-2}$ breitbandigem UVB	103
5.10.	Die ermittelten Energien vom ersten angeregten Singulett- und Triplett-Zustand von PYR-5-PH und die dazugehörigen Wellenlängen	106
5.11.	Die ermittelten Raten und Ratenkonstanten von PYR-5-PH in H_2O . .	111

5.12. Die ermittelten Raten und Ratenkonstanten von PYR-5-PH in D_2O . .	113
5.13. Die ermittelten Energien vom ersten angeregten Singulett- und Triplett-Zustand von Nicotinsäure und Nicotinamidsäure und die dazugehörigen Wellenlängen	115
5.14. Die ermittelten Raten und Ratenkonstanten von Nicotinamid in D_2O . .	118
5.15. Die Absorption der verschiedenen fettlöslichen Vitamine in Ethanol bei 308 und 355 nm in %	120
5.16. Die gefittete 1O_2 Abklingdauer τ in Lösungen aus fettlöslichen Vitaminen in Ethanol	121
5.17. Die Quantenausbeute Φ_Δ der verschiedenen fettlöslichen Vitamine bei 308 und 355 nm	125
5.18. Veränderungen der Absorption der fettlöslichen Vitamine nach Bestrahlung mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB. Ein Anstieg der Absorption ≥ 2 % ist in rot und ein Abfall in blau markiert.	128
5.19. Veränderungen der Absorption fettlöslicher Vitamine nach Bestrahlung mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB im gesamten UVB bzw. im gesamten UVA Bereich in %.	129
5.20. Die ermittelten Quantenausbeuten Φ_Δ von Vitamin E und K_1 bei 308 und 355 nm und die Quantenausbeuten Φ_Δ von mit $1 J \cdot cm^{-2}$ breitbandigem UVB vorbestrahlten Vitamin E und K_1 bei 308 und 355 nm . . .	133
5.21. Die ermittelten Raten und Ratenkonstanten von Vitamin E in Ethanol .	135
5.22. Die Absorption der verschiedenen Medikamente bei 308 und 330 nm in %	137
5.23. Die 1O_2 Quantenausbeuten der verschiedenen Medikamente bei 308 und 330 nm in luftgesättigtem D_2O	142
5.24. Veränderungen der Absorption der Medikamente nach Bestrahlung mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB. Ein Anstieg der Absorption ≥ 2 % ist in rot und ein Abfall in blau markiert.	145
5.25. Vergleich der zeitaufgelösten Singulett-Sauerstoff Signale (Fehler von 10 %) bei Anregung von verschiedenen Cremes bei 308 nm	153
5.26. Vergleich der zeitaufgelösten Singulett-Sauerstoff Signale (Fehler von 10 %) bei Anregung von verschiedenen Cremes bei 355 nm	154
5.27. Abschwächung von Strahlung durch Proteinlysate und Zelllysate bei verschiedenen Wellenlängen	162
5.28. Veränderungen der Abschwächung von Strahlung durch Proteinlysate und Zelllysate nach Bestrahlung mit 1 und $13 J \cdot cm^{-2}$ UVB. Ein Anstieg der Abschwächung ≥ 2 % ist in rot und ein Abfall in blau markiert.	167

Abbildungsverzeichnis

2.1.	Einteilung der UV Schäden in direkte UVB und indirekte UVA Schäden	8
3.1.	Verschiedene Eindringtiefe von UVA und UVB-Strahlung in die Haut . .	12
3.2.	Schematische Darstellung von UV Strahlung, die auf Gewebe trifft und in Gewebe eindringt	13
3.3.	Der Absorptionskoeffizient μ_a (A), Streukoeffizient μ_s (B) und Anisotropiefaktor g (C) bestimmt mittels Streulichtmessung und inverser Monte-Carlo Simulation [RBSM99]	14
3.4.	A: Schematische Darstellung einer eukaryotischen Zelle vom Tier, wobei die Organellen nicht im richtigen Maßstab dargestellt sind [Kar05], B: die schematische Darstellung der Plasmamembran von eukaryotischen Zellen [Kar05]	17
3.5.	Schematischer Aufbau eines Bakteriums	18
3.6.	Die Abbildung zeigt den Aufbau der Haut (links) und speziell den Aufbau der Epidermis (rechts) [Wit07]	20
3.7.	Schematische Darstellung der Epidermis mit den Veränderungen der Lipid Strukturen während der epidermalen Differenzierung	22
3.8.	Epidermis eines Hausschweins (Deutsches Edelschwein) [Mey96]	23
3.9.	Der Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks, gemessen mit reduzierter atmosphärischer Sauerstoffzufuhr und erhöhter Sauerstoffversorgung durch das Blut [SSA ⁺ 02]. Auf der x-Achse ist die Tiefe z der Haut in μm aufgetragen, wobei 0 die Hautoberfläche ist.	24
3.10.	Schematische Darstellung der Atom- und Molekülorbitale von Sauerstoff [Reg10]	27
3.11.	Die Energiezustände von Sauerstoff-Atom im Grundzustand und in den ersten beiden angeregten Zuständen mit den dazugehörigen Anregungsenergien	28
3.12.	Schematische Darstellung der Singulett-Sauerstoff Erzeugung	29
3.13.	In (A) ist der Energietransfer bei Försterprozess dargestellt und in (B) der Elektronenaustausch bei Dexter-Prozess	30
3.14.	Schematisches Energieniveaudiagramm zur Erzeugung von $^1\text{O}_2$ durch Energietransfer vom T_1 -Zustand des Photosensibilisators mit allen vorhandenen Raten und Ratenkonstanten [Bai05]	34

4.1.	molekulare Struktur der Referenz-Photosensitizer	42
4.2.	molekulare Struktur der untersuchten Flavine	43
4.3.	molekulare Struktur von Niacin und ihrer biologisch wirksamen Formen NAD und NADP	44
4.4.	molekulare Struktur der verschiedenen untersuchten Vitamine aus der B ₆ -Gruppe	46
4.5.	Struktur der verschiedenen fettlöslichen Vitamine	49
4.6.	Struktur der verschiedenen untersuchten Medikamente	54
4.7.	Messaufbau mit dem XeCl-Excimerlaser	64
4.8.	Messaufbau mit dem abstimmbaren Lasersystem	66
4.9.	Ein Lumineszenzsignal von TMPyP in Wasser	68
4.10.	schematischer Messaufbau zur ¹ O ₂ Lumineszenz Messung	69
4.11.	Der schematische Aufbau des Fluorimeters	73
4.12.	In (A) ist schematisch die Detektion einer laserinduzierten Druckwelle dargestellt und in (B) ein auf dem Oszilloskop betrachtetes optoakusti- sches Signal von BBBN	74
5.1.	Absorptionsspektren der untersuchten wasserlöslichen Vitamine	77
5.2.	σ für verschiedene Konzentrationen von FAD	79
5.3.	σ für verschiedene Konzentrationen von PYR-HCL, PYRXAL-HCL und PYR-5-PH	80
5.4.	Die Veränderung der Moleküle Pyridoxin, Pyridoxal und Pyridoxal 5'phos- phat bei unterschiedlichen pH-Werten	81
5.5.	Die Absorptionsspektren von PYR bei einem pH-Wert von 2,0, 7,1 und 11,9, von PYRXAL-HCL bei einem pH-Wert von 2,4, 6,3 und 10 und von PYR-5-PH bei einem pH-Wert von 1,5, 3,4, 5,1, 7,3 und 10,5	83
5.6.	spektral aufgelöst detektierte ¹ O ₂ Signale von wasserlöslichen Vitaminen	85
5.7.	Die Bestimmung der Quantenausbeute von FAD durch den Vergleich der Steigungen von Lumineszenzenergie pro absorbierte Energie mit den Referenzsubstanzen PNS und TMPyP	88
5.8.	Die Absorptionsspektren der wasserlöslichen Vitamine nach Bestrahlung mit verschiedenen UVB Dosen	93
5.9.	Der Sauerstoffverbrauch von den Vitaminen der B ₆ Gruppe bei Bestrah- lung mit 308 nm für 20 Minuten	97
5.10.	Spektral aufgelöste ¹ O ₂ Signal der Vitamine der B ₆ vor (blaue Linie) und nach (rote Linie) der Bestrahlung mit 1 J · cm ⁻² UVB bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm	98
5.11.	Absorptionsspektren von Nicotinsäure (rechts) und Nicotinamidsäure (links) vor und nach der Bestrahlung mit 13 J · cm ⁻² UVB	101
5.12.	Spektral aufgelöste ¹ O ₂ Signal Nicotinsäure und Nicotinamidsäure vor (blaue Linie) und nach (rote Linie) der Bestrahlung mit 13 J · cm ⁻² UVB bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm	102

5.13.	Das Absorptionsspektrum von 10 μM PYR-5-PH in Ethanol (rote Linie) und zum Vergleich das Absorptionsspektrum von 10 μM PYR-5-PH in PBS mit einem pH-Wert von 5 (gestrichelte rote Linie)	104
5.14.	A: die detektierten Fluoreszenz und Phosphoreszenz Photonen bei Anregung von 10 μM PYR-5-PH in Ethanol bei 315 nm in einem Wellenlängenbereich von 335 bis 600 nm bei Zimmertemperatur (blaue Linie) und 77 Kelvin (rote Linie); B: das detektierte Emissionsspektrum bei Anregung von 10 μM PYR-5-PH in PBS (pH 5) bei 320 nm in einem Wellenlängenbereich von 340 bis 600 nm bei Zimmertemperatur	105
5.15.	A: Die Amplituden des LIOAS Signal für verschiedene eingestrahlte Laserenergien für PYR-5-PH in PBS (pH=5) mit einer Absorption von 0,27. B: Die aus den Amplituden pro Energie Graphen ermittelten Steigungen aufgetragen gegen die Absorption für PYR-5-PH und die Referenz BBN	108
5.16.	Die ermittelten Abklingzeiten der Lumineszenzsignale von PYR-5-PH bei einer Variation der Sauerstoffkonzentration bei 0,1 mM PYR-5-PH (A,B), bei einer Variation der PYR-5-PH Konzentration bei 30 % (C) und 100 % (D) Sauerstoffsättigung und bei einer Variation der Quencherkonzentration bei 30 % (E) und 100 % (F) Sauerstoffsättigung in Wasser sind dargestellt	110
5.17.	Die ermittelten Abklingzeiten der Lumineszenzsignale von PYR-5-PH bei einer Variation der Sauerstoffkonzentration bei 0,1 mM PYR-5-PH (A), bei einer Variation der PYR-5-PH Konzentration bei 100 % (B) Sauerstoffsättigung und bei einer Variation der Quencherkonzentration bei 100 % (C) Sauerstoffsättigung in schwerem Wasser sind dargestellt	112
5.18.	Die optische Dichte von Nicotinsäure und Nicotinamidsäure im UVB und UVA Bereich für unterschiedliche pH Werte	114
5.19.	Die Emissionsspektren von Nicotinsäure gelöst in Ethanol (B) und PBS (D) und Nicotinamidsäure gelöst in Ethanol (A) und PBS (C) in saurer und basischer Lösung	115
5.20.	Die ermittelten Abklingzeiten der Lumineszenzsignale von Nicotinamidsäure bei einer Variation der Sauerstoffkonzentration bei 25 mM Nicotinamidsäure (A), bei einer Variation der Nicotinamidsäure-Konzentration bei 25 % (B) und bei 100 % (C) Sauerstoffsättigung und bei einer Variation der Quencherkonzentration bei 25 % (D) und bei 100 % (E) Sauerstoffsättigung in D_2O sind dargestellt	117
5.21.	Die Absorptionsspektren der verschiedenen untersuchten fettlöslichen Vitamine	119
5.22.	Spektral aufgelöste 1O_2 Signale der fettlöslichen Vitamine in Ethanol	122
5.23.	Zeitaufgelöste 1O_2 Signale von Vitamin A, E und K_1	123
5.24.	Graphische Auftragung der absorbierten Energie gegen die Lumineszenzenergie von Vitamin E und den Referenz-Substanzen PN und TMPyP	124

5.25. Die Absorptionsspektren der fettlöslichen Vitamine nach UVB Bestrahlung zwischen 0 und $6,62 J \cdot cm^{-2}$ in einen Spektralbereich von 200 bis 600 nm	127
5.26. Der Sauerstoffverbrauch von Vitamin E und Vitamin K_1 bei der Bestrahlung mit 308 nm, 100 % Sauerstoffsättigung entsprechen $1850 \mu M$ Sauerstoff in Ethanol	130
5.27. Spektral aufgelöste 1O_2 Signal vor (blaue Linie) und nach (rote Linie) der Bestrahlung mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm	131
5.28. Spektral aufgelöste 1O_2 Signal vor (blaue Linie) und nach (rote Linie) der Bestrahlung mit $1 J \cdot cm^{-2}$ UVB bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm	132
5.29. Die ermittelten Abklingzeiten der Lumineszenzsignale von Vitamin E bei einer Variation der Sauerstoffkonzentration bei 0,25 mM Vitamin E (A) und bei einer Variation der Vitamin E Konzentration bei 7 % Sauerstoff (B und C) in Ethanol sind dargestellt	135
5.30. Absorptionsspektren der verschiedenen untersuchten Medikamente	137
5.31. σ der untersuchten Medikamente für Konzentrationen zwischen 5 und $100 \mu M$	139
5.32. Spektral aufgelöst detektierte Lumineszenzsignale der untersuchten Medikamente	140
5.33. Zeitlich aufgelöste Lumineszenzsignale der untersuchten Medikamente . .	141
5.34. Absorptionsspektren der untersuchten Medikamente nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB Dosen	144
5.35. A, B, C: Spektral aufgelöst detektierte Lumineszenz Signale von TMPyP Lösungen (H_2O) mit Streukörpern (Siliziumdioxid). D: Das Signal von Siliziumdioxid alleine. E, F: Die spektral aufgelöst detektierten Signale von reinem H_2O mit Siliziumdioxid. Zum Vergleich ist die Skala der Photonencounts normiert auf den Maximalwert	148
5.36. Zeitlich aufgelöste Lumineszenz Signale von TMPyP Lösungen mit Streukörpern	149
5.37. Spektral aufgelöste 1O_2 Signale von den verschiedenen untersuchten Hautpflegeprodukten	151
5.38. Zeitaufgelöste 1O_2 Signale der untersuchten Cremes 4, 10, 11 und 12 . .	152
5.39. Protonen-NMR von Creme 10 (A) und 11 (B)	155
5.40. Protonen-NMR von Creme 4 (A) und 12 (B)	156
5.41. Das GC-Spektrum von Creme 10 (A) und Creme 11 (B)	158
5.42. Das GC-Spektrum von Creme 4 (A) und Creme 12 (B)	158
5.43. In den Cremes per GCMS-Analyse und Datenbankvergleich der Fraktionierungsmuster identifizierte Substanzen	159
5.44. A: Die Abschwächung von Strahlung durch Proteinlysate und Zelllysate in H_2O , B: Absorption von Proteinen [Har80]	161

5.45.	Die 1O_2 Lumineszenz Signale von Proteinlysate und Zelllysate in D_2O gelöst bei Anregungswellenlängen von 290 nm, 300 nm und 308 nm spektral aufgelöst detektiert und mit einer Lorenzkurve gefittet (blaue Linie). Außerdem das 1O_2 Signal einer gleich konzentrierten Proteinlysate bzw. Zelllysate Suspension in D_2O mit zusätzlich 20 mM Natriumazid bei den gleichen Anregungswellenlängen spektral aufgelöst detektiert (rote Linie).	163
5.46.	Zeitaufgelöstes 1O_2 Signal von Proteinlysate und Zelllysate Suspension in H_2O und D_2O bei einer Anregungswellenlänge von 290 nm	165
5.47.	Abschwächung von Strahlung durch Proteinlysate und Zelllysate nach der Bestrahlung mit verschiedenen UVB Dosen	167
5.48.	Sauerstoffverbrauch von Proteinlysate und Zelllysate bei UVB Bestrahlung bei 308 nm für 45 Minuten	168
5.49.	Spektral aufgelöst detektierte 1O_2 Signale von Bakteriensuspensionen in D_2O mit (rote Linie) und ohne (blaue Linie) Quencher (40 mM NaN_3) bei Anregungswellenlängen von 308, 320 und 355 nm	171
5.50.	Spektral aufgelöst detektierte 1O_2 Signale von Keratinozyten-Suspensionen (12 Millionen Zellen pro ml) mit (rot) und ohne (blau) 50 mM NaN_3 bei 308 nm (links) und 320 nm (rechts)	173
5.51.	In (a) und (b) sind die spektral aufgelöst detektierten 1O_2 Lumineszenz Signale für eine Anregung mit 308 und 355 nm dargestellt. In (c) und (d) sind dieselben Lumineszenz Signale für eine Anregung mit 308 und 355 nm dargestellt (blaue Linie) und die spektral aufgelöst detektierten 1O_2 Lumineszenz Signale der in NaN_3 eingelegten Schweinehautstückchen für dieselbe Anregung (rote Linie).	176
5.52.	Die Singulett-Sauerstoff Signale von menschlicher Epidermis zeitlich (unten) und spektral aufgelöst (oben) detektiert für Anregungswellenlängen von 308 nm (links) und 320 nm (rechts).	178
5.53.	Links: Negativ-Kontrolle, die ohne Zugabe vom MMP-1 Antikörper gefärbt wurde. Rechts: MMP-1 positiv gefärbte Plazenta.	181
5.54.	Histologische Schnitte, die bei verschiedenen Wellenlängen mit 0,2 Joule bestrahlt wurden und danach immunhistologisch gefärbt worden sind. Die schwarzen Pfeile deuten auf Areale mit erhöhter MMP-1 Expression. Unten rechts wurde ein histologischer Schnitt vergrößert dargestellt, damit die bräunliche und die rosa-rote Färbung besser zu erkennen ist. .	182
5.55.	Links: unbestrahlte histologische Schnitte; Mitte: histologische Schnitte, die bei 308 nm und 320 nm mit 0,2 Joule UVB bestrahlt wurden; Rechts: histologische Schnitte, die bei 308 nm und 320 nm mit 2,2 Joule UVB bestrahlt wurden	183

Literaturverzeichnis

- [Ack01] ACKERMANN, Günther: *Photophysikalische Grundlagen zur Fluoreszenzdiagnostik von Tumoren der Haut*, Universität Regensburg, Diss., 2001
- [AP98] ANDERSON, R. R. ; PARRISH, J. A.: The optics of human skin. In: *J Invest Dermatol* (1998), Nr. 1, S. 13 - 19
- [ASB83] ARUDI, R. L. ; SUTHERLAND, M. W. ; BIELSKI, B. H. J.: Purifikation of oleic acid and linoleic acid. In: *J Lipid Research* (1983), Nr. 24, S. 485 - 488
- [Atk94] ATKINS, P. W.: *Physical Chemistry*. Oxford University Press Oxford Melbourne Tokyo, 1994
- [Bai05] BAIER, Jürgen: *Lumineszenz-Untersuchung zur Generierung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff in zellulärer Umgebung*, Universität Regensburg, Diss., 2005
- [BESLL87] BAUMGÄRTL, H. ; EHRLY, A. ; SAEGER-LORENZ, K. ; LÜBBERS, D.: *Clinical Oxygen Pressure Measurement*. Springer-Verlag Berlin, 1987
- [BFP⁺07] BAIER, J. ; FUSS, T. ; POLLMANN, C. ; WIESMANN, C. ; PINDL, K. ; ENGL, R. ; BAUMER, D. ; MAIER, M. ; LANDTHALER, M. ; BÄUMLER, W.: Theoretical and experimental analysis of the luminescence signal of singlet oxygen for different photosensitizers. In: *J Photochem Photobiol B* (2007), Nr. 87, S. 163 - 173
- [BfS07] BFS: *UV-Fibel Geprüftes Sonnenstudio Zertifikierungskriterien des Bundesamt für Strahlenschutz*. website, 2007. – <http://doris.bfs.de/jspui/handle/urn:nbn:de:0221-201012164217>
- [BfS11] BFS: *Infolyer des UV-Bündnisses: Sonne aber sicher*. website, 2011. – <http://www.bfs.de>

- [BH92] BRASLAVSKY, S. E. ; HEIBEL, G. E.: Time-resolved photothermal and photoacoustic methods applied to photoinduced processes in solution. In: *Chem. Rev.* (1992), Nr. 92, S. 1381 - 1410
- [BH03] BRENNER, M. ; HEARING, V. J.: The protective role of melanin against UV damage in human skin. In: *Photochem Photobiol* (2003), Nr. 3, S. 539 - 549
- [BK62] BISHOP, D. H. ; KING, H. K.: Ubiquinone and vitamin K in bacteria. 2. Intracellular distribution in *Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*. In: *Biochem J* (1962), Nr. 85, S. 550 - 554
- [BK00] BERNEBURG, M. ; KRUTMANN, J.: Photoimmunology, DNA repair and photocarcinogenesis. In: *J Photochem Photobiol B* (2000), Nr. 54, S. 87 - 93
- [BKH00] BECKER, W. M. ; KLEINSMITH, L. J. ; HARDIN, J.: *The World of the Cell*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, 2000
- [BLE⁺00] BILSKI, P. ; LI, M. Y. ; EHRENSHAFT, M. ; DAUB, M. E. ; CHIGNELL, C. F.: Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. In: *Photochem Photobiol* (2000), Nr. 2, S. 129 - 134
- [BME⁺00] BAUMLER, D. ; MAIER, M. ; ENGL, R. ; SZEIMIES, R. M. ; BÄUMLER, W.: Singlet oxygen generation by 9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis (beta-methoxyethyl)-porphycene (ATMPn) in solution. In: *Chem Phys* (2000), Nr. 285, S. 309 - 318
- [BML⁺07] BAIER, J. ; MAISCH, T. ; LOIBL, M. ; VASOLD, R. ; BÄUMLER, W.: Time dependence of singlet oxygen luminescence provides an indication of oxygen concentration during oxygen consumption. In: *J. Biomed. Opt.* (2007), Nr. 12
- [BMM⁺06] BAIER, J. ; MAISCH, T. ; MAIER, M. ; ENGEL, E. ; LANDTHALER, M. ; BÄUMLER, W.: Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers. In: *Biophys J* (2006), Nr. 4, S. 1452 - 1459
- [BMM⁺07] BAIER, J. ; MAISCH, T. ; MAIER, M. ; LANDTHALER, M. ; BAUMLER, W.: Direct detection of singlet oxygen generated by UVA irradiation

- in human cells and skin. In: *J Invest Dermatol* (2007), Nr. 127, S. 1498 - 1506
- [Bon08] BONZEL, Eugen Alexander M.: *Hautphysiologie im Neugeborenenalter: Die Barrierefunktion der Haut von Frühgeborenen in den ersten sieben Lebenswochen*, Charité - Universität Berlin, Diss., 2008
- [Bor85] BORK, K.: *Kutane Arzneimittelnebenwirkungen*. SCHATTAUER Stuttgart, 1985
- [BPMK⁺04] BERNEBURG, M. ; PLETTENBERG, H. ; MEDVE-KONIG, K. ; PFAHLBERG, A. ; GERS-BARLAG, O. H. G. H. Gefeller ; KRUTMANN, J.: Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in normal skin. In: *J Invest Dermatol* (2004), Nr. 5, S. 1277 - 1283
- [BRK⁺11] BÄUMLER, W. ; REGENSBURGER, J. ; KNAK, A. ; FELGENTRAGER, A. ; MAISCH, T.: UVA and endogenous photosensitizers - the detection of singlet oxygen by its luminescence. In: *Photochem Photobiol Sci* (2011), Nr. 11, S. 107 - 117
- [BSJ⁺08] BUECHNER, N. ; SCHROEDER, P. ; JAKOB, S. ; KUNZE, K. ; MARESCH, T. ; CALLES, C. ; KRUTMANN, J. ; HAENDELER, J.: Changes of MMP-1 and collagen type Ialpha1 by UVA, UVB and IRA are differentially regulated by Trx-1. In: *Exp Gerontol* (2008), Nr. 43, S. 633 - 637
- [BSSK02] BRENNEISEN, P. ; SIES, H. ; SCHARFFETTER-KOCHANKE, K.: Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. In: *Ann N Y Acad Sci* (2002), Nr. 973, S. 31 - 43
- [Bus03] BUSELMAIER, W.: *Biologie für Mediziner*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2003
- [CJ05] CHRISTEN, Phillipp ; JAUSSE, Rolf: *Biochemie: Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005
- [CKS92] CZARNETZKI, B. ; KERL, H. ; STERR, W.: *Dermatologie und Venereologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992
- [CMW⁺] CHOI, W. ; MIYAMURA, Y. ; WOLBER, R. ; SMUDA, C. ; REINHOLD,

- W. ; LIU, H. ; KOLBE, L. ; HEARING, V. J.: Regulation of human skin pigmentation in situ by repetitive UV exposure: molecular characterization of responses to UVA and/or UVB. In: *J Invest Dermatol* , Nr. 130, S. 1685 - 1696
- [Dam] DAMIAN, D. L.: Photoprotective effects on nicotinamide. In: *Photochem Photobiol* , Nr. 4, S. 578 - 585
- [DBBG⁺11] DADVAND, P. ; BASAGANA, X. ; BARRERA-GOMEZ, J. ; DIFFEY, B. ; NIEUWENHUIJSEN, M.: Measurement errors in the assessment of exposure to solar ultraviolet radiation and its impact on risk estimates in epidemiological studies. In: *Photochem Photobiol* (2011), Nr. 7, S. 1161 - 1167
- [DBCP06] DAD, P. ; BISBY, R. H. ; CLARK, I. P. ; PARKER, A. W.: Formation of singlet oxygen from solutions of vitamin E. In: *Free Radic Res* (2006), Nr. 40, S. 333 - 338
- [DC02] DEROSA, M. C. ; CRUTCHLEY, R. J.: Photosensitized singlet oxygen and its applications. In: *Coordination Chemistry Review* (2002), S. 351 - 371
- [DDP⁺08] DONG, K. K. ; DAMAGHI, N. ; PICART, S. D. ; MARKOVA, N. G. ; OBAYASHI, K. ; OKANO, Y. ; MASAKI, H. ; GREETHER-BECK, S. ; KRUTMANN, J. ; SMILES, K. A. ; YAROSH, D. B.: UV-induced DNA damage initiates release of MMP-1 in human skin. In: *Exp Dermatol* (2008), Nr. 17, S. 1037 - 1044
- [DDS⁺09] DAZA, M. C. ; DOERR, M. ; SALZMANN, S. ; MARIAN, C. M. ; THIEL, W.: hotophysics of phenalenone: quantum-mechanical investigation of singlet-triplet intersystem crossing. In: *Phys Chem Chem Pys* (2009), Nr. 11, S. 1688 - 1696
- [Dem09] DEMTRÖDER, W.: *Experimentelle Physik II Elektrizität und Optik*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009
- [Dif91] DIFFEY, B. L.: Solar ultraviolet radiation effects on biological system. In: *Phys Med Biol* (1991), Nr. 3, S. 299 - 328
- [Dif02] DIFFEY, B. L.: Sources and measurement of ultraviolet radiation. In: *Academic Press* (2002), Nr. 28, S. 4 - 13

- [DK09] DAEHN, I. ; KARRAN, P.: Immune effector cells produce lethal DNA damage in cells treated with a thiopurine. In: *Cancer Res* (2009), Nr. 69, S. 2393 - 2399
- [DKK94] DZHAGAROV, B. M. ; KRUK, N. N. ; KONOVALOVA, A. A. Stepuro I. N. V. Solodunov S. N. V. Solodunov: Quantum yield of photosensitized formation of singlet oxygen by vitamins of the B6 group and their adducts. In: *Journal of Applied Spectroscopy* (1994), Nr. 61, S. 505 - 508
- [DKK95] DZHAGAROV, B. M. ; KRUK, N. N. ; KONOVALOVA, A. A. Stepuro I. N. V. Solodunov S. N. V. Solodunov: Photosensitized Formation of singlet oxygen by vitamins of the B group. In: *Journal of Applied Spectroscopy* (1995), Nr. 2, S. 285 - 289
- [DLM95] DOW, J. ; LINDSAY, G. ; MORRISON, J.: *Biochemistry Molecules, Cells and the Body*. Addison-Wesley Publishers Ltd., 1995
- [Eat98] EATON, D. F.: International Union of Pure and Applied Chemistry Organic Chemistry Division Commission on Photochemistry. Reference materials for fluorescence measurement. In: *J Photochem Photobiol B* (1998), Nr. 2, S. 523 - 531
- [Ehl07] EHLERS, A.: *Klinische Anwendungen der Multiphotonen-Tomographie humaner Haut*, Universität des Saarlandes, Diss., 2007
- [EKM+02] ENGL, R. ; KILGER, R. ; MAIER, M. ; SCHERER, K. ; ABELS, C. ; BÄUMLER, W.: Singlet Oxygen Generation by 8-Methoxypsoralen in Deuterium Oxide: Relaxation Rate Constants and Dependence of the Generation Efficacy on the Oxygen Partial Pressure. In: *J. Phys. Chem. B* (2002), Nr. 106
- [ELL+12] EGGERSDORFER, M. ; LAUDERT, D. ; LETINOIS, U. ; MCCLYMONT, T. ; MEDLOCK, J. ; NETSCHER, T. ; BONRATH, W.: One hundred years of vitamins-a success story of the natural sciences. In: *Angew Chem Int Ed Engl* (2012), Nr. 51, S. 12960 - 12990
- [EMTP+05] EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S. ; TAVAKKOL, A. ; POLEFKA, T. G. ; NABI, Z. ; ELSNER, P. ; THIELE, J. J.: Vitamin E delivery to human skin by a rinse-off product: penetration of alpha-tocopherol versus wash-out effects of skin surface lipids. In: *Skin Pharmacol Physiol* (2005), Nr. 18, S. 20 - 26

- [EMZW⁺08] EL-MAHDY, M. A. ; ZHU, Q. ; WANG, Q. E. ; WANI, G. ; PATNAIK, S. ; ZHAO, W. ; ARAFA EL, S. ; BARAKAT, B. ; MIR, S. N. ; WANI, A. A.: Naringenin protects HaCaT human keratinocytes against UVB-induced apoptosis and enhances the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from the genome. In: *Photochem Photobiol* (2008), Nr. 2, S. 307 - 316
- [Eng03] ENGL, Roland: *Die Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff in homogenen Lösungen sowie Lipid- und Zellsuspensionen*, Universität Regensburg, Diss., 2003
- [EZ11] EBRAHIM-ZADEH, M.: Optischer parametrischer Oszillator: Gepulste Laserstrahlung vom Ultraviolett bis ins Infrarot. In: *Photonik* (2011), Nr. 1
- [FBB⁺12] FITZPATRICK, T. B. ; BASSET, G. J. ; BOREL, P. ; CARRARI, F. ; DELLAPENNA, D. ; FRASER, P. D. ; HELLMANN, H. ; OSORIO, S. ; ROTHAN, C. ; VALPUESTA, V. ; CARIS-VEYRAT, C. ; FERNIE, A. R.: Vitamin deficiencies in humans: can plant science help? In: *Plant Cell* (2012), Nr. 24, S. 395 - 414
- [Fei07] FEINGOLD, K. R.: Thematic review series: skin lipids. the role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. In: *Journal of Lipid Research* (2007), Nr. 12, S. 2531 - 2546
- [Fel09] FELGENTRÄGER, Ariane: *Spektroskopische Untersuchungen zur Inaktivierung von Bakterien*, Universität Regensburg, Diplomarbeit, 2009
- [FHR⁺10] FU, J. J. ; HILLEBRAND, G. G. ; RALEIGH, P. ; LI, J. ; MARMOR, M. J. ; BERTUCCI, V. ; GRIMES, P. E. ; MANDY, S. H. ; PEREZ, M. I. ; WEINKLE, S. H. ; KACZVINSKY, J. R.: A randomized, controlled comparative study of the wrinkle reduction benefits of a cosmetic niacinamide/peptide/retinyl propionate product regimen vs. a prescription 0.02 % tretinoin product regimen. In: *Br J Dermatol* (2010), Nr. 162, S. 647 - 654
- [FJG02] FEISTER, U. ; JAKEL, E. ; GERICKE, K.: Parameterization of daily solar global ultraviolet irradiation. In: *Photochem Photobiol* (2002), Nr. 3, S. 281 - 293
- [FN01] FLORS, C. ; NONELL, S.: On the Phosphorescence of 1H-Phenalen-1-one. In: *Helvetica Chimica Acta* (2001), Nr. 84, S. 2533 - 2539

- [Fri09] FRISCH, Peter: *Dermatologie und Venerologie für das Studium*. Walter der Cruyter & Co., 2009
- [FXY⁺07] FU, P. P. ; XIA, Q. ; YIN, J. J. ; CHERNG, S.-H. ; YAN, J. ; MEI, N. ; CHEN, T. ; BOUDREAU, M. D. ; HOWARD, P. C. ; WAMER, W. G.: Photodecomposition of Vitamin A and Photobiological Implications for the Skin. In: *Photochemistry and Photobiology* (2007), Nr. 83, S. 409 - 424
- [Geh04] GEHRING, W.: Nicotinic acid/ nicotinamide and the skin. In: *J Cosmet Dermatol* (2004), Nr. 2, S. 88 - 93
- [Got86] GOTTSCHALK, G.: *Bacterial Metabolism*. Springer-Verlag, 1986
- [Gör] GÖRNER, H.: Oxygen uptake after electron transfer from amines, amino acids and ascorbic acid to triplet flavins in air-saturated aqueous solution.
- [GR08] GRUIJL, F. R. ; REBEL, H.: Early events in UV carcinogenesis–DNA damage, target cells and mutant p53 foci. In: *Photochem Photobiol* (2008), Nr. 2, S. 382 - 387
- [Gru02] GRUIJL, F. R.: Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. In: *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* (2002), Nr. 5, S. 316 - 320
- [GS] GLETTE, J. ; SANDBERG, S.: Phototoxicity of tetracyclines as related to singlet oxygen production and uptake by polymorphonuclear leukocytes.
- [Gul12] GULCIN, I.: Antioxidant activity of food constituents: an overview. In: *Arch Toxicol* (2012), Nr. 86, S. 345 - 391
- [GV03] GENSCH, T. ; VIAPPIANI, C.: Time-resolved photothermal methods: accessing time-resolved thermodynamics of photoinduced processes in chemistry and biology. In: *Photochem. Photobiol. Sci* (2003), Nr. 2, S. 699 - 721
- [Har80] HARM, W.: Biological Effects of Ultraviolet Radiation. In: *Cambridge University Press* (1980)
- [HHKW03] HANGARTER, M.-A. ; HÖRMANN, A. ; KAMDZHILOV, Y. ; WIRZ, J.: Primary photoreactions of phyloquinone (vitamin K1) and

- plastoquinone-1 in solution. In: *Photochem Photobiol Sci* (2003), Nr. 2, S. 524 - 535
- [HKM06] HUANG, R. ; KIM, H. J. ; MIN, D. B.: Photosensitizing effects of riboflavin, lumiflavin and lumichrome on the generation of volatiles in soy milk. In: *J Agric Food Chem* (2006), Nr. 6, S. 2359 - 2364
- [HS98] HANSON, K. M. ; SIMON, J. D.: Epidermal trans-urocanic acid and the UV-A-induced photoaging of the skin. In: *Proc Natl Acad Sci USA* (1998), Nr. 18, S. 10576 - 10578
- [Hus05] HUSSEIN, M. R.: Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. In: *J Cutan Pathol* (2005), Nr. 3, S. 191 - 205
- [HW06] HAKEN, Hermann ; WOLF, Hans C.: *Molekülphysik und Quantenchemie: Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen*. 5. Auflage. 2006
- [HY02] HARRISON, G. I. ; YOUNG, A. R.: Ultraviolet radiation-induced erythema in human skin. In: *Methods* (2002), Nr. 28, S. 14 - 19
- [JBRKN08] JIMENEZ-BANZO, A. ; RAGAS, X. ; KAPUSTA, P. ; NONELL, S.: Time-resolved methods in biophysics. 7. Photon counting vs. analog time-resolved singlet oxygen phosphorescence detection. In: *Photochem Photobiol Sci* (2008), Nr. 7, S. 1003 - 1010
- [JBSMN08] JIMENEZ-BANZO, A. ; SAGRISTA, M. L. ; MORA, M. ; NONELL, S.: Kinetics of singlet oxygen photosensitization in human fibroblasts. In: *Free Radic Biol Med* (2008), Nr. 11, S. 1926 - 1934
- [JCP87] JOSHI, P. C. ; CARRARO, C. ; PATHAK, M. A.: Involvement of reactive oxygen species in the oxidation of tyrosine and dopa to melanin and in skin tanning. In: *Biochem Biophys Res Commun* (1987), Nr. 1, S. 265 - 237
- [Jun98] JUNG, E. G.: *Dermatologie*. Hippokrates Verlag GmbH, 1998
- [Kar94] KARLSON, Detlef und Koolman J. Peter und Doenecke D. Peter und Doenecke: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 14. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1994

- [Kar05] KARP, G.: *Molekulare Zellbiologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005
- [Kar07] KARRAN, P.: Thiopurines, DNA damage, DNA repair and therapy-related cancer. In: *Br Med Bull* (2007), Nr. 79, S. 153 - 170
- [KBS00] KLOTZ, L. O. ; BRIVIBA, K. ; SIES, H.: Mitogen-activated protein kinase activation by singlet oxygen and ultraviolet A. In: *Method Enzymol* (2000), Nr. 319, S. 130 - 143
- [KD96] KAMAT, J. P. ; DEVASAGAYAM, T. P.: Methylene blue plus light-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes: inhibition by nicotinamide (vitamin B3) and other antioxidants. In: *Chem Biol Interact* (1996), Nr. 99, S. 1 - 16
- [KD99] KAMAT, J. P. ; DEVASAGAYAM, T. P.: Nicotinamide (vitamin B3) as an effective antioxidant against oxidative damage in rat brain mitochondria. In: *Redox Rep* (1999), Nr. 4, S. 179 - 184
- [KDMMS90] KAISER, S. ; DI MASCIO, P. ; MURPHY, M. E. ; SIES, H.: Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. In: *Arch Biochem Biophys* (1990), Nr. 277, S. 101 - 108
- [KHS01] KLOTZ, L. O. ; HOLBROOK, N. J. ; SIES, H.: UVA and singlet oxygen as inducer of cutaneous signaling events. In: *Curr Probl Dermatol* (2001), Nr. 29, S. 95 - 113
- [Kil01] KILGER, Robert: *Untersuchungen der Relaxation von Photofrin-generiertem Singulett-Sauerstoff in Lösungen und in vitro*, Universität Regensburg, Diss., 2001
- [KKS03] KLOTZ, L. O. ; KRONCKE, K. D. ; SIES, H.: Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. In: *Photochem Photobiol Sci* (2003), Nr. 2, S. 88 - 94
- [Kre10] *Früherkennungsblatt: Hautkrebs erkennen.* website, 2010. – <http://www.krebshilfe.de>
- [Kru01] KRUTMANN, J.: The Role of UVA rays in skin aging. In: *European Journal of Dermatology* (2001), Nr. 11
- [KSKL99] KRAMER-STICKLAND, K. ; KROL, E. S. ; LIEBLER, D. C.: UV-B

- induced photooxidation of Vitamin E in Mouse Skin. In: *Chem. Res. Toxicol.* (1999), Nr. 12, S. 187 - 191
- [LC57] LINBURG, R. G. ; COX, R. H.: Stigmasta- 3,5,55 Triene and distigmasteryl ether. In: *Canadian Journal of Chemistry* (1957), Nr. 35
- [Löf08] LÖFFLER, G.: *Basiswissen Biochemie mit Photobiochemie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2008
- [LKK05] LATSCH, Hans P. ; KAZMAIER, U. ; KLEIN, Helmut A.: *Chemie für Biologen*. 2. Auflage. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2005
- [Loi06] LOIBL, M.: *Messung der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in Makromolekülen*, Universität Regensburg, Diplomarbeit, 2006
- [LPB⁺06] LAMBERS, H. ; PIESSENS, S. ; BLOEM, A. ; PRONK, H. ; FINKEL, P.: Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. In: *Int J Cosmet Sci* (2006), Nr. 28, S. 359 - 370
- [Mad03] MADISON, Kathi C.: Barrier Function of the Skin: „La Raison d’Être“ of the Epidermis. In: *The Journal of Investigative Dermatology* (2003), Nr. 121, S. 231 - 241
- [ME09] MUSA, K. A. ; ERIKSSON, L. A.: Theoretical assessment of norfloxacin redox and photochemistry. In: *J Phys Chem A* (2009), Nr. 113, S. 10803 - 10810
- [MEKL75] MATHESON, I. B. ; ETHERIDGE, R. D. ; KRATOWICH, N. R. ; LEE, J.: The quenching of singlet oxygen by amino acids and proteins. In: *Photochem Photobiol* (1975), Nr. 21, S. 165 - 171
- [Mey96] MEYER, W.: Comments on the suitability of swine skin as a biological model for human skin. In: *Der Hautarzt, Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie und verwandte Gebiete* (1996), Nr. 3, S. 178 - 182
- [MH99] MIKSITS, K. ; HAHN, H.: *Basiswissen Medizinische Mikrobiologie und Infektologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1999
- [MJC⁺96] MARTI, C. ; JÜRGENS, O. ; CUENCA, O. ; CASALS, M. ; NONELL, S.: Aromatic ketones as standarts for singlet oxygen O₂ (1O₂) photosensitization Timeresolved photoacoustic and NIR emission studies. In: *Photochem Photobiol* (1996), Nr. 97, S. 11 - 18

- [MN76] MEYER, W. ; NEURAND, K.: The distribution of enzymes in the skin of domestic pig. In: *Laboratory animals* (1976), Nr. 3, S. 237 - 247
- [MNR82] MEYER, W. ; NEURAND, K. ; RADKE, B: Collagen fibre arrangement in the skin of the pig. In: *Journal of anatomy* (1982), Nr. 134, S. 139 - 148
- [Mor96] MORTIMER, C. E.: *Chemie: Das Basiswissen der Chemie*. 6. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 1996
- [MOR⁺07] MONTANER, B. ; O'DONOVAN, P. ; REELFS, O. ; PERRETT, C. M. ; ZHANG, X. ; XU, Y. Z. ; REN, X. ; MACPHERSON, P. ; FRITH, D. ; KARRAN, P.: Reactive oxygen-mediated damage to a human DNA replication and repair protein. In: *EMBO Rep* (2007), Nr. 11, S. 1074 - 1079
- [MS79] MERZ, W. G. ; SANDFORD, G. R.: Isolation and Characterization of a Polyene-Resistant Variant of *Candida tropicalis*. In: *Journal of Clinical Microbiology* (1979), Nr. 9, S. 677 - 680
- [MS08] MADDODI, N. ; SETALURI, V: Role of UV in cutaneous melanoma. In: *Photochem Photobiol* (2008), Nr. 2, S. 528 - 536
- [MSC98] MARTINEZ, L. J. ; SIK, R. H. ; CHIGNELL, C. F.: Fluoroquinolone antimicrobials: singlet oxygen, superoxide and phototoxicity. In: *Photochem Photobiol* (1998), Nr. 67, S. 399 - 403
- [MSG⁺98] MISKOSKI, S. ; SANCHEZ, E. ; GARAVANO, M. ; LOPEZ, M. ; SOLTERMANN, A. T. ; GARCIA, N. A.: Singlet molecular oxygen-mediated photo-oxidation of tetracyclines: kinetics, mechanism and microbiological implications. In: *J Photochem Photobiol B* (1998), Nr. 43, S. 164 - 171
- [MWB⁺08] MAISCH, T. ; WORLICEK, C. ; BABILAS, P. ; LANDTHALER, M ; SZEMIES, R. M.: A HCL/alcohol formulation increase 5-aminolevulinic acid skin distribution using an ex vivo full thickness porcine skin model. In: *Experimental Dermatology* (2008), Nr. 10, S. 813 - 820
- [MY64] MONTAGNA, W. ; YUN, J. S.: The Skin of the domestic pig. In: *The Journal of Investigative Dermatology* (1964), Nr. 42, S. 11 - 21
- [NGT93] NONELL, S. ; GONZALEZ, M. ; TRULL, F. R.: 1h-Phenalen-1-one-

- 2-sulfonic acid: an extremely efficient singlett-oxygen sensitizer for aqueous media. In: *Afinidad L* (1993), Nr. 448, S. 445 - 450
- [Nik13] NIKI, E.: Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. In: *Free Radic Biol Med* (2013)
- [NKS05] NABOKINA, S.M. ; KASHYAP, M. L. ; SAID, H. M.: Mechanism and regulation of human intestinal niacin uptake. In: *Am J Physiol Cell Physiol* (2005), Nr. 289, S. C97 - C103
- [NMS⁺03] NAQVI, K. R. ; MELO, T. B. ; SLIWKA, H.-R. ; MOHAMAD, S. B. B. ; PARALI, V.: Photochemical and photophysical behavior of vitamin E: interaction of its long-lived transient photoproducts with carotenoids. In: *Photochem Photobiol Sci.* (2003), Nr. 2, S. 381 - 385
- [Ogi83] OGILBY, C. S. P. R. and Foote F. P. R. and Foote: Chemistry of Singlet Oxygen Effect of Solvent, Solvent Isotopic Substitution and Temperature on the Lifetime of Singlet Molecular Oxygen. In: *J Am Chem Soc* (1983), Nr. 105, S. 342 - 343
- [Ogi10] OGILBY, P. R.: Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. In: *Chem Sov Rev* (2010), Nr. 39, S. 3282 - 3209
- [Oli91] OLIVEROS, E.: 1H-Phenalen-1-one: Photophysical Properties and Singlet-Oxygen Production. In: *Helvetica Chimica Acta* (1991), Nr. 74, S. 79 - 90
- [OPZ⁺05] O'DONOVAN, P. ; PERETT, C. M. ; ZHANG, X. ; MONTANER, B. ; XU, Y.-Z. ; HARWOOD, C. A. ; MCGREGOR, J. M. ; WALKER, S. L. ; HANAOKA, F. ; P., Karren: Azathioprine and UVA Light Generate Mutagenic Oxidative DNA Damage. In: *Science* (2005), Nr. 309, S. 1871 - 1874
- [ORK99] OSADA, K. ; RAVANDI, A. ; KUKSIS, A.: Rapid Analysis of Oxidized Cholesterol Derivatives by High-Performance Liquid Chromatography combined with Diode-Array Ultraviolet and Evaporative Laser Light-Scattering Detection. In: *JAACS* (1999), Nr. 76, S. 863 - 871
- [ORS⁺06] OTT, G. ; REIDENBACH, H.-P. ; SIEKMANN, H. ; STEINMETZ, M. ; T., Völker.: *Leitfaden "Nichtionisierende StrahlungSSonnenstrahlung"*. 2006

- [PD06] PATTISON, D. I. ; DAVIES, M. K.: Action of ultraviolet light on cellular structures. In: *EXS* (2006), Nr. 96, S. 131 - 157
- [PHF⁺06] PRYOR, W. A. ; HOUK, K. N. ; FOOTE, C. S. ; FUKUTO, J. M. ; IGNARRO, L. J. ; SQUADRITO, G. L. ; DAVIES, K. J.: Free radical biology and medicine: it's a gas, man! In: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2006), Nr. 291, S. 491 - 511
- [PHK⁺03] PAPPINEN, Sari ; HERMANN, Marin ; KUNTSCHKE, Judith ; SOMERHARJU, Pentti ; WERTZ, Philip ; URTTI, Arto ; SUHONEN, Marjukka: Comparison of rat epidermal keratinocyte organotypic culture (ROC) with intact human skin: Lipid composition and thermal phase behavior of the stratum corneum. In: *Biochimica et Biophysica Acta* (2003), Nr. 1778, S. 824 - 834
- [PLR⁺12] PATZELT, A. ; LADEMAN, J. ; RICHTER, H. ; DARVIN, M. E. ; SCHANZER, S. ; THIEDE, G. ; STERRY, W. ; VERGOU, T. ; HAUSER, M.: In vivo investigation on the penetration of various oils and their influence on the skin barrier. In: *Skin Research and Technology* (2012), Nr. 18, S. 364 - 369
- [PMR⁺02] PANDEY, R. ; MEHROTRA, S. ; RAY, R. S. ; JOSHI, P. C. ; HANS, R. K.: Evaluation of UV-radiation induced singlet oxygen generation potential of selected drugs. In: *Drug and chemical toxicology* (2002), Nr. 25, S. 215 - 225
- [PP45] PETERSON, W. H. ; PETERSON, M. S.: Relation of Bacteria to Vitamins and Other Growth Factors. In: *Bacteriol Rev* (1945), Nr. 2, S. 49 - 109
- [PS84] PARKER, J. G. ; STANBRO, W. D.: Dependence of photosensitized singlet oxygen production on porphine structure and solvent. In: *Photochem Photobiol* (1984), Nr. 170, S. 259 - 284
- [RBSM99] ROGGAN, A. ; BEUTHAN, J. ; SCHRÜNDER, S. ; MÜLLER, G.: Diagnostik und Therapie mit dem Laser. In: *Physikalische Blätter* (1999), Nr. 55, S. 25 - 30
- [Reg10] REGENSBURGER, Johannes: *Spektroskopische Untersuchungen zur Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Biomolekülen, Bakterien und Zellen*, Universität Regensburg, Diss., 2010

- [RG99] REDMOND, R. W. ; GAMLIN, J. N.: A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. In: *Photochem Photobiol* (1999), Nr. 70, S. 391 - 475
- [RHBR12] ROZANOWSKA, M. ; HANDZEL, K. ; BOULON, M. E. ; ROZANOWSKI, B.: Cytotoxicity of All-Trans-Retinal Increases Upon Photodegradation(dagger). In: *Photochem Photobiol* (2012), Nr. 55
- [Rie03] RIEDEL, S.: *Vergleichende Untersuchungen zur dermalen Penetration und Permeation in Diffusionszellen*, Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss., 2003
- [RK06] REDMOND, R. W. ; KOICHEVAR, I. E.: Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. In: *Photochem Photobiol* (2006), Nr. 5, S. 1178 - 1186
- [RK13] RAULIN, C. ; KARSAI, S.: *Lasertherapie der Haut*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013
- [RMK⁺13] REGENSBURGER, J. ; MAISCH, T. ; KNAK, A. ; GOLLMER, A. ; FELGENTRAEGER, A. ; LEHNER, K. ; BAEUMLER, W.: UVA irradiation of fatty acids and their oxidized products substantially increases their ability to generate singlet oxygen. In: *Phys Chem Chem Phys* (2013), Nr. 15, S. 17672 - 17680
- [Ruw07] RUWIEDEL, K.: *Wechselwirkung UVA- & UVB- induzierter Signaltransduktionsprozesse in humanen Hautzellen*, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Diss., 2007
- [RWB⁺] ROZANOWSKA, M. ; WESSEL, J. ; BOULON, M. E. ; BURKE, J. M. ; RODGERS, M. A. ; TRUSCOTT, T. G. ; SARNA, T.: Blue light-induced singlet oxygen generation by retinal lipofuscin in non-polar media, JOURNAL=Free Radic Biol Med, YEAR=1998, NUMBER=24, PAGES=1007 1012.
- [RZ99] RANGARAJAN, M. ; ZATZ, J. L.: Skin delivery of vitamin E. In: *J. Cosmet. Sci.* (1999), Nr. 50, S. 249 - 279
- [SAB⁺08] SEGGER, D. ; ASSMUS, U. ; BROCK, M. ; ERASMY, J. ; FINKEL, P. ; FITZNER, A. ; HEUSS, H. ; KORTEMEIER, U. ; MUNK, S. ; RHEINLÄNDER, T. ; H., Schmidt-Lewerkühne ; SCHNEIDER, W. ; WESER, G.: Multicenter study on measurement of the natural pH of the skin

- surface. In: *International Journal of Cosmetic Science* (2008), Nr. 30, S. 75
- [SAS⁺00] STÜCKER, M. ; ALTMAYER, P. ; STRUK, A. ; HOFFMANN, K. ; SCHULZE, L. ; RÖCHLING, A. ; LÜBBERS, D. W.: The transepidermal oxygen flux from the environment is in balance with the capillary oxygen supply. In: *Journal of Investigative Dermatology* (2000), Nr. 114, S. 533 - 540
- [Sch98] SCHWARZ, T.: UV light affects cell membrane and cytoplasmic targets. In: *J Photochem Photobiol B* (1998), Nr. 2, S. 91 - 96
- [Sch01] SCHENKMAN, K. A.: Cardiac performance as a function of intracellular oxygen tension in buffer-perfused hearts. In: *American Journal of Physiology Heart and circulatory physiology* (2001), Nr. 6, S. 2463 - 2472
- [Sch05a] SCHIEBLER, Theodor H.: *Anatomie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. 9. bearbeitete Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2005
- [Sch05b] SCHWARZ, T.: Mechanisms of UV-induced immunosuppression. In: *Keio J Med* (2005), Nr. 4, S. 165 - 171
- [SM00] SIMON, G. A. ; MAIBACH, H. I.: The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations– an overview. In: *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* (2000), Nr. 5, S. 229 - 234
- [SMA04] STÜCKER, M. ; MOLL, C. ; ALTMAYER, P.: Sauerstoffversorgung der Haut Unter besonderer Berücksichtigung der kutanen Sauerstoffaufnahme aus der Atmosphäre. In: *Der Hautarzt* (2004), Nr. 3, S. 273 - 279
- [SRGGGB05] SCHIEKE, S. M. ; RUWIEDEL, K. ; GERS-GARLAG, H. ; GRETHER-BECK, J. S. K. S. Krutmann: Molecular crosstalk of the ultraviolet A and ultraviolet B signaling responses at the level of mitogen-activated protein kinases. In: *J Invest Dermatol* (2005), Nr. 4, S. 857 - 859
- [SRV⁺00] STEGE, H. ; ROZA, L. ; VINK, A. A. ; GREWE, M. ; RUZICKA, T. ; GRETHER-BECK, S. ; KRUTMANN, J.: Enzyme plus light therapy to

- repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000), Nr. 97, S. 1790 - 1795
- [SS95] SIES, H. ; STAHL, W.: Vitamin E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. In: *Am J Clin Nutr* (1995), Nr. 62, S. 1315 - 1321
- [SS03] SCHWEITZER, C ; SCHMIDT, R.: Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. In: *Chem Rev* (2003), Nr. 103, S. 1685 - 1757
- [SS07] STEIN, K. R. ; SCHEINFELD, N. S.: Drug-induced photoallergic and phototoxic reactions. In: *Expert opinion on drug safety* (2007), Nr. 6, S. 431 - 443
- [SSA⁺02] STÜCKER, M. ; STRUK, A. ; ALTMAYER, P. ; HERDE, M. ; BAUMGÄRTL, H. ; LÜBBERS, D. W.: The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis. In: *Journal of Physiology* (2002), Nr. 3, S. 985 - 994
- [STDW94] SCHMIDT, R. ; TANELIAN, C. ; DUNSBACH, R. ; WOLFF, C.: Phenalenone, a Universal Reference Compound for the Determination of Quantum Yields of Singlet Oxygen (Delta) Sensitization. In: *J Photochem Photobiol A: Chem* (1994), Nr. 79, S. 11 - 17
- [TEM07] THIELE, J. J. ; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S.: Vitamin E in human skin: Organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology. In: *Molecular Aspects of Medicine* (2007), Nr. 26, S. 646 - 667
- [TH06] TRAUPE, H. ; HAMM, H.: *Prädiatrische Dermatologie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2006
- [TKB09] THALER, A. K. ; KAMENISCH, Y. ; BERNEBURG, M.: The role of ultraviolet radiation in melanomagenesis. In: *Exp Dermatol* (2009), Nr. 19, S. 81 - 88
- [TTP98] THIELE, J. J. ; TRABER, M. G. ; PACKER, L.: Depletion of human stratum corneum vitamin E: an early and sensitive in vivo marker of UV induced photo-oxidation. In: *J Invest Dermatol* (1998), Nr. 110, S. 756 - 761

- [Tuc07] TUCHIN, V.: *Tissue Optics Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*. Spie Press, 2007
- [UAR⁺97] UMEZAWA, N. ; ARAKANE, K. ; RYU, A. ; MASHIKO, S. ; HIROBE, M. ; NAGANO, T.: Participation of reactive oxygen species in phototoxicity induced by quinolone antibacterial agents. In: *Arch Biochem Biophys* (1997), Nr. 342, S. 275 - 281
- [VKO89] VAUPEL, P. ; KALLINOWSKI, F. ; OKUNIEFF, P.: Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review. In: *Cancer Research* (1989), Nr. 49, S. 6449 - 6465
- [VRW07] VÖGTLE, Fritz ; RICHARDT, Gabriele ; WERNER, Nicole: *Dentrische Moleküle: Konzepte, Synthesen, Eigenschaften, Anwendungen*. 1. Auflage. 2007
- [WC68] WAMPLER, J. E. ; CHURCHICH, J. E.: The Triplet State of Pyridoxal. In: *Biochem Biophys Res Commun* (1968), Nr. 32, S. 629 - 634
- [Wit07] WITT, M.: *Anatomie G1*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007
- [WJJ05] WONDRAK, Georg T. ; JACOBSON, Myron K. ; JACOBSON, Elaine L.: Endogenous UVA-Photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. In: *Photochemical and Photobiological Sciences* (2005), Nr. 5, S. 215 - 237
- [WKR⁺03] WRONA, M. ; KORYTOWSKI, W. ; ROZANOWSKA, M. ; SARNA, T. ; TRUSCOTT, T. G.: Cooperation of antioxidants in protection against photosensitized oxidation. In: *Free Radic Biol Med* (2003), Nr. 35, S. 1319 - 1329
- [XYZG06] XIAO-YONG, W. ; ZHI-GANG, B.: UVB-irradiated human keratinocytes and interleukin-1 α indirectly increase MAP kinase/AP-1 activation and MMP-1 production in UVA irradiated dermal fibroblasts. In: *Chinese Medical Journal* (2006), Nr. 119, S. 827 - 831
- [YCH⁺81] YOUNG, A. R. ; CHADWICK, C. A. ; HARRISON, G. I. ; NIKAIDO, O. ; RAMSDEN, J. ; POTTEN, C. S.: The similarity of the action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema. In: *J Invest Dermatol* (1981), Nr. 1, S. 982 - 988

- [You97] YOUNG, A. R.: Chromophores in human skin. In: *Phys Med Biol* (1997), Nr. 5, S. 789 - 802
- [ZK98] ZINTH, W. ; KÖRNER, H. J.: *Physik III Optik, Quantenphänomene und Aufbau von Atomen*. R. Oldenburg Verlag München Wien, 1998
- [ZZS⁺11] ZHANG, Y. ; ZHU, X. ; SMITH, J. ; HAYGOOD, M. T. ; GAO, R.: Direct observation and quantitative characterization of singlet oxygen in aqueous solution upon UVA excitation of 6-thioguanines. In: *J Phys Chem B* (2011), Nr. 115, S. 1889 - 1894

7. Wissenschaftliche Publikationen

1. Wolfgang Bäuml, Johannes Regensburger, Alena Knak, Ariane Felgenträger, Tim Maisch, **UVA and endogenous photosensitizers- the detection of singlet oxygen by its luminescence**, In: *Photochemical & Photobiological Sciences* (2012 Januar, 11 (1) 107-117)
2. Johannes Regensburger*, Alena Knak*, Tim Maisch, Michael Landthaler, Wolfgang Bäuml, **Fatty acids and vitamins generate singlet oxygen under UVB irradiation**, In: *Experimental Dermatology*, (2012 Februar, 21(2) 135-139), (*geteilte Erstautorenschaft)
3. Johannes Regensburger, Tim Maisch, Alena Knak, Anita Gollmer, Ariane Felgenträger, Karin Lehner, Wolfgang Bäuml, **UVA irradiation of fatty acids and their oxidized products substantially increases their ability to generate singlet oxygen**, In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2013 September, 15 (40) 17672-17680)
4. Alena Knak, Johannes Regensburger, Tim Maisch, Michael Landthaler, Wolfgang Bäuml, **Singlet oxygen generation and photochemical changes of vitamins - the interaction of UVB and UVA irradiation**, In: *Photochemical and Photobiological Sciences*, *accepted*
5. Alena Knak, Roger Bresolí, Ester Boix, Santi Nonell, Wolfgang Bäuml, **Quantum Yield of Triplet State and Singlet Oxygen Generation of Vitamin B₆ at a skin-like pH**, In: *to be submitted*

8. Beiträge auf wissenschaftlichen Konferenzen

1. Vortrag bei der *International Photodynamic Association 2011*, 12.05.2011, Innsbruck, Österreich
Titel: **Generation of singlet oxygen by UVB-irradiation of endogenous molecules**
2. Vortrag beim *18. Jahrestag der Deutschen Gesellschaft für Lasermedizin*, 21.05.2011, Ulm, Deutschland
Titel: **Generation of singlet oxygen by UVB-irradiation of endogenous molecules**
3. Postervortrag beim *Symposium des Universitätsklinikums Regensburg 2011*, 04.11.2011, Regensburg, Deutschland
Titel: **Generation of singlet oxygen by UVB-irradiation of endogenous molecules**
4. Postervortrag beim *39. Jahrestreffen der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung*, 01.03.2012 - 03.03.2012, Marburg, Deutschland
Titel: **UVB and singlet oxygen - Potential new pathways of cell damage?**
5. Postervortrag bei der *36. Konferenz der American Society of Photobiology*, 23.-27.06.2012, Montreal, Kanada
Titel: **UVB radiation generates not only singlet oxygen but is also able to change endogenous photosensitizers - potential new pathways of cell damage?**

6. Postervortrag beim 9. *Internationalen Symposium für Photodynamische Therapie und Photodiagnose in der klinischen Praxis*, 16.10.2012 - 20.10.2012, Brixen, Italien
Titel: **UVA and UVB radiation changes endogenous molecules in different ways and influences therefore their ability to generate singlet oxygen - Potential new pathways of cell damage?**

7. Postervortrag beim 9. *Internationalen Symposium für Photodynamische Therapie und Photodiagnose in der klinischen Praxis*, 16.10.2012 - 20.10.2012, Brixen, Italien
Titel: **Different endogenous photosensitizers generate singlet oxygen by UVB irradiation**

8. Postervortrag beim 40. *Jahrestreffen der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung*, 14.03.2013 - 16.03.2013, Dessau
Titel: **UVA and UVB radiation changes endogenous molecules in different ways and influence therefore their ability to generate singlet oxygen - Potential new pathways of cell damage?**

9. Postervortrag beim 41. *Jahrestreffen der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung*, 13.03.2014 - 15.03.2014, Köln
Titel: **Singlet oxygen generated by skin care products and their ingredients via UVB excitation**

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich in den letzten Jahren während meiner Dissertation unterstützt haben.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich Herrn Prof. Dr. Wolfgang Bäumler aussprechen, dafür dass er mich als Doktorandin angenommen hat, für die gute Betreuung meiner Arbeit und dafür dass er mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Außerdem möchte ich mich insbesondere bedanken bei:

- Herrn Prof. Dr. Elmar Lang, dafür dass er sich bereit erklärt hat, mein Mentor zu sein und mich während meiner Zeit als Doktorandin stets unterstützt hat,
- Frau Prof. Dr. Karrer, dafür dass sie bereit war, meine Mentorin zu sein und mich während dieser Zeit immer unterstützt hat,
- Herrn Dr. Johannes Regensburger, für seine Hilfsbereitschaft speziell in technischen Fragen und die gute Zusammenarbeit,
- Herrn Dr. Tim Maisch, für seine stete Unterstützung und für die Hilfe in allen biologischen Fragen,
- Herrn Dr. Andreas Späth, für seine Hilfe in chemischen Fragen, die gute Zusammenarbeit und die Kooperationsmöglichkeit mit dem Institut für organische Chemie für NMR-Messungen und GCMS-Analysen,
- Frau Ariane Felgenträger und Frau Anita Gollmer, die mir immer tatkräftig zur Seite standen,
- Frau Petra Unger, Frau Eva Herschberger und Frau Lydia Künzel, für ihre Hilfe bei der Zellkultur und der Immunhistologie,
- allen Mitarbeitern der dermatologischen Abteilung im H4, für die bereitwillige Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima,
- Herrn Prof. Santi Nonell, für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe in Barcelona und seine Hilfe und Betreuung bei den dort durchgeführten Messungen,

- Herrn Roger Bresolí, für seine stete Unterstützung und Hilfe bei den in Barcelona durchgeführten Experimenten.
- allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Santi Nonell in Barcelona, dafür dass sie mich so herzlich aufgenommen haben, für die angenehme Zusammenarbeit und ihre Hilfe und Unterstützung während meiner Zeit in Barcelona,
- meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung,
- dem Freistaat Bayern, für die finanzielle Unterstützung durch ein Stipendium im Rahmen der bayrischen Eliteförderung,
- dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), für ein Stipendium zur wissenschaftlichen Aus- und Fortbildung im Ausland.

ERKLÄRUNG

Ich Knak, Alena geboren am 20.11.1984 in Bad Oeynhausen erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 25. März 2014

.....

Alena Knak