

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung der Radikalbildung durch Sonnenbestrahlung in  
Abhängigkeit der Dosis und spektralen Bereiche

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stephanie Albrecht

aus Ueckermünde

Datum der Promotion: 23.06.2019

## 1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis .....	2
1.1 Abbildungsverzeichnis .....	3
1.2 Tabellenverzeichnis .....	3
2 Abstrakt .....	4
3 Einführung .....	6
4 Methodik .....	8
4.1 Prinzip der ESR-Spektroskopie und Radikaldetektion mit Spinmarkern und -fallen .....	8
4.2 Bestrahlungsaufbau .....	10
4.3 Untersuchung der hauttypabhängigen Radikalproduktion <i>in vivo</i> .....	10
4.4 Untersuchung der Radikalproduktion von <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i> Haut .....	11
4.5 Methodenetablierung zur Radikaldetektion mit Spinmarkern und Spinfallen <i>ex vivo</i> .....	11
4.6 Berechnung und Statistik .....	12
5 Ergebnisse .....	13
5.1 Untersuchung der Radikalproduktion von In- und Ex-vivo-Hautmodellen .....	13
5.2 Untersuchung der hauttypabhängigen Radikalproduktion <i>in vivo</i> .....	13
5.3 Methodenetablierung zur Radikaldetektion mit Spinmarkern und Spinfallen <i>ex vivo</i> .....	14
6 Diskussion .....	15
6.1 Untersuchung der Radikalproduktion von <i>in vivo und ex vivo</i> Haut .....	15
6.2 Untersuchungen der hauttypabhängigen Radikalproduktion <i>in vivo</i> .....	16
6.3 Methodenetablierung zur Radikaldetektion mit Spinmarkern und Spinfallen <i>ex vivo</i> .....	18
7 Literaturverzeichnis .....	22
8 Eidesstattliche Versicherung und ausführliche Anteilserklärung .....	24
9 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen .....	27
9.1 Publikation 1 .....	27
9.2 Publikation 2 .....	36
9.3 Publikation 3 .....	48
10 Lebenslauf .....	60
11 Komplette Publikationsliste .....	64
11.1 Publikationen .....	64
11.2 Poster .....	65
11.3 Präsentationen .....	65
12 Danksagung .....	67

## 1.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ablaufdiagramm der durchgeführten Forschungsarbeit .....8

Abbildung 2: ESR-Spektrum von a) PCA und b) PBN behandelte*r* *ex vivo* Schweinehaut ...10

## 1.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verhältnisse der bestrahlungsinduzierten Radikalproduktion zwischen den einzelnen Spektralbereichen und den einzelnen Hauttypen II und IV-V .....14

## 2 Abstrakt

**Einleitung** Die Haut ist im besonderen Maße oxidativem Stress durch Sonnenbestrahlung ausgesetzt. Eine zu lange ultraviolette (UV)- Bestrahlung kann die Radikalkonzentration in der Haut erhöhen, was zu Hautschädigungen wie Entzündungen, vorzeitiger Hautalterung und einem Anstieg des Hautkrebsrisikos führen kann. In *ex vivo* Humanhaut-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Hälfte aller freien Radikale durch den sichtbaren (VIS)- und nahinfraroten (NIR)-Spektralbereich der Sonnenstrahlung gebildet werden. Jedoch fehlen hierzu In-vivo-Erkenntnisse.

In dieser Arbeit wurde die spektrale Radikalproduktion *ex vivo* (Schweine- und Humanhaut) und *in vivo* (Humanhaut) untersucht und *in vivo* für verschiedene Hauttypen (II, hell) und (IV-V, dunkel) miteinander verglichen. Zudem wurden Verfahren zur kutanen Radikaldetektion mittels Spinmarkern (PCA) und Spinfallen (PBN) in exzidiierter Schweinehaut etabliert und miteinander verglichen. Zusätzlich wurde die Dosisabhängigkeit der kutanen Radikalproduktion untersucht.

**Methodik** Die *in vivo* Humanhaut-Untersuchungen sowie die Vergleichsmessungen zwischen *in vivo*- und *ex vivo* Haut wurden mit der L-Band-Elektronenspinresonanz (ESR) Spektroskopie mit PCA während einer simulierten Sonnenbestrahlung im UV-, VIS-NIR- und NIR-Bereich durchgeführt. Die Methodenuntersuchungen für PCA und PBN erfolgten mit der X-Band ESR-Spektroskopie an *ex vivo* Schweineohrhaut während UV-NIR- und VIS-NIR-Bestrahlung.

**Ergebnisse** Bei simulierter Sonnenbestrahlung induzierte der UV-Bereich in heller Haut die meisten Radikale, gefolgt vom VIS- und am wenigsten durch den NIR-Bereich. In dunkler Haut wurden in allen Spektralbereichen gleich viele Radikalmengen gefunden. In dunkler Haut wurden, verglichen zur hellen Haut, signifikant weniger Radikale im UV-Bereich, aber signifikant mehr Radikale im NIR-Bereich induziert.

Beim Vergleich heller Hautmodelle untereinander erzeugte *in vivo* Humanhaut unter Bestrahlung signifikant die meisten Radikale, gefolgt von *ex vivo* Schweinehaut und zuletzt exzidiierter Humanhaut. Alle Hautmodelle zeigten unter UV- eine höhere Radikalproduktion als unter VIS-NIR-Bestrahlung. Die Substanzmenge und Konzentration (PCA, PBN) beeinflusst signifikant die detektierte kutane Radikalproduktion. Die für eine maximale Radikaldetektion optimalen Präparationsparameter konnten evaluiert und eine Dosisabhängigkeit der Radikalproduktion gezeigt werden.

**Schlussfolgerung** Alle Bereiche des Sonnenspektrums (UV, VIS, NIR) induzieren in hellen und dunklen Hauttypen freie Radikale. Nach 4-minütiger UV-NIR Bestrahlung zeigte dunkle Haut nur 40 % weniger Radikale als helle Haut. *In vivo*- und *ex vivo* Haut ist in ihrer Radikalproduktion nicht quantitativ, jedoch in ihren Tendenzen miteinander vergleichbar. Bei der Messung mit Spinmarkern oder Spinfallen ist es von Bedeutung, die Konzentration und Menge ausreichend hoch zu wählen, um Substanzverarmungen und damit eine zu geringe Bestimmung der Radikalmenge (Fehler steigt mit steigender Substanzverarmung) zu vermeiden. Beide Messmethoden (PCA, PBN) zeigen in ihren relativen Werten und zeitlichen Abhängigkeiten vergleichbare Ergebnisse für die Radikalproduktion in bestrahlter Haut.

## Abstract

**Introduction** The skin is particularly exposed to solar-induced oxidative stress. An excessive exposure to ultraviolet (UV) radiation increases the radical concentration, likely inducing skin damage (inflammation, tumor progression). Investigations on *ex vivo* human skin showed that half of all free radicals are induced by the visible (VIS) and near infrared (NIR) regions of the solar spectrum. However, *in vivo* results are missing.

Therefore, the spectral radical production was measured and compared *ex vivo* (porcine and human skin) and *in vivo* (human skin). Different skin types (II, fair) and (IV-V, dark) were compared *in vivo*. Methods for the detection of the radical production in excised skin with spin marker (PCA) and spin trap (PBN) were established and compared. Also the dose dependence of the cutaneous radical production was investigated.

**Methods** The investigations on human skin *in vivo*, the comparative measurements between *in vivo* and *ex vivo* skin, respectively were performed using L-band electron paramagnetic resonance (ESR) spectroscopy during simulated solar irradiation in the UV, VIS-NIR and NIR regions. The methods for PCA and PBN were investigated using X-band EPR spectroscopy on *excised* porcine skin during UV-NIR and VIS-NIR irradiation.

**Results** In fair skin most radicals were induced in the UV followed by the VIS and finally by the NIR region during simulated solar irradiation. In dark skin all spectral regions induced the same radical amount. In darker skin the radical amount was significantly lower in the UV, and significantly higher in the NIR region compared to fair skin.

*In vivo* human skin (II) showed the highest amount of irradiation-induced radicals, followed by excised porcine- and finally excised human skin. The amount and concentration of PCA and PBN significantly influence the cutaneous radical production. Optimal preparation parameters and an irradiation dose-dependent radical production could be found.

**Conclusion** The whole solar spectrum induces free radicals in fair and dark skin types. Dark skin showed a 40% decreased radical amount than fair skin (4 min UV-NIR). The *in vivo* and *ex vivo* cutaneous radical production is not quantitative comparable but shows comparable trends. For spin marker and spin trap measurements a sufficiently high concentration should be used to avoid substance depletion and a misinterpretation of the radical amounts. Both measurement methods (PCA, PBN) show comparable results in their relative values and time dependencies of the radical production in irradiated skin.

### 3 Einführung

Die Haut stellt eine Barriere dar, die das Körperinnere vor externen Einflüssen wie pathogenen und oxidativen Stressfaktoren schützt. Während dieser Funktion ist sie täglicher Sonnenbestrahlung ausgesetzt, die sich auf Meereshöhe aus 6 % ultravioletter (UVB, 280-320 nm und UVA 320-400 nm), 52 % sichtbarer (VIS, 400-700 nm) und 42 % infraroter (IR, 700 nm-1 mm) Strahlung zusammensetzt [1].

Eine moderate Sonnenbestrahlung ist für unsere Gesundheit unerlässlich, im Besonderen wird die UVB-Strahlung für die Vitamin-D-Synthese benötigt [2]. Eine exzessive Sonnenexposition kann jedoch zu einem Erythem (Sonnenbrand), Hautschäden und der Entstehung von freien Radikalen führen [3]. Freie Radikale werden im Körper für die Regulierung physiologischer Prozesse wie zum Beispiel der Zellkommunikation und des Signaltransportes benötigt [4]. Eine zu hohe Anzahl an freien Radikalen kann jedoch in der Haut zu oxidativem Stress und Hautschädigungen [5] wie Entzündungen [6] und frühzeitiger Hautalterung [7] führen und im schlimmsten Fall die Entstehung von Hautkrebs begünstigen [8, 9]. Die Messung freier Radikale ermöglicht es dementsprechend, auf die Stärke eines oxidativen Stresses zurückzuschließen. Daher ist die Untersuchung freier Radikale in der dermatologischen Forschung von großem Interesse. Eine geeignete Messmethode hierfür stellt die Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie dar [10].

Die Haut ist den negativen Auswirkungen der Sonnenstrahlung jedoch nicht schutzlos ausgeliefert, sie verfügt über Melanin, welches die Sonnenstrahlung absorbiert und streut [11]. Zudem besitzt die Haut ein komplexes antioxidatives Verteidigungssystem [12, 13], welches verschiedene endo- und exogene Antioxidantien wie Enzyme, Vitamine und Carotinoide enthält, die freie Radikale abfangen und neutralisieren können [14-16]. Dieses Verteidigungssystem kann jedoch bei zu hohen Radikalkonzentrationen aus dem Gleichgewicht geraten, wodurch die Entstehung von Hautschäden die Folge sein kann [17].

Eine exzessive UV-Exposition wird als ein entscheidender Faktor für die Hautkrebsentstehung angesehen [18]. Durch stetig verbesserte Sonnenschutzmittel [19], die im UV-Bereich schützen, könnte ein Rückgang von Hautkrebsraten erwartet werden. Jedoch verzeichnet die Statistik weltweit jährlich steigende Inzidenzraten für schwarzen und weißen Hautkrebs [20]. Dadurch stellt sich die Frage, ob auch die anderen Bereiche der Sonnenstrahlung die Entstehung von Hautkrebs begünstigen könnten. Forschungen der letzten Jahre konnten aufzeigen, dass nicht nur die UV-Strahlung, sondern jeder Bereich des Sonnenspektrums zur Entstehung von freien Radikalen beiträgt [21]. In einer *ex vivo* Studie konnte festgestellt werden, dass die VIS- und die nahinfrarote (NIR, 700- 1400 nm) Sonnenstrahlung 50 % der gesamten Radikallast in humaner Haut erzeugt [21].

Sollte sich diese spektrale Radikalverteilung *in vivo* bestätigen, würde das eine Entwicklung von neuen Schutzkonzepten gegen VIS- und NIR-Bestrahlung im Sonnenschutz erforderlich machen. Daher war es wichtig, zu untersuchen, ob diese spektrale Radikalverteilung auch *in vivo* zu beobachten ist und ob sie sich für verschiedene Hauttypen unterscheidet. Auch stellte sich die Frage, wie vergleichbar *ex vivo* zu *in vivo* Untersuchungen der kutanen bestrahlungsinduzierten Radikalproduktion sind und welche der ESR-Messmethoden die Radikalproduktion vertrauenswürdig nachweist. Mit diesen neuen Fragestellungen beschäftigte sich dieses Promotionsvorhaben.

## **Zielstellung**

*Ex vivo* wurde die spektralabhängige Radikalproduktion an hellen Hauttypen (I-III entsprechend der Fitzpatrick Skala [22]) umfassend untersucht [21, 23]. Ziel war es, zu untersuchen, wie sich die Radikalproduktion *in vivo* bei verschiedenen Hauttypen während einer qualitativ simulierten Sonnenbestrahlung verhält. Hierfür lagen nach unserem Kenntnisstand keine *in vivo* Daten in hellen und dunklen Hauttypen (II und IV-V entsprechend der Fitzpatrick Skala [22]) vor. Ein weiteres Ziel war es, die Vergleichbarkeit aus *ex vivo* [21, 23] zu *in vivo* Studien für die Radikalproduktion in verschiedenen Spektralbereichen zu untersuchen und die Einflussparameter zu spezifizieren. Für diese Untersuchungen sollte die L-Band ESR Spektroskopie mit dem Spinmarker PCA (3-(Carboxyl)-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy) eingesetzt werden.

Um mit der ESR-Spektroskopie unter physiologischen Bedingungen kutane Radikale zu detektieren, werden der Spinmarker (PCA) [24, 25] und die Spinfalle (PBN, N-tert-Butyl-*a*-phenylnitron) [21, 26] eingesetzt. Jedoch ist beim Spinmarker PCA nicht auszuschließen, dass er auch mit Antioxidantien in bestrahlter Haut reagiert. Beides führt zu einer Abnahme der ESR-aktiven Spinmarker. Wohingegen mit der Spinfallen-Technik Radikale eindeutig nachgewiesen werden können. Jedoch können Spinfallen bei der L-Band ESR Spektroskopie nicht *in vivo* auf der Haut angewendet werden, da die hierfür benötigten Konzentrationen so hoch wären, dass sie Hautirritationen hervorrufen könnten [27]. Daher ist es notwendig, zu einem empfindlicheren ESR-Verfahren (X-Band) zu wechseln. Jedoch sind bei der X-Band ESR Spektroskopie aufgrund der limitierten Probengröße nur Untersuchungen an exzidiierter Haut möglich. Mit den *ex vivo* Messungen sollte überprüft werden, ob eine Radikaldetektion mit Spinmarkern und Spinfallen vergleichbare Ergebnisse liefert. Auch sollten beide Methoden auf mögliche Fehlerquellen hin untersucht werden. Mittels der Vergleichsmessungen zwischen dem Spinmarker PCA und der Spinfalle PBN soll überprüft werden, ob mit dem PCA, das auch *in vivo* angewendet wird, valide bestrahlungsinduzierte Radikale nachweisbar sind.

Neben der Untersuchung der Radikalproduktion in verschiedenen Spektralbereichen sollte auch die Abhängigkeit der Radikalproduktion von der Bestrahlungsdosis mit der neu etablierten PCA-

Methode am X-Band ESR Spektroskop überprüft werden. Sollte es möglich sein, frühere Ergebnisse von Zastrow et al., die an PBN behandelter exzidiertes Humanhaut gewonnen wurden [28], mit PCA zu bestätigen, wäre das ein weiterer Hinweis dafür, dass die PCA-Methode geeignet ist, Radikale zu detektieren.

#### 4 Methodik

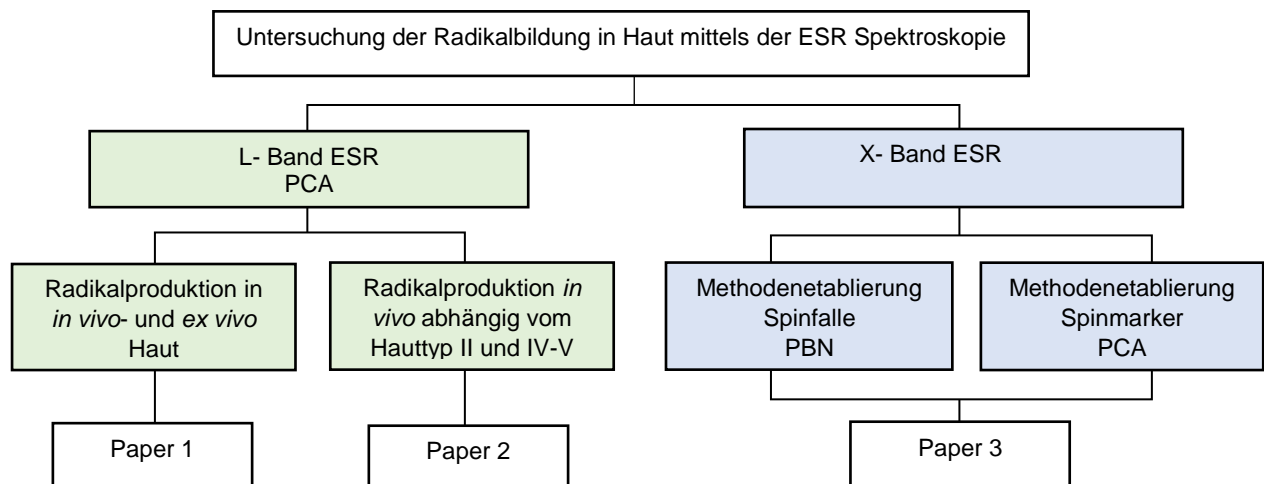


Abbildung 1: Ablaufdiagramm der durchgeführten Forschungsarbeit, gegliedert nach den ESR-Frequenzen L- und X-Band, nach denen die bestrahlungsinduzierte kutane Radikalproduktion *in vivo* und *ex vivo* untersucht wurde.

Die vorliegende Forschungsarbeit gliedert sich in zwei Hauptbereiche, getrennt nach den ESR-Frequenzen L- (1-2 GHz) - und X-Band (9-10 GHz), mit denen die kutane bestrahlungsinduzierte Radikalproduktion *in vivo* und *ex vivo* untersucht wurde. Die Struktur der vorliegenden Forschungsarbeit ist in Abbildung 1 als Ablaufdiagramm dargestellt.

##### 4.1 Prinzip der ESR-Spektroskopie und Radikaldetektion mit Spinmarkern und -fallen

Die ESR-Spektroskopie ist die einzige Methode, die es ermöglicht, freie Radikale direkt zu messen und zu spezifizieren [29]. Hierbei wird ausgenutzt, dass freie Radikale ungepaarte Elektronen und dementsprechend einen resultierenden Elektronenspin besitzen [30]. Bei Anlegung eines externen Magnetfeldes orientieren sich die Elektronenspins der ungepaarten Elektronen mit und entgegengesetzt des externen Magnetfeldes (Promotionspublikation 2, Abb. S1). Dadurch kommt es zu einer Aufspaltung des Energieniveaus der Elektronenspins. Bei Einstrahlung einer zusätzlichen elektromagnetischen Welle (Mikrowelle), kommt es bei übereinstimmender Energie zu einer resonanten Anregung der Elektronenspins vom nieder- auf das höherenergetische Energieniveau. Dadurch wird der eingestrahlten Mikrowelle Energie entzogen. Diese resonante Mikrowellenabsorption wird im ESR-Gerät gemessen und im ESR-Spektrum in erster Ableitung dargestellt (Promotionspublikation 2, Abb. S1). [29]

Die Energien, bei denen eine resonante Mikrowellenabsorption auftritt, werden durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Neben dem äußeren angelegten Magnetfeld sind hierbei



auch Wechselwirkungsprozesse von benachbarten Atomkernen und Elektronenspins von Bedeutung. Dadurch können aus den ESR-Spektren sowohl Informationen zur Anzahl und Struktur der Radikale, als auch deren Umgebung (Viskosität, Polarität) gewonnen werden. Jedoch ist diese Methode mit hohen technischen Anforderungen verbunden. [10, 30]

Bei der ESR-Spektroskopie unterscheidet man zwischen verschiedenen Frequenzbändern. Typische Frequenzbänder reichen vom L-Band (1-2 GHz), S-Band (3 GHz), X-Band (9-10 GHz), K-Band (24 GHz), Q-Band (34 GHz) bis hin zum W-Band (95 GHz) [31]. Je höher die verwendete Frequenz der Mikrowelle ist, je höher ist die Messempfindlichkeit des Systems und je geringer ist die erlaubte Probengröße [31]. Durch den Wassergehalt in biologischen Proben kommt es zu einer nicht-resonanten Mikrowellenabsorption, die mit steigenden Frequenzen zunimmt. Dadurch wird die Mikrowelle geschwächt, was die erlaubte Probengröße limitiert. Während in einem L-Band noch Probengrößen von einem Unterarmquerschnitt möglich sind, so dass *in vivo* Humanhautmessungen möglich sind, können im X-Band nur noch Proben von wenigen Millimetern Größe gemessen werden. Die nicht-resonante Schwächung wirkt sich zusätzlich auf die Eindringtiefe der Mikrowelle und damit auf die Hauttiefe aus, in der noch kutane Radikale nachgewiesen werden können. Hierbei können beim L-Band Eindringtiefen von ca. 9-33 mm erreicht werden, während beim X-Band nur noch Tiefen von ca. 0,5 mm möglich sind. [32] In dieser Arbeit wurde die L- und die X-Band ESR Spektroskopie eingesetzt, die verwendeten ESR-Parameter sind in den beigefügten Publikationen [33-35] einzeln aufgelistet.

Die meisten Radikale besitzen eine hohe Reaktivität und dementsprechend kurze Lebenszeiten [5], was eine direkte Messung unter physiologischen Bedingungen in der Haut verhindert. Als Lösung können die Lebenszeiten durch eine Stabilisierung oder Markierung der freien Radikale verlängert werden [10].

Zum Markieren werden sogenannte Spinmarker-Substanzen verwendet; in dieser Arbeit wurde der Spinmarker PCA eingesetzt. PCA ist ein stabiles Nitroxidradikal, welches von sich aus ein ESR-Signal mit drei charakteristischen Linien liefert (Abbildung 2, a). Tritt das PCA mit einem induzierten Hautradikal in Verbindung, wird dieses ESR inaktiv [24]. Hierbei ist der Intensitätsabfall des ESR-Spektrums proportional zum Radikalaufkommen, dementsprechend könnte auf die Anzahl der induzierten freien Radikale rückgeschlossen werden. Jedoch ist bei der Auswertung Vorsicht geboten, da PCA auch mit Antioxidantien in der Haut reagieren könnte, wodurch eine Abnahme der PCA Signalintensität nicht nur durch z. B. bestrahlungsinduzierte Radikale hervorgerufen werden könnte, was das Messergebnis verfälschen würde. Der ausgewählte Spinmarker PCA ist, im Gegensatz zu anderen Spinmarkern, hydrophil und sehr reaktionsträge, weshalb eine Reaktion mit z.B. Antioxidantien in der Zelle/Gewebe stark vermindert ist. Ein eindeutiger Radikalnachweis geht nur über so genannte Spinfallen, auch Spintraps genannt. Sie ermöglichen es, Aussagen über die Art der gebildeten Radikale zu treffen [36]. Sie sind von sich aus ESR-inaktiv. Erst nach der Reaktion mit einem freien Radikal bilden

sie ein ESR-aktives Radikaladdukt, deren ESR-Spektrum Informationen über die Art des stabilisierten Radikals enthält [37]. In dieser Forschungsarbeit wurde die Spinfalle PBN verwendet. Die zeitliche Entwicklung der ESR-Spektren ist in Abbildung 2 dargestellt.

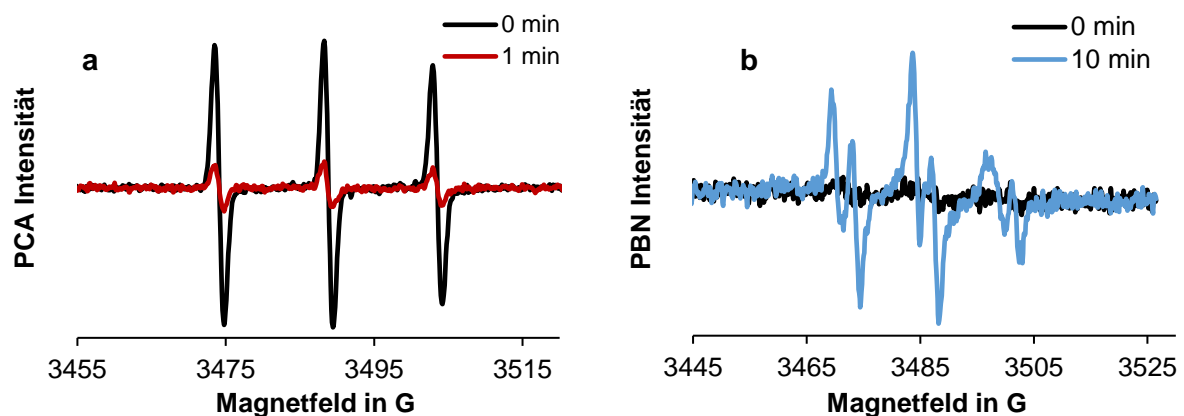


Abbildung 2: ESR-Spektrum von a) PCA und b) PBN behandelter *ex vivo* Schweinehaut unbestrahlt (0 min, schwarze Linie) und nach a) 1 min (rote Linie) und b) 10 min (blaue Linie) Bestrahlung mit simulierter Sonnenstrahlung (UVB-NIR).

#### 4.2 Bestrahlungsaufbau

Die Hautproben wurden direkt im ESR-Gerät bestrahlt. Dies ermöglicht die Detektion der Radikale zeitgleich zur Bestrahlung und damit höher aufgelöste kinetische Untersuchungen bei gleichbleibender Probenposition, verglichen mit einer externen Bestrahlung. Auch können bei der *in situ* Bestrahlung geringere Bestrahlungsenergien verwendet und damit Untersuchungsbedingungen, die einer moderaten täglichen solaren Bestrahlung entsprechen (unterhalb einer minimalen Erythem Dosis von 30mJ/cm<sup>2</sup> UVB für Hauttyp II [22]), unter Laborbedingungen simuliert werden.

Für die Bestrahlung wurde ein Sonnensimulator mit einer 150 W Xenon Lampe eingesetzt. Das Xenon Lampenspektrum wurde mittels eines optischen Filters (LSZ185 AM0 Filter) auf das AM0-Sonnenspektrum angepasst. Durch zusätzlich eingesetzte Filter konnten die jeweils benötigten Spektralbereiche für die Bestrahlungsexperimente ausgewählt und über verschiedene Lichtleitfasern in das ESR-Spektrometer eingekoppelt und direkt auf die Probe ausgerichtet werden. Der Sonnensimulator, die Fasern und der Filter stammten von der Firma LOT Oriel GmbH & Co. KG, Deutschland. Die in dieser Forschungsarbeit verwendeten Spektralbereiche, Bestrahlungsstärken und Strahlungsdosen sind in den beigefügten Publikationen [33-35] aufgelistet.

#### 4.3 Untersuchung der hauttypabhängigen Radikalproduktion *in vivo*

In dieser Forschungsarbeit wurde die spektrale Radikalproduktion *in vivo* an Probanden mit heller Haut (Hauttyp II) [33, 35] und dunkler Haut (Hauttyp IV-V) [35] für die Spektralbereiche UV, VIS-NIR und NIR einzeln untersucht und miteinander verglichen. Hierbei wiesen die dunkelhäutigen

Probanden ( $3,2 \pm 0,6$ )-fach höhere Melaninwerte<sup>1</sup> auf als die hellhäutigen Probanden [35]. Für die Untersuchung der Radikalproduktion wurde ein weiterentwickeltes L-Band ESR Spektrometer (LBM MT 03, Magnostech Berlin, Deutschland) eingesetzt, welches Messungen des oxidativen Stresses *in vivo* während einer simulierten Sonnenbestrahlung ermöglicht [38].

Die Probanden wurden an den Unterarminnenseiten (40 min inkubiert mit 100 µl einer 0,8 % PCA Lösung) im ESR-Gerät erst unbestrahlt und anschließend unter simulierter Sonnenbestrahlung an derselben Position gemessen. Aus der Differenzbildung zwischen dem unbestrahlten und dem bestrahlten kutanen PCA-Abbau kann auf die bestrahlungsinduzierte Radikalproduktion in der Haut zurückgeschlossen werden [33, 35]. Das methodische Vorgehen ist in den ersten beiden Promotionspublikationen [33, 35] genauer beschrieben.

#### **4.4 Untersuchung der Radikalproduktion von *in vivo* und *ex vivo* Haut**

Neben der *in vivo*- (Hauttyp II) und *ex vivo* Humanhaut (Hauttyp II) wurde exzidierte Schweinehaut untersucht [33], da sie oft als Modell zu humaner Haut eingesetzt wird [39]. Die exzidierte Human- und Schweinehaut wurde über das *Stratum corneum* mit 50 µl einer 0,8% PCA Lösung für 20 min inkubiert. Die Inkubationsparameter von *in vivo* Haut (siehe Punkt 4.3) wurden für *ex vivo* Haut so angepasst, dass nach der Inkubation *in-* und *ex vivo* die gleiche PCA Startintensität im ESR Spektrum vorlag. Die weiteren ESR-Messungen und Bestrahlungen erfolgten *ex-* und *in vivo* unter den gleichen Bedingungen (siehe Punkt 4.3). Hierbei wurde die Radikalproduktion *in-* und *ex vivo* unter UV und VIS-NIR Bestrahlung untersucht und miteinander verglichen. Das methodische Vorgehen ist in der ersten Promotionspublikation [33] genauer beschrieben.

#### **4.5 Methodenetablierung zur Radikaldetektion mit Spinmarkern und Spinfallen *ex vivo***

Um die bestrahlungsinduzierten Radikale in der Haut mit Spinfallen detektieren zu können, war es notwendig, von der bisher eingesetzten L-Band ESR Spektroskopie zu einem empfindlicheren ESR-Verfahren und damit zu höheren Frequenzen zu wechseln. Hierfür wurde ein neues X-Band ESR System "Elexys E 500" mit einem TMHS Resonator (Bruker Bio Spin GmbH, Deutschland) eingesetzt. Zu Beginn erfolgte die Anpassung eines Sonnensimulators auf das neue X-Band ESR Gerät. Hierfür wurde eine geeignete Lichtleitfaserhalterung entwickelt, um die Proben während der X-Band ESR Messung mit einem simulierten Sonnenspektrum bestrahlen zu können.

Als Spinmarker kam PCA und als Spinfalle PBN zum Einsatz. PBN weist verglichen zu anderen Spinfallen eine geringere Unterscheidbarkeit seiner verschiedenen Radikaladdukte im ESR Spektrum auf (Abbildung 2, b). Jedoch fand die Auswahl von PBN statt, da es wegen seiner hohen Stabilität der Radikaladdukte (über 60 min, [28]) und seiner Sensitivität für Hydroxyl-, Superoxidanion und kohlenstoffzentrierten Radikalen [21] ähnliche Eigenschaften wie PCA

---

<sup>1</sup> Der Melaninwert (relative Einheit von 0-999) wurde an der Unterarminnenseite mit einem Mexameter MX 18 (Courage+Khazaka Cologne, Deutschland) gemessen.

besitzt. Dadurch eignet sich PBN für Vergleichsmessungen und die Validierung des Spinmarkers PCA. Die nachfolgenden Untersuchungen erfolgten an exzidierte Schweineohrhaut.

Zuerst wurden X-Band ESR Verfahren für die Radikaldetektion mit PCA und PBN etabliert. Das umfasste die systematische Untersuchung der Einflussfaktoren der Präparationsparameter der Probeninkubation (Temperatur, Substanzkonzentration und Menge) an sechs Schweineohren sowie der Berechnungsmethode. Die Hautproben wurden hierfür mit den Spektralbereichen UVB-NIR und VIS-NIR bestrahlt. Anschließend erfolgte der Vergleich der detektierten bestrahlungsinduzierten Radikalproduktion zwischen PCA und PBN behandelte Haut an drei Schweineohren im UV- und VIS-NIR Bereich [34]. Nach der Probenpräparation (beschrieben in [34]) erfolgte die Messung der Hautproben im Resonator des ESR-Gerätes unter simulierter Sonnenbestrahlung.

Für die Vergleichsmessung der Radikalproduktion zwischen PCA und PBN behandelte Haut wurden die als optimal bewerteten Präparationsparameter (Zeit 10 min, Temperatur 32°C, Substanzmenge 120 µl, Substanzkonzentration 1,5 und 0,6 mM PCA, 1 M PBN [34]) verwendet. Zu jeder bestrahlten ESR-Messung erfolgte die Aufnahme einer unbestrahlten Kontrollmessung unter jeweils gleichen Präparations- und Messbedingungen. Die Anzahl der bestrahlungsinduzierten kutanen Radikalproduktion bei PCA ergibt sich aus der Differenz zwischen der unbestrahlten und der bestrahlten Messung. Für ESR-Messungen mit PBN war eine Differenzbildung nicht nötig, da PBN behandelte Haut im ESR-Spektrum unbestrahlt nur ein Rauschen zeigt (Abbildung 2, b). Die Hautpräparation, Bestrahlung und angewendeten Berechnungsmethoden sind in der dritten Promotionspublikation [34] detailliert beschrieben.

#### **4.6 Berechnung und Statistik**

Für die statistische Auswertung der Signifikanzen ( $***p \leq 0,001$ ,  $**p \leq 0,01$ ,  $*p \leq 0,05$ ) wurden die Verfahren: „Generalized estimating equations (GEE) Test“, „Mann-Whitney U-test for non-related samples“ und „Wilcoxon signed-rank test“ mittels der Software SPSS Statistics Version 22 von IBM, USA, verwendet. Der GEE-Test wurde hierbei eingesetzt, um die Signifikanz der Radikalproduktion über den gesamten Messzeitraum zu bestimmen, während die anderen beiden Tests zur Bestimmung der Signifikanz innerhalb eines bestimmten Messzeitpunktes verwendet wurden. Hinsichtlich der Journalvorgaben sind in den Promotionspublikationen [33, 34] die rohen p-Werte und in [35] die mit der Benjamini-Hochberg (BH) -Methode korrigierten p-Werte angegeben. Die Funktionsbestimmung der Kinetiken der Radikalproduktionen wurde mit der Software OriginPro 8.5.G (OriginLab Corporation, USA) berechnet. Die weiteren Berechnungsverfahren sowie die einzelnen Probandenzahlen sind in den drei Promotionspublikationen [33-35] aufgeführt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Untersuchung der Radikalproduktion von In- und Ex-vivo-Hautmodellen

Das bestrahlungsinduzierte Radikalaufkommen unterschied sich zwischen *in-* und *ex vivo* Haut. Hierbei zeigte unter simulierter UV- und VIS-NIR-Bestrahlung *in vivo* Humanhaut (Hauttyp II) das höchste Radikalaufkommen, gefolgt von exzidiierter Schweinehaut und mit der geringsten Radikalproduktion *ex vivo* Humanhaut (Hauttyp II). *In vivo* Humanhaut zeigte signifikante Unterschiede in der Radikalproduktion zu den beiden *ex vivo* Hautmodellen, während sich die Radikalproduktion zwischen den beiden *ex vivo* Hautmodellen nicht signifikant unterschied (1, Abb. 2 und 3). Der Vergleich zwischen *in vivo*- und *ex vivo* Hautmodellen zeigte, dass die Verhältnisse zwischen den Radikalproduktionen je nach verwendetem Spektralbereich (bei 4 min UV- und 10 min VIS-NIR- Bestrahlung) variieren. *Ex vivo* Humanhaut zeigte hierbei unter UV- eine 3,5-fach und unter VIS-NIR eine 2-fach geringere Radikalproduktion im Vergleich zu *in vivo* Humanhaut. Während exzidierte Schweinehaut unter UV- eine 2,8-fach und unter VIS-NIR-Bestrahlung eine 1,5-fach geringere Radikalproduktion als *in vivo* Humanhaut (Hauttyp II) zeigte. [33]

### 5.2 Untersuchung der hauttypabhängigen Radikalproduktion *in vivo*

In unbestrahlter Haut war das Startsignal von PCA direkt nach der Inkubation dreifach höher in dunkler als in heller Haut. Zudem zeigte sich in unbestrahlter dunkler Haut ein ca. doppelt so schneller PCA Abbau verglichen zu heller Haut (2, Abb. 1). [35]

Die Bestrahlungsexperimente zeigten, dass alle spektralen Bereiche der simulierten Sonnenstrahlung in hellen- und dunklen Hauttypen freie Radikale induzierten (2, Abb. 3). Hierbei unterschieden sich die Hauttypen in ihrem Ansprechverhalten. In heller Haut (Hauttyp II) wurden die meisten freien Radikale signifikant durch den UV-, gefolgt vom VIS- und anschließend dem NIR-Bereich induziert (1, Abb. 1 a). Im Gegensatz zu hellen Hauttypen induzierten alle Spektralbereiche UV, VIS und NIR in dunklen Hauttypen vergleichbare Radikalmengen (2, Abb. 4). Im direkten Vergleich zwischen den Hauttypen ist zu erkennen, dass in dunkler Haut während einer UV-Bestrahlung signifikant weniger Radikale induziert wurden als in heller Haut (2, Abb. 3, a), während bei einer NIR Bestrahlung signifikant mehr Radikale in dunkler Haut als in heller Haut induziert wurden (2, Abb. 3, c) [35]. Die relativen Verhältnisse der bestrahlungsinduzierten Radikalproduktion zwischen den einzelnen Spektralbereichen und Hauttypen (2, Abb. 4) sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Verhältnis der Radikalproduktion	<b>UV</b>	:	<b>VIS</b>	:	<b>NIR</b>
Hauttyp II	2,4	>	1	>	0,4
Hauttyp IV-V	1	≈	1	≈	1
	<b>Hauttyp II</b>		:	<b>Hauttyp IV-V</b>	
UV			3	>	1
VIS			1	≈	1
NIR*			1	<	2,6

Tabelle 1: Verhältnisse der bestrahlungsinduzierten Radikalproduktion zwischen den einzelnen Spektralbereichen und den einzelnen Hauttypen II [33] und IV-V [35] nach 4 min (\*6min) Bestrahlung (2, Abb. 4). Zum Vergleich der Radikalproduktionen zwischen den einzelnen Spektralbereichen (oberer Teil der Tabelle) wurden die Radikalproduktionen auf die Radikalmenge vom VIS Bereich des zugehörigen Hauttyps normiert.

### 5.3 Methodenetablierung zur Radikaldetektion mit Spinmarkern und Spinfallen *ex vivo*

Für die weiteren Untersuchungen der Vergleichbarkeit von Spinmarker- und Spinfallen-Substanzen wurde das *ex vivo* Hautmodell Schweineohrhaut verwendet und mit der X-Band ESR Spektroskopie untersucht.

#### Einfluss der Präparationsparameter auf die Untersuchungsergebnisse der Radikalproduktion

Die Untersuchungen zeigten, dass Präparationsparameter, wie die verwendete Konzentration und Substanzmenge, die detektierbare bestrahlungsinduzierte Radikalproduktion signifikant beeinflussten. Hierbei wurde bei gleicher Bestrahlung und Substanzkonzentration mit steigenden PCA (von 40- zu 120 µl) und PBN (von 40-, 80- zu 120µl) Substanzmengen ein signifikanter Anstieg der gemessenen Radikalproduktion detektiert (3, Abb. 4). [34]

Mit Erhöhung der Substanzkonzentration bei gleichbleibender Substanzmenge und Bestrahlung konnte bei PCA ein Anstieg der Radikalproduktion detektiert werden (3, Abb. 2, a). Dieser Effekt war in allen Konzentrations- und Bestrahlungsbereichen (außer zwischen 0,6- 1,5 mM, VIS-NIR) signifikant. Alle Konzentrationsbereiche zeigten bei PCA behandelte Haut signifikant mehr Radikale nach einer UVB-NIR- als nach einer VIS-NIR-Bestrahlung an. Jedoch unterschieden sich die Verhältnisse der detektierten Radikalproduktionen zueinander: Im UVB-NIR-Bereich wurden in Haut bei einer Substanzkonzentration von 0,1 mM PCA  $3,5 \pm 0,5$ , bei 0,6 mM PCA  $6 \pm 1$  und bei 1,5 mM  $8 \pm 2$  mehr Radikale als im VIS-NIR-Bereich detektiert [34]. Bei PBN zeigte sich ein signifikanter Anstieg der detektierten Radikalproduktion bei einer Substanzkonzentration von 0,8 zu 1 M. Eine Erhöhung der Konzentration über 1 M wirkte sich bei PBN nicht signifikant auf das Messergebnis aus (3, Abb. 3). Eine Variation der Inkubationstemperatur zwischen 22°C und 37°C zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die detektierte Radikalproduktion in PCA oder PBN behandelte bestrahlte Haut (Daten nicht gezeigt) [34].

## **Einfluss der Bestrahlungsdosis auf die Radikalproduktion**

Bei einer UVA-Bestrahlung mit verschiedenen Bestrahlungsstärken (0,1 bis 1,06 mW/cm<sup>2</sup>) wies die kumulative Radikalproduktion, über die Bestrahlungsdosis aufgetragen, vergleichbare Kurvenverläufe auf (3, Abb. 5). [34]

## **Vergleich der Radikalproduktion zwischen PCA und PBN behandelter *ex vivo* Haut**

Bei beiden Detektionsverfahren wurden jeweils in PCA und PBN behandelte *ex vivo* Schweinehaut signifikant mehr Radikale während einer UVB-UVA- als bei einer VIS-NIR-Bestrahlung detektiert (3, Abb. 6, a PCA, b PBN). Hierbei wurden bei beiden Methoden ab 9,8 Minuten Bestrahlung vergleichbare Anteile in der Radikalproduktion (80% im UV und 20% im VIS-NIR Bereich) nachgewiesen (3, Abb. 7). Die Kurvenverläufe von UVB-UVA bestrahlter exzidierte Schweinehaut zeigten in beiden Methoden jeweils monoexponentielle Verläufe, während die Radikalproduktion bei der PBN behandelten Haut ein stärkeres Abflachen als bei PCA aufweist (3, Abb. 6). Unter VIS-NIR-Bestrahlung zeigten beide Methoden lineare Verläufe der Radikalproduktion. [34]

## **6 Diskussion**

### **6.1 Untersuchung der Radikalproduktion von *in vivo* und *ex vivo* Haut**

Humane Haut *in vivo* zeigte signifikant höhere Radikalmengen unter UV- und VIS-NIR-Bestrahlung als die beiden *ex vivo* Hautmodelle Schweine- und Humanhaut (1, Abb. 2, 3). Dies entspricht den Ergebnissen einer früheren Humanhaut-Studie. Hier wurde eine höhere Radikalproduktion in UV-bestrahlter Haut *in vivo* - verglichen zu *ex vivo* - festgestellt [16]. Dies könnte mit dem Sauerstoffgehalt in der Haut zusammenhängen. *In vivo* Haut enthält ausreichend Sauerstoff. Dieser wird für die Bildung von Sauerstoffradikalen benötigt. Jedoch verarmt der Sauerstoffgehalt in der Haut innerhalb von Minuten nach der Exzision [16]. Aus logistischen Gründen konnten die *ex vivo* Hautmodelle nicht direkt nach der Entnahme gemessen werden. Die ESR-Messungen erfolgten innerhalb von Stunden nach der Exzision. Dementsprechend kann von einer Sauerstoffverarmung und einem geringeren Metabolismus ausgegangen werden, was die geringeren Radikalproduktionen von *ex vivo*- im Vergleich zu *in vivo* Haut erklären könnte. [33]

Von beiden *ex vivo* Hautmodellen zeigt Humanhaut das geringere Radikalaufkommen unter simulierter Sonnenbestrahlung verglichen zu Schweinehaut. Eigene Messungen zeigten, dass Humanhaut mehr Melanin als Schweinehaut (gering bis kein Melanin) besitzt (Daten nicht veröffentlicht). Durch den höheren Melaningehalt ist die *ex vivo* Humanhaut besser gegen die radikalinduzierende Wirkung von UV-Strahlung geschützt [40]. Ein weiterer wichtiger Bestandteil neben dem Melanin sind die Carotinoide im antioxidativen Schutzsystem der Haut, welches für die Neutralisierung von freien Radikalen verantwortlich ist [41, 42]. Humane Haut besitzt eine

höhere Menge an Carotinoiden als Schweinehaut (keine Carotinoide) [43]. Dies könnte die bessere Schutzwirkung und damit die geringere Radikalproduktion in exzidiierter humaner Haut, verglichen zu Schweinehaut, bei einer VIS-NIR Bestrahlung erklären. [33]

Die Ergebnisse zeigen, dass Bestahlungsmessungen an *in vivo*- und *ex vivo* Haut nur eingeschränkt miteinander vergleichbar sind. Hier muss die höhere Radikalproduktion *in vivo* und veränderliche Verhältnisse der Radikalproduktion bei verschiedenen Spektralbereichen zwischen den Hautmodellen berücksichtigt werden. Jedoch zeigen alle Hautmodelle *in vivo* und *ex vivo* gleiche Tendenzen in ihrer Radikalproduktion. Hierbei konnte festgestellt werden, dass sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* mehr Radikale in der Haut unter UV- als unter VIS-NIR Bestrahlung erzeugt werden. [33]

Die Untersuchungen zur Radikalproduktion *in*- und *ex vivo* [33] wurden von Herrn Robert Müller im Rahmen seiner Promotion durchgeführt. Ich unterstützte ihn bei der Bestrahlung und der Ergebnisberechnung (siehe Anteilserklärung). Nach den vergleichenden Messungen der Radikalproduktion zwischen *ex*- und *in vivo* Haut wurde die spektrale Radikalproduktion für helle und dunkle Hauttypen von mir *in vivo* untersucht.

## **6.2 Untersuchungen der hauttypabhängigen Radikalproduktion *in vivo***

Die ersten Beobachtungen beziehen sich *in vivo* auf unbestrahlte Haut. Obwohl die gleiche Substanzmenge und -konzentration inkubiert wurde, sind die PCA-Startwerte nach der Inkubation in dunkler Haut höher als in heller Haut [35]. Das stärkere Eindringverhalten vom Spinmarker PCA in dunkle Haut könnte an einer schwächer ausgeprägten Hautbarriere liegen. Diese These wird durch Untersuchungen des Transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) unterstützt. Hierbei wurden höhere TEWL-Werte in dunkler als in heller Haut gemessen [44, 45]. Höhere TEWL-Werte können auf eine schwächer ausgeprägte Hautbarrierefunktion hinweisen [46], wodurch eine erhöhte PCA Eindringfähigkeit in dunkler, verglichen zu heller Haut erklärt werden könnte. [35]

Der schnellere PCA-Abbau durch den Metabolismus (2, Abb. 1) in dunkler, verglichen zu heller Haut weist auf eine stärkere Verteilung des PCA in dunkler Haut hin. Durch eine stärkere Verteilung des Spinmarkers kann angenommen werden, dass dieser einer stärkeren/intensiveren Metabolisierung unterliegt, wodurch die schnellere Abbaurate in dunkler Haut erklärt werden kann (2, Abb. 1). Um diesen Effekt zu berücksichtigen, wurde vor jeder bestrahlten Hautmessung die gleiche Position unbestrahlt gemessen und als Grundsignal von der bestrahlten Messung abgezogen. Ein Einfluss der unterschiedlichen PCA-Verteilung auf die Messergebnisse kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Um dennoch eine hohe Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Hauttypen gewährleisten zu können, wurden alle Messungen mit den gleichen Präparations- und Messparametern durchgeführt. Die möglichen Auswirkungen der



unterschiedlichen PCA-Verteilungen in den Hauttypen wurde in der zweiten Promotionspublikation ausführlich beschrieben. [35]

Aus Untersuchungen an *ex vivo* Humanhaut (Hauttyp II) ist bekannt, dass die meisten freien Radikale pro Wellenlängenbereich durch den UV-Bereich induziert werden [21]. Dieser Anteil macht 50 % der Radikale aus, die durch das gesamte Sonnenspektrum erzeugt werden. Die restlichen 50 % der freien Radikale werden durch den VIS- und NIR-Bereich induziert [21, 47]. Damit tragen diese Spektralbereiche entscheidend zum kutanen Radikalaufkommen bei. Die Untersuchungen von Probanden vom hellen Hauttyp (II) bestätigen *in vivo* die vorhergehenden *ex vivo* Ergebnisse von Zastrow et al. [21]. Hierbei werden auch *in vivo* die signifikant meisten Radikale durch den UV-Bereich induziert (1, Abb. 1, a, b). Darauf folgt der VIS-Bereich. Die signifikant geringste Radikalproduktion wird durch den NIR-Bereich induziert. Dies entspricht den Erwartungen, da die bestrahlungsinduzierte Radikalanzahl pro Wellenlängenbereich hin zu niedrigeren Strahlungsenergien abnimmt. Im NIR-Bereich reicht die Strahlungsenergie nicht mehr aus, um freie Radikale direkt zu erzeugen. Jedoch kann eine NIR-Bestrahlung auf indirektem Weg, durch Aktivierung der Mitochondrien und bestimmter Enzyme, zu einer Erhöhung der kutanen Radikalkonzentration führen [48, 49]. [33]

Entgegen den Ergebnissen bei hellen Hauttypen (II) induzieren alle Spektralbereiche (UV, VIS und NIR) in dunkler Haut (IV-V) *in vivo* eine vergleichbare Radikalmenge (2, Abb. 4 a). Den Erwartungen entsprechend werden bei UV-Bestrahlung signifikant weniger Radikale in dunkler als in heller Haut induziert (2, Abb. 3, a). Dunkle Hauttypen weisen eine höhere Menge an Eumelanin auf als helle Hauttypen [50]. Aus vorhergehenden Untersuchungen ist bekannt, dass die Haut mit steigender Melaninkonzentration (Eumelanin) besser gegen die radikalinduzierende Wirkung von UV-Strahlung geschützt ist [40]. *In vivo* werden nach einer 4-minütigen UV-Bestrahlung 3-mal weniger Radikale in dunkler als in heller Haut induziert (2, Abb. 4). Die hier durchgeführten Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse von Herrling et al. Hierbei wurde *ex vivo* eine 1,8- 2,5-fach geringere Radikalproduktion in dunkler Haut (IV-V), verglichen zu heller Haut (II) gefunden [40]. [35]

Dunkle Haut weist von ihren optischen Eigenschaften einen geringeren Reflexionsgrad für Sonnenstrahlung auf als helle Haut [51], weshalb dunkle Haut bei gleicher Bestrahlung mehr Energie absorbiert. Hierbei schützt das Melanin die dunkle Haut aufgrund seiner strahlungsabsorbierenden Eigenschaften im UV-Bereich. Dieser Schutz nimmt aufgrund schwächer werdender Absorption zu höheren Wellenlängen (NIR-Bereich) hin exponentiell ab [52]. Eine stärkere Absorption von NIR-Strahlung in dunkler Haut könnte zu einem höheren Temperaturanstieg im Vergleich zu heller Haut und dementsprechend zu einer stärker ausgeprägten Radikalproduktion im NIR-Bereich führen. Untersuchungen mit hellen Hauttypen (II) zeigten, dass bei erhöhter Hauttemperatur mehr kutane Radikale unter NIR-Bestrahlung induziert werden [21]. Dabei verstärken Hitze und NIR-Strahlung die kutane Radikalproduktion

unabhängig voneinander [53]. Durch den Messaufbau war eine Temperaturmessung der Probandenhaut während der Bestrahlung nicht möglich. [35]

Die Untersuchungsergebnisse bestätigen die Erkenntnisse, dass Personen mit einem Hauttyp IV-V länger in der Sonne bleiben können ohne ein Erythem zu entwickeln [22]. Jedoch zeigen die Messergebnisse auch, dass dunkle Haut nicht vollständig geschützt ist. Es kann angenommen werden, dass freie Radikale, die im VIS-NIR-Bereich entstehen, sich nach längerer Exposition aufsummieren und zu Hautschädigungen führen könnten (2, Abb. 3, b, c). Hierbei ist besonders der Infrarot-Bereich zu beachten, der 42 % des gesamten Sonnenspektrums auf der Erdoberfläche ausmacht [1] und tief bis in die subkutanen Schichten der Haut eindringt [3]. Untersuchungen zeigten, dass NIR-Langzeitbestrahlungen vergleichbare Hautschädigungen (Hyperkeratosen, Photoalterung und ein erhöhtes Risiko für Plattenepithelkarzinomen) wie eine chronische UV-Bestrahlung verursachen können [54]. Nach vier Minuten Bestrahlung mit dem gesamten simulierten Sonnenspektrum entsteht in dunkler Haut 60 % der Radikalanzahl von heller Haut. Dies zeigt, dass neben hellen auch dunkle Hauttypen einen Sonnenschutz benötigen, um Hautschäden durch Sonnenbestrahlung vorzubeugen. Für dunkle Hauttypen sollte dieser Sonnenschutz speziell auch im VIS-NIR-Bereich schützen. Hierfür könnten Streupartikel und Antioxidantien in Sonnencreme eingesetzt werden. [35]

Um die bisher erfolgten Radikalmessungen mit PCA zu verifizieren, wird auf die Spinfalle PBN zurückgegriffen.

### **6.3 Methodenetablierung zur Radikaldetektion mit Spinmarkern und Spinfallen *ex vivo***

Um Messungen mit Spinfallen zu ermöglichen, musste von der bisher verwendeten L-Band ESR Spektroskopie auf ein sensitiveres ESR-Spektrometer gewechselt werden. Zudem wurde eine empfindlichere Radikaldetektion mit Spinmarkern etabliert und beide Messmethoden (Spinfallen und -marker) auf ihre Vergleichbarkeit hin getestet. Für die folgenden Untersuchungen wurde ein X-Band ESR-Spektroskop eingesetzt. Bei dieser empfindlicheren Methode können nur exzidierte Hautproben untersucht werden. Als *ex vivo* Hautmodell wurde exzidierte Schweineohrhaut verwendet, da sie vergleichbare Tendenzen in ihrer Radikalproduktion zu humaner Haut zeigt [33] und gut verfügbar ist.

Um eine geeignete Messmethode für die Radikaldetektion mit Spinmarkern und Spinfallen zu entwickeln, musste im ersten Schritt der Einfluss der Präparationsparameter verstanden werden. Hierfür wurde erst der Einfluss der Präparationsparameter auf das Messergebnis untersucht.

In Studien, in denen die Menge an gebildeten Radikalen nach Noxenaussetzung untersucht werden soll, wurde der Spinmarker PCA für die Radikalmessung in verschiedensten Konzentrationen angewendet. Diese variierten bei Hautmessungen zum Beispiel von 0,1 mM in Human- [24] bis hin zu 10 mM in Schweinehaut [55]. Die Spinfalle PBN wurde unter anderem auf

Humanhaut in den Konzentrationen 0,2 M [26] bis hin zu 0,8 M [21] angewendet. Zu den Substanzmengen fehlten jedoch oft genaue Angaben für PCA [24, 25] und PBN [21, 26]. In ESR L-Band Studien unserer Arbeitsgruppe wurden je nach Untersuchungsmethode 50 µl PCA bei *ex vivo* Humanhaut und Tierhautmodellen [43] bis hin zu 100 µl bei *in vivo* Humanhaut [33] inkubiert. Unterschiedliche PCA- und PBN-Mengen (3, Abb. 4, a, b) und Konzentrationen (3, Abb. 2, A und Abb. 3) beeinflussen das Messergebnis der Radikalproduktion in bestrahlter Haut. Daher sind Studien mit unterschiedlichen Substanzmengen und Konzentrationen nur bedingt miteinander vergleichbar. [34]

Es wäre zu erwarten, dass in der Haut bei einer gleichen Bestrahlung eine gleiche Radikalanzahl induziert wird, unabhängig von der Menge oder Marker/Spinfallen-Konzentration. Jedoch zeigt sich mit steigender PCA Konzentration von 0,1 bis 1,5 mM (3, Abb. 2, a) ein signifikanter Anstieg der detektierten Radikalproduktion nach UVB-NIR-Bestrahlung. Bei einer kleineren Radikalanzahl, die im VIS-NIR-Bereich induziert wird, ist ab 0,6 mM kein signifikanter Anstieg der Radikalproduktion mehr zu beobachten. Es verändern sich somit die Verhältnisse der Radikalproduktionen zwischen dem hohen (UVB-NIR) zum geringeren oxidativen Stress (VIS-NIR) mit steigenden PCA Konzentrationen (3, Abb. 2, a). [34]

Dieser Effekt könnte auf eine Substanzverarmung des PCA in der Haut zurückzuführen sein. PCA reagiert mit den bestrahlungsinduzierten Radikalen in der Haut und wandelt sich dadurch zum ESR-inaktiven Hydroxylamin um [24]. Dementsprechend kann über die Verringerung des PCA-ESR-Signals auf die Anzahl der freien Radikale in der Haut rückgeschlossen werden (Abbildung 2, a). Ist das PCA jedoch „verarmt“, können nachträglich gebildete kurzlebige Radikale nicht mehr mit derselben Wahrscheinlichkeit durch das PCA nachgewiesen werden. Somit erklärt sich, dass bei höheren PCA-Konzentrationen mehr Radikale detektiert werden können. Dieser Effekt ist als kritisch einzuordnen und sollte bei quantitativen ESR-Untersuchungen immer berücksichtigt werden, da die Ergebnisse hinsichtlich der Radikalproduktionen ansonsten verfälscht werden könnten. Auch kann es zu einer Überinterpretation von einem kleineren zu einem größeren oxidativen Stress bei Substanzverarmung kommen. Ein Verarmungseffekt kann am besten bei kinetischen Messungen der Radikalproduktion erkannt werden. Tritt hier ein Abflachen der Messkurve auf, kann dies auf einen Verarmungseffekt hindeuten (3, Abb. 6, b bei UVB-UVA-Bestrahlung). [34]

Trotz Verarmungseffekte sind die Ergebnisse der Radikalproduktionen beider Messmethoden (Marker/Spinfallen) in ihrer Tendenz miteinander vergleichbar. Prinzipiell zeigen alle untersuchten PCA-Konzentrationen bei einer UVB-NIR-Bestrahlung eine höhere Radikalproduktion an als bei einer VIS-NIR-Bestrahlung (3, Abb. 2, a) [34]. Dies entspricht den Erwartungen, da die zusätzliche UV- neben der VIS-NIR-Bestrahlung zu einem weiteren oxidativen Stress in der Haut führt [21].

Die Herausforderung bei der Messung mit Spinmarkern und Spinfallen besteht darin, eine ausreichende Substanzkonzentration und -menge in der Haut anzubieten, um Verarmungseffekte zu minimieren. Gleichzeitig muss die Spinmarker-Konzentration gering genug sein, um Verbreiterungen im ESR-Signal oder bei Spinfallen toxische Effekte zu verhindern [27]. So zeigen PBN-Konzentrationen über 1 M keinen Anstieg der Radikalproduktion an (3, Abb. 3). Dies könnte unter anderem an toxischen Effekten des PBN liegen, die ab 0,5 M auftreten [27].

Als optimale Parameter für die vergleichenden Messungen mit den Substanzen PCA und PBN konnten folgende Präparationsparameter optimiert werden: 10 min Inkubation bei 32 °C mit 120 µl Substanzmenge von 0,6 mM PCA bei VIS-NIR- und 1,5 mM PCA bei UVB-NIR-Bestrahlung und 1 M PBN in allen Spektralbereichen. [34]

### **Vergleich der Radikalproduktion zwischen PCA und PBN behandelte ex vivo Haut**

Beide Messmethoden zeigen in PCA und PBN behandelte Haut mehr Radikale bei UVB-NIR- als bei VIS-NIR-Bestrahlung (3, Abb. 6, a, b). Die Ergebnisse zwischen beiden Methoden sind in ihren Verhältnissen miteinander vergleichbar. Bei beiden Verfahren zeigt sich ab 9,8 min. Bestrahlung ein Verhältnis von 80 % der Radikale im UVB-NIR- zu 20 % im VIS-NIR-Bereich (3, Abb. 7). In anderen Studien wurden bei UV-Bestrahlung 50 % der Radikale in exzidierte Humanhaut [21] und 60 % der Radikale in ex vivo Schweinehaut [33, 41], verglichen zu VIS-NIR Bestrahlung gefunden. Jedoch ist die hier vorgestellte Studie [34] mit den anderen Studien nicht direkt vergleichbar, da unterschiedliche Substanzkonzentrationen und Bestrahlungsparameter verwendet wurden, wodurch die relativen Verhältnisse der Radikalproduktionen beeinflusst werden. In dieser Studie [34] ging es vorrangig darum, die Vergleichbarkeit der Radikaldetektion zwischen Spinmarker (PCA) und Spinfallen (PBN) zu untersuchen, was signifikant nachgewiesen wurde.

Im Vergleich zu PBN ist PCA hinsichtlich der Detektion der Radikalproduktion empfindlicher (3, Abb. 6 A und B). Dies könnte an einer geringeren Eindringfähigkeit von PBN in die Haut liegen, da höhere Substanzkonzentrationen im Vergleich zu PCA benötigt wurden. Auch zeigt die Radikalproduktion (UVB-UVA) bei PBN behandelte Haut (3, Abb. 6, b) ein stärkeres Abflachen der Messkurve an als bei PCA (3, Abb. 6, a), was auf eine frühere Substanzverarmung von PBN gegenüber PCA hinweisen könnte. Zur Eindringfähigkeit von PCA und PBN konnten in Haut keine vergleichenden Studien gefunden werden, jedoch unterscheiden sich die Substanzen PCA und PBN in ihrer Polarität, während PCA hydrophile [56] und PBN lipophile [57] Eigenschaften aufweist, was die Substanzverteilung in der Haut beeinflussen könnte. Um eine möglichst vergleichbare Inkubation zu ermöglichen, wurde die exzidierte Haut von beiden Seiten über das *Stratum corneum* und die *Dermis* inkubiert.

PBN wird unter anderem zur Quantifizierung von kutanen bestrahlungsinduzierten Radikalen eingesetzt [21], da PBN erst bei der Reaktion mit Radikalen ein anwachsendes ESR-Signal zeigt

(Abb. 2, b). Dadurch können dem PBN-Signal eindeutig Radikale zugeordnet werden. Dies ist bei PCA nicht möglich, hier zeigt das ESR Spektrum nur das nicht-reagierte PCA an (Abbildung 2, a). Dadurch kann bei PCA nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es nicht auch mit Antioxidantien in der Haut reagiert. Die Vergleichsmessungen zwischen PBN und PCA zeigen jedoch vergleichbare Ergebnisse für die relative Verteilung und Kinetik der detektierten Radikalproduktion an. Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass das PCA vorwiegend mit Radikalen reagiert. Daraus folgend kann die PCA-Methode als valide betrachtet werden, um bestrahlungsinduzierte kutane Radikale zu messen.

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Stabilität von PCA und seiner relativen Vergleichbarkeit zu PBN, würde sich dieser Spinmarker für eine quantitative Radikalmessung unter der Bedingung, dass Verarmungseffekte berücksichtigt werden, eignen. Der Vorteil von PCA gegenüber PBN ist, dass PCA auch bei UV-Bestrahlung für eine Quantifizierung genutzt werden könnte. Bei einer UV-Bestrahlung reagiert die Spinfalle PBN mit eigenen Radikalen (Selbsttrapping), was zu einer Überinterpretation der Radikalproduktion im UV-Bereich führen kann. [34]

### **Einfluss der Bestrahlungsdosis auf die Radikalproduktion**

Mit der etablierten empfindlicheren Spinmarker-Messmethode konnte die Dosisabhängigkeit in einem einzelnen Spektralbereich (UVA) untersucht werden. Hierbei weist die kumulative Radikalproduktion von PCA behandelte *ex vivo* Schweinehaut bei verschiedenen Bestrahlungsstärken vergleichbare Kurvenverläufe (3, Abb. 5) auf, die eine positive Abhängigkeit von der UVA-Bestrahlungsdosis zeigen [34]. Dies bestätigt die vorhergehenden Untersuchungsergebnisse von Zastrow et al. in PBN behandelte *ex vivo* Humanhaut [28]. Das zeigt zusätzlich, dass mit PCA vergleichbare Ergebnisse zu PBN erzielt werden können und dementsprechend davon ausgegangen werden kann, dass mit der PCA-Messmethode valide kutane Radikale nachgewiesen werden können.

### **Ausblick**

Ausgehend von dem neuen Verständnis über die Radikaldetektion mittels des Spinnakers PCA könnte die, in dieser Arbeit entwickelte empfindlichere PCA-Methode optimiert werden, um eine valide Methode für die Quantifizierung von bestrahlungsinduzierten Radikalen in der Haut an der Charité zu ermöglichen. Zudem könnte durch das neu erworbene Wissen über eine effektive Präparations- und Messmethode von Hautbiopsien mittels der Spinfalle PBN im nächsten Schritt instabilere und damit schwieriger zu messende Spinfalle, die eine bessere Unterscheidbarkeit der induzierten Hautradikale ermöglichen, untersucht werden. Hierbei würde sich die Spinfalle DMPO anbieten, die eine Unterscheidbarkeit von Sauerstoffradikalen und kohlenstoffzentrierten Radikalen (z.B. Lipid-Radikale) in Haut ermöglichen könnte.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Norm CIE 85: 1989; Solar spectral irradiance, (1989).
- [2] A. Zittermann, J.F. Gummert, Sun, vitamin D, and cardiovascular disease, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, (2010) 124–129.
- [3] T. G. Polefka, T. A. Meyer, P. P. Agin, R.J. Bianchini, Effects of Solar Radiation on the Skin, *Journal of Cosmetic Dermatology*, (2011) 134–143.
- [4] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, (2007) 44–84.
- [5] D. Darr, I. Fridovich, Free Radicals in Cutaneous Biology, *J. Invest. Dermatol.*, (1994) 671–675.
- [6] C. W. Trenam, A. J. Dabbagh, C. J. Morris, D.R.Blake, Skin inflammation induced by reactive oxygen species (ROS): an in-vivo model, *British Journal of Dermatology*, (1991) 325–329.
- [7] M. Dalle Carbonate, M.A. Pathak, Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, (1992) 105-124.
- [8] J. F. O'Connell, A. J. P. Klein-Szanto, D. M. DiGiovanni, J. W. Fries, T.J. Slaga, Enhanced Malignant Progression of Mouse Skin Tumors by the Free Radical Generator Benzoyl Peroxide', *CANCER RESEARCH*, (1986) 2863-2865.
- [9] T.J. Slaga, A.J. Klein-Szanto, L.L. Triplett, L.P. Yotti, K.E. Trosko, Skin tumor-promoting activity of benzoyl peroxide, a widely used free radical-generating compound, *Science*, (1981) 1023-1025.
- [10] B. Halliwell, M. Whiteman, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *British Journal of Pharmacology* (2004) 231–255.
- [11] P. Fritsch, *Dermatologie und Venerologie Lehrbuch und Atlas*, Springer- Verlag Berlin Heidelberg New York 1998.
- [12] N.G. Jablonski, The evolution of human skin and skin color, *Annu Rev Anthropol*, (2004) 585–623.
- [13] R. Kohen, Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation, *Biomed & Pharmacother*, (1999) 181-192.
- [14] M. Darvin, L. Zastrow, W. Sterry, J. Lademann, Effect of Supplemented and Topically Applied Antioxidant Substances on Human Tissue, *Skin pharmacology and physiology*, (2006) 238–247.
- [15] J. J. Thiele, C. Schroeter, S. N. Hsieh, M. Podda, L. Packer, The antioxidant network of the stratum corneum., *Curr Probl Dermatol*, (2001) 26-42.
- [16] M. C. Meinke, R. Müller, A. Bechtel, S. F. Haag, M. E. Darvin, S. B. Lohan, F. Ismaeel, J. Lademann, Evaluation of carotenoids and reactive oxygen species in human skin after UV irradiation: a critical comparison between in vivo and ex vivo investigations, *Experimental Dermatology*, (2015) 194–197.
- [17] S. Briganti, M. Picardo, Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, (2003) 663–669.
- [18] B. K Armstrong, A. Krickler, The epidemiology of UV induced skin cancer, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, (2001) 8-18.
- [19] J. Lademann, M. C. Meinke, S. Schanzer, S. Albrecht, L. Zastrow, Neue Aspekte bei der Entwicklung von Sonnenschutzmitteln, *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und Verwandte Gebiete*, (2017) 349–353.
- [20] T. L. Diepgen, V. Mahle, The epidemiology of skin cancer, *British Journal of Dermatology*, (2002) 1-6.
- [21] L. Zastrow, N. Groth, F. Klein, D. Kockott, J. Lademann, R. Renneberg, L. Ferrero, The Missing Link – Light-Induced (280–1,600 nm) Free Radical Formation in Human Skin, *Skin pharmacology and physiology*, (2009) 31–44.
- [22] T.B. Fitzpatrick, The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI., *Arch Dermatol.*, (1988 ) 869-871.
- [23] L. Zastrow, O. Doucet, L. Ferrero, N. Groth, F. Klein, D. Kockott, J. Lademann, Free Radical Threshold Value: A New Universal Body Constant, *Skin pharmacology and physiology*, (2015) 264–268.
- [24] T. Herrling, J. Fuchs, J. Rehberg, N. Groth, UV-Induced free radicals in the skin detected by ESR spectroscopy and imaging using nitroxides, *Free Radical Biology & Medicine*, (2003) 59–67.
- [25] K. Jung, M. Seifert, Th. Herrling, J. Fuchs, UV-generated free radicals (FR) in skin: Their prevention by sunscreens and their induction by self-tanning agents, *Spectrochimica Acta Part A* 69, (2008) 1423–1428.
- [26] T. Herrling, L. Zastrow, J. Fuchs, N. Groth, Electron Spin Resonance Detection of UVA-Induced Free Radicals., *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, (2002) 381–383.
- [27] J. Fuchs, N. Groth, T. Herrling, In vitro and in vivo assessment of the irritation potential of different spin traps in human skin, *Toxicology*, (2000) 55–63.
- [28] L. Zastrow, L. Ferrero, T. Herrling, N. Groth, Integrated Sun Protection Factor: A New Sun Protection Factor Based on Free Radicals Generated by UV Irradiation, *Skin pharmacology and physiology*, (2004) 219–231.
- [29] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology & medicine*, Oxford University Press 2015.
- [30] R. Kirmse, J. Stach, *ESR-Spektroskopie Anwendungen in der Chemie*, Akademie-Verlag Berlin, (1985) 11 ff, 118.
- [31] A. Lund, M. Shiotani, S. Shimada, *Principles and Applications of ESR Spectroscopy*, New York: Springer Science+Business Media 2011.
- [32] J. Fuchs, T. Herrling, N. Groth, Detection of Free Radicals in Skin: A Review of the Literature and New Developments, *Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology*. *Curr Probl Dermatol*. Basel, Karger, (2001).
- [33] S. B. Lohan, R. Müller, S. Albrecht, K. Mink, K. Tscherch, F. Ismaeel, J. Lademann, S. Rohn, M.C. Meinke, Free radicals induced by sunlight in different spectral regions - In vivo vs. ex vivo study, *Experimental Dermatology*, (2016).
- [34] S. Albrecht, S. Ahlberg, I. Beckers, D. Kockott, J. Lademann, V. Paul, L. Zastrow, M.C. Meinke, Effects on detection of radical formation in skin due to solar irradiation measured by EPR spectroscopy, *Methods*, (2016).
- [35] S. Albrecht, S. Jung, R. Müller, J. Lademann, T. Zuberbier, L. Zastrow, C. Reble, I. Beckers, M.C. Meinke, Skin type differences in solar simulated radiation-induced oxidative stress, *British Journal of Dermatology*, (2018).
- [36] G.R. Buettner, Spin trapping: ESR parameters of spin adducts\*, *Free Radical Biology & Medicine*, (1987) 259-303.

- [37] B. A. Jurkiewicz, G.R. Buettner, EPR Detection of Free Radicals in UV-Irradiated Skin: Mouse Versus Human, *Photochemistry and Photobiology*, (1996) 918-922.
- [38] S.F. Haag, K. Tscherch, S. Arndt, A. Kleemann, I. Gersonde, J. Lademann, S. Rohn, M.C. Meinke, Enhancement of skin radical scavenging activity and stratum corneum lipids after the application of a hyperforin-rich cream, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (2014) 227-233.
- [39] T. P. Sullivan, W. H. Eaglstein, S. C. Davis, P. Mertz, The pig as a model for human wound healing., *Wound Repair Regen.*, (2001) 66-76.
- [40] T. Herrling, K. Jung, J. Fuchs, The Important Role of Melanin as Protector against Free Radicals in Skin, *SOFW JOURNAL* (2007) 26-32.
- [41] S. Arndt, S. F. Haag, A. Kleemann, J. Lademann, M.C. Meinke, Radical protection in the visible and infrared by a hyperforin-rich cream – in vivo versus ex vivo methods, *Experimental Dermatology*,, (2013) 354–357.
- [42] A. C. Lauer, N. Groth, S. F. Haag, M. E. Darvin, J. Lademann, M.C. Meinke, Radical scavenging capacity in human skin before and after vitamin C uptake: an in vivo feasibility study using electron paramagnetic resonance spectroscopy., *J Invest Dermatol.*, (2013) 1102–1104.
- [43] S. F. Haag, A. Bechtel, M. E. Darvin, F. Klein, N. Groth, M. Schafer-Korting, R. Bittl, J. Lademann, W. Sterry, M. C. Meinke, Comparative study of carotenoids, catalase and radical formation in human and animal skin, *Skin pharmacology and physiology*, (2010) 306-312.
- [44] F. Kompaore, J. P. Marty, C. Dupont, In vivo evaluation of the stratum corneum barrier function in blacks, Caucasians and Asians with two noninvasive methods., *Skin Pharmacol.* 6(3), (1993) 200-207.
- [45] D. Wilson, E. Berardesca, H.I. Maibach, In vitro transepidermal water loss: differences between black and white human skin, *British Journal of Dermatology*, (1988) 647-652.
- [46] R. M. Walters, P. Khanna, M. Chu, M.C. Mack, Developmental Changes in Skin Barrier and Structure during the First 5 Years of Life, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, (2016) 111–118.
- [47] M. E. Darvin, S. F. Haag, J. Lademann, L. Zastrow, W. Sterry, M.C. Meinke, Formation of free radicals in human skin during irradiation with infrared light. , *J. Invest. Dermatol.*, (2010) 629–631.
- [48] S. Schieke, H. Stege, V. Kürten, S. Grether-Beck, H. Sies, J. Krutmann, Infrared-A radiation-induced matrix metalloproteinase 1 expression is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human dermal fibroblasts., *J Invest Dermatol.*, (2002) 1323-1329.
- [49] P. Schroeder, J. Haendeler, J. Krutmann, The role of near infrared radiation in photoaging of the skin, *Experimental Gerontology*, (2008) 629–632.
- [50] S. Alaluf, D. Atkins, K. Barrett, M. Blount, N. Carter, A. Heath, Ethnic Variation in Melanin Content and Composition in Photoexposed and Photoprotected Human Skin, *PIGMENT CELL RES* 15, (2002) 112-118.
- [51] R. R. Anderson, J.A. Parrish, The Optics of Human Skin, *The Journal of Investigative Dermatology*, (1981) 13-19.
- [52] G. Zonios, A. Dimou, I. Bassukas, D. Galaris, A. Tsolakidis, E. Kaxiras, Melanin absorption spectroscopy: new method for noninvasive skin investigation and melanoma detection, *Journal of Biomedical Optics*, (2008) 014017-014011-014018.
- [53] M.Y. Akhalaya, G. V. Maksimov, A .B. Rubin, J. Lademann, M.E. Darvin, Molecular action mechanisms of solar infrared radiation and heat on human skin, *Ageing Research Reviews*, (2014) 1-11.
- [54] S. M. Schieke, P. Schroeder, J. Krutmann, Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms, *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, (2003) 228–234.
- [55] T. Herrling, K. Jung, J. Fuchs, Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin, *Spectrochimica Acta Part A* 63, (2006) 840–845.
- [56] S.F. Haag, E. Fleige, M. Chen, A. Fahr, C. Teutloff, R. Bittl, J. Lademann, M. Schäfer-Korting, R. Haag, M.C. Meinke, Skin penetration enhancement of core–multishell nanotransporters and invasomes measured by electron paramagnetic resonance spectroscopy, *International Journal of Pharmaceutics*, (2011) 223-228.
- [57] S. Kim, G. V. M. de A. Vilela, J. Bouajila, A. G. Dias, F. Z. G. A. Cyrino, E. Bouskela, P. R. R. Costab, F. Nepveua, a-Phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) derivatives: Synthesis and protective action against microvascular damages induced by ischemia/reperfusion, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (2007) 3572–3578.

## 8 Eidesstattliche Versicherung und ausführliche Anteilserklärung

### Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Stephanie Albrecht, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der Radikalbildung durch Sonnenbestrahlung in Abhängigkeit der Dosis und spektralen Bereiche“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s .o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift



## **Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen**

Stephanie Albrecht hatte Anteil an den folgenden Publikationen:

### **Publikation 1:**

Silke B. Lohan, Robert Müller, Stephanie Albrecht, Kathrin Mink, Kathrin Tscherch, Fakher Ismaeel, Jürgen Lademann, Sascha Rohn, Martina C. Meinke, Free radicals induced by sunlight in different spectral regions – in vivo versus ex vivo study, *Experimental Dermatology*, 2016, 25(5):380-5. DOI: 10.1111/exd.12987

[Impact Faktor 2,532]

Beitrag im Einzelnen: Unterstützung bei der Bestrahlung, Kontrolle und Einrichtung des Sonnensimulators vor den *in vivo* Messungen sowie Unterstützung bei der Berechnung der Ergebnisse. Mitarbeit am Manuskript im Bestrahlungspart.

### **Publikation 2:**

Stephanie Albrecht, Sora Jung, Robert Müller, Jürgen Lademann, Thorsten Zuberbier, Leonhard Zastrow, Carina Reble, Ingeborg Beckers, Martina C. Meinke, Skin type differences in solar simulated radiation-induced oxidative stress, *British Journal of Dermatology*; 2018; DOI: 10.1111/bjd.17129

[Impact Faktor 6,129]

Beitrag im Einzelnen: Erstellung des Ethikantrages. Durchführung der Messung an hellen (6 Probanden) und dunklen Hauttypen (6 Probanden) sowie Kontrolle der Bestrahlung. Anschließende Berechnung der Daten, statistische Auswertung und Interpretation der Ergebnisse. Verfassung und Revision des Manuskripts.

### **Publikation 3:**

Stephanie Albrecht, Sebastian Ahlberg, Ingeborg Beckers, Dieter Kockott, Jürgen Lademann, Victoria Paul, Leonhard Zastrow, M.C. Meinke, Effects on detection of radical formation in skin due to solar irradiation measured by EPR spectroscopy, *Methods*, (109) 44-54, 2016, DOI: 10.1016/j.ymeth.2016.06.005

[Impact Faktor 3,802]

Beitrag im Einzelnen: Etablierung der ESR- Methoden zur Detektion von bestrahlungsinduzierten freien Radikalen in der Haut mit Spinmarkern und Spinfallen. Anpassung des bestehenden Messaufbaus durch Entwicklung einer Bestrahlungshalterung. Kontrolle der Bestrahlung sowie Durchführung der Messung (Einfluss der Präparationsparameter, Untersuchung der Dosisabhängigkeit und spektrale Vergleichsmessung zwischen PCA und PBN behandelte *ex vivo* Schweineohrhaut). Berechnung der Daten einschließlich Untersuchung der

Berechnungsmethoden und statistischer Auswertung. Interpretation der Ergebnisse, Verfassung und Revision des Manuskriptes.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---

## 9 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Um Veröffentlichungsrechte nicht zu verletzen, werden die Publikationen, die der Promotion zugrundeliegenden nicht im Volltext aufgeführt.

### 9.1 Publikation 1

#### **Free radicals induced by sunlight in different spectral regions – in vivo versus ex vivo study**

Silke B. Lohan<sup>1</sup>, Robert Müller<sup>1</sup>, Stephanie Albrecht<sup>1</sup>, Kathrin Mink<sup>3</sup>, Kathrin Tscherch<sup>3</sup>, Fakher Ismaeel<sup>2</sup>, Jürgen Lademann<sup>1</sup>, Sascha Rohn<sup>3</sup>, Martina C. Meinke<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Dermatology, Venerology and Allergology, Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

<sup>2</sup> Department of Gynecology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

<sup>3</sup> Institute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Hamburg, Germany

<https://dx.doi.org/10.1111/exd.12987>

## 9.2 Publikation 2

### **Skin type differences in solar simulated radiation-induced oxidative stress**

Stephanie Albrecht<sup>1</sup>, Sora Jung<sup>1</sup>, Robert Müller<sup>1</sup>, Jürgen Lademann<sup>1</sup>, Thorsten Zuberbier<sup>1</sup>,  
Leonhard Zastrow<sup>1</sup>, Carina. Reble<sup>1,2</sup>, Ingeborg Beckers<sup>3</sup>, Martina C. Meinke<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Dermatology Venerology and Allergology, Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

<sup>2</sup> Courage + Khazaka Electronic GmbH, Mathias-Brüggen-Straße 91, 50829 Köln, Germany

<sup>3</sup> Beuth University of Applied Sciences Berlin, Luxemburger Straße 10, in 13353 Berlin, Germany

<https://dx.doi.org/10.1111/bjd.17129>

### 9.3 Publikation 3

#### **Effects on detection of radical formation in skin due to solar irradiation measured by EPR spectroscopy**

Stephanie Albrecht <sup>1</sup>, Sebastian Ahlberg <sup>1</sup>, Ingeborg Beckers <sup>2</sup>, Dieter Kockott <sup>3</sup>, Jürgen Lademann <sup>1</sup>, Victoria Paul <sup>1</sup>, Leonhard Zastrow <sup>1</sup>, Martina C. Meinke <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Center of Applied Cutaneous Physiology (CCP), Department of Dermatology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1 in 10117 Berlin, Germany

<sup>2</sup> Beuth University of Applied Sciences Berlin, Luxemburger Straße 10 in 13353 Berlin, Germany

<sup>3</sup> UV-Technik, Vogelsbergstraße 27 in 63456 Hanau, Germany

<https://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.06.005>

## **10 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 11 Komplette Publikationsliste

### 11.1 Publikationen

1. Stephanie Albrecht, Sora Jung, Robert Müller, Jürgen Lademann, Thorsten Zuberbier, Leonhard Zastrow, Carina Reble, Ingeborg Beckers, Martina C. Meinke; Skin type differences in solar simulated radiation-induced oxidative stress, *British Journal of Dermatology*; 2018; DOI: 10.1111/bjd.17129
2. Leonhard Zastrow, Martina C. Meinke, Stephanie Albrecht, Alexa Patzelt, Jürgen Lademann; From UV Protection to Protection in the Whole Spectral Range of the Solar Radiation: New Aspects of Sunscreen Development.; *Adv Exp Med Biol.*; 2017; 996:311-318; DOI: 10.1007/978-3-319-56017-5\_26.
3. Jürgen Lademann, Martina C. Meinke, Sabine Schanzer, Stephanie Albrecht, Leonhard Zastrow; New aspects in the development of sunscreens agents; *Hautarzt*; 2017; 68(5):349-53; DOI: 10.1007/s00105-017-3965-9
4. Carla Souza, Patricia Maia Campos, Sabine Schanzer, Stephanie Albrecht, Silke B. Lohan, Jürgen Lademann, Maxim E. Darvin, Martina C. Meinke; Radical-Scavenging Activity of a Sunscreen Enriched by Antioxidants Providing Protection in the Whole Solar Spectral Range; *Skin pharmacology and physiology*; 2017; 30(2):81–89; DOI: 10.1159/000458158
5. Stephanie Albrecht, Sebastian Ahlberg, Ingeborg Beckers, Dieter Kockott, Jürgen Lademann, Victoria Paul, Leonhard Zastrow, M.C. Meinke; Effects on detection of radical formation in skin due to solar irradiation measured by EPR spectroscopy; *Methods*; (109) 44-54; 2016; DOI: 10.1016/j.ymeth.2016.06.005
6. Silke B. Lohan, Robert Müller, Stephanie Albrecht, Kathrin Mink, Kathrin Tscherch, Fakher Ismaeel, Jürgen Lademann, Sascha Rohn, Martina C. Meinke, Free radicals induced by sunlight in different spectral regions - in vivo versus ex vivo study; *Exp Dermatol.*; 2016; 25(5):380-5, DOI: 10.1111/exd.12987
7. Nadine Döge, Erika Thiel, Gunter Seewald, Stephanie Albrecht, Annika Vogt, Julia Liebscher, Karl-Heinz Schönborn; Wide-field Two Photon Microscopy Transcending technology limitations; *Optik & Photonik*; 2015; 10(5):39-42; DOI: 10.1002/opph.201500035

8. Michael Gierlak; Stephanie Albrecht; Josef Kauer; Eric Leverenz; Ingeborg E. Beckers; Wavefront coding using a spatial light modulator for extended depth of field microscopy; Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging III, 879803; 2013; DOI: 10.1117/12.2032618

## 11.2 Poster

1. Stephanie Albrecht, Ceyda Kasim, Anja Elpelt, Sarah Hedtrich, Achim Gruber, Christian Witzel, Jürgen Lademann, Leonhard Zastrow, Ingeborg Beckers, Martina C. Meinke; Quantification and Characterization of cutaneous irradiation induced radical formation by EPR spectroscopy in different skin models; 2nd Sino-German Symposium Berlin 2017
2. Stephanie Albrecht, Ingeborg Beckers, Jürgen Lademann, Martina C. Meinke; Quantification of cutaneous radical formation in the UV and VIS-NIR spectral range measured by EPR spectroscopy; 30. Treffpunkt Medizintechnik „Glanzlichter der Medizintechnik“, Charité-Universitätsmedizin, Berlin 2016

## 11.3 Präsentationen

1. Stephanie Albrecht, Ceyda Kasim, Anja Elpelt, Carina Reble, Lars Mundhenk, Hannah Pischon, Sarah Hedtrich, Christian Witzel, Jürgen Lademann, Leonhard Zastrow, Ingeborg Beckers, Martina C. Meinke; Limits and possibilities to detect free radical formation in skin during UV- irradiation; International Conference on UV LED Technologies & Application; Berlin (2018)
2. Stephanie Albrecht; Investigation of radical formation in skin during sun irradiation with EPR spectroscopy; Student Symposium vom Sonderforschungsbereich 1112; Lehnin, Brandenburg (2017)
3. Stephanie Albrecht, Ceyda Kasim, Anja Elpelt, Sarah Hedtrich, Achim Gruber, Christian Witzel, Jürgen Lademann, Leonhard Zastrow, Ingeborg Beckers, Martina C. Meinke; Quantification and Characterization of irradiation induced radical production in different skin models by EPR, 9<sup>th</sup> Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar “Biomedical Sciences”, Berlin (2017)
4. Stephanie Albrecht, Ceyda Kasim, Anja Elpelt, Sarah Hedtrich, Achim Gruber, Christian Witzel, Jürgen Lademann, Leonhard Zastrow, Ingeborg Beckers, Martina C. Meinke; Quantification and qualification of irradiation induced radical production in human and animal skin models; Forschungsseminar Fachbereich Physik, Freie Universität Berlin, (2017)



5. Stephanie Albrecht, Ceyda Kasim, Anja Elpelt, Sarah Hedtrich, Achim Gruber, Christian Witzel, Jürgen Lademann, Leonhard Zastrow, Ingeborg Beckers, Martina C. Meinke; Radical formation in different skin models during irradiation and their detection possibilities; Research-Seminar Department of Dermatology and Allergy Charité – Universtätsmedizin Berlin Klinik für Dermatologie und Allergologie, Berlin (2017)
6. Stephanie Albrecht, Comparability of radical formation in irradiated skin measured with spin probe and spin trap by EPR spectroscopy, Disciplinary Forum of the SFB 1112, Institute of Chemistry and Biochemistry, FU Campus Dahlem, Berlin (2016)
7. Stephanie Albrecht, ESR- Messung von bestrahlungsinduzierten freien Radikalen in der Haut mittels Spin- Marker und Spin- Traps, Treffen der Stiftung für Hautphysiologie, Charité- Universitätsmedizin Berlin, Berlin (2016)

## 12 Danksagung

Bei der hier vorgestellten Promotionsarbeit handelt es sich um ein kooperatives Projekt zwischen der Charité - Universitätsmedizin Berlin und der Beuth Hochschule für Technik Berlin. Zudem wurde dieses Projekt durch den Physik-Bereich der Freien Universität Berlin unterstützt. Während der Promotion habe ich von allen Seiten freundliche und kompetente Unterstützung erfahren. Für diese Unterstützung und Förderung möchte ich mich bei allen Beteiligten ganz herzlich bedanken.

Frau Prof. Dr. Martina Meinke von der Charité - Universitätsmedizin Berlin danke ich für das spannende Forschungsthema. Auch möchte ich mich bei Frau Prof. Meinke für ihre ausgezeichnete Betreuung als Doktormutter bedanken und dass sie mir geholfen hat, den roten Faden zu behalten, um mich beim Forschen nicht zu verlieren. Auch möchte ich mich bei Frau Prof. Meinke für Ihre frischen Ideen und die anregenden fachlichen Diskussionen, die ich sehr genossen habe, bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Ingeborg Beckers von der Beuth Hochschule für Technik Berlin möchte ich mich für Ihre freundliche Co-Betreuung meiner Promotion bedanken und für ihre kompetente Hilfestellung bei optischen und physikalischen Problemen. Ich danke ihr dafür, dass sie mich während der Promotion und des vorangegangenen Studiums so gut unterstützt und gefördert hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Lademann möchte ich mich bedanken, dass er mich so freundlich in seinem Team aufgenommen und mir ermöglicht hat, in seinen Laboren an der Charité zu forschen. Auch danke ich ihm für seine Unterstützung und sein Vertrauen in meine Forschungsarbeit.

Frau Dr. Silke Lohan danke ich für das Korrekturlesen und ihre nützlichen Anregungen. Auch möchte ich mich bei Frau Sabine Grenz für Ihre sorgfältige Englischübersetzung des dritten Promotionspapers und ihre Englischkorrekturen der anderen beiden Promotionspublikationen bedanken. Auch danke ich Frau Christiane Domke für ihre sorgfältige Deutschkorrektur des Dissertationsmanuskriptes.

Mein Dank gilt auch allen, die mich durch Ihre kompetente Hilfe bei Fragen unterstützt und mir im Laufe des Promotionsprojektes neue Anregungen gegeben haben. Herrn Prof. Dr. Torsten Zuberbier danke ich hierbei für seine spannende Idee, die Radikalproduktion auch an dunklen Hauttypen zu untersuchen. Herrn Prof. Dr. Leonhard Zastrow danke ich für seine fachkundige Beratung bei der Verwendung von Spinfällen. Auch danke ich Frau Dr. Sora Jung für Ihre medizinische Beratung bei dermatologischen Fragen. Herrn Dr. Johannes Schleusener danke ich für seine geduldige Hilfe bei Fragen zur Statistik, englischer Grammatik und Organisation. Frau Dr. Carina Reble danke ich für Ihre Hilfe bei der Vermessung und der Berechnung der Sonnensimulator-Spektren. Auch gilt hierbei mein Dank Herrn Dr. Dieter Kockott für seine geduldige und kompetente Hilfestellung bei Bestrahlungsfragen. Herrn Prof. Dr. Robert Bittl und

Herrn Dr. Christian Teutloff von der Freien Universität Berlin danke ich für die geduldige Hilfestellung bei Fragen zur ESR-Spektroskopie.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jürgen Lademann an der Charité - Universitätsmedizin Berlin für ihre Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Es hat mir große Freude bereitet, mit ihnen zusammenzuarbeiten.

Diese Forschungsarbeit wurde durch Promotionsstipendien vom Sonderforschungsbereich 1112 „Nanocarrier“, der Sonnenfeld Stiftung - Stiftung des privaten Rechts, der Forschungsförderung der Beuth Hochschule für Technik Berlin und dem Hypatia Programm zur Förderung von Nachwuchswissenschaftlerinnen an der Beuth Hochschule für Technik Berlin gefördert. Ihnen gilt mein Dank für Ihre finanzielle Unterstützung während der Promotionsphase. Auch gilt mein Dank der Studienstiftung des deutschen Volkes, die mich während meines vorangegangenen Bachelor- und Masterstudiums ideell und finanziell unterstützt und mir damit mehr Zeit für mein Studium und den Zugang zur Promotion ermöglicht hat.

Ich danke besonders den lieben Menschen, die mich im privaten Raum  
unterstützt und mir Mut gegeben haben.