

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

DISSERTATION

Radikalbildung *in vivo* / *ex vivo*
nach Bestrahlung verschiedener Wellenlängen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Robert Müller

aus Naumburg

Datum der Promotion: 05.03.2021

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Meinke MC, Muller R, Bechtel A, Haag SF, Darvin ME, Lohan SB, Ismaeel F, Lademann J. Evaluation of carotenoids and reactive oxygen species in human skin after UV irradiation: a critical comparison between in vivo and ex vivo investigations. *Exp Dermatol*, 2015. 24: p. 194–197.

Lohan SB, Muller R, Albrecht S, Mink K, Tscherch K, Ismaeel F, Lademann J, Rohn, S, Meinke MC. Free radicals induced by sunlight in different spectral regions - *in vivo* versus *ex vivo* study. *Exp Dermatol*, 2016. 25(5): p. 380-5.

Albrecht S, Jung S, Muller R, Lademann J, Zuberbier T, Zastrow L, Reble C, Beckers I, Meinke MC, Skin type differences in solar simulated radiation-induced oxidative stress. *Br J Dermatol*, 2018.

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	I
2	Abbildungsverzeichnis	III
3	Tabellenverzeichnis	III
4	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
5	Zusammenfassung	1
5.1	Abstract.....	3
6	Einleitung	5
6.1	Motivation	5
6.2	Hintergrund	6
7	Grundlagen	7
7.1	Haut und Lipide.....	7
7.1.1	Aufbau und Funktion der Haut.....	7
7.1.2	Lipide der Haut	9
7.2	Das elektromagnetische Spektrum.....	12
7.3	Antioxidatives System.....	17
7.4	Radikale.....	20
7.5	Methoden zur Messung von Radikalen	22
7.5.1	Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie.....	22
7.5.2	Markersubstanzen	25
7.5.3	Alternative Methoden zur indirekten Messung von Radikalen.....	28
8	Methoden.....	29
8.1	Studiendesign	29
8.2	Materialliste.....	31
8.3	Auswahl der Probanden	32
8.4	Fragebogen zu Ernährungs- & Lebensgewohnheiten	34
8.5	Vorbereitung der Haut für <i>in vivo</i> ESR-Messungen.....	35
8.6	Probenvorbereitung für die <i>ex-vivo</i> -ESR-Untersuchungen.....	36
8.7	Bestrahlung.....	38
8.8	ESR Parameter und Messdurchführung.....	38
8.9	Lipidextraktion.....	40

8.10	Lipidanalyse mit HPTLC.....	41
8.11	Statistik.....	43
9	Ergebnisse.....	44
9.1	Radikalbildung durch UV-Licht	44
9.2	Radikalbildung durch sichtbares und nahes infrarotes Licht	47
9.3	<i>In vivo</i> Radikalbildung durch NIR-Licht.....	49
9.4	<i>In vivo</i> Vergleich Radikalproduktion UV, NIR, VIS.....	51
9.5	Lipidextraktion.....	52
9.6	Ernährungs- & Lebensgewohnheiten	54
10	Diskussion	54
10.1	Radikalbildung bei verschiedenen Wellenlängen	55
10.1.1	UV.....	55
10.1.2	VIS/NIR.....	58
10.2	Schutz der Haut vor Sonnenstrahlung	63
10.3	Analyse der Hautlipide nach Lipidextraktion	64
10.4	Fehlerdiskussion	65
11	Schlussfolgerung und Ausblick.....	67
12	Literaturverzeichnis.....	68
13	Fragebogen zur Ernährung und Lebensgewohnheiten	76
14	Anteilerklärung an erfolgten Publikationen	85
15	Eidesstattliche Versicherung	86
16	Curriculum vitae.....	87
17	Danksagung.....	88

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Haut	9
Abbildung 2: Struktur eines Sphingolipids	12
Abbildung 3: Elektromagnetisches Spektrum	13
Abbildung 4: sichtbares Licht	16
Abbildung 5: Elektronen-Spinresonanz-Spektroskop (ESR)	23
Abbildung 6: Zeeman-Aufspaltung	25
Abbildung 7: Spin Marker PCA	26
Abbildung 8: Veranschaulichung der Neutralisierung von PCA	27
Abbildung 9: Übersicht der Untersuchungen in den verschiedenen	31
Abbildung 10: Präparierung der Schweineohren	36
Abbildung 11: Bestrahlung der Hautbiopsie mit UV-Licht	37
Abbildung 12: Densitogramm	42
Abbildung 13: Abfall der relativen ESR Intensität nach Bestrahlung mit UV-Licht	45
Abbildung 14: Vergleich der Radikalbildung mit UV-Licht nach 2 und 4 Minuten	46
Abbildung 15: Vergleich der zeitlichen Abhängigkeit der Radikalbildung während der UV Bestrahlung	47
Abbildung 16: Säulendiagramm UV und VIS/NIR Vergleich bei 4 Minuten	48
Abbildung 17: Vergleich der zeitlichen Abhängigkeit der Radikalbildung während der VIS/NIR Bestrahlung	49
Abbildung 18: Kumulative Radikalbildung nach NIR Bestrahlung in vivo	50
Abbildung 19: Liniendiagramm in vivo Vergleich	51
Abbildung 20: Säulendiagramm Vergleich in vivo	52
Abbildung 21: Säulendiagramm der Lipidextraktion	53

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Sebumlipide	10
Tabelle 2: Prozentuale Verteilung der Lipide des Stratum corneums	11
Tabelle 3: Elektromagnetisches Spektren und ihre Wellenlängen	13
Tabelle 4: Intrazelluläre Enzyme und ihre Summenformel	19
Tabelle 5: Radikale und ihre Halbwertszeiten	26
Tabelle 6: Materialien	31
Tabelle 7: Kriterien der Studie	32
Tabelle 8: Anzahl, Alter BMI und Rauchgewohnheiten der Probanden	33
Tabelle 9: Lipide des Densitogrammes	42

4 Abkürzungsverzeichnis

a.u.	arbitrary unit (willkürlichen Einheiten)
Asc ^{•-}	Ascorbinsäure Radikal
B	Magnetfeldstärke
DCFH	2',7'-dichlorodihydrofluorescein
ESR	Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie
GHz	Gigahertz
G-SH	Glutathion
GS-SG	Glutathiondisulfid
HOCL	hypochlorige Säure
OH [•]	Hydroxylradikal
OOH [•]	Hydroperoxylradikal
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPTLC	high-performance thin-layer chromatography, Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie
LDL	Low-Density Lipoprotein
MED	minimale Erythemdosis
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mT	Millitesla
m ²	Quadratmeter
MMP	Matrix Metalloproteinase
NIR	nahes Infrarotlicht
NO [•]	Nitroxiradikal
NOS	reaktive Stickstoffspezies
O ₂ ^{•-}	Superoxidanion
O ₂ ⁻	Dioxidanion
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
PCA	Carboxy-2,2,5,5-Tetramethyl-1-Pyrrolidinoxy

ROO•	Peroxyradikal
R*	Radikal
RO•	Alkoxyradikal
s	Sekunde
SWO	Schweineohren
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SOD	Superoxiddismutase
UV	Ultraviolett
UV-A	Ultraviolett-A
UV-B	Ultraviolett-B
VIS	visible light, sichtbares Licht

5 Zusammenfassung

Radikalbildung *in vivo* / *ex vivo* nach Bestrahlung verschiedener Wellenlängen

Sonnenlicht leistet durch die Vitamin-D-Synthese in der Haut einen wichtigen Beitrag für unsere Gesundheit. Wird zu lange in der Sonne verweilt, übersteigen die negativen Aspekte und es kann zu einer vermehrten Bildung von Radikalen kommen. Diese können zu Schäden der DNS, Hautalterung und letztendlich Krebsentstehung führen.

Ziel war es zu untersuchen, ob *in vivo* nicht nur die Bestrahlung mit UV-Licht, sondern auch die Bestrahlung mit VIS- und NIR-Licht Radikale bilden und diese Ergebnisse mit *ex vivo* Ergebnissen zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurden insgesamt 23 Probanden mit den o.g. Lichtspektren bestrahlt. Die entstandenen Radikale der Haut wurden mit einem L-Band ESR Spektrometer und einer Markersubstanz (PCA) quantitativ gemessen. Zum Vergleich dieser *in vivo* Ergebnisse mit *ex vivo* Hautmodellen wurde Humanhaut von Bauch- und Brusthautresektionen (n=6) sowie Haut von Schweineohren als Tiermodell unter vergleichbaren Bedingungen untersucht (n=18). Um Auswirkungen der Bestrahlung auf die Hautlipide zu studieren, wurde die Lipidzusammensetzung des Stratum corneum der Probanden vor und nach Bestrahlung mittels HPTLC bestimmt.

Mit UV-Licht bestrahlte Probanden bildeten wie erwartet den größten Anteil an Radikalen. Dies ist mit der hohen Absorption von UV-Licht im Gewebe und dem stetigen Nachschub von Sauerstoff in das durchblutete Gewebe geschuldet. *Ex vivo* wurden deutlich weniger Radikale gebildet.

Mit VIS/NIR-Licht bestrahlte Probanden bildeten im Vergleich zur *ex vivo* Untersuchung ebenfalls signifikant mehr Radikale. Auch bei der Bestrahlung von *ex vivo* Haut mit VIS/NIR-Licht kam es noch eindeutig zur Bildung von Radikalen, jedoch deutlich weniger im Vergleich zu *in vivo*. Da NIR-Licht, entsprechend seiner Wellenlänge, in tiefere Hautschichten eindringen kann, wird davon ausgegangen, dass enzymatische Prozesse bei der Bildung von Radikalen von entscheidender Rolle sind. Der schnelle

Funktionsverlust der Enzyme *ex vivo* führt entsprechend zur verminderten Bildung von Radikalen. Selbst bei der Bestrahlung mit isoliertem NIR-Licht *in vivo* entstanden noch 34 % der Radikale von VIS- und NIR-Licht zusammen und 18 % der Radikale von UV-Licht.

Die Analyse der Lipidzusammensetzung ergab nach der Bestrahlung mit UV- sowie VIS/NIR-Licht eine Abnahme verschiedener Lipide. Diese Abfälle könnten durch die Bildung von Radikalen in der Haut nach der Bestrahlung mit UV- und VIS/NIR-Licht erklärt werden.

Diese Studie zeigte, dass Sonnenlicht nicht nur im UV-, sondern auch im VIS- und NIR-Bereich zur Bildung von Radikalen in der Haut führt. Um einen optimalen Sonnenschutz zu gewährleisten ist es notwendig Haut im gesamten Sonnenspektrum vor schädlicher Wirkung zu schützen.

5.1 Abstract

Production of radicals *in vivo* /*ex vivo* after irradiation of different wavelengths

Sunlight plays a major part for healthy living through vitamin-D-synthesis. However, if people stay for too long in sunlight hazard effects exceed. Consequences like increased production of radicals which are able to damage the DNA, skin aging and finally cancer can occur.

Aim was to investigate if *in vivo* not only UV-light, but also VIS- and NIR-light leads to the formation of radicals too and compare these findings with the *ex vivo* results. For this aim 23 subjects with the above-mentioned light spectra were irradiated. The new formed radicals were quantitative measured with a marker substance (PCA) and an L-Band-EPR spectrometer. To compare these *in vivo* results with *ex vivo* skin models, human abdominal skin and skin from breast reduction (n=6), as well as pig ear skin as an animal model, were investigated (n=18). To investigate effects of the irradiation to skin lipids, the lipid composition of the stratum corneum of the subjects was determined before and after irradiation using HPTLC.

As expected, subjects irradiated with UV-light produced the biggest part of radicals. This is due to the high absorption of UV-light in the skin and the constant oxygen supply in the blood perfused tissue. Clearly less radicals were produced *ex vivo*.

Comparatively subjects irradiated with VIS/NIR-light as well formed many radicals compared to *ex vivo* investigation. Also after irradiation of *ex vivo* skin with VIS/NIR-light radical formation clearly was observed however, it was less pronounced compared to *in vivo*.

NIR-light is able to reach deeper skin layers through its longer wavelength. This is why it's assumed here enzymatic processes play a key role in radical production. The fast loss of function of enzymes *ex vivo* leads to a reduced production of radicals.

Even irradiation with isolated NIR-light *in vivo* formed 34 % of the radicals of VIS- and NIR-light combined and even 18 % of the radicals of UV-light.

The analysis of the lipid composition after irradiation with UV- and VIS/NIR-light shows a lowering of certain lipids. These decreases could be explained by the creation of radicals in the skin after irradiation with UV- and VIS/NIR-light.

This study shows that sunlight leads to the creation of radicals not only in the UV- but also in the VIS/NIR-range. To provide an optimal protection it's necessary to protect skin in the whole spectral range against harmful effects.

6 Einleitung

6.1 Motivation

Wir sind jeden Tag in unterschiedlichem Maße Sonnenlicht ausgesetzt. Manch einer bekommt weniger Strahlung ab, andere wie z.B. Dachdecker haben berufsbedingt eine hohe Belastung. Generell tendiert der Trend dazu, viel Zeit in der Sonne zu verbringen. So wird eine gebräunte Hautfarbe als Schönheitsideal angesehen, was zu häufigeren und längeren Aufenthalten in der Sonne führt. Zusammen mit einem Anstieg der Lebenserwartung kommt es, im Vergleich zu früheren Generationen, zu einer insgesamt höheren Strahlenbelastung.

Es ist hinreichend bekannt, dass zu viel Sonnenstrahlung, vor allem wegen des besonders schädlichen UV-Licht-Anteils, zu faltiger, runzlicher Haut mit einem erhöhten Risiko für Hautkrebs führt [2]. Die Tatsache, dass die Ozonschicht zunehmend dünner wird und es somit zu einer geringeren Absorption des UV-B-Lichts kommt, verdeutlicht die Wichtigkeit eines ausreichenden Sonnenschutzes.

Es ist aber nicht bekannt, wie schädlich die Strahlung im sichtbaren (VIS) und nahen infraroten (NIR) Spektralbereich ist. Hier gibt es von Zastrow et al. erste *ex vivo* Daten zur Radikalbildung in exzidiierter Haut, deren Bedeutung *in vivo* aber noch nicht untersucht wurde [3]. Die *ex vivo* Ergebnisse weisen auf eine Radikalproduktion von bis zu 50 % im VIS+NIR-Bereich hin. Damit wäre u.a. erklärbar, warum trotz Applikation von Sonnenschutzcremes weiterhin die Tumorraten steigen. Ob diese Verteilung auch *in vivo* gilt, wurde vor Beginn dieser Arbeit nicht untersucht.

In vivo Untersuchungen zur Radikalmessung erfordern ein spezielles Messinstrument, von denen nur sehr wenige auf der Welt existieren. Eines dieser Instrumente befindet sich in der Dermatologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin. Weiterhin ist der Vergleich von *ex vivo* und *in vivo* Untersuchungen sehr schwierig und muss unter möglichst vergleichbaren Bedingungen durchgeführt werden. Dieser Aufgabe widmet sich die hier vorgestellte Doktorarbeit.

6.2 Hintergrund

Es gibt verschiedene Methoden um Radikale nachzuweisen. Dieses kann zum einen in Zellkulturen (*in vitro*) geschehen. Als Beispiel sei hier die Fluoreszenzspektroskopie genannt. Dabei wird 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) benutzt, welches in Anwesenheit von Radikalen wie ROS und NOS (reaktive Sauerstoff – und Stickstoffspezies) zu 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. DCF ist ein stark fluoreszierendes Molekül, welches mithilfe eines Fluoreszenzspektrometers nachgewiesen werden kann [4].

Es wurden in *ex vivo* Untersuchungen an human exzidiierter Haut gezeigt, dass nicht nur unter UV-Licht Radikale entstehen, sondern auch andere Wellenlängenbereiche, wie sichtbares Licht (VIS) oder nahes Infrarotlicht (NIR) schädliches Potential haben. Auch diese Wellenlängenbereiche führen zur Entstehung von Radikalen [3].

Vandersee et al. zeigten, dass der Karotin-Gehalt der Haut nach Bestrahlung mit blau-violettem Licht abfiel, was auf die Entstehung von Radikalen hindeutet. Weitere Studien belegen, dass die Bestrahlung mit sichtbarem Licht ebenfalls zur Bildung von Radikalen führt [5, 6]. So kam es, wie bei der Bestrahlung mit UV-Licht, zur Bildung von ROS, proinflammatorischen Zytokinen und der vermehrten Expression von MMP's (Matrix Metalloproteinasen), welche die Spaltung von Peptidbindungen in Proteinen katalysieren.

Außerdem wurden von Meinke et al. [7] nachgewiesen, dass mit Infrarotlicht bestrahlte Haut von Schweineohren weniger Radikale bilden, wenn diese mit Sonnencreme behandelt wurden. Dies legt nahe, dass auch menschliche Haut von Sonnencremes profitieren könnte, welche vor NIR-Strahlen schützen. Es existieren bereits *ex vivo* Untersuchungen an exzidiierter Humanhaut. Nachdem die Haut mit UV-Licht bestrahlt wurde, zeigte sich, dass trotz des Umstandes dass es sich nicht um lebende Haut handelte, immer noch viele Radikale entstanden sind [8]. Es wurden schon einige Studien mithilfe der Elektronen-Spinresonanz-Spektroskopie (ESR) durchgeführt, jedoch nicht mit Untersuchung verschiedener Wellenlängen an unterschiedlichen Hautmodellen [9-11].

In dieser Arbeit sollten diese *ex vivo* Ergebnisse mittels *in vivo* Untersuchungen am Menschen verglichen werden. Um die Untersuchung *in vivo* zu ermöglichen, wurde mit der ESR-Technologie gearbeitet. Bei dieser Methode werden ungepaarte Elektronen

quantitativ gemessen, welche bei der Bildung von Radikalen durch Bestrahlung entstehen. Es wurde menschliche Haut *in vivo* und zum Vergleich Humanhaut nach Hautresektion sowie Schweineohren als Tiermodell jeweils mit UV-Licht, VIS/NIR-Licht und NIR-Licht bestrahlt. Das Ziel war es zu untersuchen, ob bei Humanhaut *in vivo* auch andere Wellenlängen, neben UV-A- und UV-B-Licht, für die Entstehung von Radikalen verantwortlich sein könnten.

Der Körper kann bei Bestrahlung mit Licht das antioxidative Verteidigungssystem *in vivo* hochregulieren, dabei kann aber auch durch reflektorische Vasodilatation mehr Blut in die Haut gelangen und so steht mehr O₂ im Gewebe zur Bildung von ROS zur Verfügung. Daher stellt sich die Frage, ob lichtinduzierte Radikalbildung höher *in vivo* oder *ex vivo* ist.

7 Grundlagen

7.1 Haut und Lipide

7.1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut ist mit 2 m² eines der größten Organe des Menschen und setzt sich aus der Epidermis, der Dermis und der Subkutis zusammen.

Die Epidermis ist die äußerste Schicht der Haut und besitzt je nach Körperregion einen Durchmesser von 30-300 µm. Die Dermis und Subkutis sind vaskularisiert, während die Epidermis über keine eigenen Blutgefäße verfügt. Der Aufbau besteht aus 4 horizontalen Zelllagen. In der Basalmembran befinden sich Stammzellen, aus denen Keratinozyten entstehen – der Hauptbestandteil der Epidermis [12]. In dem darüber befindlichen *Stratum spinosum* verändern die Keratinozyten ihre Form und Ausrichtung. Im *Stratum granulosum* verlieren sie ihre Zellorganellen und –kerne, um nach Dehydration und Bildung dermalen Lipide, als Korneozyten zu fungieren welche die äußere Schicht, das *Stratum corneum* bilden. Diese Schicht stellt die Hauptbarriere der Haut dar [13]. Sie bietet Schutz vor Witterungsbedingungen wie Hitze und Kälte sowie UV-Strahlung und verschiedenste Umwelteinflüsse wie Abgase, Reinigungsmittel oder Klimaanlage. Die Korneozyten enthalten das Protein Keratin und sind in einer komplexen Matrix

vielschichtiger Lipide eingebettet. Das *Stratum corneum* wird als Ziegelsteinstruktur beschrieben, bei der die Kerneozyten die „Steine“ und die interzellulären Lipide den „Mörtel“ repräsentieren [14].

Die Dermis ist 1-5 mm dick, bestehend aus dem *Stratum reticulare* sowie dem *Stratum papillare* und ist mit zahlreichen Gefäßen und Nerven durchzogen welche die Epidermis versorgen. Außerdem befindet sich hier das stabilisierende Bindegewebe, welches durch Fibrozyten gebildet wird. Dieses besteht zum Großteil aus Kollagenfasern und anderen elastischen Fasern, welche der Haut ihre Festigkeit verleihen. Des Weiteren befinden sich hier Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel, Talgdrüsen und Schweißdrüsen sowie Mastzellen, welche bei Entzündung und allergischen Reaktionen eine wichtige Rolle spielen.

Die unterste Schicht der Haut wird von der Subkutis gebildet, welche mehrere Zentimeter dick sein kann. Diese besteht zum größten Teil aus Fettgewebe, welches der Wärmeisolierung, eines mechanischen Schutzpolsters sowie als Energiespeicher dient [15]. In erster Linie fungiert die Haut als mechanische und chemische Barriere. Die Hornschicht verhindert das Austrocknen des Körpers und das Eindringen körperfremder Substanzen. Außerdem bietet das durch Melanozyten gebildete Melanin einen Schutz vor schädlichem UV-Licht, indem es als UV-Filter fungiert. Dies führt dazu, dass pigmentierte Haut widerstandsfähiger gegen Sonnenbrand und Hautkrebs ist als „weiße Haut“ [16]. Ebenso wirkt das Melanin als Antioxidans und ist für die Pigmentierung verantwortlich. Ein gewisser Teil an UV-Licht wird allerdings für die Vitamin-D-Synthese benötigt. Je mehr Melanin vorhanden ist, desto dunkler ist der Hauttyp und desto weniger effektiv ist die UV-Licht induzierte Vitamin-D-Synthese [17]. Langerhans-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Immunabwehr. Mithilfe des Gefäßplexus und den Schweißdrüsen wird die Thermoregulation sichergestellt. Die Haut verfügt über ein trockenes und saures Milieu, welches schädlichen Keimen entgegenwirkt, jedoch eine symbiontische Hautflora begünstigt [15].

Epidermis Oberhaut	0,03 - 2mm	stratum disjunctum stratum corneum stratum lucidum stratum granulosum stratum spinosum Melanozyten stratum basale
Dermis Lederhaut	0,5 - 1,5mm	stratum papillare Ruffini- & Meissner-Tastkörperchen Schweiß- & Talgdrüsen, Follikel stratum reticulare
Subcutis Unterhaut	0,5 - 100mm	adipöses Fett Nerven, Blutgefäße Vater-Pacini-Körperchen Bindegewebsstränge

Abbildung 1: Aufbau der Haut

7.1.2 Lipide der Haut

Die Lipide der Haut stammen aus zwei verschiedenen Regionen. In der Dermis wird aus den Talgdrüsen das Sebum produziert, welches entlang der Haarfollikel an die Hautoberfläche gelangt. Die restlichen Lipide stammen aus Kerneozyten des *Stratum corneums* in der Epidermis. Die Lipide der Talgdrüsen und die Lipide der Kerneozyten mischen sich an der Oberfläche der Haut und bilden den Hautlipidfilm [18].

Die Beschaffenheit dieses Lipidfilms ist vor allem abhängig von der Anzahl der Talgdrüsen in den verschiedenen Körperregionen.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Sebumlipide

(Green et. al. [19])

Lipide	Anteil in %
Triglyceride(~54%),Freie Fettsäuren(~43%,),Diglyceride (~4%)	57,5
Wachsester	26
Squalen	12
Cholesterolester	3
Cholesterol	1,5

An Bereichen wie Kopfhaut, Stirn und oberer Thorax gibt es vergleichsweise viele Talgdrüsen. Deshalb enthält der Hautlipidfilm in diesen Bereichen über 90 % der Sebumlipide (Tabelle 1: Zusammensetzung der Sebumlipide) [19]. An den Händen und Füßen gibt es weniger und an Hand- und Fußflächen sogar gar keine Talgdrüsen. An diesen Stellen besteht der Lipidfilm mehr aus epidermalen Lipiden [20].

Zusammen wirken sie dem Eindringen von körperfremden Stoffen entgegen, verhindern einen zu hohen Wasserverlust und spielen eine wichtige Rolle in der Barrierefunktion der Haut.

Die intrazellulären Lipide, welche von den Korneozyten gebildet werden und diese umschließen, weisen einen anderen Lipidaufbau auf, im Vergleich zum Hautlipidfilm.

Eine Besonderheit des *Stratum corneums* ist die spezielle Lipidzusammensetzung, welche in Tabelle 2: Prozentuale Verteilung der Lipide des Stratum corneum abgebildet ist [21].

Tabelle 2: Prozentuale Verteilung der Lipide des Stratum corneums

Lipide	Anteil in %
Ceramide	35,0 ± 3,2
Freie Sterole (Cholesterol)	28,9 ± 3,6
Freie Fettsäuren	19,2 ± 3,5
Sterolester	6,5 ± 1,5
Tri-, Diglyceride	3,5 ± 1,4
Phospholipide	3,2 ± 1,1
Cholesterolsulfate	1,8 ± 0,7
n-Alkane	1,7 ± 1,3
Squalen	0,2 ± 0,1

Phospholipide, welche ein typischer Bestandteil biologischer Membranen sind, sind im Lipidfilm des *Stratum corneums* nicht zu finden. Die größten Gruppen von den hier vorkommenden Lipiden sind Ceramide (Sphingolipide), Cholesterol (Cholesterin) und freie, langkettige Fettsäuren [22-24]. Es besteht der Konsens, dass die Hauptkomponente, nämlich die Ceramide, eine Schlüsselrolle in der Barrierefunktion der Haut spielen [25, 26].

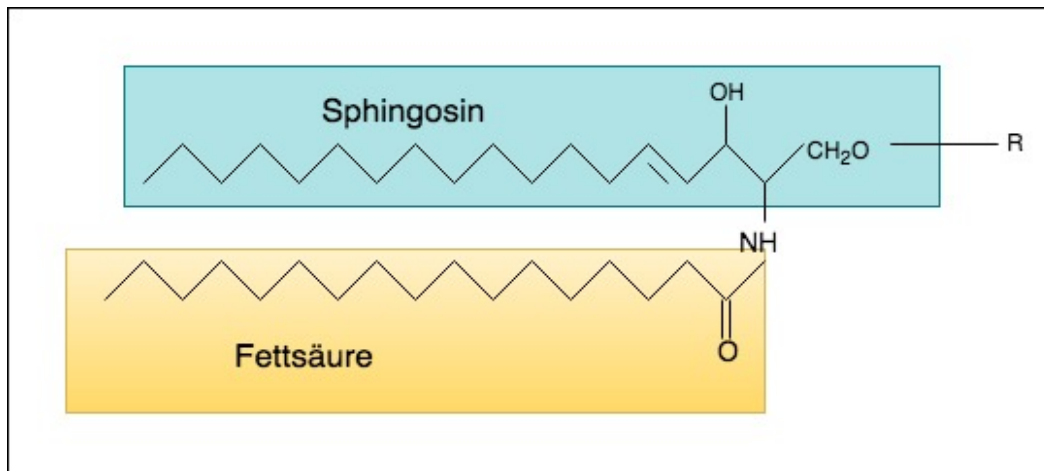


Abbildung 2: Struktur eines Sphingolipids

Sphingolipide bestehen aus einem ungesättigter Aminoalkohol und einer, über eine Amidgruppe gebundenen Fettsäure. Wird der Rest "R" durch ein Wasserstoffatom (H) ausgetauscht, handelt es sich bei der Substanz um ein Ceramid

Neigt die Haut zu einer verminderten Talgsekretion, kann eine atopische Dermatitis zugrunde liegen. Eine atypische Zusammensetzung und ein reduzierter Gehalt an epidermalen Lipiden, besonders an Ceramiden, was zu einer gestörten Hautbarriere führt, ist hierfür typisch. Die Besiedelung der Haut mit pathogenen Erregern wie *S. aureus* wird begünstigt und kann zu Infektionen führen [27].

Talgdrüsen stehen unter dem Einfluss von Hormonen und chemischen Substanzen, welche die Zusammensetzung des Hautlipidfilms verändern können. Östrogene und Retinoide besitzen z.B. eine hemmende Wirkung auf die Bildung von Sebum, weshalb sie zur Behandlung von Akne eingesetzt werden. Androgene haben hingegen eine fördernde Wirkung auf die Sebumproduktion [28].

7.2 Das elektromagnetische Spektrum

Aus dem umfangreichen Spektrum der elektromagnetischen Wellen der Sonne stellt das sichtbare Licht nur einen kleinen Bereich dar [29]. Die spektrale Aufteilung der Sonnenenergie auf Meeresebene umfasst ca. 3–7 % UV-Licht, 44 % sichtbares Licht, und 53 % Infrarotlicht [30].

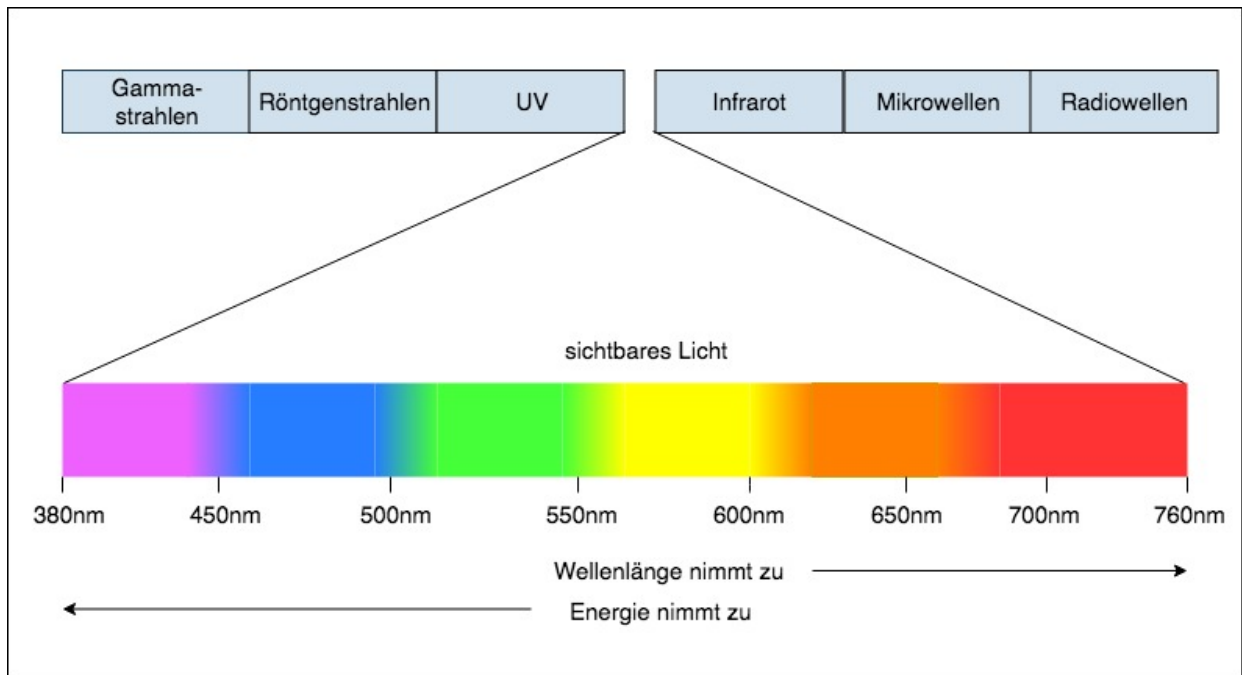


Abbildung 3: Elektromagnetisches Spektrum

Das Spektrum der Sonnenstrahlung auf der Erdoberfläche reicht von 290 bis 3000 nm und enthält folgende Wellenlängenbereiche [31] :

Tabelle 3: Elektromagnetisches Spektren und ihre Wellenlängen

Elektromagnetisches Spektrum	Wellenlänge
Ultraviolettes Licht (UV)	UV-C: 280-100 nm UV-B: 280–320 nm / UV-A: 320–400 nm
sichtbares Licht (Vis)	400–760 nm
Infrarotlicht (IR)	IR-A: 760–1400 nm und IR-B: 1400–3000 nm IR-C: 3000 nm – 1 mm

Ultraviolettes Licht

Wird die Haut des Menschen Sonnenlicht ausgesetzt, ist auch ein Teil UV-Strahlung enthalten. Während UV-A-Licht kaum abgeschwächt auf uns einwirken kann, wird UV-B-Licht teilweise in der Ozonschicht gefiltert. Der Anteil von UV-A-Strahlung beträgt 95 %, während UV-B-Strahlung nur 5 % ausmacht [32]. UV-C-Licht wird komplett in der Erdatmosphäre absorbiert und erreicht die Erdoberfläche nicht. Das energiereichere und kurzwelligere UV-B-Licht dringt nicht so tief in die Haut ein und entfaltet seine Wirkung zum größten Teil in der Epidermis [33]. Dort führt dies bei zu hoher Intensität zu schmerzhaften Sonnenbrand (Dermatitis solaris) und hat durch seine kanzerogene Wirkung negative Effekte auf die Haut. UV-Licht stimuliert die Bildung von ROS, welche hauptverantwortlich für die Entstehung von Hautläsionen sind und führen zu schnellerer Hautalterung [34] sowie der Genese von malignen Hauterkrankungen [35-37]. UV-B-Strahlung führt in der Epidermis zur Bildung von Melanin und ist für die indirekte Bräunung verantwortlich. Diese verbleibt längerfristig und bietet einen Lichtschutz. Werden Hautzellen UV-B-Strahlung ausgesetzt, führt dies zu einer unmittelbaren Freisetzung von gebundenem Eisen [38], welches die Bildung des äußerst schädlichen Hydroxylradikal ($\text{OH}\cdot$) über die Fenton-Reaktion katalysieren kann [39]. UV-B-Strahlung wird hauptverantwortlich für die Entstehung von Basalzellkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen gemacht [32].

UV-A-Licht ist langwelliger als UV-B-Licht und kann daher tiefer in die Haut eindringen. So treten Schäden bis in die Dermis hin auf [40]. Dort beeinträchtigt es unter anderem Fibroblasten, welche in ihrer Fähigkeit eingeschränkt werden elastische Fasern zu bilden, was langfristig zu einem Verlust der Spannkraft der Haut führt. Hieraus resultiert eine vorzeitige Hautalterung [41]. Das Potential ein Erythem zu bilden ist hier eher gering. UV-A-Licht ist für die direkte Pigmentierung verantwortlich und führt über eine Konformationsänderung des Melanins zu einer nur über Stunden anhaltende, kurzfristige Bräune, welche kaum Lichtschutz bietet. Zudem ist UV-A-Licht in der Lage das Immunsystem zu schwächen, welches die Entstehung maligner Hauttumoren begünstigt [42-44].

Um sich vor der schädlichen Wirkung von UV-Licht zu schützen, sollte die Dauer in der die Haut der Sonnenstrahlung ausgesetzt ist, möglichst gering gehalten werden. Dies kann zum einen durch das Meiden der Sonne und zum anderen durch hautbedeckende Kleidung erfolgen. Auch die Anwendung von Sonnencremes ist für die Prävention von

gesundheitlichen Schäden durch Sonnenstrahlung essentiell. Es ist besonders auf einen UV-Schutz in jungen Jahren acht zu geben. So zeigten Weinstock et al. [45], dass eine gesteigerte Sonnenlichtexposition vor dem 20. Lebensjahr die Wahrscheinlichkeit an einem Melanom zu erkranken deutlich erhöht, als vergleichbare Sonnenlichtexposition nach dem 30. Lebensjahr. Es wird geschätzt, dass die Inzidenz an einem nicht-Melanom Hautkrebs zu erkranken (vor allem Basalzellkarzinom und Plattenepithelkarzinom) während der gesamten Lebenszeit um 78 % reduziert wird, wenn während der ersten 18 Lebensjahre präventiv eine Sonnencreme mit dem Lichtschutzfaktor 15 angewandt wird [46].

Ist der Mensch jedoch durch Umweltbedingungen oder besonderem Verhalten nur geringen Mengen UV-B-Strahlung (Wellenlänge 280-320 nm) ausgesetzt, kann auch dies negative Effekte haben [47].

Die Vitamin-D-Synthese ist hauptsächlich abhängig von der Menge an UV-B-Strahlung. Ein Vitamin-D-Mangel im Körper führt zu negativen Effekten der Gesundheit, der Muskelfunktion und der Knochenhärte. Des Weiteren wird Vitamin D in Verbindung mit einer Prävention von Diabetes mellitus Typ1 und Erkrankungen des Herz-Kreislauf Systems gebracht [48]. Weiterhin wird UV-Licht medizinisch im Rahmen der Lichttherapie zur Behandlung von Akne, Neurodermatitis, Psoriasis und der Winterdepression eingesetzt [49, 50].

Infrarotes Licht

Das infrarote Licht kann in die 3 Wellenlängenbereiche IR-A, IR-B und IR-C eingeteilt werden. Weiterhin kann eine andere Unterteilung in nahes Infrarotlicht (760-3000 nm), mittleres Infrarotlicht (3.000-30.000nm) und fernes Infrarotlicht (30.000 nm - 1 mm) vorgenommen werden. Diese Unterteilungen spiegeln das Verhalten der unterschiedlichen Wellenlängen in der menschlichen Haut wieder. Je nach Wellenlänge wird das Infrarotlicht in verschiedenen Hautschichten absorbiert. Die Eindringtiefe in die Haut sinkt mit zunehmender Wellenlänge ab. Kurzwelligeres IR-A-Licht erreicht die subkutanen Hautschichten, ohne die Hautoberfläche erheblich zu erwärmen. IR-C-Strahlung wird komplett in den oberen Hautschichten absorbiert und resultiert in erhöhter Hauttemperatur, welche sich angenehm warm anfühlt, aber auch bis hin zu Verbrennungen reichen kann [51].

Dass zu viel UV-Strahlung eine schädliche Wirkung auf die Haut hat, ist hinreichend bekannt [52-55]. Aber auch Infrarotlicht besitzt schädliches Potential. Niedrige Dosen haben analgetische, antiinflammatorische und wundheilungsfördernde Effekte, weshalb sie medizinisch zur Behandlung bei entzündlichen Prozessen angewandt werden. Der Mechanismus des heilenden Effektes beruht in der Aktivierung der Energiebereitstellung in den Mitochondrien in Form von ATP sowie eventuell durch Entgiftung von freien Radikalen [56]. So kommt Infrarotlicht bei Arthrose [57-59], Tendinopathie [60, 61] oder oraler Mukositis [56] zum Einsatz. Hohe Dosen haben jedoch eine schädliche Wirkung auf die Haut [3, 62-64]. So entstehen nach NIR-Bestrahlung zum einen direkt vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [65-67]. Trifft NIR-Strahlung auf die Hautoberfläche steigt zum anderen deren Temperatur an, was zur Bildung von Hitzeschockradikalen führen kann [68]. Diese Radikale bilden sich etwa bei 43-45°C, also bei wesentlich höheren Werten als die physiologische Hauttemperatur von 27,6-33,1°C [68, 69]. Diese zwei Mechanismen der Entstehung von ROS können ihre Wirkung gegenseitig durch Erhöhung der Strahlendosis oder durch Anstieg der Temperatur multiplizieren [70].

Sichtbares Licht

Der Teil der elektromagnetischen Strahlung, den Menschen sehen können, wird als sichtbares Licht, im englischen Visible Light, kurz VIS bezeichnet. Es umfasst das elektromagnetische Spektrum von 380 nm – 760 nm. In diesem Bereich finden sich alle Farben mit spezifischer Wellenlänge wieder. Wird weißes Licht durch ein Prisma aufgetrennt, so werden die Farben eines Regenbogens sichtbar, die sogenannten Spektralfarben. Diese sind in Abbildung 4 dargestellt.

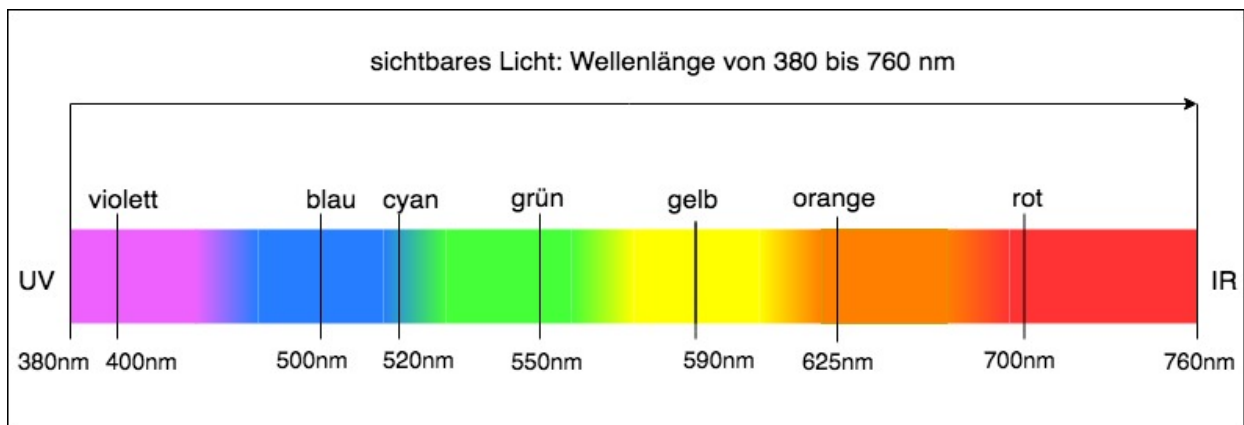


Abbildung 4: sichtbares Licht

Es gibt nur wenige Studien über sichtbares Licht. Zastrow et al. wiesen kürzlich mittels ESR in humaner *ex vivo* Haut einen Anstieg von freien Radikalen, nicht nur bei UV- und NIR-Licht, sondern auch durch VIS-Licht nach [3, 65]. Experimentelle Untersuchungen aus humanen *in vivo* Studien welche zeigen, dass sichtbares Licht Gen-regulierende Aktivitäten besitzt oder tierische *in vivo* Studien die zeigen, dass chronische Aussetzung von sichtbarem Licht tatsächlich zu Faltenbildung in der Haut führt, sind derzeit noch nicht vorhanden.

Zusätzlich ist so gut wie nichts über die Rolle von sichtbarem Licht in der Karzinogenese der Haut und der Interaktion zwischen UV-Licht, IR-Licht und VIS-Licht bekannt.

Dennoch stimmen die bestehenden Studien mit der Vermutung überein, dass sichtbares Licht biologische Effekte auf menschliche Haut ausübt, welche eine erhöhte Radikalbildung zur Folge hat und welche relevant für Hautpigmentation und eventuell für Hautalterung sind.

7.3 Antioxidatives System

Das Wort "Antioxidans" wird in der biomedizinischen Literatur oft benutzt, jedoch selten definiert. Meistens wird der Begriff nur in Verbindung mit kettenabbrechenden Antioxidantien wie α -Tocopherol (Vitamin E) verwendet [71]. Gutteridge et al. haben eine umfangreichere Auffassung und definieren Antioxidantien als „jedes Substrat, dass in niedrigen Konzentrationen, verglichen mit dem oxidierbaren Substrat, signifikant die Oxidation dieses Substrates verzögert oder hemmt“ [72]. Der Körper wehrt sich gegen Radikale, indem er sie „einfängt“ (scavenging) oder indem er sie „knackt“ (quenching) [73]. Antioxidantien unterbrechen die Radikal-Kettenreaktion, indem sie ein Elektron an ROS abgeben [74]. Die Antioxidantien selber kehren sofort wieder in ihre ursprüngliche Form zurück [75].

Die Zellen des Körpers werden vor Strahlung durch bestimmte Pigmente geschützt. So ist Melanin in der Lage UV-Licht zu absorbieren. Karotinoide hingegen wirken Molekülen wie Singulett-Sauerstoff (1O_2) entgegen, die sich in elektronisch angeregten Zuständen befinden [76].

Antioxidantien können bei Oxidationen an verschiedenen Ebenen wirken. Dies kann bei den vielen Mechanismen veranschaulicht werden, bei denen oxidativer Stress durch Lipidperoxidation zu Zellschäden führen kann.

Antioxidantien können Lipidperoxidation entgegenwirken durch [71]:

1. Verringerung der lokalen O₂ Konzentration (z.B. durch die Verbindung oder dem Austausch mit Sauerstoff)
2. Abwehr von Kettenreaktionen durch Peroxidation, indem Verbindungen neutralisiert werden, welche die Fähigkeit besitzen Wasserstoff-Atome zu entziehen, wie z.B. das Hydroxyl-Radikal (OH·)
3. Löschen oder Einfangen von Singulett-Sauerstoff, welcher direkt mit an Membranen gebundenen Lipiden reagieren kann und Peroxide bildet. Lycopin ist z.B. der beste Singulett-Sauerstoff Fänger in menschlichem Gewebe [77]
4. Bindung von Metallionen, um zu verhindern, dass diese die Entstehung von ROS katalysieren
5. Entfernung von Peroxiden, indem sie in ein nicht Radikal Produkt umgewandelt werden, wie z.B. Alkohol durch Glutathionperoxidase
6. Reaktion mit Radikalen, die für eine Radikal-Kettenreaktion verantwortlich sind, indem sie Wasserstoff aus Seitenketten von Fettsäuren entziehen. Kettenreaktion abbrechende Antioxidantien sind oft Phenole oder aromatische Amine, von denen α -Tocopherol der wichtigste Vertreter ist.

Es existieren enzymatische und nicht enzymatische Mechanismen, die intrazellulär und extrazellulär lokalisiert sind. Der größte Teil des antioxidativen Netzwerkes befindet sich in der Epidermis, hier konnte eine höhere Konzentration im Vergleich zur Dermis gefunden werden [78]. Zu den intrazellulären enzymatischen Mechanismen gehört z.B. die Superoxiddismutase (SOD), Katalase und Glutathionperoxidase. SOD katalysiert die Umwandlung von Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid. Katalase wandelt Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser um und die Glutathionperoxidase katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu oxidiertem Glutathion und Wasser [79].

Tabelle 4: Intrazelluläre Enzyme und ihre Summenformel

(GSH (Glutathion), GSSG (Glutathiondisulfid), O₂^{•-} (Superoxid-Anionen), H₂O₂ (Wasserstoffperoxid))

antioxidatives Enzym	Summenformel
Superoxiddismutase	$2 \text{ O}_2^{\bullet -} + 2 \text{ H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}_2$
Katalase	$2 \text{ H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$
Glutathionperoxidase	$2 \text{ GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{ H}_2\text{O}$

Da Antioxidantien nicht komplett vor Zellschäden schützen, gibt es Reparatur Enzyme, welche geschädigte Proteine zerstören [80], oxidierte Fettsäuren von Membranen entfernen [81] und Schäden an der DNA reparieren [82]. All diese Reparaturmechanismen sind größtenteils intrazellulär lokalisiert.

Andere antioxidative Reparaturmechanismen sind extrazellulär aktiv. Zu ihnen gehören das Plasma, Eisen-Transport-Protein Transferrin und das ebenfalls Eisen bindende Protein Laktotferrin, welches in vielen Körperflüssigkeiten (z.B. Tränenflüssigkeit, Nasensekret) gefunden wird. Chelatbildung mit Eisenionen spielt eine wichtige Rolle, um Lipidperoxidation und Fragmentierung der DNA zu verhindern [76].

Gemüse ist wichtig für eine ausgewogene Ernährung. Viele Studien belegen, dass eine enge Beziehung zwischen der Einnahme von Gemüse und dem Schutz vor einer Vielzahl von Krankheiten, wie Krebs oder kardiovaskuläre Erkrankungen besteht [83]. So sollen Radikale mitverantwortlich bei der Entstehung von Hauttumoren [2, 84], Diabetes [85], Arteriosklerose [86] oder neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer oder Morbus Parkinson sein [87-90].

Ein wichtiger Faktor, welcher dem Krebs entgegenwirken soll, sind die in Gemüse vielfältig vorkommenden nicht-enzymatischen Antioxidantien, wie z.B. Vitamin C, Vitamin E (Tocopherole) und Karotinoide. Vitamin C ist ein starkes Antioxidans und neutralisiert Radikale vor allem im Blut. Vitamin E und Karotinoide entfalten ihre antioxidative Wirkung unter lipophilen und hydrophilen Bedingungen. Vitamin E kommt vor allem in Zellmembranen vor und ist in der Lage eine große Anzahl von Radikalen zu neutralisieren. β -Carotin ist das häufigste Antioxidans in Zellmembranen und Lipoproteinen, auch wenn dies über eine geringere antioxidative Aktivität verfügt [91].

Gemüse enthält nicht nur die oben genannten Antioxidantien, sondern auch eine große Anzahl von u.a. Flavonoiden, Flavonen und Polyphenolen, die ebenfalls eine antioxidative Aktivität aufweisen. Flavonoide sind in der Lage, der Bildung von kanzerogene Nitrosoaminen entgegen zu wirken [92]. Auch Polyphenole sind starke Antioxidantien - ihre Synthese und Regulation ist abhängig von der Sonnenstrahlung [93].

Die Verteilung und die Konzentration von Antioxidantien im menschlichen Körper und in der Haut hängen stark von Faktoren wie dem Gesundheitszustand, die Ernährungsweise, dem Hauttyp, der Körperregion und externen Faktoren ab [94-97]. Die Konzentration von Antioxidantien im Blutplasma und im Gewebe sind bei Nichtrauchern höher als bei Rauchern und höher bei Individuen, deren Nahrung viele Vitamine und Karotinoide enthält als bei denjenigen, welche sich unausgewogen Ernähren [95, 98-102]. Wird Haut UV-Strahlung ausgesetzt, resultiert dies in einer Verminderung der Antioxidantien-Konzentration in der Haut wie z.B. β -Carotin, Lycopin, Lutein sowie den essentiellen Vitaminen A, C und E [98-102].

Haut ist die äußere Barriere des Körpers und tritt direkt in Kontakt mit schädlichen Oxidantien aus der Umwelt. Antioxidantien sind sehr empfindlich gegenüber äußeren oxidativen Stress, weshalb ein zusätzlicher topischer Schutz in Form von Sonnencreme oder systemisch applizierten Antioxidantien, wie Vitamine und Karotinoide, unterstützend wirkt [103].

7.4 Radikale

Atome enthalten einen Nukleus und Elektronen, welche sich normalerweise in Paaren um den Nukleus bewegen. Ein freies Radikal ist jedes Molekül oder Atom, welches ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzt. Die ungepaarten Elektronen verändern die chemische Reaktivität eines Moleküls oder Atoms und führen zu einer gesteigerten Reaktivität [72].

Radikale (Oxidantien) werden als normales Produkt des aeroben Metabolismus gebildet. Sie können aber ebenso auch durch verschiedene Arten von Strahlung entstehen. Unter dem Einfluss von Röntgenstrahlung formiert sich in Zellen das Hydroxid Radikal ($\text{OH}\cdot$). Bestrahlung durch UV-Licht führt zu einem elektronisch angeregten Zustand mit daraus resultierender Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS). Sogar Ultraschall und

Mikrowellenstrahlung können zur Bildung von Radikalen führen [76]. Unter pathophysiologischen Bedingungen steigt der Anteil an Radikalen an, bis diese nicht mehr kompensiert werden können. Prinzipiell besteht ein Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien im Körper. Antioxidantien sind bis zu einem gewissen Grad fähig sich an veränderte Verhältnisse, wie z.B. Stress oder Krankheiten, anzupassen. Kippt das Gleichgewicht zugunsten der prooxidativen Seite, resultiert dies in einer übermäßigen Bildung von Radikalen.

Da das antioxidative System nicht alle Schäden vom Körper abwenden kann, führt die überproportionale Bildung von Radikalen zu einer Schädigung der Zellen. Dabei kann es zu Funktionseinschränkungen von Lipiden, Proteinen oder Enzymen kommen. Eine besondere Bedeutung kommt dabei der möglichen Schädigung der Basen der DNA, der Nucleinsäuren (v.a. Thymin und Guanin) zu. Durch ihre Oxidation kann es zur Schädigung von Chromosomen und letztlich des Erbgutes kommen. Dieser Effekt wird „Oxidativer Stress“ bezeichnet [76] und kann in der Haut vor allem durch Sonnenstrahlung, Umweltgifte oder Xenobiotika hervorgerufen werden [70, 104]. Bei geringem, oxidativem Stress reagiert das Gewebe oft mit vermehrten antioxidativen Abwehrmechanismen. Wird die Zelle durch Radikale zu sehr geschädigt, kann dies zur Nekrose oder Apoptose führen. „Anti-Apoptose Gene“ scheinen in einigen Zellen die Information für Radikalfänger zu kodieren [105].

ROS (Reaktive Sauerstoffspezies) sind reaktive, chemische Verbindungen, welche in zwei Kategorien eingeteilt werden. Freie Radikale (z.B. O_2^- und OH^-) und Verbindungen, die keine Radikale darstellen (z.B. H_2O_2 und $HOCl$) [106]. In kleinen Konzentrationen stellen ROS Signalmoleküle dar. Werden sie jedoch in zu großen Mengen gebildet, haben sie eine schädliche Wirkung auf den Metabolismus. Den toxischen Effekten von ROS wirkt das antioxidative System entgegen [86]. Wird Haut z.B. UV-Licht ausgesetzt, bilden sich freie Radikale, neben reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) vor allem reaktive Nitrogen Spezies (RNS) und oxidierte Lipid Spezies (LOS). All diese Radikale können mit ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden [3, 8, 10, 107].

Treffen zwei freie Radikale aufeinander, können sie ihr freies Elektron gemeinsam nutzen und sich über eine kovalente Verbindung zu einem neutralen Molekül vereinigen. Die meisten Moleküle im Körper stellen jedoch keine Radikale dar. Daher reagieren freie Radikale am wahrscheinlichsten mit Nicht-Radikalen. Wenn ein freies Radikal mit einem Nicht-Radikal reagiert, entfernt es ein Elektron und hinterlässt wiederum ein Molekül mit

einem freien Elektron. Dabei entsteht eine freie Radikal-Kettenreaktion, wobei neue Radikale entstehen. Greifen Radikale an Membranen oder Lipoproteinen an, kommt es zur Lipidperoxidation [79]. So entstehen aus Low-Density Lipoprotein (LDL) nach Lipidperoxidation Schaumzellen, welche in Verbindung mit der Entstehung von Arteriosklerose gebracht werden [108].

7.5 Methoden zur Messung von Radikalen

7.5.1 Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie

Um Radikale *in vivo* messen zu können, wird die Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie (ESR) genutzt. Durch sie ist es möglich, paramagnetische Substanzen nachzuweisen und zu quantifizieren. Eine paramagnetische Substanz bzw. Radikale zeichnet sich dadurch aus, dass sie ungepaarte Elektronen besitzt. Da die meisten Radikale hochreaktiv sind und nur eine sehr kurze Halbwertszeit haben, ist es notwendig sie mit einem stabilen „Marker-Radikal“ (Spinmarker) zu detektieren.



Abbildung 5: Elektronen-Spinresonanz-Spektroskop (ESR)

Elementarer Bestandteil des ESR sind zwei Magnete und eine Mikrowelle. Dabei bleibt die Mikrowellenstrahlung konstant und das Magnetfeld ist variabel. Ungepaarte Elektronen besitzen einen Eigendrehimpuls („Spin“), der ihre Detektion ermöglicht [109].

In dem äußeren Magnetfeld können ungepaarte Elektronen entweder „parallel“ ($m_s = +1/2$) oder „antiparallel“ ($m_s = -1/2$) sein. Die Absorption der Mikrowellenstrahlung sorgt für den Übergang vom niederenergetischen Zustand in den energetisch höheren Zustand [110-112]. Dieser Effekt wird „Zeeman-Aufspaltung“ genannt, welcher in Abbildung 6 zu sehen ist.

Je stärker das äußere Magnetfeld ist, desto stärker ist der energetische Abstand ΔE zwischen den beiden Energieniveaus. Dies wird mit folgender Gleichung beschrieben:

$$\Delta E = h \cdot \nu = g \cdot \mu_B \cdot H_0$$

h = Plancksches Wirkungsquantum = $6,6260755 \cdot 10^{-34}$ J s

ν = Frequenz der Mikrowellenstrahlung [s⁻¹]

g = Landé-Faktor (g-Wert)

μ_B = Bohr'sches Magneton = $0,92740154 \cdot 10^{-23}$ J T⁻¹

H_0 = Feldstärke des äußeren Magnetfeldes [T = Tesla]

Es existieren je nach Frequenz der Mikrowellenstrahlung verschiedene Frequenzbänder (W-Band 95 GHz, Q-Band 35 GHz, X-Band 9-10 GHz, S-Band 2-3 GHz oder L-Band 1-1,5 GHz). Dabei gilt, je höher die Frequenz der Mikrowelle ist, desto geringer ist die Eindringtiefe der Mikrowellenstrahlung in eine Probe [109].

Liegt das Interesse ausschließlich in der Untersuchung der Epidermis kann mit einem X-Band ESR Spektrometer gearbeitet werden, da die Epidermis nur 30 – 300 μ m dick ist. Die vaskularisierte Dermis kann noch mit einem S-Band untersucht werden. Soll die Subkutis mit analysiert werden, wird ein L-Band benötigt [10].

Es wurde in dieser experimentellen Arbeit ein L-Band mit einer niedrigen Frequenz von 1,3 GHz genutzt, welches eine Eindringtiefe von 1-1,5 cm ermöglicht. So können oxidative Prozesse *in vivo* gemessen werden. VIS- und NIR-Strahlung haben unterschiedliche Wellenlängen und damit unterschiedliche Eindringtiefen, welche gleichermaßen erfasst werden können.

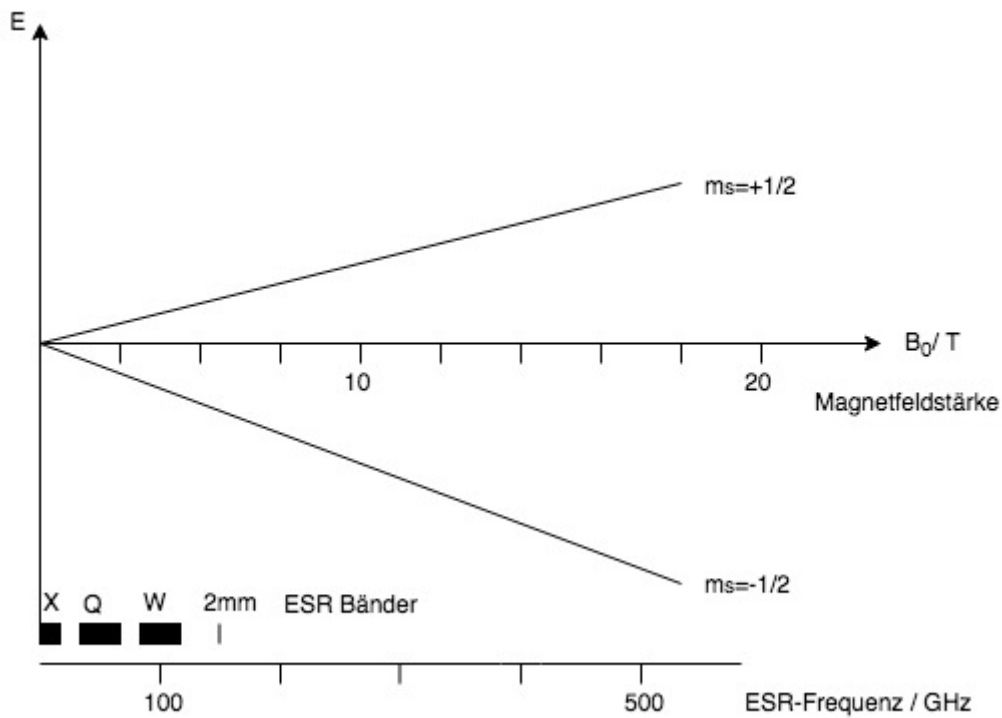


Abbildung 6: Zeeman-Aufspaltung

Aufspaltung von Elektronen in den parallelen ($m_s= +1/2$) und im antiparallelen ($m_s= -1/2$) Zustand. Die Aufspaltung nimmt mit steigender Frequenz der ESR-Bänder zu.

7.5.2 Markersubstanzen

Wie bereits erwähnt, besitzen die meisten Radikale eine sehr kurze Halbwertszeit von wenigen Millisekunden bis hin zu einigen Sekunden, weshalb ihre Detektion mithilfe von direkter ESR Messung nicht möglich ist. Die Reaktivität eines Radikals ist proportional mit seiner Halbwertszeit (Tabelle 5: Radikale und ihre Halbwertszeiten). Daher kann gesagt werden, je kürzer die Halbwertszeit eines Radikals ist, desto ausgeprägter ist seine Reaktionsfreudigkeit.

Tabelle 5: Radikale und ihre Halbwertszeiten

[113]

Radikal	Halbwertszeit
Hydroxylradikal (HO•)	10 ⁻⁹ s
Singulett-Sauerstoff (¹ O ₂)	10 s
Alkoxyradikal (RO•)	10 ⁻⁶ s
Peroxyradikal (ROO•)	7 s
Nitroxiradikal (NO•)	1 - 10 s

In dieser Studie wurde ein L-Band ESR-Spektrometer genutzt, welches nicht in der Lage ist kurzlebige Radikale nachzuweisen. Um die entstandenen Radikale dennoch messen zu können, werden sogenannte Markersubstanzen, wie „Spinmarker“ oder „Spinfallen“ benutzt. Diese sind selber freie Radikale; sie können mit den kurzlebigen Radikalen eine kovalente Verbindung eingehen, wodurch deren Halbwertszeit verlängert wird. Mittels dieser Technologie können quantitative Aussagen über die Radikalkonzentration gemacht werden (Spinmarker) bzw. kann auch eine Charakterisierung vorgenommen werden (Spinfallen).

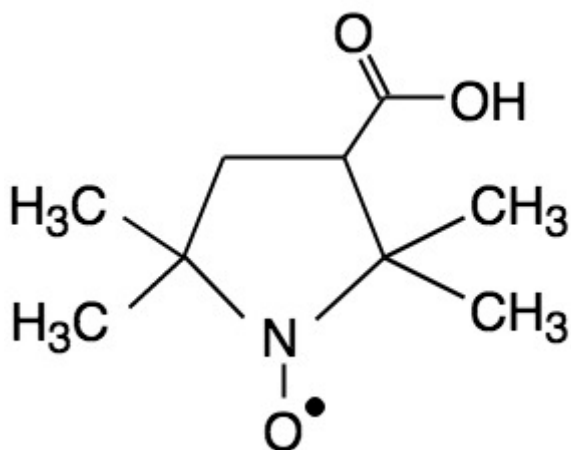


Abbildung 7: Spin Marker PCA

(3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy)

In dieser Arbeit wurde die Markersubstanz PCA (3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy) gewählt. PCA ist ein hydrophiles Nitroxid, welches selber ein ESR-Signal evoziert. Kommt es mit einem kurzlebigen Radikal in Verbindung, wandelt es sich in das entsprechende Hydroxylamin um und ist in dieser Form im ESR nicht mehr detektierbar

[114]. PCA reagiert nur schwach mit in den in der Haut befindlichen Antioxidantien und ist außerdem gut für *in vivo* Versuche geeignet, da es keine toxischen Eigenschaften besitzt [115]. Der Abfall der PCA-Konzentration führt zu einem verminderten ESR-Signal. So kann also indirekt ein Rückschluss auf die entstandenen Radikale gezogen werden [8], was in Abbildung 8 veranschaulicht wird.

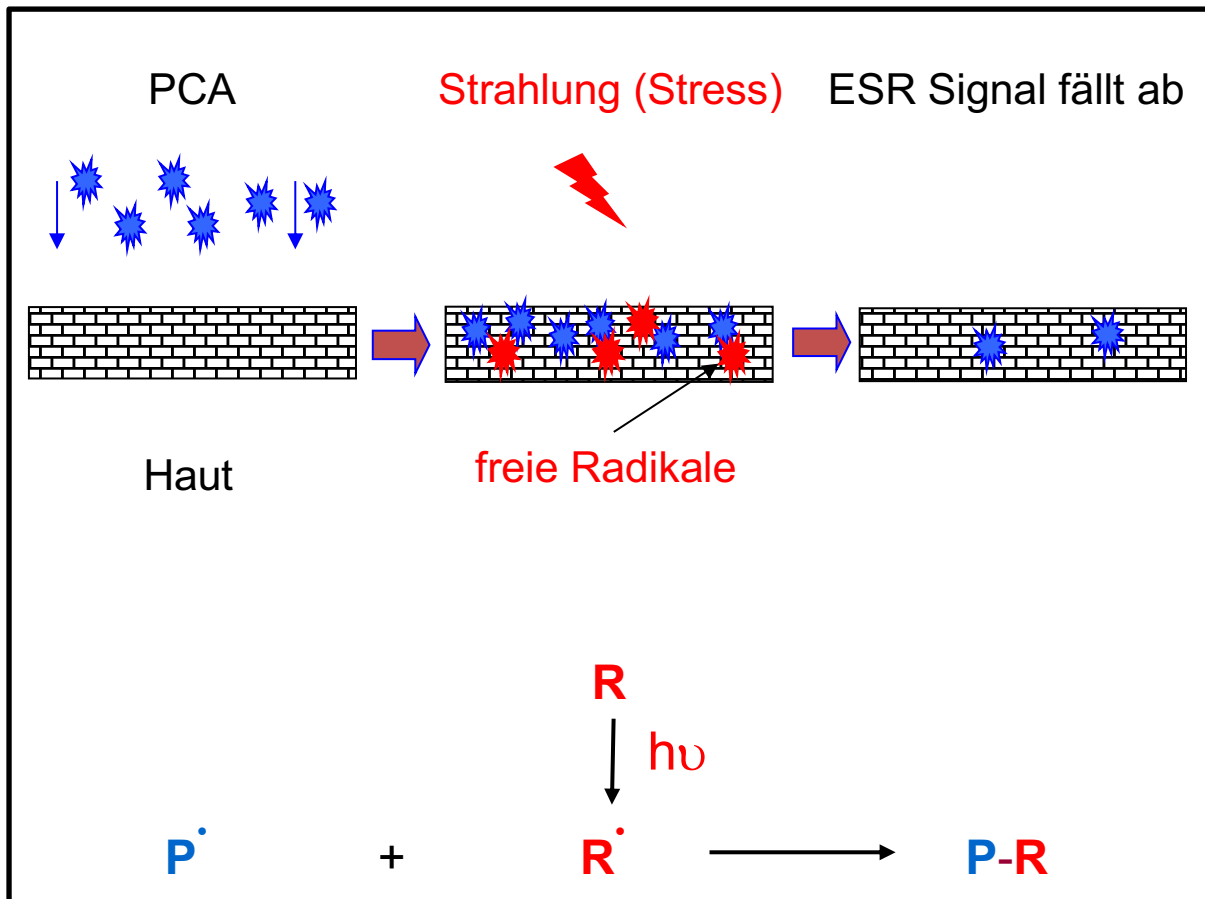


Abbildung 8: Veranschaulichung der Neutralisierung von PCA

P^{\bullet} - PCA mit ungepaartem Elektronenpaar, R - Molekül, R^{\bullet} - Radikal mit ungepaartem Elektronenpaar, $h\nu$ - Photonenenergie, $P-R$ - Produkt aus PCA und dem Radikalrest

7.5.3 Alternative Methoden zur indirekten Messung von Radikalen

qRT-PCR, Western-Blot oder Resonanz-Raman-Spektroskopie stellen mögliche Alternativmethoden zur Messung der Entstehung von Radikalen in Gewebe dar.

Mittels der qRT-PCR (real-time quantitative PCR) wird Haut von Probanden *in vivo*, die beispielsweise mit NIR-Licht bestrahlt wurde, mit einer Stanzbiopsie entnommen. Aus diesen Proben wird die in den Zellen befindliche RNA extrahiert und die Expression von MMP-1 (Matrix metalloproteinase-1) quantitativ mittels RT-PCR gemessen. MMP-1 ist ein Enzym, welches die Spaltung von Peptidbindungen in Proteinen katalysiert und so zum Abbau von Typ-1 und Typ-3 Kollagen sowie elastischen Fasern führt, was letztendlich zu Bildung von Falten und Verlust von Elastizität führt. Die Expression dieses Enzyms wird durch Bestrahlung mit NIR-Licht angeregt, indem NIR-Licht durch ROS Bildung in der mitochondrialen Elektronentransportkette eine retrograde Signalantwort generiert und so als Indikator für entstandene Zellschäden dient [66].

Für die Messung der Protein-Expression in Gewebe bedient man sich der Western-Blot-Technologie, bei der ein spezifischer Antikörper verwendet wird, der das zu interessierende Protein detektieren kann (Immunoblot) [66].

Auf ähnliche Weise werden bei der Immunfluoreszenzmikroskopie selbige Hautstanzen mit fluoreszierenden sekundären Antikörpern behandelt und so das MMP-1 Protein mikroskopisch nachgewiesen.

Eine weitere Methode ist die nicht-invasive Resonanz-Raman-Spektroskopie. Bei dieser Methode werden die antioxidativen Eigenschaften von Karotinoiden in der Haut genutzt. So wird mit einem Argon-Laser die Konzentration von Karotinoiden vor und nach Bestrahlung gemessen. Da sich die Karotinoidkonzentration nach Bestrahlung durch Bildung von Radikalen und Reduktion durch jene Karotinoide verringert, kann indirekt auf die Menge der entstanden Radikale geschlossen werden [95].

8 Methoden

8.1 Studiendesign

Diese Pilotstudie hatte das Ziel, das Verhalten der Haut auf den „Stressor“ elektromagnetische Strahlung im Hinblick auf die Bildung von Radikalen zu untersuchen. Das elektromagnetische Spektrum ist weit gefächert und beinhaltet kurzwellige „Strahlen“, wie z.B. Röntgenstrahlung, bis hin zu langwelligen „Wellen“, wie z.B. den Radiowellen, die jeweils sehr unterschiedlichen Eigenschaften aufweisen. Es kann festgehalten werden, dass je kürzer die Wellenlänge ist, desto geringer ist die Eindringtiefe und desto höher ist die Energie der Photonen. Da die Wirkung unterschiedlicher Wellenlängen untersucht werden sollte, wurde in dieser Studie der Wellenlängenbereich von 300-2000 nm analysiert. Die Radikalmessungen erfolgten für die folgenden 3 Spektralbereiche: UV (325–380 nm), VIS/NIR (400-2000 nm) und NIR (780-2000 nm). Die Radikalproduktion durch den VIS-Bereich *in vivo* (400-700 nm) wurde berechnet (Radikalproduktion VIS/NIR – Radikalproduktion NIR).

Da nicht nur die Wellenlänge einen Einfluss auf die Bildung von Radikalen hat, sondern auch die Herkunft und Beschaffenheit der Haut selbst, wurde mit verschiedenen Hautmodellen gearbeitet.

Wenn die Radikalbildung vor und nach Bestrahlung gemessen werden soll, sind ESR-Messungen *in vivo* schwierig durchzuführen. Für Bestrahlungsexperimente können zuverlässige *in vivo* Messungsergebnisse nur *in situ* gemessen werden, wie kürzlich für VIS/NIR-Bestrahlung gezeigt wurde [1, 116].

Im Zentrum des Interesses stand die Untersuchung der intakten Haut des Menschen. Nur hier lassen sich die Reaktionen der Haut auf Stress durch Bestrahlung in physiologischer Weise untersuchen. Zehn Probanden nahmen an der Bestrahlung mit UV-Licht teil. Bei zwei Probanden wichen die Messungen >25% von der Standardabweichung ab, sodass sie von der Studie ausgeschlossen wurden. Bei den VIS/NIR-Licht Untersuchungen nahmen ebenfalls zehn Probanden teil. Auch hier unterschieden sich bei einem Teilnehmer die Messungen so stark, dass ein Ausschluss vorgenommen wurde. Bei der ausschließlichen Bestrahlung mit NIR-Licht wurden insgesamt sechs Probanden eingeschlossen.

Da es aus Gründen der Praktikabilität und Ethik leichter ist mit Hautmodellen, anstatt mit Probanden zu arbeiten, erfolgten alle Untersuchungen außerdem an der Haut von Schweineohren (SWO) sowie an frisch resezierter Humanhaut nach Brust- und Bauchhautresektionen. So ist es möglich, die Bildung von Radikalen in den verschiedenen Modellen zu vergleichen und auf Unterschiede und eventuelle Gemeinsamkeiten hin zu analysieren. *In vivo* sind Experimente nicht gut reproduzierbar und aus ethischen Gründen nicht immer anwendbar. Vor allem ist aber die Bestrahlung mit UV-Licht schwer zu begründen. Deshalb wurde die Haut bisher meistens an Modellen, also *ex vivo* untersucht. Nur in wenigen Studien wurden bisher Untersuchungen am Menschen (*in vivo*) durchgeführt [8, 117, 118]. Mit UV-Licht wurde Haut von acht Schweineohren und Haut von sechs Patienten nach Brust- und Bauchhautresektionen bestrahlt.

Je dunkler/ gebräunter die Haut ist, desto weniger Radikale werden im UV-Bereich mittels der ESR-Spektroskopie sichtbar. Dies liegt an den farbgebenden Melanozyten, welche entstandene Radikale teilweise neutralisieren können. Die Untersuchungen fanden von Herbst bis Winter statt. So wurde sichergestellt, dass die Haut der Probanden so wenig wie möglich gebräunt war. Generell wurden Studienteilnehmer ausgewählt, welche keine Besuche im Solarium tätigten oder vor kurzem starker Sonnenstrahlung von einem eventuellen Urlaub ausgesetzt waren. Außerdem war es den Probanden untersagt, am Tag der Untersuchung Hautpflegeprodukte am Unterarm aufzutragen. Alle Probanden mussten einen Fragebogen ausfüllen, der über ihre Ernährungsgewohnheiten und ihren Lebensstil Auskunft gab.

VIS/NIR-Licht hat durch seine Wellenlänge die Möglichkeit, tiefer in Gewebe einzudringen als UV-Licht. Eine zusammenfassende Übersicht mit allen untersuchten Wellenlängenbereichen ist in Abbildung 9 dargestellt.

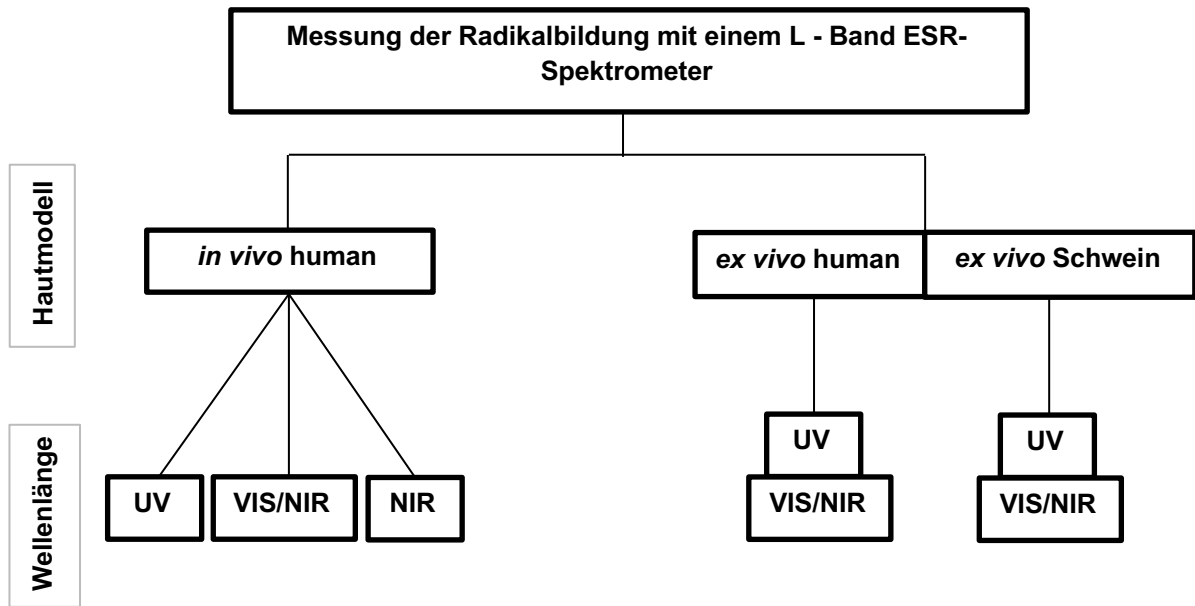


Abbildung 9: Übersicht der Untersuchungen in den verschiedenen Wellenlängenbereichen

8.2 Materialliste

Tabelle 6: Materialien

Material	Hersteller
PCA (Carboxy-2,2,5,5-Tetramethyl-1-Pyrrolidinoxy)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Epikutanpflaster (Okklusivplaster)	Finn Chamber Epitest Ltd Oy, Helsinki, Finland
Filterpapierscheiben	Epitest Ltd Oy, Tuusula, Finland
Cyclohexan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Band ESR-Spektrometer	LBM MT 03; Magnettech, Berlin, Deutschland

Sonnensimulator LS 0104	LOT Oriel GmbH & Co.KG, Darmstadt, Deutschland
Abdeckglas	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Quarzglas	SPI, Westchester, PA, USA

8.3 Auswahl der Probanden

Ein- und Ausschlusskriterien

Tabelle 7: Kriterien der Studie

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Vollendung des 18. Lebensjahres	Minderjährige Probanden
Unterschriebene, schriftliche Einverständniserklärung	Nicht unterschriebene Einverständniserklärung
Gesunde Probanden	Zum Zeitpunkt der Messung erkrankte Probanden
Keine Pigmentierungs- oder Hautbarrierestörungen im Bereich der Unterarme	Pigmentierungs- oder Hautbarrierestörungen im Bereich der Unterarme
	*Tragen von metallischen Piercings oder Implantaten
	*Probanden, welche zum Zeitpunkt der Untersuchung unter größerem Stress standen

* Stress ist ein bekannter Auslöser für ein geschwächtes antioxidatives Potential. Dies kann die Bildung von Radikalen begünstigen. So wurden Probanden, welche im Prüfungsstress oder anderweitig unter physischen oder psychischen Druck standen, nicht mit in die Studie eingeschlossen. Auch das Tragen von metallischen Objekten war ebenso ein Ausschlusskriterium, da das ESR-Spektrometer starke Magneten enthält.

Alle Probanden, welche in die Studie eingeschlossen wurden, waren gesund, litten nicht an Allergien oder Lebensmittelunverträglichkeiten und wiesen einen Hauttyp II nach Fitzpatrick auf [119]. Somit wurden 23 gesunde Probanden im Alter zwischen 18-42 Jahren in die Studie eingeschlossen. Jeder Proband hatte des Weiteren eine schriftliche Einverständniserklärung unterschrieben. Die Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin stimmte der Studie im Einverständnis mit der Erklärung von Helsinki von 1983 zu.

Tabelle 8: Anzahl, Alter BMI und Rauchgewohnheiten der Probanden

		UV	VIS/NIR	NIR	gesamt
Anzahl	gesamt	8	9	6	23
	männlich	5	4	2	11
	weiblich	3	5	4	12
Alter (Jahre)	MW	24.25	27.6	25.5	25.78
	SD	4.3	6.76	1.87	4.31
	min	18	22	23	21
	max	32	42	28	34
BMI [kg/m²]	MW	24.2	22.57	22.43	23.06
	SD	1.11	2.06	1.76	1.65
	min	23.52	20.07	20.41	21.33
	max	26.51	26.21	25.14	25.95
Rauchgewohnheit	R	4	3	2	9
	NR	4	5	4	13

Die genaue Verteilung der Probanden, mit Alter, BMI und Rauchergewohnheiten ist in *Tabelle 8* tabellarisch dargestellt.

Es wurde eine ausgewogene Menge an Rauchern und Nichtraucher rekrutiert. Der Großteil der Probanden war zwischen 20 und 30 Jahre alt. Da ein zu hoher Wassergehalt im Arm das ESR-Signal schwächt, wurde darauf geachtet möglichst keine übergewichtigen Probanden zu rekrutieren. Der BMI bewegte sich im Durchschnitt zwischen 20-25. Im Durchschnitt haben Männer umfangreichere Unterarme welche auch signaldämpfend wirken. Die Geschlechter der Probanden sind ebenfalls weitestgehend harmonisch verteilt.

8.4 Fragebogen zu Ernährungs- & Lebensgewohnheiten

Alle Probanden haben vor der Messung einen Fragebogen zu Ernährungs- und Lebensgewohnheiten ausgefüllt (S. 76), welcher von A. Lauer entwickelt wurde [120]. Dieser enthielt ein breites Spektrum an Faktoren, welche das antioxidative System der Haut direkt und indirekt beeinflussen könnten. Zu den direkten Einflüssen gehören beispielsweise die Anwendung von Pflegecremes mit eventuell enthaltenen Antioxidantien, der Hauttyp nach Fitzpatrick [119], Solariumbesuche, die durchschnittliche Sonnenexposition sowie Anwendung von Sonnencremes mit Lichtschutzfaktor. Außerdem wurde nach indirekten Einflüssen, wie dem Auftreten von Stress im Privat- oder Berufsleben, der Frequenz von sportlicher Betätigung, der Anzahl von Infekten oder Magen- Darmerkrankungen pro Jahr sowie nach Rauch- oder Alkoholgenuss gefragt.

Die Probanden sollten weiterhin Angaben zu ihrer Ernährung machen. So wurde nach dem Anteil von kohlenhydrathaltiger und fettreicher Nahrung gefragt. Bei konsumiertem Obst und Gemüse wurde eine Liste mit typischen regionalen sowie importierten Lebensmitteln vorgegeben, in der die Häufigkeit des Verzehres vermerkt werden sollte. Probanden, welche viel oder wenig Obst und Gemüse zu sich nahmen, wurden in die Gruppen „antioxidantienreiche Ernährung“ und „antioxidantienarme Ernährung“ eingeteilt. So konnte später die Menge der entstandenen Radikalen nach Bestrahlung in Relation mit den Ernährungsgewohnheiten gesetzt werden, mit dem Ziel eine eventuelle Korrelation zu erkennen.

Da diese Lebensumstände das antioxidative System positiv wie auch negativ beeinflussen können, ist es unabdingbar zu wissen, unter welchen Einflüssen die Probanden standen. So könnte eine vergleichsweise geringe Bildung von Radikalen in der Haut, z.B. mit einer vitaminreichen Ernährung oder einem stressarmen Lebensstil in Verbindung gebracht werden.

8.5 Vorbereitung der Haut für *in vivo* ESR-Messungen

In dieser Studie sollte der Frage nachgegangen werden, wie viele Radikale in der menschlichen Haut nach Bestrahlung mit verschiedenen Wellenlängenbereichen entstehen. Hierfür wurde die Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie (ESR) genutzt. So war es möglich, entstandene Radikale von Probanden am Ort der Entstehung *in vivo* zu messen. Den lebenden Menschen zu untersuchen ist von grundlegender Bedeutung, da nur hier vitale, biologische Prozesse ablaufen, welche nicht simuliert werden können und einen erheblichen Einfluss auf die Bildung von Radikalen haben.

Es wurde den Probanden das Testradikal PCA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) auf ihre Haut aufgetragen. Nachdem die Haut bestrahlt wurde, kam es durch diesen Stress auf die Zellen, zur Bildung von Radikalen. Diese Radikale haben sich mit dem PCA verbunden und konnten so über den Abfall des ESR-Signals indirekt detektiert werden.

Zur Messung der Bildung von Radikalen wurde die Innenseite des Unterarmes der Probanden gewählt. Dieses Hautareal ist relativ gering gebräunt, was zu einer vergleichsweise höheren Bildung von Radikalen, als am äußeren Unterarm oder im Gesicht führt. Zunächst wurden im untersuchten Bereich befindliche Haare entfernt und die Haut mit einem in Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) getränktem Papierhandtuch gereinigt, um den Fettgehalt der Haut der unterschiedlichen Probanden anzugleichen. Anschließend wurden an zwei verschiedenen Stellen des Unterarms zwei Messareale markiert. Hiernach wurden auf dem Unterarm zwei Filterpapiere aufeinander platziert (Epitest Ltd Oy, Tuusula, Finland). Darauf wurden 100 µl 0.8% PCA (3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy) Lösung (50 mM, Ethanol/Wasser; 1:1(v/v)) aufgetragen und okklusiv abgeklebt (Finn Chamber Epitest Ltd Oy, Helsinki, Finland).

Nach einer Penetrationszeit von 40 Minuten erfolgte die Entfernung der Okklusionsbedeckung sowie der Filterpapierscheiben. Der Arm des Probanden wurde einmal abgetupft und in der ESR-Halterung eingespannt. Die Probanden lagen während der gesamten Messung ruhig auf einer Liege, damit Muskelzuckungen oder gar Bewegungen des Armes das empfindliche ESR-Signal nicht beeinflussten.

8.6 Probenvorbereitung für die *ex-vivo*-ESR-Untersuchungen

Untersuchung von Schweinehaut

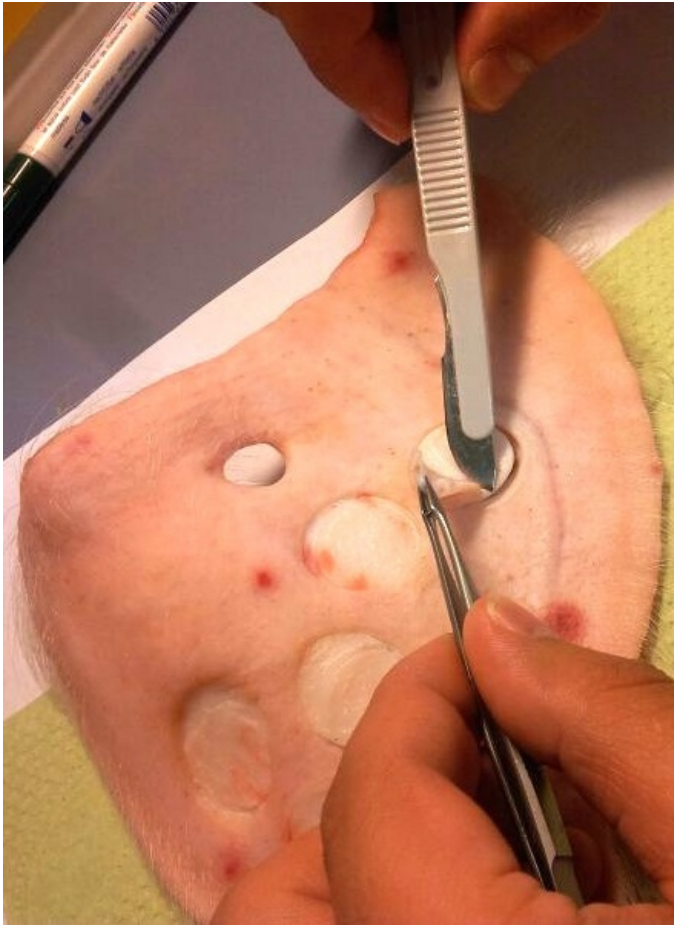


Abbildung 10: Präparierung der Schweineohren

Die Haut des Schweineohrs (SWO) hat sich als gutes Modell für menschliche Haut bewiesen [118]. Haag et al. zeigten, dass die Katalaseaktivität der Schweinehaut ähnlich zu der des Menschen ist. Katalase ist ein antioxidatives Enzym, welches den Körper vor Oxidationsprozessen schützt. Es wandelt Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser um. Nach der Bestrahlung durch UV-Licht wurden vergleichbar viele Radikale bei Humanhaut und Schweinehaut nachgewiesen [125]. Der große Vorteil von Tiermodellen ist die gute Verfügbarkeit im Vergleich zu

menschlicher Haut. Alle verwendeten Schweineohren stammen von einem lokale Bauern (Gerald Nusche, Niederlehme, Brandenburg). Genehmigt wurden die Nutzung der Schweineohren für diese Experimente durch das Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Landkreis Dahme - Spreewald.



Zunächst wurden die Schweineohren gereinigt, vorhandene Haare entfernt und die Haut mit Ethanol gesäubert. Die Haut wurde mit Klebestreifen abgeklebt und der Klebestreifen danach abgerissen. Mithilfe dieser Technik ist es möglich, die Hautbarriere etwas zu schwächen und so das Eindringen des Spinmarkers PCA zu erleichtern. Da die gemessenen Radikale nicht auf der Hautoberfläche, sondern innerhalb des oberen Hautgewebes entstehen, ist es mit dieser Methode möglich, die oxidativen Prozesse der oberen Hautschicht zu untersuchen. Zwei Hautbiopsien wurden mit einem Durchmesser von 17 mm aus dem Ohr herausgestanzt.

Abbildung 11: Bestrahlung der Hautbiopsie mit UV-Licht

Auf diesen Hautproben wurde jeweils ein Filterpapier platziert. Um eine ähnliche Intensität wie *in vivo* zu erreichen, wurden nur 50 μ l 0.8% PCA Lösung (50 mM, Ethanol/Wasser; 1:1; (v/v)) aufgetragen und okklusiv abgeklebt.

Nach einer Penetrationszeit von 20 Minuten wurde die Okklusionsbedeckung entfernt, das Ohr einmal abgetupft und auf einem Objektträger festgeklebt. Anschließend wurde der Objektträger auf einer speziellen Halterung im ESR-Gerät befestigt.

Präparation von Human exzidiierter Haut für ESR-Messungen

Die Haut des Menschen ist für die Forschung von großem Interesse. Tiermodelle lassen sich zwar als Vergleich nutzen, doch deren Untersuchungsergebnisse liefern nur eine ungefähre Aussage. Der Nachteil von human exzidiierter Haut ist zum einen die schlechte Verfügbarkeit und zum anderen die geringe biologische Restaktivität, welche für die Bildung von Radikalen wichtig ist.

Von sechs Probanden (vier Frauen, zwei Männer) im Alter von 48 bis 76 Jahren wurde im Rahmen von drei Brust- und drei Bauchhautresektionen Haut entnommen. Die Haut wurde gekühlt gelagert und am selben Tag für ESR-Messungen verwendet.

Die exzidierte Humanhaut wurde mit Ethanol gereinigt, Haare sowie das Unterhautfettgewebe entfernt und jeweils zwei 17 mm große Hautbiopsien auf einen Objektträger geklebt. Um eine ähnliche Intensität wie *in vivo* zu erreichen, wurden nur 50 µl 0.8% PCA für 20 Minuten auf ein Stück Filterpapier gegeben und okklusiv abgeklebt.

8.7 Bestrahlung

Die Haut (*in vivo / ex vivo*) wurde mit einem Sonnensimulator (LS 0104, LOT Oriel GmbH & Co.KG, Darmstadt, Deutschland) bestrahlt. Dieser Simulator verfügte in etwa über die zweifache Leistung der Sonnenstrahlung.

Um das UV-Spektrum zu erhalten, wurden ein Sonnenspektrumfilter, ein Graufilter und ein Gaußfilter verwendet. Zum Weiterleiten des Lichtes wurde eine Lichtleitfaser für UV-Licht genutzt.

Für das VIS/NIR-Spektrum kam ein Sonnenspektrum Filter zum Einsatz. Das Licht wurde mit einer VIS/NIR-Lichtleitfaser weitergeleitet.

Um das NIR-Spektrum zu erhalten, kam ein NIR-Filter und einen Sonnenspektrum-Filter zum Einsatz. Das Licht wurde auch mit einer VIS/NIR-Lichtleitfaser weitergeleitet.

8.8 ESR-Parameter und Messdurchführung

Die Radikalbildung wurde mit einem L-Band ESR-Gerät LBM MT 03 (Magnettech, Berlin, Germany) gemessen. Folgende Einstellungen wurden für das ESR-Spektrometer gewählt: Mikrowellenfrequenz (1.3 GHz), Zentrales Magnetfeld (46 mT), Magnetfeld-(sweep) Breite (8 mT), Magnetfeld-(sweep) Zeit (10 s) und eine modulierbare Amplitude von (0.15 mT).

In-vivo-Messdurchführung

Während der UV-Bestrahlung wurde sechs Minuten lang ein Ausgangssignal ermittelt, um die bereits vorhandenen Radikale sowie die Ausgangsintensität, die Baseline des Markers, zu messen. Danach wurde mit UV-Licht an der gleichen Position mit einer Leistung von 1.16 mW/cm^2 (0.348 J/cm^2), welche 0.1 mW/cm^2 (30 mJ/cm^2) UV-B enthielt, für fünf Minuten bestrahlt. Damit die Haut nicht mit dem ESR-Sensor in Berührung kam, wurde ein Quarzglas (SPI, Westchester, PA, USA) zwischen Haut und Sensor gelegt. Quarzglas ist durchlässig für UV-Licht im Gegensatz zu normalem Glas, welches UV-Licht absorbiert.

Bei der Untersuchung mit VIS/NIR-Licht war die Durchführung ähnlich. Da diese Wellenlänge jedoch weitaus weniger Energie als UV-Licht aufweist, wurde eine längere Bestrahlungszeit gewählt. So konnten genügend Radikale entstehen, um diese signifikant nachweisen zu können. Es erfolgte 12 Minuten lang die Ermittlung des Ausgangssignals, danach wurde auch hier an der gleichen Stelle bestrahlt. Allerdings mit einer höheren Leistung von 120 mW/cm^2 (72 J/cm^2) und anstatt 6 Minuten für nun 10 Minuten. Damit die Haut keinen Kontakt mit dem Sensor bekam, wurde hier ein normales Abdeckglas (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) zwischen Sensor und zu messender Haut gelegt. Dieses Glas ist durchlässig für sichtbares- sowie infrarotes Licht, jedoch nicht für UV-Licht.

Bei der Bestrahlung mit NIR-Licht wurde ebenfalls eine längere Bestrahlungszeit gewählt, da auch NIR-Licht, im Vergleich zu UV-Licht, weniger energetisch ist. Um dennoch genug Radikale messen zu können, wurde 12 Minuten lang ein Ausgangssignal ermittelt. Anschließend wurde auch hier an der gleichen Stelle, aber mit einer Leistung von nur 60 mW/cm^2 (36 J/cm^2), für 10 min bestrahlt. Hier wurde ebenfalls ein Abdeckglas zwischen Sensor und Haut gelegt.

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wurden jeweils Doppelmessungen am selben Probanden durchgeführt und daraus Mittelwerte gebildet. Alle Messwerte wurden jeweils auf die erste Messung normiert. Die bestrahlten Messwerte wurden von den unbestrahlten Ausgangswerten abgezogen, um auf diesem Weg die Änderung der Radikalproduktion durch Bestrahlung berechnen zu können.

Ex vivo Messdurchführung

In den *ex vivo* Untersuchungen war das grundsätzliche Vorgehen und die Bestrahlungsleistung entsprechend den *in vivo* Messungen. Mit UV-Licht wurde jedoch 12 Minuten lang ein Ausgangssignal ermittelt. Danach erfolgte die Bestrahlung für 10 Minuten an der gleichen Position. Um das Signal zwischen den *in vivo*- und *ex vivo* Messungen zu adaptieren, wurde die Dämpfung dem Probenvolumen jedoch angepasst.

Insgesamt wurden acht Schweineohren mit UV-Licht und zehn Schweineohren mit VIS/NIR-Licht bestrahlt. Für die Untersuchung der Radikalproduktion in exzidierte Humanhaut wurden jeweils sechs Proben mit UV-Licht sowie sechs Proben mit VIS/NIR-Licht bestrahlt.

8.9 Lipidextraktion

Der oberflächliche Hautlipidfilm besteht aus Lipiden der Talgdrüsen der Dermis und aus den Lipiden der Korneozyten der Epidermis. Mithilfe dieser Fette ist es der Haut möglich, den Wasserverlust zu begrenzen und dem Eindringen von körperfremden Stoffen entgegenzuwirken. Da der Verlust von Lipiden zu einer gestörten Barrierefunktion führt, sollte die Lipid-Zusammensetzung der Haut der Probanden auf Veränderungen nach Bestrahlung mit UV- und VIS/NIR-Licht untersucht werden.

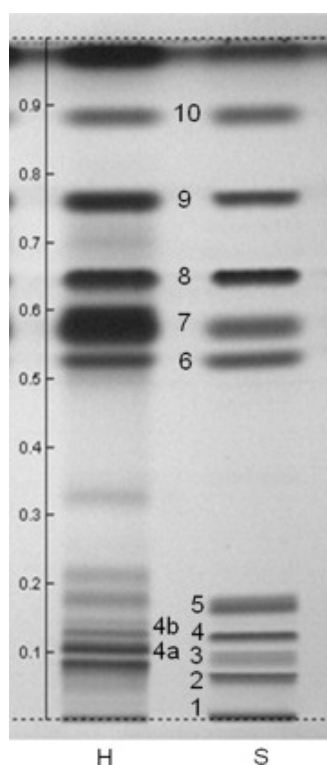
Um Fette aus der Haut lösen zu können, wurde ein Gemisch aus Cyclohexan (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) (1:4 (v/v)) verwendet. Vor und nach der Bestrahlung erfolgte die Bestimmung der Lipide in der oberen Hautschicht an zwei nah beieinanderliegenden Hautarealen. Für die Herauslösung der Lipide an den beiden Stellen wurde ein Zentrifugationsröhrchen (Oberfläche 7.3 cm²) mit 5 ml Lösung gefüllt und dieses auf den Unterarm gepresst. Die Probanden wurden angewiesen 1 Minute lang den Arm samt Röhrchen zu schütteln, damit die Flüssigkeit die Lipide aus der Haut extrahieren konnte. Dieser Ablauf wurde an selbiger Stelle noch zwei weitere Mal mit neuen Röhrchen samt neuer Mixtur wiederholt, um insgesamt drei Mal 5 ml Lösung zu erhalten. Diese 2 x 15 ml Hautlipidextrakt wurden in zwei Röhrchen gesammelt und bei – 20 °C tief gefroren, um es für die spätere Analyse zu konservieren. Die extrahierten Lipide wurden mit Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie (HPTLC) analysiert.

8.10 Lipidanalyse mit HPTLC

Mit der Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) ist es möglich, Lösungen, z.B. Fettbestandteile, aufzutrennen und die Masse der einzelnen Bestandteile zu bestimmen. Dabei wird das Gemisch in der „mobilen Phase“ mithilfe eines Lösungsmittels zu einer „Säule“ weitergeleitet. Diese Säule ist hohl, meist mit Kieselgel gefüllt und wird „stationäre Phase“ genannt. In dieser werden die Bestandteile der Lösung durch ihre polaren Eigenschaften aufgetrennt. Ihre Auswertung erfolgt mit einem Densitometer, dem sogenannten TLC-Scanner. Dabei wird die Farbdichte der Banden im sichtbaren und im ultravioletten Spektralbereich quantitativ gemessen und es kann auf diesem Weg eine Aussage über den Anteil der verschiedenen Lipide getroffen werden.

Die Analyse der Lipide wurde mit wenigen Änderungen nach der Prozedur von Farwanah et al. [121] vollzogen, mit geringfügigen Änderungen die denen von S.F. Haag et al. [122] entsprechen. Für die Analyse der Lipide der Haut wurden 10 µl der Lösung auf 6 mm Banden bei einem Fluss von Stickstoff auf Siliziumgel Platten gegeben, zu sehen in *Abbildung 12* [1]. (HPTLC, Siliziumgel 60, Merck, Darmstadt, Germany, 10 x 20 cm, vorbehandelt mit Methanol/Chloroform (v/v, 1:2) mit einem HPTLC Autosampler (ATS4, CAMAG, Muttenz, Schweiz)).

Tabelle 9: Lipide des Densitogrammes



Nr.	Substanz	Hersteller	Summenformel
10	Squalen	Sigma	C ₃₀ H ₅₀
9	Cholesterol-Oleat	Sigma	C ₄₅ H ₇₈ O ₂
8	Glycerol-Trioleat	Sigma	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆
7	Ölsäure	Sigma	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
6	Cholesterol	Sigma	C ₂₇ H ₄₆ O
5	Cer [NS]	Sederma	C ₃₆ H ₇₃ NO ₄
4b	Cer [NP2]	Sigma	-
4a	Cer [NP1]	Sigma	-
4	Cer [NP]	Evonik	C ₃₆ H ₇₃ NO ₄
3	Cer [AP]	Evonik	-
2	Cholesterol-3-sulfat	Sigma	C ₂₇ H ₄₅ O ₄ SNa
1	Phosphatidylcholin und Sphingomyelin	Sigma/ Fluka	- /C ₄₁ H ₈₄ N ₂ O ₆ P

Abbildung 12: Densitogramm

H: Stratum corneum-Extrakt aus Humanhaut

S: Standard Lipid Mix [1]

Die Lösung wurde einmal pur und einmal verdünnt (Verdünnungsfaktor 4) gemessen. Die Lipide wurden nach Färbung mit 10 % CuSO₄ (Rot), 8 % H₃PO₄ (Merck) und in wässriger Lösung quantifiziert, indem sie für 8 Minuten bei 180 °C erhitzt wurden. Dafür wurde ein TLC Wellenlängen-Scanner 3 (CAMAG) mit einer WinCATS Software (Version 1.4.4.6337) benutzt, der bei einer Wellenlänge von 600 nm maß. Für diesen Zweck wurden folgende Substanzen benutzt: L- α -Phosphatidylcholin, Cholesterin, Ölsäure, Triolein, Cholesterinester, Natriumcholesterinsulfat, Squalen, Sphingomyelin (alle von Sigma Aldrich), Ceramide [NS] (Sederma, Nettetal, Germany), Ceramide [NP], und Ceramide [AP] (Evonik, Essen, Deutschland). Alle Substanzen wurden in einer Mischung aus Methanol/Chloroform (1:1, (v/v)) aufgelöst. Für die Bestimmung der einzelnen Komponente aus der Lösung im *Stratum corneum* wurde das Standard Ceramid [NP] verwendet. Die Menge von L- α -Phosphatidylcholin und Sphingomyelin wurde als Summe

bestimmt (sum PC + SM). Es wurde weiterhin drei Mal mit zehn Eichlösungen der Standardmischung kalibriert.

8.11 Statistik

Mit dem Programm Cu3.exe (Magnettech, Berlin, Deutschland) wurden die ESR-Signale aufgezeichnet. Hiermit ist es auch möglich, die einzelnen Einstellungen des ESR-Gerätes, wie etwa die Mikrowellenfrequenz, zu verändern.

Die erhaltenen ESR-Spektren wurden mit dem Programm MPlot (Magnettech, Berlin, Deutschland) ausgewertet. Um das Signal-Rausch Verhältnis zu verbessern, wurden jeweils 4 aufeinanderfolgende ESR-Spektren zu einem einzigen Spektrum zusammengefasst.

In der Studie wurde insgesamt 23 Probanden untersucht. An jedem Probanden erfolgte eine Doppelmessung. Wenn die Ratenkonstante der beiden Messungen 30% voneinander ab, wurde der Proband aus Gründen der Reproduzierbarkeit von der Studie ausgeschlossen. Die Messwerte der beiden Messungen wurden gemittelt und die Standardabweichung sowie der Standardfehler berechnet. Alle Messergebnisse wurden auf ihre Signifikanz hin untersucht, wobei $p \leq 0,05$ als signifikant unterschiedlich definiert wurde.

(*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$)

Die Daten wurden auf ihre statistische Signifikanz mit dem Programm SPSS 19 (SPPSS Inc., Chicago, IL, USA) unter Windows geprüft. Angewandt wurde der Mann-Whitney U-Test.

9 Ergebnisse

9.1 Radikalbildung durch UV-Licht

Ziel dieser Untersuchung war es zu analysieren, wie sich UV-Strahlung auf die menschliche Haut *in vivo* auswirkt, genauer gesagt, wie viele Radikale dabei entstehen. Jung et al. sowie Zastrow et al. bestrahlten bereits Humanhaut *ex vivo* mit UV-Licht [3, 117]. ESR-Messungen sind *in vivo* schwierig durchzuführen. Für Bestrahlungsexperimente können zuverlässige *in vivo* Messergebnisse nur *in situ* gemessen werden, wie kürzlich bei VIS/NIR-Bestrahlung gezeigt wurde [1, 116].

In dieser Studie wurde unter anderem menschliche Haut *in vivo* bestrahlt. Mit UV-Licht ist es *in vivo* nicht möglich Haut so lange zu bestrahlen, wie es *ex vivo* der Fall ist. Dies liegt an der minimale Erythemdosis von 30 mJ/cm^2 , welche aus ethischen Gründen nicht überschritten werden darf. Kein Proband entwickelte ein Erythem.

Bei den Probanden ist erst 6 Minuten lang ein Ausgangssignal ermittelt worden, danach wurde 5 Minuten lang mit UV-Licht bestrahlt (Abbildung 13 A). Das ESR-Signal blieb ohne Bestrahlung bei allen Experimenten relativ konstant.

Bei den Hautbiopsien von Schweineohren sowie der human exzidierten Haut wurden jeweils 10 Minuten lang ein Ausgangssignal ermittelt und anschließend 10 Minuten lang mit UV-Licht bestrahlt.

Nach dem Einsetzen der Bestrahlung, fiel das ESR-Signal verschieden stark ab. Um die Änderung der Radikalproduktion zu errechnen, wurden die bestrahlten Werte von den Ausgangswerten abgezogen, was in Abbildung 13 dargestellt ist.

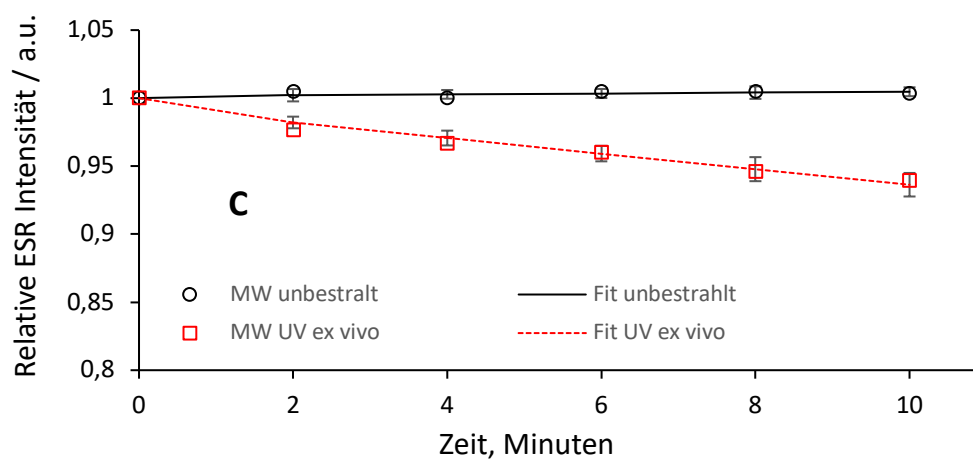
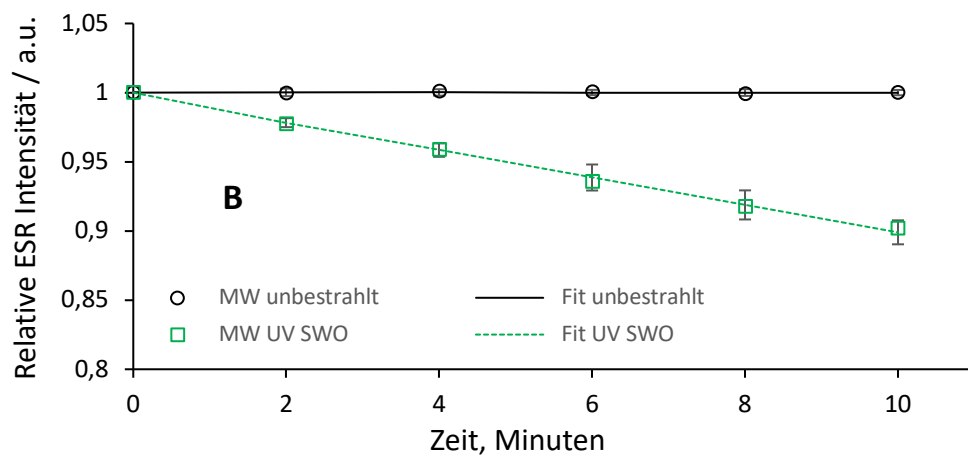
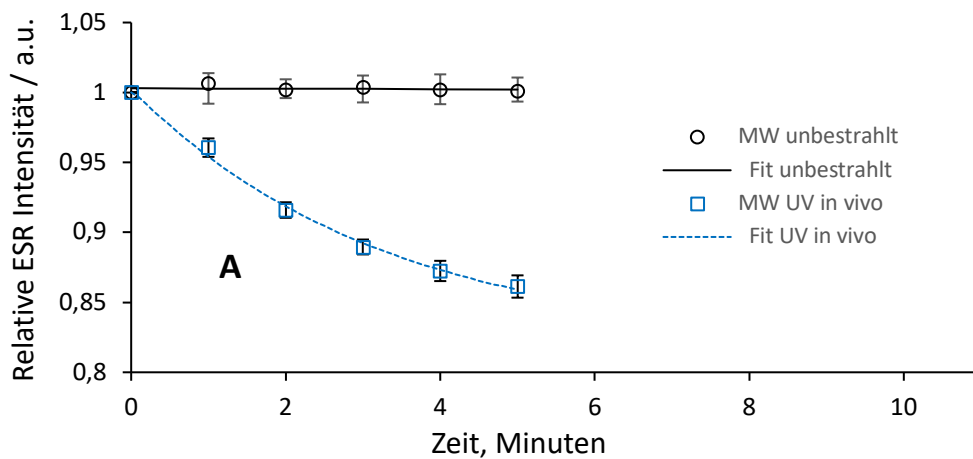


Abbildung 13: Abfall der relativen ESR-Intensität nach Bestrahlung mit UV-Licht

UV-Licht bestrahlte Haut von Probanden in vivo (A), Schweineohren (B) sowie von human exzidierte Haut (C) mit jeweils $1,6\text{mW}/\text{cm}^2$ ($\text{MW} \pm \text{SEM}$).

Die Bestrahlung mit UV-Licht zeigte unter vergleichbaren Bedingungen bei *in vivo* und *ex vivo* Untersuchungen (humane Haut und Schweinehaut Biopsien) Unterschiede in der Bildung von freien Radikalen, wie der Vergleich in Abbildung 14 veranschaulicht.

Es zeichnete sich deutlich ab, dass sich *in vivo* die meisten Radikale bilden. Die Messungen waren im Vergleich zu human exzidierte Haut hochsignifikant ($P \leq 0,001$), gefolgt von Biopsien der Haut von Schweineohren, welche eine Signifikante ($P \leq 0,05$) 2,8-fach kleinere Zunahme der kumulativen Radikalbildung zeigten. Die Biopsien von human exzidierte Haut zeigte die niedrigste Bildung an freien Radikalen. Hier wurden, im Vergleich zu *in vivo* bei 4 Minuten, ca. 3,5-mal weniger Radikale gebildet, wobei der Unterschied zu Schweinehaut nicht sehr groß war.

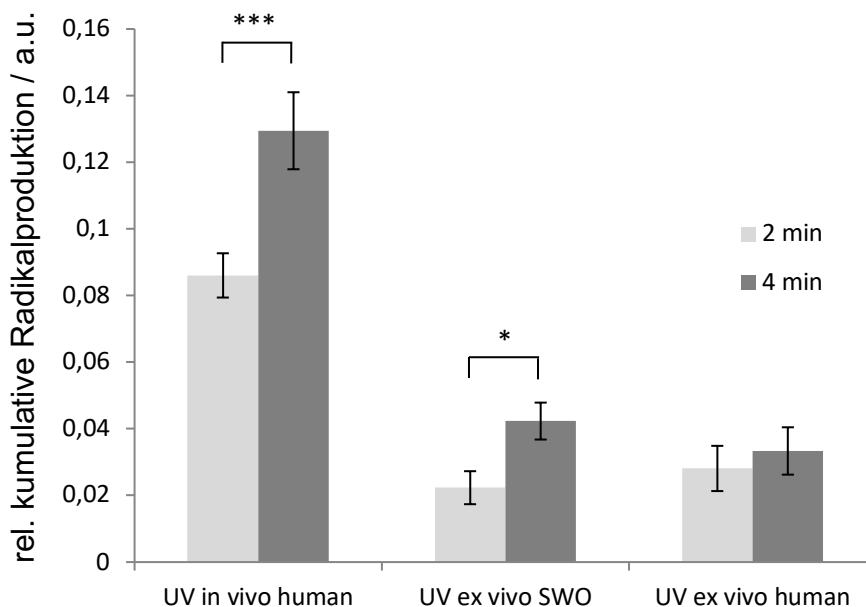


Abbildung 14: Vergleich der Radikalbildung mit UV-Licht nach 2 und 4 Minuten

In vivo bei 4 Minuten um Faktor 3 mehr Radikalproduktion als SWO und Faktor 4 mehr Radikalproduktion als *ex vivo*. MW \pm SEM, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$

Die Unterschiede der Menge der gebildeten Radikale bei 2 und 4 Minuten sind ebenfalls in Abbildung 14 dargestellt. Bei den *in vivo* Versuchen kam es nach 4 Minuten zu der höchsten Radikalproduktion gefolgt von Haut von Schweineohren mit Verminderung auf $32,69 \pm 4,02$ % und einer weiteren Verminderung bei human exzidierte Haut auf $24,36 \pm 5,19$ %.

Zwischen den einzelnen Experimenten ist nicht nur die Menge der gebildeten Radikale unterschiedlich, auch die Kinetik verhält sich individuell anders. So ist bei der Bildung von Radikalen *in vivo* ein sehr steiler Anstieg zu erkennen, welcher im Verlauf in die Sättigung fällt. Human exzidierte- und Schweinehaut bilden eher linear Radikale, welche nicht in eine Sättigung zu scheinen gehen (Abbildung 15).

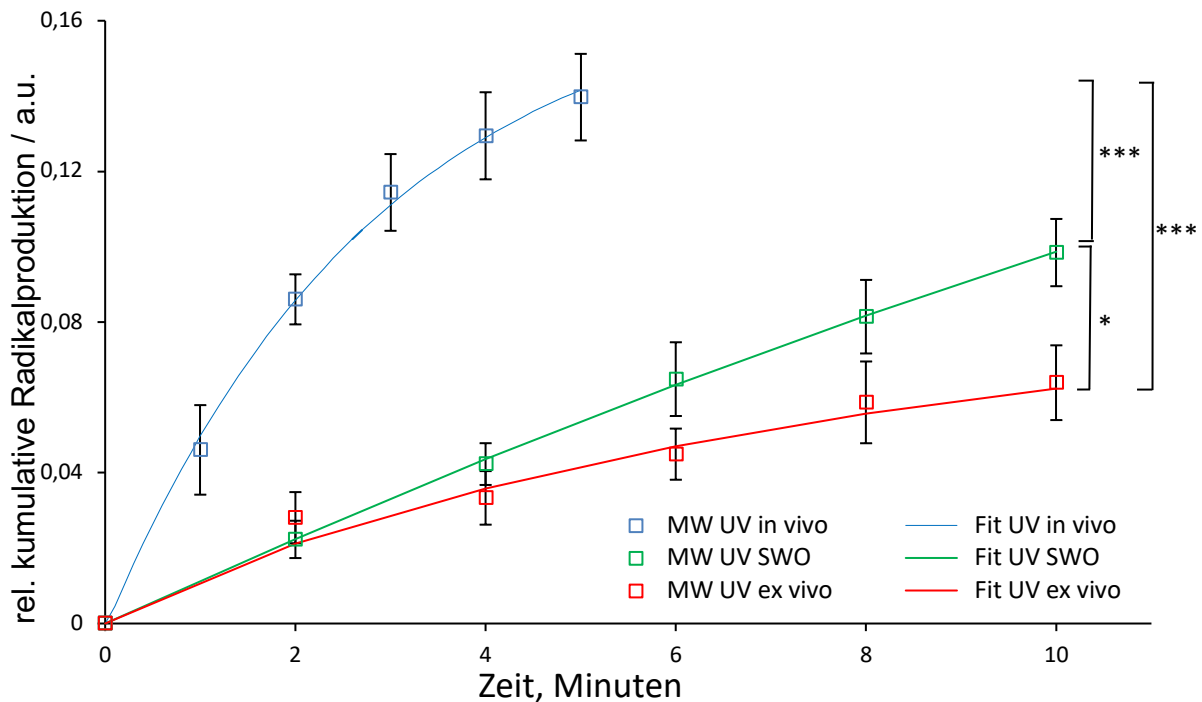


Abbildung 15: Vergleich der zeitlichen Abhängigkeit der Radikalbildung während der UV Bestrahlung

Probanden (blau), Schweineohren (grün) und human exzidierten Haut (rot) mit jeweils $1,16\text{mW/cm}^2$, $\text{MW} \pm \text{SEM}$, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$

9.2 Radikalbildung durch sichtbares und nahes infrarotes Licht

In einem zweiten Teil wurde Haut mit VIS/NIR-Licht bestrahlt. Auch hier sollte untersucht werden, wie sich menschliche Haut im Verhältnis zu Schweinehaut und human exzidierten Haut bei der Bestrahlung verhält. Mit VIS/NIR-Licht war es länger möglich Haut zu bestrahlen. Im Unterschied zu UV-Licht, welches ein Erythem nach fünf Minuten Bestrahlungszeit induziert, konnte VIS/NIR-Licht für zehn Minuten angewandt werden – es entstand auch hier bei keinem Probanden ein Erythem.

In Abbildung 16 ist zu sehen, dass *in vivo* bei 4 Minuten der größte Anteil an Radikalen produziert wurde, gefolgt von Schweinehaut mit noch $72,41 \pm 18,3$ % der Radikale und human exzidiierter Haut mit $40,92 \pm 8,08$ % der Radikale. Die Menge der produzierten Radikale ist zwar geringer als bei den UV-Untersuchungen, das Verteilungsmuster ist jedoch ähnlich. Die Bestrahlung mit VIS/NIR-Licht zeigt bei vier Minuten, bei allen Untersuchungen, eine signifikante Bildung von freien Radikalen. *In vivo* wurde jedoch ein Faktor von 0,6 niedrigerem Signal bei $0,07 \pm 0,03$ a.u. im Vergleich zu UV-Licht gemessen. Die Menge an freien Radikalen *in vivo*, nach einer Bestrahlungszeit mit VIS/NIR-Licht von 10 Minuten, ist immer noch geringer verglichen mit der UV-Bestrahlung *in vivo* nach vier Minuten (Abbildung 19).

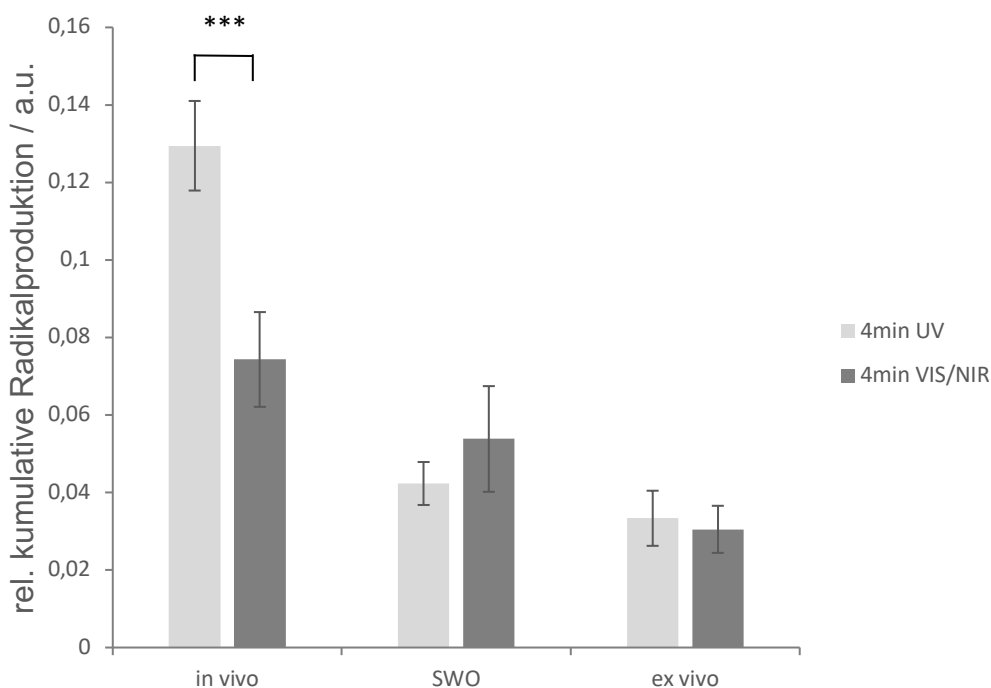


Abbildung 16: Säulendiagramm UV und VIS/NIR Vergleich bei 4 Minuten

Vergleich der Radikalbildung unter UV-Licht (hell) und VIS/NIR-Licht (dunkel) bei den Probanden, den Schweineohren und der human exzidierten Haut bei 4 Minuten. UV-Licht mit $1,6\text{mW}/\text{cm}^2$ und VIS/NIR-Licht mit $120\text{mW}/\text{cm}^2$. $MW \pm SEM$, *** $p \leq 0,001$

Auch die Kinetik verhält sich anders. So ist bei den Probanden *in vivo* längst nicht so ein steiler Anstieg zu sehen wie bei den UV-Messungen. Im Verlauf der Bestrahlung fällt die Radikalproduktion auch nicht so schnell in die Sättigung, was in Abbildung 17 zu sehen ist. Die Unterschiede zwischen der *in vivo* und *ex vivo* Gruppe sind bei der Bestrahlung mit VIS/NIR-Licht weniger stark ausgeprägt als bei UV-Licht. Bei VIS/NIR-Licht bestrahlter Humanhaut unterscheiden sich *in vivo* und *ex vivo* um einen Faktor von zwei.

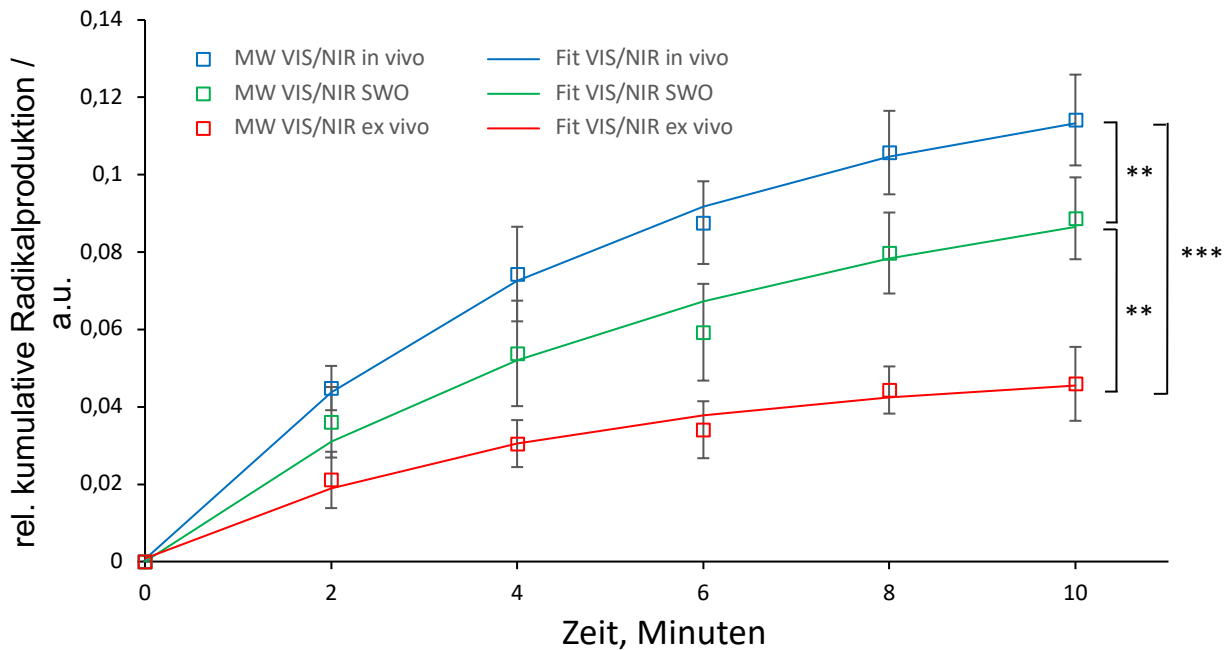


Abbildung 17: Vergleich der zeitlichen Abhängigkeit der Radikalbildung während der VIS/NIR-Bestrahlung

Probanden (blau), Schweineohren (grün), human exzidierte Haut (rot) mit jeweils 120mW/cm^2 (nach 10 Minuten 72mJ/cm^2). In vivo bei 4 Minuten um Faktor 1,4 mehr Radikalproduktion als SWO und Faktor 2,5 mehr Radikalproduktion als ex vivo. MW \pm SEM, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

9.3 In vivo Radikalbildung durch NIR-Licht

In diesem Untersuchungsabschnitt sollte ausschließlich das mögliche, schädliche Potential von NIR-Licht untersucht werden. NIR-Licht induzierte Radikale setzen die Aktivität von Enzymen voraus. Diese sind in exzidierte Haut stark reduziert. Daher wurden ausschließlich *in vivo* Messungen durchgeführt. Um die verschiedenen Wellenlängenbereiche *in vivo* vergleichen zu können, wurden ausschließlich Probanden mit Infrarotlicht bestrahlt.

Die untersuchten Personen zeigten bei der Bestrahlung mit NIR-Licht die geringsten Veränderungen in Bezug auf die Radikalbildung. Zieht man die Radikalmenge gebildet im NIR-Bereich von der Bildung im VIS+NIR-Bereich ab, werden trotzdem noch 34 % der Radikale im NIR-Bereich gebildet. Bei 4 Minuten entstanden 18 % der Radikale, welche

durch UV-Licht entstanden sind. Das entspricht einem Faktor von 5,4. Die Radikalbildung verläuft initial linear und geht dann in eine leichte Sättigung über.

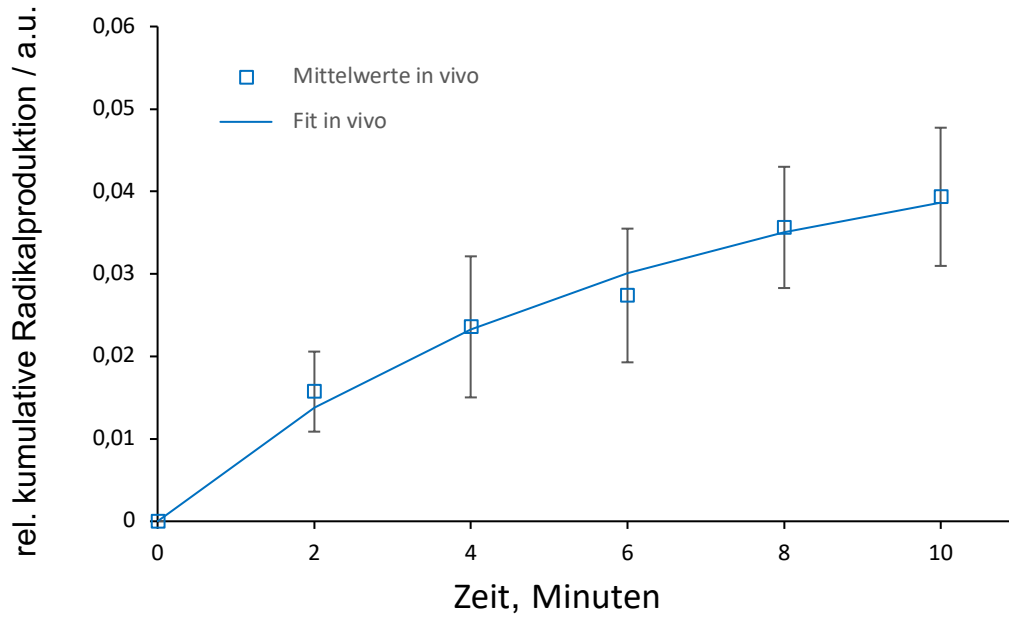


Abbildung 18: Kumulative Radikalbildung nach NIR-Bestrahlung in vivo

Änderung der Radikalproduktion der Probanden bei Infrarot Bestrahlung mit 60mW/cm^2 (36 J/cm^2 nach 10 Minuten) $MW \pm SEM$.

9.4 *In vivo* Vergleich Radikalproduktion UV, NIR, VIS

Die Bildung von Radikalen wurde bei allen Wellenlängenbereichen an Probanden *in vivo* untersucht. In Abbildung 19 ist die kumulative Radikalbildung über die Zeit dargestellt. Die Untersuchung an den Probanden mit UV-Licht wurde 5 Minuten lang durchgeführt, um die minimale Erythem Dosis (30 mJ/cm^2) nicht zu übersteigen.

Werden die verschiedenen Spektralregionen verglichen, ist deutlich zu erkennen, dass UV-Strahlung die meisten Radikale gebildet hat. Bei Bestrahlung mit VIS- und NIR-Licht kam es zu einer niedrigeren Radikalbildung, wobei durch NIR-Licht am wenigsten Radikale gebildet wurden. Nach 2 Minuten wurde bei allen Spektralbereichen ein Sättigungseffekt gesehen. Die kumulative Radikalproduktion von UV-Licht bei 4 Minuten Bestrahlungszeit ist 2,3-mal höher als bei VIS-Licht und 5,8-mal höher als bei NIR-Licht (Abbildung 20)

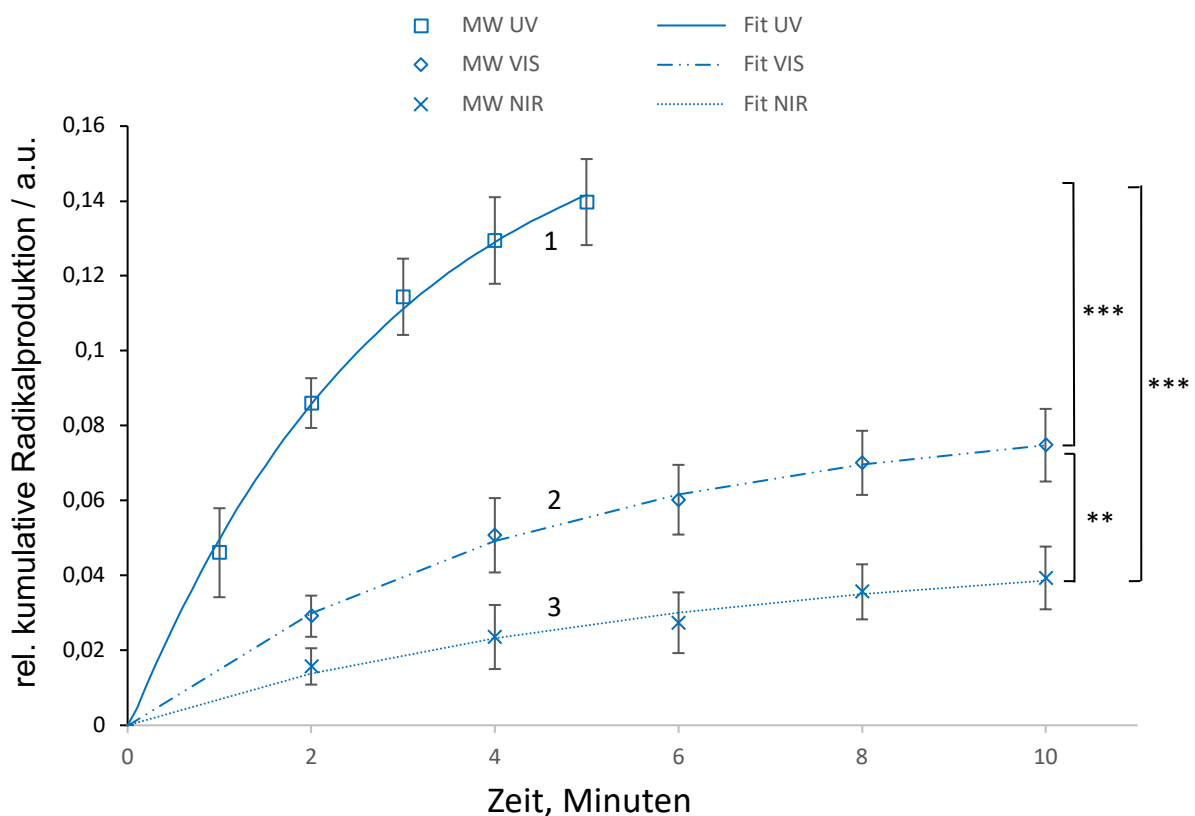


Abbildung 19: Liniendiagramm *in vivo* Vergleich

Vergleich der Änderung der Radikalproduktion der Probanden. Es wurde mit: (1) UV-Licht ($1,16 \text{ mW/cm}^2$), (2) VIS-Licht und (3) NIR-Licht (60 mW/cm^2) bestrahlt. Die VIS Werte wurden errechnet. MW \pm SEM, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

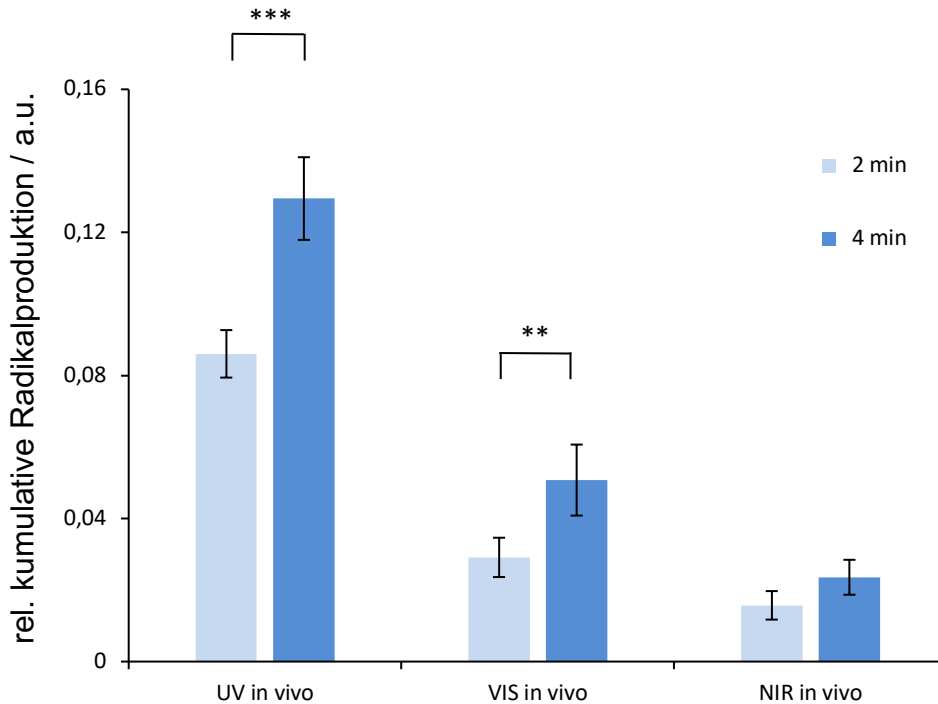


Abbildung 20: Säulendiagramm Vergleich *in vivo*

Vergleich der Radikalbildung der Probanden bei 2 Minuten (hellblau) und bei 4 Minuten (dunkelblau), welche mit UV und NIR bestrahlt wurden. Die VIS-Werte sind aus den VIS/NIR- und NIR-Daten errechnet wurden. Bei UV bei 4 Minuten um Faktor 2,55 mehr Radikalproduktion VIS und Faktor 5,49 mehr Radikalproduktion als NIR. MW \pm SEM, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

9.5 Lipidextraktion

Die Analyse der Lipidzusammensetzung *in vivo* zeigte nach der Bestrahlung mit UV-Licht eine Veränderung der Konzentrationen der *Stratum corneum*-Lipide (Abbildung 21). So kam es zu einer Abnahme von Ölsäure, Glycerol-Triolat, der Ceramid Untergruppen [AP, AP1 und AP2] und zu einem Anstieg von Cholesterol-3-Sulfat sowie der Ceramid Untergruppen [NP und NP2].

Mit VIS/NIR-Licht bestrahlte Haut zeigte hingegen ein Anstieg der Ceramid Untergruppen [NP und AP1+AP2], Ölsäure, Squalen sowie Cholesterol Oleat und einen signifikanten Abfall von Cholesterol-3-Sulfat. Alle anderen *Stratum corneum*-Lipide zeigten nach Bestrahlung mit den Spektralbereichen VIS/NIR oder UV keine Veränderung.

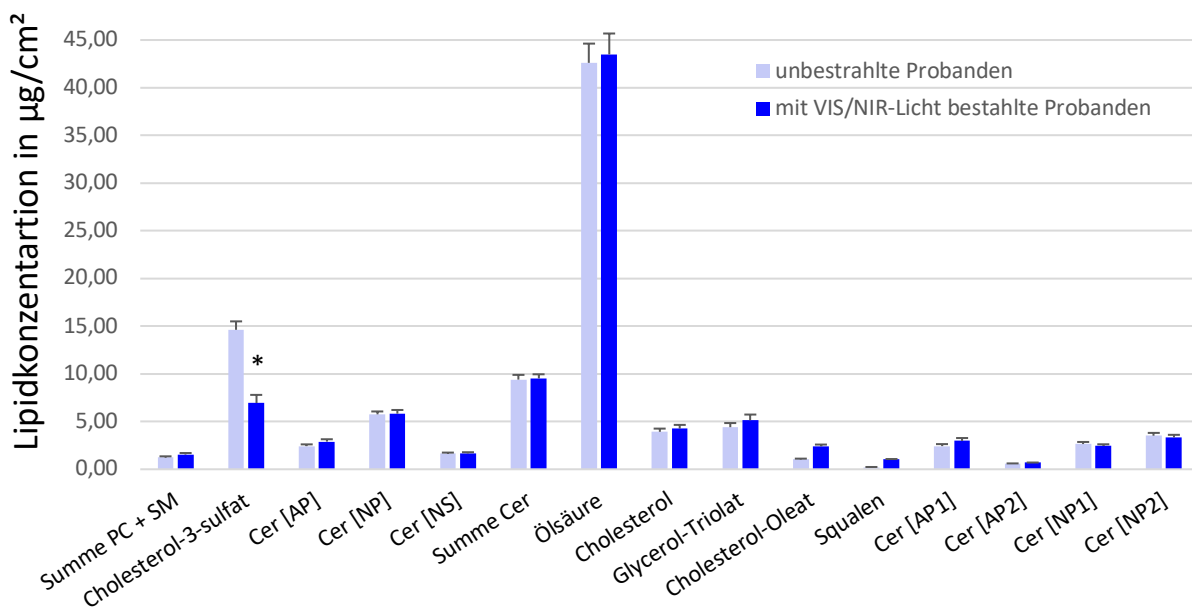
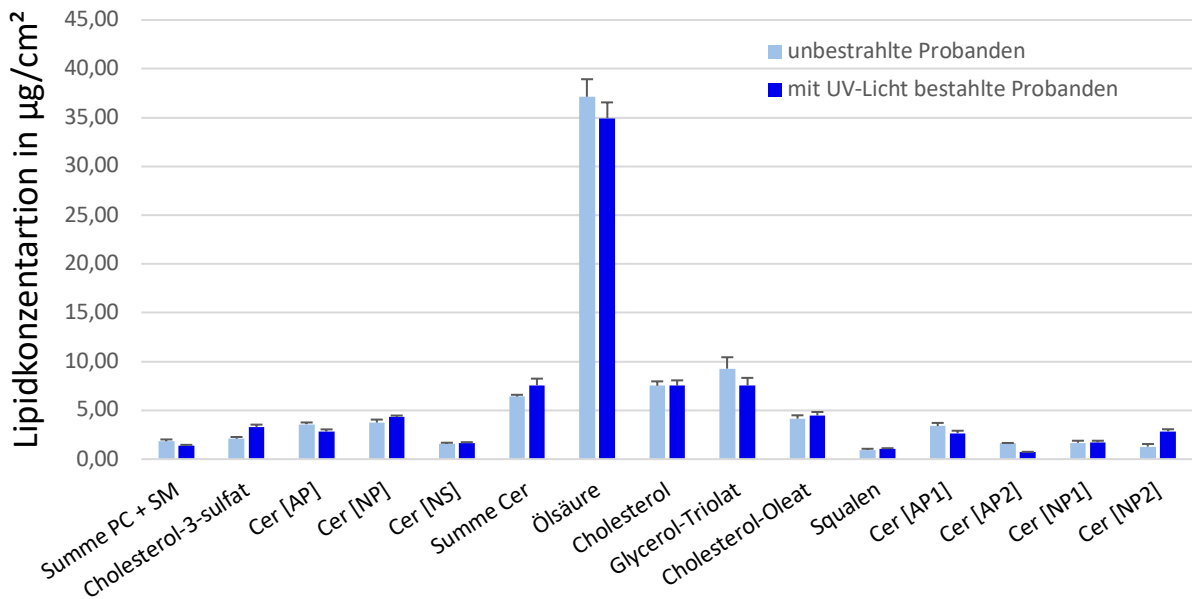


Abbildung 21: Säulendiagramm der Lipidextraktion

vor und nach Bestrahlung mit UV-Licht mit $1,16\text{mW/cm}^2$ ($n=8$) (oben) und VIS/NIR-Licht mit 120mW/cm^2 ($n=6$) (unten), PC + SM (L- α -Phosphatidylcholin und Sphingomyelin), Cer (Ceramide) $\text{MW} \pm \text{SEM}$

9.6 Ernährungs- & Lebensgewohnheiten

Die Auswertung der Fragebögen der Probanden hat keine Korrelationen in Hinblick auf die Radikalbildung ergeben.

Probanden, welche sich im weitesten Sinne gesund ernährten, bildeten nicht nachweisbar weniger Radikale als Probanden die vergleichsweise weniger Obst und Gemüse als Bestandteil in ihrer Ernährung hatten. Auch wurden keine Unterschiede in der Radikalbildung bei Rauchern und Nichtrauchern gefunden.

10 Diskussion

Durch vermehrte Aufenthalte in der Sonne in der Freizeit und durch das Schönheitsideal einer gebräunten Haut, steigt die Strahlenbelastung und damit die Bildung von freien Radikalen in der Haut in der Bevölkerung an [123]. Auch die wachsende Umweltverschmutzung, verbunden mit der Verringerung der Ozonschicht, trägt zu diesem Trend bei. Durch Sonnenschutzmittel kann der UV-Bereich effektiv abgedeckt werden, jedoch bleibt der VIS/NIR-Bereich ungeschützt. Maßnahmen zum Schutz dieser steigenden Belastung zur Prävention von bösartigen Hauterkrankungen sind wichtig und werden oft unterschätzt.

Daher wurde in dieser Dissertation die Reaktionen von Haut auf die Bestrahlung von Wellenlängen im Bereich UV, VIS/NIR und NIR untersucht. Es wurde mittels der ESR-Spektroskopie eine quantitativ nachweisende Methode angewandt, um das schädigende Potential der verschiedenen Lichtspektren zu analysieren. Dabei wurden die entstandenen Radikale nach Bestrahlung direkt am Probanden *in vivo* sowie an exzidierte Haut *ex vivo* gemessen. Außerdem erfolgten Untersuchungen an Haut von Schweineohren als Tiermodell, um vergleichende Messungen durchzuführen. Ebenfalls wurde das Lipidprofil der Probanden vor und nach Bestrahlung gemessen, um eventuelle Veränderungen der einzelnen Fettbestandteile zu analysieren.

10.1 Radikalbildung bei verschiedenen Wellenlängen

UV-Licht hat nur einen Anteil von 6,8 % (0,5 % UV-B, 6,3 % UV-A), das sichtbare Licht (VIS) dagegen weist einen Anteil von 38,9 % des gesamten Sonnenspektrums auf. Das Infrarot-Spektrum (IR) hat einen Anteil von 54,3 % und das NIR-Spektrum (als Teil vom IR-Spektrum) hat einen Anteil von 30 % des Sonnenspektrums [124]. In dieser Studie wurde die Menge der gebildeten Radikale bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen. Weiterhin konnten auch Aussagen über die unterschiedliche Kinetik der verschiedenen Spektralbereiche getroffen werden. In dieser Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob lichtinduzierte Radikalbildung in Haut ausgeprägter *in vivo* oder in exzidiierter Haut ist.

Es existieren nur sehr wenige *in vivo* ESR-Messungen mit Probandenkollektiven und Statistiken nur von der Forschungsgruppe des Zentrums für experimentelle & angewandte Hautphysiologie der Charité. Diese Pilotstudie präsentiert erstmalig vergleichende Ergebnisse in allen drei Wellenlängenbereichen. Außerdem kann die Radikalbildung aus früheren *ex vivo* Studien nun *in vivo* bei UV-, VIS- und NIR-Licht bestätigt werden [116].

10.1.1 UV

Während der ESR-Untersuchung stieg für alle Hautmodelle (*in vivo* und *ex vivo*) die Radikalproduktion bei allen 3 Wellenlängenbereichen an. Der größte Anteil an Radikalen wurde im Bereich des UV-Lichtes gemessen. Bei keiner anderen Wellenlänge sind so schnell so viele Radikale entstanden. Die hohe Radikalbildung konnte *in vivo*, *ex vivo* und für Schweinehaut festgestellt werden. Dies war zu erwarten, da Radikalbildung im UV-Bereich oft untersucht wurde, um beispielsweise Sonnencremes mit UV-Filtern zu entwickeln [125]. Jedoch ist die Menge der entstandenen Radikale nicht überall gleich groß. Wie bereits für UV- und NIR-Licht gezeigt, weichen die absoluten Werte und die Kinetik verglichen zu den *ex vivo* Untersuchungen ab [116, 126]. So wurden *in vivo* bei 4 Minuten, mit einem Faktor von 3,5 deutlich mehr Radikale als *ex vivo* nachgewiesen (Abbildung 14). Die Unterschiede waren signifikant und haben sich deutlich dargestellt.

In vivo wurde eine größere Menge an Radikalen in einer kürzeren Zeit gebildet. Der Grund hierfür ist die kontinuierliche Zufuhr von Sauerstoff im durchbluteten Gewebe,

welcher für die Bildung von ROS nötig ist. In exzidierte Haut ist der im Gewebe vorhandene Sauerstoff nach nur kurzer Zeit aufgebraucht [126]. Deswegen verhält sich die Kinetik in *ex vivo* Untersuchungen eher linear und es kommt zu deutlich weniger Radikalbildung. Dies wurde in neueren Untersuchungen von Albrecht et al. bestätigt [127]. Diese hatten Schweineohren *ex vivo* mit UV/NIR- und VIS/NIR-Licht bestrahlt und vergleichbare Ergebnisse zu dieser Studie erhalten. Außerdem kommt es zur schnellen Reduktion von Enzymen und Zellaktivität, was eine wichtige Voraussetzung für Radikalbildung ist, besonders im sichtbaren- und Infrarotspektrum [66, 128]. Dies wurde auch durch Arndt et al. gezeigt [116]. Sie fanden in ihren Untersuchungen nach IR-Bestrahlung signifikant mehr Radikale in der Haut von Probanden *in vivo* als in der Haut von Schweineohren *ex vivo*.

In einer früheren Studie von Zastrow et al. wurde ebenfalls human exzidierte Haut mit UV-Licht bestrahlt [129]. Auch dort wurde eine eher lineare Beziehung zwischen Bestrahlungsintensität und gebildeten Radikalen gesehen, welche noch ausgeprägter war als in dieser Studie. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass in exzidiertem Gewebe das antioxidative System nicht mehr aktiv genug ist, um eine Gegenregulation bei entsprechendem Stress, wie z.B. Bestrahlung, vorzunehmen. Ein Grund für die starke Radikalbildung durch UV-Licht ist die hohe Energie dieser Strahlung. Die aufgenommene Energie kann jedoch nicht wieder abgeben oder komplett in Wärme umgewandelt werden. Dies führt dazu, dass sich Bindungen lösen und Moleküle zerfallen.

In dieser Pilotstudie wurde gezeigt, dass eine direkte Beziehung zwischen *in vivo* und *ex vivo* Untersuchungen schwer herzustellen ist. Des Weiteren wurden Unterschiede bei Haut von Schweineohren und human exzidierte Haut festgestellt.

Um das Verhalten von Haut, welche mit verschiedenen Wellenlängen bestrahlt wird, zu untersuchen, wird ein Hautersatz benötigt, welcher in ausreichender Menge zur Verfügung steht. Schweinehaut ist ein akzeptiertes Modell für menschliche Haut [130]. In dieser Pilotstudie wurde bei dem Tiermodell mit Haut von exzidierten Schweineohren mehr Radikale nach UV-Bestrahlung gemessen als bei human exzidierte Haut (Abbildung 15).

Diese Ergebnisse stimmen mit einer früheren Untersuchung von Haag et al. überein. Er hatte bei Haut von Schweineohren ebenfalls mehr Radikale nach Bestrahlung mit UV-B-Licht gemessen, verglichen mit menschlicher Haut [118]. Es wurde gezeigt, dass das

antioxidative Netzwerk von Schweinehaut nicht direkt vergleichbar mit menschlicher Haut ist. Die verschieden starke Reaktion auf UV-Licht kann durch einen unterschiedlichen Gehalt von Antioxidantien der Haut, wie z.B. Karotinoiden oder eben einen verminderten Melaningehalt erklärt werden. So enthält Schweinehaut beispielsweise fast keine Karotinoide, welche antioxidativ wirken. Der Katalase-Gehalt, ebenfalls antioxidativ wirksam, entspricht jedoch dem von menschlicher Haut [118]. Deshalb ist Schweinehaut ein gutes Modell und unerlässlich in der Forschung, da menschliche Haut nicht unbegrenzt zur Verfügung steht.

Eine Methode, um *in vivo* indirekt auf entstandene Radikale zu schließen, ist die Resonanz-Raman-Spektroskopie. Humanhaut enthält verschiedene Antioxidantien, wie z.B. Karotinoide, Vitamine, Enzyme und andere [103, 131]. UV-Photonen besitzen viel Energie, deshalb ist es nicht verwunderlich, wenn Radikale entstehen nachdem Haut mit UV-Licht bestrahlt wurde. Die entstandenen Radikale können wiederum die Antioxidantien der Haut zerstören. Der Anstieg der Radikalproduktion, hervorgerufen durch Bestrahlung mit UV-Licht, korreliert mit einer Abnahme von Karotinoiden, was durch Messungen mit der Resonanz-Raman-Spektroskopie in früheren Studien bestimmt wurde [118, 132]. Darüber hinaus korreliert das durch UV-Licht induzierte Erythem mit dem Abbau von Karotinoiden in der Haut. Lademann et al. haben Humanhaut *in vivo* mit UV- und NIR-Licht bestrahlt. Mittels der Resonanz-Raman-Spektroskopie konnte sie ein Absinken der Karotinoid-Konzentration der Haut nachweisen [133]. Karotinoide sind potente Antioxidantien. Bildet die Haut durch Bestrahlung Radikale, reagieren die Karotinoide mit diesen und werden abgebaut. Eine Reduktion der Karotinoid-Konzentration deutet somit indirekt auf die Anwesenheit von Radikalen hin. Später haben Darwin et al. mittels ESR-Spektroskopie nachgewiesen, dass der Abbau von Karotinoiden bei NIR-Strahlung durch Radikale bedingt ist [67, 134]. Auch Meinke et al. nutzten die resonante Raman-Spektroskopie und fand heraus, dass bei der gleichen Dosis von UV-B-Licht, welche auf menschliche Haut *ex vivo* gestrahlt wurde, weniger Karotinoide zerstört wurden als *in vivo* [107]. Diese Methodik bestätigt die Ergebnisse der ESR-Spektroskopie bei der Bestrahlung mit UV- und sogar NIR-Licht.

10.1.2 VIS/NIR

Die Bestrahlung mit VIS- und NIR-Licht kombiniert (VIS/NIR), zeigte einen schwächeren Anstieg an Radikalproduktion über die Zeit verglichen zu UV-Licht, wohingegen die Bestrahlung mit NIR-Licht allein zu der geringsten Bildung von freien Radikalen führte. Nach zwei Minuten wurde bei allen Wellenlängenbereichen ein Sättigungseffekt gesehen. Die kumulative Radikalproduktion von UV-Licht bei vier Minuten ist 2,3-mal höher verglichen zu VIS-Licht und 5,8-mal höher verglichen zu NIR-Licht (Abbildung 20).

Außerdem sind Unterschiede in der Kinetik zwischen *in vivo*, *ex vivo* und der Schweinehaut festzustellen. Während es bei den Probanden *in vivo* zu einer sehr starken Radikalbildung anfangs, jedoch zu einer Abnahme gegen Ende der Bestrahlung kam, wurde bei Human- und Schweinehaut *ex vivo* eine eher gleichmäßige, lineare Radikalbildung festgestellt.

Die Abnahme der Radikalproduktion mit der Zeit *in vivo* könnte mit einer Hochregulation des endogenen antioxidativen Netzwerkes, welches entstandene Radikale neutralisiert, erklärt werden [131]. Dieser Schutzmechanismus kann *ex vivo* nicht untersucht werden.

Bei der Bestrahlung mit VIS/NIR-Licht war eine ähnliche Verteilung der Radikalbildung wie bei UV-Licht zu sehen. Bei 4 Minuten fiel die gesamte Radikalproduktion *in vivo* erneut am ausgeprägtesten aus. Schweineohren bildeten 72 % der Radikale und human exzidierte Haut bildete 41 % der Radikale die *in vivo* gebildet wurden (Abbildung 17).

Die Menge der gebildeten Radikale zeigten große Unterschiede. So wurden, verglichen mit UV-Licht, bei den Probanden *in vivo* bei VIS/NIR-Licht mit einem Faktor von 0,6 eindeutig weniger Radikale gebildet. Im Verlauf der Messung sättigte sich die Radikalproduktion auch nicht so schnell, wie es bei der Bestrahlung mit UV-Licht der Fall war. Insgesamt sind die Unterschiede zwischen *in vivo* und *ex vivo* bei VIS/NIR-Licht nicht so ausgeprägt wie bei UV-Licht. Dies ist teils damit zu begründen, dass nach Bestrahlung mit UV-Licht, v.a. *in vivo*, vergleichsweise enorm viele Radikale gebildet werden. Hat sich das gesamte PCA mit den neu gebildeten Radikalen abereagiert, können weitere gebildete Radikale nicht mehr registriert werden, da das vorhandene PCA aufgebraucht ist. Mittels ESR ist es nur möglich Radikale indirekt durch Neutralisierung von PCA nachzuweisen.

Arndt et al. haben mit demselben Versuchsaufbau ebenfalls VIS/NIR-Untersuchungen an Probanden *in vivo* und *ex vivo* an Schweineohren durchgeführt [116]. Sie kam zu ähnlichen Ergebnissen. In ihren Messungen fiel das ESR-Signal *in vivo* nach 10-minütiger Bestrahlung auf 87 % ab. Auch diese Studie kam zu vergleichbaren Ergebnissen. So fiel das ESR-Signal *in vivo* nach 10 Minuten auf 90,6%.

In der Studie von Arndt et al. zur Untersuchung zur Radikalbildung durch NIR-Licht sind keine Untersuchungen an menschlicher Haut *ex vivo* durchgeführt wurden. In dieser Arbeit wurde dem nachgegangen. Es wurden bei allen Wellenlängen mehr Radikale bei der Haut von Schweineohren *ex vivo* gemessen, verglichen mit humaner Haut *ex vivo*. Bei allen *ex vivo* Untersuchungen verhielt sich die Radikalproduktion insgesamt weniger ausgeprägt, verglichen zur Bestrahlung *in vivo*. Dies ist wie oben beschrieben mit einem niedrigeren Sauerstoffgehalt im Gewebe zu begründen.

Brandt et al. fanden heraus, dass bei Bestrahlung mit reinem UV-Licht eine höhere minimale erythemale Dosis (MED) möglich war, als bei zusätzlicher Bestrahlung mit VIS/NIR-Licht [135]. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass Haut *in vivo*, welche mit UV-B- und NIR-Licht bestrahlt wurde, mehr Radikale bildet als nur mit reiner UV-Strahlung [136]. Daraus kann erschlossen werden, dass VIS/NIR-Licht eine zusätzliche schädliche Wirkung auf die Haut hat.

Es ist nicht überraschend, dass epidemiologische Daten und klinische Beobachtungen vermuten lassen, dass IR-A-Licht nicht ungefährlich für die menschliche Haut ist. So können durch Bestrahlung von Haut mit IR-A-Licht biologische Mechanismen induziert werden [51].

Da NIR-Photonen nicht genug Energie besitzen um direkt Radikale zu erzeugen, stellt sich die Frage auf welchem Weg dies geschieht. Deswegen liegt die Vermutung nahe, dass enzymatische Prozesse an der Erzeugung von Radikalen mitwirken.

Calles et al. fanden heraus, dass IR-A-Licht die Transkription von primären, dermalen Fibroblasten ändert [137]. In dieser Studie wurden ca. 600 Gene gefunden, welche IR-A sensitiv waren. Sie sind u.a. verantwortlich für Apoptose und Stressantwort. Im weiteren Sinne sind diese Gene also mit verantwortlich für Photoalterung und Photokarzinogenese. Z.B. wurde das Gen für Matrix-Metalloproteinase 1 (MMP-1) beeinflusst. Dies führt zu einer reduzierten Typ I Kollagen Expression, was Kollagenfasern zerstören kann und so zu Falten und letztendlich Hautalterung führt [138].

So wurden von Schroeder et al. humane Fibroblasten mit IR-A-Licht bestrahlt, was zur Entstehung von Superoxidanionen führte, welche aus der Atmungskette entstanden sind. Dadurch wird eine retrograde mitochondriale Signalantwort generiert, welche verantwortlich für IR-A-Strahlung induzierte MMP-1 Expression ist [139]. Schroeder et al. zeigten so, dass Mitochondrien bei Bestrahlung mit IR-Licht das biologische System darstellen, welches bei der Radikalbildung involviert ist [66].

NIR induzierte Bildung von ROS wurde also schon *in vitro* bei menschlichen Haut-Fibroblasten, *ex vivo* bei NIR bestrahlten Hautbiopsien und *in vivo* bei humaner Haut nachgewiesen [3, 66, 67, 139].

2008 wurde das erste Mal gezeigt, dass die topische Anwendung einer Mischung aus Antioxidantien, welche Vitamin C, Vitamin E, Ubiquinon und Traubensaftextrakt enthielt, die Expression von MMP-1 mRNA *in vivo* in menschlicher Haut nach Bestrahlung mit VIS/NIR-Licht verringert [140].

Dies ist nicht der einzige bekannte Mechanismus, durch den NIR-Licht Haut schädigt. NIR-Bestrahlung aktiviert die Angiogenese in der Haut, was letztendlich zur Faltenbildung beiträgt [141]. Des Weiteren führt NIR-Bestrahlung zu einer vermehrten Bildung von Mastzellen, was ebenfalls zur Hautalterung beiträgt [142]. Diese Mechanismen sind vor allem für Photokarzinogenese bedeutsam. Jantschitch et al. zeigten, dass NIR-Strahlung, welche vor UV-B-Strahlung appliziert wurde, das induzierte Absterben von Keratinozyten durch UV-B-Strahlung verringert und so zur Entstehung von Hautkrebs beiträgt [143].

Im sichtbaren und infraroten Bereich werden pro Wellenlänge deutlich weniger Radikale gebildet. Dies war zu erwarten, da die Energie des Lichtes schwächer ist und klassische Radikalbildung vermindert ist. Die Energie des Lichtes im NIR-Bereich ist nicht stark genug, um direkt Radikale zu bilden [144]. Jedoch werden in den Mitochondrien und durch die Aktivität verschiedener Enzyme ROS gebildet, welche zu Hautalterung führen können [145, 146].

Eine derzeit noch offene Frage betrifft die Erwärmung: welche Rolle spielt Wärme bei NIR induzierter ROS Bildung? Es wurde die These aufgestellt, dass menschliche Haut, welche Wärme ausgesetzt wird, unter dem Einfluss von Photoalterung (Photoaging) steht. Es wurde z.B. gezeigt, dass Humanhaut, welche unter schwarzer Kleidung Sonnenlicht ausgesetzt ist, vermehrt MMP-1 exprimiert [147].

So zeigten Shin et al., dass Enzyme und Mitochondrien an der Entstehung von Hitzeschockproteinen beteiligt sind, welche die Bildung von ROS induzieren [148]. Daraus folgt die Annahme, dass die erhöhte Temperatur in der Haut, hervorgerufen durch NIR-Licht, über enzymatische Prozesse zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führt.

Diese Vermutung wurden auch von Zastrow et al. bestätigt. Er zeigte, dass die freie Radikalbildung umso größer wird, je höher die in der Haut durch das NIR-Licht erreichte stationäre Temperatur bei gleicher Bestrahlungszeit ist [3]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Radikalgenerierung in Humanhaut *ex vivo* exakt dem Verlauf des Fiebers im menschlichen Körper folgt. Die Radikalbildung erhöht sich bei 37°C, hat einen steilen Anstieg bis etwa 41°C und geht bei etwa 43°C stationärer Hauttemperatur in eine Plateauregion über. Das erlaubt die Schlussfolgerung, dass enzymgesteuerte Photochrome oder Enzyme selbst für die Radikalerzeugung verantwortlich sind [149]. Die Annahme einer enzymatischen Bildung von ROS wird gestützt durch die Plateauregion bei 43°C. Enzyme und Proteine verlieren hier ihre strukturelle Wirksamkeit [150] und eine Erythembildung wird beobachtet.

Auch andere Autoren [148, 151] schrieben über Hitzeschockprotein induzierte Bildung von reaktiven Spezies, welche von beiden, Enzymen und Mitochondrien, aktiviert wurden. Es wurden Hinweise gefunden, welche zeigen, dass die Aktivierung des transienten potential vanilloid Typ 1 Rezeptor (TRPV-1) eine Rolle bei der thermalen Hautalterung spielt [152-155]. Ob und in welchem Umfang Hitze die Aktivierung von TRPV-1 Kanälen und ROS Bildung zur NIR-Licht induzierten Hautschädigung beiträgt, ist momentan noch nicht vollständig verstanden und wird noch diskutiert [143, 145, 156, 157].

In dieser Pilotstudie wurden die Auswirkungen von VIS-Licht in Kombination mit NIR-Licht betrachtet (VIS/NIR). Um die alleinige radikalbildende Wirkung von VIS-Licht zu untersuchen, wurden von den durchschnittlichen VIS/NIR-Werten die separat gemessenen NIR-Werte abgezogen. Es wurde errechnet, dass VIS-Licht für 66 % der gesamten Radikalbildung von VIS/NIR-Licht verantwortlich ist und NIR-Licht nur für 34 % (Abbildung 19). Damit bildet VIS-Licht eindeutig mehr Radikale als NIR-Licht.

Das Auftreten von beträchtlichen Mengen von freien Radikalen *in vivo* über den gesamten sichtbaren Bereich von 400–760nm ist ein erwartetes, aber bisher nicht exakt nachgewiesenes Ergebnis [5, 158].

Diese Ergebnisse wurden kürzlich durch *in vivo* Untersuchungen mittels Resonanz-Raman-Spektroskopie bestätigt, welche einen VIS- und IR-Licht induzierten Abbau von Hautkarotinoiden zeigten [67, 134, 159].

Zastrow et al. wiesen mithilfe von ESR nach, dass menschliche *ex vivo* Haut unter Bestrahlung nicht nur mit UV- und NIR-Licht, sondern auch alleinig mit VIS-Licht Radikale bildet. Interessanterweise wurde gezeigt, dass die Art der Radikale, die bei Bestrahlung entstanden sind, bei allen Wellenlängen dieselben sind [3, 65]. Zastrow et al. konnten mit sichtbarem Licht unter Verwendung unterschiedlicher Spintraps außerdem das Auftreten von •OH-, •OOH- und von •O₂-Radikalen nachweisen [160].

Mahmoud et al. zeigten, dass elektromagnetische Strahlung im sichtbaren Bereich zwischen 80–480 mW/cm² bei menschlicher Haut *in vivo* Pigmentation in Abwesenheit von UV-Licht hervorrufen kann [161]. Dies deutet auf einen Kompensationsversuch der Haut hin, entstandene Radikale zu neutralisieren.

Im Unterschied zu NIR-Licht ist derzeit relativ wenig über die Mechanismen bei VIS induzierter Hautpigmentierung oder MMP-1-Expression bekannt. Liebel et al. haben gezeigt, dass eine Exposition von sichtbarem Licht zu Photoalterung beiträgt, indem Kollagenbrüche vermehrt auftreten [6]. Dabei wurden humane Epidermismodelle sichtbarem Licht ausgesetzt, worauf hin ein Anstieg der Expression von mRNA von MMP-1 und Tumor Nekrose Faktor Alpha in epidermalen Keratinozyten nachgewiesen wurde. Diese Gen-regulierende Aktivität von sichtbarem Licht wurde in Verbindung mit erhöhter Bildung von ROS in den epidermalen Modellen gebracht. Oberflächliche Behandlung dieser Modelle mit einem Sonnencreme-Produkt, welches ein Pflanzenextrakt mit antioxidativen Eigenschaften enthält, inhibierte VIS induzierte MMP-1 Expression. Diese Entdeckung konnte *in vivo* in menschlicher Haut bestätigt werden. Dabei wurde die Bildung von ROS nach VIS-Bestrahlung mittels Chemilumineszenz nachgewiesen [6].

10.2 Schutz der Haut vor Sonnenstrahlung

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass Haut, welche Sonnenlicht ausgesetzt ist, nicht nur einen UV-Schutz, sondern einen Schutz im gesamten Spektrum der Sonne benötigt. Gerade wenn ein sehr guter UV-Schutz dazu führt, dass die Warnfunktion des Erythems ausfällt, verlängert sich der Aufenthalt in der Sonne um ein Vielfaches. Damit steigt die Radikallast im sichtbaren und infraroten Bereich eventuell über eine kritische Radikalkonzentration, welche zu Schäden in der Haut führen kann. Zastrow et al. haben eine kritische Radikalkonzentration postuliert, ab der sich die Art der Radikale verändert [162]. Die Balance aus Sauerstoff- und Lipidradikalen ändert sich ab einer bestimmten Radikallast zugunsten der Lipidradikale. Die Sauerstoffradikale (ROS) können vom antioxidativem System gut kontrolliert werden. Ist die Kapazität erschöpft, reagieren sie zu Lipidradikalen, welche mit Schäden in den Membranen und Zellwänden assoziiert sind. Zastrow et al. konnten zeigen, dass die Art der gebildeten Radikale nicht von der Wellenlänge abhängt, sondern ausschließlich von der applizierten Dosis. 2009 haben Zastrow et al. bereits herausgefunden dass 50 % der Radikale, welche durch Sonnenstrahlung gebildet werden, aus dem sichtbaren- und Infrarotbereich stammen [3]. Diese Entdeckung stellt neue Ansprüche an Sonnencremes, welche nun fähig sein müssen, das komplette Sonnenspektrum abzudecken, um einen maximalen Schutz zu bieten. Wird dies nicht gewährleistet, wird die Bevölkerung dazu verleitet, sich durch den erhofften Sonnenschutz durch Sonnencremes länger in der Sonne aufzuhalten. Die Folgen sind das häufigere Auftreten von Sonnenbrand, was langfristig zur Hautalterung und letztendlich zur Entstehung von Krebs führen kann.

Der Zusatz von Antioxidantien in Sonnencremes führt zur direkten Neutralisation von Radikalen in der Haut. Dies hat sich vor allem bei NIR-Licht als wirksam bewiesen. Nanopartikel wie Titaniumdioxid oder Zinkoxid reflektieren, streuen oder absorbieren Sonnenlicht und führen so zu einem erweiterten Schutz [163].

In einer aktuellen Studie von Albrecht et al. wurden die Hauttypen IV und V mit UV-, VIS- und NIR-Licht bestrahlt, um die Ergebnisse mit den Messungen an Hauttyp II zu vergleichen [164]. Die Messungen erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie in der hier vorgestellten Arbeit. Es stellte sich heraus, dass verglichen mit Hauttyp II, bei Hauttyp IV und V signifikant mehr Radikale während der Bestrahlung mit NIR-Licht gebildet wurden. Nach Bestrahlung mit UV-Licht entstanden hingegen signifikant weniger

Radikale im Vergleich zu Hauttyp II. Es wurde außerdem festgestellt, dass Hauttyp IV und V nach der Bestrahlung mit UV/NIR-Licht noch immer 60 % der Radikale von Hauttyp II bilden. Dies bedeutet, dass dunklere Hauttypen ebenfalls ausreichenden Schutz vor Sonnenlicht benötigen.

In einer Studie von Meinke et al. wurden Hautcremes mit verschiedenen Filtern mit einem ESR-L-Band mit UV/VIS- und NIR-Licht an Schweineohren untersucht [165]. Bei den Cremes, bei denen Antioxidantien zugesetzt waren, wurde ein eindeutiger Schutzeffekt im NIR-Spektrum nachgewiesen, jedoch nicht im UV/VIS-Spektrum. Hier war die Dosis im UV-Bereich so hoch (mehrere minimale Erythemdosen), dass ein Schutzeffekt nicht nachgewiesen werden konnte.

Souza et al. führten ebenfalls eine aktuelle Studie zu Sonnencremes im gesamten Sonnenspektrum durch [166]. Sie untersuchte mit dem wesentlich empfindlicheren ESR-X-Band-Spektrometer die radikalfangende Aktivität von Sonnencremes im UV-, VIS- und NIR-Bereich an Schweineohren. Auch sie kam zu dem Ergebnis, dass der Zusatz von Antioxidantien den Schutz vor Schäden durch die Bildung von Radikalen im NIR-, jedoch auch im VIS-Bereich erhöht. Im UV-Bereich wurde ebenfalls ein Schutz durch die Antioxidantien gezeigt. In dieser Arbeit wurde Sonnenlicht mit einer Dosis unter einer minimalen Erythemdosis eingesetzt.

Eine Sonnencreme mit schützendem Effekt im gesamten Sonnenspektrum sollte UV-B- und UV-A-Filter für den UV-Bereich, physikalische Filter (Titandioxid, Zinkoxid) für den gesamten Bereich sowie Antioxidantien für den NIR-Bereich enthalten.

10.3 Analyse der Hautlipide nach Lipidextraktion

Die Analyse der Hautlipide nach Bestrahlung mit UV-Licht und VIS/NIR-Licht hat eine Veränderung der *Stratum corneum* Lipide ergeben. Die Lipidkonzentration hat sich bei einigen Lipidbestandteilen verringert. So kam es nach der Bestrahlung mit UV-Licht zu der Abnahme der Konzentration von Ölsäure, Glycerol-Triolat und der Ceramid Untergruppen [AP, AP1, AP2]. Nach der Bestrahlung mit VIS/NIR-Licht kam es hingegen zu einem signifikanten Abfall von Cholesterol-3-Sulfat. Diese Abfälle könnten durch die Bildung von Radikalen in der Haut nach der Bestrahlung mit UV- oder VIS/NIR-Licht erklärt werden. Jedoch kam es auch zum Anstieg von einigen Lipidbestandteilen. Der

Grund hierfür könnte ein ungleichmäßiges Herauslösen der Fette durch das Cyclohexangemisch sein.

In einer Studie von Meinke et al. wurde Probanden über 8 Wochen ein karotinoidreiches Supplement verabreicht [1]. Karotinoide der Haut sind effektive Antioxidantien. Vor Beginn der Supplementation und acht Wochen nach Verabreichung wurden die Lipidkonzentrationen der Epidermis mittels HPTLC ausgewertet. Es zeigte sich im Trend ein Anstieg der Lipidkonzentration, was auf einen verminderten Abbau der Lipide aufgrund des Schutzes der Haut gegen ROS durch die erhöhte Karotinoidkonzentration deutet.

10.4 Fehlerdiskussion

Die Konzentration des Spinmarkers PCA ist ein entscheidender Faktor, welcher die Messergebnisse maßgeblich beeinflusst. In einer aktuellen Studie von Albrecht et al. wurden verschiedene PCA-Konzentrationen bei der Bestrahlung von Schweinehaut mit VIS/NIR-Licht getestet [127]. Bei einer Konzentration von 0,6 mM kam es nach 5,15 Minuten zu einem Signalabfall von 11 %, während es bei einer Konzentration von 1,5 mM nur zu einem Abfall von 6 % kam. Die richtige Konzentration von PCA zu finden, stellt sich also nicht als trivial dar. So muss eine Mindestkonzentration gewählt werden um eine Verarmung zu vermeiden. Da der relative Abfall von hohen Konzentrationen im Vergleich mit zu niedrigen Konzentrationen niedriger ausfällt, muss aber auch gleichzeitig so wenig wie nötig Markersubstanz eingesetzt werden, um nicht an Empfindlichkeit zu verlieren. Wenn also eine definierte Menge von Markersubstanz auf den Probanden aufgetragen wird, ist der Verlust durch Verdunsten oder inkomplettes Pipettieren als Fehlerquelle zu werten.

Wasser reduziert das ESR-Signal stark. Im Falle eines Probanden mit einem schlanken Arm wird das Signal also weniger abgeschwächt. Hat der Proband jedoch einen umfangreicheren Arm, wird das Signal vermehrt gemindert. Hier ist die Auswahl der Probanden entscheidend und möglichst homogen zu treffen. Außerdem sind die Hauteigenschaften jedes Probanden einzigartig. Nicht alle Probanden nehmen gleich viel PCA auf. So sollten Probanden immer die Anweisung bekommen, vor der Messung keine fettreichen Pflegeprodukte auf ihre Haut aufzutragen.

Der Konsum von Nikotin kann zu einer erhöhten Bildung von freien Radikalen in der Haut führen [167]. Um die Messungen vergleichbar zu machen, wurde in dieser Studie auf ein ausgeglichenes Verhältnis von Rauchern zu Nichtrauchern geachtet.

Das ESR-Spektrometer ist ein hochempfindliches Messinstrument. Schwankungen in der Temperatur, Erschütterungen oder Muskelzuckungen beeinflussten die Messung. Es ist also von Vorteil Messungen nicht auf verschiedene Jahreszeiten zu verteilen, wobei individuelle Schwankungen der Tagestemperatur nicht auszuschließen sind. Nach jeder Messung wurden die Spektren nach Artefakten untersucht. Traten fehlerhafte Messungen auf, wurden diese identifiziert und einzelne Spektren nicht berücksichtigt.

Der Arm der Probanden wurde in eine Vorrichtung eingespannt. Da die Größe der Arme der Probanden individuell unterschiedlich waren, konnte der Arm nicht exakt mit gleichem Druck eingespannt werden. Einige Probanden berichteten teils über Taubheitsgefühle. Dies könnte bedeuten, dass die Blutversorgung eingeschränkt war und so eventuell weniger Sauerstoff für die Bildung von Radikalen bereitstand.

Die Peak to Peak - Auswertung der ESR-Signale wurden mit dem Auge am Bildschirm skaliert. Geringe Abweichungen in der Auswertung sind nicht komplett auszuschließen.

Bei der Lipidextraktion wurden die Zentrifugenröhrchen nur durch Druck am Unterarm samt Flüssigkeit gepresst. Da der Arm zur Lipidextraktion geschüttelt werden musste, sind kleinere Mengen aus dem Extraktionsgebiet entwichen. Das verminderte Volumen entspricht einer kleineren Menge an messbaren Lipiden.

11 Schlussfolgerung und Ausblick

Diese Pilotstudie zeigt, dass Licht im sichtbaren und infrarot Bereich nicht nur *ex vivo*, sondern auch *in vivo* Radikalbildung verursacht. Weiterhin ergaben die Messungen, dass *in vivo* deutlich mehr Radikale gebildet werden. Dies bedeutet, dass nicht nur im UV-Bereich, sondern im gesamten Spektrum des Sonnenlichtes Radikale durch Bestrahlung in der Haut entstehen. Wird Sonnencreme jedoch mit Antioxidantien versetzt, kann die schädliche Wirkung der Sonnenstrahlung in der Haut abgeschwächt werden. Es kommt zur verminderten Bildung von Radikalen, was die Kollagen- und Elastinfasern schützt und letztendlich hautalternde Prozesse verlangsamt.

Da Menschen mit dunklem Hauttyp nach Bestrahlung mit NIR-Licht deutlich mehr Radikale bilden als Menschen mit hellem Hauttyp, ist ein spezieller Lichtschutz mit Antioxidantien sinnvoll. In Zukunft wird in Sonnenschutz gefragt sein, welcher das gesamte Sonnenspektrum abdeckt.

Welche Auswirkungen der Einsatz von Antioxidantien in Sonnencremes auf die Inzidenz von Hautkrebs hat, muss jedoch noch geklärt werden. Trotz der weit verbreiteten Anwendung von Pflegeprodukten mit UV-Filtern, ist die Zahl der Hautkrebserkrankungen in den letzten Jahrzehnten steigend. Dies liegt wohl daran, dass sich nach Anwendung von Sonnencremes das Eintreten von Sonnenbrand verzögert und so die Aufenthaltsdauer in der Sonne verlängert wird. Außerdem ist ein langes Sonnenbad bei vielen Menschen sehr beliebt und die resultierende Bräunung zählt vor allem in westlichen Ländern als Schönheitsideal.

Der beste Schutz vor Hautschäden bleibt das Vermeiden von zu langen Aufenthalten in der Sonne und das Tragen von langer Bekleidung sowie Sonnenhüten. Dies muss durch Sensibilisierung der Bevölkerung, durch Aufklärung und letztendlich Verhaltensänderungen umgesetzt werden.

12 Literaturverzeichnis

1. Meinke MC, Friedrich A, Tscherch K, Haag SF, Darvin ME, Vollert H, Groth N, Lademann J, Rohn S. Influence of dietary carotenoids on radical scavenging capacity of the skin and skin lipids. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2013;84(2):365-73.
2. Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol*. 2004;43(5):326-35.
3. Zastrow L, Groth N, Klein F, Kockott D, Lademann J, Renneberg R, Ferrero L. The missing link--light-induced (280-1,600 nm) free radical formation in human skin. *Skin pharmacology and physiology*. 2009;22(1):31-44.
4. Daghasanli NA, Itri R, Baptista MS. Singlet oxygen reacts with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and contributes to the formation of 2',7'-dichlorofluorescein. *Photochemistry and photobiology*. 2008;84(5):1238-43.
5. Haywood R. Relevance of sunscreen application method, visible light and sunlight intensity to free-radical protection: A study of ex vivo human skin. *Photochemistry and photobiology*. 2006;82(4):1123-31.
6. Liebel F, Kaur S, Ruvolo E, Kollias N, Southall MD. Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes. *J Invest Dermatol*. 2012;132(7):1901-7.
7. Meinke MC, Haag SF, Schanzer S, Groth N, Gersonde I, Lademann J. Radical protection by sunscreens in the infrared spectral range. *Photochemistry and photobiology*. 2011;87(2):452-6.
8. Herrling T, Fuchs J, Rehberg J, Groth N. UV-induced free radicals in the skin detected by ESR spectroscopy and imaging using nitroxides. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(1):59-67.
9. He G, Samouilov A, Kuppusamy P, Zweier JL. In vivo EPR imaging of the distribution and metabolism of nitroxide radicals in human skin. *J Magn Reson*. 2001;148(1):155-64.
10. Herrling T, Jung K, Fuchs J. Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2006;63(4):840-5.
11. Zastrow THLB, L.J.; Ferrero, L.; Groth, N. . In-vivo measurements of free radicals in human skin. *IFSCC Mag* 2003;6:295-301.
12. I. M. *Dermatologie*. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag; 2005.
13. Wertz PW, van den Bergh B. The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chem Phys Lipids*. 1998;91(2):85-96.
14. Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol*. 1983;80(1 Suppl):44s-9s.
15. Fritsch P. *Dermatologie und Venerologie*. 2 ed. Berlin: Springer; 2004.
16. Kaidbey KH, Agin PP, Sayre RM, Kligman AM. Photoprotection by melanin--a comparison of black and Caucasian skin. *J Am Acad Dermatol*. 1979;1(3):249-60.
17. Xiang F, Lucas R, de Gruijl F, Norval M. A systematic review of the influence of skin pigmentation on changes in the concentrations of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in plasma/serum following experimental UV irradiation. *Photochem Photobiol Sci*. 2015;14(12):2138-46.
18. Sheu HM, Chao SC, Wong TW, Yu-Yun Lee J, Tsai JC. Human skin surface lipid film: an ultrastructural study and interaction with corneocytes and intercellular lipid lamellae of the stratum corneum. *Br J Dermatol*. 1999;140(3):385-91.
19. Greene RS, Downing DT, Pochi PE, Strauss JS. Anatomical variation in the amount and composition of human skin surface lipid. *J Invest Dermatol*. 1970;54(3):240-7.
20. Clarys P, Barel A. Quantitative evaluation of skin surface lipids. *Clin Dermatol*. 1995;13(4):307-21.
21. Melnik BC, Hollmann J, Erler E, Verhoeven B, Plewig G. Microanalytical screening of all major stratum corneum lipids by sequential high-performance thin-layer chromatography. *J Invest Dermatol*. 1989;92(2):231-4.
22. Gray GM, White RJ. Glycosphingolipids and ceramides in human and pig epidermis. *J Invest Dermatol*. 1978;70(6):336-41.

23. Gray GM, Yardley HJ. Different populations of pig epidermal cells: isolation and lipid composition. *J Lipid Res.* 1975;16(6):441-7.
24. Yardley HJ, Summerly R. Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis. *Pharmacol Ther.* 1981;13(2):357-83.
25. Coderch L, Lopez O, de la Maza A, Parra JL. Ceramides and skin function. *Am J Clin Dermatol.* 2003;4(2):107-29.
26. Holleran WM, Man MQ, Gao WN, Menon GK, Elias PM, Feingold KR. Sphingolipids are required for mammalian epidermal barrier function. Inhibition of sphingolipid synthesis delays barrier recovery after acute perturbation. *J Clin Invest.* 1991;88(4):1338-45.
27. Maia CFS. Verbesserung der topischen Glucocorticoidtherapie: Prüfung von neuen Wirkstoffen und SLN-Präparationen: Weißensee-Verlag; 2002.
28. Smith KR, Thiboutot DM. Thematic review series: skin lipids. Sebaceous gland lipids: friend or foe? *J Lipid Res.* 2008;49(2):271-81.
29. Trautwein AXK, U.; Hüttermann, J. Physik für Mediziner, Biologen, Pharmazeuten 2014.
30. Frederick JE SH, Haywood EK. Solar ultraviolet radiation at the earth's surface. *Photochem Photobiol Sci.* 1989;50:443-50.
31. Kochevar IE, Pathak MA, Parrish JA, *Dermatology in General Medicine.* Fitzpatrick, editor 1999.
32. Fartasch MBT. UV Strahlung und Hautkrebs - Wechselspiel UV und Haut. *IPA-Journal* 2011;3:12-5.
33. BL D. How much Sun protection do we need? *SöFW Journal.* 2002;128:2-8.
34. Peres PS, Terra VA, Guarnier FA, Cecchini R, Cecchini AL. Photoaging and chronological aging profile: Understanding oxidation of the skin. *J Photochem Photobiol B.* 2011;103(2):93-7.
35. Birch-Machin MAS, H. How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue. *Mutagenesis.* 2005;25:101-7.
36. Barresi C, Stremnitzer C, Mlitz V, Kezic S, Kammeyer A, Ghannadan M, Posa-Markaryan K, Selden C, Tschachler E, Eckhart L, Increased sensitivity of histidinemic mice to UVB radiation suggests a crucial role of endogenous urocanic acid in photoprotection. *J Invest Dermatol.* 2011;131(1):188-94.
37. Armstrong BK, Krickler A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B.* 2001;63(1-3):8-18.
38. Brenneisen P, Wenk J, Klotz LO, Wlaschek M, Briviba K, Krieg T, Sies H, Scharffetter-Kochanek K, Central role of Ferrous/Ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem.* 1998;273(9):5279-87.
39. Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res.* 2003;531(1-2):81-92.
40. Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J. Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2000;16(6):239-44.
41. Krutmann J. Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. *J Dermatol Sci.* 2000;23 Suppl 1:S22-6.
42. Beissert S, Schwarz T. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 1999;4(1):61-4.
43. Damian DL BR, Halliday GM. Measurement of in vivo sunscreen immune protection factors in humans. *Photochemistry and photobiology.* 1999;70(6):919-5.
44. Grether-Beck S WM, Krutmann J, Scharffetter-Kochanek K. Photoschädigung und Photoalterung - Prävention und Behandlung. *JDDG.* 2005;2:19-25.
45. Weinstock MA, Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Bronstein BR, Mihm MC, Speizer FE, Nonfamilial cutaneous melanoma incidence in women associated with sun exposure before 20 years of age. *Pediatrics.* 1989;4:199-204.
46. Stern RS WM, Baker SG. Risk reduction for nonmelanoma skin cancer with childhood sunscreen use. *Archives of dermatology.* 1986;122:537-45.

47. J. EJMJ. Melanoma and sun exposure: An overview of published studies. *Int J Cancer*. 1997;73:198–203.
48. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(3):362-71.
49. Jepson TL, Ernst ME, Kelly MW. Current perspectives on the management of seasonal affective disorder. *J Am Pharm Assoc (Wash)*. 1999;39(6):822-9; quiz 80-2.
50. Meffert H, Scherf HP, Bäuml H, Ziegler-Böhme H, Gülke L, Struy H, Strangfeld D, Siewert H, Sönnichsen N, Systemische Effekte der Ultraviolett-, sichtbaren bzw. Infrarotstrahlung bei seriellen Ganzkörperbestrahlungen. *Dermatol Monatsschr*. 1989;175(10):609-22.
51. Schieke SM, Schroeder P, Krutmann J. Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2003;19(5):228-34.
52. Matthews YJH, G. M. ;Phan, T. A. ;Damian, D. L. Wavelength dependency for UVA-induced suppression of recall immunity in humans. *J Dermatol Sci*. 2010;59(3):192-7.
53. Norval M, Halliday GM. The consequences of UV-induced immunosuppression for human health. *Photochemistry and photobiology*. 2011;87(5):965-77.
54. Schade N, Esser C, Krutmann J. Ultraviolet B radiation-induced immunosuppression: molecular mechanisms and cellular alterations. *Photochem Photobiol Sci*. 2005;4(9):699-708.
55. Sklar LR, Almutawa F, Lim HW, Hamzavi I. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. *Photochem Photobiol Sci*. 2013;12(1):54-64.
56. Bensadoun RJ, Nair RG. Low-level laser therapy in the prevention and treatment of cancer therapy-induced mucositis: 2012 state of the art based on literature review and meta-analysis. *Curr Opin Oncol*. 2012;24(4):363-70.
57. Chow RT, Johnson MI, Lopes-Martins RA, Bjordal JM. Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of randomised placebo or active-treatment controlled trials. *Lancet*. 2009;374(9705):1897-908.
58. Brosseau L, Robinson V, Wells G, Debie R, Gam A, Harman K, Morin M, Shea B, Tugwell P. Low level laser therapy (Classes I, II and III) for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005(4):CD002049.
59. Bjordal JM, Couppe C, Chow RT, Tuner J, Ljunggren EA. A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. *Aust J Physiother*. 2003;49(2):107-16.
60. Tumilty S, Munn J, McDonough S, Hurley DA, Basford JR, Baxter GD. Low level laser treatment of tendinopathy: a systematic review with meta-analysis. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(1):3-16.
61. Bjordal JM CC, Ljunggreen AE. Low level laser therapy for tendinopathy. Evidence of a dose-response pattern. *Phys Ther Rev*. 2001;6:91-9.
62. Darvin ME, Haag SF, Meinke MC, Sterry W, Lademann J. Determination of the influence of IR radiation on the antioxidative network of the human skin. *J Biophotonics*. 2011;4(1-2):21-9.
63. Krutmann J, Morita, A., Chung, J.H. Sun exposure: what molecular photo- dermatology tells us about its good and bad sides. *J Invest Dermatol*. 2012;132:976-84.
64. Schroeder P, Calles, C., Benesova, T., Macaluso, F., Krutmann, J. Photoprotection beyond ultraviolet radiation—effective sun protection has to include protection against infrared A radiation-induced skin damage. *Skin Pharmacol Physiol*. 2010;23:15-7.
65. Zastrow L, Groth N, Klein F, Kockott D, Lademann J, Ferrero L. [UV, visible and infrared light. Which wavelengths produce oxidative stress in human skin?]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. 2009;60(4):310-7.
66. Schroeder P, Lademann J, Darvin ME, Stege H, Marks C, Bruhnke S, Krutmann J. Infrared radiation-induced matrix metalloproteinase in human skin: implications for protection. *J Invest Dermatol*. 2008;128(10):2491-7.
67. Darvin ME, Haag SF, Lademann J, Zastrow L, Sterry W, Meinke MC. Formation of free radicals in human skin during irradiation with infrared light. *J Invest Dermatol*. 2010;130(2):629-31.

68. Cho S, Shin MH, Kim YK, Seo JE, Lee YM, Park CH, Chung JH. Effects of infrared radiation and heat on human skin aging in vivo. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2009;14(1):15-9.
69. Kleesz PD, R.; Fluhr, J.W. Full-body skin mapping for six biophysical parameters: baseline values at 16 anatomical sites in 125 human subjects. *Pharmacol Physiol.* 2012;25:25-33.
70. Akhalaya MY, Maksimov GV, Rubin AB, Lademann J, Darvin ME. Molecular action mechanisms of solar infrared radiation and heat on human skin. *Ageing Res Rev.* 2014;16:1-11.
71. Halliwell B, Gutteridge JMC. The Antioxidants of Human Extracellular Fluids. *Arch Biochem Biophys.* 1990;280(1):1-8.
72. Gutteridge JM, Halliwell B. Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic Biol Med.* 1992;12(1):93-5.
73. Bayerl C. [Skin aging and evidence-based topical strategies]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete.* 2015.
74. Wolfle U, Seelinger G, Bauer G, Meinke MC, Lademann J, Schempp CM. Reactive molecule species and antioxidative mechanisms in normal skin and skin aging. *Skin pharmacology and physiology.* 2014;27(6):316-32.
75. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997;82(2):291-5.
76. H S. Oxidative stress II: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology.* 1991;82:291-5.
77. Devasagayam TA, Ippendorf H, Werner T, Martin H, Siesa H. Carotenoids, Novel Polyene Polyketones and New Capsorubin Isomers as Efficient Quenchers of Singlet Molecular Oxygen. In: Ong ASH, Packer L, editors. *Lipid-Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Applications. Molecular and Cell Biology Updates: Birkhäuser Basel;* 1992. p. 255-64.
78. Y. Shindo EW, L. Packer. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J Invest Dermatol.* 1993;100(3):260-5.
79. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* 1994;344(8924):721-4.
80. Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem.* 1991;266(4):2005-8.
81. Maiorino M, Chu FF, Ursini F, Davies KJ, Doroshow JH, Esworthy RS. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18-kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines. *J Biol Chem.* 1991;266(12):7728-32.
82. Breimer LH. Repair of DNA damage induced by reactive oxygen species. *Free Radic Res Commun.* 1991;14(3):159-71.
83. S.C. Sahu SG, in: S.I. Baskin, H. Salem (Eds.). *Oxidants, Antioxidants and Free Radicals* 1997. 327 p.
84. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 2000;21(3):361-70.
85. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010;107(9):1058-70.
86. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.* 2000;18(6):655-73.
87. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006;97:1634-58.
88. Motherwell MSZ, L. The novel role of mitochondrial induced oxidative stress and genetic mutations in Parkinson's disease. *Gene.* 2013.
89. Sayre LM, Smith MA, Perry G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem.* 2001;8(7):721-38.
90. Friedrich A. Einfluss oral eingenommener Carotinoide auf den antioxidativen Status der Haut, die Radikalschutzfunktion der Haut und auf das Lipidprofil der Haut. 2015.
91. Jung K, Richter J, Kabrodt K, Lucke IM, Schellenberg I, Herrling T. The antioxidative power AP--A new quantitative time dependent (2D) parameter for the determination of the antioxidant capacity and reactivity of different plants. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy.* 2006;63(4):846-50.
92. M.P. Kahkonen AIH, H.J. Vuorela, J.P. Rauha, K. Pihlaja, T.S. Kujala, M. Heinonen. *J Agric Food Chem.* 1999;47:3954.

93. H. Günzler ea. Analytiker-Taschenbuch. 148 p.
94. Darvin ME GI, Ey S, Brandt NN, Albrecht H, Gonchukov SA, Sterry W, Lademann J. J. Thiele, F. Dreher, L. Packer. Non-invasive detection of beta-carotene and lycopene in human skin using Raman spectroscopy. *Laser Phys.* 2003;14:231-3.
95. Darvin ME GI, Meinke M, Sterry W, Lademann J. Non-invasive in vivo determination of the carotenoids beta-carotene and lycopene concentrations in the human skin using the Raman spectroscopic method. *J Phys D Appl Phys.* 2005;38:2696–700.
96. Gollnick HP SC. Beta-carotene plasma levels and content in oral mucosal epithelium is skin type associated. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2002;15:360-6.
97. Vahlquist A LJ, Michaelsson G, Rollman O. Vitamin A in human skin. II. Concentrations of carotene, retinol and dehydroretinol in various components of normal skin. *J Invest Dermatol.* 1982;79:94-7.
98. Cesarini JP ML, Maurette JM, Adhoute H, Bejot M. Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2003;19:182-9.
99. Gackowski D KJ, Siomek A, Olinski Raith, K. Oxidative DNA damage and antioxidant vitamin level: comparison among lung cancer patients, healthy smokers and nonsmokers. *Int J Cancer* 2005;114:153-6.
100. Hata TR ST, Ermakov IV, McClane W, Khachik F, Gellermann W, Pershing LK. Non-invasive Raman spectroscopic detection of carotenoids in human skin. *J Invest Dermatol.* 2000;115:441–8.
101. Heinrich U GC, Wiebusch M, Eichler O, Sies H, Tronnier H, Stahl W. Supplementation with β -Carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. *J Nutr* 2003;133:98–101.
102. Kiokias S GM. Dietary supplementation with a natural carotenoid mixture decreases oxidative stress. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:1135–40.
103. Berne B VA, Fischer T, Danielson BG, Berne C. UV treatment of uraemic pruritus reduces the vitamin A content of the skin. *Eur J Clin Invest.* 1984;14:203–6.
104. Biesalski HK HC, Hopfenmuller W, Schmid C, Gollnick HP. Effects of controlled exposure of sunlight on plasma and skin levels of beta-carotene. *Free Radic Res.* 1996;24:215-24.
105. Eicker J KV, Wild S, Riss G, Goralczyk R, Krutmann J, Berneburg M. Betacarotene supplementation protects from photoaging – associated mitochondrial DNA mutation. *Photochem Photobiol Sci.* 2003;2:655-9.
106. JH S. Skin, sun, and vitamin A: from aging to cancer. *J Dermatol.* 2001;28:595–8.
107. Ribaya-Mercado JD GM, Gilchrest BA, Russell RM. Skin lycopene is destroyed preferentially over beta-carotene during ultraviolet irradiation in humans. *J Nutr.* 1995;125:1854–9.
108. Darvin M, Zastrow L, Sterry W, Lademann J. Effect of supplemented and topically applied antioxidant substances on human tissue. *Skin pharmacology and physiology.* 2006;19(5):238-47.
109. Bickers DR, Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol.* 2006;126(12):2565-75.
110. Sarafian TA. Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? *Free Radic Res Commun.* 1994;20:1-6.
111. Kukreja RC, & Hess, M. L. . Free radicals, cardiovascular dysfunction, and protection strategies 1994.
112. Meinke MC, Muller R, Bechtel A, Haag SF, Darvin ME, Lohan SB, Ismaeel F, Lademann J. 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;24(3):194-7.
113. H.Esterbauer SPG, A.Giessauf, O.Ziouzenkova, P.Ramos. Free Radicals Lipoprotein Oxidation and Atherosclerosis - Biological and Clinical Aspects. Richelieu Press 1995:11-26.
114. J. MÜLLER DR, L. W. KROH. Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) http://www.behrs.de/media/catalog/product/3/1/317_lp.pdf2005

115. Haag SF, Taskoparan B, Bittl R, Teutloff C, Wenzel R, Fahr A, Chen M, Lademann J, Schafer-Korting M, Meinke MC. Stabilization of reactive nitroxides using invasomes to allow prolonged electron paramagnetic resonance measurements. *Skin pharmacology and physiology*. 2011;24(6):312-21.
116. Haag SF, Taskoparan B, Darvin ME, Groth N, Lademann J, Sterry W, Meinke MC. Determination of the antioxidative capacity of the skin in vivo using resonance Raman and electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Experimental dermatology*. 2011;20(6):483-7.
117. Vogt O, Lademann J, Rancan F, Meinke MC, Schanzer S, Stockfleth E, Sterry W, Lange-Asschenfeldt B. Photoprotective properties of the fluorescent europium complex in UV-irradiated skin. *Skin pharmacology and physiology*. 2013;26(2):76-84.
118. Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr*. 1995;62(6 Suppl):1315S-21S.
119. Fuchs J, Herrling T, Groth N. Detection of free radicals in skin: a review of the literature and new developments. *Curr Probl Dermatol*. 2001;29:1-17.
120. Fuchs J, Groth N, Herrling T. Cutaneous tolerance to nitroxide free radicals in human skin. *Free Radic Biol Med*. 1998;24(4):643-8.
121. Arndt S, Haag SF, Kleemann A, Lademann J, Meinke MC. Radical protection in the visible and infrared by a hyperforin-rich cream--in vivo versus ex vivo methods. *Experimental dermatology*. 2013;22(5):354-7.
122. Jung K, Seifert M, Herrling T, Fuchs J. UV-generated free radicals (FR) in skin: their prevention by sunscreens and their induction by self-tanning agents. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2008;69(5):1423-8.
123. Haag SF, Bechtel A, Darvin ME, Klein F, Groth N, Schafer-Korting M, Bittl R, Lademann J, Sterry W, Meinke MC. Comparative study of carotenoids, catalase and radical formation in human and animal skin. *Skin pharmacology and physiology*. 2010;23(6):306-12.
124. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Archives of dermatology*. 1988;124(6):869-71.
125. Lauer AC, Groth N, Haag SF, Darvin ME, Lademann J, Meinke MC. Dose-dependent vitamin C uptake and radical scavenging activity in human skin measured with in vivo electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Skin pharmacology and physiology*. 2013;26(3):147-54.
126. Farwanah H, Neubert R, Zellmer S, Raith K. Improved procedure for the separation of major stratum corneum lipids by means of automated multiple development thin-layer chromatography. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2002;780(2):443-50.
127. Haag SF, Tscherch K, Arndt S, Kleemann A, Gersonde I, Lademann J, Rohn S, Meinke MC. Enhancement of skin radical scavenging activity and stratum corneum lipids after the application of a hyperforin-rich cream. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2014;86(2):227-33.
128. Lademann J, Schanzer S, Richter H, Pelchrzim RV, Zastrow L, Golz K, Sterry W. Sunscreen application at the beach. *J Cosmet Dermatol*. 2004;3(2):62-8.
129. Lohan SB, Lauer AC, Arndt S, Friedrich A, Tscherch K, Haag SF, Darvin ME, Vollert H, Kleemann A, Gersonde I, Groth N, Lademann J, Rohn S, Meinke MC. Determination of the Antioxidant Status of the Skin by In Vivo-Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy. *Cosmetics*. 2015; 2:286-301.
130. Fujikake K, Tago S, Plasson R, Nakazawa R, Okano K, Maezawa D, Mukawa T, Kuroda A, Asakura K. Problems of in vitro SPF measurements brought about by viscous fingering generated during sunscreen applications. *Skin pharmacology and physiology*. 2014;27(5):254-62.
131. Martina C, Meinke RM, Anne Bechtel, Stefan F. Haag, Maxim E. Darvin, Silke B. Lohan, Fakher Ismaeel and Jürgen 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;24:194-7.

132. Albrecht S, Ahlberg S, Beckers I, Kockott D, Lademann J, Paul V, Zastrow L, Meinke MC. Effects on detection of radical formation in skin due to solar irradiation measured by EPR spectroscopy. *Methods*. 2016;109:44-54.
133. Vladimirov Iu A, Klebanov GI, Borisenko GG, Osipov AN. [Molecular and cellular mechanisms of the low intensity laser radiation effect]. *Biofizika*. 2004;49(2):339-50.
134. Zastrow L, Ferrero L, Herrling T, Groth N. Integrated sun protection factor: a new sun protection factor based on free radicals generated by UV irradiation. *Skin pharmacology and physiology*. 2004;17(5):219-31.
135. Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen*. 2001;9(2):66-76.
136. Thiele JJ, Schroeter C, Hsieh SN, Podda M, Packer L. The antioxidant network of the stratum corneum. *Curr Probl Dermatol*. 2001;29:26-42.
137. Darvin ME, Richter H, Ahlberg S, Haag SF, Meinke MC, Le Quintrec D, Doucet O, Lademann J. Influence of sun exposure on the cutaneous collagen/elastin fibers and carotenoids: negative effects can be reduced by application of sunscreen. *J Biophotonics*. 2014;7(9):735-43.
138. Lademann J, Schanzer S, Meinke M, Sterry W, Darvin ME. Interaction between carotenoids and free radicals in human skin. *Skin pharmacology and physiology*. 2011;24(5):238-44.
139. Darvin ME, Haag S, Meinke M, Zastrow L, Sterry W, Lademann J. Radical production by infrared A irradiation in human tissue. *Skin pharmacology and physiology*. 2010;23(1):40-6.
140. Brandt MR, M.; Schrader, A. . Influence of VIS/NIR radiation on the characteristics of sunscreens and human skin. *IFSCC Magazine* 2001;1(4):15-9.
141. Kim HH, Lee MJ, Lee SR, Kim KH, Cho KH, Eun HC, Chung JH. Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice. *Mech Ageing Dev*. 2005;126(11):1170-7.
142. Calles C, Schneider M, Macaluso F, Benesova T, Krutmann J, Schroeder P. Infrared A radiation influences the skin fibroblast transcriptome: mechanisms and consequences. *J Invest Dermatol*. 2010;130(6):1524-36.
143. Kim MS, Kim YK, Cho KH, Chung JH. Regulation of type I procollagen and MMP-1 expression after single or repeated exposure to infrared radiation in human skin. *Mech Ageing Dev*. 2006;127(12):875-82.
144. Schroeder P, Pohl C, Calles C, Marks C, Wild S, Krutmann J. Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(1):128-35.
145. Grether-Beck S, Marini A, Jaenicke T, Krutmann J. Effective photoprotection of human skin against infrared A radiation by topically applied antioxidants: results from a vehicle controlled, double-blind, randomized study. *Photochemistry and photobiology*. 2015;91(1):248-50.
146. Yano K, Oura H, Detmar M. Targeted overexpression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 in the epidermis of transgenic mice prevents ultraviolet-B-induced angiogenesis and cutaneous photo-damage. *J Invest Dermatol*. 2002;118(5):800-5.
147. Kim MS, Kim YK, Lee DH, Seo JE, Cho KH, Eun HC, Chung JH. Acute exposure of human skin to ultraviolet or infrared radiation or heat stimuli increases mast cell numbers and tryptase expression in human skin in vivo. *Br J Dermatol*. 2009;160(2):393-402.
148. Jantschitsch C, Majewski S, Maeda A, Schwarz T, Schwarz A. Infrared radiation confers resistance to UV-induced apoptosis via reduction of DNA damage and upregulation of antiapoptotic proteins. *J Invest Dermatol*. 2009;129(5):1271-9.
149. Tepavcevic S, Darling SB, Dimitrijevic NM, Rajh T, Sibener SJ. Improved hybrid solar cells via in situ UV polymerization. *Small*. 2009;5(15):1776-83.
150. Schieke S, Stege H, Kurten V, Grether-Beck S, Sies H, Krutmann J. 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;119(6):1323-9.
151. Schroeder P, Haendeler J, Krutmann J. The role of near infrared radiation in photoaging of the skin. *Exp Gerontol*. 2008;43(7):629-32.

152. Cho S, Lee MJ, Kim MS, Lee S, Kim YK, Lee DH, Lee CW, Cho KH, Chung JH. Infrared plus visible light and heat from natural sunlight participate in the expression of MMPs and type I procollagen as well as infiltration of inflammatory cell in human skin in vivo. *J Dermatol Sci*. 2008;50(2):123-33.
153. Shin MH, Moon YJ, Seo JE, Lee Y, Kim KH, Chung JH. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(4):635-45.
154. Hong JE, Santucci LA, Tian X, Silverman DJ. Superoxide dismutase-dependent, catalase-sensitive peroxides in human endothelial cells infected by *Rickettsia rickettsii*. *Infect Immun*. 1998;66(4):1293-8.
155. Pullmann H, Mores E, Reinbach S. [Effects of infrared and UVA rays on the human skin and their efficacy in the treatment of atopic dermatitis]. *Z Hautkr*. 1985;60(1-2):171-7.
156. Kim MSK, Y.K.; Cho, K.H.; Chung, J.H. Infrared exposure induces an angiogenic switch in human skin that is partially mediated by heat. *Br J Dermatol*. 2006;6(155):1131-8.
157. Lee YM, Kim YK, Chung JH. Increased expression of TRPV1 channel in intrinsically aged and photoaged human skin in vivo. *Experimental dermatology*. 2009;18(5):431-6.
158. Lee YM, Kim YK, Kim KH, Park SJ, Kim SJ, Chung JH. A novel role for the TRPV1 channel in UV-induced matrix metalloproteinase (MMP)-1 expression in HaCaT cells. *J Cell Physiol*. 2009;219(3):766-75.
159. Lee YML, W.H.; Kim, Y.K.; Kim, K.H.; Chung, J.H. Heat-induced MMP-1 expression is mediated by TRPV1 through PKC α signaling in HaCaT cells. *Experimental dermatology*. 2008(17):864-70.
160. Li WH, Lee YM, Kim JY, Kang S, Kim S, Kim KH, Park CH, Chung JH. Transient receptor potential vanilloid-1 mediates heat-shock-induced matrix metalloproteinase-1 expression in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2007;127(10):2328-35.
161. Jung T, Hohn A, Piazena H, Grune T. Effects of water-filtered infrared A irradiation on human fibroblasts. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(1):153-60.
162. Piazena H, Kelleher DK. Effects of infrared-A irradiation on skin: discrepancies in published data highlight the need for an exact consideration of physical and photobiological laws and appropriate experimental settings. *Photochemistry and photobiology*. 2010;86(3):687-705.
163. Lund L, Ley RD, Felton LA, GS T. Determination of wavelength-specific UV protection factors of sunscreens in intact skin by EPR. 2007.
164. Vandersee S, Beyer M, Lademann J, Darvin ME. Blue-violet light irradiation dose dependently decreases carotenoids in human skin, which indicates the generation of free radicals. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:579675.
165. Zastrow L, Groth N, al KFe. Detection and identification of free radicals generated by UV and visible light in ex vivo human skin. *IFSCC Magazine* 2008;11(3):207-15.
166. Mahmoud BH, Ruvolo E, Hexsel CL, Liu Y, Owen MR, Kollias N, Lim HW, Hamzavi IH. Impact of long-wavelength UVA and visible light on melanocompetent skin. *J Invest Dermatol*. 2010;130(8):2092-7.
167. Zastrow L, Doucet O, Ferrero L, Groth N, Klein F, Kockott D, Lademann J, Free Radical Threshold Value: A New Universal Body Constant. *Skin pharmacology and physiology*. 2015;28(5):264-8.
168. Zastrow L, Lademann J. Light - Instead of UV Protection: New Requirements for Skin Cancer Prevention. *Anticancer Res*. 2016;36(3):1389-93.
169. Albrecht S, Jung S, Muller R, Lademann J, Zuberbier T, Zastrow L, Reble C, Beckers I, Meinke MC. Skin type differences in solar simulated radiation-induced oxidative stress. *Br J Dermatol*. 2018.
170. Meinke MC, Syring F, Schanzer S, Haag SF, Graf R, Loch M, Gersonde I, Groth N, Pflucker F, Lademann J. Radical protection by differently composed creams in the UV/VIS and IR spectral ranges. *Photochemistry and photobiology*. 2013;89(5):1079-84.
171. Souza C, Maia Campos P, Schanzer S, Albrecht S, Lohan SB, Lademann J, Darvin ME, Meinke MC. Radical-Scavenging Activity of a Sunscreen Enriched by Antioxidants Providing Protection in the Whole Solar Spectral Range. *Skin pharmacology and physiology*. 2017;30(2):81-9.
172. Nicita-Mauro V, Lo Balbo C, Mento A, Nicita-Mauro C, Maltese G, Basile G. Smoking, aging and the centenarians. *Exp Gerontol*. 2008;43(2):95-101.

13 Fragebogen zur Ernährung und Lebensgewohnheiten

Bitte beantworten Sie den folgenden Fragebogen wahrheitsgemäß. Die Auswertung der Daten erfolgt ausschließlich im Rahmen der Studie. Keine der von Ihnen gemachten Angaben wird in Bezug zu Ihrem Namen veröffentlicht. Wenn Sie meinen zu einer Frage gibt es keine passende Antwortmöglichkeit, nehmen Sie die Antwort, die am Ehesten zutrifft!

1. Welche Probandennummer haben Sie?
(bitte hier eintragen:) _____

2. Wann sind Sie geboren? Geben Sie bitte Monat und Jahr an.
Monat: _____ / Jahr: _____

3. Sie sind
 männlich weiblich

4. Verwenden Sie regelmäßig Hautpflegeprodukte an den Unterarmen
(z.B. Bodylotion)?
 ja nein

enthält dieses Produkt Antioxidantien?
 ja nein vielleicht

Nennen Sie den Namen des Produktes, das Sie für die Unterarme am Häufigsten verwenden:
(bitte Produktnamen eintragen:) _____

5. Angaben zum Hauttyp
(bei allen Angaben zum Hauttyp (Punkt 5) sind nur Einmalnennungen möglich!
Kreuzen Sie bitte an:

Augenfarbe:	<input type="checkbox"/> braun	<input type="checkbox"/> grau	<input type="checkbox"/> blau	<input type="checkbox"/> grün
Haarfarbe (=natürliche Haarfarbe):	<input type="checkbox"/> braun	<input type="checkbox"/> schwarz	<input type="checkbox"/> blond	
Haben Sie Sommersprossen?	<input type="checkbox"/> ja		<input type="checkbox"/> nein	

Wenn ja, bekommen Sie im Sommer deutlich mehr Sommersprossen?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Wie oft haben Sie Sonnenbrände pro Jahr?	<input type="checkbox"/> > 2 Mal pro Jahr	<input type="checkbox"/> ≤ 2 Mal pro Jahr
Treten bei Ihnen Sonnenbrände auf, obwohl Sie starke Sonneneinstrahlung meiden?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Werden Sie bei Sonnenstrahlung regelmäßig braun ohne vorher rot zu werden?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein

6. Angaben zur Sonnenexposition: Bitte schätzen Sie Ihre Sonnenexposition in den Sommermonaten des Jahres ein.

SoS= Sonnenschutz

Scha= Aufenthalt im Schatten

<input type="checkbox"/> immer SoS und/oder Scha (ich meide die Sonne)	<input type="checkbox"/> nur gelegentlich SoS und/oder nur gelegentlich Scha (Ich gehe lieber in die Sonne als in den Schatten und nehme Sonnenmilch wenn es heiß ist)	<input type="checkbox"/> selten SoS und/oder wenig Scha (ich bade gern mal in der Sonne, auch wenn es richtig warm ist und habe öfter keinen Sonnenschutz parat)
---	---	---

7. Besuchen Sie regelmäßig ein Solarium?

ja nein

Wenn ja, wie häufig? _____

8. Angaben zur Leistungsfähigkeit

Welche Aussage trifft auf Sie für die letzten vier Wochen im Allgemeinen zu?

<input type="checkbox"/> Ich habe mich körperlich sehr leistungsfähig gefühlt
<input type="checkbox"/> Ich habe mich körperlich leistungsfähig genug gefühlt
<input type="checkbox"/> Ich habe mich körperlich nicht leistungsfähig genug gefühlt
<input type="checkbox"/> Ich habe mich körperlich gar nicht leistungsfähig gefühlt

9. Angaben zur körperlichen Bewegung

Treiben sie Sport? (=mind. 30 Minuten körperlich anstrengende Bewegung am Stück ohne längere Pausen)

<input type="checkbox"/> nie
<input type="checkbox"/> <1x/Monat
<input type="checkbox"/> 1-2x/Monat
<input type="checkbox"/> ≥ 1x/Woche
<input type="checkbox"/> > 2x/Woche

10. Schätzen Sie bitte ein, wie viele Gehminuten pro Tag Sie insgesamt zu Fuß zurücklegen!

<input type="checkbox"/> <10 Minuten/ Tag
<input type="checkbox"/> 10 -20 Minuten/ Tag
<input type="checkbox"/> 20 -40 Minuten pro Tag
<input type="checkbox"/> >40 Minuten/ Tag

11. Stimmung

Wo befanden Sie sich im Schnitt während der letzten vier Wochen auf einer Skala von 1 bis 10, wenn 1 bedeutet "ich fühle mich nicht wohl" und 10 "ich fühle mich sehr wohl"?

- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

12. Stress

Hatten Sie während der letzten vier Wochen einen geregelten Tagesablauf?

- ja nein

12.2 Hatten Sie den letzten vier Wochen eher viel oder eher wenig Stress?

- eher wenig eher viel

12.3 Schätzen Sie bitte Ihr Stresslevel in den letzten vier Wochen noch etwas genauer ein!

<input type="checkbox"/> kaum Stress
<input type="checkbox"/> relativ wenig Stress
<input type="checkbox"/> mittelmäßiger Stress
<input type="checkbox"/> viel Stress
<input type="checkbox"/> sehr viel Stress

12.4 Schätzen Sie bitte Ihren beruflichen Stress in den letzten vier Wochen ein!
Dazu zählt auch Stress durch Ihre Ausbildung/ Ihr Studium!

Wieviel beruflichen Stress hatten Sie in den letzten vier Wochen?

<input type="checkbox"/> kaum
<input type="checkbox"/> relativ wenig
<input type="checkbox"/> mittelmäßig
<input type="checkbox"/> viel
<input type="checkbox"/> sehr viel

12.5 Schätzen Sie bitte Ihren privaten Stress in den letzten vier Wochen ein!

Wieviel privaten Stress hatten Sie in den letzten vier Wochen?

<input type="checkbox"/> kaum
<input type="checkbox"/> relativ wenig
<input type="checkbox"/> mittelmäßig
<input type="checkbox"/> viel
<input type="checkbox"/> sehr viel

13. Fragen zur Gesundheit

13.1 Waren Sie in den letzten vier Wochen erkältet?

ja nein

Schätzen Sie bitte die Schwere Ihrer Erkältung auf einer Skala von 1-6 ein:
(Wenn mehr als eine Erkältung vorkam, dann die schwerere Erkältung beschreiben)

1= leichte Erkältung

6= schwere Erkältung

1

2

3

4

5

6

Geben Sie die Dauer der Erkältung in Tagen an!

Das Ende Ihrer Erkältung ist der Zeitpunkt der deutlichsten Beschwerdebesserung. Also der Zeitpunkt, zu dem Sie sich wieder annähernd so leistungsfähig wie vor der Erkältung fühlten.

1Tag Dauer 2 Tage 3 Tage 4 Tage 5Tage 6Tage 7Tage 8Tage

>8Tage

Waren Sie in den letzten vier Wochen so stark erkältet, dass Sie nicht zur Arbeit/ zur Uni/ zur Ausbildung gehen konnten?

ja nein

Hatten Sie während der letzten vier Wochen Fieber?

ja nein

13.2 Hatten Sie während der letzten vier Wochen Beschwerden eines Magen-Darm

Infekts? (Durchfall, Erbrechen, Übelkeit oder Bauchschmerzen?)

ja nein

Schätzen Sie bitte die schwere Ihres Infektes auf einer Skala von 1-6 ein:

1= leichter Infekt

6=schwerer Infekt

1

2

3

4

5

6

Bitte kreuzen Sie an, welche Beschwerden während Ihres Infektes aufgetreten sind (erste Spalte).

Geben Sie dann für die angekreuzten Beschwerden an, wie schwer diese waren mit Hilfe der Skala von 1 bis 6 (zweite Spalte):

<input type="checkbox"/> Leistungsminderung (Gefühl schlapp und ohne Energie zu sein)	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
<input type="checkbox"/> Gefühl krank zu sein	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
<input type="checkbox"/> Erbrechen	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
<input type="checkbox"/> Durchfall	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6
<input type="checkbox"/> Bauchschmerzen	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	<input type="checkbox"/> 6

Geben Sie die Dauer Ihrer Beschwerden in Tagen an!

Das Ende Ihres Infektes ist der Zeitpunkt der deutlichsten Beschwerdebesserung. Also der Zeitpunkt zu dem Sie sich wieder annähernd so gesund wie vor Ihren Beschwerden fühlten.

1Tag Dauer 2 Tage 3 Tage 4 Tage 5Tage 6Tage 7Tage 8Tage
 >8Tage

13.3 Gesundheit im Allgemeinen:

Wie häufig haben Sie Infekte pro Jahr? (z.B. Erkältungen oder Durchfallerkrankungen bei denen man sich krank fühlt)	<input type="checkbox"/> ≤ 2 / Jahr	<input type="checkbox"/> 2-4/ Jahr	<input type="checkbox"/> > 4/ Jahr
--	-------------------------------------	------------------------------------	------------------------------------

Nehmen Sie derzeit Medikamente ein?

ja nein

Wenn ja, welches Medikament nehmen Sie ein? _____

Aus welchem Grund nehmen Sie dieses Medikament ein? _____
 Seit wann nehmen Sie dieses Medikament ein? _____

14. Ernährungsgewohnheiten

Essen Sie eher viel oder eher wenig Gemüse?

eher wenig eher viel

Essen Sie eher viel oder eher wenig Obst und Gemüse?

eher wenig eher viel

Essen Sie eher viel oder eher wenig Obst?

eher wenig eher viel

Wie schätzen sie die Mengenmäßige Zusammensetzung Ihrer Ernährung ein?
 Schätzen Sie die Angaben in Prozent. Sie müssen insgesamt nicht auf 100%
 kommen.

Wenn Sie sich unsicher sind, dann beziehen Sie sich auf die letzten vier Wochen
 Ihrer Ernährung.

Anteil von Kohlenhydraten an der gesamten Ernährung (= Brot, Nudeln, Reis, Cornflakes/Müsli u.a.)				
<input type="checkbox"/> < 10%	<input type="checkbox"/> 10-30%	<input type="checkbox"/> 31-50%	<input type="checkbox"/> 51-70%	<input type="checkbox"/> > 70%

Anteil von Fett an der gesamten Ernährung (Käse, Butter, cremige Brotaufstriche, Schokolade, Kuchen u.a.)				
<input type="checkbox"/> < 10%	<input type="checkbox"/> 10-30%	<input type="checkbox"/> 31-50%	<input type="checkbox"/> 51-70%	<input type="checkbox"/> > 70%

Anteil von Obst an der gesamten Ernährung				
<input type="checkbox"/> < 10%	<input type="checkbox"/> 10-30%	<input type="checkbox"/> 31-50%	<input type="checkbox"/> 51-70%	<input type="checkbox"/> > 70%

Anteil von Gemüse an der gesamten Ernährung				
<input type="checkbox"/> < 10%	<input type="checkbox"/> 10-30%	<input type="checkbox"/> 31-50%	<input type="checkbox"/> 51-70%	<input type="checkbox"/> > 70%

Obst:

Diese Obstsorte esse ich...:	selten oder nie	≥1 Mal pro Monat	≥1Mal/ Woche	≥ 4 Mal pro Woche	weiß nicht
Apfel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Orange	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Banane	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kiwi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mango	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Wassermelone	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Feigen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
rote Trauben	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
grüne Trauben	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kaki/ Sharon	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ananas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Andere: _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Gemüse:

Diese Gemüsesorte esse ich...:	selten oder nie	>1 Mal pro Monat	>1Mal/ Woche	≥ 4 Mal pro Woche	weiß nicht
Tomate	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tomatensoßen, Ketchup	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Paprika	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Brokkoli	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kartoffeln	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Spinat	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Blattsalat	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Karotten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Grünkohl	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Succhini	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Blumenkohl	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kürbis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Andere: _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

15. Genussmittel

15.1 Wie häufig konsumieren Sie alkoholische Getränke?

Selten/ nie	>1 Mal pro Monat	>1Mal/ Woche	≥ 4 Mal pro Woche
-------------	------------------	--------------	-------------------

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

Sind Sie derzeit aktiver Raucher?

ja nein

Wenn ja, wie viele Zigaretten rauchen Sie pro Tag im Schnitt?

<input type="checkbox"/> < 10 Zig/ Tag	<input type="checkbox"/> >10 Zig/ Tag
--	---------------------------------------

Seit wie vielen Jahren rauchen Sie?

<input type="checkbox"/> <5 Jahre	<input type="checkbox"/> 5 -10 Jahre	<input type="checkbox"/> 10 - 15 Jahre	<input type="checkbox"/> >15 Jahre
-----------------------------------	--------------------------------------	--	------------------------------------

15.2 Wenn Sie derzeit nicht rauchen, haben Sie früher einmal geraucht?

ja nein

Über welchen Zeitraum haben Sie regelmäßig geraucht?

<input type="checkbox"/> <5 Jahre	<input type="checkbox"/> 5 -10 Jahre	<input type="checkbox"/> 10 - 15 Jahre	<input type="checkbox"/> >15 Jahre
-----------------------------------	--------------------------------------	--	------------------------------------

Wieviele Zigaretten haben Sie im Schnitt am Tag geraucht?

<input type="checkbox"/> < 10 Zig/ Tag	<input type="checkbox"/> >10 Zig/ Tag
--	---------------------------------------

Wie lange ist ihr Zigarettenkonsum her?

<input type="checkbox"/> <5 Jahre	<input type="checkbox"/> 5 -10 Jahre	<input type="checkbox"/> 10 - 15 Jahre	<input type="checkbox"/> >15 Jahre
-----------------------------------	--------------------------------------	--	------------------------------------

16. Lebensstiländerung

Änderung des Lebensstils in den letzten fünf Jahren			
Mein Lebensstil ist:	<input type="checkbox"/> gleichgeblieben	<input type="checkbox"/> leicht verändert	<input type="checkbox"/> grundlegend verändert
Leben sie heute eher gesünder oder ungesünder als vor fünf Jahren?	<input type="checkbox"/> gesünder	<input type="checkbox"/> ungesünder	<input type="checkbox"/> Gleich gesund

14 Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Publikation 1: Meinke MC, **Muller R**, Bechtel A, Haag SF, Darvin ME, Lohan SB, Ismaeel F, Lademann J. Evaluation of carotenoids and reactive oxygen species in human skin after UV irradiation: a critical comparison between in vivo and ex vivo investigations. *Exp Dermatol*, 2015. 24: p. 194–197.

Beitrag im Einzelnen: Erhebung der Primärdaten (selbständige Durchführung der in vivo und ex vivo ESR-Messungen), statistische Auswertung, Unterstützung bei der Verfassung des Manuskriptes.

Publikation 2: Lohan SB, **Muller R**, Albrecht S, Mink K, Tscherch K, Ismaeel F, Lademann J, Rohn, S, Meinke MC. Free radicals induced by sunlight in different spectral regions - *in vivo* versus *ex vivo* study. *Exp Dermatol*, 2016. **25**(5): p. 380-5.

Beitrag im Einzelnen: Erhebung der Primärdaten (selbständige Durchführung der ESR-Messungen, Extraktion der Lipide), statistische Auswertung, Unterstützung bei der Verfassung des Manuskriptes.

Publikation 3: Albrecht S, Jung S, **Muller R**, Lademann J, Zuberbier T, Zastrow L, Reble C, Beckers I, Meinke MC, Skin type differences in solar simulated radiation-induced oxidative stress. *Br J Dermatol*, 2018.

Beitrag im Einzelnen: Teilerhebung der Primärdaten von VIS/NIR in vivo Bestrahlung (selbständige Durchführung der ESR-Messungen)

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

15 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Robert Müller, versichere an Eides statt, durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Radikalbildung *in vivo* /*ex vivo* nach Bestrahlung verschiedener Wellenlängen“ selbständig 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) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zur 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 etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin 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.“

Darum

Unterschrift

16 Curriculum vitae

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

17 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei der gesamten Forschungsgruppe des Zentrums für experimentelle & angewandte Hautphysiologie der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. J. Lademann für die nette Aufnahme, Einarbeitung und Begleitung bedanken.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. rer. nat. M. Meinke für das Überlassen des interessanten Themas, die durchgehende Unterstützung und stetige Hilfsbereitschaft.

Außerdem möchte ich mich bei S. Schanzer, Dr. rer. nat. St. Haag, St. Albrecht und Dr. rer. nat. S. Lohan herzlich für die Einführung in die Arbeit am ESR-Gerät, die Hilfe bei den Arbeiten mit der Software sowie der Auswertung und die ständige Diskussionsbereitschaft herzlich bedanken.

Auch bei den Probanden, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, möchte ich mich für die Mitarbeit recht herzlich bedanken.

Außerdem möchte ich meiner Familie danken, die mich stets bekräftigt diese Dissertation voranzubringen. Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder Clemens.