

Aus dem Institut für
Umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine Universität
Direktor: Prof. Dr. med. J. Krutmann

**Der Einfluss der UV-Filtersubstanzen Uvinul und Parsol auf die
UVB-induzierte Inhibition der IFN- γ induzierten ICAM-1 Expression
in menschlicher Haut**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

LUCIE RAUCH

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Jean Krutmann

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Helger Stege

meinen Eltern & meinem Ehemann

Inhaltsverzeichnis.....	Seite
I VERWENDETE ABKÜRZUNGEN.....	7
1 EINLEITUNG.....	8
1.1 Elektromagnetische Strahlung.....	9
1.1.1 Optische Strahlung.....	10
1.1.2 Sichtbare Strahlung.....	10
1.1.3 Ultraviolette Strahlung.....	11
1.2 Photobiologische und photochemische Grundlagen.....	12
1.2.1 Physikalische Grundlagen.....	12
1.2.2 Biologische Effekte.....	14
1.2.3 Photobiologische Eigenschaften der Haut.....	14
1.2.4 Bioaktivität der UV-Strahlung.....	16
1.2.5 UV-Erythem.....	16
1.2.6 DNS-Schädigung.....	18
1.2.7 Photoaging.....	18
1.2.8 Photokarzinogenese.....	19
1.2.9 UV-induzierbare Erkrankungen.....	20
1.2.10 Immunmodulation/Immunsuppression.....	21
1.3 Schutzmechanismen gegen die negative Wirkung von Sonnenlicht.....	23
1.3.1 Natürliche Photoprotektion.....	23
1.3.2 Topische Lichtschutzmittel.....	27
1.3.3 Systemische Lichtschutzstoffe.....	31
1.3.4 Textilien.....	31
1.3.5 Karenz.....	32
1.4 UVB-Lichtschutzfaktor.....	32
1.5 UVB-strahleninduzierte Expression von ICAM-1 in menschlichen Zellen.....	35
1.5.1 UVB-Effekte auf die humane ICAM-1-Expression.....	37
1.5.2 <i>in-vitro</i> -Testungen.....	38
1.5.3 <i>In-vivo</i> -Testungen.....	39
1.6 Testsystem.....	40
1.6.1 Bestimmung der MED.....	40
1.6.2 Übertragung des Testsystems <i>in vivo</i>	41
1.6.3 Ausbau des Testsystems zum Nachweis einer Immunmodulation.....	42
2 MATERIAL UND METHODEN.....	45
2.1 Material.....	45
2.1.1 Probanden.....	45
2.1.2 UV-Filtersubstanzen.....	45
2.1.3 IFN- γ	46
2.1.4 Strahlenquelle.....	46

2.1.5	Immunhistochemische Reagenzien.....	46
2.2	Methoden.....	47
2.2.1	Bestimmung der MED.....	47
2.2.2	Bestimmung des LSF.....	48
2.2.3	Versuchsordnung.....	48
2.2.4	Biopsien.....	49
2.2.5	Immunhistochemie.....	49
2.2.6	Bestimmung der optimalen Verdünnung von ICAM-1.....	50
2.2.7	Semiquantitative Beurteilung der Präparate.....	50
3	ERGEBNISSE.....	52
4	DISKUSSION.....	55
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	67
6	ANHANG.....	82
7	CURICULUM VITAE.....	91
8	DANKSAGUNG.....	92
9	ZUSAMMENFASSUNG (ABSTRACT).....	93

I Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
cm ²	Quadratcentimeter
COLIPA	Comité de Liaison des Associations Européennes de L'Industrie de la Parfumerie, des Produits Cosmetiques et de Toilette
DDC	dermale dendritische Zellen
DNS	Desoxyribonukleinsäure
HNK	normalen humane Keratinozyten
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IL	Interleukin
IL-1RI	TYP 1 IL-1 Rezeptor
IFN- γ	Interferon γ
IPF	Immunprotektionsfaktor
J	Joule
KB	transformierte Keratinozyten
kd	Kilodalton
LFA	Lymphozyten Funktion assoziiertes Antigen
LC	Langerhans Zellen
LSF	Lichtschutzfaktor
MED	minimale Erythemdosis
mg	Miligramm
MISD	minimale immunsuppressive Dosis
n	Anzahl
NMSC	non melanotic skin cancer
PBS	Protein-blocking Reagenz
UV	Ultraviolette Strahlung
UVA	Spektralbereich A
UVB	Spektralbereich B
UVC	Spektralbereich C
rh	rekombinant humane
SALT	skin-associated lymphoid tissues
s.c.	subkutan
SIS	skin immune system
SPF	sun protection factor
Tab	Tabelle

TCR	T-Zellantigenrezeptoren
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TNF β	Tumornekrosefaktor β

1 EINLEITUNG

Die jüngsten Untersuchungen zur Abnahme der Ozonschicht in der Atmosphäre (*Cetre of atmosperic science 1998*) und die steigende Inzidenz von bösartigen Hauttumoren haben wiederholt die Frage nach den potentiellen Gesundheitsrisiken durch UV-Exposition in den Vordergrund gerückt. Große Aufklärungskampagnen sollen zu einem erhöhten Bewusstsein gegenüber den Risiken einer unkontrollierten UV-Exposition führen. Dabei wird in besonderem Maße die Applikation von Sonnenschutzmitteln auf exponierte Haut propagiert.

Lichtschutzmittel dienen der Prophylaxe von akuten (z.B. Sonnenbrand) (*Kaidbey 1990; Gasparro 1998*) und chronischen UV-Schäden (z. B: Kanzerosen, Hautalterung) (*Ananthaswamy 2002*).

Das Maß der Protektion wird durch den Lichtschutzfaktor (LSF) eines Sonnenschutzpräparates ausgedrückt. Er gibt allerdings nur Auskunft über seine erythemprotektive Wirkung im Bereich der UVB-Strahlung und macht keine Aussage über eine eventuell vorhandene oder fehlende immunprotektive Wirkung (*Domanski 1999*). Es wird immer wieder gefordert, dass zur Optimierung der UV-Prophylaxe Sonnenschutzpräparate auch vor weiteren UV-induzierten biologischen Effekten, wie Immunsuppression oder der Induktion von DNS-Schäden schützen sollten und diese neuen Protektionsfaktoren neben dem LSF benannt werden müßten. Es hat sich gezeigt, dass Lichtschutzzubereitungen mit hohem UVB- und niedrigem UVA-Filter zu einem gefährdenden Sonnenabusus führen können (*Autier 1999*). Bei Ausnutzung der möglichen, langen erythemprotektiven Expositionszeiten bei hohem UVB-Filter wird die Haut extrem hohen UVA-Dosen ausgesetzt, die die Hautalterung verstärken und vermutlich auf lange Sicht die Karzinogenese verstärken können (*Autier 2000*). Durch *in vitro* und *in vivo* Studien im Tiermodell und humanen Modell ist bekannt, dass UVB eine Reihe von biologischen Effekten schon unterhalb eines sichtbaren UVB-Erythems induzieren kann (*Cooper 1993, Lavker 1995*).

Vor diesem Hintergrund ist die Entwicklung eines verlässlichen Testsystems, welches in der Lage ist, die lokale UVB-induzierte Immunsuppression zu messen und dadurch immunprotektive Eigenschaften eines Sonnenschutzmittels zu ermitteln, besonders wichtig.

Die im Folgenden dargestellten Untersuchungen dienen zur Etablierung eines photoimmunologischen Testsystems zur Festlegung der MISD (minimale

immunsuppressiven Dosis) und eines daraus abgeleiteten IPF (Immunprotektionsfaktor) im Humansystem (*in vivo* beim Menschen als photoimmunologisches Read-out-System). Zwei handelsübliche Sonnenschutzpräparate wurden dahingehend untersucht, inwieweit sie in der Lage sind, die UVB-induzierte Hemmung der IFN- γ -induzierten ICAM-1 Expression auf Keratinozytenoberflächen zu verhindern.

1.1 Elektromagnetische Strahlung

Sichtbares Licht und benachbarte Spektren, Ultraviolett und Infrarot, sind eine wichtige Quelle für das Leben auf der Erde. Die gesamte optische Strahlung geht von der Photosphäre der Sonne aus.

Die Veränderungen des Sonnenspektrums beim Durchdringen der Erdatmosphäre entstehen durch Streuung an Luftmolekülen und Schwebstoffen (Aerosolen) und durch Absorption in atmosphärischen Gasen und Dämpfen. Für den ultravioletten Bereich sind dabei die Absorption durch Ozon im Wellenlängengebiet unterhalb von 300 nm sowie eine starke spektrale Abhängigkeit des Streuverhaltens von Bedeutung. Letztgenannte bewirkt, dass die kurzwelligen Anteile der direkten Sonnenstrahlung um so stärker abnehmen, je länger ihr Weg durch die Atmosphäre ist. Der gestreute Anteil dagegen, im Sichtbaren erkennbar als die blaue Himmelsstrahlung, erhöht sich bei tiefer stehender Sonne, da sie dann größerer Luftmassen durchdringen muss. Dies erklärt die stärkere biologische Wirkung der Sonneneinstrahlung am Mittag im Vergleich zum Abend.

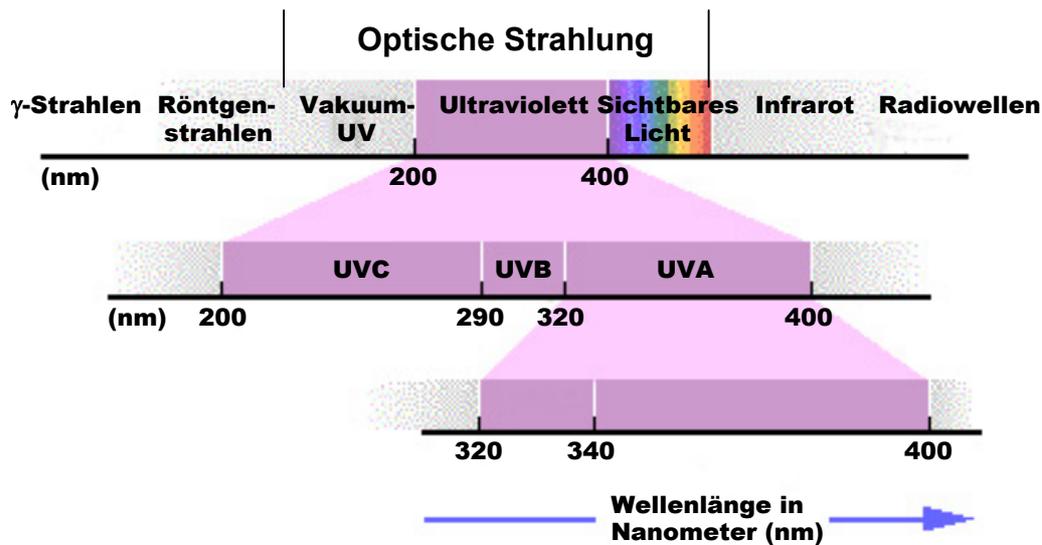


Abb. 1: Optische Strahlung

1.1.1 Optische Strahlung

Die optische Strahlung setzt sich definitionsgemäß aus infraroter, sichtbarer und ultravioletter Strahlung zusammen. Sie werden im Hinblick auf ihre chemischen und physikalischen Wirkungen unterteilt in :

Infrarote Strahlung

langwelliges Infrarot (IR-C) 10 μ - 1mm

es handelt sich um energiearme Strahlung, die biologisch von geringer Bedeutung ist.

mittelwelliges Infrarot (IR-B) 3-10 μ

Hauptemissionsbereich erhitzter Gläser (Lampenkolben). Sie wird vom Menschen nicht als Wärmestrahlung empfunden, da sie bereits in der obersten Hautschicht absorbiert wird. Langwierige Einstrahlung wird als unangenehm empfunden, da keine Gegenreaktion zur Regulierung der Körpertemperatur eintritt.

Kurzwelliges Infrarot (IR-A) 800-3000 nm

Sie stellt den Hauptemissionsbereich der Wärmestrahlung der Sonne dar. Die Strahlung dringt tief in die Haut ein und wird in weiten Grenzen als angenehm empfunden. Den Bereich 800-1400 nm bezeichnet man auch als therapeutische Wärmeoktave.

1.1.2 Sichtbare Strahlung

Das Hauptunterscheidungsmerkmal der sichtbaren Strahlung ist der durch die einzelnen Wellenlängenbereiche im menschlichen Auge hervorgerufene Farbeindruck. Die Empfindlichkeit des Auges für die verschiedenen Farben ist unterschiedlich groß. Für Grüntöne ist das Auge am empfindlichsten und für violette und rote Farben am unempfindlichsten. Da diese Sensibilität für die Definition von Lichtquellen eine ganz wesentliche Bedeutung hat, wurde aufgrund von experimentellen Untersuchungen ein Normalauge ermittelt und dessen Empfindlichkeitsverlauf als spektraler Hellempfindlichkeitsgrad oder $V(\lambda)$ -Kurve in die Normung aufgenommen.

Auch im psychologischen Bereich können die Wellenlänge und damit die Farbe eine Rolle spielen. Bläuliche Farben sollen die Aktivität erhöhen, während rötliche Farbtöne beruhigend und entspannend wirken sollen.

Obwohl die Farbeindrücke mit steigender Wellenlänge kontinuierlich ineinander übergehen, lassen sich doch ungefähre Grenzen für die einzelnen Farbbereiche festlegen:

Violett	380-420 nm
Blau	421-495 nm
Grün	496-566 nm
Gelb	567-589 nm
Orange	590-627 nm
Rot	628-780 nm

1.1.3 Ultraviolette Strahlung

Langwelliges UV (UV-A1) 340-400 nm

Es ist ein fester Bestandteil natürlicher und künstlicher, ungefilterter Licht- und UV-Quellen. Energieschwächste UV-Strahlung. Aufgrund ihrer chemischen Wirksamkeit kann sie mit dem kurzwelligen, sichtbaren Licht (< 440 nm) zusammengefasst werden.

Langwelliges UV (UV-A2) 320-340 nm

Hierbei handelt es sich um den Übergangsbereich zwischen UV-A und UV-B,

Mittelwelliges UV (UV-B) 280-320 nm

Die Grenzen wurden nach der Erythemwirkungskurve menschlicher Haut entsprechend den grundsätzlichen Untersuchungen von *Karl Eilham Haußer* und *Wilhelm Vahle* definiert (280 nm: niedrigste Empfindlichkeit zwischen 254 und 297 m. 315 nm: 1%), maximale Empfindlichkeit bei 297 nm.

Kurzwelliges UV (UV-C) 200-280 nm

Es handelt sich dabei um den kurzwelligen und somit energiereichsten Teil der UV-Strahlung. Physikalisch erstreckt sich UV-C bis 15 nm und schließt damit unmittelbar an die Röntgenstrahlung an. Die kurzwellige Grenze der UV Strahlung des optischen Bereichs wurde deshalb mit 100 nm festgelegt, um Kollisionen mit dem Strahlenschutzgesetz zu vermeiden. Zwischen 100-200nm absorbieren Sauerstoff und Stickstoff die UV-Strahlung. Daher kann dieser auch als Vakuum-UV bezeichnete Bereich in Luft nicht auftreten.

Auf die Erde trifft UV-C nur in sehr geringen Mengen, da die kurzwellige UV-C-Strahlung größtenteils durch die Ozonschicht gefiltert wird.

Optische Strahlung besteht nur in Ausnahmefällen, z.B. bei Lasern, aus einer einzigen Wellenlänge. Im Normalfall wird dagegen immer ein Gemisch von vielen Wellenlängen mit unterschiedlichen Intensitäten emittiert. Die Darstellung dieser wellenlängenbezogenen Zusammensetzung eines Strahlungsgemisches wird als spektrale Strahlungsverteilung oder Spektrum bezeichnet.

1.2 Photobiologische und photochemische Grundlagen

1.2.1 Physikalische Grundlagen

Elektromagnetische Strahlung kann mit Molekülen auf folgende Weisen interagieren:

1. Transmission, d.h. der Strahlengang wird nicht verändert und folgt den optischen Gesetzen.
2. Reflektion, Reemission, Refraktion, Dispersion, Interferenz, d.h. der Strahlengang wird verändert. Auch hier gelten die optischen Gesetze.
3. Absorption, d.h. es kommt zu einer Schwächung von elektromagnetischer Strahlung. Absorption wird durch die Gesetze der Quanten-Physik beschrieben und bildet das wichtigste Gebiet der Photobiologie und Photochemie.

Hierbei werden die optischen Gesetze außer Kraft gesetzt. (*Kochevar 1995*)

Nach dem Gesetz von *Grotthus* und *Draper*, muss Licht zunächst von Molekülen absorbiert werden, bevor es chemische Vorgänge auslösen kann. Bei der Absorption wird elektromagnetische Energie in chemische Energie umgewandelt, wobei das absorbierende Molekül als Chromophor bezeichnet wird. Das bedeutet, dass Strahlung einer bestimmten Wellenlänge, die nicht absorbiert wird auch nicht zu einer photochemischen Umwandlung des Moleküls führen kann. Andersherum gilt dieses Gesetz jedoch nicht, da Photonen absorbiert werden können ohne photochemische Effekte auszulösen. Die Energie kann dort auch in Fluoreszenz oder in Wärme umgewandelt werden.

Bei der Absorption korreliert der Energieanstieg des angeregten Moleküls mit der Energie des absorbierten Photons (Gesetz von *Stark* und *Einstein*). Molekülstrukturen mit einfacher Bindung absorbieren im unteren, solche mit konjugierten Doppelbindungen im oberen UV-Bereich oder im sichtbaren Licht. Jedes Chromophor absorbiert nur ein einziges Photon. Die Elektronen des Moleküls die sich vorher in einem stabilen Zustand niedrigster Energie befunden haben, werden durch die absorbierte Energie auf ein Orbital mit höherem Energieniveau angehoben. Da die Energiedifferenz zwischen den Orbitalen einen bestimmten Betrag besitzt, der durch die molekulare Struktur vorgegeben ist, kann jede chemische Substanz nur Strahlung bestimmter Wellenlängen absorbieren. Normalerweise stimmt das Aktionsspektrum der Strahlung und das Absorptionsspektrum des Chromophors überein, aber es gibt Fälle, in denen der Photosensibilisator metabolisch oder photochemisch so verändert wird, dass beide Spektren nicht identisch sein müssen. Strahlung einer bestimmten Wellenlänge, die nicht absorbiert wird, kann auch nicht zu einer photochemischen Umwandlung des Moleküls führen. Besitzen die Elektronenpaare der angeregten Moleküle einen anti-parallelen Spin spricht man von einem Singulett-Zustand, bei parallelem Spin von einem Triplett-Zustand. Die Lebensdauer der angeregten Moleküle ist sehr kurz, Singuletts existieren etwa 10^{-7} s und Tripletts weniger als 10^{-3} s. Diese angeregten Moleküle sind instabil und haben das Bestreben, die absorbierte Energie wieder abzugeben, um in den stabilen Grundzustand zurückkehren zu können. Im angeregten Zustand können die Moleküle auf vielfältige Weise reagieren und ihre Energie freisetzen. Es kommt durch chemische Reaktion zur Bildung von sogenannten Photoaddukten, Emission von Licht, Fluoreszenz oder Phosphoreszenz mit nachfolgender Umwandlung in Wärme.

Dies geschieht durch Transfer in andere Moleküle und durch Wechsel vom Singulett zum Triplett („Intersystem Crossing“) oder vom Triplett zum energieärmeren Singulett. Nur beim Sauerstoff ist das Singulett das energiereichere angeregte Molekül. Diese Grundlagen sind wichtig für das Verständnis der Wirkungsweise von Sonnenschutzmitteln.

1.2.2 Biologische Effekte

Inwieweit elektromagnetische Strahlung auf die Haut einwirkt ist abhängig von der Eindringtiefe, der Dauer der Exposition und der interindividuell unterschiedlichen Toleranz gegenüber der Noxe.

Die Eindringtiefe des Lichts ist zu einem an die Wellenlänge und zum anderen an den Einfallswinkel gebunden. So wird kurzwelliges Licht bereits in hohem Maße in den oberen Hautschichten absorbiert. Mit steigender Wellenlänge nimmt die Penetrationstiefe zu und ermöglicht so Schäden an den teilungsfähigen Zellen der Basalzellschicht. Damit erklärt sich teilweise die größere destruktive Kapazität von UVB- gegenüber den kurzwelligeren, nicht in die Epidermis eindringenden UVC-Strahlen bei gleicher Energie.

Ein wichtiger Faktor in der Bewertung der Wirkung von ultravioletter Strahlung (UV-Strahlung) auf die menschliche Haut ist das Ausmaß der Exposition. (*Parrish 1983*)

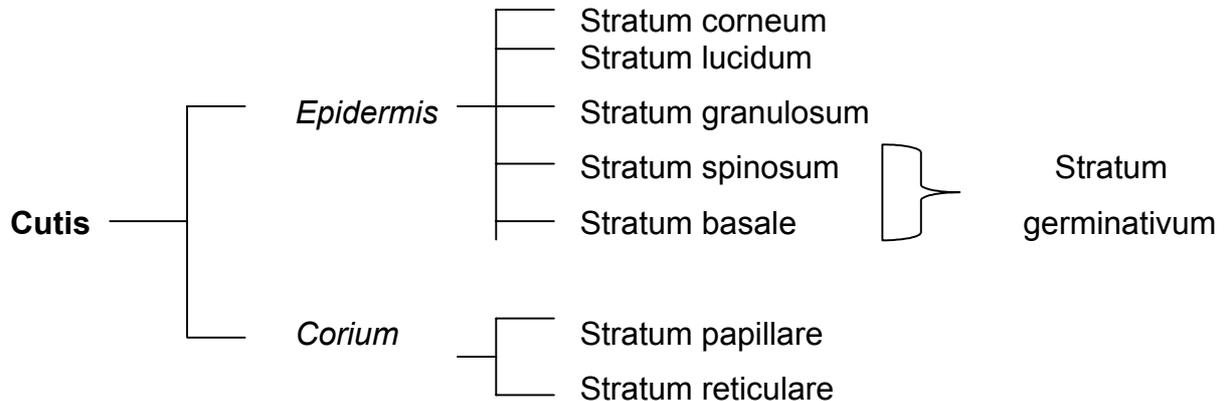
1.2.3 Photobiologische Eigenschaften der Haut

Die Haut baut sich aus der Epidermis und der Dermis auf. An die Dermis schließt in der Tiefe die Subcutis an. Die Epidermis ist ein verhornendes Plattenepithel und wird aus fünf horizontalen Zellagen aufgebaut, von denen jede ihre besonderen morphologischen und funktionellen Charakteristika besitzt.

Zuunterst, der Basallamina aufsitzend, liegt das einlagige Stratum basale. Darüber aufsitzend befindet sich das circa 2-5 Lagen breite Stratum spinosum (Stachelzellschicht). Zwischen dem Stratum corneum und dem Stratum granulosum befindet sich das Stratum lucidum, eine wenige Lagen plattspindelförmiger Zellen umfassende Verschiebeschicht. Darüber liegt das ein- bis dreilagige Stratum

granulosum (Körnerschicht). Das obere Stratum granulosum ist der Schauplatz rapide ablaufender Differenzierungsprozesse. Das Stratum granulosum geht abrupt in das Stratum corneum (Hornschicht) über. Dieses besteht aus 10-20 Zellagen fest kohärenter, plättchenartiger, kernloser hexagonaler Korneozyten.

Unterhalb der Basallamina befindet sich das Corium.



Subcutis lockeres Bindegewebe mit Fibroblasten, Endothelzellen, Kollagen, Fettzellen

Abb. 2: Aufbau der Haut. Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus

Das Stratum corneum wirkt als schützender Filter, ca. 10% der UV-B- und 50% der UV-A-Energie werden dort absorbiert bzw. reflektiert. Hierfür ist vor allen Dingen die Urokaninsäure verantwortlich. In den tieferen Schichten limitieren weitere Substanzen die Eindringtiefe durch Streuung und Absorption. Hierbei ist Melanin der wesentlichste Faktor. Aber auch Nukleinsäuren, Proteine, Lipide und schließlich Blut und Karotinoide spielen eine wichtige Rolle.

UV-B penetriert weniger tief als UV-A: In der Haut von Kaukasiern erreichen etwa 20% der eingestrahnten UV-B-Energie das Stratum spinosum und etwa 10% des obere Corium. Von UVA- und sichtbarem Licht dringen hingegen 30-50% in das obere Corium ein (Anderson 1983).

Nach UV-Bestrahlung der Haut stellen sich Änderungen von Zellmetabolismus, -funktion, -struktur ein, die sich nach einigen Stunden bzw. Tagen in Änderungen von Blutzirkulation (Erythem), Überwärmung, Schmerz, Melaninsynthese (Bräunung) und Zellkinetik (Abschuppung) manifestieren.

Histopathologisch zeigen sich die Veränderungen anhand der Schädigung der epidermalen Keratinozyten, in z. B. den sogenannten „Sonnenbrandzellen“ bei der Dermatitis solaris. Im weiteren werden dermale Ödeme und Rundzellinfiltrate und ein Verlust der immunologischen Mechanismen der Langerhanszellen beobachtet.

Nach repetitiver Bestrahlung kommt es zur Verdickung der Epidermis mittels Akanthose und Hyperkeratose, der sogenannten Lichtschwiele (*Kochevar 1995*).

1.2.4 Bioaktivität von UV-Strahlung

Sonnenlicht hat multiple, lebenswichtige Funktionen. Ein Leben auf der Erde ohne Sonnenlicht ist nicht möglich. Im Laufe der Evolution sind komplexe Mechanismen entstanden, die Sonneneinstrahlungen nutzen, wie zum Beispiel die Photosynthese. Chlorophyllhaltige Pflanzen sind mittels Photosynthese in der Lage, durch Umsetzung von Licht in chemische Energie, aus energieärmeren Verbindungen energetisch hochwertigere Substanzen aufzubauen (z.B. Stärke).

Beim Menschen finden sich biopositive Effekte der Sonnenstrahlung in der Beeinflussung der zirkadianen Rhythmik und des seelischen Wohlbefindens. So treten Depressionen im „UV-armen“ Winter häufiger und stärker auf als im „UV-reichen“ Sommer (Neuroimmunologie).

Große biologische Bedeutung hat die UV-Strahlung in der photochemischen Konversion von 7-Dehydrocholesterin zu Vitamin D₃ in der Epidermis durch UV-B.

Der Einsatz von UV-Strahlung zur Behandlung diverser Hautkrankheiten hat eine lange Geschichte. 1903 erhielt *Niels Finsen* den Nobelpreis für Medizin für seine Untersuchungen zur Lichttherapie von infektiösen Erkrankungen. Er konnte zeigen, dass die UV-Exposition kutaner Läsionen zu einem beschleunigten Heilungsprozess von Hauttuberkulose und Lupus vulgaris führt (*Finsen 1901b*).

Die UV-Phototherapie kann in der modernen Dermatologie weiterhin zur Behandlung verschiedenster Dermatosen genutzt werden. Sowohl die Phototherapie mit definierten Wellenlängen (UVB 311nm, UVA1) als auch die lokale und systemische Photochemotherapie mit Gabe von Psoralenen und nachfolgender UVA-Bestrahlung (Psoralen + UVA = PUVA) eignen sich zur effektiven Behandlung verschiedenster entzündlicher und proliferativer Dermatosen.

Neben biopositiven Effekten besitzt das ultraviolette Licht jedoch auch zahlreiche unerwünschte Wirkungen auf den menschlichen Organismus.

Hierzu zählen die im folgenden näher beschriebenen Effekte:

1.2.5 UV-Erythem

Das Erythema solaris wird auch als Sonnenbrand oder Dermatitis solaris bezeichnet. Hierbei handelt es sich um einen akut auftretenden Schaden nach Sonnenexposition. Die Neigung zu Sonnenbränden ist genetisch determiniert (Phototypen nach Fitzpatrick, s. Tab. 2) und beruht auf Menge und Art des Melanins der Haut. Die UV-Empfindlichkeit ist interindividuell sehr unterschiedlich.

Ursache des UV-Erythems können prinzipiell alle UV-Strahlungen sein. Allerdings sind die einzelnen UV-Bereiche unterschiedlich stark wirksam. Das Erythem-Aktionsspektrum zeigt ein hohes Plateau für UV-C und UV-B, bei ca. 320 nm erfolgt ein steiler Abfall. Erytheme können allerdings auch durch UV-A erzeugt werden, benötigen aber teilweise bis zu 1000 mal höhere Dosen. Das UV-Erythem entsteht wenige Stunden nach Exposition, erreicht nach 12-24 Stunden sein Maximum und klingt nach 48-72 Stunden ab. Höhere Dosen und kurzwelligeres UV führen zu schnellerer Entwicklung der Erythemreaktion, die länger persistiert.

UV-Strahlung schädigt vorwiegend epidermale Chromophore und setzt proinflammatorischen Mediatoren frei: Histamin, Serotonin, Prostaglandine (vorwiegend D2), Interleukin-1 (IL-1) aus Keratinozyten (Chemotaxis, Expression von Adhäsionsmolekülen an Keratinozyten und Gefäßzellen, Amplifikation der Produktion von IL-1 und IL-6). Es resultiert eine entzündliche Reaktion mit Schwerpunkt in Epidermis und oberer (bei UVA auch mittlerer) Dermis (*Hruza 1993; Kochevar 1995*).

Die Zellschädigung zeigt sich durch das massenhafte Auftreten apoptotischer Keratinozyten („sunburn cells“), bei höherer Intensität auch durch eine vakuolisierende Zelldegeneration.

Im Abheilungsstadium finden sich eine epidermale Hyperplasie und Hyperkeratose, die auch als „Lichtschwiele“ bezeichnet wird.

Das UV-A-Erythem ist (anders als das UV-B-Erythem) sauerstoffabhängig, d.h. es tritt bei Ischämie nicht ein und es fehlen "sunburn cells". Dies äußert sich klinisch zum Beispiel an der fehlenden Pigmentierung an Auflagerungsflächen bei Sonnenbankbenutzung (Steißbein, Schulterblätter).

Klinisch zeigt sich das solare Erythem durch hellrote, schmerzhaft, scharf auf den Ort der Lichteinwirkung begrenzte Erytheme, bei stärkerer UV-Einwirkung entsteht eine Blasenbildung, im Extremfall eine Nekrose. Schwere Sonnenbrände sind von systemischen Effekten begleitet (Fieber, Krankheitsgefühl). Im Abheilungsstadium kommt es zu einer Pigmentierung und Abschuppung. Als Residualzustand können Pigmentverschiebungen (Epheliden, Lentigines, Nävuszellnävi) und bei stärkster Exposition sogar Narben beobachtet werden.

1.2.6 DNS-Schädigung

Für die Entstehung von lichtinduzierten Hauttumoren werden Veränderungen der Desoxyribonukleinsäure (DNS) verantwortlich gemacht. Die DNS besteht aus Purinen und Pyrimidinen, die in der Lage sind, Licht der Wellenlänge 230-300 nm zu absorbieren. Dieser Wellenlängenbereich ist somit hauptverantwortlich für auf die DNS einwirkenden elektromagnetischen Effekte.

Bei der UV-Bestrahlung von isolierter und zellulärer DNS konnte gezeigt werden, dass eine große Anzahl von Photoprodukten entsteht. Den größten Anteil bilden die Pyrimidin-Dimere. Im UV-B- und UV-C-Bereich fungiert die DNS selber als Chromophor. Durch die Absorption von UV-Strahlung kommt es zu einem Splicing, d.h. zu einer Entfernung eines Abschnitts aus dem RNS-Strang der DNS-Kette, die einem Intron entspricht. Eine Bestrahlung mit 254 nm führt seltener zu Kettenbrüchen, aber viel häufiger zur Bildung von Pyrimidin-Dimeren. Je größer die Wellenlänge, um so häufiger entstehen Strangbrüche. Bei einer Wellenlänge von 365nm beträgt das Verhältnis von Dimeren zu Kettenbrüchen 1:1.

Im Wellenlängenbereich von 365 bis 500 nm sinkt dieses Verhältnis jedoch wieder. Im UVA-Bereich ist die DNS nicht mehr selber Chromophor. In diesen höheren Wellenlängenbereichen sind intrazelluläre Chromophore, wie Porphyrine, Riboflavine, NADH und andere in der Lage, die Strahlungsenergie zu absorbieren. Durch Energietransfer in die DNS können Kettenbrüche verursacht werden. (*Jung 1995*)

1.2.7 Photoaging

Das Photoaging ist ein deutlich vom natürlichen Alterungsvorgang der Haut unterscheidbarer, wenn auch überlagerter Prozess. Verschiedenste Untersuchungen haben gezeigt, dass extrinsische Faktoren einen großen Anteil an degenerativen

Hautveränderungen haben. Extrinsisches Altern wird hauptsächlich durch UV-Strahlung verursacht und wird deshalb als Photoaging bezeichnet. Histopathologische, immunohistochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass die dermale Akkumulation von elastotischem Material ein wichtiger Faktor des Photoagings ist. Histologisch zeigt sich eine Zunahme von Elastin, das in dicken geknäuelten Fasern und später grobscholligen Massen die gesamte Dermis mit Ausnahme eines schmalen Streifens unterhalb der Basallamina durchzieht. Als Folge ist die Haut schlaff, faltig, grob gefeldert und nimmt durch Einlagerung weicher, hautfarbener bis leicht gelblicher, flacher Vorwölbungen eine pflastersteinartige Struktur an. Gemeinsam mit der rauhen und trockenen Beschaffenheit der Hornschicht entsteht als charakteristisches Merkmal von Hautalterung ein lederartiger Eindruck.

Biochemische und molekulare Studien konnten die Bedeutung der vermehrten Expression von extrazellulären Matrixproteinen nach UVA-Bestrahlung für das Photoaging zeigen (*Berneburg 2004*). Repetitive Bestrahlungen sind verantwortlich für die Entstehung der „common deletion“. Als common deletion bezeichnet man die Induktion einer bekannten „Marker“-Mutation in der mitochondrialen DNA.

1.2.8 Photokarzinogenese

Bereits seit 1920 ist bekannt, dass UV-Strahlung, insbesondere UVB-Strahlung in der Lage ist, Hautmalignome zu induzieren. *M. Kripke* konnte 1976 in Tierversuchen mit Nacktmäusen sehr elegant zeigen, dass kumulative UV-Strahlendosen für die Entstehung von Malignomen verantwortlich sind. UV-induzierte Tumoren beim Menschen sind vor allem spinozelluläre Karzinome und Basalzellkarzinome (NMSC-non melanotic skin cancer). Mit steigender UV-Dosis steigt die Anzahl der undifferenzierten malignen Tumoren gegenüber den gut-differenzierten. Häufig verlieren diese Tumoren ihre histotypischen Marker (Keratin), werden spindelzellförmig und exprimieren Vimentin.

Die Fähigkeit von UV-Strahlung immunmodulatorisch zu wirken, ist für die Entstehung von Hautmalignomen relevant. Es konnte gezeigt werden, dass durch UV-Strahlung zahlreiche immunologische Veränderungen im bestrahlten Individuum verursacht werden. Diese unterstützen das Überleben und Wachstum von UV-induzierten Malignomen und führen wahrscheinlich auch zu einer Selektion von wenig antigenen hochmalignen Tumorformen (*Blum 1959, Daynes 1985*).

Anders jedoch als bei epidermalen Karzinomen, die hauptsächlich mit einer chronischen, kumulativen UV-Dosis vergesellschaftet sind, ist die Rolle der UV-Strahlung bei der Entstehung des malignen Melanoms noch nicht hinreichend geklärt. Hier waren es Tiermodelle, die UV-induzierte immunmodulatorische Veränderungen für die Entstehung von malignen Melanomen, verantwortlich machten (*Ley 1989; Setlow 1989*). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass UV-bestrahlte Mäuse, denen syngene Melanomzellen in die Haut des äußeren Ohres injiziert wurden, signifikant häufiger maligne Melanome entwickelten als Mäuse, die keine Bestrahlung erhielten (*Romerdahl 1988*).

Desweiteren konnten epidemiologischen Studien zeigen, dass mit der intermittierenden Exposition von ungebräunter Haut mit mittleren Dosen von UV-Strahlung, insbesondere bei Kindern, Melanome induziert werden können (*Swerdlow 1978; Teppo 1979; Koh 1990*). Das steht im direkten Kontrast zu den Beobachtungen bei Basalzellkarzinomen und spinözellulären Karzinomen (NMSC), die mit einer kumulativen Dosis assoziiert sind (*DeFabo 1979; DeFabo 1980*).

Neuerliche Untersuchungen haben belegt, dass UV-Bestrahlung durch lokale Effekte in der Haut zu einer Entstehung von Melanomzellnestern führen kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch chronische UV-Exposition die metastatische Aussaat in innere Organe unterstützt wird und den Tod durch eine rasche Disseminierung beschleunigen kann (*Donawho 1994*).

1.2.9 UV-induzierbare Erkrankungen

Beim Menschen ist die Exazerbation von Viruserkrankungen (z.B. Herpes-Infektionen) durch UV-Strahlung hinlänglich bekannt (*Spruance 1985, Mills 1987*). Dieser Prozess wird nicht allein durch die immunsuppressive Wirkung von UVB-Strahlung erklärt, sondern auch durch die Fähigkeit von UV-Licht, latente Viren zu aktivieren. Diese Mechanismen zeigen sich nicht nur beim Herpes simplex. Niedrige Dosen von UV-Strahlung sind in der Lage, die lokale Ausprägung von Herpes zoster-Infektionen zu verstärken. Durch Sonnenlichtexposition kommt es zu einer verstärkten Narbenbildung bei der Infektion durch Windpocken-Viren (*Varizella zoster*) (*Finsen 1901-a*) als Hinweis auf eine verstärkte Erkrankung. Bei der Beobachtung von immunsupprimierten Patienten konnte gezeigt werden, dass an sonnenlichtexponierten Stellen vulgäre Warzen, wie sie durch Papillomaviren hervorgerufen werden, gehäuft auftreten (*Boyle 1984*).

Es konnten weiterhin auch systemische Effekte demonstriert werden: UV- Strahlung, insbesondere UV-B-Licht ist in der Lage, Schübe eines systemischen Lupus erythematoses oder der erythropoetischen Protoporphyrinurie auszulösen.

Lichtdermatosen beruhen auf einer qualitativ abnormen Reaktion gegenüber (meist UV-optischer) Strahlung. Sie entstehen häufig idiopathisch oder durch die Vermittlung von photosensibilisierenden Substanzen. Man unterscheidet zwei grundlegende Mechanismen, die photoallergischen und die phototoxischen.

Die idiopathischen Lichtdermatosen bilden den größten Anteil der Lichtdermatosen. In diesen Formenkreis gehören Erkrankungen, wie z.B. die polymorphe Lichtdermatose, eine häufige, chronisch rezidivierende erworbene Lichtunverträglichkeit. Sie tritt gehäuft saisonal, im Frühjahr oder im Hochsommer an sonnenentwöhnter Haut auf. Im Verlauf kommt es typischerweise durch wiederholte UV-Einwirkung zu einem sog. „Hardening-Effekt“. Auslöser ist meist UVA (80%), UVB ist nur in ca. 8% Auslöser, in ca. 12% ist es eine Kombination aus UVA und UVB. Eine weitere zu diesem Formenkreis zählende Dermatose ist die Lichturtikaria, eine seltene wahrscheinlich IgE-vermittelte Soforttyp-Reaktion.

Phototoxische Reaktionen sind auf bestrahlte Areale limitiert und manifestieren sich bei systemischer Zufuhr häufig als akut toxische Dermatitis. Viele der Photosensibilisatoren stammen aus der Stoffgruppe der Psoralene (Furocumarine) und sind pflanzlicher Herkunft. Bei lokaler Applikation von Pflanzen oder Pflanzenteilen in Kombination mit UV-Licht kann es z.B. zur Auslösung einer Wiesengräserdermatitis kommen.

Die photoallergische Reaktion ist eine klassische T-zellulär vermittelte Reaktion und kann mittels Photopatchtest nachgewiesen werden. Es handelt sich um eine Sonderform der Ekzemreaktion. Etwa 1-2% der allergischen Spättypreaktionen gehören zu dieser Form. Dabei wird die Hapten-Trägerproteinbindung nur unter Energieaufnahme, in diesem Fall UV-A-Licht, eingegangen. Auch bei dieser Form unterscheidet man die systemische Form (hämatogene Photoallergie) von einer Lokalreaktion (Photokontaktallergie).

1.2.10 Immunmodulation/Immunsuppression

Jeder höherentwickelte Organismus benötigt ein intaktes Immunsystem um einwirkende Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Viren oder Parasiten zu erkennen, abzuwehren und um Zellen, die eine maligne Transformation erfahren

haben, zu eliminieren. Die Haut ist die erste Barriere zur Abwehr von mikrobiellen Organismen. Lange Zeit wurde angenommen, dass es sich dabei nur um eine passive Barriere handelt. In den letzten Jahrzehnten konnte jedoch gezeigt werden, dass im Knochenmark gereifte, in der Haut vorkommende dendritische Leukozyten in der Lage sind, aktiv Immunantworten in der Haut zu induzieren und zu regulieren (*Stingl 1993*). Die Kombination aus immunmodulatorisch wirksamen residenten (Keratinocyten, Mastzellen und Endothelzellen) und passagieren Zellen (T-Lymphocyten, die zwischen Haut und regionalen Lymphknoten zirkulieren, mit diesen Leukozyten wird als SALT (skin-associated lymphoid tissues) und SIS (skin immune system) bezeichnet (*Streilein 1983; Bos 1987*).

Eine große Bedeutung haben in diesem Zusammenhang antigenpräsentierende Zellen. Dazu gehören Langerhans Zellen, dendritische und residente Zellen. Sie sind für die sehr komplexe Immunantwort der Haut verantwortlich.

Die Haut besitzt sämtliche zellulären und molekularen Elemente, die für die Induktion, Regulierung und Expression von Immunantworten verantwortlich sind. Es scheint, dass intrakutane Applikation von Antigenen zu einer Veränderung in verschiedenen Zellsystemen der Haut führt. Antigenpräsentierende Zellen (LC, DDC) binden das Antigen, verarbeiten es und exprimieren es in Form eines Peptid/MHC-Komplexes. Andere Zelllinien, wie Keratinocyten, Mastzellen und Endothelzellen und Fibroblasten reagieren auf diese Antigenpräsentation mit Veränderungen in ihrer Synthese von löslichen Mediatoren, die wiederum in der Lage sind, den Phänotyp und die Funktion von antigenpräsentierenden Zellen zu ändern. Nachfolgend verlassen die antigenbeladenen Zellen ihre epidermalen und/oder dermalen Standorte und migrieren über das dermale lymphatische System in die parakortikalen Regionen der drainierenden Lymphknoten. Dort präsentieren sie als lymphoide dendritische Zellen das Antigen an die T-Zellen der Umgebung. Um ihre Funktion zu erfüllen (z.B. Einleitung und Durchführung eines Effektormechanismus gegen pathogene Noxen), müssen die T-Zellklone zurück in die Haut migrieren. Im Idealfall reichern sie sich dann in Arealen mit Antigenvorkommen an. Nach Erreichen der Haut und Erhalt eines erneuten Stimulus durch antigenpräsentierende Zellen und aufgrund des costimulierenden Signalen von weiteren Zellen von (z.B.: Keratinocyten exprimiertes IL-7) unterlaufen die T-Zellen eine klonale Expansion, die in einer Ausbildung von protektiv wirksamen Effektormechanismen gegen das Pathogen resultiert. Alternativ können die sensibilisierten T-Zellen auch das Antigen auf der

Oberfläche von nicht-professionellen antigenpräsentierenden Zellen (z.B. MHC Klasse II-tragende Keratinozyten) abladen (*Stingl 1995*).

Dieses komplexe System kann durch UV-Strahlung moduliert oder gestört werden. In vitro- als auch in vivo-Untersuchungen an Tieren und Menschen haben gezeigt , dass durch ultraviolette Strahlung, vor allem durch UVB-Strahlung, das Immunsystem (der Haut) supprimiert werden kann. Die UV-Strahlung greift hierbei an mehreren Ebenen der Immunantwort an (*DeFabo 1980;Kripke 1976*).

Zunächst werden die Langerhans-Zellen morphologisch und funktionell beeinträchtigt. Ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation wird vorübergehend ausgeschaltet. Ferner wird die Stimulierbarkeit von Lymphozyten gegen Antigene herabgesetzt. Hinweisgebend waren Versuche, die zeigten, dass nach UV-Bestrahlung keine Sensibilisierungen mit einem Kontaktallergen ausgelöst werden können. Statt dessen wird eine Toleranzreaktion induziert, die durch antigenspezifische T-Suppressorzellen mediiert wird (*Elmets 1983; Applegate 1989*) . Die Auswirkungen von UV sind nicht auf den Ort der Einstrahlung beschränkt, sondern treffen den Gesamtorganismus. Aus den Keratinozyten werden zahlreiche Zytokine freigesetzt, von denen zumindest manche in die Blutbahn gelangen (IL-6, IL-1) und Allgemeinsymptome auslösen können (z.B. Fieber). Nach UV-Bestrahlungen kommt es auch zum Abfall der Zahl zirkulierender T-Zellen, wobei die Anzahl von B-Zellen unverändert bleibt. Solche Veränderungen sind bei einmaliger UV-Exposition vorübergehend. Über die Auswirkung chronischer Exposition kann noch nicht endgültig geurteilt werden. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bisher bekannten akuten und chronischen Folgen von UVB-Bestrahlung.

Akute Folgen	Chronische Folgen
Sonnenbrand	Immunsupression
Überlastung der Repairmechanismen DNS-Schäden (Mutationen)	Chronischer Lichtschaden: - Trockenheit - Juckreiz - Fältchen

	<ul style="list-style-type: none"> - Pigmentflecken - Karzinome der Haut Elastose durch UVA
--	--

Tab. 1: Akute und chronische Folgen der UVB-Wirkung auf die menschliche Haut aus: Raab, W.: Kinder und Sonnenschutz, S.43-48, Pharmazie Nr. 5, 1994

1.3 Schutzmechanismen gegen bionegative Wirkung von Sonnenlicht

1.3.1 Natürliche Photoprotektion

- Reparaturmechanismen

DNS-Sequenzen werden über die Generationen unverändert weitergegeben. Unter normalen Umständen sind Spontanmutationen äußerst selten und treten mit einer Frequenz von eins zu 10^9 Basenpaar-Replikationen auf. Um diese niedrige Mutationsrate zu erreichen, müssen Reparaturmechanismen vorhanden sein, die es einer Zelle ermöglichen, DNS-Schäden zu eliminieren.

Die Exzisionsreparatur bildet hierbei den wichtigsten Mechanismus zur Reparatur UV-bedingter Dimer-Photoprodukte der DNS. Da diese Reparaturmechanismen ohne weitere UV-Strahlung von statten geht, wird sie auch als Dunkel-Reparatur bezeichnet. Hierbei werden UV-induzierte Pyrimidin-Dimere in einem komplexen Vorgang durch neu synthetisierte intakte Nukleotide ersetzt. Als Vorlage dient hierbei der unbeschadete komplementäre DNS-Strang. Es konnte gezeigt werden, dass Domänen, die für vitale Funktionen kodieren, bevorzugt repariert werden (Bohr, 1986, Keyse 1987).

- Postreplikationsreparatur

In bakteriellen Zellen konnte nachgewiesen werden, dass während der DNS-Replikation die DNS-Nucleotidyltransferase Lücken gegenüber Dimeren hinterlässt. Die beschädigte Region wird repliziert und anschließend bringt ein DNS-Rekombinationsmechanismus eine neue Konfiguration von Strängen hervor. Diese führt zu einer Gegenüberstellung des Dimer-beinhaltenden Stranges mit einer DNA-Region, die die richtige Information zum Austausch beinhaltet. Diese Konfiguration kann nun mittels eines exzisionsähnlichen Mechanismus repariert werden. Die lückenhafte DNA kann so einer kompletten, fehlerfreien DNA gegenübergestellt

werden, die anschließend durch Polymerisation und Schluss der Stranglücke mittels Ligase, eingebaut wird (*Hincks 1989*). Die Exzisionsreparatur repräsentiert einen höchst komplexen Prozess, der auch als „Dunkel-Reparatur“ bezeichnet wird.

Beim Menschen scheint dieser Mechanismus für die Reparatur von nicht-ionisierender Strahlung die wichtigste Rolle zu spielen.

- Pigmentierung

Die Pigmentierung der Haut ist genetisch determiniert und weist große individuelle, familiäre und ethnische Unterschiede auf. Die unterschiedliche Hautfarbe ist durch quantitative und qualitative Unterschiede der Melanogenese bedingt. Das in der Epidermis vorhandene Melanin schützt vor UV-Strahlung durch Absorption, Reflexion und Streuung. Melanin wirkt aber auch als Radikalfänger photoprotektiv. Nach Fitzpatrick unterscheidet man abhängig von der Sonnenlichtempfindlichkeit und Hautbräunung 6 Hauttypen (I-VI). s Tab. 2.

Hauttyp	Hautfarbe ^a	Haare	Augen	Reaktion auf Sonnenbestrahlung ^b	
				Sonnenbrand	Bräunung
I	sehr hell	rötlich bis rötlichblond	blau, grün	immer	nie
II	hell	blond bis hellbraun	blau, grau, braun	immer	wenig
III	hellbraun	dunkelblond bis braun	braun	Selten	mäßig
IV	hellbraun bis mittelbraun	Dunkelbraun bis schwarz	braun	nie	gut
V	dunkelbraun	schwarz	braun	nie	sehr gut
VI	schwarz	Schwarz	braun	nie	sehr gut

Tab 2.: Klassifikation der Hauttypen. (Nach *Fitzpatrick*)

^a Farbe der nicht vorgebräunten Haut (z.B.: Gesäß)

^b Reaktion auf 45-60 min Sonnenexposition der nicht vorgebräunten Haut nach dem Winter

Hauttyp I-IV: Kaukasier, Hauttyp V: Orientalen, Hauttyp VI: Schwarze.

Sonnenempfindliche Individuen (Hauttyp I, II) sind sehr gefährdet in Hinblick auf die Entwicklung chronischer Lichtschäden, während weniger sonnenempfindliche Individuen (Hauttyp III, IV) ein geringeres Risiko aufweisen. Individuen mit dunkler Hautfarbe (Hauttyp V,VI) sind nahezu nicht lichtgefährdet bzw. haben ein sehr geringes Hautkrebsrisiko (*Fitzpatrick 1988*).

Die Pigmentierung stellt weiterhin eine Adaptationsreaktion nach UV-Exposition dar. Das Aktionsspektrum entspricht weitgehend dem der Erythemreaktion. Die Pigmentierung ist nicht an ein vorhergehendes Erythem, jedoch an die genetisch determinierte Pigmentierfähigkeit gebunden.

Die sogenannte „Sofortbräunung“ („immediate pigment darkening“) entsteht während der Exposition oder kurz danach und verschwindet innerhalb von Stunden. Sie ist nicht sehr intensiv, beruht auf einer chemischen Konformationsänderung des Melanins oder Umverteilung von Melanosomen. Sie ist durch Lichtqualitäten aller Art auslösbar und besitzt kaum photoprotektive Wirkung.

Die „verzögerte“ UV-Bräunung repräsentiert die eigentliche (kosmetisch begehrte) Sonnenbräunung. Sie setzt erst ca. 72 Stunden nach der UV-Exposition ein und beruht auf einer Steigerung der Pigmentproduktion. Es kommt zu einer Stimulation der Tyrosinaseaktivität und der Reifung von Melanosomen. Bei wiederholter UV-B, weniger bei UV-A-Exposition kommt es zusätzlich zur Proliferation der Melanozyten, verstärkter Dendritenbildung und vermehrtem Melanintransfer in die Keratinozyten (*Routaboul 1999*).

Allerdings gibt es bei der persistierenden Bräunung große Unterschiede, die auf die verschiedenen Melanintypen zurückzuführen sind. Das braunschwarze Eumelanin der Haut ist ein sehr potenter Lichtfilter (Absorption über alle Regionen des UV- und sichtbaren Lichts), das rötliche Phäomelanin hingegen ein schlechter. Dementsprechend kommt das Eumelanin bevorzugt bei dunklen Hauttypen vor, während sehr helle Hauttypen hauptsächlich Phäomelanin produzieren (*Zanetti 2001*).

- Keratinbildung/Lichtschwiele

Die Keratinbildung der Epidermis führt zur Bildung einer kompakten Hornschicht unterschiedlicher Dicke (15-50 µm), die von der einfallenden UV-Strahlung schützt. Die Proteine Histidin, Tyrosin und Tryptophan schwächen die UV-Strahlung durch Absorption, Reflexion und Streuung ab. Nach übermäßiger UV-Bestrahlung kommt es

zur Hyperkeratose der Epidermis, die nach *Miescher* als sogenannte Lichtschwiele der Haut bezeichnet wird (*Miescher 1930*). Diese schützt die Haut vor der schädigenden Wirkung nachfolgender UV-Exposition (*Gange 1985, Nonaka 1984*).

- Selektive Akkumulation

Die selektive Akkumulation radikalfangender lipophiler Vitamine, insbesondere der sogenannten Karotinoide, im subkutanen Fettgewebe und die Diffusion dieser Pigmente in die Dermis und Epidermis führen zur Stabilisierung von Zellmembranen. Antioxidantien wie Vitamin E (α -Tocopherol) und verwandte Verbindungen, Vitamin C (L-Ascorbinsäure) und das Tripeptid Glutathion tragen wesentlich zum Oxidationsschutz ungesättigter Lipide bei.

- Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase

Die Enzyme Superoxiddismutase (SOD) und Glutathionperoxidase dienen der selektiven Inaktivierung der durch UV-Strahlung produzierten freien Radikale und schützen vor UV-Schäden an Lipoproteinen der Zellmembran, die durch Lipidperoxidation entstehen.

Superoxiddismutase schützt auch Keratin, Elastin und Kollagen vor freien Radikalen.

1.3.2 Topische (Exogene) Lichtschutzmittel

- Chemische UV-Filter

Die Wirksamkeit von chemischen UV-Filtern beruht auf der Absorption von UV-Strahlung im Bereich konjugierter Doppelbindungen. Die strahlungsbedingte Anregung führt den UV-Filter aus dem energetischen Grundzustand in den angeregten Zustand. Bei der Rückumwandlung in den Grundzustand wird die aufgenommene Energie in Form von Wärme und Fluoreszenzstrahlung abgegeben. Photochemische Reaktionen nach der UV-Exposition können zu molekularen Veränderungen und Verlust der UV-absorbierenden Fähigkeit des UV-Filters führen (Photoinstabilität) (*Pathak 1982*). Besonders UVA-Filter können eine Photoinstabilität aufweisen. Neu entwickelte UV-Filter wie z.B. Mexoryl SX zeichnen sich durch hohe Photostabilität aus, d.h. ihre Wirksamkeit bleibt auch nach stundenlanger UV-Bestrahlung erhalten.

- Physikalische Lichtfilter

Physikalische UV-Filter sind mineralische Pigmente, die Licht durch Reflexion und Streuung abschwächen. Bei Wellenlängen über 400 nm überwiegen reflektierende und streuende Effekte, bei Wellenlängen unter 400 nm weisen Pigmente auch UV-absorbierende Eigenschaften auf. Man unterscheidet die sog. Mikropigmente (Partikelgröße < 100 nm) von den Makropigmenten (Partikelgröße > 100nm).

- *Makropigmente*

Die Makropigmente Titandioxid, Zinkoxid, Eisenoxide, Kalziumkarbonat, Mika, Kaolin und Talkum werden seit jeher in medizinisch wirksamen Präparaten und Kosmetika verwendet. Das Deckvermögen eines Pigmentpulvers in Suspension ist abhängig von dem Verhältnis der Brechungsindex des Pigments, des umgebenden Mediums, der Teilchengröße, dem Ausmaß der Lichtabsorption und den Wellenlängen des einfallenden Lichtes. Bei hohen Konzentrationen von Pigmenten (z.B. 20% Zinkoxid oder 20% Titandioxid mit je 1% Eisenoxid) (Lichtschutzpasten, Sunblocker) ist ein Totalschutz erzielbar. UV-Strahlung, sichtbares und infrarotes Licht werden relativ gleichmäßig abgedeckt. Sunblocker sind bei großflächiger Anwendung schwer verteilbar und aufgrund ihrer Eigenfarbe („Clownmaske“) kosmetisch störend.

- *Mikropigmente (ultrafeine Pigmente)*

Durch spezielle technische Verfahren ist es möglich, Titandioxid bzw. Zinkdioxid auf Teilchengrößen von 1-100 nm zu verkleinern. Durch Verringerung der Teilchengröße in den Nanometerbereich wird das Reflexions- und Streuvermögen im sichtbaren Bereich aufgehoben bzw. verschiebt sich in den UV-Bereich. Durch die Verwendung von Mikropigmenten in Lichtschutzfiltern wird der kosmetisch störende „Weißeffekt“ von Makropigmenten in Suspension vermieden. Ultrafeines Titandioxid schützt vor allem in Kombination mit chemischen UV-A und UV-B-Filtern. Im sichtbaren und infraroten Bereich bieten beide Mikropigmente aufgrund ihrer geringen Teilchengröße jedoch keinen Schutz. Vor allem in Kombinationspräparaten fanden Mikropigmente bislang ihre Anwendung. Neuerdings kann man jedoch auch Lichtschutzformulierungen erhalten, die ohne den Zusatz von UV-Filtern schützen. Eine optimal aufgearbeitete 5%ige Titandioxidsuspension kann einen Lichtschutzfaktor (LSF) von ungefähr 15 erreichen, ohne dabei einen störenden Weißeffekt zu erzeugen.

- *Biosynthetisches Melanin*

Biosynthetisch hergestelltes Melanin (Biomelanin) weist wie natürliches Melanin UV-reflektierende, -streuende und –reflektierende Qualitäten auf. Zusätzlich wirkt Biomelanin als Radikalfänger. Als alleiniger Lichtschutzfilter erreicht Biomelanin eine LSF im UV-A und UV-B-Bereich von etwa 1,5 bis 3. Da das Biomelanin eine bräunlich-graue Eigenfarbe besitzt, ist die kosmetische Akzeptanz gering.

- *Selbstbräunungsmittel*

Durch eine Reaktion mit Proteinen des Keratins in der Haut führen Selbstbräunungsmittel („quick tanning lotions“) zu einer anhaltenden Verfärbung der Haut, die circa 5-7 Tage anhält. Sie enthalten Extrakte aus Walnußschalen, Henna, Glycerolaldehyd, Hydroxymethylglyoxal oder Dihydroxyaceton (DHA). DHA führt durch selektive Oxidation von Histidin und Tryptophan zu einer orange-braunen Verfärbung der Hornschicht, die erst nach einigen Stunden abgeschlossen ist. Die durch DHA hervorgerufene Hautverfärbung schützt im langwelligen UV-A- mit einem maximalem UV-A-LSF zwischen 3 und 5. Es schützt allerdings nicht vor UV-B-Strahlung.

- *Bräunungsbeschleuniger*

Bräunungsbeschleuniger enthalten Melaninvorstufen wie Acetyltyrosin zur Steigerung der Melaninsynthese. Aufgrund einer möglichen karzinogenen Wirkung (erhöhtes Melanomrisiko?) sind sie nicht mehr im Vertrieb. Sie bieten keinen wirksamen UV-Schutz.

- *Antioxidantien*

Sie werden neben Konservierungsmitteln als Hilfsstoffe in Lichtschutzprodukten angewandt. Insbesondere Gallate, p-tert.-Butylphenol-, Vitamin-C- und Vitamin-E-Derivate verhindern die Oxidation von Lichtschutzformulierungen und schützen sie vor mikrobieller Besiedlung. Durch die wiederholte Anwendung von Vitamin-C- und – E-haltigen Präparaten in kurzen Abständen (ca. 30 min) ist ein solares Erythem mäßig beeinflussbar (Wolf 2003).

- *Ectoin*

Ectoin, eine Tetrahydropyrimidincarbonsäure, gehört zu den so genannten kompatiblen Soluten. Unter diesem Begriff wird eine Gruppe chemisch unterschiedlicher Stoffe verstanden, die natürlicherweise bei Bakterien zu finden sind. Ectoine sind amphoterische wasserbindende Substanzen, die Bakterien bei hohen Außentemperaturen und niedriger Luftfeuchtigkeit vor Wasserverlust und Hitze schützen. Sie stabilisieren Proteine, Nukleinsäuren und Membranen. Diese Eigenschaften führten in jüngster Zeit zur Testung von Ectoin als Hautschutzstoff. In ersten In-vitro-Untersuchungen konnten für die Substanz schützende Effekte gegen UV-Strahlung demonstriert werden. So ist die UVB-induzierte Abnahme von Langerhanszellen bei Applikation von Ectoin vor Bestrahlung deutlich niedriger. Des Weiteren ist die Zahl der "sunburn cells" in vitro unter Anwendung von Ectoin deutlich abgesenkt. Darüber hinaus führt Ectoin zu einer schnelleren Bildung von Hitze-Schockproteinen. Auch konnte in vivo ein hydratisierender Effekt gezeigt werden (*Bünger 2000*).

- *DNS-Reparaturenzyme*

Die topische Applikation von DNS-Reparaturenzymen stellt ein innovatives Konzept der Photoprotektion dar, das man als aktiven Lichtschutz bezeichnen kann. Vertreter dieser Substanzgruppe sind die Photolyase, die T4N5-Endonuklease oder auch die Optitelomerase.

Die DNS-Reparaturenzyme werden von UV-resistenten Mikroben wie den Bakteriophagen T4, *Micrococcus luteus* oder *Anacystis nidulans* produziert. In Liposomen verkapselt, sind diese gentechnisch rekombinant hergestellten DNS-Reparaturenzyme in der Lage, in die Haut zu penetrieren und die Reparatur von UV-induzierten Photoprodukten (Zyklobutanpyrimidindimere) an den Schwachstellen der körpereigenen DNS-Reparatur zu unterstützen. Photolyase bindet an die DNA und löst bei Aktivierung durch elektromagnetische Strahlung im Spektralbereich zwischen 300 und 500 Nanometer die Dimere teilweise wieder auf. In einer entsprechenden Untersuchung konnte unter Applikation von Photolyase eine Verminderung der Thymidindimere von 40 bis 45 Prozent gezeigt werden (*Stege 2000*). In neueren Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass bei regelmäßiger Anwendung von DNS-reparaturenzymhaltigen Sonnenschutzformulierungen, mit liposomal verpackter T4-Endonuklease V (T4N5 Liposomen), bei Patienten mit erhöhtem Hautkrebsrisiko, wie z.B. Xeroderma pigmentosum, das Neuauftreten von aktinischen Keratosen und

Basalzellkarzinomen signifikant reduziert ist (*Krutmann 2001; Yarosh 2001*). Inwiefern ein solches Präparat zur Verbesserung von UV-induzierten Langzeitschäden ohne Vorhandensein der bei Xeroderma pigmentosum auftretenden Enzymdefekte von Nutzen ist, kann derzeit noch nicht endgültig beurteilt werden. Aber auch andere Substanzen, wie IL-12 oder Polyphenol in grünem Tee scheinen eine photoprotektive Wirkung zu entfalten. Insbesondere IL-12 ist in der Lage die Apoptose UV-geschädigter Zellen zu verhindern und DNA-Schäden zu reparieren.

1.3.3 Systemische Lichtschutzstoffe

- α -Melanotropin

Nach täglicher, zehnmaliger subkutaner Gabe von α -Melanotropin konnte eine wochenlang anhaltende Bräunung der Haut hervorgerufen werden. Die Frage einer Photoprotektivität und die Risiko-Nutzen-Berechnung stehen allerdings noch aus.

- β -Karotin

Das β -Karotin, Provitamin A, welches in vielen Pflanzen vorkommt, schützt als Radikalfänger vor freien Radikalen, die durch UV-Exposition in der Haut entstehen. Es absorbiert Licht der Wellenlänge zwischen 360 und 500 nm, wobei das Absorptionsmaximum zwischen 450 bis 475 nm liegt. Als Nebenwirkung kommt es zu einer orange-gelblichen Verfärbung der Haut, die besonders im Bereich der Handinnenflächen und der Fußsohlen imponiert. Durch eine langfristige orale Gabe von β -Karotin ist es möglich, die Lichtempfindlichkeit bei Patienten mit erythropoetischer Protoporphyrinurie und erythropoetischer Porphyrie (M. Günther) zu vermindern. β -Karotin schützt nicht gegen die Sonnenbrandreaktion bei gesunden Individuen. Seine Wirksamkeit in der Hautkrebsprävention ist umstritten (*Mc Naughton 2005*).

- Cystein

Die schwefelhaltige Aminosäure Cystein kann ähnlich wie β -Karotin die subjektive und objektive Lichtempfindlichkeit von Patienten mit erythropoetischer Protoporphyrinurie vermindern.

1.3.4 Textilien

Abhängig von Material, Webart, und Farbe weisen Textilien große photoprotektive Unterschiede auf. Naturprodukte wie Wolle und Baumwolle bieten in der Regel einen schlechteren Schutz gegen UV-B- und UV-A-Strahlung als synthetische Materialien wie Polyester, Nylon oder Dracon. Textilien dunkler Farbe und engmaschiger Webart sind photoprotektiv besser wirksam als Materialien weitmaschiger Webart und heller Farbe. In den Vereinigten Staaten und in Australien sind Textilien mit Angabe des sog. Textil-LSF erhältlich. Dieser ist in der Regel deutlich höher als derjenige von topischen Lichtschutzmitteln, weist jedoch eine enorme Streubreite auf (Textil-LSF von 2-1000) (*Robson 1990, Menzies 1991; Morales 1992, Stanford 1995*).

1.3.5 Karenz

Der wirksamste Schutz gegen UV-bedingte Schäden ist die Meidung übermäßiger UV-Bestrahlung. Dabei ist zu bedenken, dass auch die indirekte Sonneneinstrahlung, wie sie zum Beispiel durch Streuung und Reflexion entsteht, zu einer UV-Belastung, beispielsweise beim Aufenthalt im Schatten, führen kann. Insbesondere die Erkenntnis, dass UV-Schäden bereits bei einer UV-Belastung mit 60% der MED entstehen, sollte zu einem vernünftigen Umgang mit UV-Strahlung führen.

1.4 UVB-Lichtschutzfaktor (UVB-LSF)

Der LSF wurde entwickelt, um die Bestimmung der Wirksamkeit von Sonnenschutzmitteln zu vereinheitlichen. Zur Zeit wird die Güte eines Sonnenschutzmittels durch den UVB-LSF oder kurz LSF angegeben. In Deutschland befinden sich nur Produkte auf dem Markt, die entweder nach der COLIPA-Methode (Comité de Liaison des Associations Européennes de L'Industrie de la Parfumerie, des Produits Cosmetiques et de Toilette-Methode) oder nach der DIN 76501 getestet werden.

Dies erfolgt nach Ermittlung der individuellen MED (minimale Erythemdosis). Als MED bezeichnet man eine unter gleichbleibenden Ablesungsverhältnissen (gleichbleibende Strahlungsquelle, gleicher Bestrahlungswinkel, gleiche Beurteiler) eben erkennbare, deutlich begrenzte entzündliche Hautreaktion (Erythem mit oder ohne Ödem). Sie ist bei konstanter Bestrahlungsstärke abhängig von der Bestrahlungszeit. Die Bestrahlungszeit für die Erythemschwelle wird für die ungeschützte und geschützte Haut bestimmt (*COLIPA 1994*).

Der LSF ist ein Maß für die Wirksamkeit eines Sonnenschutzmittels. Der Faktor zeigt an um wie viel länger sich der Anwender bei gleicher Bestrahlungsstärke und gleicher Hautreaktion der Strahlung aussetzen kann als ohne das Schutzmittel.

Dieser Lichtschutzfaktor wird mittels folgender Formel ermittelt:

$$\text{LSF} = \frac{\text{MED mit Lichtschutzmittel}}{\text{MED ohne Lichtschutzmittel}}$$

Der LSF gilt nur für Sonnenschutzmittel, die auf der Haut eine Anpassung auf absorptivem Wege an die vorhandene Sonnenstrahlung und an die individuelle Strahlenempfindlichkeit ermöglichen.

Folgende Tabelle (Tab.3) gibt an, welche Voraussetzungen zur Bestimmung des LSF nach den jeweiligen Normen erfüllt sein müssen.

Die Höhe des LSF stellt nur die maximale Verlängerung der möglichen Expositionszeit unter standardisierten Bedingungen im Vergleich zur ungeschützten Haut dar.

Bei der Anwendung von Sonnenschutzmitteln ergibt sich zusätzlich die Problematik, dass bei einer durchschnittlichen Körperoberfläche von 1,8 m² mindestens 36 g einer Sonnenschutzformulierung zur Erfüllung der COLIPA-Norm (2 mg/cm²) erforderlich sind. Dies ist in der praktischen täglichen Anwendung nicht durchführbar.

Die folgende Tabelle gibt an, in welchem prozentualen Maße ein Lichtschutzmittel das einstrahlende UV-Licht, bezogen auf die Normen der COLIPA-Norm, absorbiert.

Parameter	DIN 67501 (Entwurf 1995/96)	COLIPA
Zahl der Probanden	10-20	10-20
Hauttypen	I, II, III, IV	I, II, III und Hauttypen mit kolorimetrischen ITA°-Werten > 28
Bestrahlungsfläche	$\geq 35 \text{ cm}^2$	$\geq 30 \text{ cm}^2$
Bestrahlungsort	Rücken	Rücken
Auftragsmenge	2,0 +/- 0,1 mg/cm ²	2,0 +/- 0,4 mg/cm ²
Einwirkzeit vor Bestrahlung	15 +/- 5 min	15 +/- 5 min
Spektrum des Sonnensimulators	Sonnenstrahlenähnliches Kontinuum von 290-400 nm	Sonnenstrahlenähnliches Kontinuum von 290-400 nm
Filter		WG 320/1 mm + UG11/1 mm
MED-Schwellenbestrahlungsdauer	$\geq 15 \text{ s}$	20-180 s
Dosisprogression		25% geometrisch
MED-Ablesung nach Bestrahlung	20 +/- 4h	20 +/- 4h
Bestimmung des UVB-LSF	MED mit UV-Filter/ MED ohne UV-Filter	MED mit UV-Filter/ MED ohne UV-Filter (arithm. Mittel)

Tab. 3: Normen zur Bestimmung des UVB-Lichtschutzfaktors

Aus: COLIPA (1994) Sun protection factor test method

LSF	Absorption %
4	75
6	83,3
8	87,5
10	90
12	91,7
15	93,3
20	95
25	96
30	96,7
40	97,5
60	98,3

Tab. 4.: Lichtschutzfaktor und UV-Absorption
 Aus: COLIPA (1994) Sun protection factor test method

Aus Tab. 4 ergibt sich, dass ab einem LSF von 15-20 eine prozentuale Steigerung der Effektivität eines Lichtschutzmittels nur noch in geringem Maße möglich ist.

1.5 UVB-strahleninduzierte Expression von ICAM-1 in menschlichen Zellen

In den letzten Jahren konnten große Fortschritte in der Aufklärung der Zusammenhänge zwischen UVB-Strahlung und Immunmodulation erbracht werden. Demnach sind epidermale Keratinozyten und Langerhans Zellen die wichtigsten Ziele der UVB-strahleninduzierten Immunmodulation. Man postuliert, dass UVB-Exposition die Fähigkeit von epidermalen Zellen direkt mit Leukozyten zu interagieren durch eine Veränderung der Expression von Oberflächenrezeptoren, insbesondere Adhäsionsmolekülen, beeinflusst. Die detailliertesten Untersuchungen liegen zur Bindung des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1, CD54) an das Integrin Lymphozyten Funktion assoziiertes Antigen (LFA-1, CD11a/CD18) vor. Diese konnte als ein wichtiger Pfad in der Interaktion zwischen epidermalen humanen Keratinozyten und Langerhanszellen mit Leukozyten identifiziert werden (*Dustin 1988; Krutmann 1992*) .

Erste zielführende Untersuchungen zur Expression von ICAM-1 auf Keratinozytenoberflächen konnten von *Dustin et al* in vitro durchgeführt werden .

Dustin et al konnten zeigen, dass durch Stimulation von Langzeit-kultivierten Keratinozyten mit rekombinanten humanen (rh) Interferon (IFN) γ , diese in der Lage waren, an aktivierte T-Lymphozyten zu binden. IFN- γ -induzierte Keratinozyten-/T-Zell Adhäsion war mit einem signifikanten Anstieg der Expression von ICAM-1 auf Keratinozytenoberflächen vergesellschaftet. Durch Zugabe von anti-ICAM-1-Antikörpern zu den Keratinozyten oder anti-LFA-1Antikörpern zu den T-Zellen konnte die Interaktion zwischen den beiden Zelltypen effektiv blockiert werden. Diese Beobachtungen wiesen auf eine wichtige Rolle von ICAM-1/LFA-1 in intraepidermalen Adhäsions-Prozessen hin und führte zu ausführlichen Studien zur Aufdeckung der Regulationsmechanismen, die die Expression von ICAM-1 auf Keratinozyten determinieren.

Es stellte sich heraus, dass es sich bei ICAM-1 um ein 85-110 kd transmembranes Glykoprotein handelt, welches eine weite Verbreitung im Gewebe aufweist. ICAM-1 konnte mittels Gen-Mapping auf Chromosom 19 lokalisiert werden und wird durch eine 3.3kb große mRNA kodiert. Das Molekül besteht aus fünf tandemartig gekoppelten Domänen von denen jede Einzelne die Kriterien für die Immunglobulin-Superfamilie erfüllt (*Staunton 1988; Hogg 1991*). Eine Funktion von ICAM-1 ist es, eine Antigen-unabhängige Adhäsion zwischen Lymphozyten und deren Zielobjekten zu erlauben. Mithilfe des Integrins LFA-1 auf der Oberfläche von Leukozyten interagiert ICAM-1 auf der korrespondierenden Zelle noch vor einer Antigen-abhängigen Aktivierung der interzellulären Signalwege. Mehrere *in vitro* Experimente konnten nachweisen, dass die Interaktion zwischen LFA-1 und ICAM-1 nicht nur für die Zell-Adhäsion und Migration benötigt wird, sondern auch eine Rolle bei weiteren Leukozytenfunktionen wie Antigen-Präsentation, Lymphozyten-Aktivierung, Killer-T-Zell-vermittelte Zielobjekt-Lyse und Immunglobulin-Produktion durch T-Zell-unabhängige humorale Immunantwort spielt. Die Bindung von auf Keratinozytenoberflächen exprimierten ICAM-1 Molekülen mit LFA-1 Molekülen auf der Oberfläche von T-Zellen führt zu einer co-stimulierenden Wirkung, die sich in einer superantigen-induzierten T-Zellaktivierung äußert (*Springer 1990*). Zusätzlich muss davon ausgegangen werden, dass die ICAM-1-Expression eine wichtige Rolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung eines intraepidermalen Infiltrates spielt, indem es die molekulare Matrix bildet, in der LFA-1 exprimierende Leukozyten in inflammatorischen Prozessen binden. Immunhistochemische Studien konnten zeigen, dass bei entzündlichen Hauterkrankungen wie atopischem Ekzem, Psoriasis oder

allergischem Kontaktekzem, Keratinozyten sehr stark ICAM-1 auf ihrer Oberfläche exprimieren und eine Co-Kolonisierung mit intraepidermalen Leukozyten und ICAM-1-positiven Keratinozyten besteht. Im Gegensatz dazu findet sich in normaler humaner Haut keine signifikante ICAM-1-Expression auf Keratinozyten (Lisby 1989; Singer 1989).

Weitere Untersuchungen konnten nachweisen, dass ICAM-1 durch eine Anzahl verschiedener inflammatorischer Zytokine beeinflusst werden kann (Dustin 1986; Krutmann 1994; Luger 1990). Dies unterscheidet ICAM-1 von seinem Liganden LFA-1, der in den meisten Zelltypen konstitutionell exprimiert wird. Daraus konnte geschlossen werden, dass eine ICAM-1/LFA-1-medierte Adhäsion hauptsächlich durch die Expression von ICAM-1 kontrolliert wird. Langzeit-kultivierte, normale humane Keratinozyten (HNK) exprimieren konstitutionell kein ICAM-1. Die Expression von ICAM-1 kann jedoch sehr schnell *in vitro* durch die Zugabe von rh IFN- γ , in deutlich geringerem Maße durch die Zugabe von rh TNF α oder rh TNF β stimuliert werden (Dustin 1988; Krutmann 1990). Diese *in vitro* Ergebnisse konnten durch Untersuchungen *in vivo* gestützt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die intradermale Injektion von rh IFN- γ in humane Haut sowohl mit einer Induktion von ICAM-1-Expression auf Keratinozyten einherging als auch zu einer Annäherung von LFA-1-positiven mononukleären Zellen an ICAM-1-positive Zellen führt. Eine gesteigerte ICAM-1-Expression auf Keratinozytenoberflächen kann bereits 12 h nach Stimulation mit Zytokinen beobachtet werden und hat ihren Höhepunkt nach ca. 16-24 h. Die Veränderungen in der ICAM-1 Oberflächenexprimierung gingen hierbei immer mit einer assoziierten und korrespondierenden Veränderung der Ausgangsspiegel der ICAM-1-spezifischen mRNA einher. Dies gibt Hinweis darauf, dass die Aufregulation von ICAM-1 mRNA für die ICAM-1 Expression erforderlich ist und auf der Ebene der Gen-Transkription kontrolliert wird (Yohn 1990). Obwohl es eine Vielzahl von Informationen zu den verschiedenen Möglichkeiten der Aufregulierung von ICAM-1- Expression auf Keratinozytenoberflächen gibt, war lange Zeit wenig bekannt über die Regulationsmechanismen mit denen ICAM-1-Expression unterdrückt werden kann.

1.5.1. UVB-Effekte auf die humane ICAM-1-Expression

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass UVB-Strahlung einen Effekt auf die ICAM-1-Expression auf humanen Keratinozytenoberflächen hat. Es stellte

sich heraus, dass diese modulatorischen Effekte biphasisch wirken und dass kurz nach UVB-Strahlung die ICAM-1-Expression zunächst supprimiert wird, wohingegen es nach einiger Zeit zu einer Aufregulation der ICAM-1 Expression kommt.

1.5.2 *in-vitro*-Testungen

In-vitro-Studien konnten belegen, dass steigende Dosen von UV-B-Strahlung (0-100 J/m²) in transformierten (KB Zellen) oder normalen humanen Keratinozyten (HNK) dosisabhängig, die Zytokin-(IFN- γ , TNF α)-induzierte ICAM-1-Expression inhibiert. Hierzu wurden die in der Photoimmunologie weit verbreiteten FS20 sun lamps eingesetzt. Sie emittieren innerhalb des UVB-Bereiches, geben jedoch auch geringe Mengen an UVA-Strahlung ab. Durch den Einsatz geeigneter Filter konnte nachgewiesen werden, dass die Effekte auf die Zytokin-gesteuerte ICAM-1-Expression selektiv durch UVB-Strahlung induziert werden konnte (<315 nm) (*H. Christoph, J. Krutmann, unpublizierte Beobachtung*). Die UVB-induzierte Inhibition der Zytokin-medierten ICAM1-Expression konnte nur dann beobachtet werden, wenn die Zellen vor der Zytokin-Stimulation mit UVB bestrahlt wurden. Die eingesetzten UVB-Dosen zeigten keinen Einfluss auf die Überlebensdauer der Keratinozyten, führten jedoch in vorausgehenden Untersuchungen zu einer Produktion von Zytokinen, Prostaglandinen und Neuropeptiden (*Grewe 1993; Trefzer 1993*). In gleichzeitig publizierten Studien konnten *Khan et al.* zeigen, dass UVB-Bestrahlung nicht die konstitutive Expression von MHC Klasse II Molekülen in IFN- γ stimulierten transformierten Keratinozyten beeinflusst, diese jedoch dann komplett supprimiert werden, wenn die Zellen vor der Zytokin-Behandlung bestrahlt werden (*Khan 1993*). Ferner kann als gesichert angesehen werden, dass die UVB-induzierte Inhibition der Zytokin-gesteuerten ICAM-1 Aufregulation in humanen Keratinozyten durch Veränderungen auf Prätranslations-Ebene wirkt. Hinweisgebend dafür sind Studien zur Wirkung von UVB auf ICAM-1 mRNA-Spiegel. Es konnte nachgewiesen werden, dass die UVB-Exposition humaner transformierter Keratinozyten dosisabhängig die IFN- γ - oder TNF- α -induzierte Aufregulation von ICAM-1 mRNA inhibiert. Hierbei reichte eine Dosis von 100J/m², um die IFN- γ -induzierte Expression von ICAM-1 wieder auf den Ausgangswert zurückzuführen (*Krutmann 1992*). Zudem gibt es Studien, die auf einen posttranskriptionellen Weg der UVB-induzierten Herunterregulierung von monozytärem ICAM-1 und Keratinozyten-ICAM-1 deuten.

Sie geben Hinweise darauf, dass die Expression von ICAM-1 in verschiedenen Zellen auf verschiedenen Mechanismen beruhen kann (*Krutmann 1991*).

In vitro konnte an Zellen von Xeroderma pigmentosum-Patienten nachgewiesen werden, dass die UV-B-induzierte Inhibition der IFN- γ -bedingten ICAM-1-Expression von der Bildung von Photoaddukten abhängig ist, die nicht von Xeroderma pigmentosum-Patienten repariert werden können. Daraus wurde gefolgert, dass die Wiederherstellung der IFN- γ -Empfindlichkeit in normalen humanen Zellen durch die Entfernung von DNS-Photoprodukten mittels des Nucleotid-Exzisions-Reparaturmechanismus erfolgt (*Lambert 1990*). Ferner konnte demonstriert werden, dass UV-B-Strahlung nicht nur die Zytokin-abhängige ICAM-1 Expression in humanen Keratinozyten supprimiert, sondern eine ICAM-1 Expression auch induzieren kann (*Norris 1990*). 48 Stunden nach Bestrahlung zeigt sich eine signifikante Aufregulation der konstitutiven ICAM-1 Protein- und mRNA-Expression in Keratinozyten. Die UVB-Dosen der Induktion von konstitutiver im Vergleich zur Hemmung der IFN- γ -induzierten ICAM-1- Expression sind indentisch. Dies heißt, dass eine einmalige UVB-Dosis in der Lage ist sowohl antiinflammatorische als auch proinflammatorische Effekte auf Keratinozyten ICAM-1 Expression zu haben .

Es wurde ein Zwei-Phasen-Modell der UVB-induzierten Aufregulation von ICAM-1 in humanen Keratinozyten postuliert :

Im ersten Schritt induziert UVB-Strahlung die Produktion von IL-1 α , welches auf einem autokrinen Weg zu einer gesteigerten Expression von IL-1RI (TYP 1 IL-1 Rezeptor) Expression auf der Oberfläche von bestrahlten Keratinozyten führt. Die Zellen, die eine erhöhte Sensitivität gegenüber IL-1 α zeigen, reagieren dann in einem zweiten Schritt auf endogen produziertes IL-1 α durch Aufregulation von ICAM-1-mRNA und –Oberflächenexpression (*Trefzer 1995*). Man muss davon ausgehen, dass die autokrin induzierte ICAM-1 Expression, abhängig von der UV-Wellenlänge, unterschiedlichen Zytokinen unterliegt (*Christoph 1993*).

1.5.2 *in-vivo*-Testungen

Mittels immunhistochemischer Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die durch UV-B-Strahlen induzierte Hemmung einer Zytokin-induzierten ICAM-1 Aufregulation auch *in vivo* reproduzierbar ist (*Barker 1989*).

Injektion von rh IFN- γ intrakutan in menschliche Haut führt zu einer Aufregulierung der ICAM-1 Expression auf Keratinozytenoberflächen. Bei Vorbestrahlung mit 1 MED UV-B konnte die IFN- γ -induzierte ICAM-1 Expression in Keratinozyten fast vollständig gehemmt werden (Stege 1995, Stege 2000).

1.6 Testsystem

Als *in vivo* Testsystem schien die Hemmung einer zuvor induzierten Aufregulation geeigneter zu sein. Die oben erwähnten immunhistochemischen Testungen zeichnen sich durch eine hohe inter- und intraindividuelle Reproduzierbarkeit der UVB-induzierten Hemmung der IFN- γ -induzierten ICAM-1 Expression aus. Im Gegensatz dazu ist die UVB-induzierte Aufregulation der konstitutiven ICAM-1 Expression durch große interindividuelle Variabilität charakterisiert. Durch Untersuchungen war bekannt, dass die ICAM-1 Expression durch intrakutane Injektion von rh IFN- γ (30.000 IE) stimuliert wird. Diese IFN- γ induzierte Aufregulation der ICAM-1 Expression kann durch vorherige Bestrahlung des zu stimulierenden Hautareals mit einer MED UVB völlig gehemmt werden.

Somit können genaue biologische Endpunkte definiert werden und Aussagen zu UVB-induzierter Immunsuppression anhand der ICAM-1 Expression getroffen werden.

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Fragestellung dieser Arbeit

- 1) Läßt sich die UVB-induzierte Hemmung der zytokinabhängigen ICAM-1 Expression als Testsystem *in vivo* etablieren ?
- 2) Kann dieses Testsystem zur Überprüfung der immunprotektiven Wirkung eines Sonnenschutzmittels *in vivo* herangezogen werden?
- 3) Entspricht die MED (Minimale Erythemdosis) eines Sonnenschutzmittels seinem IPF (Immunprotektivitätsfaktor)?

1.6.1 Bestimmung der MED

Die individuell unterschiedliche MED (minimale Erythemdosis) wurde mittels etablierter photodermatologischer Testverfahren (Lichttreppe nach Wucherpfennig) ermittelt.

1.6.2. Übertragung des Testsystems *in vivo*

Initial wurde überprüft, ob sich die MED unter den gewählten Versuchsbedingungen (intrakutane IFN- γ -Injektion) von der MED ohne IFN- γ -Behandlung unterscheidet. Nach Abschluß der erwähnten Voruntersuchung und dem Ausschluß eines Unterschieds zwischen IFN- γ -behandelter und IFN- γ -unbehandelter Haut wurde zur tatsächlichen Untersuchung der UVB-abhängigen Hemmung einer Zytokin-induzierten Aufregulation der ICAM-1 Expression der nachfolgend tabellarisch (Tab. 5) und graphisch (Abb.3) dargestellte Versuchsaufbau gewählt.

Hierbei wurden 4 Versuchsanordnungen unterschieden (A-D) und unter festgelegten Bedingungen die ICAM-1-Expression mit und ohne nachfolgender s.c. IFN- γ -Applikation untersucht. Der Nachweis erfolgt mittels immunhistochemischen Nachweises von ICAM-1.

Nach Durchführung der Testungen konnten die in der Literatur vorhandenen *in vitro* Ergebnisse auch *in vivo* in immunhistochemischen Färbungen bestätigt werden. Die ICAM-1 Expression *in vivo* entsprach der Expression *in vitro* (s. Tab. 6).

Versuchsanordnung A	Versuchsanordnung B	Versuchsanordnung C	Versuchsanordnung D
normale Haut	normale Haut	normale Haut	normale Haut
-	UVB	-	UVB
-		IFN- γ	IFN- γ

Tab. 5: Versuchsaufbau

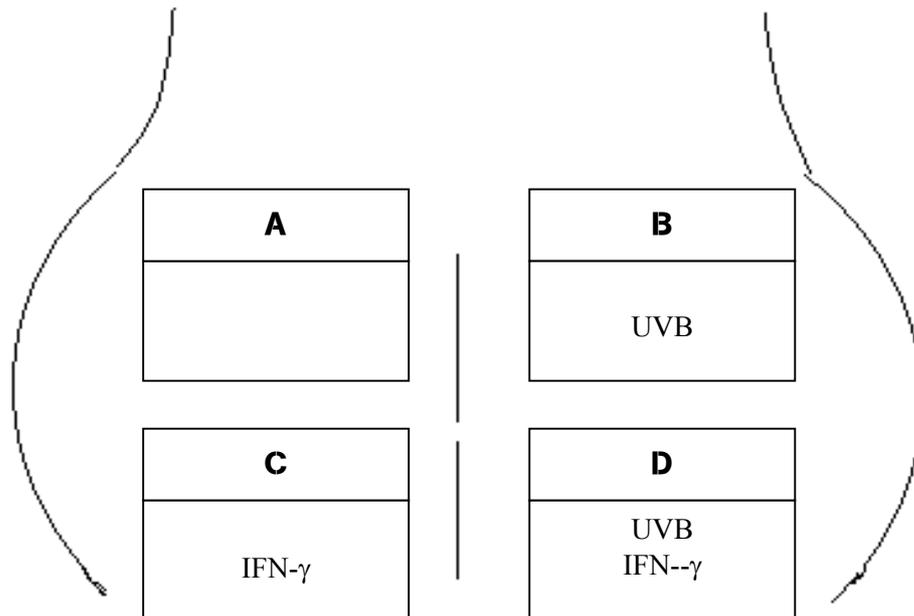
A: normale Haut

B: normale Haut nach UVB-Bestrahlung

C: normale Haut nach s.c. IFN- γ -Injektion

D: normale Haut nach UVB-Bestrahlung und anschließender s.c. IFN- γ -Injektion

Abb. 3: Gesäß, schematisch – Versuchsanordnung



Versuchsanordnung	Zellart	ICAM-Darstellung
A	Endothelzellen	positiv
	Keratinocyten	negativ
B	Endothelzellen	positiv
	Keratinocyten	negativ
C	Endothelzellen	positiv
	Keratinocyten	positiv
D	Endothelzellen	positiv
	Keratinocyten	negativ

Tab 6: Immunhistochemische Darstellung der Zellen unter Versuchsbedingungen

A: normale Haut

B: normale Haut nach UVB-Bestrahlung

C: normale Haut nach s.c. IFN-γ-Injektion

D: normale Haut nach UVB-Bestrahlung und anschließender s.c. IFN-γ-Injektion

1.6.3. Ausbau des Testsystems zum Nachweis einer Immunmodulation

Diese Vorversuche legten nahe, dass die UVB-induzierte Inhibition der IFN- γ -induzierten ICAM-1 Aufregulation als biologischer Endpunkt für den Nachweis einer Immunsuppression dienen kann. Eine Aufhebung dieses Effekts durch Applikation eines Sonnenschutzmittels, weist hiernach auf deren immunprotektiven Effekt hin. Wird bei steigender MED die Hemmung wieder sichtbar, kann man von einem Erlöschen der immunprotektiven Wirkung ausgehen.

Vor diesem Hintergrund sollte ein *in vivo* Testsystem etabliert werden, das immunhistochemisch eine Veränderung der UVB-induzierten Immunmodulation nachweisen kann. Es wurde folgende schematisch dargestellte Versuchsanordnung gewählt (Tab.7 und Abb.4), um eventuell vorhandene schützende Effekte von applizierten UV-Filtern nachzuweisen. Das Read-out-System bestand in dem Nachweis einer ICAM-1 Expression auf Keratinozyten.

Kontrollareal A	Kontrollareal B	Testareal C	Testareal D
IFN- γ	IFN- γ	IFN- γ	IFN- γ
	1 MED UVB	n MED UVB	n+x MED UVB
		UV-Filter	UV-Filter

Tab. 7: Etablierung des Testsystems. Bestimmung der Immunprotektion

A: IFN- γ (s.c.)

B: Bestrahlung mit 1 MED anschließend s.c. Injektion von IFN- γ

C: Applikation eines UV-Filters, nachfolgende Bestrahlung mit n MED, anschließend s. c. Injektion von IFN- γ

D: Applikation eines UV-Filters, nachfolgende Bestrahlung mit n+x MED, anschließend s. c. Injektion von IFN- γ

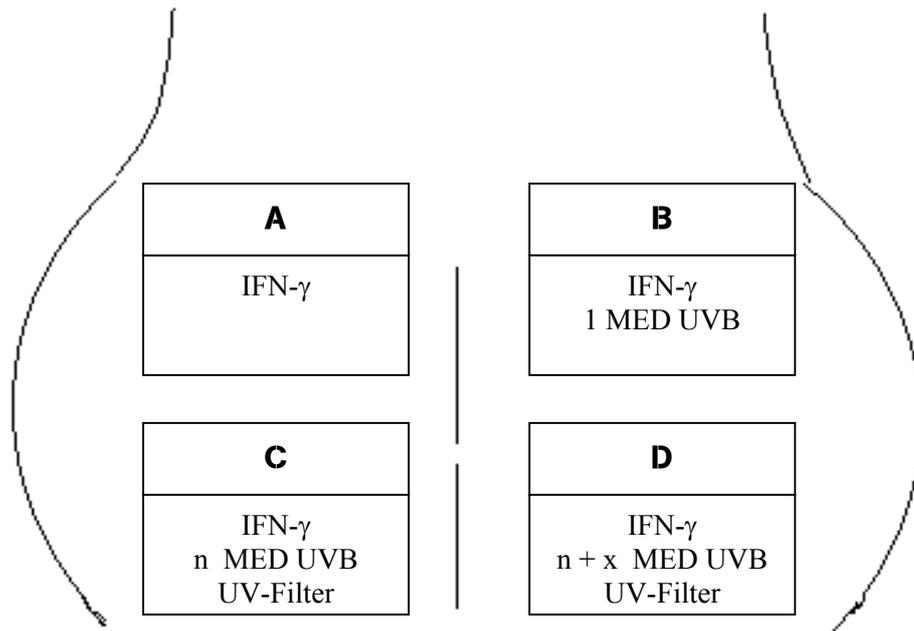


Abb 4.: Gesäß, schematisch – Versuchsanordnung –Bestimmung Immunprotektion

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Probanden

20 hautgesunde Probanden wurden in die Untersuchung eingeschlossen. Ein- und Ausschluss wurden anhand von klinischen und anamnestischen Kriterien getroffen. In der Anamnese wurde neben der allgemeinen Krankheitsgeschichte gezielt nach Hauterkrankungen und pathologischen Reaktionen auf UV-Bestrahlungen gefragt. Bei der anschließenden körperlichen Untersuchung wurde die Farbe der Augen und der Haare, sowie das Hautkolorit bestimmt und danach der Hauttyp nach Fitzpatrick bestimmt. Das gesamte Integument wurde auf Hautveränderungen hin untersucht.

Als Ausschlusskriterien wurden Angaben zu pathologischen Reaktionen auf UV-Exposition, krankhafte Hautveränderungen, sowie ein Hauttyp nach Fitzpatrick >3 festgelegt. Nach diesem Auswahlverfahren wurden 13 Probanden mit dem Hauttyp 1-2 und sieben Personen mit dem Hauttyp 3 als Versuchspersonen ausgewählt.

Die Probanden willigten nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch schriftlich ein, im Rahmen einer experimentellen Studie an *in-vivo* Experimenten teilzunehmen. Die Versuchspersonen wurden auf mögliche Risiken und Nebenwirkungen und Komplikationen, die im Rahmen der UV-Exposition, der UV-Schutzmittel- und IFN- γ -Applikation sowie der Biopsieentnahmen auftreten könnten, hingewiesen.

Die Untersuchungen erfolgten nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität und dem Abschluss einer Probandenversicherung.

2.1.2 UV-Filtersubstanzen

Die untersuchten UV-Filtersubstanzen wurden von der Firma Beiersdorf zur Verfügung gestellt. Bei den getesteten Sonnenschutzmitteln handelte es sich um eine 5%ige Ocymethoxycinnamate-Präparation (Parsol MCX) und um eine 2-%ige Octyl-Triamzone-Präparation (Uvinul T150). Da sich die Versuchsbedingungen des *in-vivo* Experimentes sowohl von der COLIPA-Norm, als auch von den *in-vitro* Lichtschutzfaktor(LSF)-Bestimmungen der Firma Beiersdorf unterscheiden, wurde eine erneute Bestimmung des Lichtschutzfaktors erforderlich.

2.1.3 IFN- γ

Zur Stimulation der Keratinozyten wurde Interferon- γ 1b (Imukin® Injektionslösung, 2 Mio. IE, Fa. Boehringer Ingelheim Pharma KG, Binger Str. 173, 55216 Ingelheim) eingesetzt. Die intrakutanen Injektionen erfolgten in einer Dosis von 30.000IE rh IFN- γ . Als Nebenwirkungen werden neben lokalen Reaktionen, selten systemische Beschwerden in Form von grippeähnlichen Symptomen beobachtet. Über die Möglichkeit des Auftretens dieser Nebenwirkungen waren die Patienten aufgeklärt und hatten die Möglichkeit, diese durch Einnahme von Paracetamol 1000mg per os zu behandeln.

2.1.4 Strahlenquelle

Als UVB-Strahlenquelle dienten FS20 Sunlamps der Firma Westinghouse, Pittsburgh, Pennsylvania, USA in einem Bestrahlungsgerät der Firma Waldmann(Villingen Schwenningen, Germany).

2.1.5. Immunhistochemische Reagenzien

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden folgende Reagentien verwendet:

- DAB-Substratkit Fa. Coulter-Immunotech Diagnostics (Europapark Fichtenhain B13, 47807 Krefeld) incl.:

 - Protein Blocking Reagenz (PBS)
 - Chromogen DAB (braune Färbung) (5 ml Aqua dest. + 5 Tropfen Tris-Pufferkonzentrat + 5 Tropfen DAS + 2 Tropfen 3%iges H₂O₂) dieses wurde aufgrund seiner Toxizität gegen AEC Chromogen ausgetauscht
 - AEC Chromogen DAB
 - Tris-Pufferkonzentrat
(Tris-Puffer: Tris-Pufferkonzentrat pH 7,6 100ml ad 1000ml NaCl 0,9%ig)
 - 3% H₂O₂
 - Bovines Serum Albumin (BSA) zur Antikörper-Verdünnung
(0,25 µg BSA ad 25 ml 0,01 mol PBS (25ml PBS x 10 + 25 ml H₂O)

- monoklonler Antikörper CD54 (ICAM-1), Fa. Immunotech GmbH (130, Av. Jean de Lattre de Tassigny, B.P. 177-13276 Marceille Cedex 9)
- ICAM-1-Isotyp Kontrolle, Fa. Immunotech GmbH (130, Av. Jean de Lattre de Tassigny, B.P. 177-13276 Marceille Cedex 9)

- Universelles Streptavidin-Peroxidase Nachweissystem (rote Färbung) Fa. Immunotech GmbH (130, Av. Jean de Lattre de Tassigny, B.P. 177-13276 Marceille Cedex 9)
- Destilliertes Wasser
- Deckgläser
- Objektträger
- Hämatoxylin der Firma Immunotech GmbH (130, Av. Jean de Lattre de Tassigny, B.P. 177-13276 Marceille Cedex 9)
- Eindeckmaterial auf Harzbasis der Firma Immunotech GmbH (130, Av. Jean de Lattre de Tassigny, B.P. 177-13276 Marceille Cedex 9)
- Feuchte Kammer
- Schnittapparat

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung der MED

In Anlehnung an die in vitro Experimente von Budnik et al (1992) wurden als UV-Strahlenquelle FS-20 Sunlamps genutzt. Als minimale Erythemdosis (MED) bezeichnet man eine unter gleichbleibenden Testverhältnissen (gleichbleibende Strahlungsquelle, gleicher Bestrahlungswinkel, gleiche Beurteiler) eben erkennbare, deutlich begrenzte entzündliche Hautreaktion (Erythem mit oder ohne Ödem). Sie ist bei konstanter Bestrahlungsstärke abhängig von der Bestrahlungszeit. Die Bestrahlungszeit für die Erythemschwelle wird für die ungeschützte Haut bestimmt. Die Bestimmung der minimalen Erythemdosis (MED) der einzelnen Probanden wurde mit der auch in der Routinediagnostik gebräuchlichen Lichttreppe nach Wucherpfennig durchgeführt. Hierzu wurde das Gesäß und der Rücken mit den FS20 Sunlamps bestrahlt.

Die Strahlenquelle wurde in einem Abstand von 30 cm aufgebaut. Ausgehend von der in der Routinediagnostik praktizierten Verfahren wurde eine Lichttreppe mit sechs unterschiedlichen Strahlendosen durchgeführt. Das zu bestrahlende, quadratische Areal war jeweils 36 cm² groß. Die Strahlendosen lagen in einem Bereich von 25-150 mJ/cm². Die Strahlendosis wurde pro Hautareal um 25 mJ/cm² gesteigert. Die Ablesung erfolgte 24 Stunden nach der Bestrahlung. Als MED wurde die kleinste Dosis festgesetzt, bei welcher es im bestrahlten Hautareal zur Ausbildung eines Erythems kam.

2.2.2 Bestimmung des LSF

Nach Testung der individuellen MED erfolgte die Bestimmung der erythemprotektiven Wirkung der UV-Filtersubstanzen: Hierzu wurde die jeweilige Testsubstanz auf je sechs 36 cm² große Testareale im Bereich des Rückens appliziert.

Pro Feld wurden 72 mg (entspr. 2 mg/cm²) des Sonnenschutzmittels gleichmäßig aufgetragen. Nach einer Einwirkzeit von 15 min gemäß der COLIPA-Norm wurden die Areale aus einer Entfernung von 30 cm (FS 20 sunlamps, Fa. Westinghouse) bestrahlt.

2.2.3 Versuchsanordnung

Nach Bestimmung der individuellen MED und der für die Sonnenschutzmittel spezifischen Sonnenschutzfaktoren, erfolgte die Bestimmung der immunprotektiven Wirkung der einzelnen UV-Filter unter Verwendung der identischen Strahlungsquelle.

Im folgenden werden die Begriffe Testareal, d.h. Hautfelder mit Testsubstanz und Kontrollareal, d.h. Hautfelder ohne Testsubstanz, unterschieden.

Auf den markierten Testarealen von ca. 12 cm² wurde die Testsubstanz entsprechend den Bedingungen der COLIPA-Norm appliziert. Das erste Kontrollareal diente dem Positiv-Nachweis für die IFN- γ induzierte ICAM-1 Aufregulation. Das zweite Kontrollareal diente dem Positiv-Nachweis der Hemmung der IFN- γ induzierten ICAM-1 Aufregulation durch vorhergehende UVB-Bestrahlung mit 1 MED UVB.

Das Kontrollareal A wird nicht bestrahlt. Das Kontrollareal B wird mit 1 MED bestrahlt. Die Testareale werden einer n-fachen Dosis der MED (n x MED) ausgesetzt (s. Tab.8).

Kontrollareal A	Kontrollareal B	Testareal C	Testareal D	Testareal E usw.
IFN- γ 30.000IE	IFN- γ 30.000IE	IFN- γ 30.000IE	IFN- γ 30.000IE	IFN- γ 30.000IE
	1 MED UVB	n MED	n+x MED	N+x MED
		Parsol/Uvinul	Parsol/Uvinul	Parsol/Uvinul

Tab. 8: Versuchsanordnung

A: Kontrollareal: IFN- γ (s.c.)

B: Bestrahlung mit 1 MED anschließend s.c. Injektion von IFN- γ

C: Applikation eines UV-Filters, nachfolgende Bestrahlung mit n MED, anschließend

s. c. Injektion von IFN- γ

D-E: Applikation eines UV-Filters, nachfolgende Bestrahlung mit $n+x$ MED, anschließend s. c. Injektion von IFN- γ

2.2.4 Biopsien

Aus Kontroll- und Testarealen wurden 24 Stunden nach UVB-Bestrahlung unter Lokalanästhesie mit einer Maximalmenge von 2ml Xylonest® 1% 8mm Durchmesser große Stanzbiopsien entnommen. Die Exzisionen wurden mittels Einzelknopfnähten mit Hautfaden (Nylon 4/0) vernäht. Die Biopsien wurden sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.5 Immunhistochemie

Es wurden Kryostatschnitte mit einer Dicke von 6-8 μm angefertigt und diese immunhistochemisch bzgl. der ICAM-1 Expression auf der Keratinozytenoberfläche analysiert. Zum Nachweis des Zytokins ICAM-1 wurde das DAB-Substratkit der Firma Coulter-Immunotech Diagnostics genutzt. Das DAB-Substratkit ist für den Nachweis von zellulären Antigenen geeignet, wenn Meerettich-Peroxidase konjugiert an (Stept-)Avidin oder Antikörper als Nachweisenzym verwendet wird. In Verbindung mit H_2O_2 wird das Substrat DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) durch Peroxidase zu einem Nitrofarbstoff oxidiert, der unlöslich ist und am Ort der Enzymaktivität ein Präzipitat bildet. Dieses Präzipitat ist im Lichtmikroskop als mit AEC-Chromogen als rote Färbung sichtbar und markiert spezifisch die Lokalisation des Antigens. Die Reaktion benötigt einen bestimmten pH-Wert, der durch den Trispuffer (Pufferkonzentrat im DAB-Substratkit) gewährleistet wird.

Jeweils ca. 4 Kryostatschnitte auf einem Objektträger wurden zwei Minuten lang in Tris-Puffer gewaschen. Ab diesem Arbeitsschritt erfolgt die Aufbewahrung der Schnitte in einer feuchten Kammer, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern. Die überschüssige Feuchtigkeit wird abgetupft und das Protein-blocking Reagenz (PBS) aufgetragen nach zehn Minuten wird das PBA abgeschüttelt und der Primär-Antikörper (anti-ICAM-1) aufgetragen. Das anti-ICAM-1 verbleibt nun für 60 Minuten bei 20°C auf den Schnitten. Die Antikörper werden abgeschüttelt und die Objektträger jeweils dreimal für zwei Minuten in frischem Tris-Puffer gewaschen. Die überschüssige Feuchtigkeit wird abgetupft und der Sekundärantikörper aufgetragen. Dieser verbleibt für dreißig Minuten auf den Präparaten. Die Objektträger werden

erneut dreimal für zwei Minuten in Tris-Puffer gewaschen. Nun wird die Streptavidin-Peroxidase für 45 Minuten auf die Präparate verteilt. Nach Ablauf der Einwirkzeit werden die Präparate erneut für dreimal zwei Minuten in Tris-Puffer gewaschen.

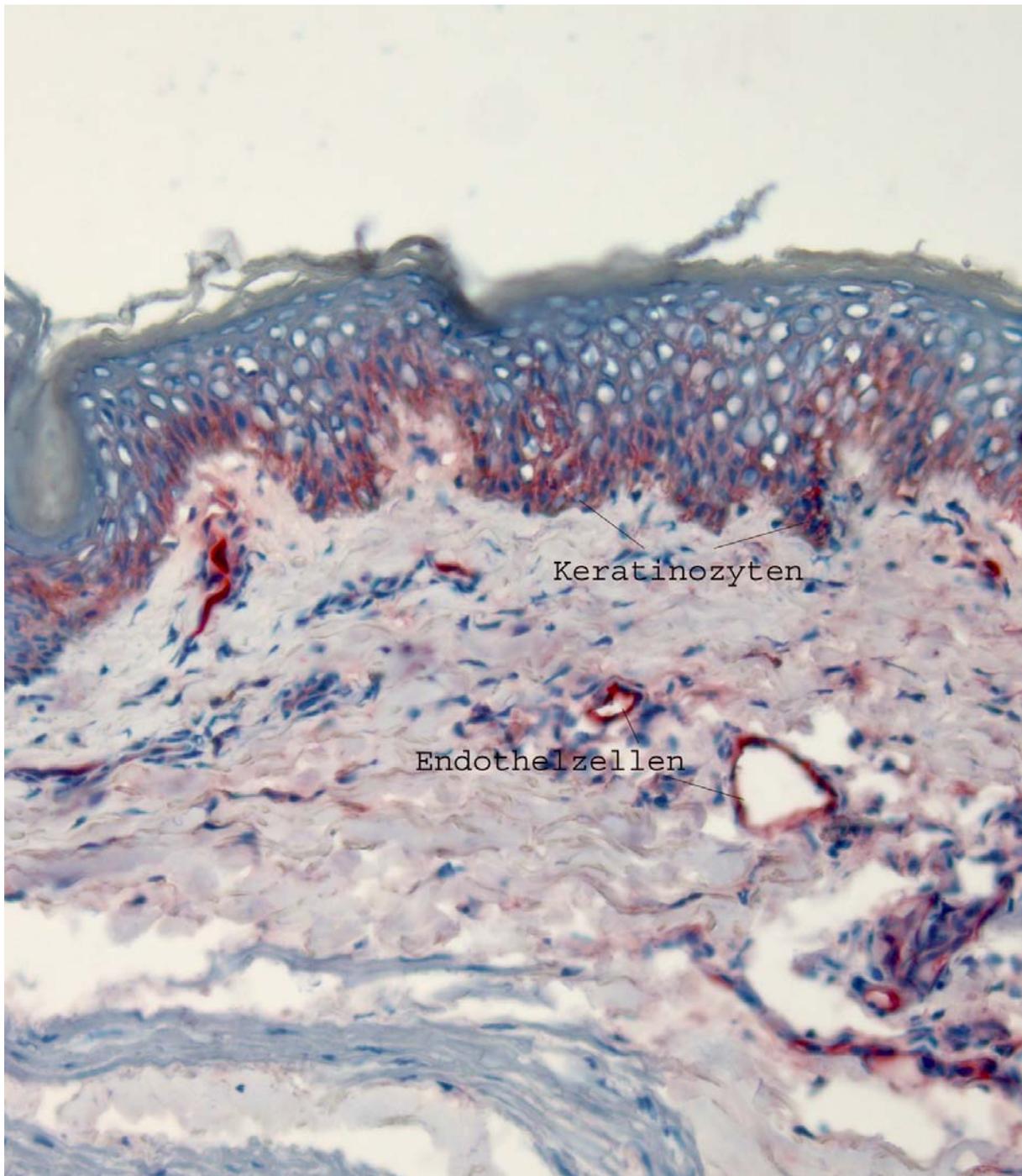
Das Chromogen AEC wird für 20 Minuten aufgetragen und danach für 2 Minuten in Wasser gewaschen. Danach erfolgt die Gegenfärbung in einem Hämalaun-Bad für 2 Minuten. Anschließend werden die Präparate für 10 Minuten in einem Wasserbad mit Frischwasserzuleitung gespült. Anschließend werden die Schnitte in Eindeckmaterial eingebettet. Bei jeder immunhistochemischen Färbung wurde eine Istoypkontrolle durchgeführt.

2.2.6 Bestimmung der optimalen Verdünnung von ICAM-1-Antikörpern

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration des monoklonalen ICAM-1-Antikörpers zur Durchführung der immunhistochemischen Färbung wurden Verdünnungsreihen mit ansteigende Konzentrationen von 1:50, 1:100, 1:200 und 1:400 durchgeführt. Die Verdünnung 1:200 war hierbei die geringste Konzentration, mit der ICAM-1-positive Zellen angefärbt werden konnte.

2.2.7 Semiquantitative Beurteilung der Präparate

Die semiquantitative Auswertung der Ergebnisse erfolgte in mindestens vier aufeinanderfolgenden, das heißt seriellen Schnitten durch zwei unterschiedliche Beurteiler in randomisierter Reihenfolge. Hierbei bedeutete +++ eine sehr starke ICAM-1 Expression, ++ starke ICAM-1 Expression, + schwache ICAM-1 Expression, - keine ICAM-1 Expression und +/- nur fokale ICAM-1 Expression.



*Abb.5: Immunhistochemie: ICAM-1-Nachweis in humaner Haut in vivo, nach s.c. Injektion von IFN- γ . Die Hautareale wurden mit Hämalaun gegengefärbt
Konstitutionelle Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen
IFN- γ -induzierte ICAM-1 Expression auf basalen Keratinozyten*

3 ERGEBNISSE

Eine tabellarische Auflistung der Ergebnisse befindet sich im Anhang.

Es wurden Untersuchungen an 20 Probanden durchgeführt. Bei allen Probanden konnte durch Gabe des Zytokins rh IFN- γ die Expression von ICAM-1 auf der Keratinozytenoberfläche *in vivo* stimuliert werden. Die Zytokin-induzierte Aufregulation des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 konnte bei allen Probanden durch vorhergehende UVB-Bestrahlung mit einer MED gehemmt werden. Bei sämtlichen Probanden konnte nach Bestrahlung mit einer MED ein Erythem ausgelöst werden. Bei 20/20 der Probanden ließ sich sowohl durch Uvinul- als auch durch Parsol-Auftragung ein Erythem wirksam verhindern, sofern die Dosis unter dem veranschlagten LSF lag. Der IPF wurde dabei nach trial-and-error Methode festgelegt. So bezeichnet man eine Problemlösemethode, bei der so lange zulässige Möglichkeiten getestet werden, bis man eine erwünschte Lösung gefunden hat.

LSF/IPF-Testung in vivo mit Parsol 5%

LSF-Testung: Die Untersuchung zur erythemprotektiven Wirkung der Testsubstanz Parsol an 5 Probanden (1-5) ergab, dass sich sowohl bei Testung mit 3 MED als auch bei Testung mit 9 MED ein Erythem vollständig verhindern ließ.

IPF-Testung: Die Untersuchungen der Immunprotektion der 5%igen Parsolformulierung bei einer UVB-Dosis von 3 MED ergab bei 5/5 Probanden eine vollständige Protektion gegenüber der UVB-induzierten Suppression der IFN- γ induzierten ICAM-1 Expression.

Hieraus folgt, dass die 5%ige Parsolformulierung nach Applikation auf die menschliche Haut bei einer *in-vivo* UVB-Bestrahlung (FS 20 sunlamps) mit 3 MED sowohl immunprotektiv als auch erythemprotektiv wirkt.

Die Suppression der IFN- γ induzierten ICAM-1 Expression durch die *in vivo* UVB-Bestrahlung konnte bei dieser Dosis jedoch nicht mehr beobachtet werden.

Hieraus folgt, dass die 5%ige Parsol Formulierung nach Applikation auf die menschliche Haut bei einer in-vivo UVB-Bestrahlung (FS 20 sunlamps) mit 9 MED zwar erythemprotektiv, nicht aber immunprotektiv wirkt (IPF<9).

Dosis-Findungs-Untersuchungen: Zur genaueren Festlegung des IPF wurden weitere Dosis-Findungs-Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurden die Umschlagspunkte der biologischen Endpunkte immer weiter eingegrenzt. Somit wurden zunächst Versuche mit 4 und 7 MED, anschließend Versuche mit 5 und 6 MED durchgeführt.

LSF-Testung: Nach Applikation von 5%iger Parsol Formulierung und anschließender Bestrahlung mit 4-7 MED, zeigte sich bei allen Probanden (11-15) ein erythemprotektiver Effekt.

Bei 2/2 Probanden (11, 12) war bei 7 MED kein immunprotektiver Effekt mehr nachweisbar. Bei 3/3 Probanden zeigte sich eine gute immunprotektive Wirksamkeit auch noch bei 5 MED (13-15). Bei 6 MED zeigte sich bei 1/3 eine schwache ICAM-Expression (15), bei 1/3 eine nur fokal angedeutete ICAM-Expression (14) und bei einem Probanden eine schwache ICAM-Expression (15).

Daraus kann gefolgert werden, dass die 5%ige Parsolformulierung mindestens einen LSF von 9 besitzt und dass der IPF etwa bei 5-6 MED liegt.

LSF/IPF-Testung in vivo mit Uvinul 2%

Mit dem Wirkstoff Uvinul wurden parallel Dosis-Findungs-Untersuchungen durchgeführt. Die Untersuchung an 5 Probanden (6-10) der erythemprotektiven Wirkung der Testsubstanz Uvinul ergab, dass sich sowohl bei Testung mit 3 MED als auch bei Testung mit 6 MED ein Erythem vollständig verhindern ließ.

Die Untersuchungen der Immunprotektion einer 2%igen Uvinulformulierung bei einer UVB-Dosis von 3 MED ergab bei 5/5 Probanden eine vollständige Protektion gegenüber der UVB-induzierten Suppression der IFN- γ induzierten ICAM-1 Expression.

Hieraus folgt, dass die 2%ige Uvinulformulierung nach Applikation auf die menschliche Haut bei einer *in-vivo* UVB-Bestrahlung (FS 20 sunlamps) mit 3 MED sowohl immunprotektiv als auch erythemprotektiv wirkt.

Die Untersuchungen der 2%igen Uvinulformulierung bei einer UVB Dosis von 6 MED ergaben bei diesen 5 Probanden (6-9) eine vollständige Suppression der IFN- γ induzierten ICAM-1 Expression durch die *in vivo* UVB-Bestrahlung.

Hieraus folgt, dass die 2%ige Uvinulformulierung nach Applikation auf die menschliche Haut bei einer in-vivo UVB-Bestrahlung (FS 20 sunlamps) mit 6 MED zwar erythemprotektiv, nicht aber immunprotektiv wirkt.

Zur genaueren Festlegung des IPF wurden weitere Dosis-Findungs-Untersuchungen durchgeführt.

Die Applikation von 2%iger Uvinulformulierung und anschließender Bestrahlung mit FS 20 sunlamps, zeigte bei allen Probanden (16-20) einen erythemprotektiven Effekt bei 4 MED und bei 3/3 auch noch bei 6 MED (16,17,20).

Bei 5/5 Probanden (16-20) war bei 4 MED eine starke bis sehr starke ICAM-Expression nachweisbar. Bei 1/3 Probanden zeigte sich eine schwache ICAM-Expression auch bei 5 MED (20) und bei 1/3 eine fokale ICAM-Expression, sowie bei 1/3 keine ICAM-Expression (19).

Bei 6 MED zeigte sich bei 3/3 keine ICAM-Expression (16,17,20)

Daraus kann für die 2%ige Uvinulformulierung auf einem LSF von wenigstens 6 geschlossen werden. mindestens einen LSF von 6 besitzt.

Die minimale immunsuppressive Dosis (MID) konnte bei ca. 4-5 festgelegt werden, das heißt, dass der IPF bei 4 anzunehmen ist.

4 DISKUSSION

Wird die Haut UV-Strahlung ausgesetzt, so führt dies zu verschiedenen biologischen Veränderungen, u.a. der Melanozytensynthese, DNS-Schäden oder Veränderungen im Immunsystem (*Morison 1989; Granstein 1990*). UV-Licht ist in der Lage, Zellvermittelte Immunantworten zu unterdrücken und kann zu einer langanhaltenden antigen-spezifischen Immunsuppression führen. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass UV-induzierte Immunsuppression durch eingeschränkte Tumorüberwachung zur Manifestation von Hautkrebs führen kann. Es gibt Anhalt dafür, dass UV-induzierte Immunsuppression auch beim Menschen eine wichtige Rolle in der Karzinogenese von Hauttumoren spielt. Insbesondere Beobachtungen an Organtransplantierten, die unter permanenter Immunsuppression stehen, bevorzugt Präkanzerosen (aktinischen Keratosen) und Kanzerosen (spinozelluläre Karzinome, Basalzellkarzinome) in UV-exponierten Arealen auszubilden, geben Hinweis auf die Rolle eines intakten Immunsystems in der Tumorüberwachung (*Kinlen 1979*). Die genetisch bedingte Erkrankung Xeroderma pigmentosum hat weitere Hinweise auf die mögliche Rolle des Immunsystems bei der Ausbildung von Hautkrebs gegeben (*Dupuy 1974; Wysenbeek 1986; Norris 1990; Lehman 1990*). Patienten mit Xeroderma pigmentosum sind extrem empfindlich gegenüber Sonnenlicht, neigen dazu, verschiedene Hautkrebsarten zu entwickeln und sind aufgrund unterschiedlicher Defekte im DNS-Reparatursystem nicht in der Lage UV-induzierte DNA-Schäden zu reparieren.

Weiterhin konnte im Tiermodell dargestellt werden, dass UV-induzierte Immunsuppression die Schwere einiger infektiöser Erkrankungen verstärkt (*Morison 1989; Garssen 1996*) und wahrscheinlich zur Pathogenese verschiedener infektiöser Erkrankungen auch beim Menschen beiträgt. Seit langem ist bekannt, dass Sonnenlicht Herpes-labialis-Bläschen in Personen mit einer latenten Infektion mit Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) triggern kann. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Induktion dosisabhängig ist (*Spruance 1985*). Diese Untersuchungen stützen die Annahme, dass UV-Einwirkungen auf die Haut zu immunsuppressiven Effekten führen können.

Der Mechanismus der UV-induzierten Immunsuppression wurde hinreichend in verschiedenen Tiermodellen geklärt. Insbesondere die Untersuchungen von ML Kripke im Mausmodell konnten zeigen, dass Mäuse, die chronischer UV-Bestrahlung

ausgesetzt sind, nicht in der Lage sind hoch antigene UV-induzierte Tumoren abzustößen (Kripke 1976). In Transfer-Untersuchungen wurde demonstriert, dass dieser systemische Effekt der UV-Strahlung durch Suppressor T-Lymphozyten bedingt ist, die eine Immunantwort gegen UV-induzierten Hautkrebs verhindern (Fisher 1982). Zusätzliche Aufklärung über den Pathomechanismus gaben ausführliche Untersuchungen im Tiermodell, die die UV-induzierte Suppression von Kontaktsensibilisierungen nutzen (Granstein 1990).

Auch die Funktionsänderung von epidermalen Langerhanszellen bei der lokalen Immunsuppression konnte beschrieben werden (Stingl 1981). Hierbei scheinen vor allen Dingen Veränderungen im Wirkspiegel lokaler Mediatoren ursächlich zu sein. Die Produktion von löslichen Zytokinen in der Haut spielt sowohl in der lokalen als auch in der systemischen UV-induzierten Immunsuppression eine wichtige Rolle (Rivas 1987; Robertson 1987; Schwarz 1987; Ullrich 1995). Eine Reihe von löslichen Mediatoren, wie verschiedene Prostaglandine (Robertson 1987), TNF- α (Tumornekrosefaktor alpha), Kurimoto 1992), IL-1 (Interleukin-1) (Robertson 1987) und IL-10 (Ullrich 1995) konnten als mögliche Mediatoren UV-induzierter Immunsuppression identifiziert werden. In Untersuchungen am Menschen konnte demonstriert werden, dass die IL-1-Aktivität im Serum nach UVB-Exposition erhöht ist (Rivas 1992).

Auf der Suche nach einem geeigneten Testsystem zur Untersuchung der lokalen UVB-induzierten Immunsuppression *in-vivo* wurde von Stege et al. (Stege 1995) ein reproduzierbares Testsystem etabliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die UVB-induzierte Hemmung der IFN- γ -induzierten ICAM-1 Expression auf Keratinozytenoberflächen sich durch eine hohe inter- und intraindividuelle Reproduzierbarkeit auszeichnet und somit ein verlässliches Testsystem darstellt.

Lichtschutzfilter

Die Hauptaufgabe, der zur Zeit auf dem Markt befindlichen Lichtschutzfilter liegt im Schutz vor akuten Veränderungen nach UV-Exposition, wie der Ausbildung eines Sonnenergythems (Gasparro 1996). Die Güte eines Sonnenschutzpräparates wird mit dem LSF (Lichtschutzfaktor) angegeben. Dieser gibt Auskunft darüber, um welchen Faktor länger man sich mit Lichtschutzfilter-behandelter Haut gegenüber unbehauelter Haut in der Sonne aufhalten kann, bis sich ein Sonnenergythem ausbildet. Bestimmt man vor und nach Auftragen eines Lichtschutzfilters die

minimales Erythemdosis (MED), d. h. die Menge an UVB-Strahlung, die ein gerade erkennbares Erythem induziert, ergibt sich der LSF nach folgender Formel:

$$\text{LSF} = \frac{\text{MED mit Lichtschutzfilter}}{\text{MED ohne Lichtschutzfilter}}$$

Der LSF für UVB-Strahlung wurde in der Vergangenheit nach verschiedenen Verfahren ermittelt. Je nach angewandter Testmethode ergaben sich abweichende UVB-Schutzwerte für das gleiche Sonnenschutzprodukt. Um diese Uneinheitlichkeit zu beenden und eine Vergleichbarkeit der Präparate zu gewährleisten, entwickelte eine Arbeitsgruppe des Dachverbandes der europäischen Kosmetikindustrie, COLIPA, 1994 eine standardisierte Prüfvorschrift zur Bestimmung des UVB-Lichtschutzfaktors, die die bis dahin in Deutschland geltende DIN-Norm ablöste (COLIPA 1994).

Damit ergab sich jedoch eine Reihe von neuen Problemen:

Zum einen ist die in der COLIPA-Vorschrift angewandte Menge von 2 mg Lichtschutzfilter pro cm² Körperoberfläche sehr viel größer als die in der Praxis tatsächlich applizierte Menge. Breitangelegte Anwenderstudien haben gezeigt, dass der Verbraucher im Durchschnitt nur etwa 0,5-1,5 mg/cm² Lichtschutzfilter aufträgt und sich damit in der Praxis die tatsächliche Schutzwirkung um den Faktor 2-4 reduziert. Zum anderen erfolgt die Applikation durch den Anwender nicht besonders gewissenhaft, insbesondere die sogenannten „Sonnenterassen“, wie Stirn, Ohren, Kopfhaut, Nasenrücken, Lippen, Schultern und Fußrücken, erhalten oft keinen ausreichenden Schutz (Autier 1999; Autier 2000). Misst man die Reduktion der UVB-Strahlung durch Lichtschutzfilter, so werden bei einem Faktor von 20 etwa 95% der Strahlung absorbiert und bei einem LSF von 50 rund 98% (Gloor 2000). Da der tatsächliche Lichtschutzfaktor in der Praxis durch falsche Anwendung de facto nie erreicht wird, sollte gerade der Einsatz von Präparaten mit extrem hohem Lichtschutzfaktor propagiert werden. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund, dass eine UV-induzierte Immunsuppression, bereits bei UV-Dosen eintritt, die deutlich unterhalb der Erythemschwelle liegen (Bielfeldt 2001).

Durch die Entwicklung immer neuer UV-Filter und galenischer Formulierungen werden immer häufiger Präparate mit sehr hohen Lichtschutzfaktoren (bis zu LSF 100) angeboten. Diese sind extrem effektiv in der Verhinderung von akuten Effekten von UV-Strahlung, wie z.B.: Sonnenbrandreaktionen. Im Tiermodell konnten diese Lichtschutzfilter auch vor chronisch induzierten UV-Schäden wie Photoaging (*Kligman 1982*), aktinischen Keratosen (*Naylor 1996*), Tumorinitialisierung und Tumor Promotion schützen (*Kligman 1980; Wulf 1982*). Der standardisierte Nachweis eines immunprotektiven Effektes solcher Sonnenschutzformulierungen in-vivo beim Menschen konnte allerdings bisher nicht erbracht werden.

Die hier gezeigten Untersuchungen versuchen das o.g. Testsystem nun zur Festlegung der MISD (minimale immunsuppressiven Dosis) sowie des IPF (Immunprotektivitätsfaktor) zweier Sonnenschutzformulierungen in vivo beim Menschen als photoimmunologisches Read-out-System zu etablieren und mit Hilfe verschiedener Versuchsanordnungen festzustellen und abzuleiten inwieweit Lichtschutzfilter in der Lage sind vor UVB-induzierter Immunsuppression zu schützen.

Problematik der Untersuchungsmethode

Eine Schwäche der COLIPA-Testmethoden ist die Auswahl der UV-Strahlenquelle. Die zur Bestimmung des LSF angewandten UV-Lampen, emittieren nur einen Anteil des in der Natur tatsächlich vorkommenden UV-Spektrums. Selbst Sonnensimulatoren, können nur ein ähnliches, jedoch nicht mit natürlicher Mittagssonne vergleichbares UV-Emissionsspektrum aufweisen (*Beasley 1996*). Wie die Abbildung (Emissionsspektren) zeigt, sind hier deutliche Unterschiede erkennbar. Da die nach der COLIPA-Norm geprüften Sonnenschutzformulierungen hauptsächlich mit der Intention entwickelt worden sind, vor effektiver erythemato gener Sonnenlicht-Spektrum-UV-Strahlung zu schützen, kann der mit artifiziellen UV-Lampen gemessene LSF, vom tatsächlichen LSF unter natürlicher Sonneneinstrahlung abweichen. Es hat sich gezeigt, dass das erythemauslösende UV-Spektrum zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben wird, wenn UV-Lampen, die zur Lichtschutzfaktor-Bestimmung eingesetzt werden eine bestimmte Dosis von nichtsolarer UV-Energie emittieren (*Learn 1993; Learn 1995*). Die meisten Lichtschutzfilter sind in der Filterung hocherythemato gener, aber in natürlicher

Umgebung irrelevanter, nichtsolarer UV-Strahlung (unter 295 nm) wenig effizient. Dies erklärt z.B. warum LSF-Werte, die mit einem nicht dem Solarspektrum entsprechenden Wellenlängenbereich ermittelt werden niedriger sein können als LSF, die mit einem Solarsimulator ermittelt werden.

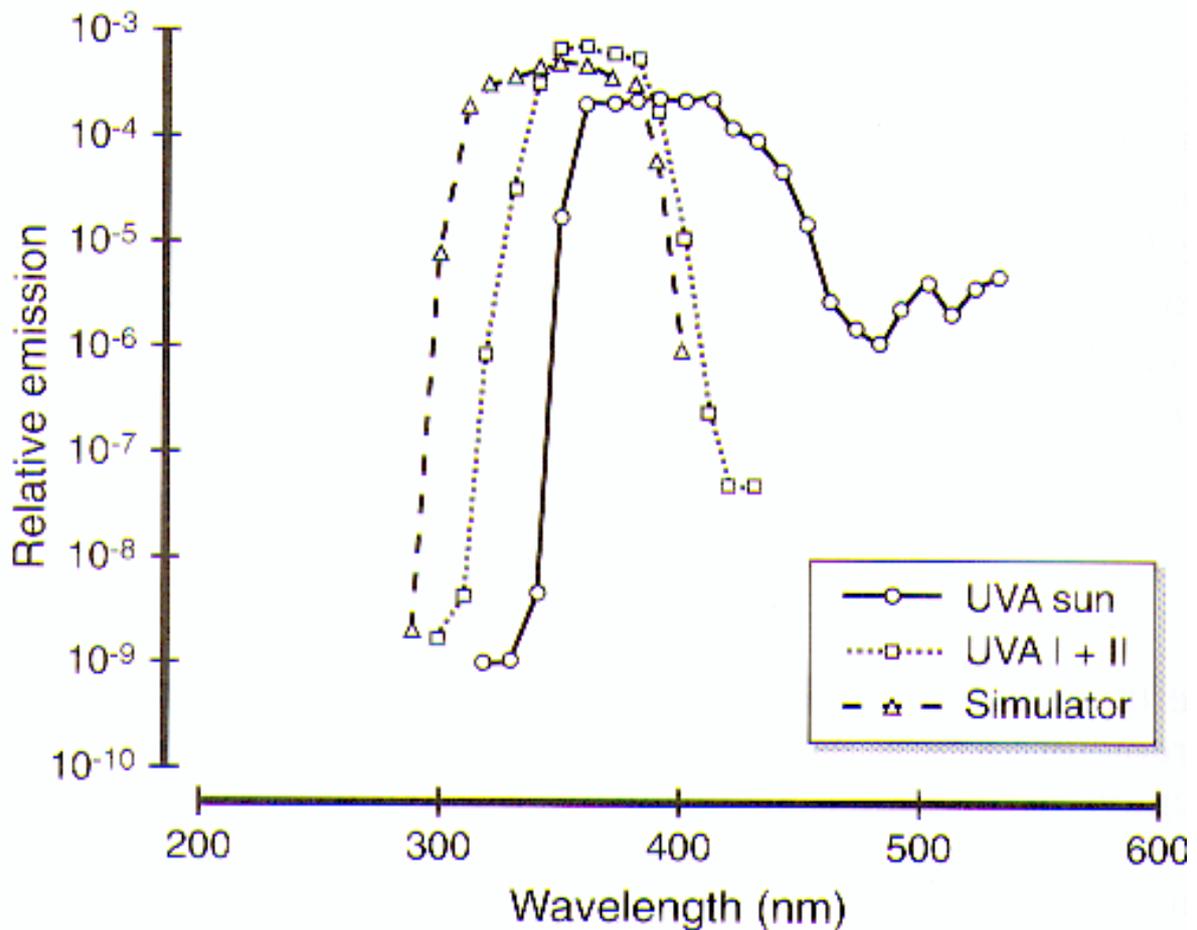


Abb.6: relative Emssionsspektren verschiedener Lampen gemessen mit einem Spektrometer in 10 nm Intervallen [Applegate et al: Expression of DNA damage and Stress proteins by UVA irradiation of human skin in vivo]

Die in dieser Arbeit verwendeten FS20 sunlamps emittieren UV-Licht vornehmlich im UVB-Bereich ab 270 nm mit einem Peak bei 313 nm. Zusätzlich emittieren sie jedoch geringfügig unterhalb von 260 nm und im UVA-Bereich.

Die Wellenlängen, die für UV-induzierte Immunsuppression verantwortlich sind, liegen vornehmlich im UVB-Spektrum (280-320 nm). UVA-Effekte könnten somit vernachlässigt werden (Morison 1989; Granstein 1990). Allerdings kann ein additiver

UVA-Effekt nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden (*Schwarz 1987*), da exakte Aktionsspektren noch nicht für sämtliche immunsuppressiven Effekte beschrieben worden sind.

Bei Wellenlängen, die ausschließlich im UVA-Bereich (320-400 nm) liegen, konnte in in-vivo Mausmodellen bisher keine Immunsuppression nachgewiesen werden. Allerdings kann es nach UVA-Exposition zu einer Veränderung von kutanen immunkompetenten Zellen und einer Isomerisation von Urokaninsäure (*Aubin 1992*) kommen. Obwohl wie bereits erwähnt der Nachweis einer immunsuppressiven Wirkung von UVA-Strahlung im Tiermodell bisher nicht erbracht werden konnte, so ist doch ein Effekt mit letzter Sicherheit nicht auszuschließen und stellt möglicherweise eine Fehlerquelle in der Versuchsanordnung dieser Arbeit dar. Geht man allerdings von der Richtigkeit der Studienergebnisse aus, so bleiben bei der Frage nach der immunprotektiven Wirkung von Sonnenschutzmitteln, zunächst allein die UVB-induzierten Effekte zu berücksichtigen. Trotzdem sollte bei weiteren Untersuchungen der Einsatz von Sonnensimulatoren der Vorzug gegeben werden, da diese dem tatsächlich in der Natur vorkommenden Sonnenlichtspektrum am nächsten kommen und somit eine höhere Aussagekraft bezüglich der Gesamtwirkung auf den Menschen erzielt werden sollte.

In verschiedenen Untersuchungen in vitro, in Tiermodellen und vereinzelt in-vivo beim Menschen konnte bisher gezeigt werden, dass Sonnenschutzpräparate in der Lage sind, UV-induzierten Sonnenbrand (*Pathak 1982, Elmetts 1992*), chronisch-rezidivierenden Herpes labialis (*Rooney 1991*), chronisch aktinische Dermatitis und Erythropoetische Protoporphyrinurie (*Diffey 1991*) Hautalterung (Photoaging) (*Kligman 1983, Kligman 1985*), DNS-Schäden (B8-10), Ausbildung von präkanzerösen Aktinischen Keratosen (*Freeman 1988; De Rijcke 1989; van Praag 1993*) sowie Hautkrebs (*van Praag 1991*) wirksam zu verhindern (*Synder 1995*) Dies gibt einen deutlichen Hinweis auf die immunprotektive Wirkung dieser Präparate.

Obwohl es Studien gibt, die die immunprotektive Wirksamkeit von Sonnenschutzmitteln anzweifeln, gibt es doch zahlreiche objektive Untersuchungen die zeigen, dass Sonnenschutzformulierungen durchaus in der Lage sind immunprotektiv wirksam zu sein (*Morison 1984; Morison 1985a; Morison 1985b; Edwards 1986*). Die Ursache für diese konkurrierenden Meinungen scheinen in der Auswahl der teilweise ungenormten Versuchsanordnungen zu liegen.

Die in dieser Arbeit beim Menschen in-vivo durchgeführten Untersuchungen konnten, wie bereits in verschiedenen *in-vitro* und Untersuchungen bei Mäusen beschrieben (Wolf 1993) zeigen, dass der IPF nicht mit dem LSF einer Sonnenschutzformulierung identisch ist, sondern deutlich darunter anzusiedeln ist.

Diskussion der Ergebnisse

Die hier vorgestellten Untersuchungsergebnisse demonstrieren, dass die beiden Sonnenschutzformulierungen Parsol und Uvinul bei niedrigen Dosen von UVB (bis zur 4x MED) gleichsam immunprotektiv wie auch erythemprotektiv wirken. Bei höheren Dosen (bei Parsol ab 6x MED und Uvinul ab 5x MED) übersteigt die erythemprotektive Wirkung die immunprotektive Wirkung.

Die unterschiedlichen Messergebnisse der Sonnenschutzformulierungen sind auf die unterschiedliche physikalischen und chemischen Eigenschaften der jeweiligen UV-absorbierenden Substanzen zurückzuführen. Angelehnt an die COLIPA-Norm konnte ein individueller LSF für jede Substanz festgelegt werden. So wurde der LSF für Parsol bei LSF 10 festgesetzt. Der LSF von Uvinul wurde im gleichen Verfahren als LSF 7 bestimmt.

Wie bereits erwähnt zeigt sich bei der Versuchsanordnung zur Ermittlung des LSF sowie IPF eine Problematik bei der Auswahl der UVB-Strahlenquelle. Bei den in den Versuchsreihen verwendeten FS20-sunlamps handelt es sich um Lampen die neben einem UVB-Spektrum zusätzlich im UVC und UVA-Bereich emittieren. Nach dem heutigen Wissensstand sind die durch diese Emissionsspektren hervorgerufenen Effekte allerdings zu vernachlässigen.

Um eine bessere Übertragbarkeit auf die tatsächlich vorhandenen UV-Verhältnisse in der Natur zu gewährleisten empfehlen sich jedoch weitere Testungen mit einem Solarsimulator, dessen Emissionsspektrum dem der Sonne gleicht.

Es stellt sich nun die Frage inwieweit die in dieser Arbeit präsentierten Resultate, eine tatsächliche Gesamtbeurteilung über die immunprotektive Fähigkeit der hier getesteten Substanzen geben kann.

Laut Definition trifft der Begriff LSF nur Aussage über die Verhinderung eines UV-Erythems nach Einwirkung von Sonnenlicht. (s. COLIPA-Norm) Obwohl Lichtschutzfilter in der Lage sind auch vor anderen UV-Schäden zu schützen (Photoaging, Herpes labialis, Hautkrebs, etc.), muss der Grad dieses Schutzes für

jeden photobiologischen Endpunkt einzeln und neu ermittelt werden. Dies folgt aus der Tatsache, dass zwar der Grad der Wirksamkeit eines Sonnenschutzmittels abhängig vom ermittelten Lichtschutzfaktor ist, jedoch keinesfalls für jeden photobiologischen Endpunkt identisch sein muss. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit von LSF und nicht erythematischen Protektionsfaktoren zu gewährleisten, sollten sich die Versuchsbedingungen für weitere biologische Endpunkte möglichst nahe an den Versuchsbedingungen für die Ermittlung des LSF anlehnen. Das heißt, dass z.B. bei der Wahl der UV-Quellen, Solarsimulatoren eingesetzt werden sollten und dass die UV-Dosen und Expositionszeiten, den tatsächlich in der Natur vorkommenden Bedingungen entsprechen sollten.

Verschiedene wissenschaftliche Arbeiten haben dargelegt, dass Lichtschutzfilter in der Lage sind immunprotektiv zu wirken. Tatsächlich zeigen sich jedoch unterschiedliche Resultate abhängig vom gewählten Versuchsprotokoll und Auswahl des zu untersuchenden photobiologischen Endpunktes. Bei den veröffentlichten Arbeiten zeigt sich, dass Sonnenschutzmittel besser vor lokalen immunsuppressiven UV-Effekten (*Ho 1992, Wolf 1993; Roberts 1996; Miyagi 1994, Hayág*) als vor systemischen Effekten von UV-Licht schützen (*Hersey 1987; Gurish 1981, Reeve 1991*). Bei einer bestimmten UV-Dosis schützen demnach Lichtschutzfilter besser vor Sonnenerythem als vor immunologischen Veränderungen (*Wolf 1993, Walker 1997*). Es konnte demonstriert werden, dass UV-induzierte Immunsuppression auch dann erfolgen kann, wenn ein Sonnenerythem infolge eines suffizienten UV-Lichtschutzfilters ausbleibt (*Wolf 1993a, Walker 1997, Wolf 1993b*). Zusätzlich wurde der Nachweis erbracht, dass unter bestimmten, definierten Bedingungen die photobiologischen Endpunkte für den IPF einer Sonnenschutzformulierung unter dem des konventionellen LSF liegen (*Bestak 1995; Wolf 1994a*). Diese Untersuchungsergebnisse spiegeln auch die Resultate dieser Arbeit wieder. Obwohl die Ursache für diese Diskrepanzen bisher noch nicht hinreichend untersucht sind, so bieten sich doch verschiedene Erklärungsmöglichkeiten für diesen Effekt an: Zum einem besteht die Möglichkeit, dass chemische Lichtschutzfilter nicht nur als einfache UV-Barriere fungieren, sondern auch in die Epidermis penetrieren und dort mit verschiedenen Strukturen und zellulären Elementen interagieren. Bei der Applikation des Lichtschutzfilters auf der Haut kann es zu einer inhomogenen Verteilung kommen. Dies kann dazu führen, dass verschiedene Zielstrukturen, die für Immunsuppression und Entzündungsreaktion unterschiedlich sein können,

unterschiedlich stark geschützt werden. Bei der topischen Applikation von Liposomen mit dem Reparaturenzym T4Endonuklease V, welches spezifisch für die Reparatur von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren ist, zeigen sich ähnliche Effekte. Die Liposomen sind zwar in der Lage, komplett vor einer UV-induzierten Suppression einer Spättyp-Reaktion auf *C. albicans* zu schützen, sie sind allerdings nur teilweise in der Lage eine Sonnenbrandreaktion zu unterdrücken (*Wolf 1995-2*). Hinzu kommen Untersuchungen, die zeigen, dass Lichtschutzfilter sich bevorzugt unterhalb des Stratum corneum anlagern und demzufolge, obwohl sie dadurch Schäden in tieferen Hautstrukturen verhindern, nicht effektiv genug vor Schäden an oberflächlicheren Chromophoren, wie z.B. Urokaninsäure, die als Immunmodulator der oberflächlichen Epidermis wirken kann, schützen können (*De Fabo 1983*). Eine andere Arbeit demonstriert, dass Lichtschutzfilter durchaus in der Lage sind vor trans- zu cis-Photoisomerisation von Urokaninsäure im menschlichen Stratum corneum nach Lichtexposition zu schützen (*Lay 1985*). Einige Studien, in denen Lichtschutzfilter keine immunprotektive Wirkung aufwiesen, exponierten chronische und nicht Einzel-UV-Dosen. Insbesondere nach repetitiver UV-Exposition kommt es zu verschiedenen epidermalen und dermalen Veränderungen, z.B. der Ausbildung einer Lichtschwiele und dermalen Infiltration mit verschiedenen Zellen. Diese Veränderungen können trotz Lichtschutzfilterapplikation entstehen und spielen eine Rolle bei der UV-induzierten Immunsuppression (*Wolf 1994*). Weitere Arbeiten konnten darstellen, dass es trotz eines kompletten Erythemschutzes zu kleineren DNA-Schäden kommen kann. Dies stellt sich in der Ausbildung von Sonnenbrandzellen (sunburn cells) dar (*Wolf 1995a; Roberts 1996; Wolf 1993*). Demgegenüber stehen wiederum Untersuchungen die zeigen, dass Sonnenschutzfilter in der Lage sind effektiv vor DNA-Schäden, insbesondere in Form von Pyrimidin-Dimer-Formation zu schützen (*De Rijcke 1989; van Praag 1993; Freeman 1988*). Diese Publikationen postulieren, dass die Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere die Haupttrigger zumindest einiger Formen von Immunsuppression sind, z.B. bei der lokalen und systemischen Suppression der Spättypreaktion auf *C. albicans* (*Applegate 1989; Hodges 1977*). Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass ein Anteil an der immunprotektiven Wirkung von Sonnenschutzmitteln, der Schutz vor der Ausbildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren in bestimmten Regionen der DNA sein kann, z.B. in aktiven Transkriptions-Regionen. Dieser Effekt beinhaltet jedoch nicht notwendigerweise einen allumfassenden Schutz vor weiteren DNA-Schäden. Diese Ergebnisse

spiegeln sich in einer Arbeit wieder, in der zwei chemische UVB-Sonnenschutzfilter nur einen partiellen Schutz vor systemischer Immunsuppression gaben, obwohl sie effektiv die Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren unterdrücken konnten (*Wolf 1995a*). Eine Erklärungsmöglichkeit für die diskrepanten Untersuchungsergebnisse könnte auch sein, dass Sonnenschutzmittel chemisch mit Molekülen interagieren können, u.a. mit DNA, und dadurch zu einer Immunsuppression führen. Hierbei können sie immunsuppressive Effekte verstärken. Passend zu dieser Theorie konnte nachgewiesen werden, dass in UV-exponierten Bakterien in der Anwesenheit von PABA (Paraaminobenzoessäure) *Hodges 1977; Knowland 1993*) und Zimtsäure-Derivaten (*Shimoi 1985*) Mutationen beobachtet werden konnten. Die Autoren dieser Arbeit schlossen daraus, dass Sonnenschutzfilter die Reparatur von DNA-Schäden inhibieren können. Zusätzlich konnte in-vitro gezeigt werden, dass PABA die Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren nach UV-Einwirkung verstärkt (*Sutherland 1984; Sutherland 1982*). PABA Ester allein waren in der Lage DNA-Schäden zu induzieren und diese Effekte konnten durch eine nachfolgende UV-Strahlung noch verstärkt werden (*Long 1984*). Ein weiterer Punkt, der zu bedenken gilt ist, dass andere oder zusätzliche Mechanismen, die nicht mit DNA-Schädigung vergesellschaftet sind, eine Rolle in UV-induzierten Entzündungsreaktionen spielen können. Zum Beispiel könnten Zellmembran-Schäden (*Hruza 1993*), ebenso wie DNA-Schäden wichtig für die Ausbildung von UV-induzierter Entzündungsreaktion sein. Sonnenschutzmittel können solche Mechanismen besser verhindern als die Formation von DNA-Schäden und somit besser vor Entzündungsreaktionen als vor Immunsuppression schützen.

Schlußfolgerung

Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es, zu überprüfen, inwieweit die topische Applikation von zwei verschiedenen Sonnenschutzformulierungen auf die menschliche Haut in der Lage ist, gegen UV-B induzierte, lokale immunsuppressive Effekte zu schützen. Als photoimmunologisches Read-out-System wurde das Modell der UVB-induzierte Suppression der IFN- γ induzierten ICAM1-Aufregulation.

Die untersuchten UV-Filter Uvinul und Parsol sind partiell in der Lage vor immunsuppressiven Effekten von UVB-Strahlung zu schützen. Durch das gewählte Read-out System konnte gezeigt werden, dass bei beiden Präparaten der IPF unterhalb des LSF der jeweiligen Formulierung liegt. Bei Anwendung dieser Präparate kann es also ab einer bestimmten Dosis trotz Ausbleibens einer

Erythemreaktion zur Ausbildung von immunsuppressiven Effekten der UV-Strahlung kommen.

Zur Vermeidung solcher immunsuppressiven Effekte und der damit vergesellschafteten akuten und chronischen Schäden sollte nach Einzelpräparaten oder Kombinationsformulierungen gesucht werden, die einen kompletten Schutz vor negativen Effekten der UV-Strahlung gewährleisten. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund einer durch den Anwender falsch eingeschätzten vermeintlichen Sicherheit. Erste Schritte in diese Richtung zeigen neue Sonnenschutzformulierungen aus der Kombination von UV-Filter und DNA-Reparaturenzymen. Der Gebrauch von reinen UVB-Filtern sollte, selbst bei nachgewiesenem hohem LSF und IPF, abgelehnt werden, da sie es dem Anwender ermöglichen sich großen Dosen von UVA-Strahlung auszusetzen, ohne eine schmerzhaftes Sonnenergymreaktion auszubilden. Von einem photoimmunologischen Standpunkt heraus, ist es sinnvoll, Breitband-Lichtschutzfilter mit sowohl extrem hohem UVB-Filter und hohem IPF, sowie ausreichenden UVA-absorbierenden Eigenschaften zu entwickeln. Dies gelingt durch eine Kombination verschiedener UV-filternder Substanzen.

Obwohl für UVA-Strahlung *in vivo* keine immunsuppressiven Effekte nachgewiesen werden konnten, sollten diese Resultate kritisch überdacht werden, da bisher vor allen Dingen Tiermodelle als Versuchsanordnung gewählt wurden und humanspezifische Immun-Mechanismen und Verhaltensweisen nicht hinreichend berücksichtigt wurden. Insbesondere vor dem Hintergrund des Einflusses von UVA-Strahlung auf das Photoaging sowie ihrer vermutlich wesentlichen Rolle bei der Ausbildung von Melanomen, sollte Ihr Stellenwert noch einmal kritisch überdacht werden. Die bisher vorliegenden Daten aus Tiermodellen bekräftigen die Notwendigkeit der weiteren Forschung auf diesem Gebiet, insbesondere in humanen *in vivo* Untersuchungen. Demgegenüber stehen ethische Bedenken, da bekannte UV-bedingte negative biologische Effekte wie Photoaging, Karzinogenese, oder Immunsuppression berücksichtigt werden müssen und *humane in-vivo* Studien deshalb nur eingeschränkt durchgeführt werden. Die Entwicklung und Standardisierung von verlässlichen *in-vitro*-Testmethoden zur Erfassung relevanter photobiologischer Parameter könnte einen Ausweg bieten.

Die hier vorgestellte Testmethode ist zum einen limitiert durch die bekannten negativen Kurzzeit- und Langzeiteffekte bei hohen UV-Dosen, die es verbieten die

Probanden mit extrem hohen UV-Dosen zu bestrahlen. Zum anderen zeigt sich bei den Probanden eine sinkende Compliance bei Versuchen mit hohen LSF und damit einhergehenden langen Bestrahlungszeiten. Hinzu kommen die unter subkutaner IFN-gamma-Gabe möglichen grippeähnlichen systemischen Nebenwirkungen, die von den Probanden zu tolerieren sind und sich je nach gewählter Versuchsanordnung addieren.

Bezogen auf das in dieser Arbeit gewählte Testsystem bedeutet das, dass die angewandte Versuchsanordnungen zwar als Read-out-System gut geeignet ist, jedoch auf Testungen mit einer größeren Anzahl Probanden oder als Routinemethode aus oben genannten Gründen verzichtet werden muss.

Die aus dem Read-out-System gewonnenen Erkenntnisse können allerdings zu einem besseren Verständnis von UV-induzierten immunsuppressiven Effekten führen und dann langfristig in der Entwicklung von optimierten Breitband-Lichtschutzfiltern gipfeln.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ananthaswamy HN, Ullrich SE, Kripke ML (2002) Inhibition of UV-induced p53 mutations and skin cancers by sunscreens: implication for skin cancer prevention. *Exp Dermatol* 11 Suppl 1:40-3.
2. Aubin F, Kripke ML (1992) Effect of ultraviolet A radiation on cutaneous immune cells. In: Urbach F, ed. *Biological Responses to ultraviolet A radiation*. Overland Park: Valdenmar Publishing Company, 1992:239-247.
3. Applegate LA, Ley RD, Alcalay J, Kripke ML (1989) Identification of the molecular target for the suppression of contact hypersensitivity by ultraviolet radiation. *J Exp Med* 170:1117-1131
4. Autier P, Dore JF, Negrier S, Lienard D, Panizzon R, Lejeune FJ, Guggisberg D, Eggermont AM (1999) Sunscreen use and duration of sun exposure: a double-blind, randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 91:1304-1309
5. Autier P, Dore JF, Reis AC et al (2000) Sunscreen use and intentional exposure to ultraviolet A and B radiation: a double blind randomised trial using personal dosimeters. *Br J Cancer* 83:1243-1248
6. Barker JNWN, Sarma V, Mitra RS, Dixi VM, Nickoloff BJ (1990) Marked synergism between tumor necrosis factor- α and interferon- γ in regulation of keratinocyte-derived adhesion molecules and chemotactic factors. *J Clin Invest* 85:605-608
7. Beasley, D. G., J. Beard, J. W. Stanfield and L. K. Roberts (1996) Evaluation of an economical sunlamp that emits a near solar UV Power spectrum for conducting photoimmunological and sunscreen immune protection studies *Photochem Photobiol* 64:303-309
8. Benson HA (2000) Assessment and clinical implications of absorption of sunscreens across skin. *Am J Clin Dermatol* 1:217-24
9. Berneburg M, Plettenberg H, Medve-Konig K, Pfahlberg A, Gers-Barlag H, Gefeller O, Krutmann J (2004): Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in normal human skin. *J Invest Dermatol* 122(5):1277-83.
10. Bestak R, Barnetson RS, Nearn MR, Halliday GM (1995) Sunscreen protection of contact hypersensitivity responses from chronic solar-simulated ultraviolet

- irradiation correlates with the absorption spectrum of the sunscreen. *J Invest Dermatol* 105:345-351
11. Bielfeldt S (2001) Standardisierte Methoden zur Prüfung des Sonnenschutzes von Externa, In: Braun-Falco O, Gloor M, Korting HC (Hrsg) Nutzen und Risiko von Kosmetika. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, S 47-54
 12. Bissett DL, McBride JF, Hannon DP, Patrick LF (1991): Time-dependent decrease in sunscreen protection against chronic photodamage in UVB-irradiated hairless mouse skin. *Journal of Photochemistry & Photobiology* 9; B - Biology(3-4):323-334
 13. Blum HF (1959) Carcinogenesis by ultraviolet light. Princeton University Press, Princeton, NJ
 14. Bohr VA, Okumoto DS, Hanawalt PC (1986) Survival of UV-irradiated mammalian cells correlated with efficient repair in an essential gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 51:3830-3822
 15. Bos JD, Zonneveld I, Das PK, Krieg SR, van der Loos CM, Kapsenberg ML (1987) The skin immune system (SIS); distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin. *J Invest Dermatol* 88:569-573
 16. Boyle L, MacKie RM, Briggs JD, Junor BJR, Aitchinson TC (1984) Cancer, warts and sunshine in renal transplant patients: a case-control study. *Lancet* 1:702-705
 17. Budnik A, Trefzer U, Parlow F, Kapp A, Schöpf E, Krutmann J (1992) Human epidermal keratinocytes are a source of soluble ICAM-1 molecules. *Exp Dermatol* 1:27-30
 18. Bünger J, Axt A, zur Lage J, Fritz A, Degwert J, Driller H (2000) The protection function of compatible solute ectoin on the skin, skin cells and its biomolecules with respect to UV-irradiation, immunosuppression and membrane damage. *Proceedings XXII IFSCC International Congress 2000 Berlin*
 19. Centre for atmospheric science: European Arctic Stratospheric Ozone Experiment (EASOE) (1998): The Ozone Hole- Current research work <http://www.atm.ch.cam.ac.uk/tour/part4.html>
 20. COLIPA (1994) Sun protection factor test method
 21. Christoph H, Parlow F, Budnik A, Block r, Schöpf e, Krutmann J (1993) Ultraviolet A1-induced immunomodulation: UVA-1 and UVB-radiation both affect human keratinocyte expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), although by different mechanisms (Abstract) *Arch Dermatol Res* 285:56

22. Cooper KD, Baron ED, LeVee G, Stevens SR (2002): Protection against UV-induced suppression of contact hypersensitivity responses by sunscreens in humans. *Exp Dermatol* 11 Suppl 1:20-7
23. Cooper KD, Duraiswamy N, Hammerberg C, Allen E, Kimbrough-Green C, Dillon W, Thomas D (1993) Neutrophils, differentiated macrophages, and monocyte/macrophage antigen presenting cells infiltrate murine epidermis after UV injury. *J Invest Dermatol* 101:155-163
24. Daynes RA, Burnham DK, Dewitt CW, Roberts LK, Drueger GG (1985) The immunology of ultraviolet-radiation carcinogenesis. *Cancer Surv* 4:51-99
25. DeFabo EC, Kripke ML (1979) Dose-response characteristics of immunologic unresponsiveness to UV-induced tumors produced by UV irradiation of mice. *Photochem Photobiol* 30:385-390
26. DeFabo EC, Kripke ML (1980) Wavelength dependence and dose-rate independence of UV radiation induced immunologic unresponsiveness to a UV induced fibrosarcoma. *Photochem Photobiol* 32:183-188
27. De Fabo EC, Noonan FP (1983). Mechanism of immune suppression by ultraviolet irradiation in vivo. I. Evidence for the existence of a unique photoreceptor in skin and its role in photoimmunology. *J Exp Med* 157:84-98
28. De Rijcke S, Heenen M(1989) Decrease of ultraviolet-induced DNA injury in human skin by *p*-aminobenzoic acid esters. *Dermatologica* 179:196-199
29. Diffey, B. L. and P. M. Farr (1991) Sunscreen protection against UVB, UVA and blue light: an *in vivo* and *in vitro* comparison. *Br J Dermatol* 124:258-263
30. Domanski D, Bosnic M, Reeve VE (1999) Does sunscreen protection from immunosuppression by solar UV radiation predict protection from photocarcinogenesis? *Redox Rep.* 4:309-310.
31. Donawho CK, Kripke ML (1992) Effect of UV-B radiation on the metastasis of murine melanomas. *J cell Biochem Suppl* 16b, 316
32. Dupuy JM, Lafforet D. A defect of cellular immunity in xeroderma pigmentosum. *Clin Immunol Immunopathol* 1974;3:52-58
33. Dustin, ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA (1986) Induction by IL-1 interferon- γ : tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1) *J Immunol* 137:245-254

34. Dustin ML, Singer KH, Tuck DT, Springer TA (1988) Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon- γ and is mediated by intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) *J Exp Med* 167:1323-1340
35. Edwards EK jun, Edwards EK Sr, Frank BL, Rosen LB (1986) The effect of an ultraprotective sunscreen on Langerhans cell alteration induced by ultraviolet light in human skin. *Intl J Dermatol* 25:327-329
36. Elmetts CA, Bergstresser PR, Tigelaar RE (1983): Analysis of the mechanism of unresponsiveness produced by haptens painted on skin exposed to low dose ultraviolet radiation. *J Exp Med* 158:781-794
37. Elmetts CA, Vargas A, Oresajo C (1992) Photoprotective effects of sunscreens in cosmetics on sunburn and Langerhans cell photodamage. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 9:113-120
38. Finsen NR (1901a) The chemical rays of light and smallpox. In: *Phototherapie*. S. 1-36
39. Finsen NR (1901b) The treatment of lupus vulgaris by concentrated chemical rays. In: *Phototherapy*. S. 73-75 Hrsg.: E. Arnold, London
40. Fisher MS, Kripke ML (1982) Suppressor T lymphocytes control the development of primary skin cancers in UV-irradiated mice. *Science* 216:1133-1134
41. Fitzpatrick TB (1988) The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 124(6):869-871
42. Freeman SE, Ley RD, Ley KD (1988) Sunscreen protection against UV-induced pyrimidine dimers in DNA of human skin *in situ*. *Photodermatology* 5:243-247.
43. Gallagher CH, Greenoak GE, Reeve VE, Canfield PJ, Baker RS, Bonin AM (1984) Ultraviolet carcinogenesis in the hairless mouse skin. Influence of the sunscreen 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. *Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science* 62:577-588
44. Gange RW, Blackett AD, Matzinger EA (1985): Comparative protection efficiency of UVA- and UVB-induced tans against erythema and formation of endonuclease-sensitive sites in DNA by UVB in human skin. *J Invest Dermatol* 85(4):362-364
45. Gasparro, F. P., M. Michnick and J. F. Nash (1998) A review of sunscreen safety and efficacy (1998) *Photochem Photobiol* 68:243-256.v
46. Garssen J, Goettsch W, De Gruijl F, Slob W, van Loveren H (1996) Risk assessment of UVB effects on resistance to infectious diseases. *Photochem Photobiol* 64:269-274

47. Gloor M (2000) Antipruriginosa, Lokalanästhetika, Antihidrotika und Lichtschutz. In : Gloor M, Thoma K, Fluhr J (Hrsg) Dermatologische Externatherapie unter besonderer Berücksichtigung der Magistralrezeptur. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, S 395-419
48. Granstein RD. Photoimmunology. Semin Dermatol 1990; 9:16-24
49. Grewe M, Stege H, Vink A, Klammer M, Ruzicka T, Roza L, Krutmann J (2000) Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in ultraviolet B-irradiated human antigen-presenting cells is restored after repair of cyclobutane pyrimidine dimers. Exp Dermatol 9:423-30
50. Grewe M, Trefzer U, Ballorn A, Gyufko K, Henninger H, Krutmann J (1993) Analysis of the mechanism of ultraviolet B radiation-induced prostaglandin E2 synthesis by human epidermoid carcinoma cells. U Invest Dermatol 101:528-531
51. Gurish MF, Roberts LK, Krueger GG, Daynes RA (1981) The effects of various sunscreen agents on skin damage and the induction of tumor susceptibility in mice subjected to ultraviolet irradiation. J Invest Dermatol 76:246-251
52. Hayág MV, Chartier T, DeVoursney T, Tie C, Machler B, Taylor JR (1997) A high SPF sunscreen's effects on UVB-induced immunosuppression of DNCB contact hypersensitivity. J Dermatol Sci 16:31-37
53. Hersey P, MacDonald M, Burns C, Schibeci S, Matthews H, Wilkinson FJ (1987) Analysis of the effect of a sunscreen agent on the suppression of natural killer cell activity induced in human subjects by radiation from solarium lamps. J Invest Dermatol 88:271-276
54. Ho KK, Halliday GM, Barnetson RSC (1992) Sunscreens protect epidermal Langerhans cells and Thy-1⁺ cells but not local contact sensitization from the effects of ultraviolet light. J Invest Dermatol 98:720-724.
55. Hogg N, Bates PA, Harvey J (1991) Structure and function of intercellular adhesion molecule-1. Chem Immunol 50:95-115
56. Homey B, Schuppe HC, Neubert T, Vohr HW, Ruzicka T, Lehmann P (1996) Protection from UV radiation-induced immunosuppression by a standard sunscreen: evaluation in a murine local lymph node assay. Abstract Arch Dermatol Res 288:323.
57. Homey B, Neubert T, Arens A, Schuppe HC, Ruzicka T, Lehmann P (1997) Sunscreens and immunosuppression. J Invest Dermatol 108:395-396

58. Hodges NDM, Moss SH, Davies DJG (1977). The sensitizing effect of a sunsreen agent, p-aminobenzoic acid, on near UV-induced damage in a repair deficient strain of Escherichia coli. *Photochem Photobiol* 26:493-498
59. Hruza LL, Pentland AP (1993). Mechanisms of UV-induced inflammation. *J Invest Dermatol* 100(suppl):35-41
60. Jung EG, Bohnert E (1995) Photobiology of ultraviolet radiation-induced DNA damage. In: *Photoimmunology*. Blackwell Science 1995
61. Kaidbey KH (1990): The photoprotective potential of the new superpotent sunscreens. *J Amer Acad Dermatol* 22(3):449-452
62. Keyse SM, Tyrrell RM (1987) Rapidly occuring DNA excision repair events determine the biological expression of UV induced damage in hman cells. *Carcinogenesis* 8:1251-1256
63. Khan IU, Boehm KD, Elmets CA (1993) Modulation of IFN- γ -induced HLA-DR expression on the human keratinocyte cell line SCC-13 by ultraviolet radiation. *Photochem Photobiol* 57:285-290
64. Kinlen LJ, Sheil AG, Peto J, Doll R (1979) Collaborative United Kingdom-Australiasian study of cancer in patients treated with immunosuppressive drugs. *Br Med J* 1462-1466
65. Kligman LH, Akin FJ, Kligman AM (1980) Sunscreens prevent ultraviolet photocarcinogenesis. *J Am Acad Dermatol* 3:30-35
66. Kligman LH, Akin FJ, Kligman AM (1982) Prevention of ultraviolet damage to the dermis of hairless mice by sunscreens. *J Invest Dermatol* 78:181-189
67. Kligman LH, Akin FJ, Kligman AM (1983) Sunscreen promote repair of ultraviolet radiation-induced dermal damage. *J Invest Dermatol* 81:98-102.
68. Kligman LH (1985) Protective effect of sunscreens against photoaging. *Drug and Cosmet Ind* 137:30-34.
69. Kochevar L (1995): Primary processes in photobiology and photosensitization. In: *Photoimmunology*. Blackwell Sciences Ltd. 1995
70. Koh HK, Kligler RA, Lew RA (1990): Sunlight and cutaneous malignant melanoma: evidence for and against causation. *Photochem Photobiol* 51 :765-779
71. Kopf AW, Kripke ML, Stern RS (1984): Sun and malignant melanoma. *J Amer Acad Dermatol* 11(4 Pt 1):674-684

72. Knowland J, McKenzie EA, McHugh PJ, Cridland NA (1993). Sunlight-induced mutagenicity of a common sunscreen ingredient. *FEBS Lett* 324:309-314
73. Krien PM, Moyal D (1994) Sunscreens with broad-spectrum absorption decrease the trans to cis photoisomerization of urocanic acid in the human stratum corneum after multiple UV light exposures. *Photochem Photobiol* 60:280-287
74. Kripke ML, Fisher MS (1976). Immunologic parameters of ultraviolet carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 57:211-215
75. Krutman J (2001a): Die Verwendung von topisch applizierten DNS-Reparaturenzymen zum Schutz der menschlichen Haut gegen UVB-induzierte Schäden. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 44:480-483
76. Krutmann J (2001b) Inhibitory effects of sunscreens on the development of skin cancer. *Hautarzt* 52:62-3.
77. Krutmann J (2001c) New developments in photoprotection of human skin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14:401-7
78. Krutman J (1992a) Pharmacological aspects of ICAM-1 regulation in the skin. In: *Pharmacology of the Skin*. In: *Pharmacology of the Skin* S. 316-328. Hrsg.: Mukthar H, Press CRC, Boca Raton, FL
79. Krutmann J, Bohnert E, Jung EG (1994) Evidence that DNA damage is a mediate in Ultraviolet B radiation effects on intercellular adhesion molecule-1 expression: ultraviolet B radiation effects on intercellular adhesion molecule-1 expression. *J invest Dermatol* 102:428-432
80. Krutmann J, Czech W, Parlow F, Trefzer U, Kapp A, Schopf E, Luger TA (1992b) Ultraviolet radiation effects on human keratinocyte ICAM-1 expression: UV-induced inhibition of cytokine-induced ICAM-1 mRNA expression is transient, differentially restored for IFN gamma versus TNF alpha, and followed by ICAM-1 induction via a TNF alpha-like pathway. *J Invest Dermatol* 98:923-8
81. Krutmann J, Köck A, Schauer E, Parlow F, Möller A, Kapp A, Förster E, Schöpf E, Luger TA (1990) Tumor necrosis factor beta and ultraviolet radiation are potent regulators of human keratinocyte ICAM-1 expression. *J. Invest. Dermatol.* 95:127-131
82. Krutmann J, Parlow F, Schöpf E, Elmetts CA (1991) Posttranscriptional modification of ICAM-1 expression on human antigen presenting cells by ultraviolet B (UVB) radiation *Clin Res* 39:1029

83. Kurimoto I, Streilein JW (1992) Cis-urocanic acid suppression of contact hypersensitivity induction is mediated via tumor necrosis factor- α . *J Immunol* 148: 3072-3078
84. Lambert HC, Hanawalt PC (1990) DNA repair mechanism and their biologic implications in mammalian cells. *J Am Acad Dermatol* 22:299-308
85. Larue L, Dougherty N, Mintz B (1992): Genetic predisposition of transgenic mouse melanocytes to melanoma results in malignant melanoma after exposure to a low ultraviolet B intensity nontumorigenic for normal melanocytes. *Proc Natl Acad Sci* 89:9534-9538
86. Lavker RM, Gerberick GF, Veres DA, Irwin CJ, Kaidbey KH (1995) Cumulative effects from repeated exposures to suberythemal doses of UVB and UVA in human skin. *J Am Acad Dermatol* 32: 53-62
87. Ley RD, Applegate LA (1985) Ultraviolet radiation-induced histopathologic changes in the skin of the marsupial *Monodelphis demistica*. II. Quantitative studies of the photoreactivation of induced hyperplasia and sunburn cell formation. *J Invest Dermatol* 85:365-367
88. Learn DB, Beard J, Noloney SJ (1993). The ultraviolet C energy emitted from FS lamps contributes significantly to the induction of human erythema and murine ear edema. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 9:147-153
89. Learn DB, Beasley DG, Giddens LD, Stanfield JW, Roberts LK (1995) Minimum doses of ultraviolet radiation required to induce murine skin edema and immunosuppression are different and depend on the ultraviolet emission spectrum of the source. *Photochem Photobiol* 62:1066-1075
90. Lehman AR, Bridges BA (1990) Sunlight-induced cancer: some new aspects and implications of the xeroderma pigmentosum model. *Br. J Dermatol* 122:115-119
91. Lisby S, Ralfkier E, Rotlein E, Veijsgard GL (1989) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression correlated to inflammation. *Br J Dermatol* 120:479-484
92. Long SD, Little JB (1984) Sunscreen agents induce DNA repair activity in mouse embryo fibroblasts. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 5:193-200
93. Lowe NJ, Breedings J (1980) Evaluation of sunscreen protection by measurement of epidermal DNA synthesis. *J Invest Dermatol* 74:181-182

94. Luger TA, Schwarz T (1990) Epidermal derived cytokines. In: Skin Immune System S. 257-292. Hrsg.: Bos JD, Press CRC, Boca Raton, Florida
95. McNaughton SA, Marks GC, Green AC (2005): Role of dietary factors in the development of basal cell cancer and squamous cell cancer of the skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14:1596-607
96. Menzies SW, Lukins PB, Greenoak GE (1991): A comparative study of fabric protection against ultraviolet-induced erythema determined by spectrophotometric and human skin measurements. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 8:157-163
97. Miescher G (1930) Das Problem des Lichtschutzes und der Lichtgewöhnung. *Strahlentherapie* 35:403
98. Mills J, Hauer L, Gottlieb A, Dromgoole S, Spruance S (1987) Recurrent herpes labialis in skiers. Clinical observations and effect of sunscreen. *American Journal of Sports Medicine* 15:76-78
99. Morales SV, Llopis M, Ferrer CE (1992): Non-melanoma skin cancer: an evaluation of risk in terms of ultraviolet exposure. *European Journal of Epidemiology* 8:838-844
100. Miyagi T, Bhutto AM, Nonaka S (1994) The effects of sunscreens on UVB erythema and Langerhans cell depression. *J Dermatol* 216:45-651
101. Morison WL (1984) The effect of a sunscreen containing para-aminobenzoic acid on the systemic immunologic alterations induced in mice by exposure to UVB radiation. *J Invest Dermatol* 76:246-251.
102. Morison WL, Pike RA, Kripke ML (1985a) Effect of sunlight and its component wavebands on contact hypersensitivity in mice and guinea pigs. *Photodermatology* 2:195-204
103. Morison WL, Kelley SP (1985b) Sunlight suppressing rejection of 280- to 320-nm UV-radiation-induced skin tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 74:525-527.
104. Morison WL (1989). Effects of ultraviolet radiation on the immune system in humans. *Photochem Photobiol* 50:515-24
105. Moyal DD, Fournanier AM (2002) Effects of UVA radiation on an established immune response in humans and sunscreen efficacy. *Exp Dermatol* 11 Suppl 1:28-32

106. Naylor MF, Boyd A, Smith DW, Cameron GS, Hubbard D, Neldner KH (1995) High sun protection factor sunscreens in the suppression of actinic neoplasia Arch Dermatol 131:170-5.
107. Nonaka S, Kaidbey KH, Kligman AM (1984) Photoprotective adaptation. Some quantitative aspects. Arch Dermatol 120:609-612
108. Norris PG, Limb GA, Hamblin AS, Lehmann AR, Arlett CF, Cole J, Waugh AP, Hawk JL (1990) Immune function, mutant frequency, and cancer risk in the DNA repair defective genodermatoses xeroderma pigmentosum, Cockayne's syndrome, and trichothiodystrophy. J Invest Dermatol 4:94-100
109. Norris DA, Lyons B, Middleton MH, Yohn JY, Kashihara-Sawami M (1990) Ultraviolet radiation can either suppress or induce expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on the surface of cultured human keratinocytes. J Invest Dermatol 95:132-138
110. Pathak MA (1982) Sunscreens: topical and systemic approaches for protection of humanskin against harmful effects of solar radiation. J Am Acad Dermatol 7:285-312.
111. Raab W (1994) Kinder und Sonnenschutz. Pharmazie 5:43-48
112. Reeve VE, Bosnic M, Boehm-Wilcox C, Ley RD (1991) Differential protection by two sunscreens from UV-radiation-induced immunosuppression. J Invest Dermatol 97:624-628
113. Reeve, VE (2001) Chemoprevention of photocarcinogenesis. In Photobiology for the 21st Century, Eds. Coohill TP, Valenzano DP, Valdenmar Publ. Co., Kansas, USA. pp. 41-51
114. Rivas JM, Ullrich SE (1992) Systemic suppression of delayed-type hypersensitivity by supernatants from UV-irradiated keratinocytes: an essential role for keratinocyte-derived interleukin-10. J Immunol 149:3865-3871
115. Roberts LK, Beasley DG (1995) Commercial sunscreen lotions prevent ultraviolet radiation induced immune suppression of contact hypersensitivity. J Invest Dermatol 105:339-344.
116. Roberts LK, Beasley DG, Learn DB, Giddens LD, Beard J, Stanfield JW (1996) Ultraviolet spectral energy differences affect the ability of sunscreen lotions to prevent ultraviolet-radiation-induced immunosuppression. Photochem Photobiol 63:874-884

117. Roberts LK, Beasley DG (1997) Sunscreen lotions prevent ultraviolet radiation-induced suppression of antitumor immune responses. *Int J Cancer* 71:94-102.
118. Robertson B, Gahring L, Newton T, Daynes R (1987) *In vivo* administration of IL-1 to normal mice decreases their capacity to elicit contact hypersensitivity responses: Prostaglandins are involved in this modification of immune function. *J Invest Dermatol* 88:380-387
119. Robertson B, Gahring L, Newton T et al. *In vivo* administration of IL-1 to normal mice decreases their capacity to elicit contact hypersensitivity responses: Prostaglandins are involved in this modification of immun function. *J Invest Dermatol* 1987; 88:380-387
120. Robson J, Diffey BL (1990): Textiles and sun protection. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 7:32-34
121. Romerdahl CA, Donawho CA, Fidler IJ, Kripke ML (1988): Effect of UV-B radiation on the *in vivo* growth of murine melanoma cells. *Cancer Res.* 48:1007-4010
122. Rooney JF, Bryson Y, Mannix ML, Dillon M, Wohlenberg CR, Banks S, Wallington CJ, Notkins AL and Straus SE (1991) Prevention of ultraviolet-light-induced herpes labialis by sunscreen. *Lancet* 338 :1419-1422
123. Routaboul C, Denis A, Vinche A (1999) Immediate pigment darkening: description, kinetic and biological function. *Eur J Dermatol* 9:95-9
124. Schwarz T, Urbanska A, Gschnait F, Luger TA (1987) UV-irradiated epidermal cells produce a specific inhibitor of IL-1 activity. *J Immunol* 138:1457-1463
125. Serre I, Cano JP, Picot MC, Meynadier J, Meunier L (1997) Immunosuppression induced by acute solar-simulated ultraviolet exposure in humans: prevention by a sunscreen with a sun protection factor of 15 and high UVA protection. *J Am Acad Dermatol* 37:187-194.
126. Setlow RB, Woodhead AD, Grist E (1989) Animal model for ultraviolet radiation-induced melanoma: platyfish-swordtail hybrid. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8922-8926
127. Setlow RB, Grist E, Thompson K, Woodhead AD (1993) Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci* 90(14):6666-6670
128. Shimoi K, Nakamura Y, Noro T, Tomita I, Fukushima S, Inoue T, Kada T (1985) Methyl cinnamate derivatives enhance UV-induced mutagenesis due to the inhibition of DNA excision repair in *Escherichia coli* B/r. *Mutat Res* 146:15-22

129. Singer KH, Tuck DT, Sampson HA, Hall RP (1989) Epidermal keratinocytes express the adhesion molecule intercellular adhesion molecule-1 in inflammatory dermatoses. *J Invest Dermatol* 92:746-750
130. Springer TA (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434
131. Spruance S (1985) Pathogenesis of Herpes simplex labialis: experimental induction of lesions with UV light. *J Clin Microbiol* 22:366-368
132. Stanford DG, Georgouras KE, Pailthorpe MT (1995): Sun protection by a summer-weight garment: the effect of washing and wearing. *Medical Journal of Australia* 162:422-425
133. Stauton DE, Marlin Sd, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA (1988) Primary structure of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin superfamily. *Cell* 52:925-933
134. Stege H, Grewe M, Gyufko K, Grether-Beck S, Roza L, Krutmann J (1995) Abstract *J Inves Dermatol* 104:601
135. Stege H, Roza L, Vink AA, Grewe M, Ruzicka T, Grether-Beck S, Krutmann J (2000) Enzyme plus light therapy to repair DNA-damage in ultraviolet-B-irradiated human skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1790-1795.
136. Stege H, Budde M, Grether-Beck S, Richard A, Rougier A, Ruzicka T, Krutmann J (2002a) Sunscreens with high SPF values are not equivalent in protection from UVA induced polymorphous light eruption. *Eur J Dermatol* 12:IV-VI
137. Stege H, Budde MA, Grether-Beck S, Richard A, Rougier A, Krutmann J (2002b) Evaluation of the capacity of sunscreens to photoprotect lupus erythematosus patients by employing the photoprovocation test. *Eur J Dermatol* 12:VII-IX
138. Stingl G, Gasse-Stingl LA, Aberer W, Wolff K (1981) Antigen presentation by murine epidermal Langerhans cells and its alterations by UVB light. *J Immunol* 127:1707-1713
139. Stingl G, Hauser C, Wolff K (1993) The epidermis: an immunologic microenvironment. In: *Dermatology in General Medicine*, fourth edition. Hrsg.: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF, McGraw-Hill, Inc.. S 172-197
140. Stingl G, Hauser C (1995) The Skin immune response. In: *Photoimmunology*. Blackwell Science Ltd S. 3-18

141. Sutherland BM (1980) P-aminobenzoic acid sunlamp sensitization of pyrimidine dimer formation and transformation in human cells. *Photochem Photobiol* 1082; 36:95-97
142. Sutherland JC, Griffin KP (1984) P-Aminobenzoic acid can sensitize the formation of pyrimidine dimers in DNA: direct chemical evidence. *Photochem Photobiol* 40:391-394
143. Swerdlow AJ (1979): Incidence of malignant melanoma of the skin in England and Wales and its relationship to sunshine. *Br Med J* 2:1324-1327
144. Synder DS, May M (197) Ability of PABA to protect mammalian skin from ultraviolet light-induced skin tumors and actinic damage. *J Invest Dermatol* 65:543-546
145. Teppo L, Pakkanen M, Hakulinen T (1978): Sunlight as a risk factor of malignant melanoma of the skin. *Cancer* 41(5):2018-2027
146. Thompson SC, Jolley D, Marks R (1993) Reduction of solar keratoses by regular sunscreen use. *N Engl Med* 329:1147-1151
147. Tornaletti S, Rozek D, Pfeifer GP (1993): The distribution of UV photoproducts along the human p53 gene and its relation to mutations in skin cancer. *Oncogene* 8:2051-2057
148. Trefzer U, Brockhaus M, Loetscher H, Parlow F, Budnik A, Grewe M, Christoph H, Kapp A, Schoepf E, Luger TA, Krutmann J (1993) The 55kd tumor necrosis factor receptor on human keratinocytes is regulated by tumor necrosis factor alpha and by ultraviolet B radiation *J Clin Invest* 92:462-470
149. Trefzer U, Krutmann J (1995) Adhesion molecules as molecular targets in ultraviolet B radiation (290-315nm)-induced immunomodulation: UVB radiation effects on the expression of intercellular adhesion molecule-1 in human cells. In: *Photoimmunology*. Hrsg.: Krutmann J, Elmets CA, Blackwell Science Ltd
150. Ullrich SE (1995). The role of epidermal cytokines in the generation of cutaneous immune reactions and ultraviolet radiation-induced immune suppression. *Photochem Photobiol* 62:389-401
151. van Praag MC, Out-Luijting C, Claas FH, Vermeer BJ, Mommaas BJ (1991) Effect of topical sunscreens on the UV-radiation-induced suppression of the alloactivating capacity in human skin in vivo. *J Invest Derm* 97:629-633.
152. van Praag MC, Roza L, Boom BW, Out-Luijting C, Henegouwen JB, Vermeer BJ, Mommaas AM (1993) Determination of the photoprotective efficacy of a

- topical sunscreen against UVB-induced damage in human epidermis. *J Photochem Photobiol B Bio* 19:129-134
153. Walker SL, Morris J, Chu AC, Young AR (1994) Relationship between the ability of sunscreens containing 2-ethylhexyl-4'-methoxycinnamate to protect against UVR-induced inflammation, depletion of epidermal Langerhans (Ia⁺) cells and suppression of alloactivation capacity of murin skin *in vivo*. *J Photochem Photobiol* 22:29-36.
154. Walker SL, Young AR (1997). Sunscreens offer the same UVB protection factors for inflammation and immunosuppression in the mouse. *J Invest Dermatol* 108:133-138
155. Widyarini S, Spinks N, Husband AJ, Reeve VE (2001) Isoflavonoid compounds from red clover (*Trifolium pratense*) protect from inflammation and immune suppression induced by UV radiation. *Photochem Photobiol* 74:465-470
156. Whitmore SE, Morison WL (1995) Prevention of UVB-induced immunosuppression in humans by a high sun protection factor sunscreen. *Arch Dermatol* 131:1128-1133.
157. Wolf P, Donawho CK, Kripke ML (1993a) Analysis of the protective effects of different Sunscreens on ultraviolet radiation-induced local and systemic suppression of contact hypersensitivity and inflammatory disease in mice. *J Invest Dermatol* 100:254-259.
158. Wolf P, Yarosh DB, Kripke ML (1993b). Effects of sunscreens and a DNA excision repair enzyme on ultraviolet radiation-induced inflammation, immune suppression, and cyclobutane pyrimidine dimer formation in mice. *J Invest Dermatol* 101:523-527
159. Wolf P, Donawho CK, Kripke ML (1994) Effect of sunscreens on UV radiation-induced enhancement of melanoma growth in mice. *J Natl Cancer Inst* 86:99-105
160. Wolf P, Cox P, Yarosh DB, Kripke ML (1995) Sunscreens and T4N5 liposomes differ in their ability to protect against UV-induced sunburn cell formation, alterations of dendritic epidermal cells, and local suppression of contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 104:287-292
161. Wright MW, Wright ST, Wagner RF (2001) Mechanisms of sunscreen failure. *J Am Acad Dermatol* 44:781-4.

162. Wulf HC, Poulsen T, Brodthagen H, Hou-Jensen K (1982) Sunscreens for delay of ultraviolet induction of skin tumors. *J Am Acad Dermatol* 7:194-202
163. Wysenbeek AJ, Weiss H, Duczyminer-Kahana M, Grunwald MH, Pick AI (1986) Immunologic alterations in xeroderma pigmentosum patients. *Cancer* 58:219-221
164. Yarosh D, Klein J, OConner A, Hawk J, Rafal E, Wolf P (2001) Effect of topically applied T4 endonuclease V in liposome on skin cancer in xeroderma pigmentosum: a randomised study. Xeroderma pigmentosum study group. *Lancet* 24:926-929.
165. Yohn JJ, Critelli M, Lyons MB, Norris DA (1990) Modulation of melanocyte intercellular adhesion molecule-1 by immune cytokines. *J Invest Dermatol* 90:233-237
166. Zanetti R, Prota G, Napolitano A, Martinez C, Sancho-Garnier H, Osterlind A, Sacerdote C, Rosso S. (2001) Development of an integrated method of skin phenotype measurement using the melanins. *Melanoma Res* 11:551-7
167. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE (1994): Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372:773-776

6 ANHANG

Ergebnisse Bestimmung der minimalen Erythemdosis mit FS20 sunlamps:

Proband	Hauttyp	25 mJ/cm ²	50 mJ/cm ²	75 mJ/cm ²	100 mJ/cm ²	125 mJ/cm ²	150 mJ/cm ²
1	I-II	+	+	+	+	+	+
2	I-II	-	+	+	+	+	+
3	III	-	-	+	+	+	+
4	I-II	+	+	+	+	+	+
5	I-II	+	+	+	+	+	+
6	III	-	-	-	+	+	+
7	I-II	-	+	+	+	+	+
8	III	-	-	+	+	+	+
9	I-II	+	+	+	+	+	+
10	I-II	+	+	+	+	+	+
11	III	-	-	-	-	+	+
12	I-II	-	+	+	+	+	+
13	I-II	+	+	+	+	+	+
14	I-II	-	+	+	+	+	+
15	III	-	-	-	+	+	+
16	I-II	-	-	+	+	+	+
17	III	-	-	-	+	+	+
18	III	-	-	+	+	+	+
19	I-II	-	+	+	+	+	+
20	I-II	+	+	+	+	+	+

Tab. .9: Bestimmung der minimalen Erythemdosis mit FS20 sunlamps

Ergebnisse Erytheminduktion:

Proband	MED mJ/cm ²	IFN- γ	UVB IFN- γ	Parsol UVB (3x MED) IFN- γ	Parsol UVB (9x MED) IFN- γ
1	50	-	+	-	-
2	75	-	+	-	-
3	25	-	+	-	-
4	25	-	+	-	-
5	100	-	+	-	-

Tab.10 : Erytheminduktion (Parsol- 3MED und 9MED)

Legende: + Erythem
- kein Erythem

Proband	MED mJ/cm ²	IFN- γ	UVB IFN- γ	Uvinul UVB (3x MED) IFN- γ	Uvinul UVB (6x MED) IFN- γ
6	100	-	+	-	-
7	50	-	+	-	-
8	75	-	+	-	-
9	25	-	+	-	-
10	25	-	+	-	-

Tab11.: Erytheminduktion (Uvinul- 3MED und 6MED)

Legende: + Erythem
- kein Erythem

Proband	MED	IFN- γ	UVB	Parsol	Parsol	Parsol	Parsol
---------	-----	---------------	-----	--------	--------	--------	--------

	mJ/cm ²		IFN- γ	UVB 4x MED IFN- γ	UVB 5x MED IFN- γ	UVB 6x MED IFN- γ	UVB 7x MED IFN- γ
11	125	-	+	-			-
12	50	-	+	-			-
13	25	-	+	-	-	-	
14	50	-	+	-	-	-	
15	100	-	+	-	-	-	-

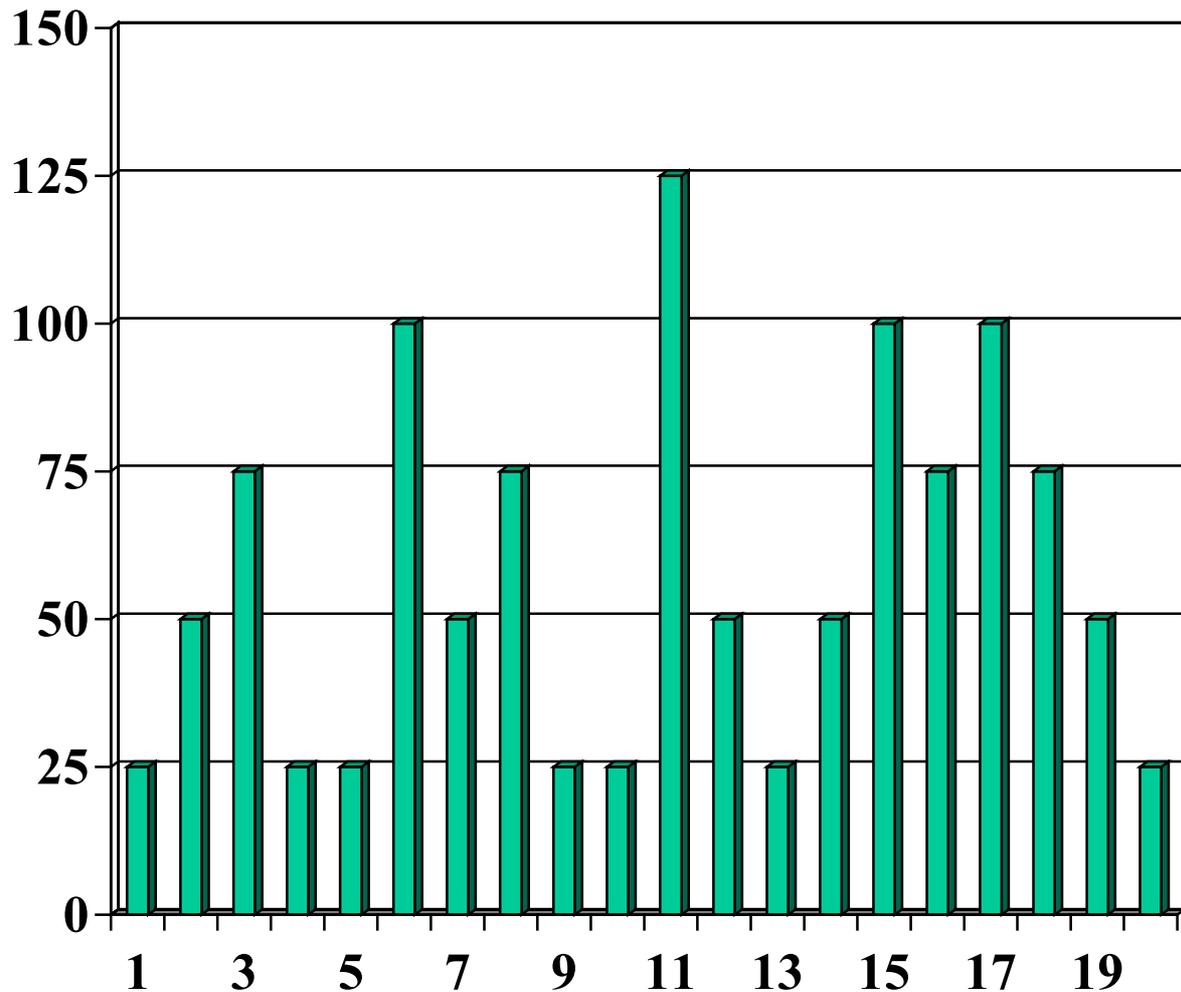
Tab.12: Erytheminduktion (Parsol- 4MED bis 7MED)

Legende: + Erythem
- kein Erythem

Proband	MED mJ/cm ²	IFN- γ	UVB IFN- γ	Uvinul UVB 4x MED IFN- γ	Uvinul UVB 5x MED IFN- γ	Uvinul UVB 6x MED IFN- γ
16	75	-	+	-	-	-
17	100	-	+	-	-	-
18	75	-	+	-	-	-
19	50	-	+	-	-	-
20	25	-	+	-	-	-

Tab.13: Erytheminduktion (Uvinul- 4MED bis 6MED)

Legende: + Erythem
- kein Erythem



Tab.14: Ermittlung der MED mittels FS20 sunlamps

Zusammenfassung:

y-Achse (Ordinate): MED in mJ/cm²

x-Achse (Abszisse:) Teilnehmer Nummer

Durchschnittliche MED: 57,5 mJ/cm²

Abweichung: 30.72

Immunhistochemische Befunde

Proband	MED mJ/cm ²	IFN- γ	UVB IFN- γ	Parsol UVB (3x MED) IFN- γ	Parsol UVB (9x MED) IFN- γ
1	50	+++	-	+++	-
2	75	++	-	++	-
3	25	+	-	-/+	-
4	25	+++	-/+	++	-
5	100	+++	-	+++	-

Tab. 15: Immunhistochemische Befunde (Parsol- 3MED und 9MED)

Legende: +++ sehr starke ICAM-1 Expression
 ++ starke ICAM-1 Expression
 + schwache ICAM-1 Expression
 - keine ICAM-1 Expression
 -/+ nur fokale ICAM-1 Expression

Zusammenfassung:

Erythemprotektion: 100% bei 3 MED und 100 % bei 9 MED

Immunprotektion: 100% bei 3 MED und 0% bei 9 MED

Proband	MED mJ/cm ²	IFN- γ	UVB IFN- γ	Uvinul UVB (3x MED) IFN- γ	Uvinul UVB (6x MED) IFN- γ
6	100	+++	-	++	-
7	50	++	-	+++	-
8	75	+	-	++	-
9	25	+++	-	++	-
10	25	+++	-	+++	-

Tab.16: Immunhistochemische Befunde (Uvinul- 3MED und 6MED)

Legende: +++ sehr starke ICAM-1 Expression
 ++ starke ICAM-1 Expression
 + schwache ICAM-1 Expression
 - keine ICAM-1 Expression
 -/+ nur fokale ICAM-1 Expression

Zusammenfassung:

Erythemprotektion: 100% bei 3 MED und 100 % bei 6 MED

Immunprotektion: 100% bei 3 MED und 0% bei 6 MED

Proband	MED mJ/cm ²	IFN- γ	UVB IFN- γ	Parsol UVB 4x MED IFN- γ	Parsol UVB 5x MED IFN- γ	Parsol UVB 6x MED IFN- γ	Parsol UVB 7x MED IFN- γ
11	125	+++	-	++			-
12	50	++	-	+++			-
13	25	++	-		++	-	
14	50	+++	-		+	-/+	
15	100	++	-		+	+	-

Tab.17: Immunhistochemisch Befunde (Parsol- 4 MED bis 7MED)

Legende: +++ sehr starke ICAM-1 Expression
 ++ starke ICAM-1 Expression
 + schwache ICAM-1 Expression
 - keine ICAM-1 Expression
 -/+ nur fokale ICAM-1 Expression

Zusammenfassung:

Erythemprotektion: 100% bis 7 MED

Immunprotektion: 100% bei 5 MED

 partiell bei 6 MED

 0% bei 7 MED

Proband	MED mJ/cm ²	IFN- γ	UVB IFN- γ	Uvinul UVB 4x MED IFN- γ	Uvinul UVB 5x MED IFN- γ	Uvinul UVB 6x MED IFN- γ
16	75	-	+	++		-
17	100	-	+	+++		-
18	75	-	+	++	-/+	
19	50	-	+	++	-	
20	25	-	+	+++	+	-

Tab.18: Immunhistochemische Befunde (Uvinul- 4MED bis 6MED)

Legende: +++ sehr starke ICAM-1 Expression
 ++ starke ICAM-1 Expression
 + schwache ICAM-1 Expression
 - keine ICAM-1 Expression
 -/+ nur fokale ICAM-1 Expression

Zusammenfassung:

Erythemprotektion: 100% bis 7 MED

Immunprotektion: 100% bei 4 MED
 partiell bei 5 MED
 0% bei 6 MED

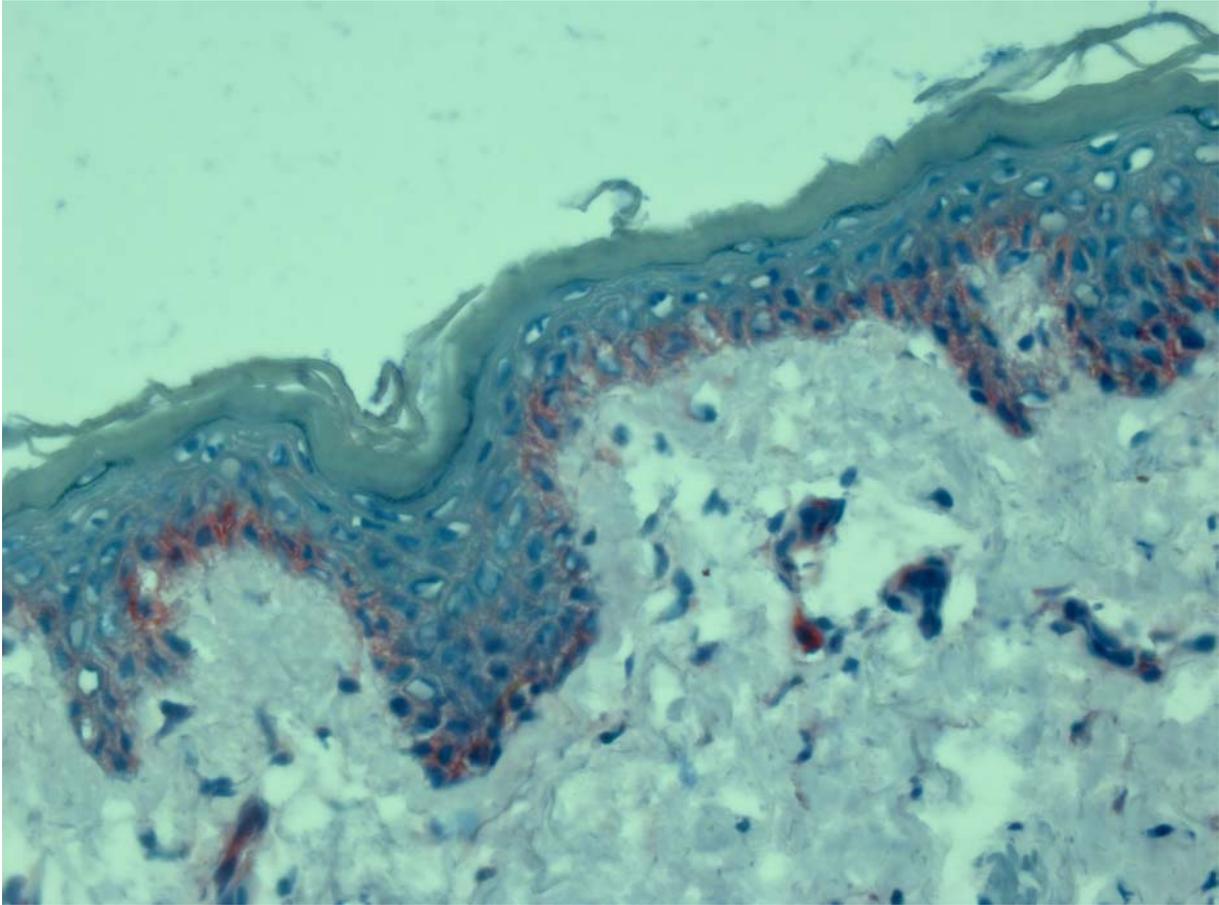


Abb7.: IFN γ -induzierte ICAM1-Aufregulation auf basalen Keratinozyten

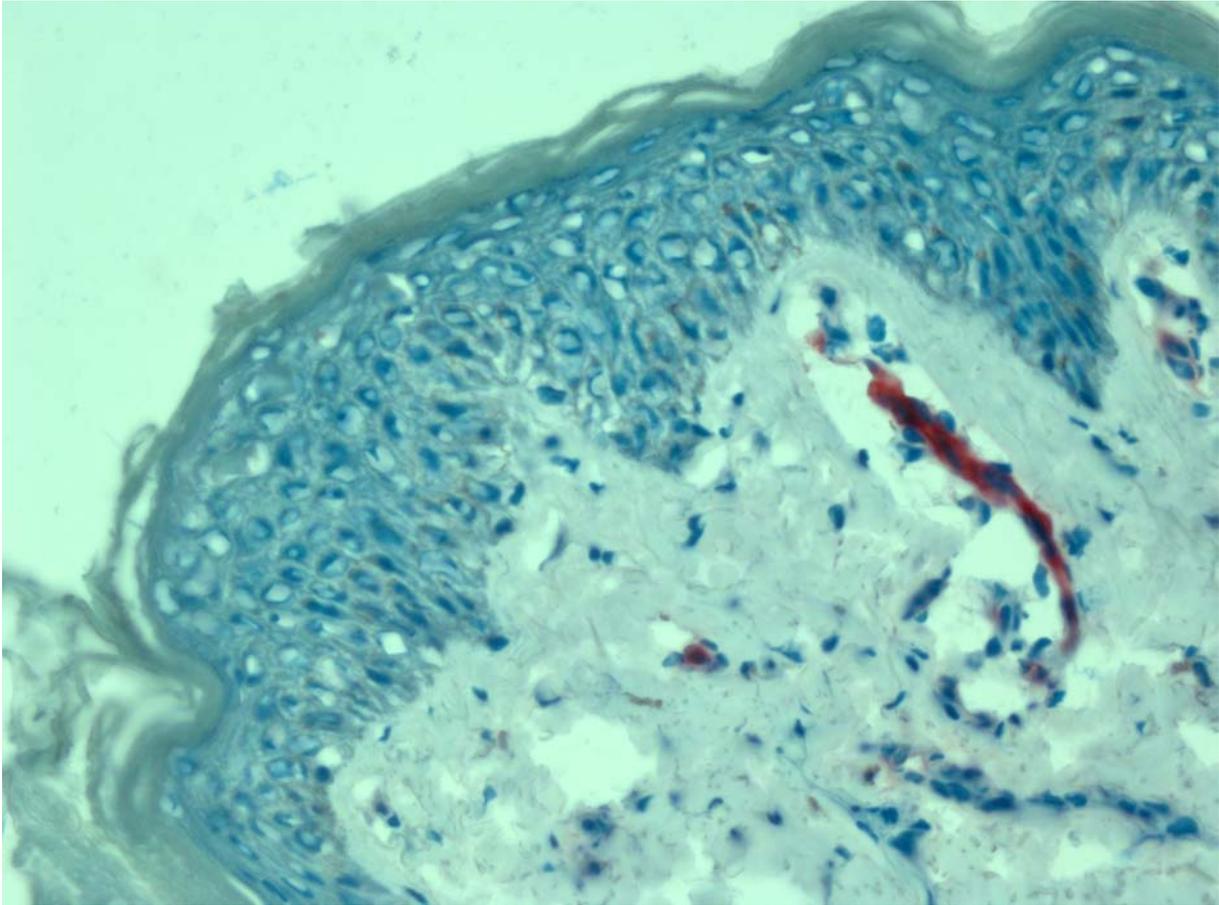


Abb.8:UVB-induzierte Suppression der IFN γ -induzierten ICAM1-Aufregulation

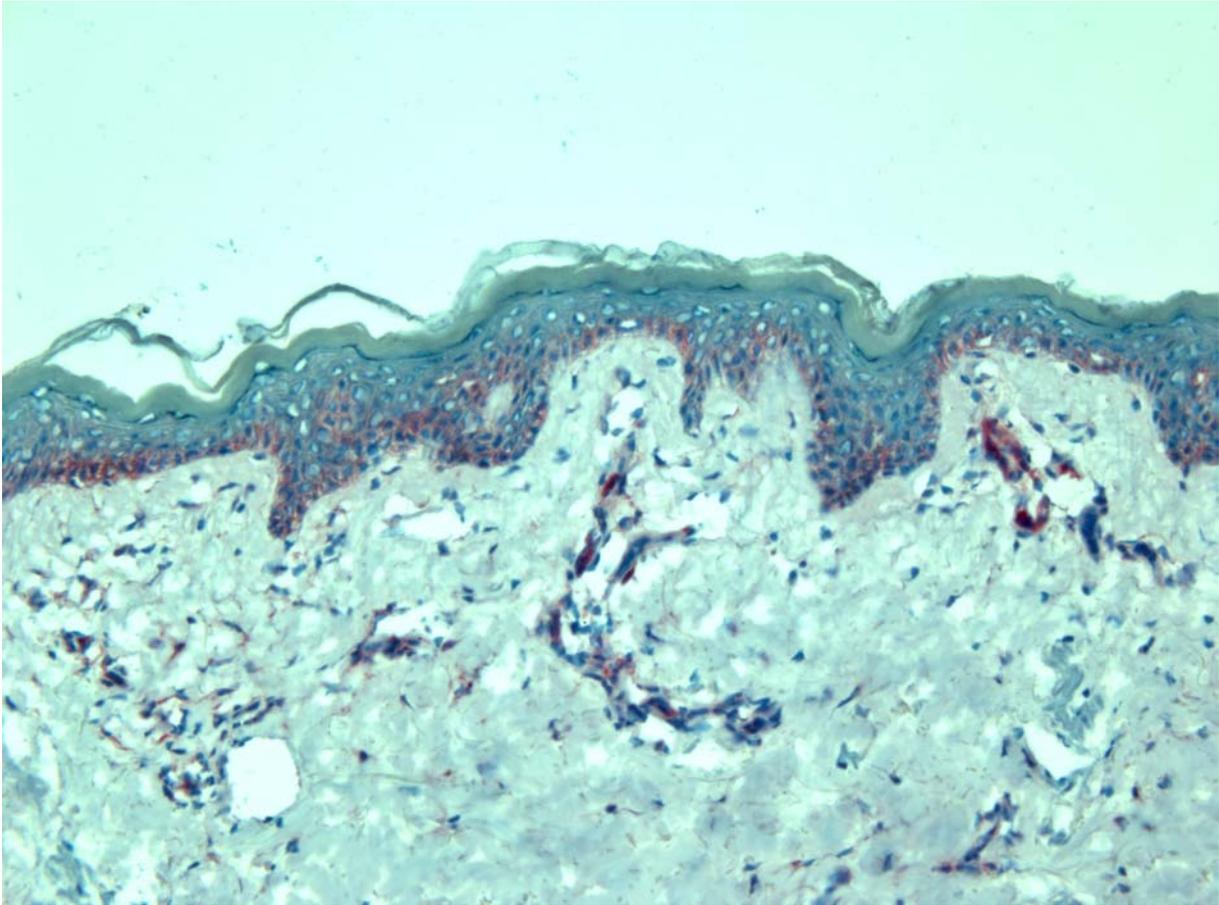


Abb.9: *IFN γ -induzierte ICAM1-Aufregulation auf basalen Keratinozyten nach Applikation eines UV-Filters und Bestrahlung mittels UVB*

7 CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Name: Rauch, geb. Malek
Vorname: Lucie
Geburtsdatum: 14. März 1972
Geburtsort: Prag
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung:

1978-1982 Grundschule in Düsseldorf
1982-1991 Theodor-Fliedner-Gymnasium in Düsseldorf
1992-1997 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
1998-1999 Arzt im Praktikum, Hautklinik Universitätsklinikum Düsseldorf
Seit 1999 Assistenzärztin, Hautklinik Universitätsklinikum Düsseldorf
Seit 11/2005 Fachärztin für Haut-und Geschlechtskrankheiten mit Zusatzbezeichnung „Allergologie“

8 DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. med. Jean Krutmann danke ich für die Überlassung des Themas.

Weiterhin möchte ich Herrn PD Dr. med. Helger Stege für die Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit danken.

Mein Dank gilt auch Frau Winkler und Frau Moritz, die mir bei der Erstellung der histologischen Präparate hilfreich zur Seite standen.

Frau PD Dr. J. Reifenberger danke ich für die Hilfe bei der Ablichtung der Schnittpräparate.

Sämtlichen Probanden, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, gilt ebenfalls mein Dank.

Meinen lieben Eltern möchte ich danken - für alles.

Mein tiefempfundener Dank gilt meinem Ehemann und meinen Kindern Julius, Magnus und Justus für die tatkräftige und liebevolle Unterstützung.

9 ZUSAMMENFASSUNG (Abstract)

Sonnenschutzfilter dienen der Prophylaxe von akuten und chronischen UV-Schäden. Der LSF trifft eine Aussage über die erythemprotektive Wirkung im Bereich der UV-B-Strahlung, gibt jedoch keine Auskunft über den UV-A-Schutz oder eine eventuell vorhandene oder fehlende immunprotektive Wirkung.

Verschiedene Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* im Tiermodell haben sich mit der Frage der immunprotektiven Eigenschaften von Sonnenschutzfiltern auseinandergesetzt, allerdings gibt es nur wenige Arbeiten, die sich mit den *in vivo* Bedingungen im humanen Modell auseinandersetzen.

Es konnte belegt werden, dass steigende Dosen von UV-B-Strahlung (0-100 J/m²) in transformierten (KB Zellen) oder normalen humanen Keratinozyten (HNK), dosisabhängig die Zytokin-(IFN- γ , TNF α)-induzierte ICAM-1-Expression inhibieren. Diese Eigenschaft wurde in dieser Arbeit zu nutze gemacht, um im humanen *in vivo* Testsystem, den Nachweis zu erbringen, dass Lichtschutzfilter in der Lage sind vor UV-B bedingter Immunsuppression zu schützen. Als biologischer Marker wurde hierfür die UV-B-induzierte Hemmung der zytokinabhängigen ICAM-1 Expression als Read-out-System genutzt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass eine 2%-ige Uvinul-Formulierung und eine 5%-ige Parsol-Formulierung in der Lage sind, nicht nur vor UV-B-Strahlung im Bereich des ausgewiesenen LSF zu schützen, sondern auch in erheblichem Maße vor UV-B bedingter Suppression der IFN- γ -induzierter ICAM-1 Aufregulierung. Hiernach sind diese Lichtschutzfilter also in der Lage nicht nur vor UV-B bedingtem Erythem sondern auch vor UV-B bedingter Immunsuppression zu schützen.