Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Die Modulation der kutanen Durchblutung unter blauem LED-Licht der Wellenlänge 453 nm und dessen Auswirkung auf die Zellvitalität

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Kim Christin Kotte

2019

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

Zweitgutachter: PD Dr. med. Stephan Meller

I. Zusammenfassung:

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger Botenstoff des menschlichen Organismus. Vor allem als Mediator der Gefäßrelaxation durch Aktivierung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) ist NO entscheidend an der Blutdruckregulation und Gewebsdurchblutung beteiligt [1-3]. Daher spielt NO eine bedeutsame Rolle bei der Genese pathophysiologischer Veränderungen, wie bspw. der endothelialen Dysfunktion [4-6] oder bei Wundheilungsstörungen [7-9]. Neben einer enzymatischen NO-Synthese [10, 11] konnte eine lichtinduzierte enzymunabhängige NO Synthese aus Nitroderivaten nachgewiesen werden [12, 13]. NO selbst ist ein flüchtiges Gas, welches in vivo schnell zu Nitroderivaten abreagiert. In Studien wurde die Existenz stabiler Nitroderivate als NO-Speicherformen im Blut mit physiologischer Wirksamkeit gezeigt [14-17]. Daneben könnten auch die in hohen Konzentrationen auf und in der Haut vorkommenden Nitroderivate wie Nitrit (NO_2^-) und S-Nitrosothiole (RSNO) von physiologischer Relevanz sein [18, 19]. Es konnte gezeigt werden, dass die Irradiation mit blauem Licht der Wellenlänge 420-453 nm zu einer NO vermittelten Steigerung der kutanen Durchblutung, zum Abfall des systemischen Blutdrucks, sowie zur Anreicherung kutaner RSNO führt [20]. Dies wird der Photolyse von NO_2^- und RSNO unter Entstehung aktiver NO-Intermediate zugeschrieben [17]. Die Anreicherung kutaner Nitroderivate konnte dabei durch die Applikation nitrithaltiger Lösungen und Emulsionen gesteigert werden [21, 22]. In mehreren Studien konnte bereits die Wirksamkeit einer Blaulichttherapie bei der Behandlung mehrerer Krankheitsbilder, wie bspw. der Psoriasis vulgaris oder bei Wundheilungsstörungen gezeigt werden [23]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmalig die Modulation der kutanen Durchblutung durch die Bestrahlung mit kontinuierlichem und gepulstem blauem Licht (453 nm) untersucht werden. Durch einen gepulsten Modus des blauen Lichtes könnten ggf. mehr Nitroderivate pro Zeit gespalten werden ohne zu einem stärkeren Temperaturanstieg oder verstärkter Toxizität zu führen. Dazu wurden die Unterarme von 13 Probanden mittels 453 nm in zwei kontinuierlichen und zwei gepulsten Modi bestrahlt und die Temperatur, sowie die kutane Durchblutung mittels Dopplerspektrometrie gemessen. Verschiedene Methoden zur Messungen des Nitritgehaltes der Haut mittels Chemiluminiszenzdetektion wurden getestet, sowie diverse Toxizitätstests mit und ohne Nitritapplikation an artifiziellen humanen Keratinozyten und Hautexplantaten durchgeführt. Insgesamt zeigte sich ein signifikanter Anstieg der kutanen Durchblutung unter allen Modi des blauen Lichtes. Der größte Blutflussanstieg wurde mit einem gepulsten Modus des blauen Lichtes (Peak 100 mW/cm^2; $\bar{X}$ 50 mW/cm^2) erreicht. Im Hinblick auf die NO Freisetzung aus nitrithaltigen Lösungen unter blauem Licht, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen kontinuierlichem oder gepulstem Licht. Es konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung mit blauem Licht über einen Zeitraum von 15 Minuten keine irritativen, korrosiven oder apoptotischen Veränderungen in humanen Keratinozyten induziert. Auch eine mehrmalige Anwendung oder Anwendungszeiten von 60 Minuten zeigten keine signifikant erhöhte Apoptoserate. Die Behandlung mit gepulstem blauem Licht bietet daher einen interessanten therapeutischen Ansatz im Hinblick auf eine Vielzahl von Krankheitsbildern, welche auf einer Dysregulation der NO Homöostase beruhen.

II. Summary

Nitric oxide (NO) is an important second messenger in the human organism. Especially as mediator of vascular relaxation by activation of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), NO plays a crucial role in blood pressure regulation and tissue perfusion [1-3]. Therefore, NO plays a decisive role in the genesis of diseases with impaired NO homeostasis, such as endothelial dysfunction as the pathophysiological correlate of cardiovascular diseases [4-6] or in wound healing disorders [7-9]. In addition to enzymatic NO synthesis [10, 11] a light-induced enzyme-independent NO synthesis from nitro derivatives was found [12, 13]. NO itself is a volatile gas which reacts rapidly in vivo to nitro derivatives. Studies have shown the existence of NO storage forms circulating in the blood in the form of stable nitro derivatives with physiological efficacy [14-17]. In addition, the nitro derivatives occurring in high concentrations on and in the human skin, such as nitrite and S-nitrosothiols (RSNO), could also be of physiological relevance [18, 19]. It was shown that not only irradiation with UVA [20-22], but also irradiation with blue light of wavelength 420 - 453 nm leads to an NO-mediated increase in cutaneous blood flow and to a decrease in systemic blood pressure, as well as to the accumulation of cutaneous RSNO [23]. This is attributed to the photolysis of nitrite and RSNO with the formation of active NO intermediates [17]. Enrichment of cutaneous nitro derivatives and therefore possible higher NO yields under irradiation could be achieved by application of nitrite-containing solutions and emulsions [24, 25]. In several studies the effectiveness of a blue light therapy in the treatment of diseases such as psoriasis vulgaris, acne vulgaris, wound healing disorders, Bowen's disease or actinic keratosis has already been demonstrated [26]. The aim of this study was to investigate the modulation of cutaneous blood circulation under irradiation with continuous and pulsed blue light (453 nm). By a pulsed mode of the blue light more nitro derivatives per time could be decomposed without leading to a higher temperature rise or increased toxicity. The forearms of 13 test persons were irradiated with 453 nm in two continuous and two pulsed modes of 453 nm light and the temperature and the cutaneous blood flow were measured by Doppler spectrometry. Various methods for measuring the nitrite content of the human skin using chemiluminescence detection were tested and various toxicity tests with and without nitrite application were performed on artificial human keratinocytes and skin specimen. Overall, there was a significant increase in cutaneous blood flow under all modes of blue light. The greatest increase in blood flow was achieved with a pulsed blue light mode (peak intensity 100 mW/cm2; $\bar{x}$ 50 mW/cm2). No difference in NO release from nitrite-containing solutions under blue light was found comparing continuous with pulsed blue light irradiation. It was shown that irradiation with blue light over a period of 15 minutes does not induce irritative, corrosive or apoptotic changes in human keratinocytes. Even repeated application or application duration of up to 60 minutes showed no significant increase in apoptotic keratinocytes. Treatment with pulsed blue light therefore offers an interesting therapeutic approach to a variety of diseases based on dysregulation of NO homeostasis.

III. Abkürzungsverzeichnis

A.U. ..... *Arbitrary Units*

ATP ..... *Adenosintriphosphat*

AUC ..... *Area under the Curve*

BCA ..... *Bicinchoninsäure*

BH_4 ..... *Tetrahydrobiopterin*

cGK I ..... *zyklische Proteinkinase I*

cGMP ..... *zyklisches Guanosinmonophosphat*

CLD ..... *Chemiluminiszenzdetektor*, *Chemiluminiszenzdetektor*

cNOS ..... *konstitutive NOS*

CO_2 ..... *Kohlenstoffdioxid*

CPDs ..... *Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere*

DNA ..... *Desoxyribonukleinsäure*

EDRF ..... *Endothelium derived relaxing factor*

ELISA ..... *Enzyme linkes Immunosorbent assay*

eNOS ..... *endotheliale NOS*

FAD ..... *Flavinadenindinukleotid*

FMN ..... *Flavinadeninmononukleotid*

GSH ..... *Glutathion*

GSNO ..... *S-Nitrosoglutathion*

H_2SO_4 ..... *Sulfoxylsäure*

Hb ..... *Hämoglobin*

HRP ..... *Streptavidin-Horseradishperoxidase*

IL-1α *Interleukin-1-alpha*

iNOS ..... *induzierbare NOS*

KI ..... *Konfidenzintervall*

L-NMMA..... *N-Methylargininacetatsalz*

LPS ..... *Lipopolysaccharid*

MLC ..... *Myosin Light chain phosphatase*

MTT ..... *Tetrazoniumsalz-3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid*

N_2O_3..... *Distickstofftrioxid*

NaCL..... *Natriumchlorid*

NADPH ..... *Nikotinamidadenindinukleotidphophat*

nNOS ..... *neuronale NOS*

NO ..... *Stickstoffmonoxid*

NO_2 ..... *Nitrit*

NOS ..... *NO-Synthase*

NO-S-alb..... *S-Nitrosoalbumin*

O2C ..... *Oxygen to see*

$ONOO^-$) ..... *Peroxynitrit*

PBS..... *Phosphatgepufferte Salzlösung*

ppb..... *parts per billion*

RBC ..... *Red Blood Cells*

RNNO ..... *N-Nitrosoverbindungen*

RNOI..... *Stickoxidintermediate*

ROS ..... *reaktive Sauerstoffradikale*

RSNOs..... *S-Nitrosoverbindungen*

rTdT ..... rekombinante terminale Desoxynukleotidyltransferase

SDS ..... *Natriumlaurylsulfat*

sGC ..... *lösliche Guanylatzyklase*

SNO-Hb ..... *S-Nitrosohämoglobin*

SO_2 ..... *Sauerstoffsättigung*

Str. ..... *Stratum*

TMB ..... *Tetramethylbenzidin*

TUNEL ..... Terminal Transferase mediated dUTP Nick End Labeling

UV ..... *Ultraviolett*

UV-Licht ..... *Ultraviolettes Licht*

1. Inhaltsverzeichnis

2. Einleitung 1

1.1 Anatomischer Aufbau und Funktion der humanen Epidermis 2

1.2 Die vielseitigen physiologischen Wirkungen von NO 4

1.2.1 NO als Vasodilatator 4

1.2.2 NO als Mediator der hypoxischen Vasodilatation via SNO-Hämoglobin 6

1.2.3 NO als Regulator von Stoffwechselprozessen 7

1.2.4 Krankheitsbilder mit veränderter NO-Homöostase 9

1.3 Der Stickstoff-Metabolismus 10

1.3.1 Enzymatische NO-Synthese 10

1.3.2 Nicht-enzymatische NO-Synthese durch Photodekomposition. 12

1.3.3 Kutane Nitroderivate als NO-Speicherform 12

1.3.4 Toxische Effekte durch UV-Strahlung 15

1.3.5 NO-Freisetzung aus Nitroderivaten unter blauem Licht (420 – 453 nm) 17

3. Ziele der Arbeit 18

4. Material und Methoden 20

1.4 Materialien und Geräte 20

1.4.2 Gewebe 23

1.4.3 Geräte 25

1.5 Methoden 30

1.5.1 Probanden-Bestrahlung mit blauem Licht (453 nm) verschiedener Intensitäten . 30

1.5.2 Messung des Nitritgehaltes der Haut 32

1.5.3 Temperaturkontrolle des Blutflussanstiegs mittels Föhn 32

1.5.4 Statistische Analyse der Blutflussdaten mittels Loess-Regression 33

1.5.5 Messung der NO-Freisetzung aus Hauthomogenisaten unter 453 nm 34

1.5.6 Berechnung der Molarität der NO-Metabolite 36

1.5.7 BCA-Proteinbestimmung 36

1.5.8 Die Bestrahlung nitrosierter BSA-Lösung mit 453 nm blauem Licht 37

1.5.9 Die Toxizität mehrfacher Bestrahlung der menschlichen Haut mit 453 nm 41

1.5.10 Die Evaluation der Toxizität von 453 nm an artifiziell gezüchteter Epidermis 41

1.5.11 Zellviabilitätsprüfung nach Irradiation mit 453 nm Licht 42

1.5.12 Fluoreszenz-mikroskopische Darstellung von DNA-Strangbrüchen: TUNEL-Assay 46

5. Ergebnisse 50

1.6 Die Steigerung der kutanen Perfusion unter Bestrahlung mit 453 nm blauem LED-Licht 50

1.6.1 Zunahme des Blutflusses in Relation zum Ausgangswert 56

1.6.2 Statistische Analyse des Blutflussanstiegs mittels LOESS-Regression 57

1.6.3 Responder/Non-Responder 66

1.6.4 Vergleich der blutflusssteigernden Potenz der Settings 1-4 unter Berücksichtigung des Temperaturanstiegs 68

1.6.5 Anstieg der kutanen Durchblutung unter externer Wärmezufuhr ohne 453 nm ... 73

1.7 Veränderung der kapillarvenösen Sauerstoffsättigung (SO_2) unter 453 nm 74

1.7.1 Relativer Anstieg der Sauerstoffsättigung unter 453 Licht in Relation zum Temperaturanstieg 79

1.8 NO-Metabolite in humanen Hautexplantaten nach Behandlung mit 453 nm 81

1.9 RSNO in bestrahlter Vollhaut 82

1.10 Apoptotische Ereignisse in humanen Hautexplantaten nach dreimaliger Bestrahlung 85

1.11 Kinetik der Dekomposition von nitrosiertem BSA unter kontinuierlichem und gepulstem blauem Licht 88

1.12 Toxizitätstest an Keratinozyten nach Behandlung mit 453 nm 92

1.12.1 Zellviabilität nach Bestrahlung mit blauem Licht 92
1.12.2 Irritation humaner Keratinozyten nach 453 nm 95
1.12.3 Korrosion humaner Keratinozyten nach 453 nm 97
1.12.4 Apoptotische Ereignisse in Episkin nach Bestrahlung mit 453 nm Licht 99
6. Diskussion 103
1.13 Anstieg der kutanen Durchblutung unter 453 nm 103
1.13.1 Der Weg des NO in der Haut: 106
1.13.2 Thermisch induzierte NO-vermittele Vasodilatation 111
1.13.3 Korrelation Blutflussanstieg und NO-Freisetzung 114
1.13.4 Temperaturkontrolle Föhntest 117
1.13.5 Individuelles Ansprechen der kutanen Perfusion unter 453 nm 117
1.14 Anstieg der Sauerstoffsättigung unter 453 nm 118
1.15 Messung der NO-Metabolite in Hauthomogenisaten aus mit 453 nm bestrahlter Haut 120
1.16 Freisetzung von NO aus nitrosierter BSA-Lösung 121
1.17 Irritationstest an humanen Keratinozyten nach 453 nm 121
1.18 Adverse Effekte des blauen Lichtes auf die Haut 122
7. Schlussfolgerung 123

1. Einleitung

Hypertonie, Hypercholesterinämie, Artherosklerose, Thrombosen, Schlaganfälle und Diabetes Mellitus [24] – Krankheiten des kardiovaskulären Systems mit erheblicher Bedeutung für unser Gesundheitssystem [25] und einer auffallend großen Komorbidität. Auch bei Krankheitsbildern wie der Psoriasis vulgaris [26], der erektilen Dysfunktion [27, 28], uterinen Infertilität oder chronischen Wundheilungsstörungen [29] finden sich Gemeinsamkeiten in der Pathophysiologie. Ihr gemeinsamer Nenner lautet: Stickstoffmonoxid (NO), ein gasförmiges, freies Radikal, welches im Gefäßendothel synthetisiert wird und von bedeutendem Einfluss für die Homöostase den menschlichen Organismus ist. Die Entdeckung seiner Bedeutung als Mediator wichtiger physiologischer, sowie pathologischer Prozesse war von ebenso großer Durchschlagskraft für die medizinische Forschung, wie die Explosivität des Sprengstoffes Nitroglycerin, der zur Entdeckung des Botenstoffes NO führte. Die geringe Größe ermöglicht die Diffusion des Moleküls durch biologische Doppellipidmembranen [30] und somit die auto- und parakrine Regulierung von Stoffwechselprozessen als Second Messenger [31]. Von größter Bedeutung sind die vasoprotektiven und anti-atherosklerotischen Effekte des NO, welche aus der Regulierung des vaskulären Tonus, Inhibition der Plättchen-Aggregation und -Adhäsion, sowie der Hemmung der Leukozyten-Adhäsion an der Intima der Gefäßwände resultieren [32, 33]. Auch seine inhibitorische Wirkung auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen [34] trägt zur Prävention von artherosklerotischen Gefäßveränderungen bei. Aus einem Ungleichgewicht im NO-Metabolismus können pathologische Veränderungen am Gefäßendothel resultieren, welche vor allem durch eine verminderte Fähigkeit zur Vasodilatation und eine gesteigerte inflammatorische Aktivität des Endothels gekennzeichnet sind [35] und in ihrer Gesamtheit zur „endothelialen Dysfunktion“ führen, welche als das pathologische Korrelat bei der Genese verschiedener Krankheiten des kardiovaskulären Systems gilt [36-38]. Ein weiteres Organsystem, in dem NO eine entscheidende Rolle als *Second Messenger* komplexer, protektiver aber auch pathologischer Zellreaktionen spielt ist die Haut [39].

Eine Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit ist daher Grundlage vieler Forschungsarbeiten mit dem Ziel, die Durchblutung verschiedener Organsysteme zu verbessern. Wie in vorherigen Arbeiten gezeigt wurde kann mittels Licht in Wellenlängenbereichen des ultravioletten Spektrums die Photodekomposition endogener Stickstoffderivate zu einer NO-Freisetzung führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von blauem Licht der Wellenlänge 453 nm auf die kutane Durchblutung und die NO-Speicher der Haut untersucht. In vorhergehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine nicht enzymatische Spaltung photolabiler Stickstoffderivate in der Haut durch blaues Licht möglich ist und zu einer lokalen NO-Freisetzung führt [40]. Der Einsatz unterschiedlicher Bestrahlungsfrequenzen des blauen Lichtes könnte somit einen modulierenden Einfluss auf die Durchblutungssteigerung der Haut haben.

1. Anatomischer Aufbau und Funktion der humanen Epidermis

Die Haut stellt mit einer Fläche von ca. 1,8 m^2 und einem Anteil von 16 % am Körpergewicht das größte und schwerste Organ des Menschen dar. Anatomisch zeigt sie einen dreischichtigen Aufbau: die apikal liegende Oberhaut (Epidermis), die Lederhaut (Dermis) und die tief liegende Unterhaut (Subkutis). Die Epidermis grenzt als oberste ca. 12 μm dünne Schicht den Körper gegen die Umwelt ab und hat somit eine wichtige Barrierefunktion gegen das Eindringen von pathogenen Krankheitserregern und Fremdsubstanzen. Zudem schützt sie den Organismus gegen physikalische Reize. Gebildet wird die Epidermis aus verschiedenen Differenzierungsstufen der Keratinozyten, welche von basal nach apikal in den programmierten Zelltot (Apoptose) gehen und sich demnach morphologisch verändern. Die einreihig angeordneten, adulten Stammzellen des Stratum (Str.) basale dienen der Regeneration der Haut. Durch Zellteilung entstehen die Tochterzellen des darüber liegenden Str. spinosum, welches aus mehrreihig angeordneten kubischen Keratinozyten besteht. Durch Abflachung der Zellen und Anreicherung mit Keratingranula entsteht das darüber liegende Str. granulosum, dessen zunehmend pyknotischen Zellen schließlich zu kernlosen Korneozyten werden, welche die apikale Hornschicht der Haut (Str. corneum) bilden

[41]; [42] (s. Abb. 1). Die obersten Zellen der Hornschicht werden fortlaufend abgestoßen, sodass sich die menschliche Epidermis alle 28 Tage vollständig erneuert.

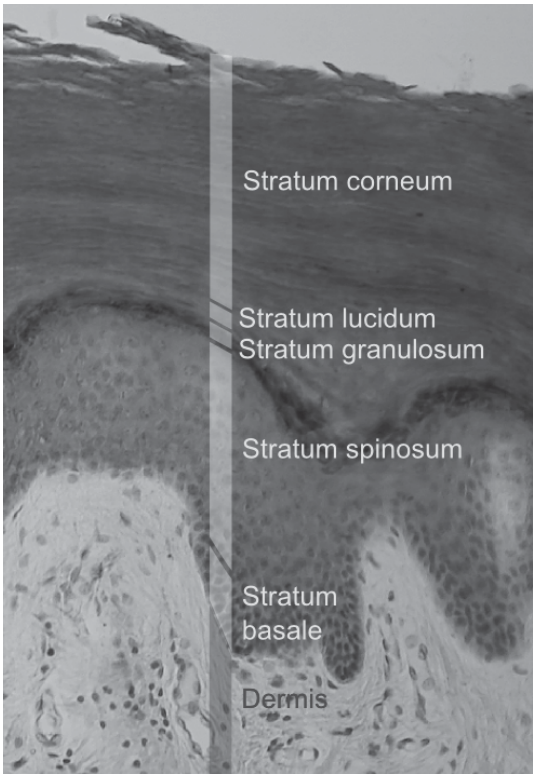


Abb. 1: Histologischer Schnitt durch die humane Epidermis,

HE-Färbung 200x; ausgehend vom Str. basale nach apikal findet ein Reifungsprozess der Keratinozyten statt, in dessen Verlauf die Zellen pyknotisch werden, sie flachen stark ab und bilden im Str. corneum eine Schicht kernloser Zellen, welche nach und nach abschilfern (WVSOM Meissner's corpuslce.JPG by Wbensmith, CC BY 3.0)

Neben den Keratinozyten finden sich in der Epidermis weitere Zelltypen. Die im *Str. basale* eingebetteten Melanozyten erfüllen durch die Synthese und Distribution des Hautfarbstoffes Melanin eine wichtige Schutzfunktion gegen durch ultraviolette (UV) Strahlung verursachte Zellschäden in tiefer gelegenen Hautschichten. Über dendritische Fortsätze steht jeder Melanozyt über mit 30 bis 40 Keratinozyten in Verbindung, um diese mit Melanin zu versorgen. Die Pigmentierung der Haut wird dabei nicht durch die Anzahl der Melanozyten, sondern durch deren Aktivität und den Melanintransfer in die umliegenden Keratinozyten determiniert [43]. Der Hauttyp lässt sich über die Fitz

Patrick-Klassifikation bestimmen, welche neben den genetischen Komponenten wie Haut-, Haar- und Augenfarbe auch die Reaktion der Haut unter UV-Exposition berücksichtigt. Darüber erfolgt eine Einteilung in die Hauttypen I-VI mit jeweils unterschiedlichem Risiko für UV induzierte Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schäden und Hautalterung [44]. Weiterhin finden sich in der Epidermis die dendritischen Langerhanszellen, welche im Rahmen des mononukleär-phagozytären Systems eine wichtige antigenpräsentierende Funktion für die Differenzierung des Immunsystems übernehmen. Über die dermoepidermale Junktionszone ist die Epidermis fest mit dem darunter liegendem, aus lockerem Bindegewebe bestehendem Str. papillare der insgesamt 1,5 bis 4 mm dicken Dermis verbunden. Neben zahlreichen Kapillarschlingen und freien Nervenendigungen zur Thermo- und Nozizeption enthält das Str. papillare Immunzellen, wie Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten, sowie Sinnesrezeptoren für Druck-, Tast- und Vibrationsempfinden. Schon die Komplexität dieses Gewebes, sowie die zahlreichen unterschiedlichen Zelltypen, deuten auf die vielen wichtigen Funktionen unserer Haut hin: Abwehr gegen pathogene Keime und Umwelteinflüsse, wie Hitze oder Kälte, Wahrnehmung der Umwelt durch Tastkörperchen und Schutz vor Verletzungen.

2. Die vielseitigen physiologischen Wirkungen von NO

1.1.1 NO als Vasodilatator

Das farblose, anorganische Gas NO ist seit Ende der 1980er Jahre intensiver Gegenstand der Forschung. Aufgrund seiner gefäßaktiven Wirkung erlangte der Sprengstoff Nitroglycerin Eingang in die Therapie der Angina pectoris. 1879 beschrieb William Murrell erstmals im „Lancet“ die Wirkungen unterschiedlicher Dosen der Substanz auf den eigenen Organismus [45]. Seit Ramsey und Palmer 1951 auf der *Canadian Heart Association* erstmalig den Einsatz von Triethanolamin Trinitrat (Metamin) bei Angina Pectoris berichteten, gewannen weitere Nitroderivate im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen zunehmend an Bedeutung, ohne dass man den

molekularen Wirkmechanismus der Substanzen kannte [46]. 1998 wurde der Nobelpreis für Physiologie der Medizin an die Forscher Furchgott, Ignarro und Murad für ihre Entdeckung von NO als Signalmolekül im kardiovaskulären System vergeben. Zuvor hatte Furchgott einen *Endothelium derived relaxing factor (EDRF)* beschrieben, welcher nur bei vorhandenem intakten Endothel zur Relaxation des Blutgefäßes führte. Der Pharmakologe F. Murad hatte 1977 entdeckt, dass Nitroverbindungen über die Entstehung von NO die lösliche Guanylatzyklase (sGC) aktivierten [47, 48]. 1986 identifizierten Furchgott und Ignarro den *EDRF* als das bereits von Murad beschriebene Molekül NO [49]. Anders als bei Gewebshormonen findet bei dem ebenfalls auto- und parakrin wirkenden NO eine rezeptorunabhängige, direkte Interaktion mit den Eisengruppen hämhaltiger Proteine wie der sGC statt. Durch die Aktivierung der sGC kommt es zur Synthese von zyklischem Guanosin-3´-5´-Monophosphat (cGMP) [50]. cGMP spielt durch seine Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (cGK I) eine entscheidende Rolle bei der Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen. Die Gefäßwände zeigen einen charakteristischen dreischichtigen Wandaufbau: Die das Blutgefäß von innen auskleidende, luminale *Tunica Intima* besteht aus Endothelzellen, welche mittels NO-Synthase-III (NOS) enzymatisch NO produzieren. Das NO diffundiert von dort in die *Tunica Media* bzw*. Muscularis*, welche die kontraktilen Filamente Myosin und Aktin enthält. Die durch cGMP aktivierte cGK I der glatten Muskelzellen aktiviert das Enzym *Myosin Light Chain (MLC)-Phosphatase*, welches ein Phosphat-Ion von der leichten Kette des Myosins abspaltet. Durch diese Dephosphorilierung verlieren die Myosinketten ihren energetisch aktiven Zustand, sodass die Ausbildung von Querbrücken zu den Aktinfilamenten nicht mehr möglich ist. Die Bindung an die Aktinfilamente und eine darauf folgende Spaltung von Adenosintriphosphat (ATP) durch das Enzym ATPase des Myosins führen im phosphorilierten Zustand, durch eine Konformationsänderung im Myosinköpfchen, zum Gleiten der kontraktilen Filamente ineinander und somit zur Kontraktion der glatten Muskelzelle [51]. Eine verminderte Phosphorilierung, wie sie unter anderem durch die NO vermittelte Zunahme der cGMP-Konzentration in den Muskelzellen des Gefäßendothels entsteht, führt somit zur Relaxation dieser Zellen und konsekutiv zur Vasodilatation (s. Abb. 2) [52].

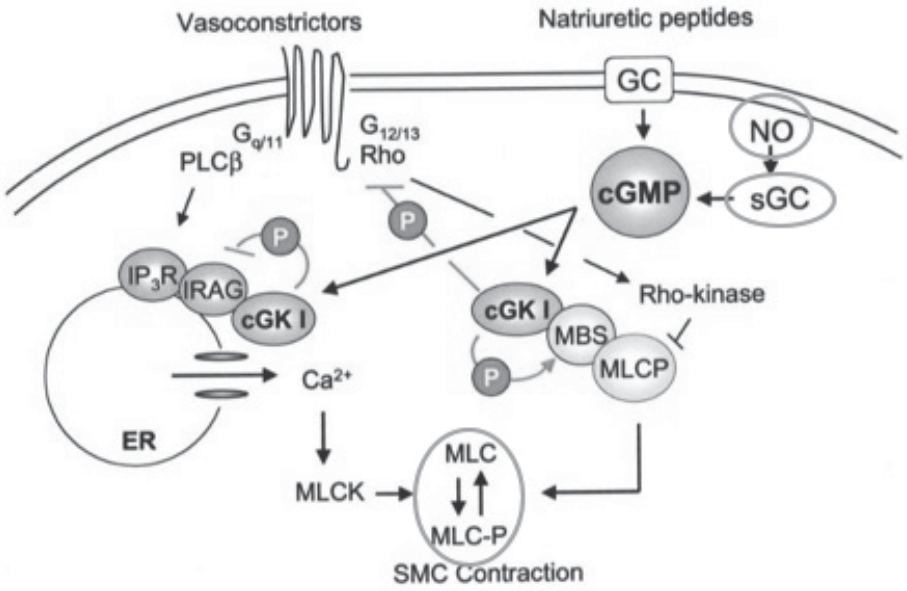


Abb. 2: Die NO induzierte Relaxation glatter Muskelzellen durch Aktivierung der enzymatischen cGMP-Synthese

Durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) durch heran diffundiertes NO (NO) aus dem Endothel, kommt es zu ansteigenden cGMP-Spiegeln in den glatten Muskelzellen der Gefäßwände. cGMP aktiviert die cGMP-abhängige Proteinkinase G (cGK I), welche das Enzym *Myosin-light-chain-Phosphatase* aktiviert. Dieses dephosphoriliert die Myosin-Leichtketten, sodass es statt zur Kontraktion, zur Relexation der glatten Gefäßmuskelzelle kommt (aus Münzel et al. 2003)

1.1.2 NO als Mediator der hypoxischen Vasodilatation via SNO-Hämoglobin

Als Vermittler der Vasodilatation spielt nicht nur die durch NO via cGMP vermittelte Relaxation der Gefäßmuskulatur eine Rolle. Im Rahmen der Autoregulation des Blutflusses, dessen biologisches Korrelat die hypoxische Vasodilatation darstellt, spielen NO und dessen Interaktion mit dem Hämoglobin eine bedeutende Rolle [53]. Lange Zeit war der genaue Mechanismus der NO-induzierten hypoxischen Vasodilatation ungeklärt. Fraglich war, wie die physiologischen Effekte des NO aufrechterhalten bleiben, obwohl *in vivo* Versuche zeigten, dass NO durch Hb abgefangen wird und stabiles Hem-Fe(II)-NO [54], was einer Inaktivierung der Bioaktivität des NO gleich käme [16]. Seit längerem schon stand jedoch nicht mehr NO alleine als Vermittler seiner

physiologischen Reaktionen im Mittelpunkt, sondern auch dessen Metabolite: S-Nitrosocystein, S-Nitrosoglutathion (GSNO), sowie niedrig molekulare S-Nitrosoverbindungen (RSNOs) und nitrosierte Proteine, welche starke Vasodilatoren darstellen. So konnte gezeigt werden, dass ein sauerstoffabhängiges S-Nitrosothiol als Mediator der hypoxischen Vasodilatation durch Erythrozyten (*Red Blood Cells*, RBC) fungiert [55]. Das ßCys93 des Hämoglobin (Hb) wird durch NO nitrosiert, sodass *in vivo* S-Nitrosohämoglobin (SNO-Hb) statt oder kompetititv zu Häm-Fe(II)-NO entsteht, welches abhängig vom Oxygenierungsstatus als NO-Donor fungieren kann. Bis dato ist der molekulare Ablauf der NO-vermittelten hypoxischen Vasodilatation nicht vollständig geklärt. Theoretisch könnte NO über eine SNO-Kaskade zu Membranmolekülen der Erythrozyten transportiert werden und extrazellulär durch Nitrosierung von Glutathion (GSH) die vasodilatierende Wirkung der RBCs vermitteln [53].

1.1.3 NO als Regulator von Stoffwechselprozessen

Auch in der Haut fungiert NO nicht nur als Second Messenger für die Vasodilatation, sondern für eine Vielzahl unterschiedlicher Stoffwechselprozesse. Als freies, schwach wirkendes Radikal mit einem ungepaarten Elektronenpaar reagiert es mit vielen verschiedenen Molekülen und Radikalen [56]. NO zeigt sowohl protektive Eigenschaften durch seine antimikrobielle Wirkung gegen Pathogene, als auch zytotoxische Effekte durch die Induktion von oxidativem Stress. Im Rahmen der Oxidation reagieren bei hohen NO-Konzentrationen 2 $NO^{\cdot}$ Moleküle mit molekularem Sauerstoff zu den Oxidationsprodukten Nitrit und Nitrat über die Bildung von reaktiven Stickoxidintermediaten (RNOI), wie beispielsweise Distickstofftrioxid (N_2O_3). Diese wiederum begünstigen nitrosativen Stress durch die Reaktion zu radikalen Stickoxiden und die Entstehung von Peroxynitrit ($ONOO^-$) [57]. Als Signalmolekül wirkt NO über kovalente Bindungen mit Metallen wie Eisen und Zink oder Thiolen an allosterischen oder reaktiven Zentren von Proteinen. *In vivo* häufig vorkommende Thiole sind sehr reaktive Nukleophile, und stellen somit besonders wichtige Zielmoleküle für NO unter Ausbildung von RSNO dar, welche wiederum unter Abgabe von NO zerfallen können.

NO aktiviert beispielsweise das Protein Guanylatzyklase bzw. deaktiviert die meisten Proteine mit hämhaltigem, reaktivem Zentrum und beeinflusst somit vielseitig Stoffwechselvorgänge [58]. Über die elektrophile Nitrosierung von Thiolgruppen cysteinhaltiger Proteine oder von Proteinen mit Zink-Schwefel-Clustern, wie bspw. in Transkriptionsfaktoren, ist NO ebenfalls in der Lage Proteine zu modifizieren und die Transkription verschiedener Gene zu beeinflussen [59, 60]. Anders als man bei einem Radikal vermuten würde, zeigt das NO-Radikal neben zytotoxischen Effekten jedoch auch sehr wichtige protektive Eigenschaften. So schützt eine vermehrte NO-Konzentration durch die exogene Zugabe der NO-Donoren SNOC (1 mM) und DETA (1 mM) vor und bis zu zwei Stunden nach UVA-Bestrahlung in der Haut vor apoptotischem Zelluntergang. Dies kann dem membranprotektiven Effekt von NO zugeschrieben werden. In Anwesenheit von NO findet eine verminderte ROS induzierte Lipidperoxidation statt, welche nach UV-Bestrahlung zu einer mitochondrialen Membranleckage mit Freisetzung von proapoptotischem Cytochrom C führen würde. Als freies Radikal ist das NO Molekül ($^{\cdot}$NO) in der Lage radikale Kettenreaktionen, wie die ROS induzierte Lipidperoxidation (s. 1.1.89) durch Alkylperoxyradikale ($LOO^{\cdot}$) zu beenden [61]. Allerdings begünstigen hohe lokale NO-Konzentrationen die Entstehung von Peroxynitrit ($ONOO^{-}$), welches durch Nitrosation von Tyrosinen, die Induktion von Doppelstrangbrüchen und die Oxidation wichtiger Moleküle stark zytotoxisch wirkt und entscheidend in den zellulären Stoffwechsel eingreift [62] [63]. Zudem zeigt NO proinflammatorische und immunmodulierende Eigenschaften. Das verzögert einsetzende Erythem nach UV-Exposition kann durch eine gesteigerte enzymatische NO-Synthese durch die induzierbare NOS erklärt werden. Im Rahmen der UV-induzierten Immunsuppression scheint NO an der Signaltransduktion für die Migrationsbewegung der Langerhanszellen aus der Epidermis heraus beteiligt zu sein. Erhöhte NO-Spiegel spielen vermutlich ebenfalls bei kutanen Abstoßungsreaktionen von Hauttransplantaten eine entscheidende Rolle. Bei der Regulation der Wundheilung hat NO einen wichtigen fördernden Einfluss auf die Reepithelialisierung, indem es die Proliferation von Keratinozyten und Fibroblasten fördert [7]. Zudem konnte ein modulierender Einfluss von NO auf die Kollagensynthese in Wunden nachgewiesen

werden [64]. Zu nennen ist ebenfalls der Einfluss von NO auf den Glucose- und Insulin-Stoffwechselwechsel: durch Gabe von NO-Donoren konnten Insulin ähnliche, den Blutglukosespiegel senkende Wirkungen des NO durch Stimulation der Glukose-Oxidation und Steigerung des Glukosetransportes nachgewiesen werden [65]. Des weiteren ist NO an der Regulation des Haarwachstums, sowie allergischen Hautreaktionen und der Proliferation und Differenzierung epidermaler Zellen beteiligt und spielt eine entscheidende Rolle in der antimikrobiellen Abwehr [12]. Die verschiedenen Zelltypen der menschlichen Haut sind allesamt in der Lage enzymatisch NO zu synthetisieren (s. 1.1.5), um die NO-Homöostase der Haut aufrecht zu erhalten [39].

1.1.4 Krankheitsbilder mit veränderter NO-Homöostase

Erhöhte NO-Spiegel durch eine vermehrte induzierbare NOS (iNOS) Expression spielen bei einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen, wie denen des rheumatischen Formenkreises eine Rolle [66, 67]. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis finden sich 35-fach höhere Werte des NO-Oxidationsproduktes Nitrit in der Synovialflüssigkeit als bei Arthrosepatienten. Über den Effloreszenzen von Patienten mit Psoriasis vulgaris konnte eine vermehrte kutane NO-Produktion nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass diese Patienten weniger an kutanen, nicht durch Candida albicans verursachten, Hautinfektionen erkranken, wird der direkten antimikrobiellen Wirkung von NO auf Bakterien, Viren und Pilze zugeschrieben. [68]. Eine der wichtigsten Pathologien an deren Genese eine veränderte NO-Homöostase beteiligt ist, ist die zuvor beschriebene endotheliale Dysfunktion [35], welche die Grundlage vieler Krankheiten des kardiovaskulären Systems bildet. Durch den vasodilatierenden Effekt verursachen veränderte NO-Spiegel im gesamten Körper pathologische Veränderungen und sind somit an der Genese vieler Krankheiten beteiligt, welche durch veränderte Perfusionsverhältnisse der Organe zustande kommen. So scheint NO z.b. auch eine wichtige Rolle bei der Genese der multifaktoriell bedingten erektilen Dysfunktion zu

spielen, da es als der entscheidende vasoaktive, nicht-adrenerge, nicht-cholinerge Neurotransmitter der Erektion identifiziert werden konnte [28], [69].

3. Der Stickstoff-Metabolismus

1.1.5 Enzymatische NO-Synthese

Im Körper wird NO von drei Isoformen des Enzyms NO-Synthase (eNOS, nNOS und iNOS) synthetisiert [70]. Als Substrat für die NO-Synthese dient L-Arginin, welches in einer von Kalzium-Calmodulin und mehreren Cofaktoren abhängigen Reaktion durch die NOS zu NO und L-Citrullin oxidiert wird. Das Enzym weist neben dem aktiven Zentrum für die Oxidation von L-Arginin mehrere Bindungsstellen für die essenziellen Kofaktoren Nikotinamidadenindinukleotidphophat (NADPH), Flavinadenindinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN) am C-Terminus, sowie für Protoporphyrin IX, Häm und Tetrahydrobiopterin (BH_4) am N-Terminus auf (s. Abb. 3) Nathan [71].

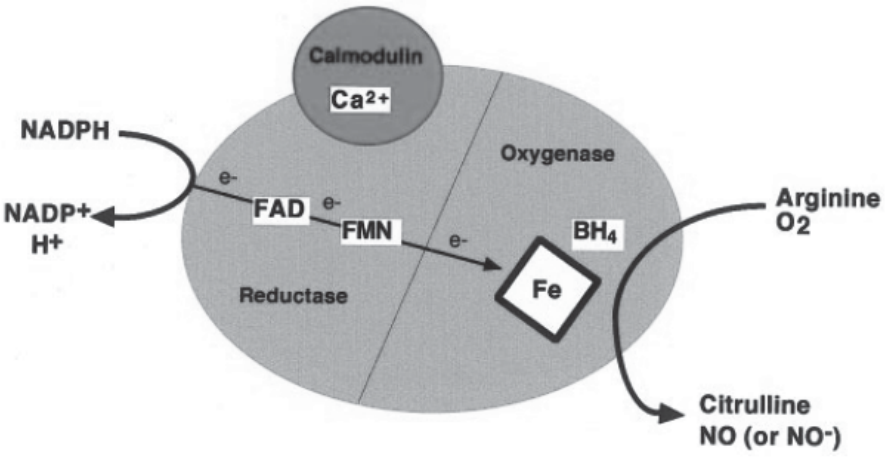


Abb. 3: Aufbau der Kalzium-Calmodulin (CaM) abhängigen NOS

Enzym aus zwei Domänen mit verschiedenen Bindungsstellen für essenzielle Kofaktoren: NADPH liefert Elektronen (e-) an die Reduktasedomäne des Enzyms, welche über FAD und FMN als Elektronenüberträger an die Oxygenasedomäne übergeben werden, wo die e- mit dem Eisen der Hämgruppe und BH4 interagieren um anschließend molekularen Sauerstoff für die Oxidation von L-Arginin zu NO und Citrullin zu aktivieren (aus Alderton et al, 2001).

In den Keratinozyten der Haut findet sich vorwiegend die neuronale NOS (nNOS) [72], wohingegen Fibroblasten und andere Zellen der Haut vorwiegend die endotheliale Form der NOS (eNOS) exprimieren [73]. Diese beiden Formen werden als konstitutive NOS (cNOS) zusammengefasst und sind nach den Zelllinien benannt, aus denen sie erstmals isoliert wurden. Allerdings finden sie sich, wie das Beispiel der Keratinozyten zeigt, auch in anderen Zelllinien [71]. Die konstitutive NO-Synthese der cNOS erfolgt abhängig vom intrazellulären Kalziumspiegel kontinuierlich auf einem niedrigen Level und hat einen regulatorischen Einfluss auf die Neurotransmission und das kardiovaskuläre System [72; 74]. Die Isoform iNOS kann durch Lipopolysaccharid (LPS)-Exposition oder Zytokinstimulation in fast allen Zellen der Haut induziert werden. [75-77]. Dadurch, dass der NO-Synthese durch die iNOS zunächst die Genexpression des Enzyms vorgeschaltet ist, erreicht die NO-Synthese erst nach 24 Stunden mit der maximalen-iNOS Expression ihr Maximum und hält bis zu 72 Stunden an. Das durch die iNOS

langanhaltend und in hohen Konzentrationen produzierte NO vermittelt zum Beispiel das inflammatorische Erythem durch die langanhaltende Blutflusssteigerung nach UV-Exposition [78] sowie die zytotoxische Wirkung der Makrophagen auf Mikroorganismen im Rahmen der Immunabwehr (; [72]; [79].

1.1.6 Nicht-enzymatische NO-Synthese durch Photodekomposition.

1995 beschrieb Furchgott eine Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen unter UV-Einstrahlung. Dieser als Photorelaxation bezeichnete Mechanismus konnte in späteren Studien einem NO-abhängigen Anstieg der cGMP-Konzentration zugeschrieben werden, welcher nicht durch NOS-Inhibitoren wie N^G-Methyl-L-arginine Acetat Salz (L-NMMA) beeinflussbar war [80]. Dies deutete auf eine enzymunabhängige UV-Licht-induzierte NO-Produktion in der menschlichen Haut hin. Die Tatsache, dass die NO-Konzentration nach UV-Bestrahlung stark ansteigt, bevor die iNOS Aktivität nach 8 bis 10 Stunden ihr Maximum erreicht, deutet auf eine UV-induzierte nicht enzymatische NO-Freisetzung aus einer kutanen Speicherform hin, welche die Zeit bis zum Anstieg der iNOS-Aktivität überbrückt [12, 72]. Bei der Photodekomposition werden chemische Bindungen durch die Photonenenergie elektromagnetischer Wellen gespalten. Da die Energie der Photonen umgekehrt proportional zur Wellenlänge des Lichtes ist, wird die Photodekomposition chemischer Bindungen besonders durch kurzwelliges Licht des sichtbaren Spektrums beziehungsweise ultraviolettes Licht (UV-Licht) induziert.

1.1.7 Kutane Nitroderivate als NO-Speicherform

Im Körper stellen Nitrit (NO_2) und RSNO potente Speicherformen für die UV-induzierte NO-Freisetzung dar, da sie endogen vorkommen und im Wellenlängenbereich des UV-Lichtes unter NO-Freisetzung zerfallen. *In vivo* kommt NO_2^- sowohl in Blut, Speichel, Magensaft, sowie auf der Haut vor [19]. Im Schweiß findet sich Nitrat (NO_3^-) in Konzentrationen von 40 μM und wird auf der Haut durch Kommensalbakterien zu 10 μM NO_2 reduziert, welches im sauren Milieu der Hautoberfläche unter NO-Abgabe dissoziiert. Ein Teil des dabei entstehenden NO diffundiert in die oberen Schichten der

Epidermis und kann dort biologisch wirksam sein [67]. Aus NO_2 freigesetztes NO zeigt protektive und regulierende Eigenschaften: NO_2 im Blut reagiert mit desoxy-Hb, sowie hämhaltigen Gewebsproteinen, um hypoxischen Zuständen mit einer NO-vermittelten Vasodilatation entgegenzuwirken und den Blutfluss zu modulieren. NO_2 zeigt somit NO-artige Wirkungen und kann als Prodrug von NO gewertet werden [19]. Eine verminderte Nitritkonzentration im Blut kann somit mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko verbunden sein und findet sich bei Patienten mit entsprechenden Risikofaktoren wie Hyperlipidämie oder Hypertonie [81, 82]. Alle epidermalen Zellen der Haut sind zur enzymatischen NO-Synthese in der Lage. Dort gebildetes NO kann durch elektrophile Nitrosierung umliegender Proteine und Moleküle Nitrosoverbindungen wie RSNO, N-Nitrosoverbindungen (RNNO) oder auch Nitromyoglobin erzeugen [12, 83]. Dabei entstehen unter physiologischen Bedingungen im Gewebe bevorzugt RSNO durch Nitrosierung reaktiver Thiolgruppen [84]. Diese finden sich vor allem in cysteinhaltigen Proteinen, sowie im Redox-Puffer Glutathion und kommen ubiquitär im Organismus vor. In der Haut konnten proteingebundene Thiole in Konzentrationen von 1360 μM ± 337 μM, freie Thiole von 238 μM ± 92 μM, sowie kleinmolekulare Thiole, hauptsächlich GSH von 143 ± 40 μM nachgewiesen werden [72]. Aus Thiolen durch Nitrosierung gebildete RSNO könnten, durch eine NO-stabilisierende Funktion als Trägermolekül, als kutaner NO Speicher fungieren [85]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die RSNO-Bioaktivität mancher Stoffwechselprozesse nicht in Korrelation zur dabei frei werdenden NO-Menge steht, sondern diese direkt RSNO-vermittelt ablaufen [59]. Bei der Dekomposition von RSNO kommt es zur homolytischen Spaltung der S-N-Verbindung unter Freisetzung von NO und einem Thiylradikal: RSNO $\Rightarrow$ $RS^{\cdot}$ + $^{\cdot}NO$. RSNO können sowohl photolytisch, als auch in Anwesenheit von Cu^+ gespalten werden, stellen aber in Dunkelheit und Anwesenheit von Metallchelatoren bei 37 °C und pH 7,4 stabile Verbindungen dar [18, 86]. RSNO zerfallen zwar unter Freisetzung von NO^-, jedoch kann dies neben der Entstehung von NO auch zu Bildung von Peroxynitrit ($ONOO^-$) führen und nitrosativen Stress verursachen [57]. Eine weitere wichtige Reaktion ist die Transnitrosierung: RSNO können in Anwesenheit von Cu^+ ein Nitrosoniumion NO^+ auf andere Thiole übertragen. Eines der bedeutendsten NO-Trägermoleküle, das S-

Nitrosoalbumin (NO-S-alb) wird endogen durch Transnitrosierung von Albumin gebildet. Die Grundlage für diese Reaktion bilden die endogen in einer Gesamtkonzentration von 200 nM vorkommenden RSNO wie S-Nitrosocystein (SNOC) und S-Nitrosoglutathion (GSNO) [87]:

GSNO + Alb ⇔ GSH + NO-S-alb

SNOC + Alb ⇔ Cys + NO-S-alb

Es konnte gezeigt werden, dass nur sechs Sekunden nach Zugabe von 100 μM SNOC zu Plasma die NO-S-alb-Konzentration um mehr als das Hundertfache der Ausgangskonzentration ansteigt. Die Zugabe von RSNO zu Thiolen in gepufferten Lösungen unter Anwesenheit von Cu^{+} führt somit direkt zur Entstehung weiterer RSNO [87]. In vorherigen Arbeiten konnten Opländer *et al.* (2013) erstmals zeigen, dass es unter Irradiation der Haut mit UVA-Licht zu einer vermehrten nicht-enzymatischen Freisetzung von NO aus kutanen Nitroderivaten wie RSNO auf und in der Haut kommt. Dies war mit den NO vermittelten Effekten einer Durchblutungssteigerung durch cGMP vermittelte Vasodilatation, sowie einem systemischen Blutdruckabfall verbunden [88]. 2013 konnten Opländer *et al.* erstmals zeigen, dass es unter Irradiation von NO2 und NO-S-alb-haltigen Lösungen mit blauem Licht der Wellenlängen 420 und 453 nm ebenfalls zu einer NO-Freisetzung kommt. Die NO-Freisetzung unter 420 nm blauem Licht war dabei fast doppelt so hoch wie unter 453 nm blauem Licht. Dabei zeigten die bestrahlten Lösungen eine langsame, niedrigamplitudige NO-Freisetzung, während die lichtinduzierte Dekomposition des NO-S-alb zu einem hohen *NO-Peak* führte und wesentlich schneller ablief (s. Abb. 4). Die vermehrte nicht-enzymatische NO-Produktion durch Anreicherung und Irradiation der kutanen Hautspeicher könnte somit Therapiemöglichkeiten für Krankheiten bieten, welche durch eine Dysregulation der NO-Homöostase zustande kommen.

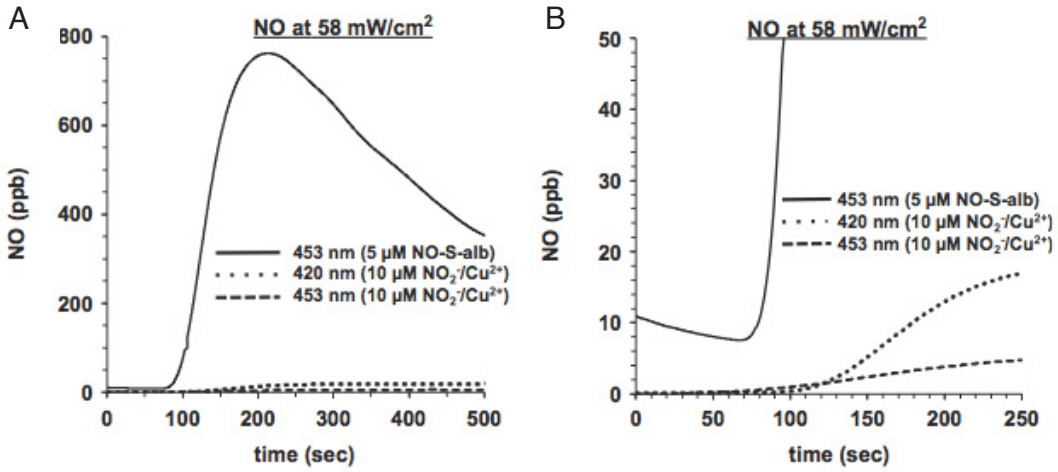


Abb. 4: NO-Freisetzung aus Lösungen mit SNO-Albumin (NO-S-alb) (5 μM in PBS, pH 7,4), sowie aus/Kupfer-Lösungen (10 μM $NaNO_2$/10 μM $CuCl_2$) unter Bestrahlung mit 420 nm und 453 nm

A: starker NO-Peak durch SNO-Albumin Dekomposition bei basaler, kontinuierlicher NO-Freisetzung durch zerfall, **B**: Vergrößerter Ausschnitt aus A zur Darstellung des schnellen NO-Anstiegs bei Dekompensation des NO-S-alb (aus [40]).

1.1.8 Toxische Effekte durch UV-Strahlung

Ein möglicher therapeutischer Nutzen der UVA-induzierten Steigerung der nicht-enzymatischen NO-Synthese könnte durch die zytotoxischen Effekte der UV-Strahlung gemindert werden. Täglich sind wir ultravioletter Strahlung ausgesetzt, welche sich in kurzwellige UV-C Strahlung (<280 nm), die jedoch aufgrund der Ozonschicht nicht die Erdoberfläche erreicht, sowie UV-B Strahlung (280 – 320 nm) und langwellige UV-A-Strahlung (320 – 400 nm) unterteilt. UV-A Strahlung dringt im Vergleich zur nur 0,5 mm eindringenden UV-B Strahlung ca. 1 mm tief in die Haut ein und erreicht somit nicht nur alle epidermalen Zellen sondern auch die Dermis. Die dermalen Kollagenfasern werden durch eine UV-induzierte Steigerung der Synthese von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) aus Keratinozyten und Fibroblasten vermehrt abgebaut [89]. Dies, sowie die verminderte Neusynthese von Kollagen aus Prokollagen in chronisch UV-exponierter Haut führen zum Verlust von Elastizität und Spannkraft der Haut und somit zur Hautalterung [90]. Die Exposition mit UV-Strahlung führt zudem zur Bildung reaktiver

Sauerstoffspezies (ROS), wie beispielsweise Superoxidanionen-Radikale, Singulettsauerstoff oder Wasserstoffperoxid, welche oxidativen Stress verursachen [72];[91]. Diese setzen radikale Kettenreaktionen in Gang, welche zur Lipidperoxidation führen. Initial kommt es dabei zur Abspaltung eines Allyl-Wasserstoffatoms einer ungesättigten Fettsäure unter Entstehung eines Lipidradikals, welches wiederum mit O_2 zu einem sehr reaktiven Alkyperoxyradikal ($LOO^{\cdot}$) reagiert. Dieses oxidiert benachbarte Fettsäuren der Doppellipidschicht einer Membran und führt somit zu einer Kettenreaktion, welche die Integrität der Membran zerstört. Dieser Mechanismus trägt zur Promotion der Apoptose nach UV-Bestrahlung bei, indem es zu mitochondrialen Membranschäden mit Freisetzung von Cytochrom C kommt [92, 93]. Im Vergleich zur UV-A Strahlung wird die UV-B Strahlung von der DNA absorbiert und führt dort vor allem zur Entstehung von *Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren* (CPDs). Diese machen eine normale Prozessierung der DNA während der Replikation und Transkription unmöglich und führen zu erheblichen Schäden auf zellulärer Ebene bis hin zur Apoptose und Karzinogenese [94]. Durch die CPDs oder andere UV induzierte Basenveränderungen, wie Purinphotoprodukte kann es zu Fehlern im Replikationsablauf mit möglichem Stopp an Replikationsgabeln kommen. An diesen Stellen kommt es durch Kollaps der Replikationsgabel zu Doppelstrangbrüchen der DNA. Akute UV-Belastungen, bei denen es zu direkten Veränderungen der DNA durch ROS oder elektromagnetische Strahlung kommt, führen über das Tumorsuppressorgen p53 zur Hochregulation des Fas-Liganden und somit zur Apoptose [95], deren morphologisches Korrelat die sogenannten „*Sunburn Cells*“ darstellen. Diese entsprechen apoptotischen Keratinozyten, in denen sich 12 bis 34 Stunden nach Bestrahlung eine DNA-Fragmentierung feststellen lässt [96]. Chronische UV-Belastung kann jedoch, trotz zahlreicher DNA-Reparaturmechanismen [97], durch Translation veränderter DNA-Abschnitte zur Synthese dysfunktioneller Proteine führen. Eine Mutation im Tumorsupressorgen p53 in Keratinozyten kann durch eine entstehende Apoptoseresistenz der Zelle zur Promotion der mutagenen Zelle und im weiteren Verlauf zur Karzinogenese maligner Hauttumoren wie dem Plattenepithelkarzinom führen [95]. Zudem steigt zusätzlich durch die UV-induzierte Immunsuppression das Risiko der

malignen Entartung veränderter Zellen, da diese vermindert vom Immunsystem erkannt und gezielt durch induzierte Apoptose eliminiert werden [98].

1.1.9 NO-Freisetzung aus Nitroderivaten unter blauem Licht (420 – 453 nm)

Um die toxischen Effekte einer Bestrahlung von Patienten mit elektromagnetischen Wellen im UV-Bereich zu vermeiden testeten Opländer *et al.* 2013 die enzymunabhängige NO-Freisetzung aus photolabilen Nitroderivaten der humanen Haut unter Irradiation mit blauem Licht der Wellenlänge 420 bis 453 nm. Erstmals konnte gezeigt werden, dass es in diesem Wellenlängenbereich zu einer Freisetzung von NO aus bestrahlten Lösungen mittels eines kupferabhängigen Mechanismus, sowie aus RSNO in wässriger Lösung kommt. Auch *in vivo* konnte eine vermehrte NO-Freisetzung über mit blauem Licht bestrahlter Haut mittels einer an einem Chemilumineszenz-Detektors (CLD, s. 0) angeschlossenen Auffangkammer gemessen werden. Die Bestrahlung der Haut mit blauem Licht (420 nm, 52 J/cm^2) führt zudem zu einer Anreicherung kutaner RSNO. Diese entstanden vermutlich durch Nitrosierung von Thiolen durch NO, welches auf der Haut durch Photodekomposition des im Schweiß enthaltenen NO_2 freigesetzt wird und in die oberen Hautschichten diffundierte. Bis dato verbleibt der genaue Mechanismus der Transmigration des NO bzw. seiner aktiven Metabolite aus der Epidermis bis zu seinem Wirkort an den tiefer gelegenen dermalen Gefäßen jedoch ungeklärt. Denkbar wäre eine Transnitrosierungskaskade thiolhaltiger dermaler Proteine bis hin zur Wirktiefe in 6 bis 8 mm Hauttiefe, in der die vasodilatierenden Effekte des NO im Sinne einer Durchblutungssteigerung nachgewiesen werden konnten. Auch eine indirekte Wirkung des NO in gebundener Form als RSNO ist denkbar [17]. Der Nachweis der Anreicherung der Haut mit RSNO unter vorheriger Behandlung mit einer Natrium-Kupfersulfat-Lösung [40], führte zu der Idee, die kutane NO-Freisetzung durch Photodissoziation aus kutanen NO-Speichern zu steigern, indem im Vorfeld die kutanen Speicher durch Inkubation mit NO-Donorsystemen aufgefüllt werden [21].

2. Ziele der Arbeit

Im Anschluss an die Arbeit von Opländer und anderen war das Ziel dieser Arbeit die Wirkung verschiedener Modalitäten des blauen Lichtes der Wellenlänge 453 nm auf die kutane Durchblutung zu untersuchen. Neben kontinuierlichem 453 nm Licht, wurden zwei verschiedene Modalitäten von gepulstem Licht verwendet. Die Überlegung dabei war, dass eine pulsatile Irradiation zu einer höheren NO-Freisetzung mittels höherer Strahlungsenergie im Peak führt, ohne die minimale Erythemdosis zu erreichen. Da die maximale Energie im Peak bei gepulstem Licht höher ist, als bei kontinuierlichem Licht derselben Dosis, steht mehr chemische Energie zur Spaltung möglicher NO-Derivate zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Effekte von kontinuierlichem und gepulstem blauen Licht der Wellenlänge 453 nm auf die kutane Durchblutung untersucht werden. Es wurde getestet, ob eine pulsatile Irradiation mit blauem Licht *in vivo* zu einem stärkeren Anstieg der kutanen Durchblutung führt, als eine kontinuierliche Bestrahlung mit blauem Licht gleicher Intensität. Von Interesse war dabei auch die Temperaturentwicklung auf der Haut während der Bestrahlung. Durch einen gepulsten Modus könnte die Wärmeentwicklung bei gleichgroßer Strahlungsdosis geringer ausfallen. Dies wäre durch eine sicherere Anwendung zum einen für einen therapeutischen Nutzen von Interesse, zum anderen würde es den Aspekt der temperaturunabhängigen Vasodilatation durch NO Freisetzung unter blauem Licht hervorheben. Zudem sollten kutane RSNO vor und nach Irradiation mit 453 nm blauem Licht *in vivo* und *in vitro* quantifiziert werden, um eine mögliche Anreicherung dieser Verbindungen in der Haut durch die Bestrahlung nachzuweisen. *In vitro* wurde getestet, ob es unter gepulstem Licht zu einer stärkeren Freisetzung von NO aus bestrahlten RSNO-haltigen Lösungen kommt, als unter kontinuierlichem Licht. Da bereits in den Vorarbeiten gezeigt werden konnte, dass es sich um einen NOS unabhängigen NO-Anstieg während der Bestrahlung handelt, konnte in dieser Arbeit auf die Verwendung von NOS-Inhibitoren, NO-Fängern, sowie die Eliminierung von RSNO durch $HgCl_2$ zum Nachweis der Enzymunabhängigkeit verzichtet werden [72]. Im Hinblick auf einen therapeutischen Nutzen einer Blaulichttherapie bei Krankheitsbildern, welche durch eine

gestörte NO-Homöostase verursacht werden, wurde untersucht, ob die Blaulicht Bestrahlung DNA-Strangbrüche induziert oder zu einer Abnahme der Zellviabilität führt. Zudem wurden mögliche apoptotische oder nekrotische Veränderungen in Keratinozyten nach der Bestrahlung untersucht.

3. Material und Methoden

4. Materialien und Geräte

Handschuhe	Ansell, Brüssel, Belgien
Zentrifugenröhrchen 15 ml/50 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster Österreich
Petrischalen	Greiner Bio One, Kremsmünster Österreich
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Serologische Pipetten	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Objektträger	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Deckgläschen	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Parafilm	Merck, Darmstadt Deutschland
Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena Deutschland
CLD 88 AM	co Physics AG, Dürnten, Schweiz
Pigmentmessgerät	Micro Medical, Königsstein, Deutschland
Digitales Thermometer	RS Components GmbH, Mörenfeld Deutschland
Multiwell-Spektrometer Victor x^3	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts USA
Phillips Light Engine	Phillips Electronics , Amsterdam, Niederlande
Haartrockner HP8232/00	Phillips Electronics , Amsterdam, Niederlande

2800 Frigocut Kryostat Mikrotom	Leica, Wetzlar, Deutschland

Chemikalien

0,9 %ige NaCl-Lösung	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Aqua-Spüllösung	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
PBS, pH 7,2	gibco® by life technologies™ Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Kupfer-II-Sulfat, wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kupfer-II-Chlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natrium-L-Ascorbat	SIGMA Life Science, Steinheim, Deutschland
N-Acetyl-L-Cystein	SIGMA Life Science, Steinheim, Deutschland
Kupfer-II-Sulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Nitrat	VWR PROLABO®, Leuven, Belgien
Natrium	VWR PROLABO®, Leuven, Belgien
Jod, 99,8 %	SIGMA Life Science, Steinheim, Deutschland
Sulfanilamid, puriss *p.a.*	Honeywell Riedel de Haen, Seeze, Deutschland
EthylendiaMinutentetraessigsäure, 99 %	SIGMA Life Science, Steinheim, Deutschland
AlbuminFraktion V, ≥ 98 %	Carl Roth GmBH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Vanadium-III-Chloride, 97 %	SIGMA Life Science, Steinheim, Deutschland

N-(1-Naphthyl)-EthylendiaMinutendihydro-chlorid	SIGMA Life Science, Steinheim, Deutschland
Eisen-II-Chlorid, 98 %	SIGMA Life Science, Steinheim, Deutschland
Methanol	EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt Deutschland
2-Propanol	EMPLURA®, Merck KGaA, Darmstadt Deutschland
Salzsäure/Chlorwasserstoffsäure, 1 N	Reagecon Shannon, Co.Clare, Ireland
Natriumhydroxid/Natriumlauge, 8 N	Combi Titrisol®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
p-Xylen	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DPBS mit Ca^{2+}, Mg^{2+}	Pan™ BIOTech Aidenbach, Deutschland
Antifoam	SIGMA Life Science, Steinheim, Deutschland
Dulbeco´s modified eagle Medium	DMEM, Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Kits

CellTiter Blue (Alamarblue)	CellTiter Blue Cell Viability Assay, Promega Corporation, Madison, USA
DNase I	RNase-free DNase I, Qiagen Hilden, Deutschland
TUNEL-Assay	DeadEnd™ Flourometric TUNEL System, Promega Corporation, Madison, USA
BCA Protein Assay	PIERCE™ Thermo Scientific Rockford, USA

ELISA für IL-1α	DuoSet ELISA Development System R&D Systems Europe, Abingdon, UK

Lösungen

Natrium-Kupfersulfat-Lösung	100 μM Natriumnitrit, 10 μM Kupfersulfat in PBS
Essigsäure-Jodid-Lösung	45 mM Kaliumiodid, 10 mM Jod in 3 ml *Aqua dest*. auf 100 ml mit Eisessig (96 %) aufgefüllt
Vanadiumchlorid-Lösung	1 % Vanadium-Chlorid (VaCl) in 1 M HCl
Homogenisatorlösung	10 ml PBS, 1 Tablette Proteaseinhibitor
NEM-Puffer	PBS + 5 mM NEM, 2,5 mM EDTA, PI
Vollmedium	10 % fetales Kalbsserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 100 μg/ml Streptomycin in DMEM
Assay Medium	Skin Ethics, Lyon

1.1.10 Gewebe

Artifizielle menschliche Haut:

Episkin von Skin Ethics™ (Lyon) ist eine *in vitro* aus humanen Keratinozyten auf einer Kollagenmatrix gezüchtete Epidermis (s. Abb. 5). Für unsere Versuche wurde *Episkin* mit einer Fläche von 0,38 cm^2 verwendet. Die humanen Keratinozyten stammen aus Proben von plastischen Operationen gesunder Brusthaut, die von einverstandenen Donoren gewonnen wurden. Es wurden HIV 1-& 2-, Hepatitis B- und C-Tests mit dem Blut der Donoren durchgeführt. Ebenso wurden die bakterielle und fungale Sterilität der Zellen sowie die Abwesenheit von Mycoplasmen sichergestellt. Die *Episkin* wird in Übereinkunft mit der Qualitätsreferenznorm ISO 9001 hergestellt, sodass

Nachweisbarkeit und Reproduktivität des Hautgewebes sichergestellt sind (http://www.*Episkin*.com/EPISKIN.asp 05.05.2015). Jede Gewebecharge wird qualitätskontrolliert im Bezug auf Zellvitalität, Barrierefunktion und Morphologie des Gewebes, bevor es ausgeliefert wird [11].

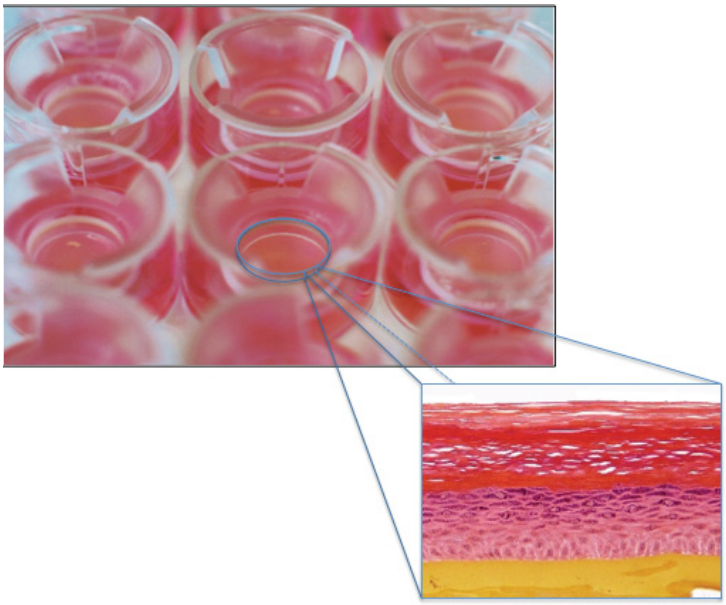


Abb. 5: Episkin von Skin Ethics,

Die aus humanen Keratinozyten auf einer Kollagenmatrix angezüchtete Episkin bildet auch histologisch ein perfektes Abbild der humanen Epidermis. (Abb: Episkin Company, 24.03.2016)

Hautexplantate aus der Chirurgie

Für die Versuche an humaner Haut wurden Hautproben aus Abdominalplastiken (Plastische Chirurgie, Köln Merheim) von Donoren, die zur Studie 3634 (mit Votum der hiesigen Ethikkommission vom 08.07.2011) eingewilligt hatten, verwendet. Die Haut wurde innerhalb von 24 h in Form kleiner Zuschnitte (ca. 4 x 6 cm) (s. Abb. 6) dreimal für 15 Minuten mit 453 nm LED-Strahlung behandelt, um anschließend mittels des TUNEL Assays (Seite 46) mögliche DNA-Schäden nach mehrfacher Bestrahlung zu erfassen. Zudem wurden Veränderungen des Nitrit und S-Nitroso-Gehaltes nach

Bestrahlung mit blauem Licht in Homogenisaten der Haut ermittelt, deren NO-Freisetzung via reduktiver Gasphasen-Chemiluminiszenz (S.27) gemessen wurde.

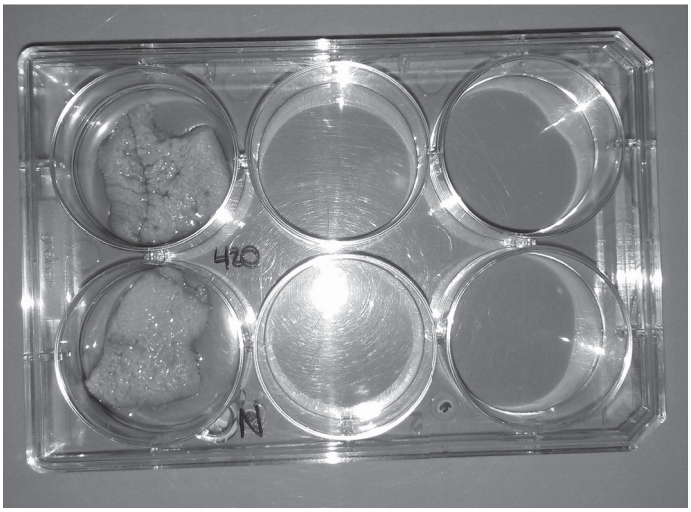


Abb. 6: Humane Hautexplantate zur Bestrahlung mit 453 nm,

Die Haut wurde unter sterilen Bedingungen aufbereitet, vom kutanen Fettgewebe gelöst und in ca. 2 cm^2 Zuschnitten in 6-Well Platten auf Nährmedium inkubiert und bestrahlt.

1.1.11 Geräte

Blaues LED-Licht

Es wurde eine von Philips Technologies, Eindhoven, bereit gestellte Bestrahlungseinheit, die Philips Light Engine, verwendet, welche aus einer Lampe mit blauen LEDs sowie einem Tisch mit einer Kontrolleinheit bestand. An der Kontrolleinheit ließen sich verschiedenen Strahlungsmodi (Lichtintensität und Strahlungsintervall; Settings 1 bis 4) des blauen Lichtes einstellen (S. 30). Zur der Bestrahlungseinheit stellte Philips zusätzlich zwei Schutzbrillen, welche undurchlässig für Licht der Wellenlänge 453 nm sind, die vom Studienprüfer/in und vom Probanden/in getragen werden mussten.

O2C von Lea Medizintechnik



Abb. 7: „O2C“ von Lea MedizinTechnik,

Messeinheit mit der von uns verwendeten Messsonde von Lea Medizintechnik

Das „Oxygen to see“ (O2C) wurde von der Firma Lea Medizintechnik GmbH, Gießen entwickelt und stellt eine Kombination aus Laser-Doppler-Anemometer und Gewebsspektrometer dar (s. Abb. 7). Mit dem O2C können der Sauerstoffgehalt, der Hämoglobingehalt, sowie die Viskosität des Blutes gemessen werden. Zudem kann aufgrund des Laser-Doppler-Verfahrens die Mikrozirkulation in verschiedenen Tiefen bestimmen werden. Für unsere Versuche waren die Bestimmungen des relativen Blutflusses, sowie die kapillar venöse Sauerstoffsättigung (SO_2) von Bedeutung. Der Blutfluss wurde in 1 bis 2 mm Tiefe (superfizial), sowie in 6 bis 8 mm Tiefe (profund) bestimmt. Dabei wird der Blutfluss in der Einheit *Arbitrary Units (A.U.)* angegeben. Dies begründet sich dadurch, dass die gemessenen Signale elektrische Größen aus Frequenzen und Amplituden sind, sodass sich als Einheit eine Kombination aus elektrischen Einheiten ergeben würde. Da uns die qualitative Aussage über den Anstieg des Blutflusses unter blauem Licht im Vergleich zum Ausgangswert vor der Bestrahlung interessierte, war es für unsere Messungen nicht notwendig den Blutfluss in ml/min zu konvertieren, sodass wir weiterhin mit der Einheit A.U. arbeiten konnten. Neben dem Blutfluss wurde mittels des *„O2C“* die kapillar-venöse SO_2 bestimmt, welche ein Maß für das Gleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und -verbrauch im Kapillargebiet

darstellt. Für die Bestimmung der gemischt venösen Sauerstoffsättigung (SO_2) analysiert das O2C mittels einer Weißlichtquelle die Farbe des Blutes, welche sich mit dem Grad der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins verändert (s. Abb. 8). Zur Berechnung der Sauerstoffsättigung in Prozent an gesättigtem Hämoglobin (Hb) am vorhandenen Hb, muss die im beleuchteten Gewebevolumen vorhandene Hämoglobinmenge bekannt sein, welche durch eine Absorptionsmessung bestimmt wird. Befindet sich viel Blut im beleuchteten Messvolumen der Sonde, absorbiert das Hämoglobin, als stärkster Lichtabsorber im Gewebe das meiste Licht. Das O2C berechnet aus dem absorbierten Lichtanteil die relative Hämoglobinmenge für das beleuchtete Gewebevolumen [99] .

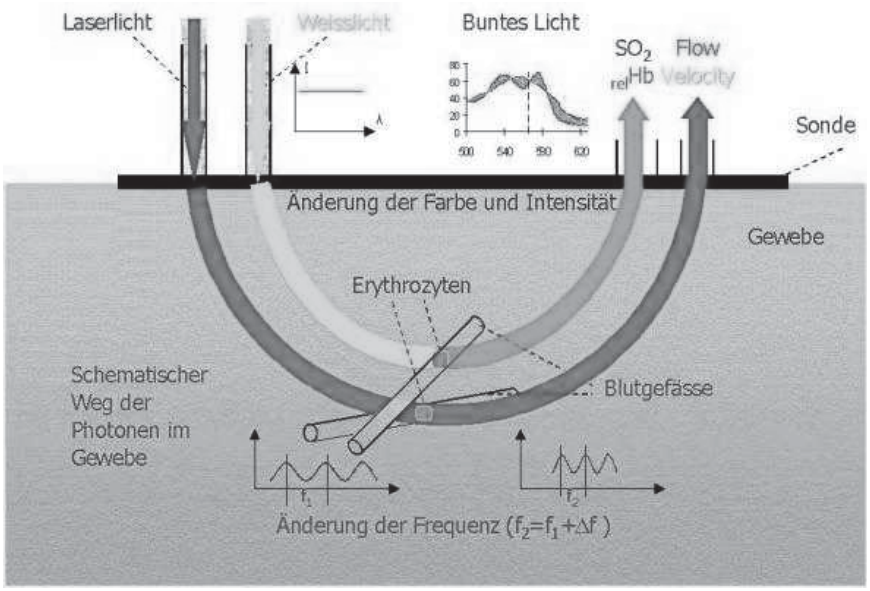


Abb. 8: Messprinzip des O2C;

durch eine Kombination von Doppler-Technik und Gewebsspektrometrie lassen sich der Hämoglobingehalt, die Sauerstoffsättigung und der relative Blutfluss des kapillaren Blutes bestimmen.

Chemiluminiszenzdetektor

Der Gehalt an NO-Metaboliten der Haut wurde in einem Chemiluminiszenzdetektor (CLD) gemessen (CLD 88 AM, Dürnten, Schweiz), welcher in der Lage ist NO im 1 nM-

Bereich zu messen. Das Messprinzip beruht auf dem Auftreten von Lichtquanten im roten bis infraroten Bereich durch die Reaktion von freigesetztem NO mit Ozon (O_3):

$NO + O_3 \rightarrow NO_2^* + O_2 \rightarrow NO_2 + hv$

Um NO aus NO-Metaboliten durch Reduktion freizusetzten wurden zwei verschiedene Lösungen verwendet. Zur Detektion von NO aus NO_2 oder RSNO wurde eine Essigsäure-Jodid-Lösung verwendet, zur Detektion von Nitrat eine Vanadium-Chlorid-Lösung. 25 ml dieser Lösungen befanden sich in einem, auf 60 °C aufgeheizten, vorgeschalteten Glaskolben. Die Reduktion von NO_2 lief dabei in der Essigsäure-Jodid-Lösung nach folgender Reaktion ab:

$NO_2^- + I^- + 2\ H^+ \rightarrow NO + ½\ I_2 + H_2O$

Die Reaktion von Nitrat mit der Vanadium-Chloridlösung wie folgt:

$2\ NO_3^- + 3\ V_3^+ + 2\ H_2O \rightarrow 2\ NO + 3\ VO_2^+ + 4\ H^+$

RSNO wurden durch die Reaktionslösung nach folgender Gleichung denitrosiert:

$I_2 + I^- \rightarrow I_3^-$

$I_3^- + 2\ RSNO \rightarrow 3\ I^- + R\square + 2NO^+$

$2\ NO + 2\ I^- \rightarrow NO + I_2$

Das freigesetzte NO wird in diesem Messverfahren mittels eines inerten Gases, Stickstoff, welches die Reaktionslösung durchströmt zur CLD abtransportiert [100]. Die Injektion der flüssigen Proben in die Reaktionslösung erfolgte mittels gasdichter Hamilton-Pipetten *(Hamilton, Reno, Nevada, USA).* Bei Injektion unbehandelter Proben setzt sich das entstehende NO-Signal aus der Dekomposition von NO_2 und RSNO zusammen. Um die einzelnen Stickstoffspezies separat messen zu können, wurden die Proben daher mit Substanzen vorbehandelt, welche das jeweils nicht zu messende NO-Derivat abfangen. Zur Quantifizierung des S-Nitrosogehalt einer Probe wurde diese zuvor mit 0,5 %-iger Sulfanilamidlösung in HCl vorbehandelt. Sulfanilamid reagiert mit vorhandenem NO_2, sodass ein stabiles Diazoniumsalz entsteht, welches nicht zu NO reduziert werden kann. Das entstehende Signal aus Sulfanilamid-vorbehandelten

Proben entspricht somit den vorhandenen RSNO in der Probe. Durch Subtraktion dieses Signals vom Gesamt-NO-Signal lässt sich der Gehalt einer Probe errechnen [67, 101].

5. Methoden

1.1.12 Probanden-Bestrahlung mit blauem Licht (453 nm) verschiedener Intensitäten

Die Bestrahlung mit blauem Licht erfolgte an 13 gesunden Probanden verschiedener Hauttypen (I-V nach Fitz-Patrick) mittels 453 nm blauem Licht, mit dem Ethikvotum der Universitätsklinik Düsseldorf: Studiennummer 4073 vom 05.04.2013. Die Lampe befand sich in einer Entfernung von 17 cm zur Auflagefläche des Armes, entsprechend einer Entfernung von ca. 11,0 bis 11,5 cm zur Hautoberfläche bei einer durchschnittlichen Dicke des Unteramres von 5,5 bis 6 cm. Die Bestrahlung erfolgte mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm in vier verschiedenen Modalitäten (Setting 1 – 4). Miteinander verglichen wurden zwei kontinuierliche Strahlungsmodalitäten unterschiedlicher Intensitäten mit zwei gepulsten Modi verschiedener Pulsfrequenzen. Setting 1 emittierte kontinuierliches Licht in einer niedrigeren Bestrahlungsstärke als die übrigen Settings. Die Settings 2 bis 4 haben unterschiedliche Bestrahlungsstärken. Durch den gepulsten Modus der Settings 3 und 4 ergibt sich eine Mittelwertsirradianz (W/cm^2), sowie Strahlungsenergie pro Fläche (J/cm^2), welche mit der von Setting 2 vergleichbar ist.

Setting	*Irradianz*	*15 Minuten*	*30 Minuten*	*60 Minuten*
1	34 mW/cm^2	30,6 J/cm^2	61,2 J/cm^2	122,4 J/cm^2
2	58 mW/cm^2	52,2 J/cm^2	104,4 J/cm^2	208,8 J/cm^2
3	$\overline{X}$ = 50 mW/cm^2 (100 mW/cm^2 im Peak)	45 J/cm^2	90 J/cm^2	180 J/cm^2
4	$\overline{X}$ = 50 mW/cm^2 (200 mW/cm^2 im Peak)	45 J/cm^2	90 J/cm^2	180 J/cm^2

Die Probanden wurden über alle Risiken der Bestrahlung aufgeklärt, sowie über ihren Versicherungsstatus durch Philips, Eindhoven. Zur Validierung der Messwerte wurde ein Fragebogen ausgefüllt, welcher Auskunft über das Wasch-, Sport- und Nahrungsprofil

der Probanden gab. Vor Beginn der Bestrahlung saßen die Probanden für 5 Minuten ruhig vor der Lampe, um den Blutfluss auf das Ruhelevel absinken zu lassen. Die O2C-Sonde, welche den Blutfluss vor, während und nach der Bestrahlung misst wurde auf einem doppelseitig klebenden Pflaster (Adhesive Tape, Lea Medizintechnik GmbH, Gießen) befestigt. Das Pflaster wurde an einer Stelle am hohlhandseitigen Unterarm im bestrahlten Bereich aufgeklebt, sowie an einem Kontrollpunkt am Oberarm. Vor Aufkleben wurde je eine der Thermometersonden (Digitales Thermometer, RS Components GmbH, Mörenfeld Deutschland) unter dem Pflaster befestigt Zu Beginn wurde die Temperatur am Ober- und Unterarm notiert, sowie die Pigmentierung und Rötung der Haut gemessen (Micro Medical, Königsstein, Deutschland). Danach wurde der Blutfluss superfizial und profund am Kontrollpunkt, sowie am darauf bestrahlten Messpunkt mittels O2C bestimmt. Anschließend wurde der Arm des Probanden im geschlossenen Kasten mittig unter der Lampe platziert und die Bestrahlung gestartet. Alle fünf Minuten wurde mittels der O2C-Sonde der Blutfluss und die Sauerstoffsättigung in % des Hb-Gehaltes superfiziell und profund am Bestrahlungspunkt bestimmt, sowie die Temperatur am Bestrahlungs- und am Kontrollpunkt notiert. Nach 14,5 Minuten erfolgte eine letzte Messung während der Bestrahlung. Nach diesem Messpunkt wurde die Lampe zu Minute 15 ausgeschaltet und erneut gemessen. Der Arm wurde bei den ersten 9 Experimenten (Proband 1-6 S1, Proband 1,3,5 S2) aus dem Kasten herausgenommen, die Sonde wurde für eine Messung am Kontrollpunkt des Oberarmes umgesetzt. Danach wurde die Sonde wieder auf den Bestrahlungsmesspunkt gesetzt und bis zu 15 Minuten nach Bestrahlungsende alle fünf Minuten weiterhin Blutfluss und Temperatur notiert. Ab Experiment Nr. 9 wurde die Sonde nicht mehr umgesetzt, um einen artifiziell induzierten Anstieg des Blutflusses, durch die Hautirritation nach Abziehen des Pflasters zu vermeiden. Für die anschließende Auswertung wurden die Messwerte der oben genannten Messungen mit Umsetzen des Pflasters ab Minute 20 exkludiert. Nach insgesamt 30 Minuten wurde zusätzlich zur Messung am Bestrahlungspunkt noch einmal am Kontrollpunkt des Oberarms der Blutfluss bestimmt, sowie die Pigmentierung und die Rötung der Haut mittels Melanometer gemessen.

1.1.13 Messung des Nitritgehaltes der Haut

Der Nitritgehalt auf der Haut sollte vor und nach Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm mittels Lösung in PBS bestimmt werden, um eine mögliche Zu-/Abnahme der kutanen NO-Speicher unter 453 nm nachweisen zu können. Dazu wurden in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio One,) 750 µl DPBS (w/o Mg^{2+}, w/o Ca^{2+}) pipettiert. Das Röhrchen wurde eine Minute geöffnet auf die Haut des Probanden gehalten, um das NO_2 auf der Hautoberfläche in PBS zu lösen. Dabei gehen wir davon aus, dass sich pro Zeit konstant viel NO_2 löst und in das PBS diffundiert. Um aufzuzeigen, dass an den verschiedenen Stellen des Unterarmes, sowie zwischen dem linken und rechten Arm keine signifikanten Unterschiede im Nitritgehalt der Haut vorliegen, wurden vorab mehrere Messreihen an verschiedenen Probanden und mehreren Stellen auf einem Arm durchgeführt (s. Abb. 1 im Anhang). Gemessen wurde jeweils der Nitritgehalt in 100 µl aus den 750 µl im Falcon nach einer Minute Hautkontakt. Das PBS wurde mittels Hamilton-Pipette aufgenommen und im Chemiluminiszenzdetektor (CLD) gemessen. Zu jedem neuen Versuchsaufbau mit der CLD wurde eine eigene Eichreihe angesetzt und gemessen, sowie eine PBS-Kontrolle. Da eine Abhängigkeit der Amplitudenhöhe zu der Zeitspanne beobachtet wurde, in welcher das PBS vom Hautkontakt bis zur Injektion in die CLD im Falcon verblieb, wurden drei Injektionen einer Probe in einem konstanten Abstand von zwei Minuten in die CLD injiziert. Die erste Injektion erfolgte dabei eine Minute nach Hautkontakt.

1.1.14 Temperaturkontrolle des Blutflussanstiegs mittels Föhn

Die Messung der NO-Metabolite unter Irradiation mit 453 nm mittels Auswaschen in PBS erwies sich als nicht repräsentativ und nicht reproduzierbar. Aus zeitlichen und praktikablen Gründen war es nicht möglich, die Bestrahlungsversuche an allen Probanden unter Messung des aus der Haut diffundierenden NO mittels einer gasdichten, an die CLD angeschlossenen Kammer zu wiederholen [72], um die NO Freisetzung unter Irradiation mit dem Blutflussanstieg korrelieren zu können. Daher fehlte eine Temperaturkontrolle um einen rein thermisch induzierten Blutflussanstieg unter 453 nm ausschließen zu können. Dazu wurden die Arme von 3 Probanden analog

zu den Bestrahlungsversuchen für 15 Minuten mit einem Föhn, statt mit blauem Licht behandelt und ebenfalls Blutfluss und Temperaturdaten erhoben. Der Föhn (Philips HP8232/00, Philips Amsterdam Eindhoven) wurde fest in eine Halterung eingespannt und der Arm der Probanden aus 40 cm Höhe geföhnt. Die Temperaturerhöhung aus dieser Höhe entsprach dem maximalen Temperaturanstieg unter Bestrahlung mit 453 nm blauem Licht.

1.1.15 Statistische Analyse der Blutflussdaten mittels Loess-Regression

Da die einzelnen Messpunkte zu verschiedenen Zeitpunkten nicht unabhängig voneinander sind, ist bei einem zeitlichen Verlauf eine ANOVA-Testung nicht empfehlenswert. Daher wurde die Veränderung der Blutfluss-, Sauerstoffsättigung- und Temperaturdaten unter blauem Licht über die Zeit mittels einer *Loess-Regression* untersucht und graphisch dargestellt. Die Loess-Regression ist eine nicht-parametrische Regression, die eine Kurve durch ein Zeit- oder Streudiagramm legt. Die Regression hilft einem eine Beziehung zwischen Variablen abzubilden und einen Trend darzustellen. Da die Streuung der Blutflusswerte unter Bestrahlung mit blauem Licht innerhalb unserer Probandengruppe sehr groß ist, kann man sich mittels der Loess-Regression am ehesten einem Trend bei der Bestrahlung nähern. Sie ist für unsere Daten zudem eine besonders günstige Darstellungsform, da einzelne Probanden, die besonders gut auf das blaue Licht reagieren in dieser Darstellungsform, nicht wie in anderen Graphiken durch z. B. Mittelwertberechnung verloren gehen, sondern im Scatterplot sichtbar bleiben. Das Prinzip der Loess-Regression besteht darin, jedem Punkt eine neue Position zu zuweisen, sodass er sich besser in das Muster seiner Nachbarpunkte einfügt. Das Ergebnis ist eine geglättete Linie. Dazu wird zunächst ein Wert *f* bestimmt**,** welcher festlegt, wie viele Nachbarpunkte in die Glättung einbezogen werden sollen**.** Ein großer *f*-Wert führt zu einer stärkeren Glättung der Kurve, da der *f-Wert* wird mit der Anzahl aller Punkte multipliziert wird, um die Anzahl relevanter Nachbarpunkte zu erhalten. Eine Gewichtsfunktion weist jedem Nachbarpunkt ein Wichtungsmaß zu, mit welchem er Einfluss auf die neue Position eines Punktes nimmt. Je näher ein Punkt am Mittelwert der einbezogenen Punkte liegt, desto größer ist sein

Einfluss auf benachbarte Punkte bei der Neuzuweisung der Punktpositionen. Nahe Punkte haben einen großen Einfluss, entfernte Punkte einen schwachen. Durch alle beteiligten Punkte wird eine Regressionsgerade nach dem Prinzip der gewichteten kleinsten Quadrate gelegt. Der Ausgangspunkt wird auf die Gerade verschoben und erhält so seine neue Position. Diese Neuzuweisung anhand gewichteter kleinster Quadrate wird mit jedem einzelnen Punkt durchgeführt. Am Ende erhält man ein Scatterplot mit einer neuen geglätteten und an die Punkteverteilung angepassten Regressionslinie. Um die Linie herum wird mittels eines grauen Balkens das 95 % Konfidenzintervall (KI) abgebildet. Für den Vergleich der verschiedenen Lampensettings untereinander gilt: Sobald sich die 95 %-Konfidenzintervallgürtel der Regressionslinien nicht überschneiden kann man von einem signifikanten Unterschied der Datensätze ausgehen [40, 102].

1.1.16 Messung der NO-Freisetzung aus Hauthomogenisaten unter 453 nm

Um mögliche Unterschiede des Effektes verschiedener Modi des blauen Lichtes (gepulst/kontinuierlich) auf die Veränderung des Gehaltes an NO, NO_2 und S-Nitroso-Verbindungen in der menschlichen Haut zu ermitteln, wurden Hautexplantate mit den Settings 1 bis 4 der Blaulichtlampe bestrahlt. Die noch am selben Tag aus dem Operationssaal gelieferte Haut wurde steril präpariert und in ca. 4 x 6 cm^2 große Stücke geschnitten. Das Fettgewebe wurde gleichmäßig bis auf eine ca. 0,5 cm tiefe Schicht abgetragen und die Haut in Petrischalen auf Vollmedium gebettet. Die apikale Schicht der Haut war dabei nicht mit Medium benetzt. Pro Setting wurden zwei Hautstücke in jeweils einer eigenen Petrischale bestrahlt. Auf ein Hautstück wurde mittig 1 ml PBS gegeben, auf das andere 1 ml Natrium-Kupfersulfat-Lösung. Die Haut wurde für 15 Minuten mit dem entsprechenden Setting bestrahlt, während die anderen Proben, sowie die Negativkontrolle im Brutschrank in Vollmedium gelagert wurden. Im Anschluss an die Bestrahlung wurden die Hautstücke unter der Sterilbank sorgfältig mit 5 ml *Aqua dest*. gewaschen. Mittig auf dem Hautstück wurde eine Stanzbiopsie (Durchmesser 1,5 cm) entnommen. Zusätzlich wurden kleine 1 cm x 1 cm große Stücke aus der Mitte herausgeschnitten. Die Stanzen und Hautausschnitte wurden unmittelbar in flüssigem

Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur Homogenisierung bei -80 °C gelagert.

Zur Messung des Gehaltes der NO-Metabolite in den bestrahlten humanen Hautexplantaten wurden diese homogenisiert und anschließend mittels CLD gemessen. Um ein injizierbares Homogenisat der Haut zu erstellen, wurden die Stanzbiopsien zunächst am Kryostat (Leica, Wetzar, Deutschland) in 5 *µ*m dicke Schnitte bis in eine Tiefe von 2,5 mm von apikal geschnitten. Anschließend wurde die geschnittene Haut in einem abgedunkelten 2 ml-Eppendorfgefäß tariert gewogen. Zunächst wurde die Haut mit NEM-Puffer (PBS mit 5mM NEM, 2,5 mM EDTA, PI) 1:4 (w/v) verdünnt und mittels Homogenisator „*Ultra Turrax TP 18/10“* (Janke und Kunkel, Staufen, Germany) homogenisiert [72]. Anschließend sollte der Überstand nach Zentrifugierung mit 1000 *g* für drei Minuten abgenommen und auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml verdünnt werden. Diese Methode erwies sich mit meinen Hautschnitten leider als nicht praktikabel. Zum einen führte sie zu nicht injizierbaren, viskösen Homogenisaten. Zum anderen lagen der gemessene Protein und NO-Gehalt der Homogenisate weit unter den zuvor beschriebenen Werten. Daher wurde versucht, die Haut direkt nach der Bestrahlung in flüssigem Stickstoff tief zu frieren und mittels eines Cell-Crushers ein Homogenisat zu erstellen, um den aufwendigen Schneideprozess im Kryostat zu umgehen. Auch bei dieser Methode war es jedoch nicht möglich ausreichend Material aus den Hautschnitten zu gewinnen, um in einer 1:4 (w/v) Verdünnung ein flüssiges Homogenisat zu erstellen. Oftmals war es kaum möglich nach Zentrifugation mit 1000 *g* einen Überstand abzunehmen. Daher wurden in weiteren Versuchsreihen Hautschnitte in einem Verhältnis von 1:10 mit einer Proteasen-Inhibitor-Lösung (1 Tablette Proteaseinhibitor auf 10 ml PBS) verdünnt und mittels Sonofier homogenisiert. Unter dem Sonofier erhitze sich das Homogenisat weniger stark als unter dem Homogenisator. Zudem wurde es etwas dünnflüssiger, sodass weniger Probenvolumen zur Erstellung des Homogenisates notwendig war. Aufgrund der mittels BCA gemessenen zu geringen Proteinkonzentration der Hautproben, war es jedoch nicht möglich, die Proben wie von Paunel et. al. [72] angegeben weiter auf 10 mg/ml Protein zu verdünnen. Daher wurde das unverdünnte Homogenisat in die CLD injiziert: 50 *µ*l in

die Essigiodine-Lösung des einen CLD-Kolbens zur Messung des NO Gehaltes, 50 µl in die Vanadium-Chlorid-Lösung des anderen CLD-Kolbens zur Messung des Nitratgehaltes. Für eine anschließende Messung der RSNO wurden 100 µl des Homogenisates 1:1 mit 0,5%-igem Sulfanilamid gemischt und dunkel für 20 Minuten auf Eis gelagert. Zur Messung des Gehaltes an N-Nitrosoverbindungen wurden diesem Gemisch 4,17 mM Ascorbat und 4,17 mM Kupfer (CuII) hinzugefügt und ebenfalls in Dunkeln für 20 Minuten auf Eis inkubiert [10, 11]. Im Anschluss an die Nitrat- und -Nitrit Messreihe der Proben wurden die RSNO/RNNO-Verbindungen durch Injektion von je 150 µl mittels Hamilton Pipette in den Essig-Jodine CLD-Kolben injiziert. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Sulfanilamid die lichtinduzierte Dekomposition von NO_2 hemmt und somit das entstehende NO-Signal der mit Sulfanilamid inkubierten Proben, dem des Zerfalles von Nitrosoverbindungen entspricht [103].

1.1.17 Berechnung der Molarität der NO-Metabolite

Die Konzentration an NO, NO_2, RSNO, RNNO wurde über die Berechnung der Fläche unter der Kurve des jeweiligen NO-Peaks der CLD mittels *Origin Lab* errechnet. Eine *Baseline* Korrektur wurde durchgeführt. Anhand der vor jedem Versuchsdurchlauf injizierten Standardreihe bekannter NO-Konzentrationen wurde eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Konzentrationen der injizierten Proben errechnet werden konnten.

1.1.18 BCA-Proteinbestimmung

Um den Gehalt an vorhandenen S-Nitrosoverbindungen pro Gramm Protein im Hauthomogenisat angeben zu können, wurde eine Proteinbestimmung an den zuvor abgenommenen Proben des Hauthomogenisates durchgeführt. Die Bicinchoninsäure (BCA)-Methode basiert auf der *Biuret-Reaktion*, der Chelatierung von Kupfer durch Proteine in alkalischen Lösungen mit Kalium-Natrium-Tartrat-Tetrahydrat ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$). Dabei wird Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert und es entsteht ein hellblauer Chelatkomplex. In einem weiteren Schritt reagiert BCA mit dem zuvor entstandenen Kupfer-Kation Cu^{1+}. Es entsteht ein intensiv lilafarbenes Reaktionsprodukt, durch die Chelatierung eines Kupferions mit 2 BCA-Molekülen. Dieser BCA-Kupfer-Komplex ist wasserlöslich und zeigt eine starke lineare Absorption bei 562 nm mit steigendem

Proteingehalt in einem Bereich von 20 bis 2000 µg/ml. Die Proteinkonzentrationen werden mittels einer parallel angesetzten Standardreihe eines Proteins in bekannten Konzentrationen, in diesem Falle bovines Serumalbumin (BSA) errechnet. Die Sensitivität dieses Standards beträgt 125 bis 2000 µg/ml. Das Kit enthält zwei verschiedene Reagenzien, welche in einem Verhältnis von 50:1 (Reagenz A:B) zu einer Arbeitslösung angesetzt wurden. Das Reagenz A enthält Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA, sowie Kalium-Natrium-Tartrat-Tetrahydrat in einer 0,1 M Natriumhydroxidlösung, das Reagenz B 4 %-ige Kupfersulfatlösung. Von dieser Lösung wurden je 200 µl zu 10 µl Standard/Probe in Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Platte wurde anschließend für 30 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur (RT) wurde die Absorption bei 562 nm im Multiwell-Spektrometer *Viktor* bestimmt. Der Leerwert der Probe (PBS) wurde von allen gemessenen Standard- und Probenwerten abgezogen. Anschließend wurde eine Standardkurve erstellt, indem die Mittelwerte der BSA-Standards gegen ihre Konzentration in µg/ml aufgetragen wurden und die lineare Regression hierzu berechnet. Anhand der Regressionsgerade wurde die Proteinkonzentration der Hauthomogenisatlösungen bestimmt, sodass die in der CLD-Messung ermittelte Konzentration an RSNO im Hauthomogenisat durch die darin vorhandene Proteinmenge normiert werden konnte [104].

1.1.19 Die Bestrahlung nitrosierter BSA-Lösung mit 453 nm blauem Licht

Um die Potenz der nicht-enzymatischen NO-Freisetzung unter den einzelnen Lampensettings (1 bis 4), unabhängig von Einflussfaktoren wie der NOS-Aktivität *in vivo*, welche ebenfalls zu einem NO-Anstieg führen könnte, beurteilen zu können, wurde nitrosiertes BSA (Bovines Serum AlbuMinuten) in einem der CLD vorgeschalteten Glaskolben mit blauem LED-Licht mit den vier verschiedenen Lampe-Settings bestrahlt. Dabei konnte die Freisetzungskinetik von NO aus RSNO unter kontinuierlicher Strahlung (Setting 2) mit der unter gepulster Strahlung (Setting 3 und 4) verglichen werden. Zur Herstellung einer 5 %-igen nitrosierten BSA-Lösung wurde NO_2 im

Verhältnis 2:1 mit BSA in 0,5 molarer Salzsäure in reinem Wasser (Millipore; kupferfrei) gelöst und für 30 Minuten auf einer Schüttelplatte suspensiert. Anschließend wurde die Lösung über Nacht auf einer Rüttelplatte im Dunkeln bei 1 °C gelagert. Durch den sauren pH-Wert der Lösung wurde durch Dekomposition NO freigesetzt, welches die freien Thiolgruppen des BSA nitrosiert. Am Folgetag wurde mit 1 mM Natriumhydroxidlösung (NaOH) der pH-Wert der Lösung auf 7,4 titriert. Für die Messung wurden zwei CLDs zeitgleich verwendet (s. Abb. 9). In die erste CLD strömte das direkt aus dem bestrahlten, nitrosierten BSA freiwerdende NO. Da BSA ein natürliches kupferbindendes Protein ist, war die kupferabhängige Photodekomposition von NO_2 unter dem blauen Licht im ersten Kolben gehemmt [30, 75, 105-109], so dass an dieser Stelle ausschließlich die Spaltung von RSNO gemessen wurde.

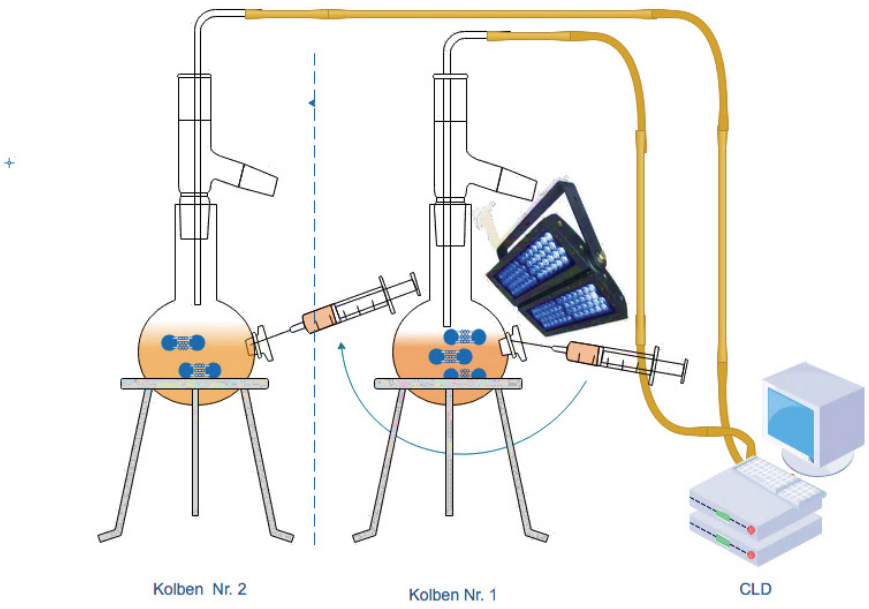


Abb. 9: CLD-Aufbau zur Messung von NO und RSNO in nitrosiertem BSA während und nach Bestrahlung mit 453 nm blauem LED-Licht;

Entnahme von mit 453 nm bestrahlter nitrosierter 1 %iger BSA-Lösung aus Kolben 1 alle 5 Minuten während der Bestrahlung zur Messung der nach X Minuten Bestrahlung noch enthaltenen NO und RSNO Verbindungen mittels Detektion des in der Essig-Jodine-Lösung frei werdenden NO mittels Chemiluminiszenz-Detektoren (CLD). Zur Messung von RSNO wurden die Proben vor Injektion in Kolben Nr. 2 im Dunkeln auf Eis mit 0,5 %iger Sulfanilamidlösung vorinkubiert.

Mittels Injektion der bestrahlten Lösung in die Essig-Jodid-Lösung einer zweiten CLD, wurde alle fünf Minuten der noch in der bestrahlten Lösung vorhandene Gehalt an NO_2 und RSNO untersucht. Wie in vorhergehenden Arbeiten beschrieben, wurden die RSNO durch Vorinkubation mit 0,5 %iger Sulfanilamidlösung in HCl gemessen [108]. Sulfanilamid bildet mit NO_2 ein stabiles Diazoniumion, sodass das NO_2 abgefangen und stabilisiert wird. Das zu messende NO-Signal entspricht dann dem Zerfall vorhandener RSNO und RNNO. Um die Freisetzungskinetik der NO-Metabolite unter blauem Licht unter möglichst physiologischen Bedingungen zu testen, wurde zur bestrahlten BSA-Lösung kein NEM hinzugefügt, so dass, wie *in vivo*, freie reduzierte Thiolgruppen in der

Lösung vorlagen. Dies ermöglicht theoretisch die fortlaufende Bildung neuer RSNO durch Nitrosierung der freien Thiole durch freiwerdendes NO. Da der bestrahlte Kolben jedoch kontinuierlich mit Stickstoff als inertem Trägergas durchströmt wurde, ist davon auszugehen, dass freigesetztes NO sofort abtransportiert und via CLD gemessen wurde, ohne dass es zur Bildung neuer RSNO kommen konnte. Somit war es möglich, die Abnahme der RSNO unter blauem Licht exakt zu quantifizieren. Der zu bestrahlende Glaskolben wurde auf 36,5 °C aufgeheizt, mit 20 ml PBS und 0,1 ml Antifoam gefüllt und anschließend mit Alufolie abgedeckt, um eine Photodekomposition der RSNO durch UV-Licht vor Einschalten der Lampe zu vermeiden. Die Blaulichtlampe wurde in 3 cm Abstand zur Vorderkante des Kolbens aufgestellt. Anschließend wurden 5 ml 5 %iges nitrosiertes BSA hinzugegeben, sodass eine 1 %ige BSA Lösung vorlag. Diese wurde für 30 Minuten mit dem blauem Licht bestrahlt. Das aus der BSA-Lösung freigesetzte NO strömte in die erste CLD und wurde in *parts per billion* (ppb) gemessen. Alle fünf Minuten während der Bestrahlung wurden insgesamt 150 µl Lösung aus dem bestrahlten Kolben entnommen. 50 µl wurden direkt in die Essig-Jodid-Lösung der zweiten CLD injiziert. Die mit einer zweiten Hamilton-Pipette entnommenen 100 µl wurden zu 100 µl 0,5 %iger Sulfanilamidlösung in HCl in ein Eppendorfgefäß gefüllt und für mindestens 20 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert für eine anschließende Messung des S-Nitrosogehaltes. Für jedes Lampensetting 2 bis 4 wurde eine neue 1 %ige BSA-, sowie Essig-Jodid-Lösung angesetzt. Nach 30 Minuten Bestrahlung mit 453 nm Licht wurden direkt im Anschluss die jeweiligen Sulfanilamid-Proben für die S-Nitrosomessung in die Essig-Jodid-Lösung injiziert und gemessen. Für jedes der Lampensettings und den entsprechenden neuen Versuchsaufbau mit frischen Lösungen wurde eine eigene Eichreihe mit Lösungen bekannter Konzentrationen angesetzt, mit welcher im Anschluss die Molarität von NO_2 und RSNO errechnet werden konnte. Die Auswertung der gemessenen NO-Werte in ppb erfolgte wiederum über die Integration der Kurve und nach *Baseline*-Subtraktion mittels *OriginLab.* Die Konzentration an NO-Metaboliten in µM ergab sich durch Division der *Area under the Curve* (AUC) der jeweiligen Probenmesswerte durch den AUC-Wert der Eichreihe. Wurden unterschiedliche Mengen an Eichlösung und Probe injiziert, so wurden die AUC-Werte

vorab auf die Menge injizierter Eichlösung extrapoliert: Wurde doppelt so viel Probe wie Eichlösung injiziert, wurde der AUC-Wert der Probe halbiert (A/2= A*). Die Berechnung der Molarität ergab sich dann aus AUC_{A^*}/AUC_E.

1.1.20 Die Toxizität mehrfacher Bestrahlung der menschlichen Haut mit 453 nm

Im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz des blauen Lichtes war es nötig zu testen, ob eine mehrfache Bestrahlung DNA-Schäden in der Haut induziert, wie es von UV-Licht bekannt ist. In diesem Sinne wurden die Hautexplantate wie zuvor beschrieben (Seite 34) präpariert und anschließend auf Vollmedium mit den 4 Lampensettings für 15 Minuten bestrahlt. Anschließend wurden Stanzbiopsien (Durchmesser 8 mm) der Hautstücke entnommen, in Paraffin gebettet und anschließend am Mikrotom in 5 µM geschnitten. Diese wurden auf Objektträger fixiert und anschließend mittels TUNEL-Kit die Fluoreszenzfärbung zur Darstellung von DNA-Strangbrüchen durchgeführt. Die Schnitte wurden unter dem Mikroskop begutachtet und Fotos angefertigt. Dieser Versuch wurde mit Hautstücken von 2 Spendern durchgeführt.

1.1.21 Die Evaluation der Toxizität von 453 nm an artifiziell gezüchteter Epidermis

Um eventuelle irritative oder korrosive Effekte des blauen Lichts der Wellenlänge 453 nm zu ermitteln, wurde das *Episkin*-Model von Skin Ethics verwendet. Das *Episkin*-Model ist zur Testung von irritativen, wie korrosiven Eigenschaften von Chemikalien validiert. Getestet wurde ein potentieller toxischer Einfluss zweier Bestrahlungszeiten (15 Minuten, 30 Minuten) des blauen Lichtes auf die Integrität humaner Keratinozyten. Die *Episkin* wurde unter der Philips Light Engine mit den Einstellungen Setting 2 bis Setting 4 für 15, 30 und 60 Minuten bestrahlt. Damit die *Episkin* während der Bestrahlung nicht austrocknet und Artefakte bei der anschließenden CellTiter-Blue- und TUNEL-Messung entstehen, wurden sie mit 100 µl Flüssigkeit benetzt: Pro Bestrahlungseinstellung je eine *Episkin* mit 100 µl PBS, sowie eine mit 100 µl-Kupfersulfat-Lösung. Die *Episkin* wurde in 12-Well-Platten auf 1,5 ml Assay-Medium

bestrahlt. Die übrigen Platten wurden während der einzelnen Bestrahlungen im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert. Nach der Bestrahlung wurden die Platten für 24 h ± 1 h bei 37 °C inkubiert, und anschließend die CellTiter-Blue Messung, sowie das *TUNEL-Assay* und die MTT Versuche durchgeführt.

1.1.22 Zellviabilitätsprüfung nach Irradiation mit 453 nm Licht

CellTiter-Blue-Assay

Zur Quantifizierung der vitalen Keratinozyten nach Bestrahlung der Episkin mit blauem Licht (453 nm) wurde das CellTiter-Blue® Cell Viability Assay zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität verwendet. Vitale Zellen sind in der Lage den enthaltenen Indikatorfarbstoff Resazurin zu Resorufin zu reduzieren Resorufin gibt ein starkes Fluoreszenzsignal ab (Exzitationsmaximum 579 nm, Emissionsmaximum 584 nm), welches mittels Fluorometer detektiert werden kann. Außerdem durchläuft das Cell-Titer-Blue-Reagenz einen „Blaushift“ während der Reduktion zu Resorufin. Während Resazurin dunkelblau ist und nur eine geringe intrinsische Fluoreszenz aufweist, ist Resorufin pink und stark fluoreszierend (Abb.3). Das Absorptionsmaximum von Resazurin liegt bei 605 nm, das von Resorufin bei 573 nm. Zur Validierung der Zellvitalität wurde Resorufin mit 540 nm angeregt und das Fluoreszenzsignal bei 590 nm mittels Multiwell-Spektrometer (Victor x^3, PerkinElmer, Waltham Massachusetts) gemessen. Unter den meisten experimentellen Bedingungen ist das Fluoreszenzsignal von CellTiter-Blue proportional zur Anzahl vitaler Zellen. Es gibt einen linearen Zusammenhang zwischen der Anzahl vitaler Zellen und der Fluoreszenz. Das Reagenz wurde in einem Verhältnis von 1:20 mit Assay-Medium (SkinEthics) verdünnt. Einen Tag nach der Bestrahlung wurden die Episkins unter sterilen Bedingungen auf 1,5 ml CellTiter-Blue-Medium gesetzt und für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz des von den vitalen Zellen ins Medium freigesetzten Resorufin wie oben beschrieben bestimmt [109]. Danach wurden die artifiziellen Epidermiskonstrukte aus ihrer Halterung gelöst und in 400 µl 4%igem Formaldehyd für 24 h bei RT fixiert für weitere TUNEL-Messungen. (Quelle: TECHNICAL BULLETIN

CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Instructions for use of Products G8080, G8081 AND G8082)

MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Test zur Bestimmung der Zellvitalität. Um mögliche schädliche Effekte des blauen Lichtes auf die Keratinozyten der Episkin zu überprüfen wurde mittels des MTT-Tests die Viabilität von bestrahlten mit nicht bestrahlten Zellen verglichen. MTT steht für Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid. In vitalen Zellen kommt es zu einer Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes durch Elektronen-Donatoren wie NADH, NADPH oder auch Succinat, [75] bei welcher blau-lilane Formazankristalle entstehen (s. Abb. 11) Anhand der Reduktionskapazität der Zellen, kann die Zellviabilität bestimmt werden, welche als proportional zur Menge des entstandenen Formazan angesehen wird. Diese kann durch Messung der Absorption des blauen Farbstoffes bei 550 nm photometrisch quantifiziert werden. [110]

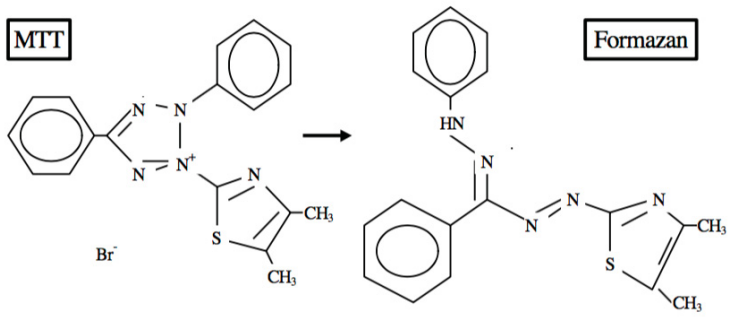


Abb. 10: Reduktion von MTT zu Formazan [111]

Hautirritations-Test

Zur Eruierung etwaiger irritativer Effekte des blauen Lichtes (453 nm) wurde ein Haut-Irritations-Test an bestrahlter Episkin durchgeführt. Als Irritation bezeichnet man

reversible Veränderungen der Haut durch exogene Reize wie z.B. Licht bestimmter Wellenlängen (wie UVA), welche zu einer Entzündungsreaktion mit lokaler Hyperämie führen, jedoch ohne Gewebsdefekt. Dazu wurde die Episkin auf 2 ml Test-Medium (von SkinEthics geliefert) mit den intensiveren Settings 2 bis 4 des 453 nm Blaulicht bestrahlt. Dabei wurde je eine Episkin mit 100 µl PBS, eine zweite mit 100 µl 100 µM-10 µM-Kupfersulfatlösung benetzt. Im Protokoll des Hautirritationstest ist eine Behandlungsdauer von 15 Minuten vorgesehen. Die Episkin wurde somit nach 15 Minuten unter dem blauen Licht mit 1 ml sterilem Wasser unter sterilen Bedingungen gewaschen, um die Behandlung zu beenden. Mit den zeitgleich behandelten Positiv- und Negativkontrollen wurde ebenso verfahren. Als Positivkontrollen wurde eine Episkin mit 100 µl 8 molarer NaOH-Lösung, eine mit 100 µl Eisessig, sowie eine mit 100 µl Natriumlaurylsulfat (SDS) behandelt, die Negativkontrolle mit 100 µl PBS. Die Kontrollen wurden für 15 Minuten ohne Bestrahlung mit den applizierten Substanzen im Wärmeschrank inkubiert. Nach der Behandlung wurden allen Episkins für 42 h ± 1 h im Wärmeschrank bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO_2) auf demselben Test-Medium inkubiert, auf dem zuvor die Behandlung stattgefunden hat. Nach den 42 h wurde 1 ml des Test-Mediums entnommen, auf dem die Episkin bestrahlt und inkubiert wurde. Dieses Medium wurde für eine darauf folgende Bestimmung der Interleukin-1-alpha (IL-1α) bei -80 °C eingefroren. Die Episkin wurde auf eine weitere 12 Well-Platte mit 1 ml 1 mg/ml MTT gesetzt und für 3 h inkubiert. Zur Extraktion des MTT-Farbstoffes wurde die Episkin anschließend vorsichtig aus den Körbchen gelöst, in 1 ml Isopropanol/HCl gegeben und über Nacht bei RT inkubiert.

IL-1α-ELISA

Um etwaige irritative Effekte des blauen Lichtes auf die epidermalen Keratinozyten zu testen, wurde neben der MTT-Messung nach 15 Minuten Bestrahlungszeit zusätzlich die IL-1α-Synthese der Keratinozyten gemessen. IL-1α ist ein wichtiger Mediator der Immunantwort. Es vermittelt die sterile Inflammation, sowie die initiale neutrophile Antwort inflammatorischer Prozesse. IL-1α wird in geringen Mengen intrazellulär konstitutiv exprimiert. Unter nekrotischen Veränderungen durch irritative oder toxische

Einwirkungen wird IL-1α vermehrt exprimiert und sezerniert [112, 113]. Es fungiert als alarmierendes Signalmolekül in der direkten Umgebung der Zelle, wo es die Inflammation durch Rekrutierung neutrophiler Granulozyten einleitet [105]. Das IL-1α wurde in 1 ml des Test-Mediums bestimmt, auf dem die Episkin bestrahlt und anschließend inkubiert wurde. Dies erfolgte mittels *Sandwich-ELISA*-Technik. Das *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dient der Quantifizierung spezifischer Moleküle. Dabei kommen zwei verschiedene Antikörper zum Nachweis eines Antigens, hier IL-1α, zum Einsatz [114]: Ein antigenbindender *Mouse Anti-human IL-1α* Antikörper in einer Arbeitskonzentration von 240 µl/ml, sowie ein biotinylierter *Rabbit-Anti-human IL-1α-Detektions*-Antikörper in einer Arbeitskonzentration von 50 ng/ml. Die Biotinylierung dieses Antikörpers kann am Ende des Assays mittels Streptavidin-*Horseradishperoxidase* (HRP)–Reaktion nachgewiesen werden. Streptavidin besitzt vier hochaffine Bindungsstellen für Biotin. Zunächst wurde biotinylierte Meerrettichperoxidase an Streptavidin gebunden, danach wurde dieser vorgeformte Komplex auf die Multiwellplatte pipettiert, sodass die noch freien Bindungsstellen des Streptavidin an die biotinylierten Detektions-Antikörper binden. Peroxidasen oxidieren Elektronendonoren, durch die frei werdenden Elektronen reduzieren sie Wasserstoffperoxid zu Wasser. Werden chromogene Substrate oxidiert wird die Reaktion durch Farbumschlag sichtbar und kann fluorometrisch quantifiziert werden. Als Substrat wurde ein 1:1 Gemisch aus H_2O_2 und Tetramethylbenzidin (TMB) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) verwendet, welches durch die HRP zu einem blauen Produkt oxidiert wird [115, 116]. Eine saure Stopplösung aus 2 molarer Sulfoxylsäure (H_2SO_4), (R&D Systems, Minneapolis, MN USA) beendet die Reaktion und wandelt den blauen TMB-Komplex in einen stabilen gelben Farbstoff um, dessen optische Dichte gemessen werden kann [117],[118]. Zur Quantifizierung der IL-1α Konzentration wurde eine Standardreihe sieben verschiedener bekannter Konzentrationen rekombinanten IL-1α´s angesetzt. Die optische Dichte der Standardreihe, sowie der *Assay-Medium* Proben der *Episkins* (S2 – S4 mit PBS/NO_2) wurde im Spektrometer (Multilabel Plate Reader VIKTOR) unter Wellenlängenkorrektur bei 540 – 570 nm gemessen. Anhand der Standardreihe wurde die Konzentration an IL-1α in pg/ml errechnet.

Hautkorrosionsassay

Um neben den irritativen Effekten auch korrosive Effekte des blauen Lichtes der Wellenlänge 453 nm zu ermitteln wurde an der *Episkin* ebenfalls ein Hautkorrosionstest durchgeführt. Als *korrosiv* bezeichnet man Substanzen, welche eine irreversible Gewebeschädigung auslösen. Diese Gewebeschädigung entspricht einer Nekrose als konsekutiver Folge von Entzündungsreaktionen oder toxischen Effekten, welche die Substanz induziert. Der Test unterscheidet sich vom Hautirritationstest lediglich durch eine längere Behandlungsdauer der *Episkin* mit der korrosiven Substanz (1h Bestrahlung mit 453 nm), sowie einer abweichenden Inkubationszeit nach der Behandlung. Es wurden dieselben Positiv- und Negativkontrollen verwendet. Die Irradiation der *Episkin* erfolgte nach dem bereits für den *Hautirritationstest* beschriebenen Schema. Die *Episkin* wurde eine Stunde mit den Settings 2, 3 und 4 auf 1 ml Test-Medium bestrahlt und anschließend mit 1 ml sterilem Wasser steril gewaschen. Statt einer darauffolgenden Inkubationszeit von 42 h wurde die Episkin für den Hautkorrosionstest direkt auf 1 ml MTT 1mg/ml gesetzt und für 3h bei 37 °C, 5 % CO_2 inkubiert. Die Extraktion des Farbstoffes erfolgte in 1 ml Isopropanol/HCl über Nacht bei RT. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte über die Messung der optischen Dichte der Extraktionslösung im Spektrometer. Dazu wurden 100 µl der einzelnen Lösungen in dreifach Bestimmung in eine 96-Well-Platte pipettiert und die Dichte bei 570 nm gemessen. Die Ergebnisse werden in Prozent von lebenden Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle angegeben [117, 119-122].

1.1.23 Fluoreszenz-mikroskopische Darstellung von DNA-Strangbrüchen: TUNEL-Assay

Zur Darstellung von DNA-Schädigung der bestrahlten Zellen der Episkin und der Vollhaut wurde das Deadend Fluorometric Tunel System von Promega benutzt. Das Assay eignet sich zur Darstellung apoptotischer Zellen an Paraffinschnitten. [12](Wu, Kennedy *et al.* 2003) Zur Vorbereitung wurde die in Paraffin gebettete Haut auf 4 µm Dicke geschnitten und auf Objektträgern fixiert. Die Deparaffinierung der Schnitte erfolgte zweimalig in Xylol für 10 Minuten, drei Mal in 100 % Alkohol (für 5, 5, und3

Minuten), danach in 95 %, 80 %, 75 % und 50 % Alkohol für jeweils drei Minuten bei Raumtemperatur (RT). Die Schnitte wurden abschließend mit 0,85%iger Natriumchlorid-Lösung (NaCl) und phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für je fünf Minuten bei RT gewaschen. Für die Fixierung wurden die Schnitte 15 Minuten mit 4 % Formaldehyd/gepuffert in PBS (Methanol-frei) behandelt und abschließend zweimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Das *Terminal Transferase mediated dUTP Nick End Labeling*-Assay (TUNEL) stellt etwaige DNA-Schäden dar, indem die rekombinante terminale Desoxynukleotidyltransferase (rTdT) die 3'OH-Enden von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen mit markierten Nukleotiden (dUTP-Digoxegin) koppelt und dadurch unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar macht. Es beruht auf der Erkenntnis, dass der Nachweis von fragmentierter DNA ein sicheres Merkmal des programmierten Zelltodes ist [72]. Das Assay wurde bei RT durchgeführt. Vor jedem Aufbringen einer neuen Lösung auf die Hautschnitte wurde die zuvor aufgebrachte Flüssigkeit vorsichtig entfernt. Zu Beginn des Assays wurde die Proteinase K-Stocklösung angesetzt, indem 10 mg Proteinase K mit 1 ml Proteinase K Puffer versetzt wurde. Diese Lösung muss bei -20 °C gelagert werden und kann zum Ansetzen mehrerer Assays verwendet werden. Die Schnitte wurden mit 100 µl einer 20 µg/ml Proteinase-K-Lösung überzogen. Die Proteinase K ist eine Endo- und Exonuklease, welche zur Extraktion der Nukleinsäuren benutzt wurde. Die Schnitte wurden zehn Minuten inkubiert und danach mit PBS gewaschen. Ein zu langes Einwirken der Proteinase-K-Lösung kann zum Ablösen der Schnitte führen. Das Nachfixieren erfolgte mit Formaldehyd 4 %/gepuffert in PBS (Methanol-frei) über fünf Minuten, sowie Waschen mit PBS. Die Positivkontrolle wurde von den anderen Proben getrennt weiterbehandelt. Sie wurde 5 mit 100 µl DNase-Puffer (QIAGEN) behandelt und danach mit einer 100 µl DNase-Puffer Lösung und 10 U DNase I (Set von Qiagen) für 10 bedeckt. Darauf folgte eine viermalige Waschung der Positivkontrolle mit destilliertem Wasser. Anschließend wurden alle Schnitte mit je 100 µl Äquilibrationspuffer ca. 5 bis 10 bedeckt. Ein Inkubationspuffer wurde nach den unten genannten Maßgaben auf Eis vorbereitet; bestehend aus den markierten Nukleotiden, dem rTdT-Enzym und dem Äquilibrationspuffer. Im Dunkeln wurden 50 µl des Inkubationspuffers auf die Schnitte pipettiert. Hierbei war zu beachten,

dass die Negativkontrolle mit einen Inkubationspuffer ohne das rTdT-Enzym behandelt wurde, welcher separat angesetzt wurde. Die Objektträger wurden mit Plastik-Coverslips bedeckt und für 60 bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Zuletzt wurden die Proben in einem zweifachen *SSC-Puffer* (20-fache Natriumcitrat-Lösung, im Kit enthalten, wurde 1:10 mit *Aqua dest*. verdünnt) für 15 gestellt. Hiermit beendete man die Enzymreaktion. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Hautschnitte mit DAKO Einbettmedium, sowie mit 4′,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) im Verhältnis 1:500 eingedeckelt. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI interkaliert mit AT-reichen Regionen doppelsträngiger DNA unter Abgabe eines Fluoreszenzsignals unter UV-Einfluss, sodass die Nuclei der Keratinozyten sichtbar werden. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei nicht direkt im Anschluss erfolgter Mikroskopie lichtgeschützt bei 4 °C [123].

Mikroskopie der TUNEL-gefärbten Hautschnitte:

Von jeder Probe wurden drei Bildaufnahmen an unterschiedlichen Stellen des Schnittes angefertigt (Bild1 – 3). Dabei wurde je eine Aufnahme mit dem DAPI-Filter zur Darstellung aller vorhandenen Zellkerne angefertigt (Belichtungszeit 20 – 30 ms), sowie eine Aufnahme mit dem FITC-Filter zur Darstellung der Zellen mit TUNEL positivem Signal (Belichtungszeit 120 – 300 ms).

Auswertung der TUNEL Bilder mittels digitaler Bildanalyse

Zur Errechnung des Anteils grün fluoreszierender Zellkerne mit DNA-Strangbrüchen nach Bestrahlung der Episkin bzw. Vollhaut wurden die Zellkerne des DAPI- und des FITC-Signals ausgezählt. Dazu wurde das Bildbearbeitungsprogramm FIJI (früher Image J) verwendet. Mit dem *adjust Treshold Tool* und der *Black&White*-Einstellung lässt sich ein Bild erstellen, auf dem nur noch weiße Zellkerne vor schwarzem Hintergrund zu sehen sind. Über den Befehl *Binary* wurde das Bild umgewandelt in eines mit schwarzen Zellen vor weißem Hintergrund. Über den Befehl *Binary Watershed* lassen sich Zellen, die sich teilweise überlappen wieder getrennt darstellen, sodass alle Zellen in die Zählung miteinfließen. Mittels dem *Analyze Particle Tool* wurden die Zellen

mit der Vorgabe *Particle size* = 20 ausgezählt. Das Programm erstellt eine Übersicht über die gezählten Punkte. Zusätzlich kann man sich das Ergebnis der Zählung optisch darstellen lassen, sodass bei jedem Bild kontrolliert wurde, ob alle Zellen erfasst wurden. Einzelne nicht gewertete Zellen wurden hinzuaddiert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil an TUNEL positiven Zellen mit einer DNA-Schädigung an allen in der DAPI Darstellung derselben Aufnahme gezählten Zellen errechnet (Feelisch, Rassaf *et al.* 2002, Paunel, Dejam *et al.* 2005; Idan, Peleg *et al.* 2015).

4. Ergebnisse

6. Die Steigerung der kutanen Perfusion unter Bestrahlung mit 453 nm blauem LED-Licht

Bei der Bestrahlung von n = 13 Probanden für 15 mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm, zeigte sich sowohl bei gepulstem, als auch bei kontinuierlichem Licht, ein Anstieg der kutanen Durchblutung superfizial in 1 bis 2 mm, sowie profund in 6 bis 8 mm Tiefe. Die Messung des Blutflusses erfolgte während der Bestrahlung von Minute 0 bis 15 alle 5 , sowie 15 über das Ausschalten der Lampe hinaus (= Minute 30) mittels Laser-Doppler-Spektroskopie.

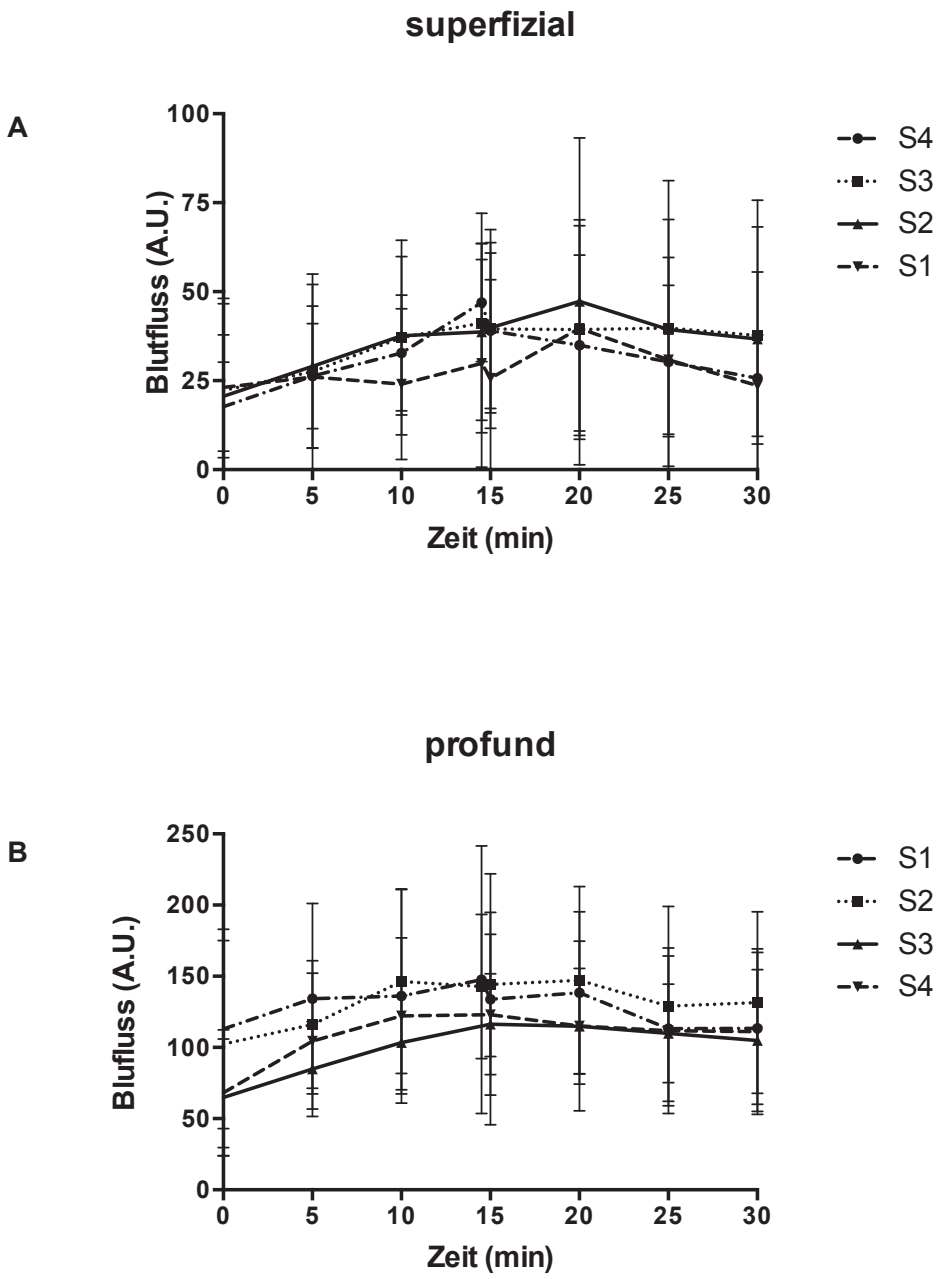


Abb. 11: Der Anstieg der kutanen Durchblutung während und nach 15-minütiger Bestrahlung mit 453 nm blauem LED-Licht 4 verschiedener Modi

A: in 1 bis 2 mm Hauttiefe, **B**: in 6 bis 8 mm Hauttiefe; Bestrahlung von n = 13 Probanden für 15 mit Setting 1 (S1 = 34 mW/cm², 30,6 J/cm²), Setting 2 (S2 = 58 mW/cm², 52,2 J/cm²), Setting 3 (S3 = 50 mW/cm², Peakintensität 100 mW/cm², 45 J/cm²), Setting 4 (S4 = 50 mW/cm², Peakintensität 200 mW/cm², 45 J/cm²), n = 13, Mittelwert ± Standardabweichung.

Insgesamt stieg die kutane Durchblutung unter allen vier Settings (S1 – S4) des blauen Lichtes deutlich an. Wie in Abb. 11 zu erkennen, konnte die kutane Perfusion vor allem unter den energiereicheren Settings 2 bis 4 nach 15 Bestrahlung im Mittel fast verdoppelt werden. Zu beachten ist dabei die große Standardabweichung aufgrund der großen interindividuellen Unterschiede in der Reagibilität auf das blaue Licht. Unter Setting 1 zeigte sich profund nach 15 Bestrahlung im Vergleich zu den superfizialen Werten eine stärkere Durchblutung als unter den Settings 3 und 4. Zudem liegen die 30 Werte von S3 und S4 vor allem in der tieferen Hautschicht unter den Werten der kontinuierlichen Settings 1 und 2. Auffällig ist jedoch, dass das Maximum der kutanen Durchblutung unter S1 und S2 vor allem in der superfizialen Hautschicht bei Minute 20, somit nach Ausschalten der Lampe liegt, während sich bei den anderen Settings das Durchblutungsmaximum bei Minute 15 unter noch laufender Bestrahlung zeigte. Da bei den ersten 6 Probanden bei Setting 1, sowie bei 3 Probanden bei Setting 2 noch eine Kontrollmessung zur Minute 15 durchgeführt wurde, für welche die Sonde vom bestrahlten Unterarm auf einen Messpunkt am Oberarm umgesetzt wurde, könnte die verstärkte Zunahme des Blutflusses zu Minute 20 Folge der lokalen Reizung der Haut sein. Einige Probanden reagierten mit einer deutlichen erythematösen Hautreaktion auf das Lösen der Sonde vom Pflaster. Um den Einfluss den Einfluss durch das Umsetzen des Pflasters beurteilen zu können, sind die Ergebnisse in Abb. 12 noch einmal unter Exklusion der Blutflusswerte von Minute 20-30 der entsprechenden Probanden dargestellt.

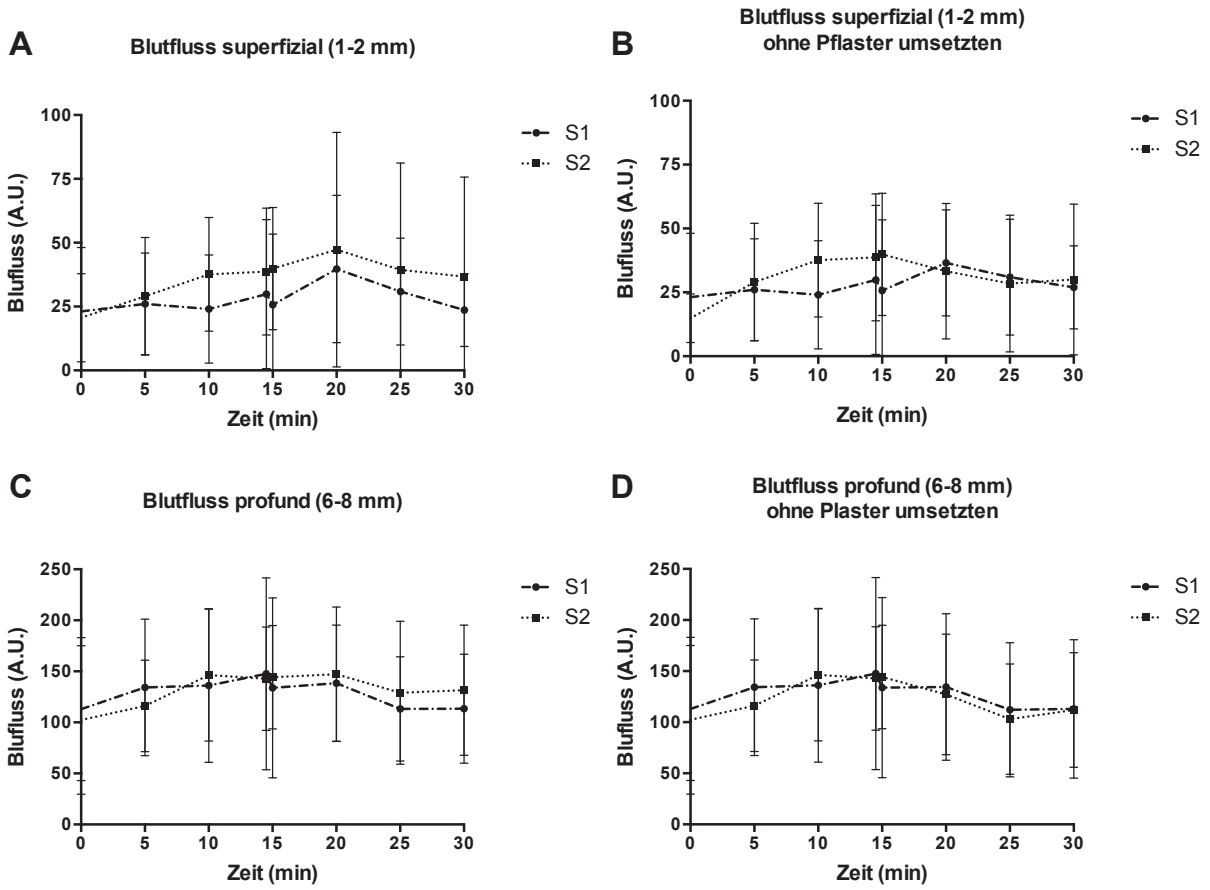


Abb. 12: Der Anstieg der kutanen Durchblutung unter 453 nm blauem Licht mit und ohne Umsetzten des Pflasters zur Kontrollmessung

A/B: Blutflussanstieg in 1 bis 2 mm Hauttiefe unter Bestrahlung mit Setting 1 (34 mW/cm^2) und Setting 2 (58 mW/cm^2) n=13, **B:** unter Exklusion der 20-30 Werte der Probanden 01 bis 06 bei S1 N=7, Probanden 01, 03 und 05 bei S2; n=10, **C/D:** Blutflussanstieg in 6 bis 8 mm Hauttiefe unter Bestrahlung mit Setting 1 (34 mW/cm^2) und Setting 2 (58 mW/cm^2) n=13, **D:** unter Exklusion der 20 bis 30 Werte der Probanden 01 – 06 bei S1 N = 7, Probanden 01, 03 und 05 bei S2; n = 10.

Exkludiert man die Werte der Probanden bei denen die Sonde zu Minute 15 umgesetzt wurde, zeigt sich eine Abflachung der Kurve ab Minute 15 in der superfizialen und der profunden Schicht bei Setting 2. Bei Setting 1 verringert sich der superfiziale 20 -Wert, bleibt jedoch gegenüber Minute 15 weiterhin erhöht. Profund zeigt sich dabei bei Setting 1, bis auf eine verkleinerte Standardabweichung, keine Veränderung des mittleren

Blutflusses zu Minute 20. Aufgrund dieser Ergebnisse in Zusammenschau mit dem oberflächlich beobachteten Erythem durch die mechanische Reizung der Haut, wurden bei allen folgenden Graphiken die 20 bis 30 Werte der entsprechenden Probanden (6 Probanden bei Setting 1; 3 Probanden bei Setting 2) exkludiert. Betrachtet man nach Ausschluss dieser Werte erneut den Kurvenverlauf (s. Abb. 13), so zeigt sich, dass die Werte von Setting 1 und 2 in der oberflächlichen Hautschicht nach 15 Bestrahlung nicht mehr über denen der Settings 3 und 4 liegen. Das weniger intensive Setting 1 zeigt im Vergleich zu den intensiveren Settings 2 ,3 und 4 eher niedrigere Werte. In 6 bis 8 mm Hauttiefe liegen die absoluten Blutflusswerte unter kontinuierlicher Bestrahlung mit den Settings 1 und 2 nach 15 Minuten weiterhin über den Blutflusswerten unter dem gepulsten Licht der Settings 3 und 4. Unter allen Settings zeigt sich auch 15 Minuten nach Bestrahlungsende zur Minute 30 eine gesteigerte Durchblutung im Vergleich zum Ausgangswert.

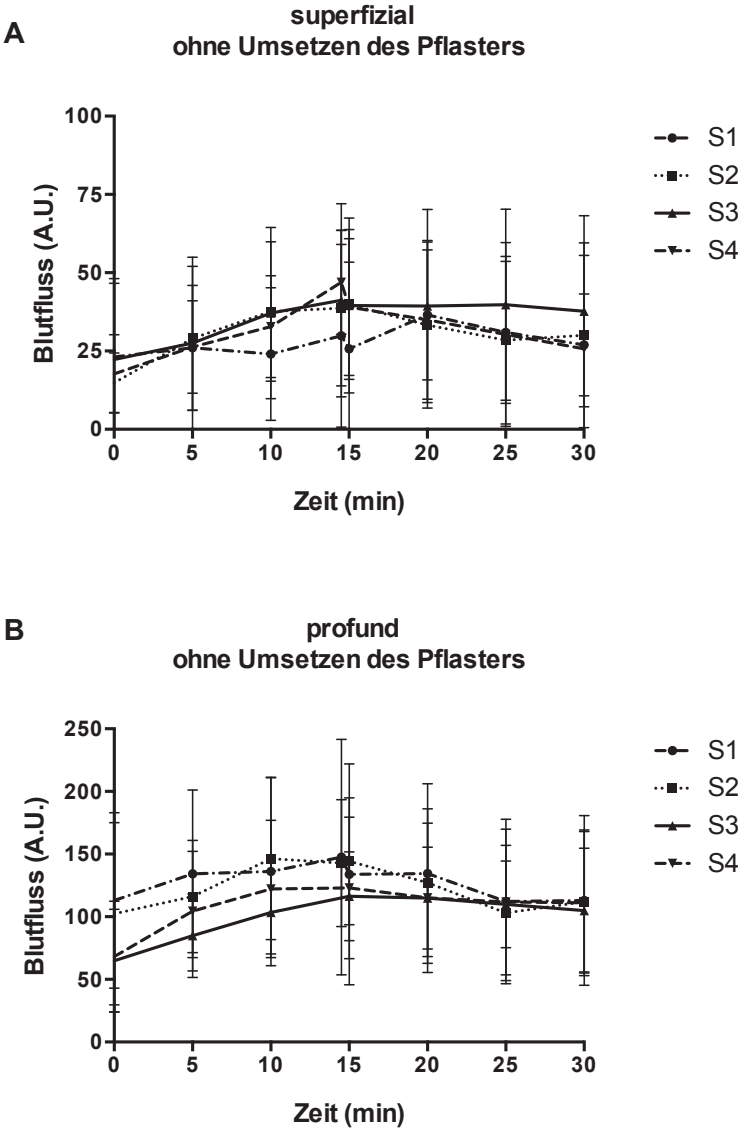


Abb. 13: Der Anstieg der kutane Durchblutung während und nach 15-minütiger Bestrahlung mit 453 nm blauem LED-Licht

A: in 1 bis 2 mm Hauttiefe**, B**: in 6 bis 8 mm Hauttiefe, Bestrahlung von n = 13 Probanden unter Exklusion der Probanden mit Umsetzen der Sonde zu Minute 15 (6 Proband bei S1; Proband 3 Probanden bei S2), Graph mit Mittelwert ± Standardabweichung.

1.1.24 Zunahme des Blutflusses in Relation zum Ausgangswert

Da für einen möglichen therapeutischen Nutzen des blauen Lichtes vor allem die blutflusssteigernde Wirkung von größerer Bedeutung ist, als die absoluten Werte, sind im weiteren Verlauf die relativen Werte des Blutflussanstiegs in Vielfachen vom Ausgangswert *= (Blutfluss X – Blutfluss Minute 0)/Blutfluss Minute 0* und in % zum Ausgangswert (100 µl µl %) dargestellt.

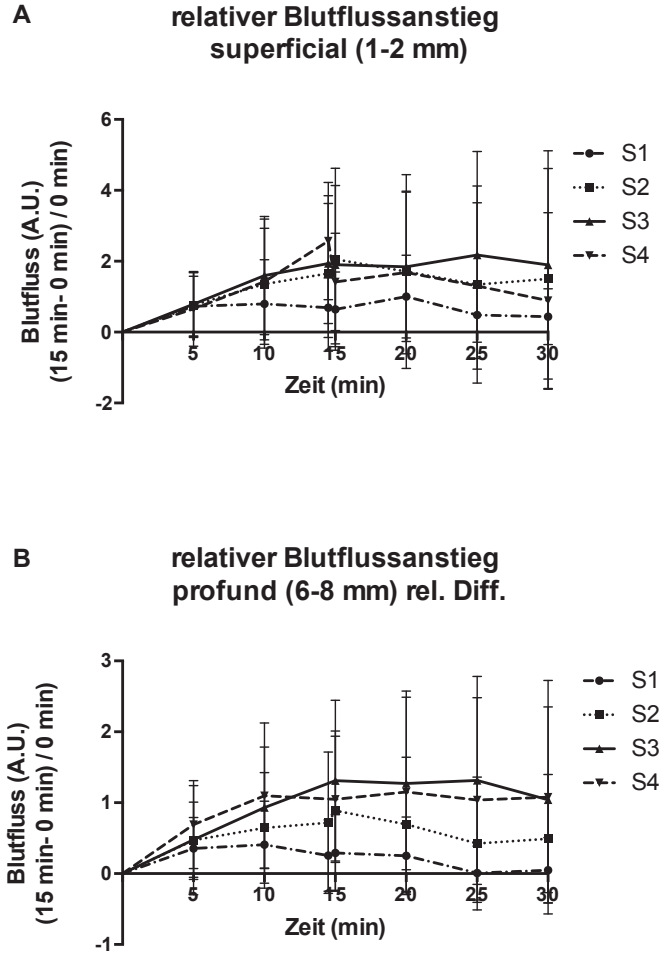


Abb. 14: relativer Blutflussanstieg unter Bestrahlung mit 453 nm in Vielfachen des Ausgangswertes,

A: in 1 bis 2 mm Hauttiefe **B:** in 6 bis 8 mm Hauttiefe, n = 13 (Exklusion von Probanden mit umgesetzter Sonde (S1: n = 7, S2: n = 10).

Mit Setting 1 bestrahlte Probanden zeigten bei Betrachtung der absoluten Werten in der profunden Hautschicht annähernd so hohe Blutflusswerte wie unter Setting 2. Die absoluten Werten der ungepulsten Settings 1 und 2 lagen in der profunden Hautschicht über denen der gepulsten Settings 3 und 4. Betrachtet man die relativen Werte liegen die Werte von Setting 1 in 6 bis 8 mm Hauttiefe im Vergleich zu den absoluten Werten unter denen von Setting 2 bis 4 (s. Abb. 14). Dies liegt an dem unter Setting 1 in 6 bis 8 mm Tiefe vergleichsweise hohen Ausgangswerten. In der relativen Darstellung zeigt sich unter Setting 3 und 4 der höchste Anstieg des Blutflusses in Bezug auf den Ausgangswert. Im Hinblick auf einen gewünschten therapeutischen Nutzen des blauen Lichtes bei schlechten Blutflussverhältnissen mit daraus resultierenden Pathologien wie Wundheilungsstörungen, ist der durchblutungssteigernde Effekt der Settings von größerer Bedeutung. Daher sollte gerade bei Patienten mit niedrigen Ausgangswerten der kutanen Durchblutung der Modus des blauen LED-Lichtes verwendet werden, mit dem eine maximale Steigerung der Durchblutung erreicht werden kann. Da der Anstieg der kutanen Durchblutung unter Setting 1 und 2 deutlich flacher ausfällt, als unter Setting 3 und 4 wäre für einen therapeutischen Einsatz ein gepulster Modus des blauen Lichtes einem kontinuierlichem vorzuziehen.

1.1.25 Statistische Analyse des Blutflussanstiegs mittels LOESS-Regression

LOESS Regression des relativen Blutflussanstieges superfizial (1 bis 2mm)

Um einen Trend des Gesamtverlaufes unter den einzelnen Settings ablesen zu können, wurden mittels der LOESS-Regression Grafiken des zeitlichen Verlaufes der Blutflussveränderungen erstellt. Diese sind für unsere Daten am besten geeignet, um statistische Aussagen und Interpretationen bei zeitlichem Verlauf zu treffen. Wie bereits auf Seite 33 beschrieben, stellt die LOESS Regression eine Form der nicht parametrische Regression dar, welche durch eine Wichtungsfunktion eine Regressionslinie durch einen Scatterplot legt und somit eine an die Daten angepasste, geglättete Kurve erstellt (s. Abb. 15). Die LOESS Regression bildet somit eine bessere Annäherung an die wahre Werteverteilung, welche zuverlässiger einen Trend bzw.

mögliche Unterschiede in den Kurvenverläufen aufzeigt, als eine ANOVA Testung. In der LOESS Regression sind sowohl die einzelnen Datenpunkte, sowie die Regressionslinie, als auch das 95 % Konfidenzintervall dieser Linie (grauer Balken) abgebildet. Analysiert wurden die relativen Werte der Blutflusssteigerung unter kontinuierlichem und gepulstem blauen Licht der Wellenlänge 453 nm in Vielfachen vom Ausgangswert ((Blutfluss $_{min\ X}$- Blutfluss $_{min\ 0}$)/Blutfluss $_{min\ 0}$). Es kann von einem signifikanten Unterschied zweier Datensätze gesprochen werden, wenn sich die 95 % KI Intervalle der Regressionslinien nicht überschneiden. Aufgrund der Vermutung, dass gepulstes blaues Licht durch seine höhere Irradianz im Peak eine stärkere Potenz zur Dekomposition photolabiler NO-Metabolite, wie NO_2 und RSNO besitzt, ohne dabei die Temperatur auf der Hautoberfläche stärker ansteigen zu lassen, als ein kontinuierliches Settings gleicher Intensität, ist im Folgenden das kontinuierliche Setting 2 den gepulsten Settings 3 und 4 gegenüber gestellt.

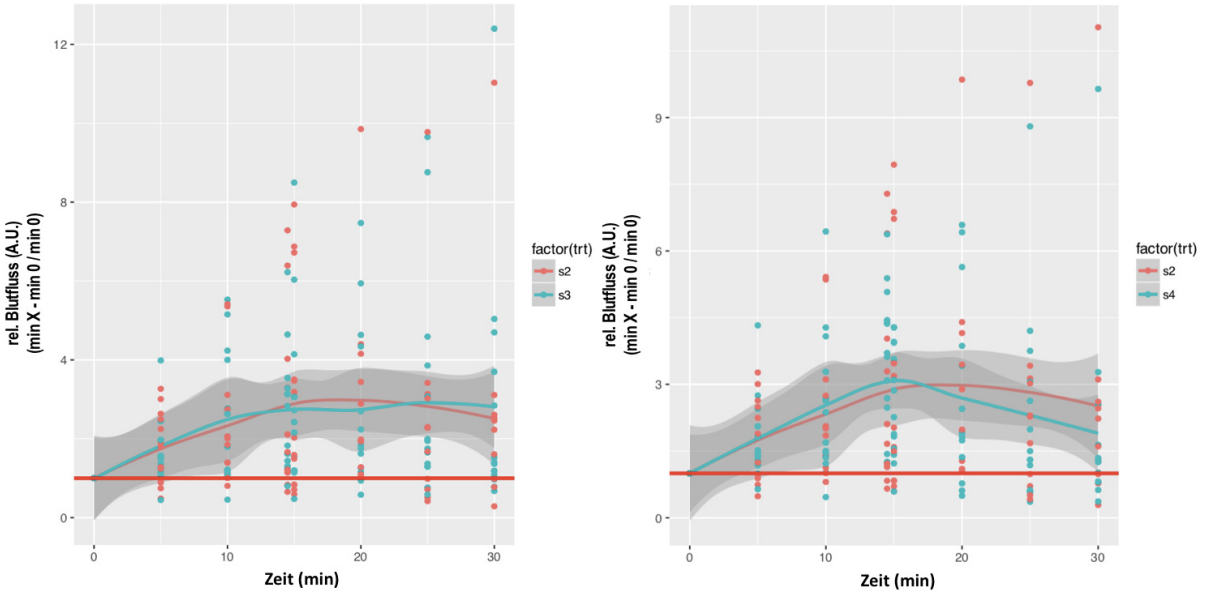


Abb. 15: Verlauf des relativen Blutflussanstiegs während und nach 15-ütiger Bestrahlung mit 453 nm in 1 bis 2 mm Hauttiefe

relativer Blutfluss (X - 0/ 0) von n= 13 Probanden (Exklusion von Probanden mit umgesetzter Sonde unter S2 , n=10) als LOESS-Regressionsgerade mit 95 %-Konfidenzintervall (grauer Balken) unter kontinuierlichem und gepulstem 453 nm Licht vergleichbarer Intensitäten, **A:** Setting 2: 58 mW/cm² und Setting 3: 50 mW/cm², mit 100 mW/cm² im Peak), **B:** Setting 2: 58 mW/cm² und Setting 4: 50 mW/cm², mit 200 mW/cm² im Peak.

Der Kurvenverlauf der LOESS Regressionen von Setting 2 und 3 ist beinahe identisch und zeigt eine starke Überlagerung der 95 % Konfidenzintervalle, sodass nicht von einem Unterschied in der blutflusssteigernden Wirkung zwischen Setting 2 und 3 ausgegangen werden kann. Im Vergleich der Regressionslinien von Setting 2 und 4 zeigen sich zur Minute 15 etwas höhere relative Blutflusswerte unter Setting 4, als unter Setting 2. Im Verlauf liegt die Kurve von Setting 4 jedoch nur gegen Ende der Bestrahlung zur Minute 15 über den Werten von Setting 2. Da sich die Konfidenzintervalle fast vollständig überlagern ist nicht von einem signifikanten Unterschied der Blutflusssteigerung beider Settings auszugehen.

In 1 bis 2 mm Tiefe zeigen die Regressionslinien der beiden gepulsten Settings 3 und 4 initial einen Deckungsgleichen Verlauf (s. Abb 16). Nach 15 Bestrahlung liegt die Kurve

von Setting 4 über der von Setting 3, sodass ein geringfügig stärkerer Anstieg des kutanen Blutflusses unter Setting 4 angenommen werden kann. Allerdings fallen die relativen Werte der Blutflusssteigerung unter Setting 4 nach Minute 15 ab, wohingegen die Werte unter Setting 3 auch 15 nach Bestrahlungsende noch auf demselben Niveau sind wie kurz vor Ausschalten der Lampe zur Minute 15. Zusammenfassend zeigt die LOESS Regression des relativen Blutflussanstieges in 1 bis 2 mm Tiefe der Haut unter Bestrahlung mit blauem Licht für 15 Minuten , dass es einen signifikanten Unterschied zwischen Setting 1 verglichen mit den intensiveren Setting 2,3,4 gibt. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Setting 2 und 3. Im Vergleich von Setting 2 mit Setting 4 bildet sich ein Trend zu höheren 15-Minuten Werten unter Setting 4 ab, welcher jedoch nicht signifikant ausfällt. Setting 3 und Setting 4 zeigen sehr ähnliche Verläufe, allerdings gibt es einen signifikanten Unterschied des relativen Blutflusses 15 Minuten nach Bestrahlungsende zur Minute 30 unter Setting 3 im Vergleich zu Setting 4. Setting 3 scheint den Blutfluss nachhaltiger zu erhöhen als Setting 4.

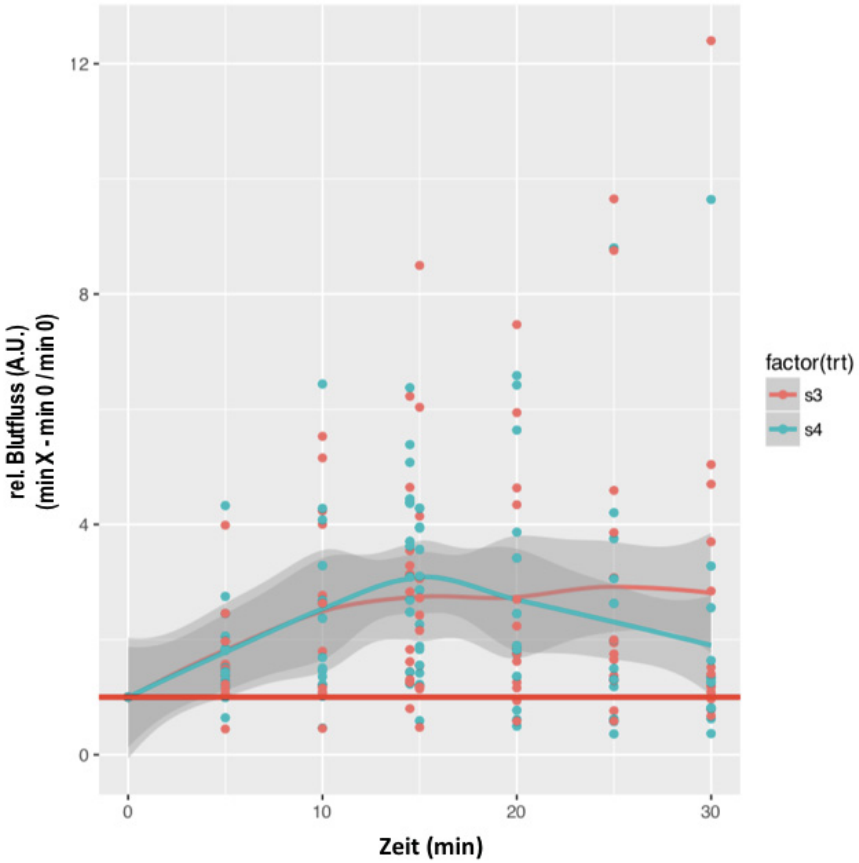


Abb. 16: Verlauf des relativen Blutflussanstiegs unter Bestrahlung mit blauem LED-Licht der Wellenlänge 453 nm in 1 bis 2 mm Hauttiefe, Vergleich der gepulsten Settings 3 und 4

relativer Blutfluss (X - 0/ 0) unter 453 nm blauem Licht von n= 13 Probanden (Exklusion von Probanden mit umgesetzter Sonde: S1 n=7; S2 n=10) als LOESS-Regressionsgerade mit 95 %.Konfidenzintervall (grauer Balken), dargestellt sind die relativen Blutflusswerte der gepulsten Settings 3 und 4 mit einer Irradianz von 50 mW/cm² und 100 mW/cm² (S3) bzw 200 mW/cm² (S4) im Peak, mit den jeweiligen 95 %-Konfidenzintervallen (grauer Balken).

LOESS Regression des relativen Blutflussanstieges profund (6 bis 8 mm Hauttiefe)

Vergleich des blutflusssteigernden Effektes von gepulstem und kontinuierlichem blauen Licht in 6 bis 8 mm Tiefe

Um die Wirkung von gepulstem blauem LED-Licht mit kontinuierlichem Licht vergleichbarer Intensität zu vergleichen sind im Folgenden die Blutflusswerte in 6 bis 8 mm Hauttiefe unter den gepulsten Settings 3 und 4 gegen das kontinuierliche Setting 2 aufgetragen.

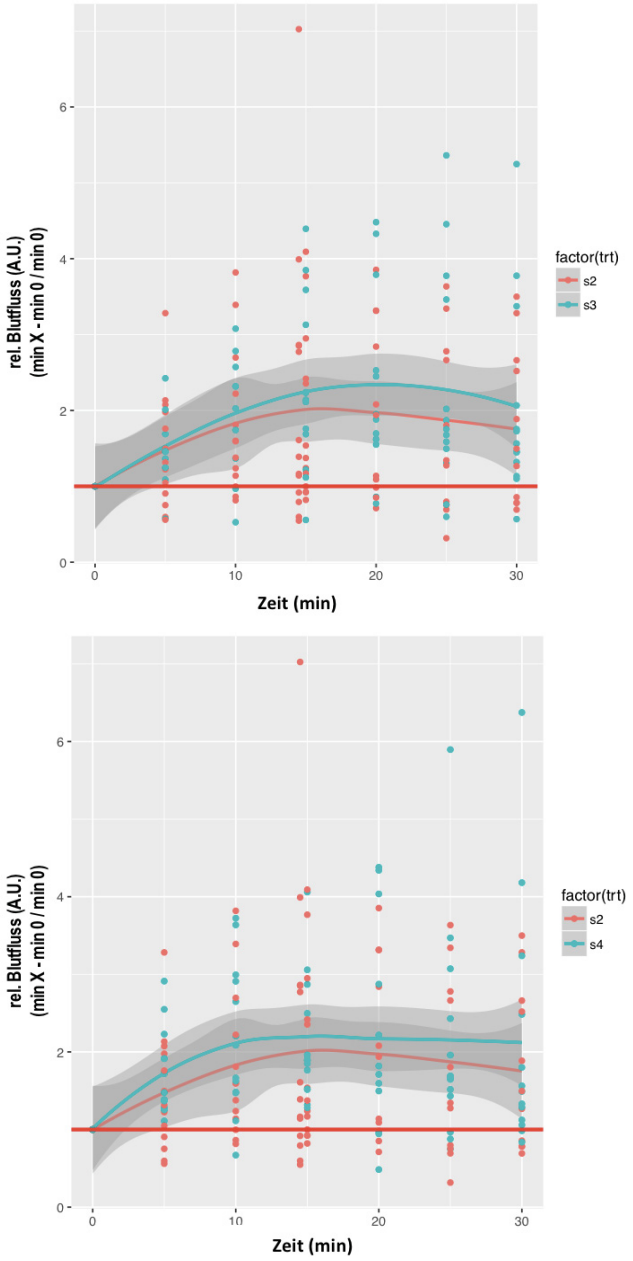


Abb. 17: Verlauf des relativen Blutflussanstiegs über die Zeit während Bestrahlung mit blauem LED-Licht der Wellenlänge 453 nm in 6 bis 8 mm Hauttiefe

13 Probanden wurden 15 mit dem blauen Licht bestrahlt, der relative Blutfluss wurde bis 15 nach Bestrahlungsende (=Minute 30) gemessen**, A:** Vergleich des kontinuierlichen Setting 2 (58 mW/cm2) mit dem gepulsten Setting 3 (50 mW/cm², mit 100 mW/cm² im Peak), **B**: Vergleich des kontinuierlichen Setting 2 (58 mW/cm2) mit dem gepulsten Setting 4 (50 mW/cm², mit 200 mW/cm² im Peak); abgebildet sind die LOESS-Regressionslinien mit ihrem 95 %-Konfidenzintervall (grauer Balken).

Der Verlauf der Regressionslinien von Setting 2 und Setting 3 verläuft bei den Werten in 6-8 mm Hauttiefe weniger deckungsgleich, als in der superfizialen Schicht. Das gepulste Setting 3 zeigt mit einer mittleren Irradianz von 50 mW/cm^2 (Peak-Irradianz von 100 mW/cm^2) kontinuierlich höhere Werte im Verlauf des relativen Blutflusses als Setting 2 mit 58 mW/cm^2. Auch im Vergleich von Setting 4 mit einer mittleren Irradianz von ebenfalls 50 mW/cm^2 (Peak-Irradianz von 200 mW/cm^2) und Setting 2 zeigen sich über den gesamten Messzeitraum höhere Werte des kutanen Blutflusses unter dem gepulsten Setting 4. Zudem fällt auf, dass der Blutfluss unter den gepulsten Settings 3 und 4 im Vergleich zu Setting 2 länger anhaltend erhöht bleibt. Der Kurvenverlauf flacht unter Setting 4 im Zeitraum 15 Minuten nach Bestrahlungsende (=15 - 30 Minuten) kaum ab. Unter Setting 3 erreicht der relative Blutflussanstieg sogar erst fünf Minuten nach Bestrahlungsende zur Minute 20 sein Maximum. Unter beiden gepulsten Settings (S3, S4) ist der Blutfluss in 6 bis 8 mm Hauttiefe 15 Minuten nach Ende der Bestrahlung (=30 Minuten) noch um das Doppelte des Ausgangswertes, auf das Dreifache erhöht. Unter Setting 2 liegt der Anstieg des kutanen Blutflusses zur Minute 30 bei einer Erhöhung um das 1,3-fache, auf etwas über das Doppelte des Ausgangswertes (s. Abb. 17). Dies lässt vermuten, dass das gepulste Licht einen potenteren und länger anhaltenden Anstieg des kutanen Blutflusses induzieren kann, als ein kontinuierliches Setting mit vergleichbarer Irradianz. In Zusammenschau mit den Temperaturwerten, s. Abb. 20, zeigt sich also, dass das gepulste blaue LED-Licht, bei etwas geringerem Anstieg der Oberflächentemperatur der Haut zu einem stärkeren Anstieg der kutanen Perfusion in 6 bis 8 mm Hauttiefe führt, als ein kontinuierliches Setting vergleichbarer Irradianz.

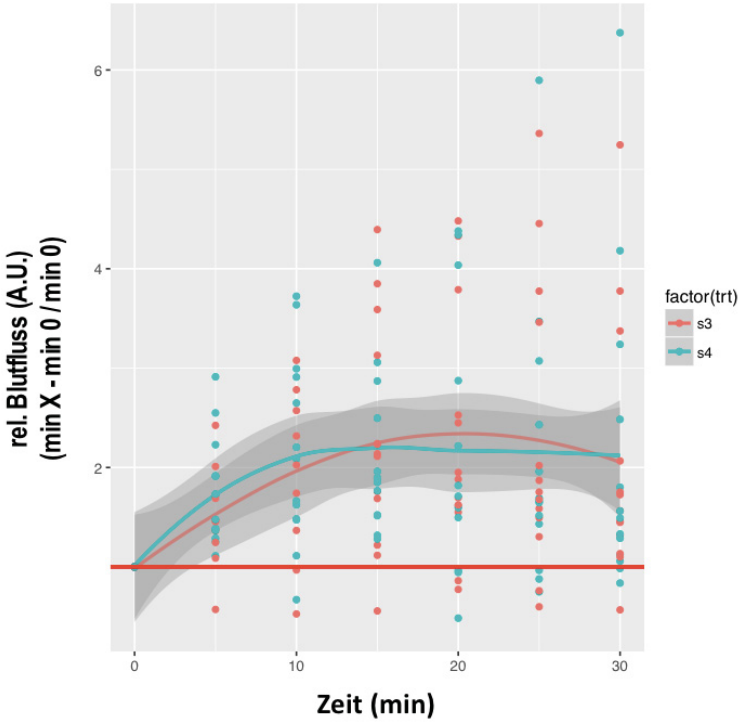


Abb. 18: Verlauf des relativen Blutflussanstiegs unter Bestrahlung mit blauem LED-Licht der Wellenlänge 453 nm in 6 bis 8 mm Hauttiefe

13 Probanden wurden 15 mit dem blauen Licht bestrahlt, der relative Blutfluss wurde bis 15 nach Bestrahlungsende (= Minute 30) gemessen, dargestellt sind die Regressionslinien der relativen Blutflusswerte der gepulsten Settings 3 und 4 mit eine Irradianz von 50 mW/cm² und 100 mW/cm² (S3) bzw. 200 mW/cm² (S4) im Peak, mit den jeweiligen 95 %-Konfidenzintervallen (grauer Balken).

Setting 3 zeigt im Vergleich zu Setting 4, welches eine doppelt so starke Peak-Irradianz von 200 mW/cm² aufweist, eine verzögerte Steigerung des Blutflusses als Setting 4. Während Setting 4 bei Minute 12 ein Maximum seiner blutflusssteigernden Wirkung erreicht, steigt der Blutfluss unter Setting 3 bis zur Minute 15 unter Bestrahlung konstant an und erreicht erst bei Minute 20, somit 5 nach Ausschalten der Lampe, sein Maximum. Erst danach zeigt sich ein leichter Abfall der relativen Blutflusswerte bis Ende der Messung. Die beiden gepulsten Settings zeigen insgesamt keinen signifikanten Unterschied ihrer blutflusssteigernden Wirkung, der Verlauf unter Setting 4 ist jedoch im Vergleich zu Setting 3 etwas abgeflachter, obwohl Setting 4 eine doppelt so hohe

Irradianz im Peak aufweist (s. Abb. 18). Dies könnte darauf hindeuten, dass eine intensivere Pulsfrequenz, wie die unter Setting 3 mit kürzeren Pausen zwischen den Impulsen bei längerer Bestrahlungszeit effektiver ist. Zu Minute 15 jedoch schneiden sich die Kurven fast, sodass es bei einer Bestrahlung von 15 Minuten Dauer keinen Unterschied machen würde, welche Pulsintensität benutzt wird. Zusammenfassend zeigen die LOESS-Regressionen des Blutflussanstieges in der profunden Hautschicht einen signifikanten Unterschied zwischen Setting 1 und den intensiveren Settings 2 bis 4. Es zeigt sich ein Trend zu höheren Blutflussanstiegen unter gepulstem Licht als unter kontinuierlichem vor: die Regressionslinien von S3 und S4 liegen im gesamten Zeitraum der Messung über der von Setting 2, obwohl dieses sogar eine höhere Irradianz von 58 mW/cm^2, als die Settings 3 und 4 mit einer mittleren Irradianz von 50 mW/cm2 aufweist. Der Blutflussanstieg unter gepulstem Licht liegt nicht nur nach 15 Minuten Bestrahlung über dem von Setting 2, sondern hält auch nach Ende der Bestrahlung länger an und bleibt bis 15 Minuten nach Bestrahlungsende auf das Dreifache erhöht.

1.1.26 Responder/Non-Responder

Einzelne Probanden zeigen eine im Vergleich zu den anderen Probanden stärker ausgeprägte Reaktion auf das blaue Licht. Um zu untersuchen, ob es mögliche Responder/Non-Responder unter den Probanden gibt, wurde der relative Blutflussanstieg vom Ausgangswert zur Minute 15 für jedes Setting in einem Scatterplot aufgetragen. Der relative Blutfluss errechnet sich wie folgt: *(Blutfluss X $_{min}$ - Blutfluss 0 $_{min}$) Blutfluss 0 $_{min}$.* Als Responder wurden Probanden definiert, welche mit einem relativen Blutflussanstieg von >1,0 reagierten. Als Non-Responder wurden Probanden mit einer Abnahme des Blutflusses unter blauem Licht definiert, also mit rel. Werten der Blutflusssteigerung von <0,0.

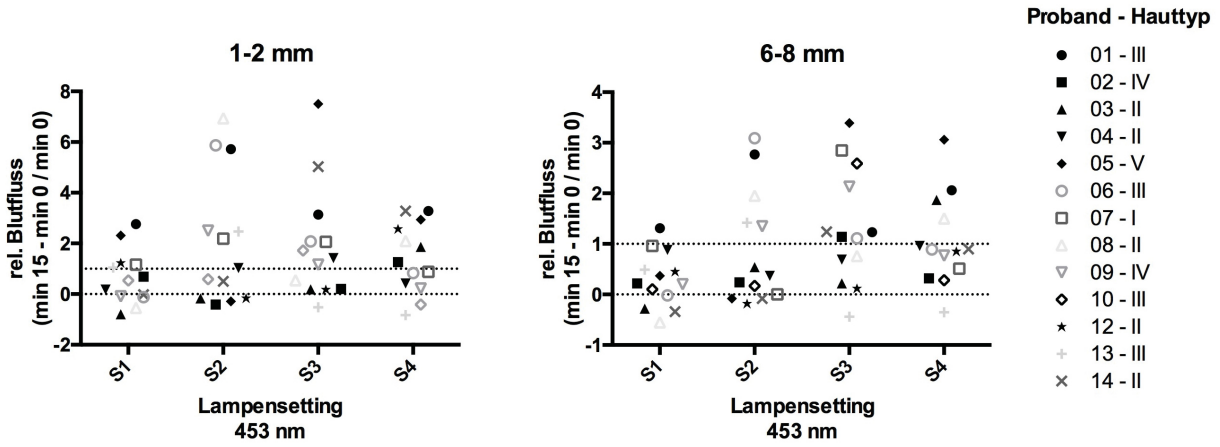


Abb. 19: Reaktion der einzelnen Probanden auf Bestrahlung mit 453 nm der Settings 1-4

Relativer Blutflussanstieg von Minute 0 zu Minute 15 von n = 13 (Exklusion von Probanden mit umgesetzter Sonde, S1 n = 7, S2 n = 10) in Abhängigkeit des Hauttypen nach Fitz-Patrick-Klassifikation, Responder = Anstieg relativen Blutfluss über das Einfache des Ausgangswertes, Non-Responder = Abfall des relativen Blutflusses unter den Ausgangswert.

In Abb. 20 zeigt sich ein sehr unterschiedliches Muster der Reagibilität der einzelnen Probanden auf das blaue Licht. Probanden mit dem höchsten Blutflussanstieg nach 15 unter einem Setting, fallen unter einem anderen Lampensetting teilweise unterhalb des Ausgangswertes (z.B. Proband ID0511, S2). Da durch Opländer *et al.* gezeigt werden konnte, dass externe Faktoren, wie beispielsweise das Ernährungsverhalten der Probanden oder der Schweißgehalt auf der Haut einen Einfluss auf die kutane Perfusion haben, wurde vor jeder Bestrahlung ein Fragebogen bezüglich des Ernährungs-, Wasch-, Sport-, Nikotin- und Sonnenverhalten der Probanden ausgefüllt. Zudem wurde der Hauttyp nach Fitz-Patrick ermittelt und in die Bewertung eingezogen. Im Abgleich mit diesen Daten zeigte sich bei unseren Ergebnissen im Hinblick auf das Durchblutungsverhalten der einzelnen Probenden jedoch kein Zusammenhang mit einem bestimmten externen Faktor. Es zeigte sich auch kein genereller Unterschied in der Reagibilität zwischen sehr hellen Hauttypen (bspw. Proband 07) im Vergleich zu sehr dunklen Hauttypen (bspw. Proband 05).Es fällt jedoch auf, dass unter den Settings 3 und 4, jeweils nur 1 Non-Responder zu verzeichnen ist, während sich unter Setting 1

fünf Non-Responder zeigen und unter Setting 2 immer noch vier. Unter den gepulsten Settings S3 und S4 zeigt sich somit ein breiteres Ansprechen der Probanden, als unter dem kontinuierlichen blauen Licht der Settings 1 und 2.

1.1.27 Vergleich der blutflusssteigernden Potenz der Settings 1-4 unter Berücksichtigung des Temperaturanstiegs

Da erhöhte Temperaturen im Rahmen der Thermoregulation des Organismus ebenfalls zu einer Vasodilatation führen [124, 125] [126], galt es thermische Effekte bei der Erhebung des durch blaues Licht hervorgerufenen Blutflussanstiegs zu berücksichtigen. Die Oberflächentemperatur wurde daher mittels einer Thermometersonde erfasst, welche auf den bestrahlten Unterarm direkt neben die O2C Sonde auf das doppelseitige Pflaster geklebt wurde. Bei allen Settings zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Oberflächentemperatur (s. Abb 20). Die Höhe des Temperaturanstiegs korreliert dabei mit der Intensität des jeweiligen Lampensettings, sodass sich unter Setting 2 mit 5 °C der höchste Temperaturanstieg zeigt, gefolgt von den im Mittel gleichwertig intensiven Settings 3 und 4. Deutlich geringer fällt der Temperaturanstieg unter dem weniger intensiven Setting 1 aus.

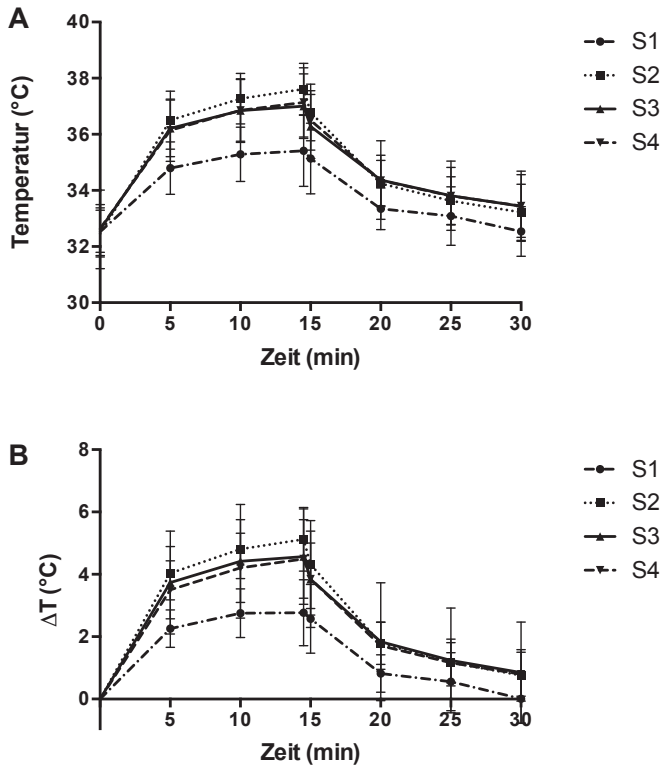


Abb. 20: Temperaturanstieg während und nach 15-minütiger Bestrahlung mit 453 nm;

A: mittlerer Anstieg der Oberflächentemperatur (°C) unter blauem Licht. Die intensiveren Settings zeigen den höchsten Anstieg der Temperatur, welcher unter den gepulsten Settings 3 und 4 (50 mW/cm_2 mit S3: 100 mW/cm_2 und S4: 200 mW/cm_2 im Peak) weniger stark ausgeprägt ist, als unter dem kontinuierlichen Setting 2 mit 58 mW/cm2. **B:** der relative Anstieg der Temperatur aufgetragen als Temperaturdifferenz ΔT ($°C_{min\ x}$ - $°C_{min\ 0}$), Mittelwert ± Standardabweichung von n = 13 Probanden.

Im Folgenden sind die relativen Werte des Blutflussanstiegs, sowie die durch die Bestrahlung entstandene Temperaturdifferenz der einzelnen Settings nach 15, 20 und 30 nebeneinander abgebildet, um diese in Relation zu einander setzten zu können. Besonderes Interesse dieser Arbeit galt der Fragestellung, ob die Verwendung eines gepulsten Lichtmodus (Setting 3, 4) einen gleichwertigen blutflusssteigernden Effekt, bei geringerer Wärmeentwicklung zeigt, wie kontinuierliches Licht vergleichbarer Intensität (Setting 2).

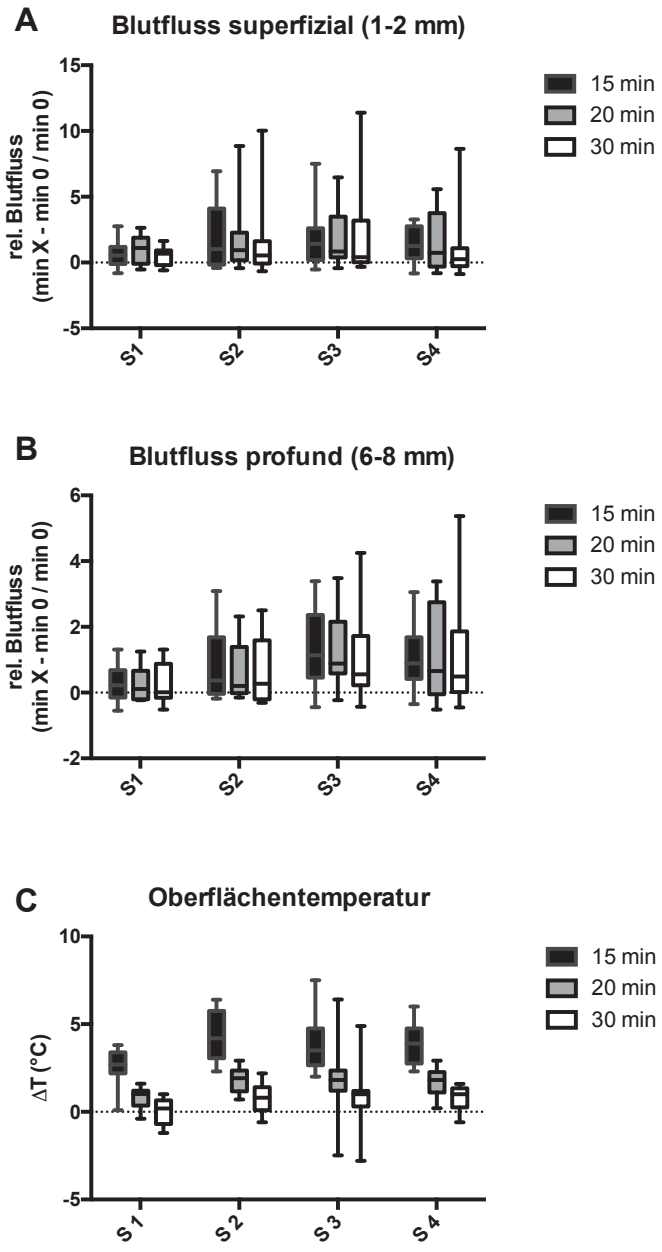


Abb. 21: Zusammenschau von relativem Blutflussanstieg und Temperaturanstieg während und nach 15-minütiger Bestrahlung mit 453 nm blauem LED-Licht

relativer Blutflussanstieg in Vielfachen vom Ausgangswert in A.U. = arbitrary units (s. S.26) in **A**: 1 bis 2 mm Hauttiefe und **B:** in 6 bis 8 mm Hauttiefe, **C:** Temperaturanstieg in ΔT ($°C_{min\ X}$- $°C_{min\ 0}$) auf der bestrahlten Hautoberfläche; Boxplots (25. und 75. Perzentile mit Median, Whisker = Maxima/Minima) von n = 13 (Exklusion von Probanden mit umgesetzter Sonde, S1 n = 7, S2 n = 10, (siehe S. 52)).

Die in Abb. 21 dargestellten Boxplots zeigen neben dem Median die mittleren 50 % der Werte, sowie die Minima und Maxima des relativen Blutflussanstieges als Whisker. Es zeigt sich, dass der Blutfluss nach 15 Minuten Bestrahlung teilweise auf 850 % ansteigt, siehe Blutfluss in 1 bis 2 mm Hauttiefe unter Setting 3. Unter Setting 2 steigt der Blutfluss in 1 – 2 mm Tiefe auf ein Maximum von 794 %, unter Setting 4 maximal auf 428 %. Profund steigt der Blutfluss maximal auf 439 % unter Setting 3. Bei Setting 2 liegt der maximal erreichte Blutfluss nach 15 Minuten Bestrahlung bei bei 409 %, bei Setting 4 bei 406 % und bei Setting 1 bei 231 %.

In der statistischen Auswertung der Daten zeigt sich unter Setting 1 ein mittlerer Anstieg der kutanen Perfusion nach 15 Minuten Bestrahlung um das 0,64-fache ± 1,05-fache des Ausgangswertes und unter Setting 2 um das 2,06-fache ± 2,57-fache des Ausgangswerts, entsprechend einer Zunahme um 200 %. Bei Setting 3 liegt der mittlere Anstieg der Perfusion um das 1,90-fache ± 2,24-fache des Ausgangswertes und bei Setting 4 um das 1,42-fache ± 1,38-fache. Setting 1 zeigt somit nach 15 Minuten Bestrahlungszeit die geringsten Blutflusswerte, mit einem gemittelten Anstieg von 60 %, im Vergleich zu den intensiveren Settings 2-4. Zwischen dem kontinuierlichen Setting 2 und den gepulsten Settings 3 und 4 vergleichbarer Intensität zeigte sich in 1 bis 2 mm Hauttiefe zur Minute 15 im Mittel kein signifikanter Unterschied in der Potenz der Blutflusssteigerung (S2: 206 %, S3: 190 %, S4: 142 %). Wobei Setting 2 in 1 bis 2 mm Hauttiefe den größten Blutflussanstieg induzierte. Zieht man zur Grafik A jedoch die Temperaturdaten aus Grafik C hinzu, fällt auf, dass sich unter Settings 2 auch die größte Oberflächentemperatur auf der Haut entwickelte. 15 Minuten nach Bestrahlungsende zur Minute 30 zeigen die Settings 2 und 3 in 1 bis 2 mm noch eine starke Erhöhung der kutanen Perfusion um 134 % unter Setting 2, sowie um 190 % unter Setting 3. Dies entspricht ca. einer Verdreifachung des ursprünglichen Blutflusses in 1 – 2 mm Hauttiefe unter Setting 3. In 6 bis 8 mm Tiefe steigt der relative Blutfluss unter Setting 1 nach 15 Minuten Bestrahlung im Mittel um das 0,29±0,54-fache an, unter Setting 2 um das 0,89-fache ± 1,12-fache des Ausgangswertes. Unter Setting 3 zeigt sich ein mittlerer Anstieg um das 1,31-fache ± 1,13-fache, unter Setting 4 um das 1,05-fache ± 0,89-fache des Ausgangswertes. In 6 – 8 mm Tiefe zeigen die gepulsten

Settings 3 und 4 somit einen höheren Anstieg der kutanen Durchblutung von über 100 % (S3: 131 %, S4: 105 %) auf über das Doppelte des Ausgangswertes, als die kontinuierlichen Settings 1 (30 %) und 2 (89 %). Am Ende der Messung zur Minute 30, somit 15 Minuten nach Bestrahlungsende, zeigen sich im Mittel erhöhte relative Blutflusswerte um das 0,234-fache ± 0,59-fache des Ausgangswertes unter Setting 1 und um das 0,65±1,01-fache des Ausgangswertes unter Setting 2, somit immer noch um 65 % erhöht. Unter Setting 3 lag der relative Wert des Blutflussanstiegs 15 Minuten nach Bestrahlungsende im Mittel bei dem 1,04±1,31-fachen des pAusgangswertes, sprich um 104 % erhöht. Unter Setting 4 zeigt sich eine Erhöhung um das 1,08±1,65-fache, somit um 108 % des Ausgangswertes. Dies lässt annehmen, dass die Blutflusssteigerung unter blauem LED-Licht der Wellenlänge 453 nm nicht nur intensitätsabhängig, sondern auch von der Impulsfrequenz des blauen Lichtes abhängig ist. Dabei zeigen die gepulsten Settings vor allem in der tieferen Hautschicht in 6 bis 8 mm auch 15 Minuten nach Bestrahlungsende noch eine Erhöhung der kutanen Perfusion um mehr als 100 %, auf über das Zweifache des Ausgangswertes, während die kontinuierlichen lediglich eine Erhöhung um 24 % unter Setting 1 und um 65 % unter Setting 2 bewirken. Somit scheint das gepulste Licht der Settings 3 und 4, auch wenn die Angabe einer Signifikanz nicht möglich ist, potenter in seiner blutflusssteigernden Wirkung, als das kontinuierliche Licht vergleichbarer Intensität des Settings 2. Diese Annahme wird durch Hinzunahme der Temperaturdaten noch weiter verstärkt. Die Temperatur auf der Hautoberfläche steigt unter Bestrahlung mit blauem Licht im Zeitraum von 15 Minuten kontinuierlich an (s. Abb. 21, Graph C). Die Temperaturdifferenz **ΔT** zum Ausgangswert liegt nach 15 Minuten Bestrahlung mit Setting 1 bei 2,6 °C ± 1,0 °C, ausgehend von einer mittleren Temperatur von 32,5 °C ± 0,9 °C zu Beginn der Bestrahlung. Bei Setting 2 beträgt **ΔT** 4,3 °C ± 1,4 °C, Setting 3 zeigt einen Temperaturanstieg von **ΔT** 3,8 °C ± 1,6 °C nach 15 Minuten Bestrahlung und Setting 4 einen Anstieg von **ΔT** 3,8 °C ± 1,2 °C. Vergleicht man Blutfluss- und Temperaturanstieg, fällt auf, dass sich die Haut unter Setting 2 am stärksten erwärmt, während der größte und am längsten anhaltende Blutflussanstieg allerdings unter Setting 3, gefolgt von Setting 4 gemessen werden konnte. Dies lässt einen potenteren

Effekt der Blutflusssteigerung unter gepulstem blauen Licht vermuten, da dieses bei weniger stark ausgeprägter Erwärmung zu einer stärkeren Vasodilatation führt, als das kontinuierliche Setting 2.

1.1.28 Anstieg der kutanen Durchblutung unter externer Wärmezufuhr ohne 453 nm

Als Temperaturkontrolle zu der Bestrahlung mit blauem Licht, wurden einige Probanden mit einem Föhn behandelt. Der Versuchsablauf entsprach dem der Bestrahlungsversuche. Der Unterarm der Probanden wurde für 15 Minuten geföhnt, alle fünf Minuten wurden Temperatur und Blutfluss äquivalent zu den Bestrahlungsversuchen gemessen.

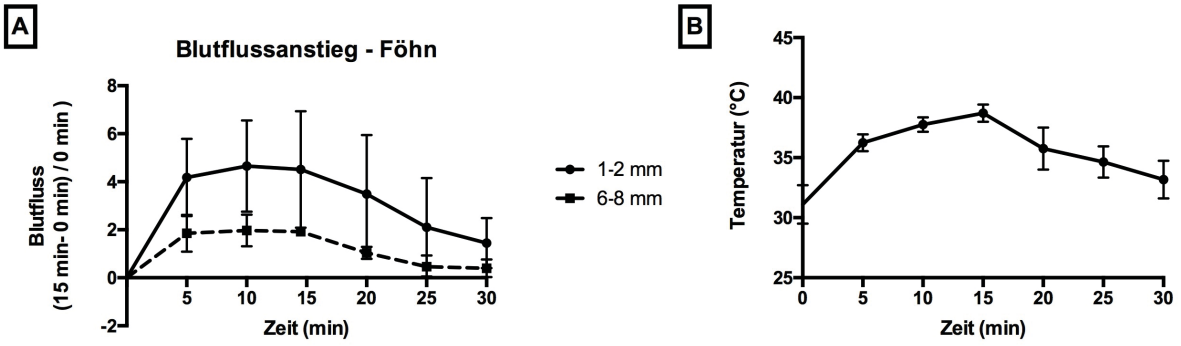


Abb. 22: Temperaturkontrolle zum Blutflussanstieg unter 453 nm mittels Föhn,

A: relativer Blutflussanstieg superfizial (1 bis 2 mm) und profund (6 bis 8 mm) unter 15 Minuten Föhn, **B:** Oberflächentemperatur der Haut unter Föhnen bis Minute 15; n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung.

Die Daten in Abb. 21 und Abb. 22 zeigen, dass der Temperaturanstieg unter Wärmezufuhr mittels Föhn mit dem Temperaturanstieg unter der Bestrahlung mit dem blauem Licht vergleichbar ist. Betrachtet man den Anstieg der kutanen Durchblutung, so wird deutlich, dass es durch die Wärmezufuhr ebenfalls zu einem Anstieg der kutanen Perfusion kommt. Dieser liegt in 1 bis 2 mm Hauttiefe zur Minute 15 bei ca. dem 4-

fachen des Ausgangswertes und in 6 bis 8 mm Hauttiefe bei ca. dem 2-fachen des Ausgangswertes. Verglichen mit den Blutflussdaten unter 453 nm blauem Licht, ist der Anstieg der kutanen Perfusion während der 15 minütigen Behandlungszeit in etwa vergleichbar. Betrachtet man allerdings die Blutflusswerte nach Beendigung der Behandlung so wird im Abgleich mit Abb. 14 deutlich, dass die Blutflusswerte nach der Bestrahlung mit 453 nm länger erhöht bleiben, als nach reiner Erhöhung der Oberflächentemperatur mittels Föhn.

1.2 Veränderung der kapillarvenösen Sauerstoffsättigung (SO_2) unter 453 nm

Während der Bestrahlung von 13 Probanden mit 45 nm blauem Licht verschiedener Modi (Setting 1-4), wurde neben der kutanen Durchblutung auch die kapillar-venöse Sauerstoffsättigung in Prozent des Hämoglobingehaltes mittels des O2C-Messgerätes bestimmt. Alle fünf Minuten während der Bestrahlung (Minute 0 bis 15) bis 15 Minuten nach Bestrahlungsende (Minute 15 – 30), wurde die Sauerstoffsättigung gemessen. Im Gegensatz zu den Blutflusswerten wäre eine Verfälschung der Ergebnisse durch die mechanische Hautirritation mit entsprechender Perfusionssteigerung nach Umsetzten der Sonde im Hinblick auf die Messung der Sauerstoffsättigung eher nicht zu erwarten. Zur Einhaltung der Einheitlichkeit und zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse, wurden bei der Auswertung der SO2-Werte dennoch die Werte ab Minute 20 derer Probanden, bei denen die Sonde umgesetzt wurde wie auch in den vorherigen Auswertungen exkludiert.

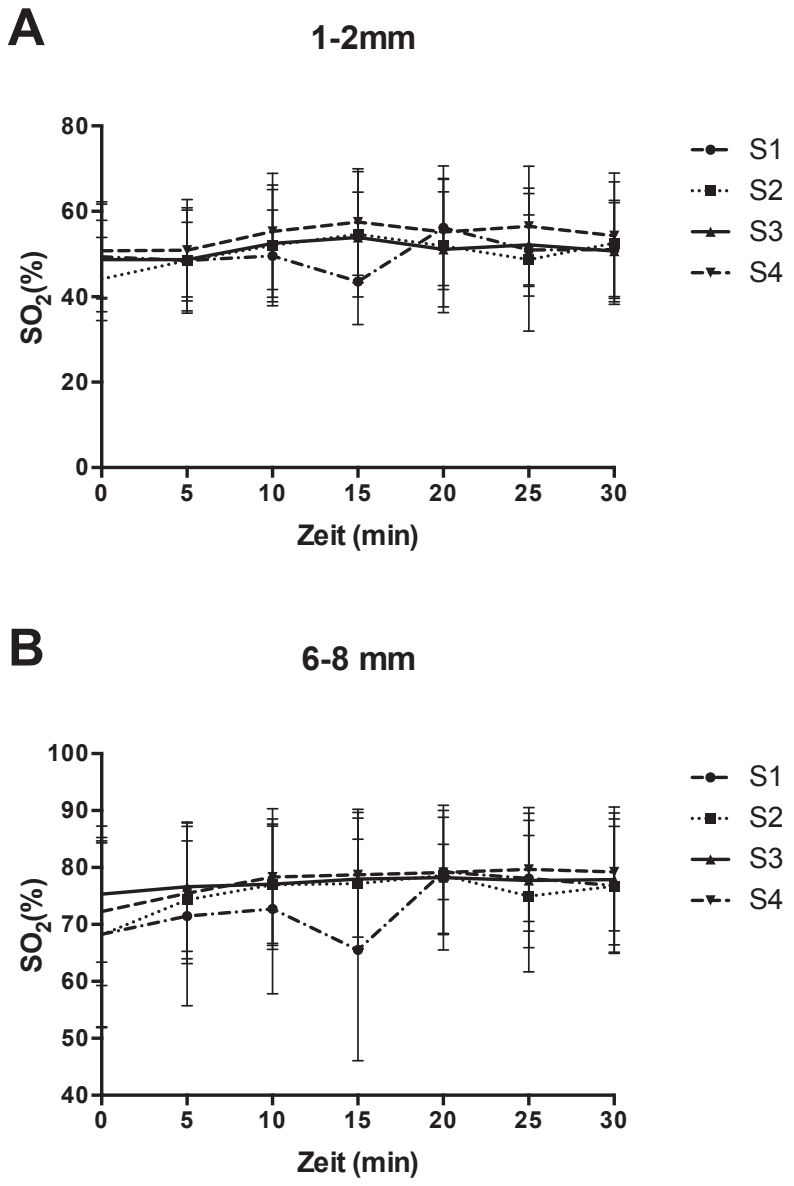


Abb. 23: Anstieg der Sauerstoffsättigung unter Bestrahlung mit blauem LED-Licht der Wellenlänge 453 nm in der superfizialen und der profunden Hautschicht

SO2 angegeben in % des Hb von n=13 bei Setting 3 und 4, n = 7 bei S1 (Exklusion der Probanden 01-06), n=10 unter S2 (Exklusion der Probanden 1-3) in **A:** 1 bis 2 mm Hauttiefe, **B:** in 6 bis 8 mm Hauttiefe

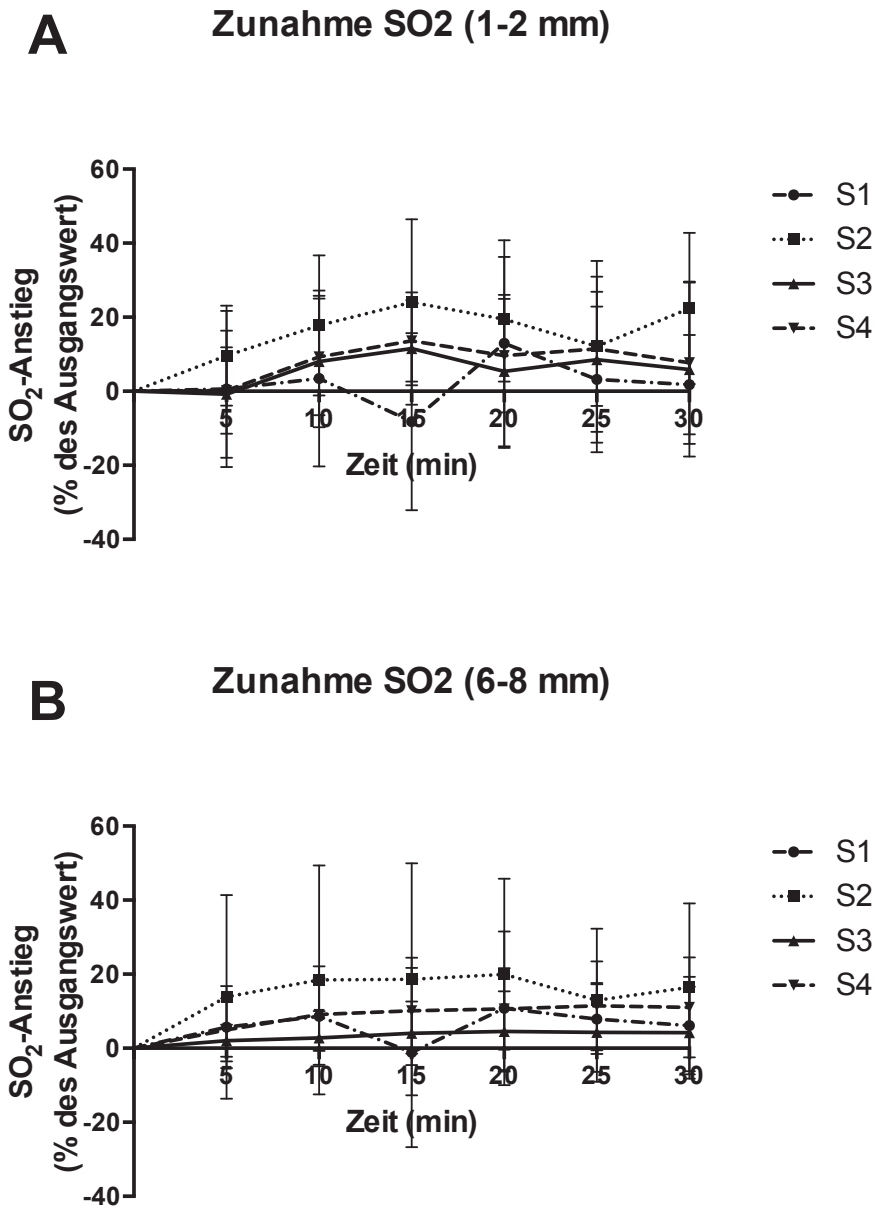


Abb. 24: Prozentualer Anstieg der SO_2 unter Bestrahlung mit blauem LED-Licht der Wellenlänge 453 nm in der superfizialen und der profunden Hautschicht

angegeben in % des Ausgangswertes von n=13 bei Setting 3 und 4, n = 7 bei S1 (Exklusion der Probanden 01-06), n=10 unter S2 (Exklusion der Probanden 1-3) ; **A**: in 1 bis 2 mm Hauttiefe, **B:** in 6-8 mm Hauttiefe

Die absoluten Werten der Sauerstoffsättigung (SO_2) in 1 bis 2 mm Tiefe stiegen unter 15 Minuten Bestrahlung mit den intensiveren Settings 2 bis 4 kontinuierlich an (s. Abb.

23,25). Setting 4 zeigt über die Zeit die höchsten gemessenen Werte der SO_2, jedoch ausgehend von höheren Ausgangswerten. Setting 2 erreicht die größte Steigerung der SO_2 nach 15 Minuten Bestrahlung auf Werte von 54,66 % ± 14,69 %, ausgehend von 44,15 % ± 9,74 %. Dies entspricht einer mittleren Steigerung um 24,02 % ± 22,47 % vom Ausgangswert. Somit nimmt die Sauerstoffsättigung unter Setting 2 um ein Viertel des Ausgangswertes zu. Bei den gepulsten Settings 3 und 4 fällt der Anstieg der Sauerstoffsättigung etwas geringer aus: Unter Setting 3 nimmt die kapillarvenöse Sauerstoffsättigung ausgehend von 48,67 % ± 9,23 % auf 53,92 % ± 10,61 % zu, entsprechend einer mittleren Zunahme um 11,57 % ± 15,16 %. Setting 4 zeigt einen mittleren Anstieg um 13,63 % ± 11,02 % des Ausgangswertes. Die Sauerstoffsättigung bleibt superfizial nach Bestrahlung mit den intensiveren Settings 2 bis 4 auch 15 Minuten nach Bestrahlungsende bei Minute 30 noch erhöht: Unter Setting 2 im Mittel um 22,38 % ± 20,41 % des Ausgangswertes, unter Setting 3 um 5,85 % ± 23,49 % und unter Setting 4 um 7,74 % ± 21,92 % des Ausgangswertes. Das weniger intensive Setting 1 zeigt 15 Minuten nach Bestrahlungsende lediglich eine Erhöhung um 1,75 % ± 13,43 % des Ausgangswertes. In der profunden Hautschicht in 6 bis 8 mm Tiefe zeigt sich ebenfalls ein kontinuierlicher Anstieg der Sauerstoffsättigung unter Bestrahlung mit 453 nm blauem Licht, siehe Abb. 23, Graph. Betrachtet man die absoluten Werte, so finden sich unter den intensiveren Settings 2 bis 4 die höchsten kapillar-venösen Sättigungswerte. Es zeigt sich ein Anstieg über die Zeit, welcher bei den Setting 3 und 4 nicht wie in der superfizialen Schicht nach 15 Minuten Bestrahlung sein Maximum erreicht, sondern im Zeitraum nach der Bestrahlung (Minute 15 – 30) noch geringfügig ansteigt. Nach 15 Minuten Bestrahlung steigt die kapillarvenöse Sauerstoffsättigung in 6 bis 8 mm Tiefe unter Setting 2 am höchsten an, von 68,19 % ± 16,15 % auf 77,18 % ± 11,50 % des Hb. Dies entspricht einer Zunahme um 18,63 % ± 31,31 % des Ausgangswertes. Setting 3 zeigt eine mittlere Zunahme der SO_2 um 4,06 % ± 8,59 % des Ausgangswertes, von 75,32 % ± 11,96 % auf 77,98 % ± 12,25 % des Hb. Unter Setting 4 steigt die SO_2 von 72,27 % ± 13,02 % auf 78,75 % ± 10,99 %, entsprechend einer mittleren Zunahme um 10,14 % ± 11,58 % des Ausgangswertes. Unter dem weniger intensiven Setting 1 kommt es im Mittel eher zu einer geringfügigen Abnahme

der SO_2 nach 15 Minuten Bestrahlung von 68,26 ± 16,43 % auf 65,54 % ± 19,49 %. Allerdings zeigt die SO_2 unter Setting 1 insgesamt einen leichten Anstieg, welcher zu Minute 15 auf Werte etwas unterhalb des Ausgangswertes absinkt, jedoch bei Minute 20 eine Zunahme um 10,83 % ± 20,79 % des Ausgangswertes erreicht. Da bei den exkludierten Probanden die Sonde erst nach der Messung zur Minute 15 umgesetzt wurde, lässt sich der Abfall der Sauerstoffsättigung zur Minute 15 unter Setting 1 nicht durch das Umsetzten oder die Exklusion erklären. Die prozentuale Zunahme der Sauerstoffsättigung unter blauem Licht ist unter Setting 1, mit Ausnahme des Abfalls bei Minute 15, im Verlauf sogar höher, als die unter Setting 3. Der stärkste Anstieg der SO_2 findet sowohl in 1 bis 2 mm Tiefe als auch in 6 bis 8 mm Tiefe unter Setting 2 statt. Auch in der profunden Hautschicht bleibt die SO_2 bis zum Ende der Messung, also 15 Minuten nach Ausschalten der Lampe noch erhöht: unter Setting 1 um 6,16 ± 13,16 %, unter Setting 2 um 16,43 % ± 22,73, unter Setting 3 um 4,21 % ± 12,40 % und unter Setting 4 um 11,05 % ± 13,53 % des Ausgangswertes (SO_2 in % des Hb).

1.2.1 Relativer Anstieg der Sauerstoffsättigung unter 453 Licht in Relation zum Temperaturanstieg

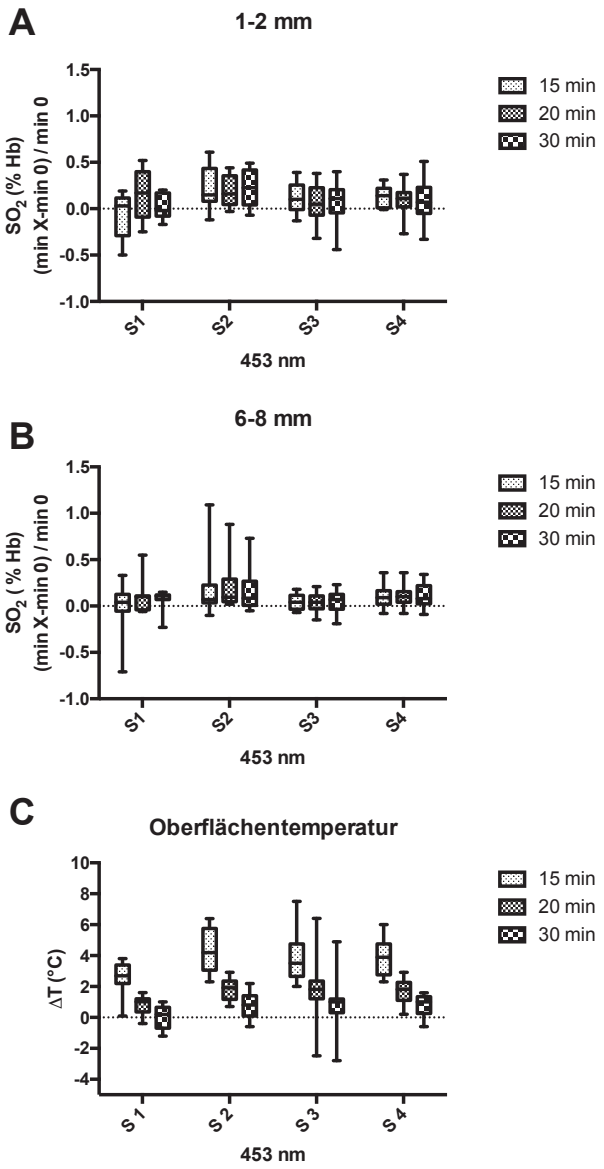


Abb. 25: relativer Anstieg der Sauerstoffsättigung (SO_2) und der Temperatur unter 453 nm blauem Licht

Sauerstoffsättigung in Vielfachen vom Ausgangswert (SO_2 in % des Hämoglobingehalt (Hb)) mittels Boxplots (25. und 75. Perzentile und Median, Whiskers mit Maximae/Minimae) von n = 13 Probanden (S1: n = 7, S2: n = 10, siehe S. 52) in **A**: 1 bis 2 mm Hauttiefe **B**: 6 bis 8 mm Hauttiefe, **C:** Oberflächentemperatur auf der Haut während und nach der Bestrahlung.

In Anbetracht des relativen Anstiegs der Sauerstoffsättigung unter blauem Licht zeigt sich der größte Anstieg sowohl superfizial als auch in der profunden Hauschicht bei Setting 2 nach 15 Minuten Bestrahlung (s. Abb. 25). Superfizial steigt die SO_2 dabei um das 0,24±0,2-fache des Ausgangswertes, somit um 24 %. Profund zeigt sich ein Anstieg um das 0,18±0,31-fache des Ausgangswertes, entsprechend einer Steigerung der Sauerstoffsättigung um ca. 19 % unter Setting 2. Nach 15-minütiger Bestrahlung mit Setting 3 stieg die SO_2 superfizial um das 0,12-fache ± 0,15-fache, somit um ca. 11 % und profund um das 0,04-fache ± 0,08-fache, entsprechend ca. 4 % des Ausgangswertes an. Unter Setting 4 stieg die SO_2 superfizial nach 15 Minuten Bestrahlung um das 0,14-fache ± 0,11-fache, entsprechend ca. 13 % des Ausgangswertes an, profund um das 0,10-fache ± 0,12-fache, somit um ca. 10 % des Ausgangswertes an. Unter dem weniger intensivem Setting 1 ist die SO_2 im Mittel nach 15 Minuten Bestrahlung superfizial um das -0,08-fache ± 0,24-fache des Ausgangswertes erhöht, profund um das -0,01-fache ± 0,26-fache. Auffällig ist der Anstieg unter Setting 1 in der superfizialen Schicht nach 20 Minuten, 5 Minuten nach Bestrahlungsende, um das 0,13-fache ± 0,28-fache des Ausgangswertes, trotz Exklusion der Probanden, bei denen nach Minute 15 das Pflaster umgesetzt wurde. Setting 1 zeigt damit von allen Settings zur Minute 20 den höchsten Anstieg der SO_2. Da vor allem die profunde Hautschicht, in welcher der Temperatureffekt eine geringere Rolle spielt, für uns die interessantere ist, fällt bei Betrachtung der SO_2-Werte in 6 bis 8 mm Hauttiefe auf, dass die Werte bis 15 Minuten nach Bestrahlungsende, zur Minute 30, immer noch erhöht sind: Bei Setting 1 um das 0,06-fache ± 0,13-fache, sprich ca. um 6 % des Ausgangswertes, bei Setting 2 um das 0,16-fache ± 0,23-fache, somit um 16 %, bei Setting 3 um das 0,04-fache ± 0,12-fache (4 %) und bei Setting 4 um das 0,11-fache ± 0,14-fache (11 %) des Ausgangswertes. Auffallend ist dabei, dass der Unterschied zu den Blutflusswerten unter 453 nm: Die Sauerstoffsättigung ist unter Setting 2, gefolgt von Setting 4 bis 15 Minuten nach Bestrahlung erhöht, während sich die stärkste Steigerung der kutanen Perfusion unter Setting 3 zeigte.

7. NO-Metabolite in humanen Hautexplantaten nach Behandlung mit 453 nm

In mehreren Versuchsreihen wurden Homogenisate bestrahlter Haut aus plastischen Operationen freiwilliger Spender (S. 34) erstellt und der Gehalt an NO-Metaboliten mittels CLD bestimmt. Zunächst wurden verschiedene Methoden zur Erstellung eines in die CLD-injizierbaren Homogenisates getestet, da die von Paunel *et al.* beschriebene Methode zur Erstellung des Homogenisat leider nicht repliziert werden konnte. Aus zeitlichen Gründen, war es daher auf Grund der aufwendigen Vorarbeit für diese Versuchsreihe leider nicht möglich mehrere auswertbare Messungen durchzuführen. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen Messungen und der sehr inkonsistenten Werte ist im Folgenden nur eine Messung exemplarisch dargestellt (s. Abb. 26). Auffallend war, dass die gemessenen NO-Werte der einzelnen Versuche sehr unterschiedlich ausfielen. Teilweise konnten nur Werte um die 10 nmol/l gemessen werden, in anderen Versuchen fielen die Werte aus wie in Abb. 26 abgebildet aus.

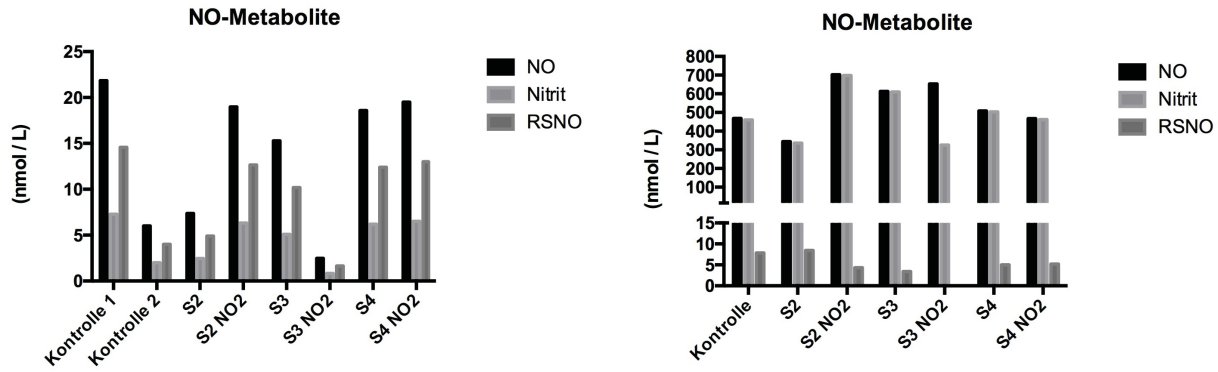


Abb. 26: NO-Metabolite in Hauthomogenisaten nach 15 Minuten Bestrahlung mit 453 nm Licht;

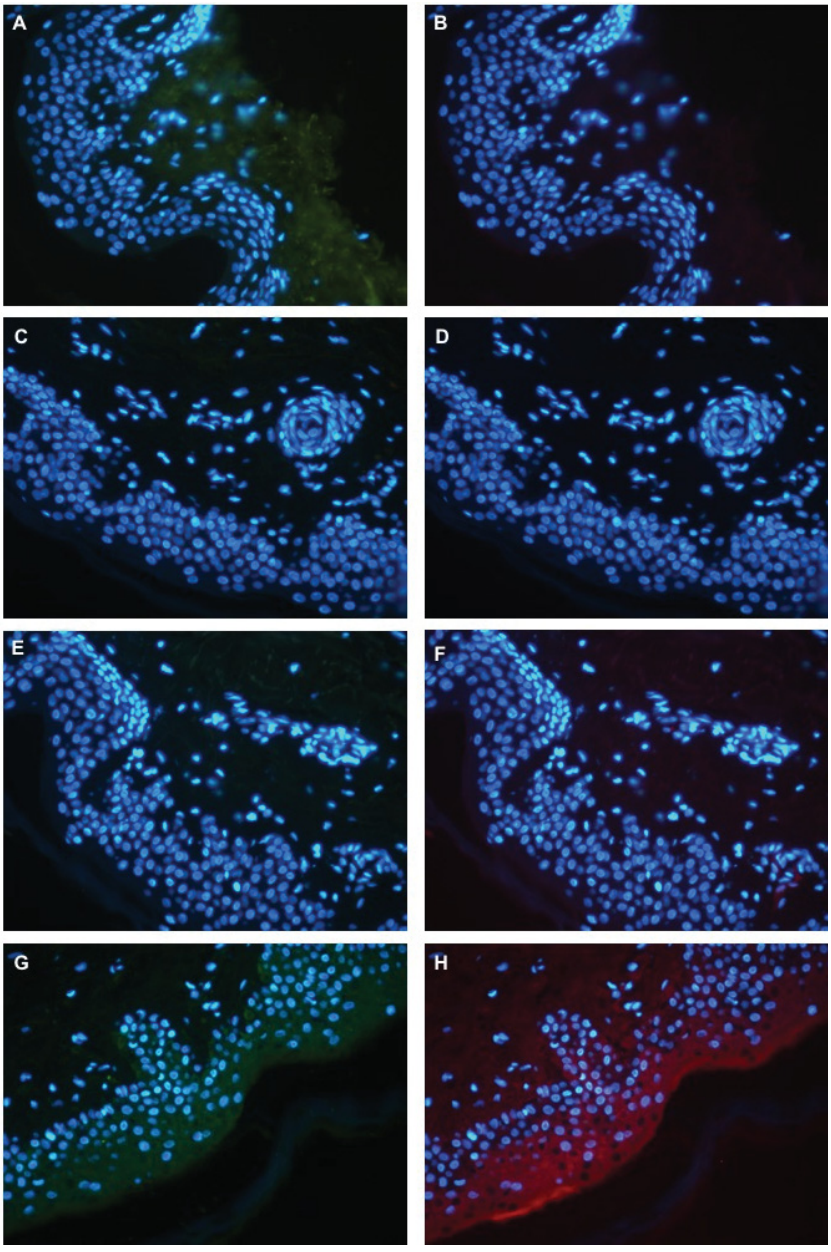
Bestrahlung mit 453 nm kontinuierlich (S1: 34 mW/cm², S2: 58 mW/cm²) und gepulst (S3: 50 mW/cm² mit 100 mW/cm² im Peak, S4: 50 mW/cm² mit 200 mW/cm² im Peak)) mit und ohne Vorinkubation mit 100 mM Na-NO2-Kupfersulfat-Lösung, neben den bestrahlten Proben sind unbehandelte Kontrollen abgebildet, auch dort zeigen sich große Unterschiede im NO-Gehalt der einzelnen Hautproben.

Im Vergleich zur Messung von Paunel *et al.* wurden 10^1 – 10^3 -fach niedrigere Werte gemessen [72]. Zwischen den Werten der unterschiedlichen Lampensettings der einzelnen Versuche ließen sich keine konstanten Werte oder Trends erkennen, sowie kein eindeutiger Unterschied zwischen den Proben mit und ohne NO_2. Aufgrund der unterschiedlichen Wertebereiche im Bereich 10^3 und der unterschiedlichen Methoden bei der Erstellung der Hauthomogenisate konnten die einzelnen Versuche nicht zu einer Graphik zusammengefasst werden. Insgesamt zeigten sich bei den einzelnen Versuchsdurchführungen keine einheitlich höheren oder niedrigeren Werte nach Vorinkubation der Hautproben mit Lösung. Zudem fielen die gemessenen NO-Werte der bestrahlten Proben teils höher, teils niedriger aus als die der unbehandelten Kontrolle. Nach Erstellung des Hauthomogenisates wurde dieses mittels BCA-Proteinmessung quantifiziert, um die gemessenen NO Mengen anschließend auf den Proteingehalt der Haut normieren zu können. Leider konnten auch bei diesem Versuchsteil die von Paunel *et al.* beschriebenen Proteinkonzentrationen der Hauthomogenisate nicht repliziert werden. Während Paunel das Hauthomogenisat auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml herunter verdünnen konnte, konnte ich bei meinen unverdünnten Homogenisaten lediglich Ausgangskonzentrationen von 0,1 – 1 μg/ml mittels BCA-Proteinassay messen.

8. RSNO in bestrahlter Vollhaut

An bestrahlter Vollhaut sollten kutane S-Nitrosoderivate mittels Immunhistochemie dargestellt und mit dem Albumingehalt korreliert werden. Abb. 27 zeigt die fluoreszenzmikroskopische Darstellung. Aufgrund der zu schlechten Beurteilbarkeit, bzw. teilweise lediglich schwarz erscheinender Bilder, wurde eine höhere Belichtungszeit von 300 ms Sekunden verwendet. Daher entsprechen die deutlich sichtbaren grünlichen und rötlichen Areale am ehesten einem Hintergrundrauschen. Lediglich vereinzelt sind scharf abgrenzbare grüne oder rote Punkte sichtbar, entweder im *Str.corneum* oder intravasal in kutanen Gefäßanschnitten, welche RSNOs und Albumin entsprechen könnten. Insgesamt wurden pro Setting mit und ohne NO2 jeweils 3 Schnitte angefertigt und pro Schnitt jeweils 3 Ausschnitte unter dem Mikroskop beurteilt. Dabei zeigten sich keine deutlich sichtbaren Unterschiede zwischen den

einzelnen Schnitten, unabhängig von der Bestrahlungsintensität oder der Inkubation mit Natrium-Kupfersulfat-Lösung.



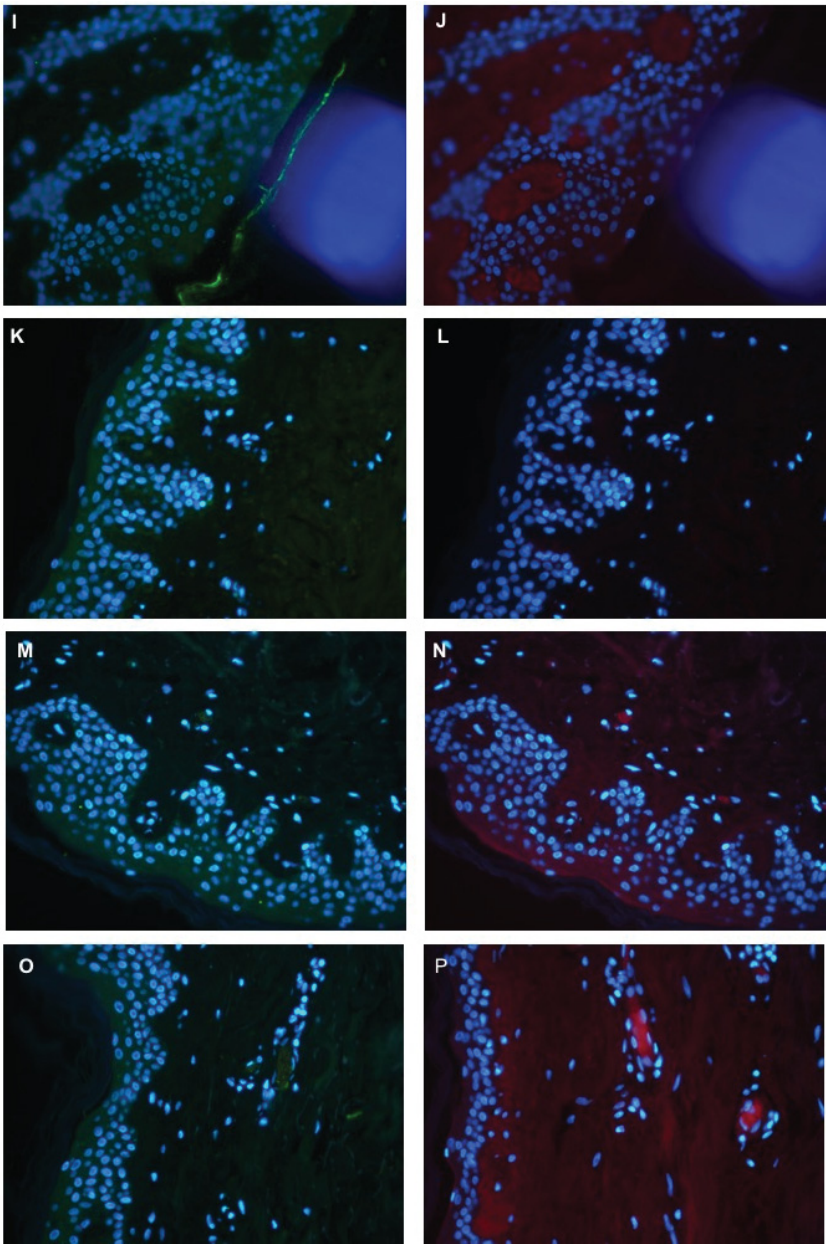
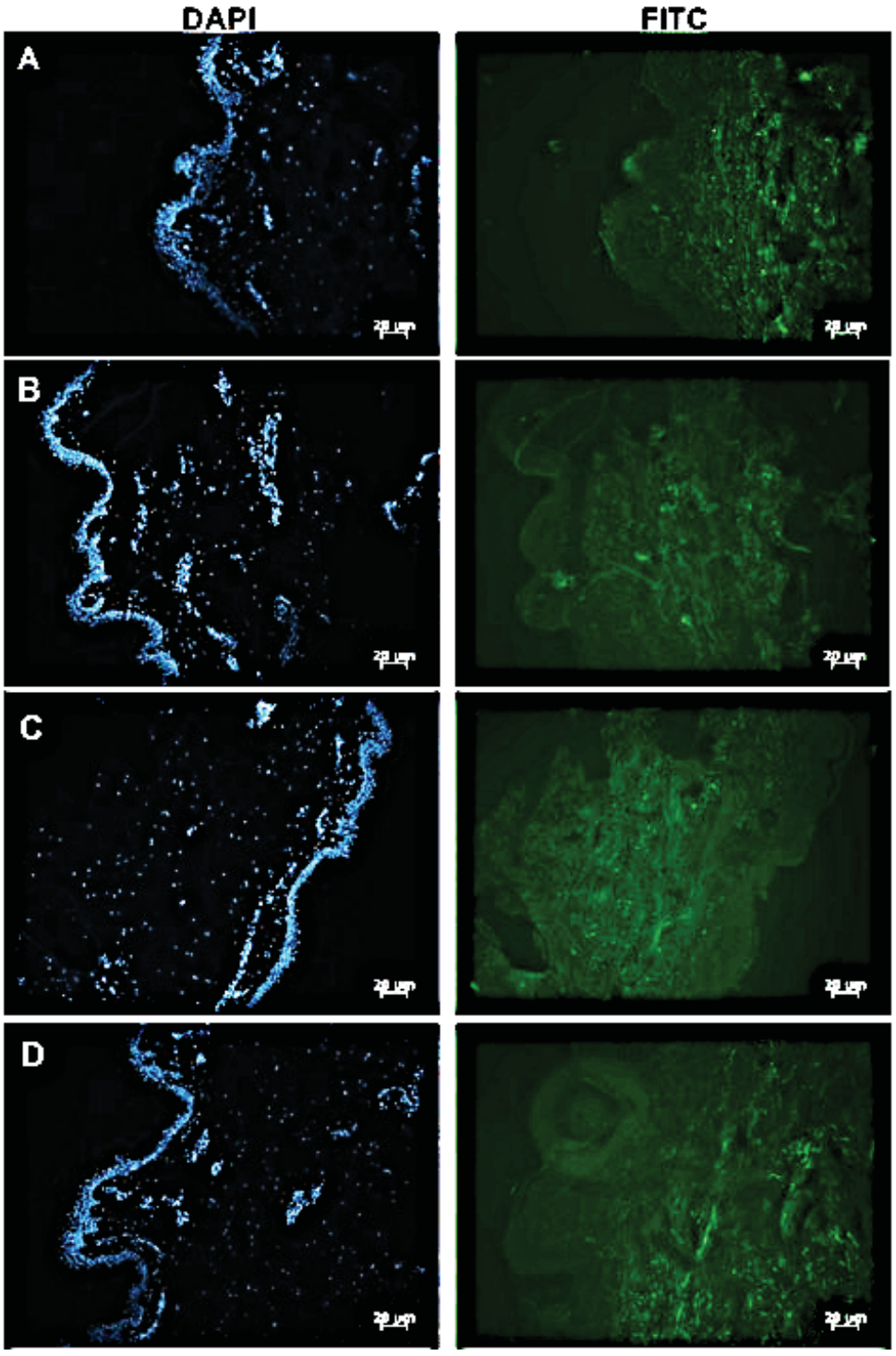


Abb. 27: Anti-S-Nitroso/Anti-Albumin Immunhistochemie an bestrahlten humanen Vollhautexplantaten;

400-fach; links: Rabbit-Anti-S-Nitroso (1:500), Zweitantikörper Anti-Rabbit (1:100), rechts: Mouse-Anti-Albumin (1:500), Zweitantikörper Anti-Mouse (1:100); **A/B:** unbestrahlte Kontrolle, **C/D**: Negativkontrolle ohne Antikörper, **E/F**: Setting 2: 15 Minuten (52,2 J/cm²), **G/H**: Setting 2: 15 Minuten mit 100 μM $NaNO_2$-$CuSO_4$-Lsg., **I/J:** Setting 3: 15 Minuten (45 J/cm², 100 J/cm² im Peak), **K/L**: Setting 3: 15 Minuten mit 100 μM $NaNO_2$-$CuSO_4$-Lsg., **M/N**: Setting 4: 15 Minuten (45 J/cm², 200 J/cm² im Peak), **O/P**: Setting 4: 15 Minuten mit 100 μM $NaNO_2$-$CuSO_4$-Lsg.

9. Apoptotische Ereignisse in humanen Hautexplantaten nach dreimaliger Bestrahlung

Zur Untersuchung möglicher DNA-schädigender Effekte des blauen Lichtes nach mehrfacher Irradiation wurden humane Hautexplantate aus der Chirurgie präpariert und innerhalb von 24 Stunden dreimalig für je 15 Minuten mit 453 nm mit einem der Settings 1 bis 4 bestrahlt. Entsprechend einer kumulativen Strahlenenergie von 91,8 J/cm^2 unter S1, 156,6 J/cm^2 unter S2 und 135 J/cm^2 unter S3 und S4. Die aus den Hautproben angefertigten Schnitte wurden mit dem *TUNEL-Kit* eingefärbt und anschließend unter dem Mikroskop Fotos angefertigt. Die links abgebildeten Schnitte wurden je mit 10 ms Belichtungszeit aufgenommen und zeigen mittels DAPI-Filter die vorhandenen Nuklei an. Rechts abgebildet ist das fluoreszierende Signal von Nuklei mit DNA-Strangbrüchen mittels FITC Filter bei einer Belichtungszeit von 300 ms. In den Schnitten ist die apikale Schicht der Haut an dem dichten epithelialen Zellverband erkennbar. Darunter liegende angefärbte Zellkerne gehören zu Fibroblasten der Subkutis oder zu Endothelzellen subkutaner Gefäße (s. Abb. 29)


DAPI
FITC
A
B
C
D

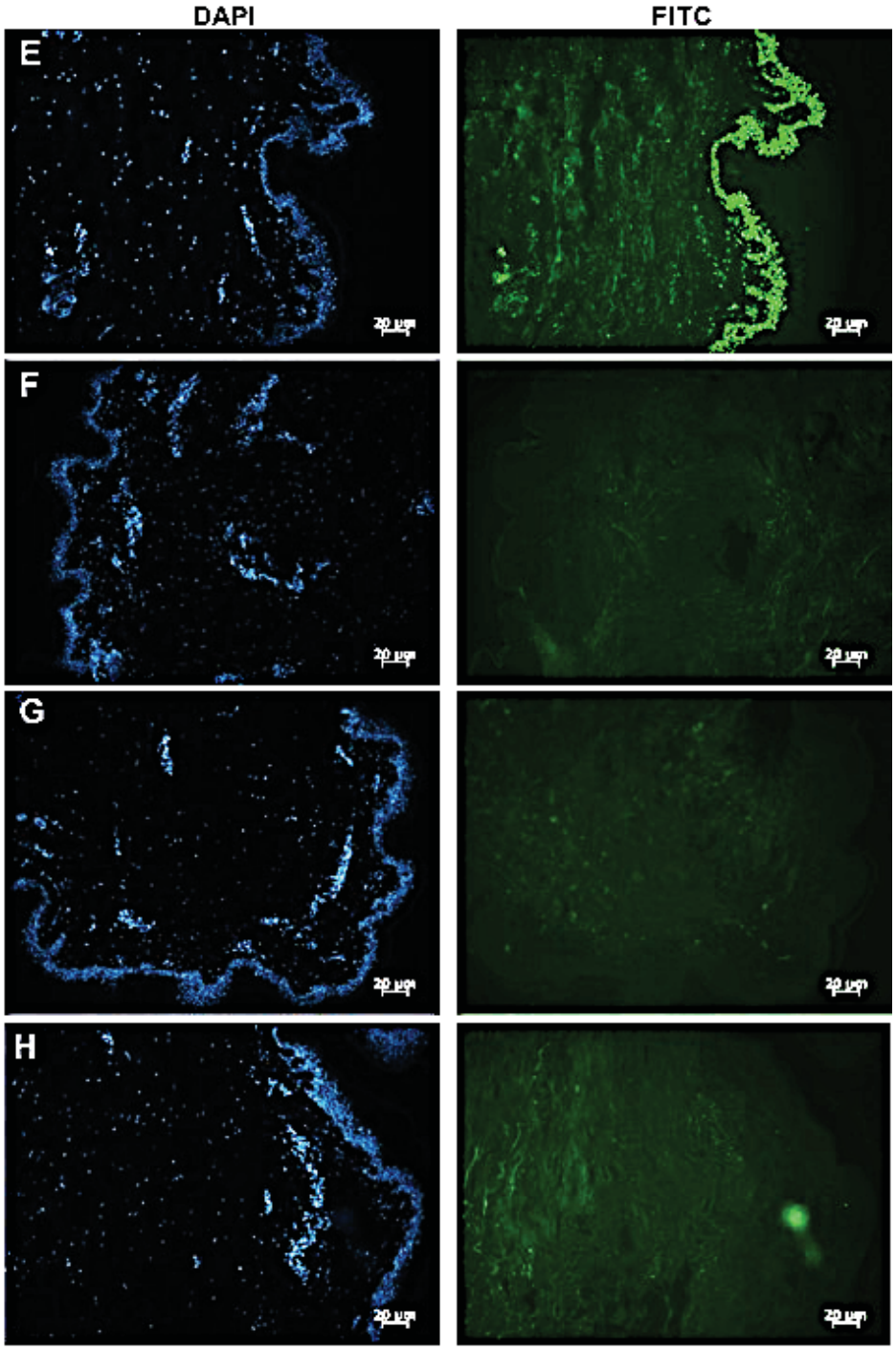


Abb. 28: Vollhaut nach dreimaliger Bestrahlung für 15 Minuten mit 453 nm blauem LED-Licht,

Darstellung vorhandener Nuklei mittels DAPI Filter (blau): Belichtungszeit 10 ms, Darstellung von DNA-Strangbrüchen in Nuklei mittels FITC-Filter: (grün) Belichtungszeit 300 ms, Maßstab 20 μm; **A**: Negativkontrolle: unbestrahlt, **B**: Setting 2 + PBS, **C**: Setting 3 + PBS, **D**: Setting 4 + PBS, **E**: Positivkontrolle (DNase), **F**: Setting 2 + NO_2, **G**: Setting 3 + NO_2, **H:** Setting 4 + NO_2.

10. Kinetik der Dekomposition von nitrosiertem BSA unter kontinuierlichem und gepulstem blauem Licht

Eine 1 %ige BSA Lösung wurde wie auf S. 37 beschrieben, mit blauem Licht der vier verschiedenen Lampensettings bestrahlt. Abb. 30 stellt die Kinetik der Photodekomposition von Nitroso-Verbindungen des nitrosierten BSA unter NO-Freisetzung im bestrahlten Glaskolben dar. Im Kolben vorhandenes NO_2 sollte dabei nicht photolytisch gespalten werden, da durch das enthaltene BSA sämtliche Kupferreste in der Lösung komplexiert worden wären. Alle 5 Minuten wurden Proben aus dem bestrahlten Kolben entnommen, die Hälfte wurde direkt in einen zweiten CLD-Kolben mit Essig-Iodine zur Messung des Gehaltes der Lösung injiziert. Die andere Hälfte der entnommenen Probe wurde in lichtundurchlässigen Eppis auf Eis gelagert, mit Sulfanilamid vorinkubiert und anschließend in der Essig-Iodine-CLD gemessen, siehe Abb. 30.

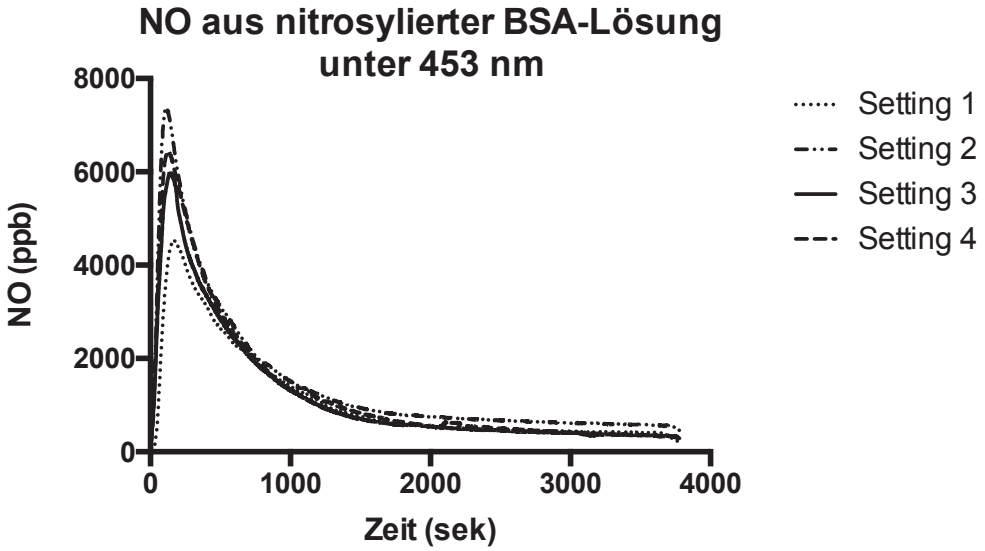


Abb. 29: Kinetik der NO-Freisetzung aus nitrosiertem BSA unter blauem Licht,

im bestrahlten Glaskolben freiwerdendes NO (ppb) aus 1%iger nitrosierter BSA-Lösung unter 453 nm: initialer Peak entspricht NO aus RSNO, das Plateau ab 2000 s entspricht NO aus NO_2, nach 3800 sek. wurde die Lampe ausgeschaltet, n = 2.

In Abb. 29 ist die Kinetik des Zerfalls der Nitrosoverbindungen unter Bestrahlung mit 453 nm abgebildet. Der Gehalt der RSNO fällt durch Photodekomposition durch das blaue Licht initial (Minute 0-5) stark ab. Dies entspricht der bereits zuvor durch Paunel beschriebenen Kinetik der S-Nitrosodekomposition unter UVA-Licht, siehe [72]. Die Kurve flacht im Verlauf ab, da vermutlich über die Zeit durch Nitrosierung freier Thiolgruppen durch freiwerdendes NO auch wieder neue RSNO entstehen, da der Lösung kein NEM hinzugefügt wurde. Der NO-Gehalt der alle fünf Minuten entnommenen Proben (s. Abb. 30) nimmt über die Zeit ab, da durch die Bestrahlung der Gehalt an spaltbaren NO-Metaboliten, den RSNO, sinkt. Da die Dekomposition von NO2 unter blauem Licht in Anwesenheit von Cu^{2+} stattfindet, welches durch das BSA vollständig gebunden wird, gehen wir davon aus, dass im bestrahlten Kolben keine Photodissoziation des noch enthaltenen NO2 stattfindet [40]. Die freigewordenen und mit der CLD gemessenen NO-Mengen des ersten, bestrahlten Kolben entstammen daher lediglich aus dem Zerfall der Nitrosoverbindungen. Noch in der Lösung

vorhandenes NO_2 zerfällt erst pH abhängig in der Essigiodine Lösung des zweiten Kolben. Das NO-Signal des zweiten CLD Kolbens mit Essigiodine setzt sich aus der Kupfer- und pH-abhängigen Spaltung von vorhandenem NO_2 und RSNO zusammen. Daher steigt der relative Anteil an vorhandenem NO_2 am Gesamt-NO-Signal über die Zeit an, da nur die RSNO im bestrahlten Kolben zerfallen, NO_2 jedoch in Abwesenheit von Kupfer nicht. Somit ist in den entnommenen Proben über die Zeit mehr NO_2 im Verhältnis zu RSNO vorhanden. Die Abnahme des Gesamt NO-Signals aus den entnommenen Proben erklärt sich aus dem starken Zerfall der RSNO.

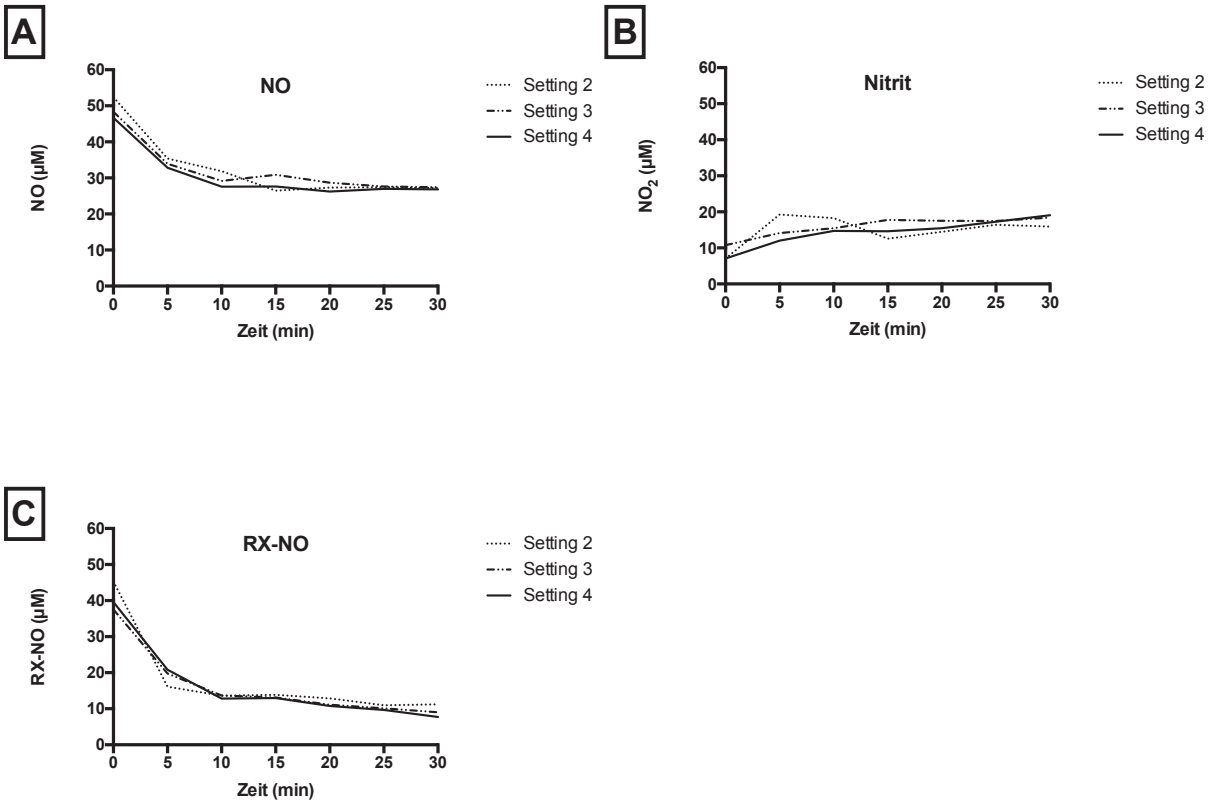


Abb. 30: Abnahme der NO-Metabolite in RSNO-BSA-Lösung unter 453 nm,

abgebildet ist der Gehalt an noch vorhandenen NO-Metaboliten (NO2 und RSNO) im bestrahlten CLD-Kolben nach X Minuten, welche nach Entnahme aus dem bestrahlten Kolben pH- und Kupferabhängig in der Essigiodine-Lösung einer zweiten CLD gespalten und gemessen wurden; n = 1; A: Gesamt NO-Signal der entnommenen Proben ohne Zusatz, B: NO-Signal aus in den entnommenen Proben enthaltenem NO_2 als Differenz aus NO- und RXNO-Gehalt der entnommenen Probe C: NO-Signal aus Nitrosoverbindungen (RXNO = RSNO, RNNO) nach Vorinkubation mit Sulfanilamid.

In Abb. 30 ist der Gehalt der NO-Metabolite in der bestrahlten Lösung, gemessen alle fünf Minuten in der zweiten Essig-Jodine-CLD aufgezeigt. Nach fünf Minuten Bestrahlung kommt es unter den einzelnen Settings zur Dekomposition von 64,44 % (Setting 2), 47,79 % (Setting 3), sowie 47,43 % (Setting 4) der initial vorhandenen S-Nitrisoverbindungen. Nach 30 Minuten Bestrahlung zeigen die einzelnen Settings eine Abnahme des RSNO Gehaltes auf 24,7 % (Setting 2), 23,9 % (Setting 3) und 19,6 % (Setting 4) des anfänglichen RSNO-Gehaltes. Somit zeigt sich unter Setting 2 der

stärkste initiale Zerfall von RSNO innerhalb der ersten fünf Minuten Bestrahlung. Nach 30 Minuten findet unter Setting 4 die stärkste Dekomposition von RSNO statt. Im Mittel über alle Settings nimmt der Gehalt von initial 2,0 ± 0,2 nmol RSNO nach fünf Minuten Bestrahlung auf 0,9 ± 0,1 nmol ab. Dies entspricht einer mittleren Reduzierung der RSNO um 54,6 % nach nur fünf Minuten Bestrahlung mit blauem Licht und entsprechend hoher Freisetzung von NO, wie Abb. 30 zeigt. Nach 30 Minuten Bestrahlung ist der Gehalt auf im Mittel auf 0,5 ± 0,1 nmol gesunken, entsprechend einer mittleren Reduktion auf 22,9 % des initialen RSNO-Gehaltes. In einem zweiten Versuchsdurchlauf, bei welchem auch das weniger potente Setting 1 mit getestet wurde, konnten diese Ergebnisse verhältnismäßig reproduziert werden. Die gemessenen Molaritäten fielen jedoch niedriger aus als bei dem ersten Versuch. Im zweiten Versuchsdurchlauf wurde auch die Kinetik des wegen seiner geringen Blutfluss und SO_2 steigernden Wirkung weniger interessanten Setting 1 untersucht. Wie in den Ergebnissen des ersten Durchlaufes, zeigt sich eine starke initiale Abnahme des RS-NO Gehaltes in den ersten fünf Minuten unter Bestrahlung. Der insgesamt in der bestrahlten Lösung noch vorhandene Gehalt an spaltbaren NO-Metaboliten sank über die Zeit, da vorhandene RSNO im bestrahlten Kolben zerfielen und NO freisetzten. In den ersten fünf Minuten unter Bestrahlung wurden 34,03 % (Setting 1), 47,45 % (Setting 2), 48,78 % (Setting 3), 53,93 % (Setting 4) des initial vorhandenen RSNO durch das blaue Licht gespalten. Nach 30 Minuten Bestrahlung sank der RSNO-Gehalt auf 30,89 % (Setting 1), 23,52 %(Setting 2), 43,13 % (Setting 3), 20,32 % (Setting 4) des Ausgangswertes ab. Damit zeigt sich insgesamt nach 30 Minuten Bestrahlung, die größte Abnahme vorhandener RSNO somit prozentual die größte NO Freisetzung unter Setting 4.

1.3 Toxizitätstest an Keratinozyten nach Behandlung mit 453 nm

1.3.1 Zellviabilität nach Bestrahlung mit blauem Licht

Mittels *Cell-Titer-Blue Assay* wurde die Zellviabilität von n=3 Episkinsets nach 15 und 30 Minuten Bestrahlung mit den intensiveren Lampensettings (2 – 4) unter Vorinkubation mit PBS vs. 100 μM-Kupfersulfat-Lösung untersucht.

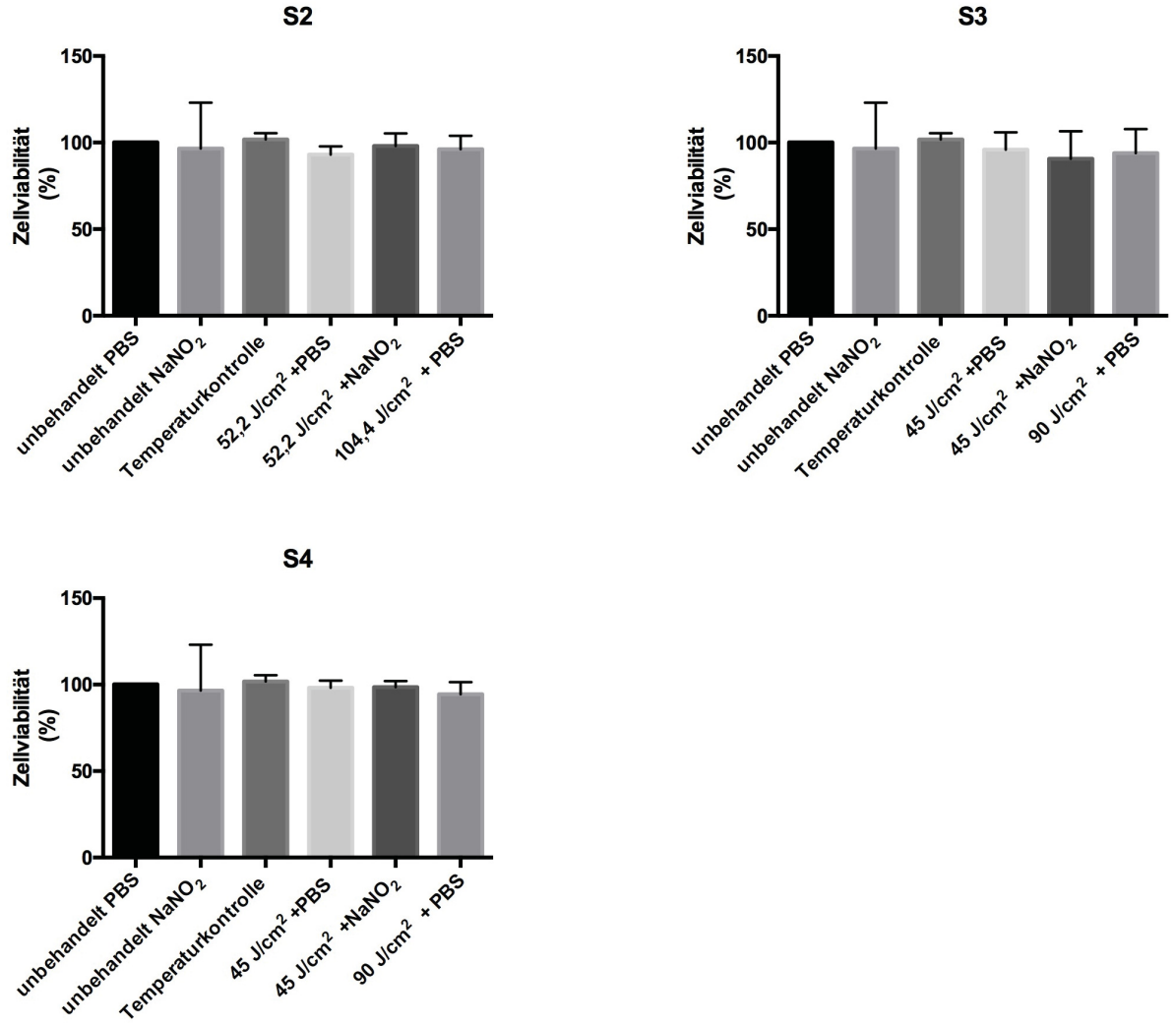


Abb. 31:Zellviabilität der Keratinozyten nach 15 und 30 Minuten unter 453 nm;

Bestrahlung von n=3 Episkinsets für 15 und 30 Minuten nach Applikation von PBS/100 μM lösung: Angabe in % zur unbehandelten Kontrolle mit PBS (= unbestrahlte Brutschrankkontrolle 15 Minuten), zusätzlich unbehandelte Kontrolle mit 100 μM lösung (NO_2) (=unbestrahlte Brutschrankkontrolle, 15 Minuten), als Temperaturkontrolle wurden Episkin + PBS lichtdicht abgedeckt und unter Setting 2 mit 104,4 J/cm^2 (= 30 Minuten) gestellt, Bestrahlung mit 453 nm für 15 Minuten (S2: 52,2 J/cm^2, S3/4: 45 J/cm^2) und 30 Minuten (S2:104,4 J/cm^2, S3/4: 90 J/cm^2), n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung.

Abb. 31 zeigt die Zellviabilität in Prozent zur Negativkontrolle, welche sich in der Fähigkeit der Zellen den Cell-Titer-Blue Farbstoff um zu setzten (s. S. 42) wieder

spiegelt. Insgesamt zeigte sich keine Abnahme der Vitalität und der Stoffwechselfunktion der Keratinozyten nach Bestrahlung mit 453 nm über 15 Minuten. Auch die mit Kupfersulfat-Lösung benetzten Episkinkeratinozyten zeigten keine Abnahme der Stoffwechselaktivität, welche als Korrelat zur Viabilität gilt. Unter Setting 2 zeigt die mit -Kupfersulfat-Lösung benetzte, unbestrahlte Kontrolle den niedrigsten Wert der Zellviabilität mit 96,54 %, während die mit PBS benetzen und 15 Minuten mit 453 nm (S2: 52,2 J/cm^2) bestrahlten Keratinozyten eine mittlere Viabilität von 98,18 % ± 4,77 % in Bezug auf die unbehandelte PBS-Kontrolle zeigen und nach 30 Minuten Bestrahlung unter PBS von 94,49 % ± 7,76 % unter S2. Die mit NO_2 benetzten Keratinozyten zeigen nach 15 Minuten 453 nm unter Setting 2 eine Viabilität von 98,56 % ± 7,25 %. Somit zeigen die mit NO_2 benetzten Proben unter Setting 2 keine im Vergleich größere Abnahme der Viabilität, als die mit PBS benetzten Proben. Unter Setting 3 zeigt sich der niedrigste Wert der Zellviabilität bei den unbestrahlten, mit NO_2 benetzten Kontrollen mit 74,25 % im Vergleich zur unbestrahlten, mit PBS benetzten Kontrolle. Im Mittel zeigt sich unter Setting 3 nach 15 Minuten Bestrahlung (45 J/cm^2) eine Viabilität der mit PBS benetzten Keratinoyten von 95,90 % ± 10,06 % und nach 30 Minuten (90 J/cm^2) von 93,97 % ± 13,80 %. Bei Inkubation mit -Lösung zeigt sich nach 15 minütiger Bestrahlung unter S3 (45 J/cm^2) eine Viabilität von 90,74± 15,84 %. Unter Setting 4 zeigt sich der niedrigste Wert der Zellviabilität mit 74,25 % bei den mit NO_2 benetzten, unbestrahlten Wärmeschrankkontrollen. Bei der mit PBS benetzten Episkin liegt die Viabilität nach 15 Minuten Bestrahlung mit Setting 4 (45 J/cm^2) im Mittel bei 98,18 % ± 4,08 %, nach 30 Minuten (90 J/cm^2) bei 94,49 % ± 7,00 % und nach 15 Minuten Irradiation unter Benetzung bei 98,56 % ± 3,51 %. Insgesamt zeigen die mit -Kupfersulfat-Lösung behandelten Proben die größte Standardabweichung und jeweils die niedrigsten Werte bei der unbestrahlten Wärmeschrankkontrolle. Unter Setting 3 zeigt sich nach 15 Minuten Bestrahlung im Mittel die niedrigste Viabilität verglichen mit den Settings 2 und 4. Insgesamt zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mit PBS und den mit NO_2 benetzten Proben.

1.3.2 Irritation humaner Keratinozyten nach 453 nm

Für das Skin Irritation Assay wurden 4 Episkinsets wie zuvor beschrieben (s. Seite 26) behandelt. Aus Kostengründen wurde zunächst nur auf Irritation der Keratinozyten nach Bestrahlung mit den intensiveren Settings 2, 3 und 4 in 3 unabhängigen Versuchsreihen (n = 3) getestet. Setting 1 wurde im Anschluss einmalig getestet. Als Positivkontrolle war zunächst 8 M Natronlauge verwendet worden. Da dies für das Skin Irritation Assay als Kontrolle unzureichend war (Viabilität weiterhin >50 %) wurde zusätzlich noch SDS als Positivkontrolle angewendet, jedoch erst nach Durchführung des ELISA-Testes, sodass die Positivkontrolle dort nur bedingt verwertbar ist. Die Umsetzung von gelbem MTT zu blauem Formazan ist ein Indikator der Zellviabilität, welche im Rahmen des *Skin Irritation Assays* eine validierte Methode darstellt, mögliche irritative Effekte an artifizieller Haut zu messen. Durch die alleinige Messung der Zellviabilität anhand der MTT-Umsetzung, kann eine Vorhersage zum irritativen Potential einer Substanz getroffen werden. Liegt die Viabilität nach 15 Minuten Exposition gegenüber dem Reiz , in diesem Falle 453 nm Licht und einer Stunde Inkubation bei > 50 % in Bezug zur Negativkontrolle, so gilt eine Substanz als potentiell nicht irritativ. Da die Zellviabilität unter keinem der Lampensettings nach 60 Minuten Behandlung mit dem „Reiz 453 nm“ (entsprechend 122,4 J/cm^2 (S1), 180 J/cm^2 (S3, S4), 208,8 J/cm^2 (S2)) auf < unter 50 % abfiel (s. Abb. 32) ist nicht von einer Irritation der Haut durch blaues Licht der Wellenlänge 453 nm auszugehen. Da die Bestrahlungsdosen in unserer Arbeit, welche auch für einen therapeutischen Einsatz denkbar wären, zwischen 30,6 J/cm^2 (S1), 45 J/cm^2 (S3/S4) und 52,2 J/cm^2 (S2) liegen, ist von keinem irritativem Effekt bei einer Bestrahlungsdauer von 15 Minuten mit 453 nm Licht auszugehen.

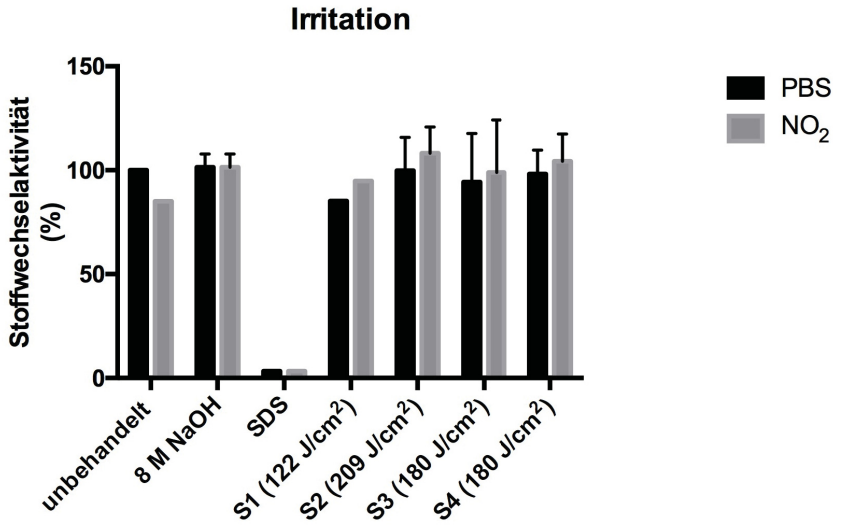


Abb. 32: Stoffwechselaktivität nach 60 Minuten 453 nm verschiedener Intensitäten,

Angabe in Prozent zur unbehandelten Kontrolle (= unbestrahlt, 60 Minuten Wärmeschrank mit PBS benetzt), die Zellviabilität nimmt unter keinem der Settings auf unter 50 % ab. Die mit 100 μM Natrium-Kupfersulfat-Lösung (NO_2) benetzte Haut zeigt bei allen Settings eine höhere Stoffwechselaktivität als die mit PBS benetzte, n = 3 {Positivkontrolle SDS n = 1}, Mittelwert ± Standardabweichung.

Die Sensitivität dieser Methode zum Nachweis irritativer Effekte des blauen Lichtes kann durch die Messung der IL-1α Expression der bestrahlten Keratinozyten von 75 % auf 91 % erhöht werden. Als irritativ gilt dann ein exogener Reiz, welcher die Viabilität auf <50 % absinken lässt und gleichzeitig zu einer IL-1α Expression von >60 pg/ml führt. Bei einer Viabilität von >50 % und einer IL-1α Expression von <60 pg/ml kann ein irritativer Effekt mit einer Sensitivität von 91 % ausgeschlossen werden (STATEMENT ON THE VALIDITY OF *IN-VITRO* TESTS FOR SKIN IRRITATION, European Comission 2007) **[127].** Bei dem durchgeführten ELISA-Assay zeigten sich keine messbar erhöhten IL-1α Werte in dem entnommenem Assay-Medium, auf dem die Proben nach Bestrahlung inkubiert wurden. Die Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen und der Blank abgezogen, anschließend der Mittelwert aus beiden blankkorrigierten Messwerten bestimmt. Anhand dieses Wertes wurde die Konzentration der Probe über eine im Fluorometer berechnete Regression der Standardreihe mit bekannten IL-1α

Konzentrationen errechnet. Abgebildet sind die Mittelwerte der Konzentration der ersten 3 Skin Irritation Assays (s. Abb. 33). Es ist deutlich erkennbar, dass die gemessenen IL-1α Werte die als irritativ geltende Grenze von 60 pg/ml nicht erreichen. Somit ist davon auszugehen, dass die Bestrahlung mit 453 nm Licht selbst nach einer Behandlungsdauer von 60 Minuten keine irritativen Effekte auf humane Keratinozyten hat. Es zeigt sich allerdings ein leichter Anstieg der Stoffwechselaktivität, vor allem bei den mit NO_2 benetzten Proben. Dies könnte ein Indikator dafür sein, dass das blaue Licht in der Lage ist die Zellen anzuregen und zu aktivieren.

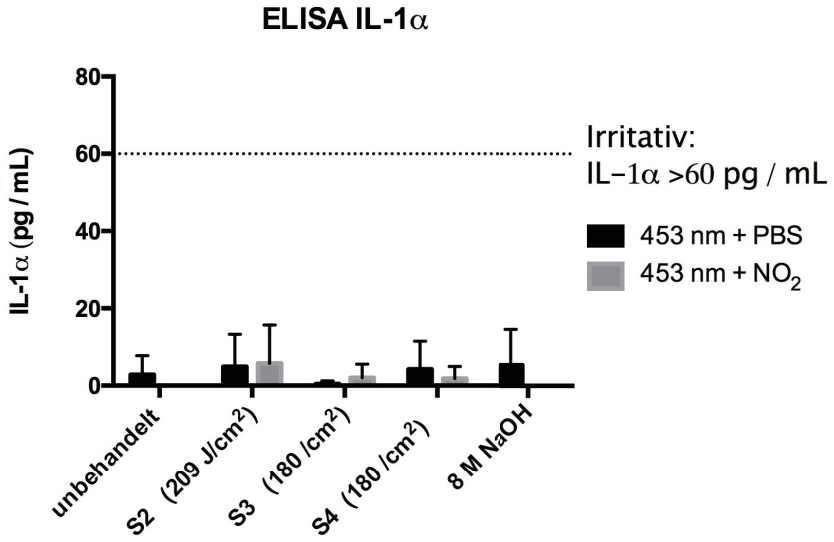


Abb. 33: IL-1α Konzentration im Inkubationsmedium nach 60 Minuten 453 nm,

unbehandelte Kontrolle = unbestrahlte Brutschrankkontrolle 60 Minuten, Bestrahlung der Episkin unter Applikation von PBS / 100 μM Natrium-Kupfersulfat-Lösung für 60 Minuten mit Setting 2 (209 J/cm²) und Setting 3/4 (180 J/cm2) keine der Proben zeigt nach 60 Minuten unter 453 nm eine IL-1α Expression über der irritativen Grenze von 60 pg/ml positiv Kontrolle mit 8 M Natronlauge (NaOH) nicht verwertbar, da weit unter der irritativen Grenze, n=3, Mittelwert±Standardabweichung

1.3.3 Korrosion humaner Keratinozyten nach 453 nm

Als korrosiv gilt eine Testsubstanz, wenn die Viabilität (gemessen in Stoffwechselaktivität in % zur negativ Kontrolle) nach 3 Minuten Exposition noch > 50 %

liegt, jedoch nach 1 Stunde Exposition < 15 % beträgt oder wenn die Stoffwechselaktivität nach 3 Minuten <50 % beträgt. Da die Aktivität auch nach 1 Stunde 453 nm nicht <50 % abgefallen ist, ist davon auszugehen, dass sie nach drei Minuten ebenfalls noch bei >50 % liegt. Daher war eine weitere Durchführung des Korrosionsassays mit einer Expositionszeit von drei Minuten als obsolet zu erachten, sodass auch aus Kostengründen darauf verzichtet werden konnte. Wie in Abb. 34 zu sehen, liegt die Stoffwechselaktivität unter allen vier Settings des 453 nm Lichts nach 60 Minuten Behandlungszeit weit > 50 %. Somit gilt Licht der Wellenlänge 453 nm auch bei einer Behandlungsdauer von 60 Minuten (entsprechend einer Dosis von S2: 209 J/cm^2, S3/4: 180 J/cm^2) nicht als korrosiv einzuschätzen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Stoffwechselaktivität im Vergleich der Settings untereinander.

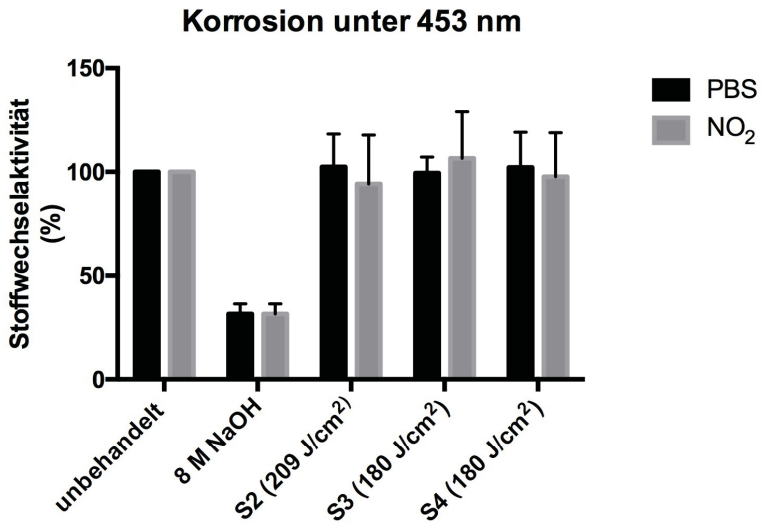


Abb. 34: Test auf Korrosion an Keratinozyten nach 60 Minuten 453 nm

Bestrahlung von Episkin unter Applikation von PBS/100 μM Natrium-Kupfersulfat-Lösung (NO_2) mit 453 nm über 60 Minute, entsprechend 209 J/cm2 (S2) und 180 J/cm2 (S3,4), Angabe in % zur unbehandelten Kontrolle (=unbestrahlte Brutschrankkontrolle 60 Minuten): keine Abnahme der Stoffwechselaktivität auf unter 15 %; n=3 Mittelwert±Standardabweichung

1.3.4 Apoptotische Ereignisse in Episkin nach Bestrahlung mit 453 nm Licht

Mittels TUNEL-Assay wurde untersucht, ob es durch die Irradiation mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm zur Induktion von DNA-Strangbrüchen kommt. Es wurden je 3 Episkin-Sets für 15 Minuten mit den Settings 1 bis 4 bestrahlt. Dabei wurde pro Setting eine Episkin mit 100 μl PBS, sowie einer 100 μM-Natrium-10 μM-Kupfersulfat-Lösung inkubiert. Es wurden histologische Schnitte angefertigt und die TUNEL-Färbung durchgeführt (siehe S.46). Ein weiteres Set wurde für 30 Minuten mit allen Settings bestrahlt, eines für 60 Minuten. Als positiv Kontrolle wurde UVA-Licht verwendet. Anschließend wurden unter dem Mikroskop mittels des Programms *AxioVision* (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena Deutschalnd) je 3 Fotos pro Schnitt angefertigt. Jeweils mit einer Aufnahme unter dem DAPI-Filter, zur Darstellung vorhandener Zellkerne, sowie einer unter dem FITC-Filter, zur Darstellung grün fluoreszenzierender Nuklei mit positivem TUNEL-Signal (s. Abb. 35). Die Auszählung der Zellen wurde mit dem

Programm *FIJI (Wu, Kennedy et al. 2003)* durchgeführt. Pro Schnitt wurden ca. 200 Zellen ausgezählt und der prozentuale Anteil von TUNEL-positiven Zellkernen zur Gesamtzahl vorhandener Zellkerne bestimmt. In Abb. 36 ist der prozentuale Anteil an TUNEL-positiven Zellkernen (grün fluoreszierend) an allen vorhandenen, mittels DAPI-Filter dargestellten Nuklei nach 15, 30 und 60 Minuten Bestrahlung abgebildet. Bei keinem der Settings 2,3,4 zeigt sich eine im Vergleich zur negativ Kontrolle signifikant erhöhte Anzahl an TUNEL-positiven Zellen mit DNA-Strangbrüchen.

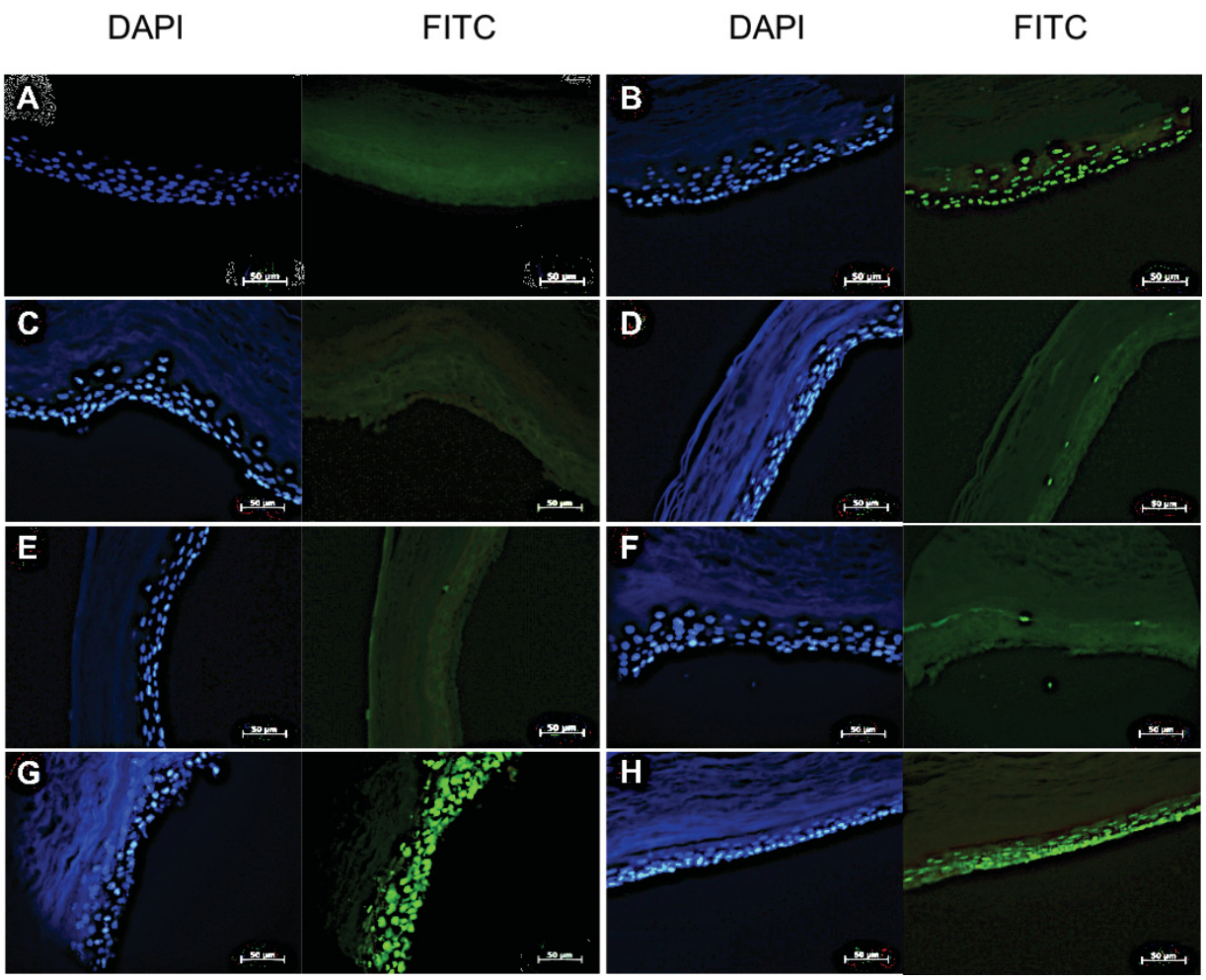


Abb. 35: Apoptotische Ereignisse in den Keratinozyten der Episkin nach 60-minütiger Bestrahlung mit 453 nm

A: Unbestrahlte Brutschrankkontrolle; **B:** TUNEL-Positivkontrolle, Epidermis mit DNase I behandelt; **C:** Setting 2, Dosis 209 J/cm²; **D**: Setting 2 mit 100 μM NO_2-Lösung; **E**: Setting 4, Dosis 180 J/cm²; **F:** Setting 4 mit 100 μM NO_2-Lösung; **G**: Positivkontrolle UVA, Strahlungsdosis 58 J/cm²; **H**: Positivkontrolle UVA mit 100 μM NO_2-Lösung. Oben bzw. links: apikale Hautschicht (*Stratum corneum*); 400-fache Vergrößerung, Maßstab 50 μm; links: blau = Kernfärbung (DAPI), rechts: grün = TUNEL-Signal apoptotischer Zellen mit DNA-Strangbrüchen

In Abb. 36 ist ersichtlich, dass sich unter Setting 2 nach 15, 30 und 60 Minuten Bestrahlung die geringste Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu Setting 3 und 4 zeigen. Keines der Settings des 453 nm blauen Lichtes induziert, selbst nach einer Bestrahlungszeit von 60 Minuten im Mittel mehr als 5 % Apoptosen. Nach 15 Minuten

zeigen sich unter Setting 2, entsprechend einer Strahlendosis von 50,2 J/cm^2 0,86 ± 0,2 % apoptotische Zellen, nach 60 Minuten zeigt sich keine Zelle TUNEL-positiv. Bei Setting 3 zeigten sich nach 15 Minuten (45 J/cm^2) 0,87 ± 0,2 %, nach 60 Minuten (180 J/cm^2) 2,6 % der Zellen apoptotisch. Unter Setting 4 waren nach 15 Minuten (45 J/cm^2) 2,95 ± 2,7 %, nach 60 Minuten (180 J/cm^2) 4,465 % apoptotische Zellen zu beobachten. Im Vergleich dazu zeigten sich unter UVA-Licht nach 15 Minuten Bestrahlung bei einer wesentlich geringeren Strahlungsenergie von nur 14,5 J/cm^2 11,76 % apoptotischer Zellen, nach 60 Minuten sogar 53,33 %.

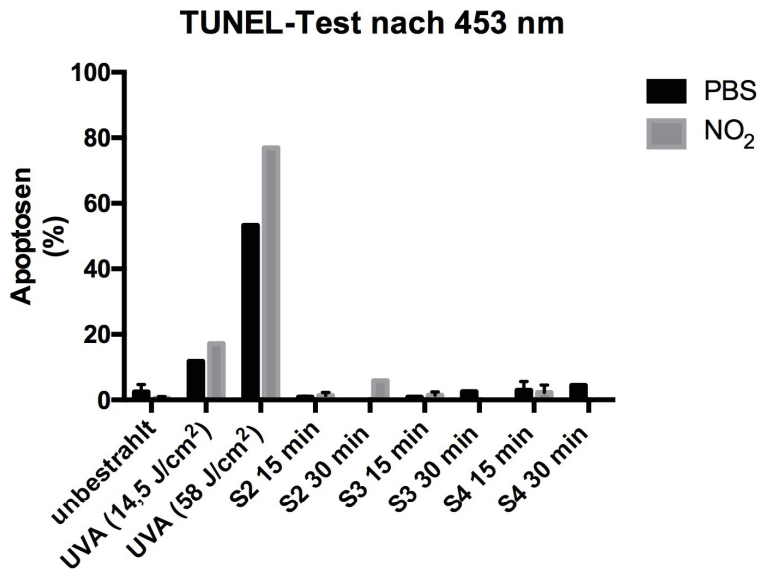


Abb. 36: Anteil apoptotischer Keratinozyten mit positivem TUNEL-Signal nach Bestrahlung mit 453 nm,

Angabe in % an TUNEL-negativen Zellen (DAPI Signal), n=3 für 15 Minuten.Werte + PBS/NO2, unbestrahlte Kontrolle, n=1 für UVA- und 60 Minuten Werte, Mittelwert±Standardabweichung

5. Diskussion

11. Anstieg der kutanen Durchblutung unter 453 nm

In ihrer 2013 veröffentlichten Arbeit konnten Opländer *et al.* zeigen, dass unter Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlängen 420, sowie 453 nm die kutane Durchblutung durch die Freisetzung von NO aus kutanen NO-Derivaten wie RSNO cGMP vermittelt gesteigert werden kann. Im Einzelnen wurde gezeigt, dass unter der Bestrahlung mit blauem Licht erstens NO aus NO_2 haltigen Lösungen unter Anwesenheit von bivalenten Kupferionen, sowie aus NO-S-Albumin haltigen Lösungen freigesetzt werden kann, zweitens, dass über der bestrahlten Haut von Probanden während der Bestrahlung eine ansteigende NO-Konzentration messbar ist und es drittens zeitgleich zu einem Anstieg der Durchblutung kommt. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich unter Bestrahlung vermehrt RSNO in der oberen Epidermis bilden, vor allem nach vorheriger Inkubation der Hautproben in einem Kupfer und NO_2 haltigen Medium.

In dieser Arbeit untersuchten wir erstmals ob der Einsatz von gepulstem blauen Licht der Wellenlänge 453 nm im Vergleich zu kontinuierlichem Licht vergleichbarer Strahlungsenergie zu einer veränderten oder gesteigerten Freisetzung von NO aus kutanen Speicherformen durch höhere Strahlungsenergien im Peak führt. Insgesamt zeigte sich unter allen Settings des 453 nm blauen LED-Lichtes, sowohl in 1 bis 2 mm als auch in 6 bis 8 mm Hauttiefe eine deutliche Steigerung der kutanen Durchblutung, welche in Relation zum Ausgangswert unter Setting 3 sowohl in 1 bis 2 mm, als auch in 6 bis 8 mm Hauttiefe am größten ausfiel (s. Abb. 14). Auffallend war, dass die absoluten Blutflusswerte in 6 bis 8 mm Hauttiefe nach 15 Minuten Bestrahlung mit Setting 1 fast genauso hoch ausfielen, wie unter Setting 2 und sogar höher als unter den intensiveren Setting 3 und 4 (s. Abb. 11). Im Hinblick auf einen gewünschten therapeutischen Nutzen des blauen Lichtes bei schlechten Blutflussverhältnissen mit daraus resultierenden Pathologien, ist der durchblutungssteigernde Effekt der Settings jedoch von größerer Bedeutung als die absoluten Werte. Bei Patienten mit sehr schlechten Ausgangswerten der kutanen Durchblutung sollte daher der Modus des blauen LED-Lichtes verwendet

werden, mit dem eine maximale Steigerung der Durchblutung erreicht werden kann. Da der Anstieg der kutanen Durchblutung unter Setting 1 und 2 flacher ausfällt, als unter Setting 3 und 4, wäre für einen therapeutischen Einsatz ein gepulster Modus des blauen Lichtes einem kontinuierlichem vor zu ziehen.

Zudem fiel auf, dass sich der maximale Anstieg der kutanen Durchblutung unter Setting 1 und 2, vor allem in 1 bis 2 mm Hauttiefe, erst nach Ausschalten der Lampe zu Minute 15 zeigte (s. Abb. 12). Bei den ersten Probanden wurde eine zusätzliche Messung an einem unbestrahlten Kontrollpunkt am Oberarm durchgeführt, für welche die O2C-Sonde vom doppelseitigen Pflaster abgelöst und umgesetzt werden musste. Aufgrund des deutlichen lokalen Erythems durch die mechanische Irritation und den Anstieg der kutanen Perfusion an der bestrahlten Stelle zu Minute 20, somit nach einmaligem Umsetzten der Sode, wurden die Messwerte dieser Probanden ab Minute 20 exkludiert. Bei Setting 2 zeigte sich nach Ausschluss der Probanden eine deutliche Abflachung des vorherigen Peaks bei Minute 20. Dies lässt darauf schließen, dass der zuvor beobachtete erneute Anstieg des Blutflusses zur Minute 20 bei Setting 2 nicht mit der Kinetik der NO-Freisetzung unter blauem Licht zusammenhängt, sondern am ehesten ein Effekt der lokalen Hautreizung ist. Allerdings lässt sich der Peak unter Setting 1 durch das Exkludieren entsprechender Probanden nicht vollkommen ausgleichen. Auch Probanden bei denen das Pflaster nicht mehr umgesetzt wurde, zeigten bei Minute 20 teilweise einen höheren Blutfluss, als nach 15 Minuten unter blauem Licht. Somit ist der erhöhte Blutfluss bei Minute 20 unter Setting 1 möglicherweise nicht durch das Umsetzten der Sonde allein zu erklären. Für den Effekt der Hautreizung spricht allerdings die Tatsache, dass der in 6 bis 8 mm Hauttiefe gemessene Blutfluss keinen so ausgeprägten Peak zur Minute 20 zeigt, wie der oberflächliche Blutfluss in 1 bis 2 mm Tiefe, da eine oberflächliche Reizung den superfizialen Blutfluss stärker beeinflusst, als den profunden. Möglicherweise zeigt das weniger intensive Setting 1 jedoch einen verzögerten Peak der NO-Freisetzung als die intensiveren Settings 2-4 aufgrund der geringeren Strahlungsenergie. Da diese sich bei fixer Wellenlänge von 453 nm aus der Lichtfrequenz ergibt ($W = h * v$, v = Frequenz v = Lichtgeschwindigkeit c*/Wellenlänge λ) [128], könnte die Frequenz der elektromagnetischen Wellen eine Rolle im Hinblick auf

die Freisetzungskinetik von NO aus RSNO spielen. Eventuell wird unter Setting 1 erst später die notwendige kumulative Strahlendosis erreicht, um die kutanen proteingebundenen NO-Derivate in vivo zu spalten. Da in den Vorarbeiten nicht mit unterschiedlichen Strahlungsintensitäten derselben Wellenlänge gearbeitet wurde, gibt es dazu bisher keine vergleichbaren Daten. Im Hinblick auf die Kinetik der Photodissoziation der S-N Verbindung ist bisher ebenfalls nur wenig bekannt. In Arbeiten, welche sich beispielsweise mit der Kinetik der UV-induzierten Spaltung von Disulfidbrücken und dadurch induzierter Konformationsänderung bestimmter Proteine beschäftigten, konnte gezeigt werden, dass die reine Strahlungsenergie allein, aufgrund zu schwacher Absorption dieser Verbindungen, nicht zur UV-induzierten Spaltung ausreicht, sondern zusätzliche Elektronendonoren wie beispielsweise Tryptophan durch UV-Exzitaion an diesen Reaktionen beteiligt sind und die Betrachtung der rein physikalischen Bindungsenergien nicht ausriecht, da viele unterschiedliche Faktoren in vivo die Stabilität solcher Verbindungen beeinflussen [129].Verschiedene Forschungsgruppen beschäftigten sich mit RSNO und deren physiologischen Wirkformen und Reaktionsmechanismen in vivo [59]; [130]. Bis dato ist nicht vollständig erschlossen, welche NO-Metabolite als Vermittler der physiologischen NO-Effekte fungieren und welche Charakeristika diese in vivo aufweisen. Diskutiert wurden unter anderem Substanzen wie z.B. Perthio (SSNO-), ein S-Nitrosothiol, welches vielversprechend schien, an interzellulären und intrazellulären Transnitrosierungsreaktionen beteiligt zu sein, da es im Vergleich zu anderen kurzlebigen RSNO wesentlich stabiler ist, als langsam freisentzender NO-Donor fungiert und zudem unter Licht der Wellenlänge 470 nm schnell zerfällt. Trotz dieser viel versprechenden Eigenschaften scheint eine physiologische Rolle als NO-Metabolit eher unwahrscheinlich, da mittels SSNO- keine Transnitrosierungsreationen induziert werden konnten [131]. Da bis jetzt nicht viel bekannt ist, welche RSNO genau an der kutanen, nicht enzymatischen NO-Synthese beteiligt sind, wäre es möglich, dass auch bei der Spaltung der S-N Verbindungen dieser RSNOs weitere, unbekannte Faktoren in vivo eine Rolle bei der Photodekomposition dieser Verbindungen spielen. Die Bindungsenergie der S-N-Verbindung der RSNOs von +23 bis +34 kcal/mol liegt jedoch

unterhalb der Strahlungsenergie des blauen Lichtes liegt (Strahlungsenergie im Bereich des sichtbaren Lichtes (410 – 590 nm) = +48,5 kcal/mol bis +69,7 kcal/mol, Strahlungsenergie 453 nm = 53,58 kcal/mol), sodass eine Photodissoziation in diesem Bereich stattfinden sollte. Es könnte jedoch sein, dass zusätzliche molekülstabilisierende Faktoren in vivo eine Rolle spielen, sodass die Verbindungen unter einer niedrigeren Strahlendosis, wie der des Setting 1 eventuell erst bei einer höheren kumulativen Gesamtdosis gespalten werden können. In Hinblick auf die Bindungsenergie der N-O Verbindung des Nitritions im Schweiß, welche mit 93,9 kcal/mol deutlich über der Strahlungsenergie des 453 nm blauen Lichtes liegt, könnte durch das gepulste Licht eine Steigerung der NO-Freisetzung aus epikutanem NO_2 im Schweiß möglich sein. Dies könnte ein Grund für die unter Setting 3 höhere und länger anhaltende Blutflusssteigerung sein. Betrachtet man dagegen die unter Setting 4 trotz gleicher Gesamtdosis geringer ausfallende blutflussteigernde Wirkung, so könnte man davon ausgehen, dass auch die Pulsfrequenz des gepulsten Modus, neben der Frequenz der elektromagnetischen Strahlung eine Rolle spielt (s. unten).

1.3.5 Der Weg des NO in der Haut:

Blaues Licht dringt nur 1 mm tief in die Haut ein. Nur bis zu dieser Eindringtiefe kann es somit seine biologischen Effekte entfalten. Eine thermisch induzierte, enzymatischen NO Freisetzung dürfte daher auch nur in den obersten Hautschichten, wie bereits zuvor erläutert eine Rolle spielen. Daher ist davon aus zu gehen, dass auch die nicht enzymatische NO-Freisetzung durch Photodissoziation aus NO-Metaboliten im Schweiß und eventuell aus proteingebundenen S-Nitrosothiolen der obersten Hautschicht, wahrscheinlich vor allem apikal stattfindet. Zudem diffundiert freies NO nur über Strecken bis 0,5 mm, das blaue Licht zeigte jedoch in unserer Arbeit auch in 6 bis 8 mm Tiefe noch eine Zunahme der kutanen Perfusion. Auch Opländer *et al.* [132] konnten zeigen, dass NO sogar in 18 mm Tiefe noch zu einem Anstieg der kutanen Perfusion führt und sogar systemische Effekte hat. Es wurde gezeigt, dass die dermale Applikation angesäuerter Nitrit haltiger Cremes (DAC/AAA Creme mit 100 μM Natriumascorbat, 50 mM Natriumn itrit, pH 5,5) unter Irradiation mit UVA Licht zur Senkung des systemischen

mittleren arteriellen Blutdruckes führt. Zudem konnte ein transepidermaler NO Gradient mittels Franz´scher Diffusionszelle nachgewiesen werden, sowie die Anreicherung kutaner RSNO unter Behandlung der Haut mit Nitrithaltiger Creme als NO-Donor. Da auch eine Diffusion von NO aus der Haut, nach Vorbehandlung mit der Creme gemessen wurde und die NO vermittelten physiologischen Effekte dosisabhängig sind [133], bestand die Annahme, dass die kutane NO-Freisetzung unter 453 nm durch eine solche Vorbehandlung noch gesteigert werden könnte. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die Versuche zur Messung kutaner NO-Derivate und zur Überprüfung der Toxizität unter 453 nm blauem Licht stets mit Applikation von PBS und Nitritlösung durchgeführt. Mittels der NO Freisetzung aus Hauthomogenaten (s. Abb. 26) und immunhistochemischen Färbungen bestrahlter Hautexplantate mit Anti-S-Nitrosoantikörpern (s.Abb. 27) wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob es unter Bestrahlung mit 453 nm unterschiedlicher Intensitäten und Modi zu einer unterschiedlichen starken Anreicherung der Haut mit RSNO kommt. Dabei zeigte sich bei meinen Versuchen kein signifikanter Unterschied in der Anreicherung kutaner RSNO unter kontinuierlichem verglichen mit gepulstem blauen Licht (453 nm). Allerdings konnten Opländer et. al [20] in ihrer Arbeit eine Anreicherung der Epidermis, sowie die Entstehung eines epidermalen Gradienten aus RSNO durch die Applikation mit Na-NO-Lösungen und Bestrahlung mit blauem Licht nachweisen. Die inkonsistenten Werte der NO-Metabolite aus bestrahlten Hautexplantaten könnten am ehesten mit der Problematik der einheitlichen Erstellung eines in die CLD injizierbaren Homogenates zusammehängen. Die direkte Bestrahlung eines einheitlich Erstellten und stärker verdünnten Homogenates in einem CLD Kolben mit direkter Messung der NO Freisetzung aus dem bestrahlten Homogenat hätte eine Alternative bieten können. Aus zeitlichen Gründen und dem Fehlen einer geeigneten Versuchsapparatur konnte dies leider im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Ungeklärt bleibt jedoch weiterhin der genaue Weg des NO durch die Haut bis hin zu seinem Wirkort in den Gefäßen und seinen systemischen Effekten. Während die systemischen blutdrucksenkenden und vasodilatierenden Wirkungen von systemisch zugeführtem NO (bspw. per inhalationem oder nutritiv) einem intravaskulären Transport,

gebunden an Hb (SNO-Hb) und Albumin mit anschließender transzellulärer Migration in die Intima des Gefäßendothels, zugeschrieben werden [134], so ist bis dato der kutane Transportmechanismus für das lokal, durch Photodissoziation freigesetzte NO ungeklärt. Nach dermaler Applikation konnte im Blut von Probanden ein Anstieg an RSNO nachgewiesen werden [22], sodass auch das lokal freigesetzte NO systemisch wirksam werden kann. RSNO, welche seit einigen Jahren aufgrund ihrer physiologischen NO ähnlichen Effekte intensiv erforscht werden, fungieren zum einen als NO-Donoren, zeigen aber auch NO unabhängige eigenständige physiologische Effekte. Diese sind wahrscheinlich zum einen einer NO-Freisetzung, zum anderen aber auch Transnitrosierungsreaktionen zu zuschreiben [135] Es konnte gezeigt werden, dass endovaskuläres NO zwischen thiolhaltigen Proteinen wie RSNOs via S-Transnitrosierungsreaktionen ausgetauscht werden kann und dass diese SNOs wie S-Nitroso-D-Cystein (D-cysNO) oder S-Nitroso-Glutathion (GSNO) vasodilatierende Wirkungen zeigen [136]. Solche Transnitrosierungsprozesse könnten auch intrakutan einen möglichen Transportmechanismus für das NO Molekül darstellen. Denkbar wäre eine transkutane Translokation des NO entlang eines Konzentrationsgradienten von einer freien Thiolgruppe zur nächsten und somit über intermittierende Bildung von S-Nitrosothiolen zu den dermalen Gefäßen, wo es lokal und systemisch wirksam werden kann (s. Abb. 37). Diese Transportmechanismen wären abhängig von der Permeabilität der RSNOs für Doppel-lipid-membranen. Der Konzentrationsgradient für freie ungebundene Thiole könnte dabei durch den Blutfluss aufrechtgehalten werden, da mit dem Blut ständig neue thiolhaltige Proteine angeliefert und NO abtransportiert bzw. intrazellulär in den Erythrozyten von Hb (SNO-Hb) und Glutathion (GSNO) gebunden würde [134].

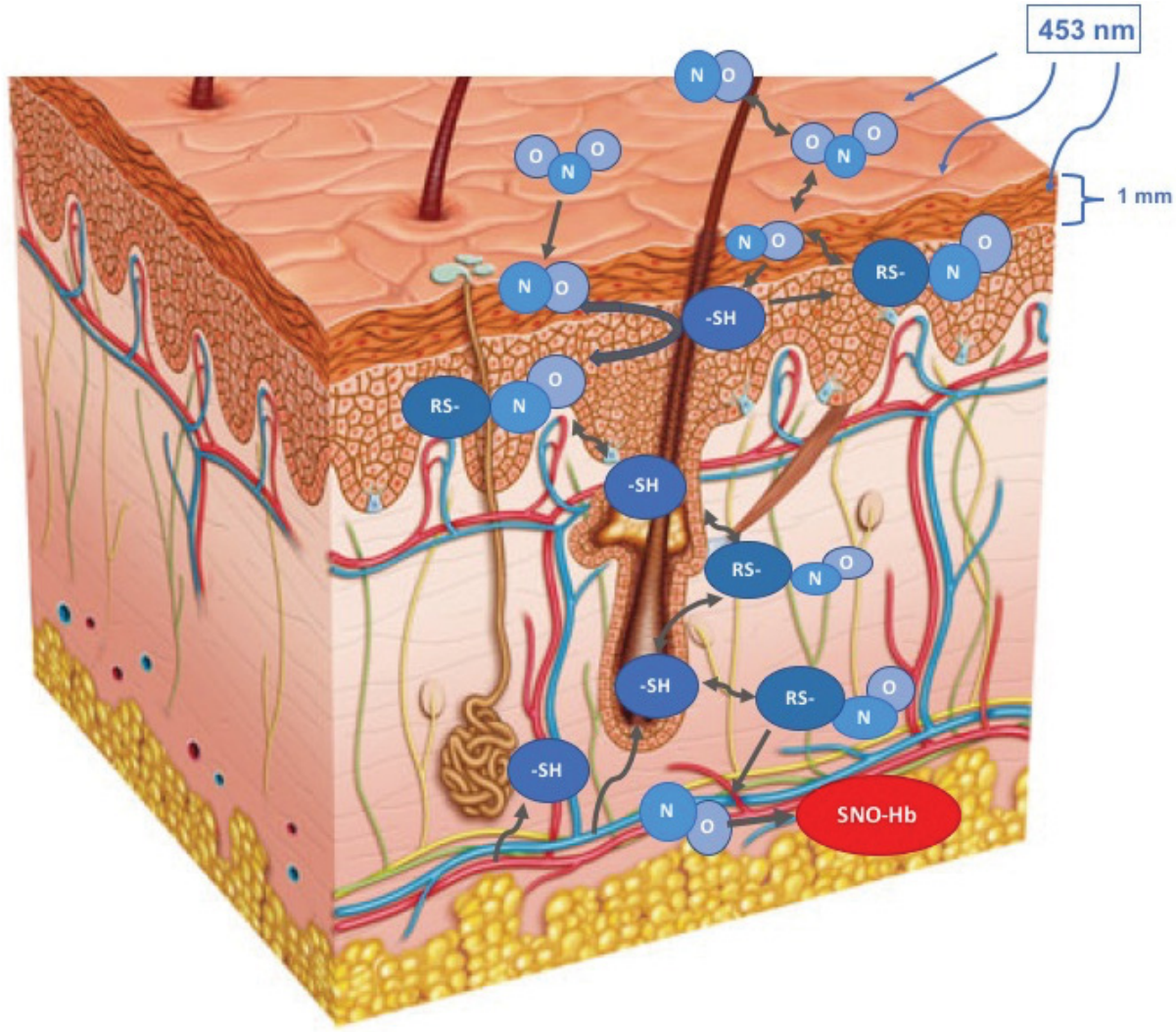


Abb. 37: Die kutane Transmigration von NO – ein theoretisches Modell,

Durch S-Transnitrosierungsreaktionen mit freien Thiolgruppen (-SH) dermaler Proteine könnte NO über die Entstehung temporärer S-Nitrosoverbindungen (RSNO) als möglichen Trägermolekülen bis zum Endothel und auch nach intravasal gelangen. Über die Entstehung von intravasal bzw. intrazellulär in den Erythrozyten gebildeten RSNO wie beispielsweise S-Nitroso-Hämoglobin (SNO-Hb) würde der Abtransport des NO zur Aufrechterhaltung des Konzentrationsgradienten geleistet werden und systemische Effekte durch den Transport von NO und physiologisch wirksamen RSNO mit dem Blutstrom möglich; (Bild abgeändert, Quelle: https://www.ck12.org/biology/variation-in-cells/lesson/Cell-Size-and-Shape-Advanced-BIO-ADV/, 26.02.2018, Lizenz: CC BY-NC 3.0)

Da sich bei unseren Daten der größte Blutflussanstieg unter Setting 3 zeigte und sich im Vergleich zu Setting 4 mit gleich großer mittlerer Strahlungsenergie von 50 mW/cm^2 ein

Trend zur höheren und länger anhaltenden Blutflusssteigerung unter Setting 3 zeigte, könnte die Impulsfrequenz des gepulsten blauen LED-Lichts ebenfalls eine Rolle im Hinblick auf die Freisetzungskinetik des NO spielen. Bei gleicher mittlerer Strahlungsenergie, jedoch doppelt so hoher Peakintensität, müsste das interpulsatile Zeitintervall bei Setting 4 doppelt so lang sein, als unter Setting 3. Durch die längeren Pausen, zwischen den einzelnen Impulsen würden apikal pro Zeit weniger RSNO gespalten werden. Dadurch lägen apikal bis 1 mm Hauttiefe, in die das blaue Licht noch eindringen kann, pro Zeit weniger freie Thiolgruppen als Trägermoleküle für das auf der Haut aus dem NO_2 im Schweiß freigesetzte NO vor. Die freien Thiolgruppen apikal könnten aber notwendig sein um den Konzentrationsgradienten nach basal aufzubauen, in dem von apikal immer wieder neue RSNO gebildet und gespalten werden und somit kontinuierlich immer mehr NO entlang einer Transnitrosierungskette nach basal wandert. Unter Setting 4 könnte es durch die pro Zeit im Vergleich zu Setting 3 verminderte, apikale NO Freisetzung in den längeren impulsfreien Intervallen eher zu einer flächenhaften Ausbreitung der RSNO durch Transnitrosierungen kommen, als zu einer Transmigration in die Tiefe. Nach dieser Überlegung müsste somit eigentlich die apikale NO Freisetzung und damit die Vasodilatation unter dem kontinuierlichen Setting 2 noch größer sein. Da jedoch Setting 3 die größere Peakintensität aufweist, kann es sein, dass unter Setting 3 gegebenenfalls mehr Strahlungsenergie für die Photodekomposition von NO_2 vorliegt und daher mehr NO_2 gespalten wird, als unter Setting 2. Der kutane Konzentrationsgradient der RSNO unter blauem Licht könnte nach basal durch die Anreicherung der basalen Schichten mit neuen ungebundenen Thiolgruppen durch den Blutstrom und den Abtransport des NO mit dem Blut aufrechterhalten werden. Dagegen könnte die von Opländer *et al.* festgestellte kutane Anreicherung mit RSNO an nicht mehr perfundierten Hautexplantaten sprechen. Andererseits würde auch in den Hautexplantaten zunächst ein Konzentrationsgradient nach basal vorliegen, da freie Thiolgruppen ubiquitär in der Haut vorkommen und zunächst aufgesättigt würden, sodass auch in den Hautexplantaten eine intraktuane Migration des NO stattfand [22, 137].

1.3.6 Thermisch induzierte NO-vermittele Vasodilatation

Wie sensibel die Blutflussveränderungen auf externe Faktoren oder Umweltveränderungen reagieren, zeigte sich auch nach Ausschalten der Lampe. Bei den kontinuierlichen Settings 1 und 2 konnte unter Beleuchtung gemessen werden, während die Lampe für die Messung in 6 bis 8 mm Tiefe unter den Settings 3 und 4 über den Zeitraum der Datenerfassung von 10 Sekunde aufgrund von Interferenzen der O2C-Messonde mit dem gepulsten Licht, kurzzeitig ausgeschaltet werden musste. Zudem wurde bei allen Settings einmal unter Bestrahlung zur Minute 14,5, sowie einmal kurz nach Ausschalten der Lampe zu Minute 15 gemessen. Dabei fiel auf, dass die Blutflusswerte direkt nach Ausschalten der Lampe bei 3 von 4 Settings einen leichten Abfall zeigten. Angenommen, dieser Effekt käme auch bei den Messungen zu Minute 5 und 10 unter Setting 3 und 4 zu tragen, wäre davon auszugehen, dass die wahren Blutflusswerte unter Setting 3 und 4 gegebenenfalls noch etwas höher lagen, als die unter ausgeschalteter Lampe gemessenen. Der leichte Abfall der Durchblutung nach Ausschalten der Lampe könnte eventuell durch den plötzlichen Wärmeentzug und eine dadurch einsetzende, reflektorische Vasokonstriktion bedingt sein. Die Mehrzahl der Probanden, berichtete von einem plötzlichen, kurzzeitigen Kältegefühl beim Ausschalten der Lampe. Durch die sympathische Aktivierung aufgrund des Kälteempfindens würde die reflexvermittelte Steigerung des vasokonstriktorischen Sympathikotonus an den peripheren Blutgefäßen zu einer verminderten Kappillardurchblutung [138] führen, was sich vor allem in oberflächlichen Hautschichten bemerkbar machen würde. Passend dazu sieht man in Abb. 13, dass der Abfall der kutanen Durchblutung nach Ausschalten der Lampe zu Minute 15 in 1 bis 2 mm Hauttiefe stärker ausgeprägt ist, als in 6 bis 8 mm Hauttiefe. In einer Arbeit von Erdl et al. [139] konnte gezeigt werden, dass die stärkste vasokonstriktorische Reaktion auf einen lokalen Kältereiz in einem Temperaturbereich zwischen 35- 38 °C liegt. Dies entspricht ebenfalls dem Temperaturspektrum unserer Messungen (s.Abb. 20) und zeigt den bedeutenden Einfluss der Temperatur auf den Vasotonus.

Vasodilatation und -konstriktion sind wichtige Bestandteile zur Aufrechterhaltung einer konstanten Körperkerntemperatur homoiothermer Lebewesen. Bei der Irradiation mit

elektromagnetischer Strahlung wird Energie übertragen, sodass es zur lokalen Erwärmung des Gewebes kommt. Wie auch unter normaler UV-Einstrahlung reagiert der Körper auf eine Temperaturzunahme mit Gegenregulationsmechanismen, um die Kerntemperatur konstant zu halten: Die duale sympathische Innervation der Haut erlaubt neben der adrenergen, sympathischen Vasokonstriktion eine ebenfalls sympathisch, jedoch cholinerg vermittelte, reflektorische Vasodilatation, welche im Rahmen der Thermoregulation dem Abtransport von Wärme via Konvektion dient. Der Tonus zur Vasokonstriktion kann bei Kälte soweit gesteigert werden, dass die schon geringe kutane Ruheperfusion von 250 ml/min auf eine minimale kutane Restperfusion heruntergefahren wird, um den Körper vor Auskühlung zu schützen. Im Rahmen der aktiven Vasodilatation kann die kutane Perfusion im Gegenzug auf bis zu 8 l/min gesteigert werden [138], um den Körper vor Hyperthermie zu schützen. Gekoppelt ist dies an eine ebenfalls Acetylcholin (Ach) vermittelte Zunahme der Sudomotoraktivität mit gesteigerter Schweißproduktion zur Temperaturregulierung durch die entstehende Verdunstungskälte. In wie fern die acetylcholinvermittelte Vasodilatation und Schweißproduktion molekular gekoppelt sind, konnte bis dato noch nicht geklärt werden.

Auch die molekularen Vorgänge der thermischen Vasodilatation sind, trotz jahrelanger Forschungsarbeiten verschiedener Forschungsgruppen und Labore nicht vollends geklärt. Verschiedene Transmitter wie Acetylcholin, Substanz P, Histamin, VIP und auch NO, wurden in zahlreichen Arbeiten als Vermittler der aktiven Vasodilatation diskutiert. Kellogs *et al.* konnten zeigen, dass vor allem die neuronale NOS (nNOS), mehr als die endotheliale NOS (eNOS) an der NO vermittelten Vasodilatation beteiligt ist. Allerdings führt eine NOS-Inhibition nicht zur Suppression der aktiven Vasodilatation, sodass NO oder zumindest das NOS produzierte NO nicht alleinig für die Vasodilatation verantwortlich zu sein scheint [124]. Aus diesen Daten und weiteren Studien, welche alle zeigen konnten, dass sich die aktive Vasodilatation durch Blockade oder Inhibition einzelner Substanzen nie vollständig supprimieren lies, resultiert daher die aktuelle Annahme, dass es sich um einen komplexen molekularen Regelkreis (s. Abb. 38), mit verschiedenen sich gegenseitig beeinflussenden Transmittern handelt. Neben Ko-Transmittern und der Photodekomposition von RSNO wäre auch eine NOS-

unabhängige NO Freisetzung aus thermoinstabilen NO-Derivaten denkbar. Es konnte gezeigt werden, dass die Vasodilatation bei Zunahme der Kerntemperatur bis zu 30 - 40 % NO-vermittelt abläuft, da viele der möglichen ebenfalls vasodilatierenden Mediatoren zu einem weiteren NO-Anstieg führen [126]. NO spielt somit eine zentrale Rolle im Rahmen der thermisch induzierten Vasodilatation. Eine starke temperaturinduzierte Vasodilatation via NO-Freisetzung interferiert jedoch mit unseren Messungen der Durchblutungssteigerung durch die Freisetzung von NO aus photolabilen Nitroderivaten, da es anhand der reinen Messung der Durchblutungssteigerung nicht möglich ist, den thermisch induzierten, NOS-vermittelten NO-Anteil von dem NO-Anteil aus Photodissoziation kutaner NO-Speicher zu differenzieren.

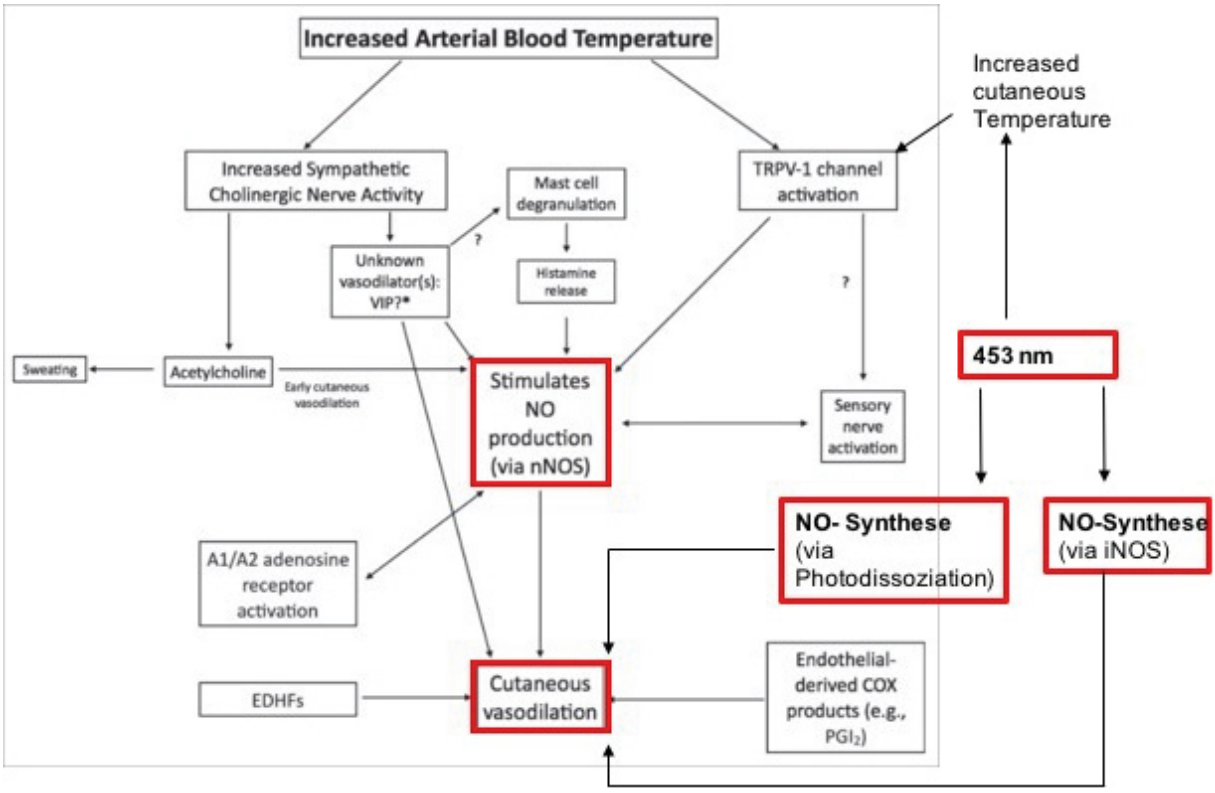


Abb. 38: NO vermittelte Vasodilatation im Rahmen der Thermoregulation,

Unterschiedliche Einflussfaktoren auf die NO Freisetzung im Rahmen der thermisch induzierten Vasodilatation, an der NO zu 30-40 % beteiligt ist. Fraglich bleibt, wie groß der Anteil der nicht enzymatischen NO Synthese unter Irradiation mit 453 nm ist; abgeändert aus [126]

1.3.7 Korrelation Blutflussanstieg und NO-Freisetzung

Dennoch scheint die Temperatur nicht alleinig für die Durchblutungssteigerung durch Vasodilatation unter Bestrahlung mit 453 nm verantwortlich zu sein, auch wenn die Oberflächentemperatur auf der bestrahlten Haut um bis > 4°C (Setting 2) ansteigt. Dies wird aus der Zusammenschau der Blutfluss und Temperaturdaten ersichtlich (s.Abb. 21), da sich der größte Anstieg der Oberflächentemperatur unter Setting 2 abzeichnet, während die größte und am längsten anhaltende Steigerung der kutanen Perfusion jedoch vor allem in 6 bis 8 mm Hauttiefe unter Setting 3 und 4 zu verzeichnen ist. Der

Temperaturanstieg unter S3 und S4 fällt im Mittel 0,5°C geringer aus, als unter Setting 2. In der profunden Schicht von 6 bis 8 mm sollte sich der Temperatureffekt zudem weitestgehend relativieren, da es dort durch den Konvektionsstrom des Blutes zu einer größeren Wärmedistribution kommt, als in der 1 bis 2 mm tiefen Hautschicht, welche direkt der Bestrahlung ausgesetzt ist. Zudem absorbieren die Melanozyten des Stratum basale den Großteil des blauen Lichtes, sodass die darunter liegende Schicht in 6 bis 8 mm Tiefe weniger direkte Strahlungsenergie erhält und sich somit nicht so stark aufheizen dürfte. Aufgrund des unterschiedlichen Melaningehalt einzelner Hauttypen, war es daher auch von Interesse zu ermitteln, ob die Vasodilatation durch 453 nm bei Leuten mit höherer Hauttypeneinstufung nach Fitz-Patrick gegebenenfalls stärker ausfällt, da mehr Strahlungsenergie absorbiert wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass dunklere Hauttypen (III-V) aufgrund der Ausbildung eines tyrosinaseabhängigen Proteinkomplexes, welcher mit einer länger anhaltenden Tyrosinaseaktivität im Rahmen des *Raper-Mason-Reaktionswegs* der Melaninproduktion *[140]* mit einer länger anhaltenden Hyperpigmentierung auf die Bestrahlung mit blauem Licht reagieren, als hellere Hauttypen [141]. Auch bei unseren Messungen wurde der Melaningehalt vor und nach Bestrahlung gemessen. Bei einem Probanden (Hauttyp V) konnte eine über 2 Wochen anhaltende Hyperpigmentierung nach 453 nm mit 50 J/cm^2 beobachtet werden. Bezogen auf die Temperaturverhältnisse kommt in der apikalen Schicht in 1 bis 2 mm Hauttiefe der kühlende Effekt durch die Verdunstungskälte des Schweißes zu tragen [142], welcher jedoch durch die Befestigung der Thermometersonde unter dem Pflaster und die dadurch gehemmte Evaporation vermindert sein dürfte. Insgesamt zeigte sich jedoch auch in 1 bis 2 mm Hauttiefe der größte Durchblutungsanstieg unter dem gepulstem Setting 3, während sich die höchste Oberflächentemperatur und auch das stärkste Wärmeempfinden unter Setting 2 zu verzeichnen waren, was für einen temperaturunabhängigen Mechanismus der NO-induzierten Vasodilatation sprechen würde.

Um die gesteigerte kutane Perfusion genauer in Relation zum kutanen NO-Gehalt der Haut setzten zu können, sollte initial vor jeder Bestrahlung eine Messung der kutanen NO-Metabolite auf der Haut durchgeführt werden. In zahlreichen, aufwendigen

Messreihen wurde versucht, den NO-Gehalt auf der Haut mittels Auswaschen in PBS zu bestimmen, um diesen vor und nach Irradiation mit 453 nm messen zu können. Durch das blaue Licht könnte es durch Photodissoziation des im Schweiß enthaltenen NO_2 oder aber durch Abbau kutaner NO-Speicher und Diffusion des NO aus der Haut in die Lösung zu einer Zu- bzw. Abnahme der NO-Konzentration kommen. Dazu wurden mit 1 ml PBS gefüllte Falcons für eine Minute auf die Haut der Probanden aufgesetzt, um anschließend den durch Diffusion in die Lösung übergegangenen Gehalt an NO-Metaboliten in der Lösung mittels CLD zu messen. Leider führte diese Methode zu sehr niedrig ausfallenden und stark schwankenden NO-Werten. Zudem zeigten sich nicht nur interindividuell zwischen den Probanden, sondern auch intraindividuell bei repetitiven NO-Messungen unbestrahlter Haut eines Probanden an derselben Stelle so große Differenzen der lokalen NO-Konzentrationen, dass die gemessenen Konzentrationsunterschiede vor und nach Irradiation in Relation dazu nicht verwertbar waren (s. Abb. 41 im Anhang). Eine alternative Methode zur Messung des aus der Haut diffundierenden NO unter 453 nm wäre die Bestrahlung der Haut unter einer luftdichten Kammer, welche mit NO als inertem Trägergas durchströmt und an eine CLD angeschlossen wird [12]. Dies konnte jedoch aus zeittechnischen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht zusätzlich durchgeführt werden. Aufgrund der zuvor beschriebenen thermisch induzierten NO-Freisetzung, wäre es jedoch sinnvoll, die NO- Emission unter blauem Licht der verschiedenen Settings aus Hautproben mit und ohne Zugabe von NOS-Inhibition wie L-NIO (0,5 mM) oder L-NMMA (1mM) zu messen [143]. So könnte der enzymunabhängige NO-Anteil aus kutanen NO-Speichern durch Subtraktion des thermisch induzierten via NOS synthetisierten Anteils annäherungsweise ermittelt werden. Denkbar wäre dazu die direkte Bestrahlung von Hauthomogenaten mit 453 nm in einem an die CLD angeschlossenen Glaskolben unter NOS Inhibition, um den rein nicht enzymatisch induzierten Anteil an NO messen zu können. Aufgrund der Annahme, dass die aktive Vasodilatation jedoch wie zuvor beschrieben ein bis dato noch nicht vollständig aufgeschlüsselter, komplexer Regelkreis mit vielen Stellgliedern zu sein scheint, käme dies jedoch auch nur einer Annäherung gleich.

1.3.8 Temperaturkontrolle Föhntest

Da die Durchführung der Messung von NO-Metaboliten in Hauthomogenisaten unter 453 nm in einem CLD-Kolben aus materialtechnischen Gründen nicht durchführbar war, wurde alternativ eine Temperaturkontrolle der Blutflussmessungen mit einem Föhn durchgeführt. Der Versuchsablauf glich dem der Bestrahlungsversuche. Die Haut des Unterarmes wurde für 15 Minuten geföhnt, statt bestrahlt, alle fünf Minuten wurden Temperatur und Blutfluss gemessen bis zu einer Gesamtdauer von 30 Minuten. Da die Föhnkontrollen erst nachträglich durchgeführt wurden waren leider nicht mehr alle Probanden greifbar, sodass dieselbe n-Zahl wie bei den Bestrahlungsversuchen leider nicht erreicht wurde. Um die Ergebnisse des Blutflussanstieges unter dem Föhn wirklich mit denen unter 453 nm vergleichen zu können, wäre es sinnvoll gewesen diese Kontrolle bei allen Probanden von Anfang an durchzuführen. Trotzdem zeigte sich ein Trend zu schneller wieder abfallenden Blutflusswerten in der geföhnten Haut, verglichen mit den Blutflusswerten nach der Bestrahlung. Dies könnte ein Hinweis auf die Anreicherung kutaner Speicherformen des NO unter dem blauen Licht sein, welche für einen länger erhöhten Blutfluss nach der Bestrahlung im Vergleich zur rein thermisch induzierten Vasodilatation sprechen würden.

1.3.9 Individuelles Ansprechen der kutanen Perfusion unter 453 nm

Insgesamt zeigte sich ein sehr inhomogenes Ansprechen der einzelnen Probanden auf die Bestrahlung mit 453 nm. Die intraindividuellen Unterschiede in der Reagibilität könnten durch externe Faktoren, wie beispielsweise die Nahrungsaufnahme oder den Schweißgehalt auf der Haut bedingt sein. Zwar wurde ein kurzer Fragebogen erhoben, jedoch wurde keine genaue Messung der Schweißkonzentration auf der Haut vor der Bestrahlung oder eine genaue Lebensmittelanalyse durchgeführt. Zudem fiel auf, dass unter dem kontinuierlichen Licht mehr Probanden mit keiner oder sogar einer Abnahme der kutanen Durchblutung reagierten. Unter den gepulsten Settings zeigten sich dagegen mehr Leute mit positivem und weniger Probanden mit negativem Ansprechen auf das blaue Licht. Daher wäre ein gepulster Modus einem kontinuierlichem vorzuziehen, um die Chance auf ein positives Ansprechen zu erhöhen.

12. Anstieg der Sauerstoffsättigung unter 453 nm

Die Sauerstoffsättigung konnte unter allen Settings des 453 nm blauen Lichtes gesteigert werden. Im Gegensatz zu den Blutflusswerten zeigte sich dabei der größte Anstieg der SO_2 jedoch unter Setting 2 gefolgt von Setting 4, statt unter Setting 3 und die Steigerung der SO_2 fiel prozentual geringer aus, als der Anstieg der kutanen Perfusion. Die Abfolge der Settings im Sinne der größten Steigerung der Sauerstoffsättigung (S2 (58 mW/cm2) > S4 (50mW/cm2) > Setting 3 (50mW/cm2) >S1 (34 mW/cm2)) könnte eine positive Korrelation zu der Strahlungsintensität des 453 nm Lichtes vermuten lassen. Interessant ist die Tatsache, dass die Sauerstoffsättigung trotz Anstieg der Hauttemperatur und somit vorliegender Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve des Hämoglobin vor allem in 1 bis 2 mm Tiefe ansteigt, obwohl eigentlich vermehrt Sauerstoff ans Gewebe abgegeben werden müsste. Da jedoch unter 453 nm und der NO vermittelten Vasodilatation, dass Sauerstoffangebot im Gewebe gesteigert ist, ohne das ein größerer Sauerstoffbedarf in der Haut herrscht, könnte dies den temperaturinduzierten zu erwartenden Abfall der SO_2 ausgleichen. Während NO in vitro mit Desoxy-Hb eine Häm-Eisen-Nitrosyl-Verbindung eingeht (Hem-Fe(II)-NO), entsteht in Verbindung mit Oxy-Hb Nitrat [54]. In hypoxischen Geweben vermittelt NO jedoch über die Bildung von SNO-Hb die hypoxische Vasodilatation und somit die bedarfsgerechte Regulation des Gefäßtonus im kapillären Endstromgebiet. Fraglich wäre, in welchem Konformationszustand sich das Hämoglobin unter 453 nm in der Haut befindet. Die Reaktivität der ßCys93 Gruppen ist abhängig von der Quartärstruktur des Hämglobin-Tetramers, welches die Entstehung von SNO-Hb in der in der Oxy-Hb Form (R-Form) begünstigt. In der desoxy-Hb Form (T-Form), somit bei gesteigertem O_2-Bedarf im Gewebe, kann das SNO-Hb als NO-Donor fungieren. Da vermehrt NO unter 453 nm freigesetzt wird und bei gesteigerter kutaner Perfusion bei gleichbleibendem O_2 Bedarf wahrscheinlich trotz Temperaturanstieg vorwiegend Oxy-Hb vorliegt, müsste es vermehrt zur Entstehung von SNO-Hb kommen. Da die Ausbildung von SNO-Hb vom Oxygenierungsstatus abhängig ist, stellt es eine Speicherfunktion für NO im Blut dar und könnte systemisch als NO-Donor in hypoxischen Geweben fungieren. Daher wäre eine Bestrahlung der Haut nicht nur lokal wirksam, sondern könnte durch Anreicherung der

vom Oxygenierungszustand abhängigen NO-Speicher die Autoregulation des Blutflusses in hypoxischen Geweben verbessern und somit gezielt wirksam sein. Dies könnte einen Ansatzpunkt für die Behandlung von Krankheitsbildern mit gestörter Mikrozirkulation bieten, wie sie beispielsweise im Rahmen der endothelialen Dysfunktion bei Diabetes mellitus vorliegt. Bei diabetischer Neuropathie kommt es zur Eröffnung arteriovenöser Shunts mit Ausschaltung des dahinter liegenden Kappillargebietes und verminderter Sauerstoffversorgung der Gewebe. Da der endothelialen Dysfunktion bei Diabetes mellitus eine verminderte NO Bioaktivität durch verminderte Aktivität der endothelialen und neuronalen NOS zugeschrieben wird, könnte neben einer Steigerung der enzymatischen Aktivität auch eine vermehrte, nicht enzymatische NO Freisetzung durch Anreicherung der kutanen und vaskulären NO Speicher durch blaues Licht zur gezielten Verbesserung der Perfusionsverhältnisse führen [144].

Die Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff wird nicht nur durch den Sättigungsgrad des Hb, sondern auch durch die NO vermittelte Steigerung der Mikrozirkulation determiniert wird. Da diese beiden Größen über die vom Oxygenierungsgrad abhängige Ausbildung von SNO-Hb miteinander korrelieren, wäre eine Korrelation der SO_2 Werte unter 453 nm bezogen auf die einzelnen Modalitäten (Setting 1-4), mit denen der Blutflusswerte zu erwarten. Warum die kutane Perfusion unter dem gepulsten Setting 3 am größten ausfällt, während die SO_2 jedoch eher proportional zur Strahlungsintensität zu sein scheint bleibt unklar. Denkbar wäre zum einen der zuvor beschriebene Einfluss der Impulsfrequenz des 453 nm Licht auf die kutane Transnitrosierungskaskade. Zum anderen könnte es sein, dass sich die Daten bei einer größeren Kohorte angleichen würden, da in dieser Arbeit nur Ergebnisse von 13 Probanden vorliegen. Der Einfluss der Temperatur auf die SO_2 unter 453 nm scheint, trotz der Verminderung der Bindungsaffinität des Hb für O_2 nicht von alleiniger Bedeutung zu sein, da die SO_2 unter Setting 2 am größten ausfällt, obwohl dort die Temperatur am stärksten ansteigt. Im Hinblick auf einen therapeutischen Nutzen würde man das Lampensetting verwenden wollen, welches einerseits lokal zur größten Durchblutungssteigerung führt, somit eher das gepulste Setting 3. Für systemische Effekte im Sinne einer Anreicherung der kutanen und vaskulären RSNO würde man das Setting verwenden wollen, bei dem Hb

in R-Form vorliegt. Da die Bindungsaffinität des Hämoglobin mit zunehmender Sättigung ansteigt, bis alle 4 Bindungsstellen besetzt sind, dürfte die gesteigerte SO_2 unter 453 nm bedeuten, dass der Großteil des Hämoglobin in der Oxy-Hb Form vorliegt, sodass sich SNO-Hb ausbilden kann. Im Hinblick auf die Anreicherung des vaskulären NO-Speichers wäre daher die Verwendung von Setting 2 vorzuziehen.

13. Messung der NO-Metabolite in Hauthomogenisaten aus mit 453 nm bestrahlter Haut

Insgesamt wurden verschiedene Methoden zur Erstellung eines Homogenisates getestet. Die Ergebnisse des NO Gehaltes der unterschiedlichen Proben variierten stark und waren nicht reproduzierbar. Ein Grund für die unterschiedlichen Konzentrationen an NO-Metaboliten in den Hauthomogenisaten könnte in der Verarbeitungsweise der Haut liegen. So war es aus zeittechnischen Gründen teilweise notwendig, die Hautzuschnitte zunächst bei -80 °C zu lagern, um die sehr zeitintensiven Messungen der NO-Konzentrationen der Hauthomogenisate an einem anderen Tag durchführen zu können. Zwar wurde die Haut unmittelbar nach der Bestrahlung in Gewebskästchen bei -80 °C eingefroren und auch während des Zuschneidens und Erstellen des Homogenisat kontinuierlich gekühlt und abgedunkelt, dennoch könnte durch die sehr aufwendige und zeitintensive Herstellung ein Teil des flüchtigen NO verloren gegangen sein. Paunel hatte ihre Proteinmessungen damals mittels Western-Blot durchgeführt, während wir das BCA-Proteinassay verwendeten. Das zugehörige Programm erstellt eine Konzentrationskurve anhand der Eichprobe, welche mittels des Kits erstellt wird (s. S. 36). Bei mehrfachen Messungen unterschiedlicher Homogenisate von unterschiedlichen Hautproben und Tagen konnten jedoch repetitiv nur Werte im μg/ml-Bereich gemessen werden. In dem Paper von 2006 wird beschrieben, dass das Homogenisat auch ohne NEM und EDTA angesetzt werden kann, sobald die Messungen sofort im Anschluss durchgeführt werden [19]. Da die mit diesem Homogenisat gemessenen NO-Mengen jedoch wesentlich geringer ausfielen, als die von Paunel gemessenen, könnte dies durch die Abwesenheit des NEM bedingt sein. Ohne die Alkylierung der Thiolgruppen durch das NEM kann es zu Transnitrosylierungsreaktionen in dem Gemisch kommen,

welches die Messwerte negativ beeinflusst, da dadurch weniger NO aus RSNO frei wird und via CLD detektiert werden kann [12].

14. Freisetzung von NO aus nitrosierter BSA-Lösung

Da es wie zuvor beschrieben bei den reinen Blutflussmessungen zur Interferenz der thermisch induzierten mit der nichtenzymatischen NO Freisetzung kommt und eine Messung der kutanen NO-Derivate vor und nach Irradiation anhand der Auswaschmethode in PBS und auch in bestrahlten Hauthomogenaten nicht möglich war, wurde der Gehalt des freiwerdenden NO aus nitrosierter BSA Lösung unter 453 nm mittels CLD gemessen. Bei diesem in vitro Versuch konnte die alleinige Potenz der einzelnen Lampensettings in ihrer Fähigkeit RSNO zu spalten untersucht werden, ohne dass eine zusätzliche Aktivität zu einer zusätzlichen NO-Freisetzung führte. Aufgrund der Lagerung des bei dem ersten Versuch direkt verwendeten BSA bei - 80°C bis zum zweiten Versuch, könnte der verminderte initiale Gehalt an NO-Metaboliten bei der zweiten Versuchsdurchführung eventuell durch den Auftauprozess bedingt sein, obwohl dieser in abgedunkelten Falcons erfolgte. Dies lässt die Stabilität der RSNO hinterfragen. Auch bei den Versuchen zur Messung des NO Gehaltes auf der Haut fiel häufiger auf, dass die NO Werte ein und derselben Lösung über eine Zeit von ca. 30 Minuten nicht konstant waren. Die Dekomposition von RSNO hängt von vielen unterschiedlichen Einflussfaktoren wie der Temperatur, dem pH-Wert und der Anwesenheit reduzierender Agenzien oder auch bivalenter Metallionen wie bspw. Kupferionen ab [18]. Da das BSA jedoch alles in der Lösung enthaltene Kupfer komplexiert haben müsste, dürfte dies keinen Einfluss auf die Dekomposition der RSNO gehabt haben.

15. Irritationstest an humanen Keratinozyten nach 453 nm

Bei der Messung des von bestrahlten Keratinozyten sezernierten IL-1α mittels ELISA ergaben sich leider wenig aussagekräftige Messwerte im Vergleich von unbehandelter Kontrolle zu bestrahlten Proben und zur Positivkontrolle. Man könnte entweder von einem methodischen Fehler bei der Durchführung des ELISA ausgehen, welcher alle

Werte betrifft oder von einer nicht funktionierenden Positivkontrolle. Als Positivkontrolle für den Irritationstest nach 453 nm an humanen Keratinozyten wurde 8 N NaOH verwendet, welche normalerweise eine Irritation der Zellen induzieren müsste. Die 8 N NaOH wurde zuvor für einen anderen Versuch angesetzt und war ordnungsgemäß mit Datum versehen und verschlossen. Allerdings wurde vor Verwendung kein pH-Test durchgeführt. Wäre die Natronlauge selbst neu angesetzt worden, hätte die Positivkontrolle eventuell funktioniert. Ein weiteres Problem des Versuches lag in der Messung der IL-1α Konzentration. Diese wurde in dem Medium gemessen, auf welchem die Episkin während der Versuchszeit nach Bestrahlung inkubiert wurde. Daher hätte beim Befüllen der Wells mit dem Assay-Medium sehr darauf geachtet werden müssen, dass jede Episkin auf exakt 1,5 ml Assay Medium platziert wird, damit die gemessenen IL-1α Konzentrationen valide gemessen werden können. Da die IL-1α-Werte der bestrahlten Proben teilweise höher, teils niedriger ausfallen, als die der unbehandelten Brutschrankkontrolle, wirken die gemessenen Werte eher zufällig und zeigen keine Konsistenz im Hinblick auf die Behandlung oder die Applikation von NO_2. Leider war eine erneute Durchführung aus Zeit und Materialmangel (Assay-Medium) nicht mehr möglich.

16. Adverse Effekte des blauen Lichtes auf die Haut

In den Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass blaues Licht im Vergleich zu UVA-Licht weniger toxisch ist und weniger DNA-Strangbrüche induziert [40]. Wir konnten in dieser Arbeit erstmals anhand eines validierten Episkin-Models zeigen, dass unter Bestrahlung mit 453 nm blauen LED´s keine Irritation oder Korrosion auftritt. Es konnte gezeigt werden, dass keine vermehrten Apoptosen unter 453 ablaufen. Im Hinblick auf einen therapeutischen Nutzen wurde humane Vollhaut dreimalig an einem Tag bestrahlt ohne dass sich danach vermehrte DNA-Strangbrüche fluoreszenzmikroskopisch nachweisen ließen. Weiterführend wäre jedoch noch die Messung kutaner reaktiver Stickoxide wie Peroxy ($ONOO^-$) [145] unter 453 nm in der Haut interessant, um etwaige toxische Effekte des blauen Lichtes umfassender beurteilen zu können. Ein weiterer Aspekt, welcher im Hinblick auf den therapeutischen

Nutzen einer Ganzkörperirradiation betrachtet werden sollte, ist der Einfluss auf die Kollagensynthese in der Haut. Da blaues Licht nur 1 m tief in die Haut eindringt, werden die dermalen Kollagenfasern nicht direkt beeinflusst. Die veränderten NO-Spiegel könnten jedoch die Kollagensynthese steigern. Dies wäre im Hinblick auf Verjüngungseffekte zwar wünschenswert, sollte jedoch bei dauerhaftem Gebrauch nicht zu einer Fibrosierung der Haut führen. Im Vergleich der einzelnen Lampensettings zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der induzierten Doppelstrangbrüche oder der gesteigerten/verminderten Stoffwechselaktivität.

6. Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die bereits durch Suschek und Opländer *et. al.* durchgeführten umfangreichen Arbeiten zur nicht enzymatischen NO Synthese unter blauem Licht dahin gehend ergänzt werden, dass zum einen die kutane Durchblutung, sowie die NO Freisetzungskinetik unter verschiedenen Modalitäten untersucht wird, sowie Toxizitätstests an humanen Keratinozyten durchgeführt werden. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Durchblutung der Haut unter Verwendung unterschiedlicher Modalitäten (kontinuierlich/gepulst) des blauen Lichtes gesteigert werden kann. Dabei konnte erstmalig gezeigt werden, dass dieser Durchblutungsanstieg nicht nur von der Strahlungsintensität des Lampensettings abhängt (S2: 58 mW/cm^2), sondern durch einen gepulsten Modus vergleichbarer Intensität (S3 im Mittel 50mW/cm^2, 100 mW/cm^2 im Peak) noch gesteigert werden kann. Dieser Effekt könnte durch eine unterschiedliche Freisetzungskinetik des NO aus kutanen NO Speicherformen, wie S-Nitrosothiolen zu Stande kommen, da bei Verwendung des gepulsten Lichtes mehr Strahlungsenergie (J/cm^2) im Peak zur Spaltung dieser Verbindungen in vivo vorliegt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine positive Reagibilität auf das blaue Licht im Sinne einer Durchblutungssteigerung bei einem gepulsten Setting bei einer größeren Anzahl von Probanden gegeben ist. Unter kontinuierlichem Licht zeigten mehr Probanden keine Reaktion auf die Bestrahlung als unter gepulstem blauen Licht. Neben der Durchblutungssteigerung wurde auch der Einfluss des blauen Lichtes auf die

Sauerstoffsättigung des Hämoglobin untersucht. Dabei zeigte sich keine eindeutige Korrelation von Blutflussanstieg und Sättigungsanstieg im Hinblick auf das Lampensetting des 453 nm Lichtes. Im Hinblick auf einen therapeutischen Nutzen des blauen Lichtes zur Anreicherung der kutanen und intravaskulären NO Speicher würden wir in Anbetracht unserer Ergebnisse die Verwendung eines gepulsten Modus mit einer mittleren Intensität von 50 mW/cm^2 und einer Peakintensität von 100m mW/cm^2 empfehlen, da sich hierunter der größte Blutflussanstieg bei geringerer Wärmeentwicklung zeigte. Aktuell wird vielseitig auf dem Gebiet des NO-Metabolismus geforscht, da eine verminderte NO Biosynthese an der Pathophysiologie vieler Krankheitsbilder beteiligt ist, wie beispielsweise erektiler Dysfunktion oder Diabetes mellitus. Daher wird intensiv an der Herstellung neuer Pharmaka geforscht, welche als NO-Donoren fungieren. Silicea-Nanopartikel könnten beispielsweise als NO-Donoren fungieren [146].

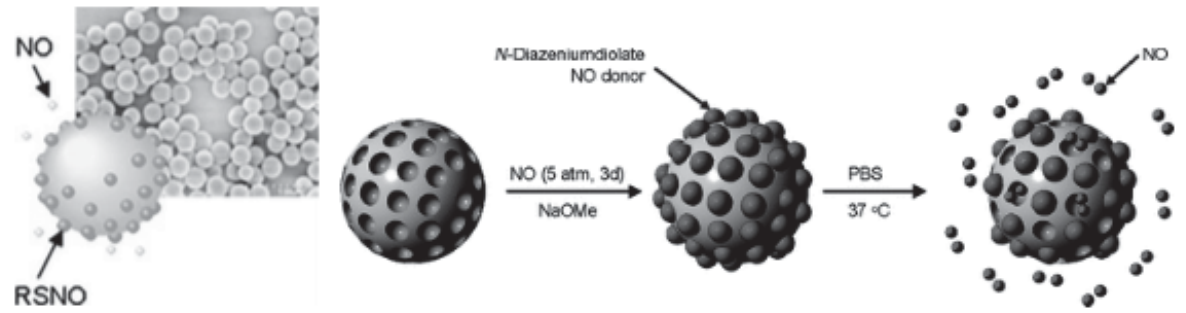


Abb. 39: Silicea Partikel fungieren als RSNO Donoren, (Quelle: Dorado et al., *Nitrosation of Aminothiones and Decomposition of S-nitroso Species*, in *Faculty of Engeneering and Built Environment* 2015)

Neben diesen pharmakologischen Ansetzten würde auch der Einsatz von blauem Licht einen Therapieansatz bei vielen verschiedenen Krankheitszuständen bieten. Die Firma Phillips hat beispielsweise eine Blaulichtquelle zum Einsatz bei psoriatischen Plaques entwickelt und forscht an den Einsatzmöglichkeiten der Blaulichttherapie bei muskulären Verspannungen. Für diabetische Patienten mit diabetischem Fußsyndrom wurde ein Blaulichtfußbad entwickelt. Die Ganzkörperbestrahlung mit blauem Licht könnte eine

Möglichkeit bieten der endothelialen Dysfunktion als Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse vorzubeugen, sie zu behandeln und gegebenenfalls die medikamentöse Therapie bei Hypertonie reduzieren zu können. Wir konnten zeigen, dass ein solcher therapeutischer Einsatz keine relevanten zytotoxischen Effekte mit sich bringt. Trotz jahrelanger Forschung ist die Gesamtheit des komplexen NO Metabolismus und seiner physiologischen Wirkungen bis dato noch nicht erschlossen. Molekulare Mechanismen, wie beispielsweise die kutane Translokation des NO oder die Aufschlüsselung der einzelnen RSNO, welche die physiologischen Effekte des NO vermitteln, stellen spannende neue Forschungsthemen dar und bieten Ansätze für neue therapeutische Möglichkeiten.

Literaturverzeichnis

1. Zhao, Y., P.M. Vanhoutte, and S.W. Leung, *Vascular nitric oxide: Beyond eNOS.* J Pharmacol Sci, 2015. **129**(2): p. 83-94.

2. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.* Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.

3. Furchgott, R.F., *The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide.* JAMA, 1996. **276**(14): p. 1186-8.

4. Maki-Petaja, K.M., et al., *Inducible nitric oxide synthase activity is increased in patients with rheumatoid arthritis and contributes to endothelial dysfunction.* Int J Cardiol, 2008. **129**(3): p. 399-405.

5. Luscher, T.F., et al., *[Endothelial dysfunction and nitrogen monoxide (NO; nitric oxide)].* Internist (Berl), 1997. **38**(5): p. 411-9.

6. Goligorsky, M.S., et al., *A pivotal role of nitric oxide in endothelial cell dysfunction.* Acta Physiol Scand, 2000. **168**(1): p. 33-40.

7. Stallmeyer, B., et al., *The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization.* J Invest Dermatol, 1999. **113**(6): p. 1090-8.

8. Schwentker, A., et al., *Nitric oxide and wound repair: role of cytokines?* Nitric Oxide, 2002. **7**(1): p. 1-10.

9. Bruch-Gerharz, D., T. Ruzicka, and V. Kolb-Bachofen, *Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease - a review.* Arch Dermatol Res, 1998. **290**(12): p. 643-51.

10. Knowles, R.G. and S. Moncada, *Nitric oxide synthases in mammals.* Biochem J, 1994. **298 (Pt 2)**: p. 249-58.

11. Forstermann, U., et al., *Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions.* Hypertension, 1994. **23**(6 Pt 2): p. 1121-31.

12. Suschek, C.V., A. Paunel, and V. Kolb-Bachofen, *Nonenzymatic nitric oxide formation during UVA irradiation of human skin: experimental setups and ways to measure.* Methods Enzymol, 2005. **396**: p. 568-78.

13. van Faassen, E.E., et al., *Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology.* Med Res Rev, 2009. **29**(5): p. 683-741.

14. Ehrreich, S.J. and R.F. Furchgott, *Relaxation of mammalian smooth muscles by visible and ultraviolet radiation.* Nature, 1968. **218**(5142): p. 682-4.

15. Stamler, J.S., et al., *Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7674-7.

16. Jia, L., et al., *S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control.* Nature, 1996. **380**(6571): p. 221-6.

17. Stamler, J.S., et al., *S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(1): p. 444-8.

18. Singh, R.J., et al., *Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols.* J Biol Chem, 1996. **271**(31): p. 18596-603.

19. Suschek, C.V., et al., *Nitrite, a naturally occurring precursor of nitric oxide that acts like a 'prodrug'.* Biol Chem, 2006. **387**(5): p. 499-506.

20. Oplander, C., et al., *Mechanism and biological relevance of blue-light (420-453 nm)-induced nonenzymatic nitric oxide generation from photolabile nitric oxide derivates in human skin in vitro and in vivo.* Free Radic Biol Med, 2013. **65**: p. 1363-77.

21. Kroncke, K.D. and C.V. Suschek, *Adulterated effects of nitric oxide-generating donors.* J Invest Dermatol, 2008. **128**(2): p. 258-60.

22. Oplander, C., et al., *Dermal application of nitric oxide in vivo: kinetics, biological responses, and therapeutic potential in humans.* Clin Pharmacol Ther, 2012. **91**(6): p. 1074-82.

23. Ablon, G., *Phototherapy with Light Emitting Diodes: Treating a Broad Range of Medical and Aesthetic Conditions in Dermatology.* J Clin Aesthet Dermatol, 2018. **11**(2): p. 21-27.

24. Williams, S.B., et al., *Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.* J Am Coll Cardiol, 1996. **27**(3): p. 567-74.

25. Assmann, T.S., et al., *Nitric oxide levels in patients with diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis.* Nitric Oxide, 2016. **61**: p. 1-9.

26. Matoshvili, M., et al., *The role of nitric oxide in the pathogenesis and severity of psoriasis.* Georgian Med News, 2014(234): p. 61-4.

27. Numao, N., et al., *Roles of attenuated neuronal nitric-oxide synthase protein expression and accelerated arginase activity in impairing neurogenic relaxation of corpus cavernosum in aged rabbits.* BJU Int, 2007. **99**(6): p. 1495-9.

28. Bush, P.A., et al., *Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum.* J Urol, 1992. **147**(6): p. 1650-5.

29. Schaffer, M.R., et al., *Nitric oxide metabolism in wounds.* J Surg Res, 1997. **71**(1): p. 25-31.

30. Subczynski, W.K., M. Lomnicka, and J.S. Hyde, *Permeability of nitric oxide through lipid bilayer membranes.* Free Radic Res, 1996. **24**(5): p. 343-9.

31. Murad, F., *The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication.* Recent Prog Horm Res, 1994. **49**: p. 239-48.

32. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium.* Lancet, 1987. **2**(8567): p. 1057-8.

33. Li, H. and U. Forstermann, *Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease.* J Pathol, 2000. **190**(3): p. 244-54.

34. Dubey, R.K., E.K. Jackson, and T.F. Luscher, *Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin1 receptors.* J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 141-9.

35. Vita, J.A., *Endothelial function.* Circulation, 2011. **124**(25): p. e906-12.

36. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease.* N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.

37. Panza, J.A., et al., *Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension.* N Engl J Med, 1990. **323**(1): p. 22-7.

38. Endemann, D.H. and E.L. Schiffrin, *Endothelial dysfunction.* J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(8): p. 1983-92.

39. Bruch-Gerharz, D., T. Ruzicka, and V. Kolb-Bachofen, *Nitric oxide in human skin: current status and future prospects.* J Invest Dermatol, 1998. **110**(1): p. 1-7.

40. Opländer, C., et al., *Mechanism and biological relevance of blue-light (420-453 nm)-induced nonenzymatic nitric oxide generation from photolabile nitric oxide derivates in human skin in vitro and in vivo.* Free Radic Biol Med, 2013. **65**: p. 1363-77.

41. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier.* Exp Dermatol, 2008. **17**(12): p. 1063-72.

42. McGrath, J.A., R.A.J. Eady, and F.M. Pope, *Anatomy and Organization of Human Skin*, in *Rook's Textbook of Dermatology*. 2008, Blackwell Publishing, Inc. p. 45-128.

43. Tsatmali, M., J. Ancans, and A.J. Thody, *Melanocyte function and its control by melanocortin peptides.* J Histochem Cytochem, 2002. **50**(2): p. 125-33.

44. Sachdeva, S., *Fitzpatrick skin typing: applications in dermatology.* Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2009. **75**(1): p. 93-6.

45. Murrell, W., *NITRO-GLYCERINE AS A REMEDY FOR ANGINA PECTORIS.* The Lancet, 1879.

46. Ka Bian, M., PhD;1 and P.F.M. Marie-Françoise Doursout, MD, PhD1, *Vascular System: Role of Nitric Oxide in Cardiovascular Diseases.* THE JOURNAL OF CLINICAL HYPERTENSION, 2008. **10**.

47. Murad, F., *Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system.* Adv Pharmacol, 1994. **26**: p. 19-33.

48. Arnold, W.P., et al., *Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3′:5′-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**(8): p. 3203-3207.

49. Furchgott, R.F., *The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide.* Jama-Journal of the American Medical Association, 1996. **276**(14): p. 1186-1188.

50. Lowenstein, C.J. and S.H. Snyder, *Nitric oxide, a novel biologic messenger.* Cell, 1992. **70**(5): p. 705-707.

51. Geeves, M.A. and K.C. Holmes, *Structural mechanism of muscle contraction.* Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 687-728.

52. Münzel, T., et al., *Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by cyclic guanosine 3′, 5′-cyclic monophosphate–dependent protein kinase.* Circulation, 2003. **108**(18): p. 2172-2183.

53. Rongli Zhang, D.T.H., Zhaoxia Qian, Alfred Hausladen, Fabio Fonseca, Ruchi Chaube, James D. Reynolds, Jonathan S. Stamler, *Hemoglobin βCys93 in cardiovascular function.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, May 2015. **112 (20)**: p. 6425-6430.

54. Singel, D.J. and J.S. Stamler, *Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: the role of nitric oxide and S-nitrosohemoglobin.* Annu Rev Physiol, 2005. **67**: p. 99-145.

55. Stamler, J.S., J.D. Reynolds, and D.T. Hess, *Letter by Stamler et al Regarding Article, "Nitrite and S-Nitrosohemoglobin Exchange Across the Human Cerebral and Femoral Circulation: Relationship to Basal and Exercise Blood Flow Responses to Hypoxia".* Circulation, 2017. **135**(24): p. e1135-e1136.

56. Williams, A.R.B.a.D.L.H., *The Physiological Role of Nitric Oxide.* Chem. Soc. Rev., 1993. **22**: p. 233-241.

57. Knott, A.B. and E. Bossy-Wetzel, *Nitric oxide in health and disease of the nervous system.* Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(3): p. 541-54.

58. Stamler, J.S., *Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide.* Cell, 1994. **78**(6): p. 931-6.

59. Gaston, B., *Nitric oxide and thiol groups.* Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 323-33.

60. Kroncke, K.D., et al., *Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. **200**(2): p. 1105-10.

61. Suschek, C.V., et al., *Even after UVA-exposure will nitric oxide protect cells from reactive oxygen intermediate-mediated apoptosis and necrosis.* Cell Death Differ, 2001. **8**(5): p. 515-27.

62. Kroncke, K.D., K. Fehsel, and V. Kolb-Bachofen, *Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where?* Nitric Oxide, 1997. **1**(2): p. 107-20.

63. Szabo, E., et al., *Peroxynitrite production, DNA breakage, and poly(ADP-ribose) polymerase activation in a mouse model of oxazolone-induced contact hypersensitivity.* J Invest Dermatol, 2001. **117**(1): p. 74-80.

64. Shukla, A., A.M. Rasik, and R. Shankar, *Nitric oxide inhibits wounds collagen synthesis.* Mol Cell Biochem, 1999. **200**(1-2): p. 27-33.

65. Kahn, N.N., et al., *Nitric oxide: the "second messenger" of insulin.* IUBMB Life, 2000. **49**(5): p. 441-50.

66. Kolb-Bachofen, V., A. Kuhn, and C.V. Suschek, *The role of nitric oxide.* Rheumatology (Oxford), 2006. **45 Suppl 3**: p. iii17-9.

67. Kroncke, K.D., K. Fehsel, and V. Kolb-Bachofen, *Inducible nitric oxide synthase in human diseases.* Clin Exp Immunol, 1998. **113**(2): p. 147-56.

68. Weller, R., et al., *Nitric oxide release accounts for the reduced incidence of cutaneous infections in psoriasis.* J Am Acad Dermatol, 1997. **36**(2 Pt 1): p. 281-2.

69. Burnett, A.L., *The role of nitric oxide in erectile dysfunction: implications for medical therapy.* J Clin Hypertens (Greenwich), 2006. **8**(12 Suppl 4): p. 53-62.

70. Palmer, J.H. and C.G. Ramsey, *Triethanolamine trinitrate (metamine) in the treatment of angina pectoris; a preliminary report.* Can Med Assoc J, 1951. **65**(1): p. 17-9.

71. Nathan, C., *Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells.* FASEB J, 1992. **6**(12): p. 3051-64.

72. Paunel, A.N., et al., *Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms.* Free Radic Biol Med, 2005. **38**(5): p. 606-15.

73. Shimizu, Y., et al., *Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in normal human skin: expression of endothelial-type and inducible-type nitric oxide synthase in keratinocytes.* J Dermatol, 1997. **24**(2): p. 80-7.

74. Forstermann, U. and H. Kleinert, *Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1995. **352**(4): p. 351-64.

75. Furchgott, R.F., *Endothelium-derived relaxing factor: Discovery, early studies, and identification as nitric oxide.* Bioscience Reports, 1999. **19**(4): p. 235-251.

76. Cortese-Krott, M.M., et al., *Zinc regulates iNOS-derived nitric oxide formation in endothelial cells.* Redox Biol, 2014. **2**: p. 945-54.

77. Hallemeesch, M.M., et al., *NO production by cNOS and iNOS reflects blood pressure changes in LPS-challenged mice.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(4): p. E871-5.

78. Deliconstantinos, G., V. Villiotou, and J.C. Stravrides, *Release by ultraviolet B (u.v.B) radiation of nitric oxide (NO) from human keratinocytes: a potential role for nitric oxide in erythema production.* Br J Pharmacol, 1995. **114**(6): p. 1257-65.

79. Toda, N., T. Imamura, and T. Okamura, *Alteration of nitric oxide-mediated blood flow regulation in diabetes mellitus.* Pharmacol Ther, 2010. **127**(3): p. 189-209.

80. Matsunaga, K. and R.F. Furchgott, *Interactions of light and sodium nitrite in producing relaxation of rabbit aorta.* J Pharmacol Exp Ther, 1989. **248**(2): p. 687-95.

81. Rassaf, T., P. Kleinbongard, and M. Kelm, *The L-arginine nitric oxide pathway: avenue for a multiple-level approach to assess vascular function.* Biol Chem, 2006. **387**(10-11): p. 1347-9.

82. Heiss, C., et al., *Plasma nitroso compounds are decreased in patients with endothelial dysfunction.* J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(3): p. 573-9.

83. Suschek, C.V., et al., *The presence of nitrite during UVA irradiation protects from apoptosis.* FASEB J, 2003. **17**(15): p. 2342-4.

84. Broillet, M.C., *S-nitrosylation of proteins.* Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(8-9): p. 1036-42.

85. Girard, P. and P. Potier, *NO, thiols and disulfides.* FEBS Lett, 1993. **320**(1): p. 7-8.

86. Bradley, S.A. and J.R. Steinert, *Characterisation and comparison of temporal release profiles of nitric oxide generating donors.* Journal of Neuroscience Methods, 2015. **245**: p. 116-124.

87. Tsikas, D., et al., *S-Transnitrosylation of albumin in human plasma and blood in vitro and in vivo in the rat.* Biochim Biophys Acta, 2001. **1546**(2): p. 422-34.

88. Opländer, C., et al., *Whole body UVA irradiation lowers systemic blood pressure by release of nitric oxide from intracutaneous photolabile nitric oxide derivates.* Circ Res, 2009. **105**(10): p. 1031-40.

89. Fisher, G.J., et al., *Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light.* N Engl J Med, 1997. **337**(20): p. 1419-28.

90. Varani, J., et al., *Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin.* J Invest Dermatol, 2000. **114**(3): p. 480-6.

91. Morliere, P., A. Moysan, and I. Tirache, *Action spectrum for UV-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts.* Free Radic Biol Med, 1995. **19**(3): p. 365-71.

92. Niziolek, M., W. Korytowski, and A.W. Girotti, *Chain-breaking antioxidant and cytoprotective action of nitric oxide on photodynamically stressed tumor cells.* Photochem Photobiol, 2003. **78**(3): p. 262-70.

93. Suschek, C.V., C. Oplander, and E.E. van Faassen, *Non-enzymatic NO production in human skin: effect of UVA on cutaneous NO stores.* Nitric Oxide, 2010. **22**(2): p. 120-35.

94. Schreier, W.J., et al., *Thymine dimerization in DNA is an ultrafast photoreaction.* Science, 2007. **315**(5812): p. 625-9.

95. Melnikova, V.O. and H.N. Ananthaswamy, *Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer.* Mutat Res, 2005. **571**(1-2): p. 91-106.

96. Iwasaki, K., M. Izawa, and M. Mihara, *UV-induced apoptosis in rat skin.* J Dermatol Sci, 1996. **12**(1): p. 31-5.

97. Rastogi, R.P., et al., *Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair.* J Nucleic Acids, 2010. **2010**: p. 592980.

98. Gillardon, F., et al., *Calcitonin gene-related peptide and nitric oxide are involved in ultraviolet radiation-induced immunosuppression.* Eur J Pharmacol, 1995. **293**(4): p. 395-400.

99. Medizintechnik, L., *The O2C Device.* 2016.

100. Feelisch, M., et al., *Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo.* FASEB J, 2002. **16**(13): p. 1775-85.

101. Oplander, C. and C.V. Suschek, *The role of photolabile dermal nitric oxide derivates in ultraviolet radiation (UVR)-induced cell death.* Int J Mol Sci, 2012. **14**(1): p. 191-204.

102. Cleveland, W.S., *Robust Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots.* Journal of the American Statistical Association, 1979. **Vol. 74, No. 368.** : p. 829-836.

103. Forstermann, U., et al., *Isoforms of nitric-oxide synthase: purification and regulation.* Methods Enzymol, 1994. **233**: p. 258-64.

104. Nathan, C.F. and J.B. Hibbs, *Role of Nitric-Oxide Synthesis in Macrophage Antimicrobial Activity.* Current Opinion in Immunology, 1991. **3**(1): p. 65-70.

105. Warren, J.B., *Nitric oxide and human skin blood flow responses to acetylcholine and ultraviolet light.* FASEB J, 1994. **8**(2): p. 247-51.

106. Lee, P.C., et al., *Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice.* Am J Physiol, 1999. **277**(4 Pt 2): p. H1600-8.

107. Stuehr, D.J. and C.F. Nathan, *Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells.* J Exp Med, 1989. **169**(5): p. 1543-55.

108. Burney, S., et al., *The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite.* Mutat Res, 1999. **424**(1-2): p. 37-49.

109. Lepoivre, M., et al., *Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide.* Biochem Biophys Res Commun, 1991. **179**(1): p. 442-8.

110. Gruetter CA , B.B., McNamara DB , Gruetter DY , Kadowitz PJ , Ignarro L and J.o.C.N. Research, *Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine.* Journal of Cyclic Nucleotide Research 1979. **5(3)**: p. 211-224.

111. Schulz , J.G., *Identifikation des Glykosylphosphatidylinositol-verankerten Heparan Sulfat Proteoglykans Glypikan als Toxizitäts-vermittelndem Rezeptor für Beta-Amyloid der Alzheimer´schen Krankheit in der neuronalen PC12 Zellinie.* 1998.

112. Idan, C., et al., *IL-1alpha is a DNA damage sensor linking genotoxic stress signaling to sterile inflammation and innate immunity.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 14756.

113. Dinarello, C.A., *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 519-50.

114. Gan, S.D. and K.R. Patel, *Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay.* J Invest Dermatol, 2013. **133**(9): p. e12.

115. Chelmowski, R., et al., *A case study on biological activity in a surface-bound multicomponent system: the biotin-streptavidin-peroxidase system.* J Phys Chem A, 2007. **111**(49): p. 12295-303.

116. Josephy, P.D., T. Eling, and R.P. Mason, *The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates.* J Biol Chem, 1982. **257**(7): p. 3669-75.

117. Alepee, N., et al., *Sub-categorisation of skin corrosive chemicals by the EpiSkin reconstructed human epidermis skin corrosion test method according to UN GHS: revision of OECD Test Guideline 431.* Toxicol In Vitro, 2014. **28**(2): p. 131-45.

118. Spielmann, H., et al., *The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the Skin Integrity Function Test.* Altern Lab Anim, 2007. **35**(6): p. 559-601.

119. Ethics, E.S., *Epi Skin Skin Corrosion Assay.* 2016.

120. Fentem, J.H., et al., *The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team.* Toxicol In Vitro, 1998. **12**(4): p. 483-524.

121. Kandarova, H., et al., *Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431.* Toxicol In Vitro, 2006. **20**(5): p. 547-59.

122. Alepee, N., et al., *The usefulness of the validated SkinEthic RHE test method to identify skin corrosive UN GHS subcategories.* Toxicol In Vitro, 2014. **28**(4): p. 616-25.

123. Laver, J.R., T.M. Stevanin, and R.C. Read, *Chemiluminescence Quantification of NO and Its Derivatives in Liquid Samples.* 2008. **436**: p. 113-127.

124. Kellogg, D.L., Jr., et al., *Nitric oxide and cutaneous active vasodilation during heat stress in humans.* J Appl Physiol (1985), 1998. **85**(3): p. 824-9.

125. Kellogg, D.L., Jr., et al., *Nitric oxide and receptors for VIP and PACAP in cutaneous active vasodilation during heat stress in humans.* J Appl Physiol (1985), 2012. **113**(10): p. 1512-8.

126. Wong, B.J. and C.G. Hollowed, *Current concepts of active vasodilation in human skin.* Temperature (Austin), 2017. **4**(1): p. 41-59.

127. Berridge, M.V. and A.S. Tan, *Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction.* Arch Biochem Biophys, 1993. **303**(2): p. 474-82.

128. Westphal, W.H., *Optik und allgemeine Strahlungslehre*, in *Physik: Ein Lehrbuch*. 1943, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 457-566.

129. Abaskharon, R.M. and F. Gai, *Direct measurement of the tryptophan-mediated photocleavage kinetics of a protein disulfide bond.* Phys Chem Chem Phys, 2016. **18**(14): p. 9602-7.

130. Al-Sa'doni, H. and A. Ferro, *S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs.* Clin Sci (Lond), 2000. **98**(5): p. 507-20.

131. Wedmann, R., I. Ivanovic-Burmazovic, and M.R. Filipovic, *Nitrosopersulfide (SSNO(-)) decomposes in the presence of sulfide, cyanide or glutathione to give HSNO/SNO(-): consequences for the assumed role in cell signalling.* Interface Focus, 2017. **7**(2): p. 20160139.

132. Opländer, C., et al., *Dermal application of nitric oxide releasing acidified nitrite-containing liniments significantly reduces blood pressure in humans.* Nitric Oxide, 2012. **26**(2): p. 132-40.

133. Pant, J., et al., *Tunable Nitric Oxide Release from S-Nitroso-N-acetylpenicillamine via Catalytic Copper Nanoparticles for Biomedical Applications.* ACS Appl Mater Interfaces, 2017. **9**(18): p. 15254-15264.

134. Heck, D.E., **NO, RSNO, ONOO-, NO+, *NOO, NOx--dynamic regulation of oxidant scavenging, nitric oxide stores, and cyclic GMP-independent cell signaling.* Antioxid Redox Signal, 2001. **3**(2): p. 249-60.

135. Heikal, L., G.P. Martin, and L.A. Dailey, *Characterisation of the decomposition behaviour of S-nitrosoglutathione and a new class of analogues: S-Nitrosophytochelatins.* Nitric Oxide, 2009. **20**(3): p. 157-65.

136. Liu, T., et al., *Local and systemic vasodilatory effects of low molecular weight S-nitrosothiols.* Free Radic Biol Med, 2016. **91**: p. 215-23.

137. Romero-Graillet, C., et al., *Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis.* J Clin Invest, 1997. **99**(4): p. 635-42.

138. Charkoudian, N., *Mechanisms and modifiers of reflex induced cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans.* Journal of Applied Physiology, 2010. **109**(4): p. 1221-1228.

139. R. ERDL, W.S., R. GROTSCH, Y. AGISHI*, A. SCHUH, J. MAGYAROSY, *Kältevasokonstriktion, Kältedilatation und reaktive Hyperämie der Haut, dargestellt anhand der Laser-Doppler-Flußmessung.* Z. Phys. Med. Baln. Med. Klim. 16 (1987) 94-98, 1986: p. 94 ff.

140. D'Mello, S.A., et al., *Signaling Pathways in Melanogenesis.* Int J Mol Sci, 2016. **17**(7).

141. Regazzetti, C., et al., *Melanocytes Sense Blue Light and Regulate Pigmentation through Opsin-3.* J Invest Dermatol, 2018. **138**(1): p. 171-178.

142. Nielsen, B., *Thermoregulation in rest and exercise.* Acta Physiol Scand Suppl, 1969. **323**: p. 1-74.

143. Paunel, A., *Biologische Relevanz der nicht-enzymatischen Stickstoffmonoxid-Generierung in der*

menschlichen Haut, in *Aus dem Institut für Molekulare Medizin, Forschungsgruppe Immunbiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*. 2006, Heinrich Heine Universität: Düsseldorf.

144. Riad, A., et al., *Enhancement of endothelial nitric oxide synthase production reverses vascular dysfunction and inflammation in the hindlimbs of a rat model of diabetes.* Diabetologia, 2008. **51**(12): p. 2325-32.

145. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.* Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 315-424.

146. Dorado, J.B., *Nitrosation of Aminothiones and Decomposition of S-nitroso Species*, in *Faculty of Engeneering and Built Environment* 2015, The Universitiy of New Castle.

IV. Anhang

• Ergänzende Abbildungen

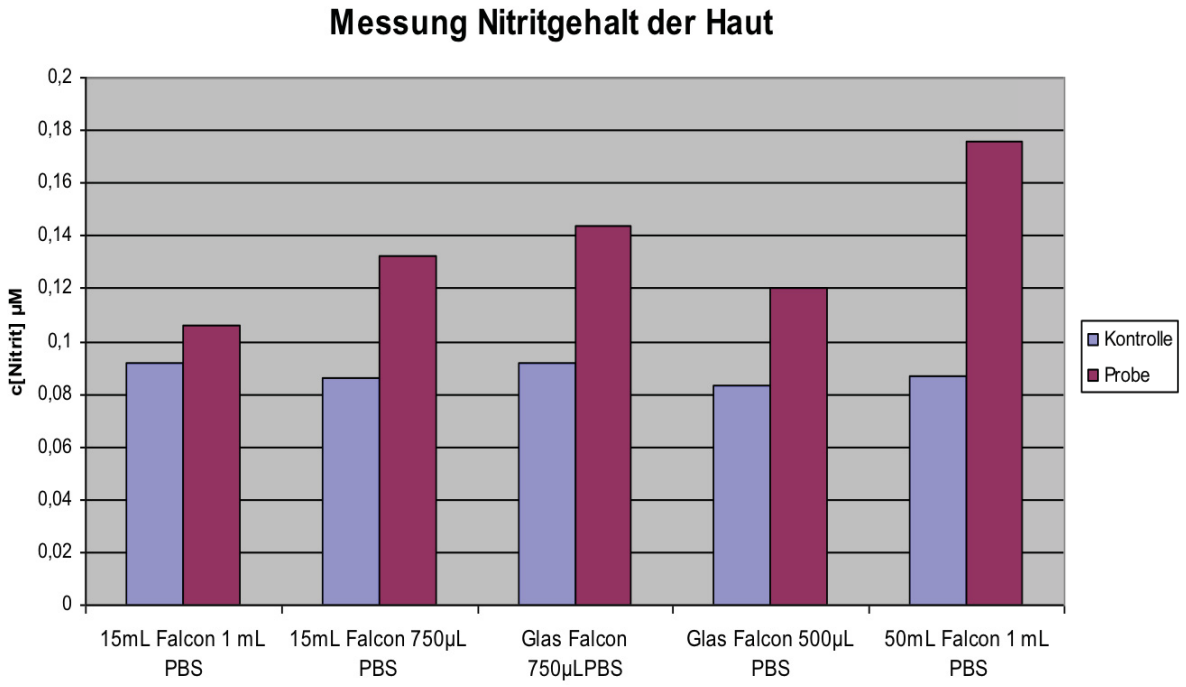


Abb. 40: Messung des Nitritgehalt der Haut

Darstellung des Nitritgehaltes der Haut mittels verschiedener Gefäße und Flüssigkeitsvolumina (PBS) nach einer Minute Hautkontakt (= Probe), sowie als Kontrolle nach einer Minute Latenz im Gefäß ohne Hautkontakt mittels CLD Detektion der freigesetzten NO Mengen in ppb und Errechnung des Nitritgehaltes als AUC.

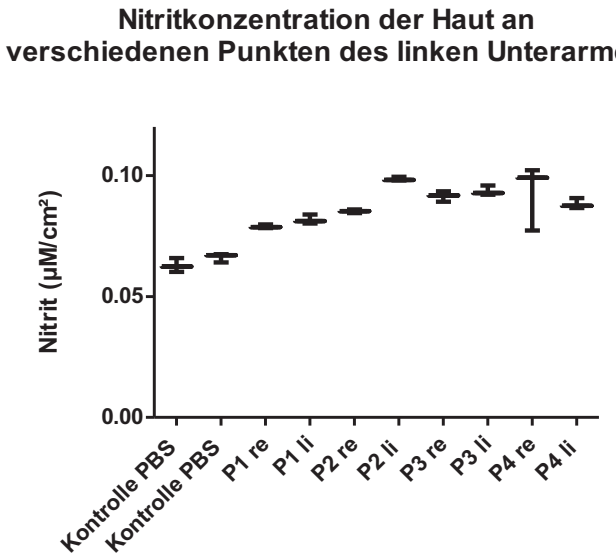


Abb. 41: Nitritkonzentration in 1 ml PBS nach 1 Minute Hautkontakt

Darstellung des Nitritgehaltes der PBS-Lösung (NO_2 in $\mu M/cm^2$) nach einer Minute Hautkontakt, die Errechnung erfolgte nach Messung der NO Freisetzung aus der PBS-Lösung mittels CLD (NO in ppb) als *Area under the curve* (AUC) mit dem Programm OriginLab

- **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Histologischer Schnitt durch die humane Epidermis,.....3

Abb. 2: Die NO induzierte Relaxation glatter Muskelzellen durch Aktivierung der enzymatischen cGMP-Synthese.....6

Abb. 3: Aufbau der Kalzium-Calmodulin (CaM) abhängigen NOS.....11

Abb. 4: NO-Freisetzung aus Lösungen mit SNO-Albumin (NO-S-alb) (5 μM in PBS, pH 7,4), sowie aus/Kupfer-Lösungen (10 μM $NaNO_2$/10 μM $CuCl_2$) unter Bestrahlung mit 420 nm und 453 nm.....15

Abb. 5: Episkin von Skin Ethics,.....24

Abb. 6: Humane Hautexplantate zur Bestrahlung mit 453 nm, ...25

Abb. 7: „O2C“ von Lea MedizinTechnik, ...26

Abb. 8: Messprinzip des O2C; 27

Abb. 9: CLD-Aufbau zur Messung von NO und RSNO in nitrosiertem BSA während und nach Bestrahlung mit 453 nm blauem LED-Licht;.....39

Abb. 10: Reduktion von MTT zu Formazan [111].....43

Abb. 11: Der Anstieg der kutanen Durchblutung während und nach 15-minütiger Bestrahlung mit 453 nm blauem LED-Licht 4 verschiedener Modi.....51

Abb. 12: Der Anstieg der kutanen Durchblutung unter 453 nm blauem Licht mit und ohne Umsetzten des Pflasters zur Kontrollmessung.....53

Abb. 13: Der Anstieg der kutane Durchblutung während und nach 15-minütiger Bestrahlung mit 453 nm blauem LED-Licht.....55

Abb. 14: relativer Blutflussanstieg unter Bestrahlung mit 453 nm in Vielfachen des Ausgangswertes, ...56

Abb. 15: Verlauf des relativen Blutflussanstiegs während und nach 15-ütiger Bestrahlung mit 453 nm in 1 bis 2 mm Hauttiefe.....59

Abb. 16: Verlauf des relativen Blutflussanstiegs unter Bestrahlung mit blauem LED-Licht der Wellenlänge 453 nm in 1 bis 2 mm Hauttiefe, Vergleich der gepulsten Settings 3 und 4 61

Abb. 17: Verlauf des relativen Blutflussanstiegs über die Zeit während Bestrahlung mit blauem LED-Licht der Wellenlänge 453 nm in 6 bis 8 mm Hauttiefe 63

Abb. 18: Verlauf des relativen Blutflussanstiegs unter Bestrahlung mit blauem LED-Licht der Wellenlänge 453 nm in 6 bis 8 mm Hauttiefe 65

Abb. 19: Reaktion der einzelnen Probanden auf Bestrahlung mit 453 nm der Settings 1-4 67

Abb. 20: Temperaturanstieg während und nach 15-minütiger Bestrahlung mit 453 nm; 69

Abb. 21: Zusammenschau von relativem Blutflussanstieg und Temperaturanstieg während und nach 15-minütiger Bestrahlung mit 453 nm blauem LED-Licht 70

Abb. 22: Temperaturkontrolle zum Blutflussanstieg unter 453 nm mittels Föhn, ... 73

Abb. 23: Anstieg der Sauerstoffsättigung unter Bestrahlung mit blauem LED-Licht der Wellenlänge 453 nm in der superfizialen und der profunden Hautschicht..... 75

Abb. 24: Prozentualer Anstieg der SO_2 unter Bestrahlung mit blauem LED-Licht der Wellenlänge 453 nm in der superfizialen und der profunden Hautschicht..... 76

Abb. 25: relativer Anstieg der Sauerstoffsättigung (SO_2) und der Temperatur unter 453 nm blauem Licht..... 79

Abb. 26: NO-Metabolite in Hauthomogenisaten nach 15 Minuten Bestrahlung mit 453 nm Licht; 81

Abb. 27: Anti-S-Nitroso/Anti-Albumin Immunhistochemie an bestrahlten humanen Vollhautexplantaten; 84

Abb. 28: Vollhaut nach dreimaliger Bestrahlung für 15 Minuten mit 453 nm blauem LED-Licht, ... 87

Abb. 29: Kinetik der NO-Freisetzung aus nitrosiertem BSA unter blauem Licht,..... 89

Abb. 30: Abnahme der NO-Metabolite in RSNO-BSA-Lösung unter 453 nm,..... 91

Abb. 31:Zellviabilität der Keratinozyten nach 15 und 30 Minuten unter 453 nm;..... 93

Abb. 32: Stoffwechselaktivität nach 60 Minuten 453 nm verschiedener Intensitäten, ... 96

Abb. 33: IL-1α Konzentration im Inkubationsmedium nach 60 Minuten 453 nm, ... 97

Abb. 34: Test auf Korrosion an Keratinozyten nach 60 Minuten 453 nm 99

Abb. 35: Apoptotische Ereignisse in den Keratinozyten der Episkin nach 60-minütiger Bestrahlung mit 453 nm 101

Abb. 36: Anteil apoptotischer Keratinozyten mit positivem TUNEL-Signal nach Bestrahlung mit 453 nm, ... 102

Abb. 37: Die kutane Transmigration von NO – ein theoretisches Modell, ... 109

Abb. 38: NO vermittelte Vasodilatation im Rahmen der Thermoregulation,..... 114

Abb. 39: Silicea Partikel fungieren als RSNO Donoren, (Quelle: Dorado et al., *Nitrosation of Aminothiones and Decomposition of S-nitroso Species*, in *Faculty of Engeneering and Built Environment* 2015)..... 124

Abb. 40: Messung des Nitritgehalt der Haut..... 138

Abb. 41: Nitritkonzentration in 1 ml PBS nach 1 Minute Hautkontakt..... 139