Kutane Effekte von Zigarettennebenstrom

in vitro und in vivo

Etablierung geeigneter Konditionen (*in vitro* und *in vivo*) und Evaluierung der Effekte auf HaCaT-Zellen mittels Neutralrotfreisetzungstest sowie der Effekte auf die Hautphysiologie mittels biophysikalischer Messmethoden

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg aus dem Institut für gewerblich technische Wissenschaften, Studiengang Kosmetik und Körperpflege

vorgelegt von Maren Kemper Hamburg 2007 Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2000 bis Mai 2006 unter der Leitung von Prof. Dr. Kerscher im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg, Abteilung Kosmetik und Körperpflege, durchgeführt.

- 1. Gutachter:
- 2. Gutachter:

Tag der Disputation

"So geht es mit Tabak und mit Rum: erst bist du froh, dann fällst du um."

(Wilhelm Busch)

Meinen Kindern Finn und Liz

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung	1
1.1	Aufbau der Haut	1
1.1.1	Epidermis	1
1.1.1.1	Struktur des Stratum corneums	3
1.1.1.2	Lipidzusammensetzung des Stratum corneums	4
1.1.1.3	Mikrostrukturen der Stratum-corneum-Lipide	7
1.1.1.4	Barrierefunktion des Stratum corneums	9
1.1.1.5	Zusammensetzung des Hydrolipidfilms	11
1.1.2	Dermis	12
1.1.2.1	Kollagen	13
1.1.2.2	Elastin	16
1.1.2.3	Bindegewebige Grundsubstanz	17
1 2	Zigarettenrauch	18
1.2	Zusammensetzung des Zigarettenrauches	18
1.2.1	Nikotin	23
1.2.1.1	Kohlonmonovid	20
1.2.1.2	Freie Bedikele, reaktive Seuersteffenezies und exidetiver Stress	20
1.2.2	POS und Linidaerovidation	20
1.2.3	ROS und Lipidperoxidation	29
1.3	Ziel dieser Arbeit	31
2	Material und Methoden	33
	In-vitro-Untersuchungen (Teil 1 der Arbeit)	
2.1	Material zur Etablierung geeigneter Konditionen und	33
	Evaluierung der Zigarettennebenstromeffekte (in vitro)	
2.1.1	HaCaT-Zellen	33
2.1.2	Chemikalien	34
2.1.3	Zellkulturmaterialien	35
2.1.4	Zellkulturmedien	36
2.1.5	Mediumzusätze	36

2.1.6	Zubereitungen	37
2.1.7	Geräte	39
2.1.8	Expositionskammer	40
^ ^	Methoden zur Etablierung geeigneter Konditionen und	13
2.2	Evaluierung der Zigarettennebenstromeffekte (<i>in vitro</i>)	40
221		13
2.2.1	Kultur von HaCaT-Zellen	43
2212	Subkultivierung von HaCaT-Zellen	43
2213	Kryokonservierung von HaCaT-Zellen	44
2.2.1.4	Auftauen von HaCaT-Zellen	44
2.2.2	Vitalitätsuntersuchung und Zellzahlbestimmung	45
2.2.3	Mykoplasmen	46
2.2.4	Neutralrotfreisetzungstest	48
2.2.5	Statistische Auswertung der Zellkultur	49
	In-vivo-Untersuchungen (Teil 2 und Teil 3 der Arbeit)	
23	Probanden	50
2.3.1	Fin-/Ausschlusskriterien	51
2.3.2	Abbruchkriterien	51
2.4	Material zur Evaluierung der Zigarettennebenstromeffekte	52
	(in vivo)	
2.4.1	Chemikalien und Präparate	52
2.4.2	Durchführung der In-vivo-Versuche	52
2.4.2.1	Zigarettennebenstromexposition (in vivo)	53
2.4.2.2	Kohortenstudie	53
2.4.3	Geräte	54

2.5	Methoden Evaluierung der Zigarettennebenstromeffekte (in vivo)	55
2.5.1	Epidermale biophysikalische Messmethoden	55
2.5.1.1	Hautoberflächen pH-Wert	55
2.5.1.2	Stratum-corneum-Hydratation	55
2.5.1.3	Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)	56
2.5.1.4	Sebumetrie	56
2.5.2	Dermale biophysikalische Messmethoden	57
2.5.2.1	Hauttopografie	57
2.5.2.2	Elastizität	60
2.5.3	Lipidperoxid-Test	65
2.6	Statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung	67
3	Ergebnisse	68
	In-vitro-Untersuchungen (Teil 1)	
3.1	Etablierung geeigneter Konditionen	68
3.1.1	Kultivierung von HaCaT-Zellen	68
3.1.2	Zytotoxizität verschiedener SDS-Konzentrationen	71
3.2	Evaluierung der Zigarettennebenstromeffekte (in vitro)	74
3.2.1	PBS-Überstand	74
3.2.2	PH-Werte von PBS nach Zigarettenexposition	76
3.2.3	Zytotoxizität von Zigarettennebenstrom	77
3.2.4	Zytotoxizität von Zigarettennebenstrom mit SDS-Exposition	78
3.2.5	Vergleich der Zytotoxizität von SDS-Exposition vor/nach	80
	Zigarettennebenstromexposition	
	In-vivo-Untersuchungen (Teil 2 und Teil 3 der Arbeit)	
3.3	Lebensgewohnheiten der Probanden	81
3.4	Evaluierung der Zigarettennebenstromeffekte (in vivo)	82
3.4.1	Hautoberflächen-pH-Wert	82
3.4.2	Stratum-corneum-Hydratation	83
3.4.3	Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)	84
3.4.4	Lipidperoxid-Konzentration	85

3.5	Kohortenstudie	86
3.5.1	Epidermale biophysikalische Messungen	86
3.5.1.1	Hautoberflächen-pH-Wert	86
3.5.1.2	Stratum-corneum-Hydratation	91
3.5.1.3	Transepidermaler Wasserverlust	94
3.5.2	Dermale biophysikalische Messungen	97
3.5.2.1	Hauttopografie	97
3.5.2.2	Elastizität	110
3.5.3	Lipidperoxid-Konzentration	120
4	Diskussion	121
	In-vitro-Untersuchungen	
4.1	Etablierung geeigneter Konditionen in vitro	122
4.2	Zigarettennebenstromexposition in vitro	124
4.3	Vergleich der Zytotoxizität von SDS-Exposition	129
	vor und nach Zigarettennebenstromexposition	
	In-vivo-Untersuchungen	
4.4	Zigarettennebenstromexposition in vivo	131
4.5	Kohortenstudie	135
4.5.1	Epidermale Parameter	135
4.5.2	Dermale Parameter	137
4.5.3	Lipidperoxid-Konzentration	146
5	Literatur	148
6	Zusammenfassung	167
7	Abstract	169
8	Anhang	
	Veröffentlichungen	
	Danksagung	
	Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
С	Kohlenstoff
CEPA	California Environmental Protection Agency
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ECM	Extra Cellular Matrix (Extrazelluläre Matrix)
EMEM	Eagle`s Minimum Essential Medium
EPA	Environmental Protection Agency
ETS	Enviromential Tabacco Smoke
	(Zigarettenrauch in der Raumluft)
FACIT	Fibrillenassoziierte Kollagene
FKS	Fötales Kälberserum
h	Stunde
HaCaT	Human Adult Low Calcium and High Temperature
HbCO	Carboxyhämoglobin
HS	Hauptstrom (siehe auch MTS)
IARC	International Agency of Research on Cancer
ISO	Internationale Organisation für Standardisierung
LPO	Lipidperoxid
min	Minuten
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MTS	Mainstream Tabacco Smoke (Hauptstromrauch)
MMP	Matrixmetalloproteinase
NMF	Natural Moisturizing Factor
NNK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NNN	N'-Nitrosonornikotin
NS	Nebenstrom (siehe auch STS)
O ₂	Sauerstoff
pack-years	Anzahl der konsumierten Zigarettenpackungen pro Jahr

PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezie)
S	Sekunde
SC	Stratum corneum
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Lauryl (oder Dodecyl) Sulphate
	(Natriumlaurylsulfat)
SELS	Surface Evaluation of Living Skin
SPSS	Statistical Package for the Social Science
STABW	Standardabweichung
STFehler	Standardfehler
STS	Sidestream Tabacco Smoke (Zigarettenebenstromrauch)
TEWL	Transepidermal Water Loss (Transepidermaler
	Wasserverlust)
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase
TSNA	Tabakspezifische Nitrosamine
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

Abbildungsverzeichnis

Abbildung		Seite
1	Schematischer Aufbau der Epidermis	2
2	Molekülstruktur der wichtigsten Stratum-corneum-Lipide	7
3	Vereinfachte Darstellung der Anordnung einzelner Lipid-	9
	komponenten innerhalb des Bilayers der Stratum-corneum-Lipide	
4	Backstein-Mörtel-Modell	10
5	Darstellung der Dermis	12
6	Schema der Zigarettenrauchverteilung einer Zigarette	19
7	Abbauwege von Nikotin	24
8	Grafische Darstellung der Expositionskammer	40
9	Fotografische Darstellung der In-vitro-Exposition	41
10	Fotografische Darstellung der In-vivo-Exposition	42
11	Strukturformel von Neutralrot	48
12	Berechnung des Rauigkeitsfaktors SE _{sc}	58
13	Berechnung des Rauigkeitsfaktors SEr	59
14	Berechnung des Rauigkeitsfaktors SE _{sm}	59
15	Schematische Darstellung einer Cutometriemessung	61
16	Exemplarische Darstellung zweier Elastizitätsmessungen	63
17	Darstellung der chemischen Reaktion des Lipidperoxid-	65
	Detektions-Kits	
18	Fotografische Darstellung konfluenter HaCaT-Zellen (10 x)	68
19	Fotografische Darstellung konfluenter HaCaT-Zellen (20 x)	69
20	Fotografische Darstellung nicht-konfluenter HaCaT-Zellen	70
	mit Zellfortsätzen	
21	Grafische Darstellung der zytotoxischen Wirkung verschiedener	71
	SDS-Konzentrationen	
22	Grafische Darstellung der zytotoxischen Wirkung verschiedener	72
	SDS-Konzentrationen	
23	Grafische Darstellung der Differenz zwischen auf 6- und	73
	24-Loch kultivierten Zellen nach Exposition mit verschiedenen	
	SDS-Konzentrationen	
24	Grafische Darstellung der Zytotoxizität verschiedener Volumina	74
	PBS-Überstand bei Zigarettennebenstromexposition	

25	Grafische Darstellung der Zytotoxizität von 0 μ, 500 μl,	75
	1000 μl und 2000 μl PBS-Überstand bei Rauchexposition	
26	Grafische Darstellung der pH-Werte von 1 ml PBS in einer	76
	Petrischale vor und nach 15 min Zigarettennebenstromexposition	
27	Grafische Darstellung der Zytotoxizität von Zigaretten-	77
	nebenstromexposition	
28	Grafische Darstellung der Zytotoxizität von Zigaretten-	78
	nebenstromexposition mit anschließender SDS-Exposition	
29	Grafische Darstellung der Zytotoxizität von verschiedenen	79
	SDS-Konzentrationen ohne/mit anschließender Zigaretten-	
	nebenstromexposition	
30	Grafische Darstellung des Vergleichs der Zytotoxizität von	80
	0,8 mM SDS-Exposition vor und nach Zigarettennebenstrom-	
	exposition	
31	Hautoberflächen-pH-Werte vor und nach Zigaretten-	82
	nebenstromexposition im Zeitverlauf	
32	Stratum-corneum-Hydratations-Werte vor und nach	83
	Zigarettennebenstromexposition im Zeitverlauf	
33	TEWL-Werte vor und nach Zigarettennebenstrom-	84
	exposition im Zeitverlauf	
34	LPO-Werte vor und nach Zigarettennebenstrom-	85
	exposition im Zeitverlauf	
35	Vergleich der Hautoberflächen-pH-Werte von Rauchern versus	86
	Nichtrauchern	
36	Vergleich der Hautoberflächen-pH-Werte von Männern versus	87
	Frauen	
37	Vergleich der Hautoberflächen-pH-Werte von Rauchern/	88
	Nichtrauchern versus Raucherinnen/Nichtraucherinnen	
38	Vergleich der Hautoberflächen-pH-Werte von Männer	89
	verschiedener Altersgruppen und Rauchgewohnheiten	
39	Vergleich der Hautoberflächen-pH-Werte von Frauen	90
	verschiedener Altersgruppen und Rauchgewohnheiten	
40	Vergleich der Stratum-corneum-Hydratationswerte von	91
	Rauchern versus Nichtrauchern	

Stratum-corneum-Hydratationswerte von Männern	92
verschiedener Altersgruppen und Rauchgewohnheiten im	
Vergleich	
Stratum-corneum-Hydratationswerte von Frauen verschiedener	93
Altersgruppen und Rauchgewohnheiten im Vergleich	
TEWL-Werte von Männern verschiedener Altersgruppen und	95
Rauchgewohnheiten im Vergleich	
TEWL-Werte von Frauen verschiedener Altersgruppen im	96
Vergleich	
Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich	98
von Rauchern versus Nichtrauchern	
Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich	99
von Männern versus Frauen	
Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich	101
von Männern, die rauchen, mit Männern, die nicht rauchen	
Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich	105
von Frauen mit 47 Jahren und älter Raucherinnen versus	
Nichtraucherinnen	
Vergleich der statistisch signifikanten Elastizitätsparameter von	110
Rauchern mit Nichtrauchern	
Vergleich eineiiger Zwillinge mit unterschiedlichen Raucher-	121
gewohnheiten	
Strukturformel von Nikotin (3-(1-Methyl- 2-pyrrolidinyl)-pyridin)	128
Kumulativ-toxisches Hautekzem	132
	 Stratum-corneum-Hydratationswerte von Männern verschiedener Altersgruppen und Rauchgewohnheiten im Vergleich Stratum-corneum-Hydratationswerte von Frauen verschiedener Altersgruppen und Rauchgewohnheiten im Vergleich TEWL-Werte von Männern verschiedener Altersgruppen und Rauchgewohnheiten im Vergleich TEWL-Werte von Frauen verschiedener Altersgruppen im Vergleich Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Rauchern versus Nichtrauchern Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Männern versus Frauen Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Männern versus Frauen Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Männern versus Frauen Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Männern, die rauchen, mit Männern, die nicht rauchen Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Frauen mit 47 Jahren und älter Raucherinnen versus Nichtraucherinnen Vergleich der statistisch signifikanten Elastizitätsparameter von Rauchern mit Nichtrauchern Vergleich eineiiger Zwillinge mit unterschiedlichen Raucher- gewohnheiten Strukturformel von Nikotin (3-(1-Methyl- 2-pyrrolidinyl)-pyridin) Kumulativ-toxisches Hautekzem

Tabellenverzeichnis

Tabe	elle	Seite
1	Lipidzusammensetzung der lebenden Epidermis	5
2	Fettsäurezusammensetzung des Stratum corneum	6
3	Typ-I-Kollagen spaltende Metalloproteinasen (MMPs)	14
4	Vergleich von Nebenstromrauch, Hauptstromrauch und	20
	Tabakrauch in der Raumluft	
5	Überblick über einige wichtige Schadstoffe im Nebenstrom	21
	und das Verhältnis Nebenstrom und Hauptstrom	
6	Toxische und kanzerogene Substanzen in tabakrauchverun-	22
	reinigter Raumluft	
7	Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von	97
	Rauchern versus Nichtrauchern	
8	Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von	98
	Männern versus Frauen	
9	Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter des Vergleiches von	99
	Rauchern versus Raucherinnen	
10	Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von	100
	Männern, die rauchen, mit Männern, die nicht rauchen	
11	Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von	102
	Männern der Altersgruppe 1 Raucher versus Nichtraucher	
12	Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von	102
	Männern Altersgruppe 2 Raucher versus Nichtraucher	
13	Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von	103
	Frauen der Altersgruppe 3 Raucherinnen versus Nichtraucherinnen	
14	Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich der	103
	Visioscan®-Ergebnisse von Frauen Altersgruppe 1 versus Altersgruppe	e 2
15	Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von	104
	Frauen unter 47 Jahren versus Frauen mit 47 Jahren und älter	
16	Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von	105
	Frauen mit 47 Jahren und älter Raucherinnen versus Nichtraucherinne	n
17	Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von	106
	Männern der Altersgruppe 2 versus Frauen Altersgruppe 2	
18	Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von	107

	Rauchern Altersgruppe 2 versus Raucherinnen Altersgruppe 2	
19	Zusammenfassung der p-Werte der Rauigkeitsparameter R1-R5	108
20	Zusammenfassung der p-Werte der SELS-Parameter	109
21	Statistisch signifikante Ergebnisse beim Vergleich der Elastizitäts-	110
	parameter von Nichtrauchern versus Rauchern	
22	Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitäts-	111
	parameter von Nichtraucherinnen versus Raucherinnen	
23	Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitäts-	112
	parameter von Raucherinnen der Altersgruppe 1 versus Nicht-	
	raucherinnen entsprechender Altersgruppe	
24	Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitäts-	113
	parameter von Raucherinnen der Altersgruppe 3 versus Nicht-	
	raucherinnen entsprechender Altersgruppe	
25	Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitäts-	114
	parameter von Frauen der Altersgruppe 1 versus Frauen der	
	Altersgruppe 2	
26	Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitäts-	115
	parameter von Frauen der Altersgruppe 2 versus Frauen der	
	Altersgruppe 3	
27	Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitäts-	115
	parameter von Frauen der Altersgruppe 1 versus Frauen der	
	Altersgruppe 3	
28	Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitäts-	116
	parameter von Frauen unter 47 Jahren versus Frauen mit oder	
	über 47 Jahren	
29	Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitäts-	117
	parameter von Frauen, die 47 Jahren oder älter sind,	
	Raucherinnen versus Nichtraucherinnen	
30	Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitäts-	117
	parameter von Frauen unter 47 Jahren,	
	Raucherinnen versus Nichtraucherinnen	
31	Zusammenfassung der p-Werte aller Elastizitätsparameter	118
32	Zusammenfassung der pK-Werte und der Wasserlöslichkeit einiger	126
	Bestandteile des Zigarettennebenstromrauches	

1 Einleitung

Die Sehnsucht nach Gesundheit, Jugend und Schönheit besteht seit Jahrtausenden und nimmt auch in unserer modernen, westlichen Leistungsgesellschaft eine bedeutende Stellung ein. Dieser Wunsch erscheint nicht unbegründet, zumal verschiedene Studien darauf hinweisen [Adams *et al.* 1975; Kligman *et al.*1989], dass attraktive und gut aussehende Menschen distinkte soziale Vorteile (sowohl im Privat- als auch im Berufsleben) gegenüber subjektiv als weniger anziehend wahrgenommene Menschen erlangen, wobei diese Wirkungen auch auf ältere Menschen zutreffen, denen es gelingt, ein jüngeres Aussehen zu erhalten. Glatte, reine Haut und volles, glänzendes Haar gehören zu den begehrtesten Attributen der Attraktivität und repräsentieren das augenfälligste Merkmal für Jugend und Gesundheit. Die Haut als ein wesentliches Kommunikationsorgan des Menschen tritt nicht nur zu ihrer Umwelt in Kontakt, sondern auch zu ihren Mitmenschen und setzt sich somit ihrer Beurteilung aus.

1.1 Aufbau der Haut

Die Haut stellt die äußere Begrenzung des menschlichen Körpers zu seiner Umwelt dar und bildet mit einer Gesamtfläche von 1,5 bis 2 m² sein größtes Organ [Jung *et al.* 1995]. Histologisch lässt sich die Haut in drei Schichten – Subkutis, Dermis (Kutis) und Epidermis – unterteilen. Von besonderem Interesse für die Aufgabenstellung und Zielsetzung dieser Arbeit sind die beiden oberen Schichten der Haut: Die Epidermis, da sie aufgrund ihrer Lokalisation in Wechselwirkung mit der Umwelt steht, und die Dermis, da sich in diesem Bereich der Hautschicht die entscheidenden Veränderungen während der intrinsischen, aber auch der extrinsisch induzierten (durch zum Beispiel Zigarettenrauch) Hautalterungsprozesse vollziehen.

1.1.1 Epidermis

Die Epidermis ist ektodermaler Herkunft. Sie besteht zu 90 Prozent aus Keratinozyten und beherbergt zudem symbiotisch mit den Keratinozyten lebend Merkel-Zellen, Melanozyten, Langerhans-Zellen und Lymphozyten. Da sie keine Gefäße enthält, erfolgt ihre Versorgung durch Diffusion von der darunter liegenden, gefäßreichen Dermis. Es handelt sich bei der Epidermis um ein klassisches Proliferationsgewebe, das heißt, sie befindet sich im Zustand der dauernden Erneuerung. Die Keratinozyten entstehen aus den Stammzellen der Basalschicht (Stratum basale), durchwandern die gesamte Epidermis und durchlaufen dabei einen streng regulierten Differenzierungsgang (Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum) (Abb. 1). Terminal differenziert ergeben sich die funktionstragenden, nicht mehr stoffwechselaktiven Keratinozyten des Stratum corneums: die Korneozyten [Fritsch 1998].



Abb. 1: Modifizierter schematischer Aufbau der Epidermis nach Schürer et Ruzicka [1998]

1.1.1.1 Struktur des Stratum corneums

Das Endprodukt der epidermalen Differenzierung bildet das etwa 10 bis 20 μ m dicke Stratum corneum (Hornschicht). Es besteht aus 10 bis 20 Zelllagen fest kohärenter, plättchenartiger, kernloser hexogenaler Korneozyten [Mackenzie 1973], die in eine Lipidmatrix geordneter Struktur eingebettet sind. Im Inneren der Korneozyten befindet sich quervernetztes Keratin, eingelagert in eine amorphe Grundsubstanz aus zysteinund prolinreichen Proteinen [Fritsch 1998]. Anstelle der üblichen Plasmamembran werden die Korneozyten nach außen hin durch eine 7 bis 15 nm dicke Hornhülle, dem sogenannten ,Cornified Envelope', abgegrenzt. Sie besteht unter anderem aus durch Transaminasen vernetzten, glutaminreichen Proteinen wie Involucrin [Simon *et al.* 1984] und Keratolinin [Fritsch 1998], an die kovalente Lipide gebunden sind. Das ,Cornified Envelope' stellt den chemisch widerstandfähigsten Teil der Korneozyten dar.

Histologisch lässt sich das Stratum corneum in verschiedene Schichten unterteilen. Die unteren fünf bis sechs Zelllagen werden als Stratum compactum und die oberflächlichen Zelllagen als Stratum disjunctum bezeichnet. Im Stratum disjunctum nimmt die Zahl der Desmosomen (interzelluläre Haftstellen, an denen auch die Tonofilamente ansetzen) ab, wodurch der Zusammenhalt der Zellen geringer wird und die oberen Zellen leicht abgeschilfert werden können.

Betrachtet man den Wassergehalt des Stratum corneums, liegt dieser zwischen 10 und 40 Prozent [Warner *et al.* 1988], wobei ein abfallender Gradient von innen nach außen herrscht. Die innerste Zellschicht des Stratum corneums steht mit der hohen Feuchtigkeit der Zellen des Stratum granulosums, die bis zu 70 Prozent betragen kann, im Gleichgewicht, die äußerste Zellschicht meist mit der trockenen Umgebungsluft. Dieser Konzentrationsgradient führt zu einer kontinuierlichen Wasserabgabe an die Umgebungsluft, was auch als Transepidermaler Wasserverlust (TEWL) bezeichnet wird. Für den pH-Wert im Stratum corneum wird ebenfalls ein Gradient beschrieben, wobei er an der Oberfläche des Stratum corneums zwischen 4,5 und 5,5 liegt, im Inneren kontinuierlich ansteigt und in der untersten Schicht des Stratum corneums einen Wert von etwa 7 erreicht, der dem pH-Wert in der lebenden Epidermis entspricht [Turner *et al.* 1998; Öhmann *et al.* 1994].

1.1.1.2 Lipidzusammensetzung des Stratum corneums

Die Lipide im Interzellularraum des Stratum corneums machen etwa 10 bis 30 Prozent des Gesamtvolumens beziehungsweise 10 bis 15 Prozent der Gesamtmasse des Stratum corneums aus [Grayson *et* Elias 1982]. Die Synthese dieser Lipide findet in den sogenannten Odland-Körperchen (auch Keratinosomen oder ,Odland-bodies' genannt) statt. Odland-Körperchen sind ovaläre Vesikel mit einem Durchmesser von 0,1 bis 0,3 μ m, die in den Zellen des Stratum spinosums und Stratum granulosums gebildet werden. Im Inneren bestehen Odland-Körperchen hauptsächlich aus übereinander

gestapelten, abgeflachten, unilamellaren Lipidvesikeln. Kurz vor der terminalen Differenzierung der Epidermis verschmilzt die Membran der Lamellengranula mit der Zellmembran und die Lipidvesikel werden in den Interzellularraum der Grenzschicht zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum exozytiert. Sie ordnen sich dort parallel zur Zellmembran der verhornten Zellen an, wobei sie durch Schrumpfung der Korneozyten während der Verhornung näher aneinanderrücken und schließlich zu kontinuierlichen Lipidlamellen verschmelzen, die ein multilamellares System aus Lipiddoppelschichten bilden [Landmann 1986].

Während des Zelldifferenzierungsprozesses verändert sich die Lipidzusammensetzung der Epidermis grundlegend (siehe Tab. 1).

Zu den Hauptbestandteilen der Lipide des Stratum basale gehören Phospholipide, freie Fettsäuren, Cholesterol, Cholesterolderivate, Triglyzeride und Glucosylceramide beziehungsweise Ceramide, die der Gruppe der Sphingolipide zugeordnet werden; daneben findet man geringe Mengen Wachsester, Squalen und n-Alkane.

Mit fortschreitender Differenzierung nach außen nimmt der Gehalt an Ceramiden und Glucosylceramiden zu. Die Phospholipide werden schließlich nahezu vollständig katabolisiert und die Glucosylceramide deglucosyliert [Yardley *et al.* 1981; Wertz *et al.* 1989]. Die Lipide im Stratum corneum setzen sich dann hauptsächlich aus Ceramiden, Cholesterol, Cholesterolestern und freien Fettsäuren zusammen.

Lipidklasse	Stratum basale	Stratum granulosum	Stratun [Lampe 1983]	n corneum [Elias 1990] [We	ertz 1996]
1. Polare Lipide					
Phosopholipide Cholesterolsulfat	44,5 2,4	25,3 5,5	4,9 1,5	Spuren 4,0	-
2. Neutrale Lipide					
Cholesterol Freie Fettsäuren Triglyzeride Sterole und Wachsester Squalen n-Alkane 3. Sphingolipide	11,2 7,0 12,4 r 5,3 4,9 3,9	11,5 9,2 24,7 4,7 4,6 3,8	14,0 19,3 25,2 5,4 4,8 6,1	20,0 25,0 Spuren 5,0 4,0 4,0	25,0 10,0-15,0 Spuren 5,0 -
Glucosylceramide Ceramide	3,5 3,8	5,8 11,7	Spuren 18,1	- 35,0	- 50,0

Tab. 1: Lipidzusammensetzung (% m/m) der lebenden Epidermis nach Lampe *et al.* [1983] und des Stratum corneums [Lampe *et al.* 1983; Elias 1990; Wertz 1996]

Die prozentualen Angaben der einzelnen Lipide im Stratum corneum fallen je nach Autor teilweise sehr unterschiedlich aus (Tab. 1), was zum Beispiel auf die Verwendung unterschiedlicher Extraktionsmethoden und -mittel zurückgeführt werden kann. Für den schwankenden Gehalt an Triglyzeriden wird zudem eine Kontamination mit dermalen Talgdrüsenlipiden und die Mitextraktion subkutanen Fettgewebes bei der Verwendung exzidierter Haut verantwortlich gemacht [Elias 1983, Wertz *et al.* 1987]. Die Hauptursache der Variabilität der Lipidzusammensetzung besteht jedoch darin, dass die Lipide sowohl einer interindividuellen Schwankung unterworfen sind als auch eine

Abhängigkeit von der jeweiligen untersuchten Körperregion aufweisen [Lampe et al. 1983].

Betrachtet man die sehr heterogene Zusammensetzung der Stratum-corneum-Lipide, verhält sie sich im Vergleich zu Biomembranen des menschlichen Körpers sehr ungewöhnlich, da Phospholipide als Bilayer bildende Komponente nur in Spuren zu detektieren sind. Der Cholesterolanteil steigt dagegen bis zum Stratum corneum an und ist mit 20 bis 25 Prozent größer als in jeder anderen Membran. Neben dem freien Cholesterol lassen sich auch Cholesterolester finden, wobei besonders das bei Raumtemperatur flüssige Cholesterololeat während der Differenzierung akkumuliert [Wertz et al. 1987]. Das in geringen Mengen vorkommende Cholesterolsulfat wird in der Regel zu den polaren Lipiden gezählt und erreicht die höchste Konzentration in der Schicht zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum, bevor es anschließend enzymabhängig desulfatiert wird [Elias 1983]. Im Stratum corneum selbst existiert ein Konzentrationsgradient an Cholesterolsulfat mit abnehmenden Mengen in den äußeren Zellschichten und im abgeschuppten Material, weshalb ihm eine Funktion bei der Modulation des Desquamationsprozesses und der Cholesterolsynthese in der Epidermis in Form eines Rückkopplungsmechanismus zugeschrieben wird [Williams 1992]. Triglyzeride nehmen im Stratum corneum im Gegensatz zum Talg nur eine untergeordnete Stellung ein. Es kommen dagegen meist freie Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 14 bis 28 Kohlenstoffatomen (C-Atome) vor, wobei nach Lampe et al. [1983] gesättigte C16- und ungesättigte C18-Fettsäuren dominieren (Tab. 2).

Fettsäuren	C-Atome: Doppelbindungen	Menge [%]
Myristinsäure	14 : 0	3,8
Palmitinsäure	16:0	36,8
Palmitoleinsäure	16 : 1	3,6
Stearinsäure	18:0	9,9
Ölsäure	18 : 1	33,1
Linolsäure	18 : 2	12,5
Arachinsäure	20:0	0,3

Tab. 2: Fettsäurezusammensetzung (% m/m) des Stratum corneums (Bauch) nach Lampe et al. [1983]



Abb. 2: Molekülstruktur der wichtigsten Stratum-corneum-Lipide

1.1.1.3 Mikrostrukturen der Stratum-corneum-Lipide

Trotz des Fehlens der Phospholipide als physiologische Lipide von Biomembranen sind sämtliche Lipide des Stratum corneums in der Lage, ein hochgeordnetes, multilamellares System zu bilden, das den Raum zwischen den Korneozyten vollständig ausfüllt. Für die Fusion der Doppelschichten der von den Odland-Körperchen exozytierten Lipid-Scheibchen scheint die Anwesenheit von Cholesterolsulfat und freien Fettsäuren notwendig zu sein. Neubert *et al.* [2005] zeigten, dass Cholesterolsulfat für die Bildung der Stratum-corneum-Bilayes essentiell ist; als möglichen Grund hierfür wurde die benötigte Polarität diskutiert.

Im Interzellularraum zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum findet sich zusätzlich eine höhere Konzentration an Kalziumionen als intrazellulär. Wahrscheinlich verbindet ein divalentes Kalziumion zwei negativ geladene Fettsäuren beziehungsweise Cholesterolsulfatmoleküle, die sich in einander gegenüberliegenden Doppelschichten befinden, und stellt derart den engen Kontakt der Doppelschichten als Voraussetzung für die Fusion her [Landmann 1991]. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von Studien mit aus Stratum-corneum-Lipiden bestehenden Liposomen unterstützt, bei denen durch Zugabe kleiner Mengen von Kalziumionen die unilamellaren Vesikel zu multilamellaren Doppelschichtsystemen transformierten [Abraham *et al.* 1987]. Eine

Voraussetzung für die Stabilität des phospholipidfreien multilamellaren Systems im Stratum corneum besteht im Vorhandensein der Ceramide. Die Ceramide verhalten sich zwar wegen des Fehlens einer geladenen Kopfgruppe weniger polar als Phospholipide, sie sind in Anwesenheit von freien Fettsäuren und Cholesterol aber in der Lage, stabile Bilayer zu bilden, die hinsichtlich der Fluidität jedoch nicht mit anderen Biomembranen des Körpers vergleichbar sind. Mit Ausnahme des linolreichen Acylceramids (Ceramid 1) sind die Kohlenwasserstoffketten hauptsächlich gesättigt und kommen in einer geraden all-trans-Konformation vor. Sie stabilisieren insgesamt die Doppelschicht durch laterale H-Brücken der OH-Gruppen und versteifen die äußere Zone der Doppelschicht [Pascher 1976]. Durch die unterschiedlichen Kettenlängen kommt es zu einem Ineinandergreifen der Ketten im zentralen Teil des Bilayers mit einer ebenfalls daraus resultierenden Stabilisierung. Die Ceramide 2 bis 6 enthalten weiterhin keine Methyl-Seitenketten oder cis-Doppelbindungen und die trans-Doppelbindung der Sphingosinbasen stört nicht die Kettenanordnung. Das für die Stabilität wichtigste Ceramid stellt allerdings das Ceramid 1 dar, dessen Funktion innerhalb der Doppelschicht häufig mit einer molekularen Niete verglichen wird. Man nimmt an, dass die ω-Hydroxyfettsäure dieses Ceramides einen Bilayer komplett durchspannt (diskutierte Länge des Ceramids 13 nm), während die Linolsäurekette in die angrenzende Doppelschicht ragt und beide Bilaver aneinanderheftet [Neubert et al. 2005]. Der hohe Cholesterolanteil der Stratumcorneum-Lipide führt ebenfalls zu einer Stabilisierung des Systems, da Cholesterol benachbarte Fettsäureketten in eine regelmäßige Anordnung zwingt und somit die Ordnung erhöht. Die Bedeutung der Fettsäuren in dem System wird unterschiedlich diskutiert. Gesättigte Fettsäuren besitzen keine rotierenden Knicke und erhöhen die molekulare Ordnung der Doppelschicht, wobei das Auftreten von Lücken seltener wird. Ungesättigte Fettsäuren bewirken dagegen eine laterale Aufweitung der Lamelle, was zum einen eine gewisse Fluidität des Bilayers erhalten würde und zum anderen die Löslichkeit von Cholesterol innerhalb des Bilayers erhöhen könnte [Bouwstra et al. 1996].



Abb. 3: Vereinfachte Darstellung einer möglichen Anordnung der einzelnen Lipidkomponenten innerhalb des Bilayers der Stratum-corneum-Lipide [nach Neubert *et al.* 2005]

Die Abbildung 3 gibt die postulierte Anordnung der einzelnen Bestandteile innerhalb der Stratum-corneum-Lipidlamellen wieder. Ceramide, Cholesterol und freie Fettsäuren bilden in dieser Darstellung das Grundgerüst, in dem die polaren Kopfgruppen einer Schicht an die polaren Gruppen der anderen Schicht grenzen. Die unpolaren Kohlenwasserstoffketten zeigen in die jeweils entgegengesetzten Richtungen und treffen sich in der Mitte des Bilayers, wobei die unterschiedlich langen Ketten der Ceramide ineinandergreifen und die Bilayer durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen seitlich stabilisieren. Unpolare Bestandteile, etwa Wachse oder Kohlenwasserstoffketten, polare Bestandteile wie Wasser hingegen im Bereich der polaren Kopfgruppen eingebaut. Ceramid 1 ragt durch die hydrophobe Region des Bilayers und mit seiner Linolsäurekette in den angrenzenden Bilayer hinein und stabilisiert auf diese Weise das multilamellare System.

1.1.1.4 Barrierefunktion des Stratum corneums

Die Struktur des Stratum corneums wird häufig mit einer Mauer verglichen ("mortarbrick-model") [Elias 1983; Abb. 4]. Die Keratinozyten fungieren hierbei als "Ziegelsteine" für die chemische und mechanische Stabilität der Haut, während der interzellulären Lipidmatrix, dem "Mörtel", die eigentliche Barrierefunktion hinsichtlich der Wasserhomöostase und dem Eindringen fremder Substanzen zugeschrieben wird, obwohl die Lipidmatrix nur etwa 10 Prozent der Trockenmasse des Stratum corneums ausmacht.



Abb. 4: Backstein-Mörtel-Modell

Während die Korneozyten vor allem eine physikalische Barriere darstellen, schützt die lipidreiche, während des Differenzierungsweges von den Keratinozyten gebildete Interzellularsubstanz vor allen chemisch gegen von außen eindringende Substanzen und unkontrollierten Transepidermalen Wasserverlust (TEWL), wobei hier sowohl die qualitative wie auch quantitative Zusammensetzung der Lipide von großer Bedeutung ist. Die Zusammensetzung der Lipide wird auch erheblich durch Nahrungsfaktoren beeinflusst. Ein Mangel an essentiellen Fettsäuren wie Linolsäure führt beispielsweise zu einer starken Zunahme der Permeabilität des Stratum corneums mit einer fünf- bis achtfachen Erhöhung des TEWL und einer fehlerhaften Differenzierung der Korneozyten [Lowe et al. 1977; Elias et al. 1980]. Eine topische und systemische Supplementierung der fehlenden Fettsäure resultiert in einer Verbesserung der kutanen Symptome [Prottey et al. 1975; Hansen et Jensen 1985]. Für einige Hautkrankheiten des Menschen werden ebenfalls Störungen im Lipidstoffwechsel der Haut als Ursache postuliert. Paige et al. [1994] konnten zeigen, dass bei verschiedenen Formen der Ichthyose ein Mangel an bestimmten Acylceramidfraktionen zu erkennen ist, und Motta et al. [1994] beobachteten eine Veränderung in der Verteilung der Ceramide bei psoriatrischen Patienten. Eine Entfernung der Hautlipide durch Extraktion mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln führt zu einer Erhöhung der Permeabilität des Stratum corneums mit einem deutlichen Anstieg des TEWL [Smith *et al.* 1982]. Durch diese und zahlreiche andere Untersuchungen wurde die Bedeutung der interzellulären Lipide für die Barriereeigenschaften der Haut eindeutig belegt.

1.1.1.5 Zusammensetzung des Hydrolipidfilms

Das Stratum corneum ist mit einem dünnen "Hydrolipidfilm" - einer Emulsion aus Wasser (hydro) und Fett (lipos) - überzogen. Dieser Schutzfilm unterliegt einer ständigen Regeneration und Erneuerung und setzt sich zusammen aus a) Lipiden des dermalen Talgdrüsensekretes (,Talg'), b) Lipiden der Hornschicht, die an die Oberfläche gelangt sind (epidermale Lipide), c) durch die Epidermis abgegebem Wasser (perspiratio insensibilis) und d) Sekretionsprodukten der dermalen Schweißdrüsen (Wasser, organische Karbonsäuren, Aminosäuren und Salze). Die Lipide auf der Hautoberfläche, von denen 90 Prozent aus den Talgdrüsen stammen, bestehen hauptsächlich aus Squalen, Wachsestern, Triglyzeriden, Cholesterol und Cholesterolestern, wobei es darauf hinzuweisen gilt, dass den Squalen, als wichtigste Lipidkomponente des Talges, antioxidative Eigenschaften ähnlich dem a-Tocopherol zugeschrieben werden [Thiele et al. 1999]. Triglyzeride werden auf der Oberfläche der Haut teilweise durch bakterielle Lipasen in Mono- und Diglyzeride und freie Fettsäuren gespalten, die wahrscheinlich zu dem niedrigen pH-Wert beitragen. Zu den weiteren für die Aufrechterhaltung des sauren Hautoberflächen-pH-Wertes wichtige Substanzen zählen die Milchsäure, zahlreiche freie Aminosäuren, Urocaninsäure und Pyrrolidoncarbonsäure. Der saure Hydrolipidfilm auf der Hautoberfläche wird aufgrund seiner Schutzfunktion gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen auch als "Säureschutzmantel' bezeichnet. Der Säureschutzmantel schützt direkt gegen die Einwirkung alkalischer Lösungen und indirekt gegen Bakterien- und Pilzbesiedlung.

Die Zusammensetzung des Hydrolipidfilms variiert nach Alter des Individuums sowie nach Lokalisation der untersuchten Hautregion, da die epidermalen Lipide zwar nahezu konstant bleiben, im Gegensatz dazu sich die Sebumlipidproduktion jedoch stark androgen- und regionsabhängig verhält. Während die Sebumlipide nur einen geringen Einfluss auf die epidermale Barriere ausüben, konnte gezeigt werden, dass die Entfernung der epidermalen Lipide durch Extraktion mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln eine Erhöhung der Permeabilität des Stratum corneums zur Folge hat, die sich mit einem deutlichen Anstieg des TEWL bemerkbar macht [Smith *et al.* 1982].

1.1.2 Dermis

Die Dermis (Korium, ,Lederhaut') umfasst das unter der Epidermis gelegene Bindegewebe, das sich in die Tiefe bis zum subkutanen Fett erstreckt und deren Dicke in Abhängigkeit von der Lokalisation steht. Sie besteht hauptsächlich aus Fibroblasten, die in eine Matrix aus Strukturproteinen wie Kollagen Typ I und III, Elastin und einer amorphen Grundsubstanz aus wasserbindenden Mucopolysacchariden eingebettet sind. Die meisten Komponenten der dermalen Matrix werden von den Fibroblasten selbst produziert. Die Dermis beherbergt darüber hinaus die die Haut versorgenden Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven und Hautanhangsgebilde.



Abb. 5: Darstellung der Dermis: Das Stratum papillare bildet die scharfe, wellenförmige Grenze zur Epidermis. 1. Stratum papillare, 2. Basalmembran, 3. Basalzellen, 4. Epidermis [dankenswerterweise von Dr. Norbert Böder-Schlicht, Dermatologikum Hamburg, zur Verfügung gestellt] Die Dermis kann lichtmikroskopisch in eine untere (Stratum reticulare, retikuläre Dermis) und obere (Stratum papillare, papilläre Dermis) Schicht unterteilt werden, wobei die untere Schicht, die durch ein straffes geflechtartiges Bindegewebe gekennzeichnet ist, kontinuierlich in die darunter gelegene Subkutis (Unterhautfettgewebe) übergeht (Abb. 5). Das aus einem lockeren kollagenem Bindegewebe bestehende Stratum papillare bildet hingegen die scharfe, wellenförmige Grenze zur Epidermis, wodurch die Kontaktfläche zur Epidermis vergrößert und damit eine optimale Nährstoffversorgung der Basalzellen über die in den Papillarkörpern verlaufenden Blutgefäße sichergestellt wird.

Für das makroskopische Erscheinungsbild der menschlichen Haut und insbesondere auch für die Dermatokosmetik erweist sich die Dermis von entscheidender Bedeutung, da sich in dieser Hautschicht während des intrinsisch und auch extrinsisch (zum Beispiel durch Zigarettenrauch) induzierten Alterungsprozesses wesentliche Veränderungen vollziehen [Kerscher *et* Williams 2004].

1.1.2.1 Kollagen

Kollagene bilden eine Familie nah miteinander verwandter Proteine und stellen die zahlreichsten fibrillären Proteine des extrazellulären Raums dar. Das charakteristische Merkmal eines Kollagenmoleküls besteht in einer dreisträngigen Tripelhelix, die von drei identischen oder unterschiedlichen α-Ketten gebildet wird. Bisher wurden neunzehn verschiedene Kollagen-Typen in Vertebraten identifiziert, die als Typ I-XIX klassifiziert werden. Die Mitglieder der Proteinfamilie der Kollagene können nach den dreidimensionalen Strukturen, die sie ausbilden, in zwei Hauptklassen eingeteilt werden. Es wird die Unterscheidung getroffen zwischen fibrillären Kollagenen und nicht-fibrillären Kollagenen. Fibrilläre Kollagene (Typ I, II, III, V, XI) zeichnen sich durch eine lange, ununterbrochene Tripelhelix aus. Die restlichen Kollagene sind hingegen nicht in der Lage, Fibrillen zu formen; sie zeigen eine enorme strukturelle Vielfalt, verschiedenste makromolekulare Organisationen, unterschiedlichste Gewebeverteilungen sowie Funktionen. Die nicht-fibrillären Kollagene können in mehrere Gruppen gegliedert werden. Man unterscheidet zwischen netzbildenden Kollagenen (Typ IV, VIII und X), fibrillenassoziierten (FACIT) Kollagenen (zum Beispiel Typ IX, XII, XIV, XVI und XIX), die sich durch längere nicht helikale Regionen auszeichnen, sowie filamentbildendem Kollagen Typ VI und einer Gruppe aus den Kollagenen des Typs XV und XVIII. Die Moleküle des Kollagens Typ VII bilden Dimere, die sich zu Verankerungsfibrillen verbinden und Basalmembranen an das darunter liegende Bindegewebe knüpfen, während Kollagen Typ XIII ein hexagonales Gitter ausbildet. Es existieren weiterhin Kollagene (zum Beispiel Kollagen Typ XVII), die nicht sekretiert werden, sondern als Bestandteil von Hemidesmosomen eine transmembrane Domaine besitzen [Li *et al.* 1993].

Der physiologische Umbau des Kollagensystems erfolgt wie dessen pathologischer Abbau komplex reguliert durch eine Familie von Metalloenzymen, die aus einer Gruppe von mindestens achtundzwanzig zinkabhängigen Endopeptinasen, sogenannten Matrixmetalloproteinasen (MMPs), stammen. Matrixmetalloproteinasen sind für den extrazellulären Abbau von Matrixproteinen wie Kollagen, Elastin, Proteoglykanen, Laminin und Fibronektin zuständig [Berton *et al.* 2000]. An dieser Stelle wird in Form einer Kurzdarstellung (Tab. 3) auf die für die dermale Matrix wichtigsten Kollagen-Typ (Typ I) spaltenden Matrixmetalloproteinasen MMP-1, MMP-8 und MMP-13 eingegangen.

MMP-Nomenklatur	Enzym	Charakteristika
		- Wichtigstes Enzym für
MMP-1	Interstitielle Kollagenase	Kollagenmetabolismus
	(Kollagenase 1)	der menschlichen
		Haut
		- Abbau von Kollagen I,
		II und III, nicht aber IV
		- Induktion durch zum
		Beispiel UV-Licht,
		möglicherweise
		Zigarettenrauch
		- Expression vor allem
		durch Fibroblasten
		(auch von Keratino-
		zyten, Synovialzellen
		etc.)
		- Kaliziumabhängig

		- Abbau von Kollagen
MMP-8	Neutrophile Kollagenase	Тур І
		- Expression vor allem
		durch Neutrophile
MMP-13	Kollagenase-3	- Abbau von Kollagen Typ I

Tab. 3: Typ-I-Kollagen spaltende Matrixmetalloproteinasen (MMPs), modifiziert nach [Kerscher *et* Williams 2004]

Im Gegensatz zu allen anderen MMPs sind die Kollagenasen MMP-1, MMP-8, MMP-13 in der Lage, fibrilläres Kollagen an spezifischen Stellen in zwei Fragmente zu spalten. Die Bruchstücke betragen je ein Viertel und drei Viertel des Moleküls [Krane *et al.* 1996]. Bei Körpertemperatur denaturieren diese Fragmente zu Gelatine und werden dadurch den Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9), die lediglich nicht-tripel-helikale Bereiche von Kollagenen spalten können, zugänglich und schließlich degradiert [Kahari *et* Saarialho-Kere 1999].

Die Regulation der Kollagenasen gestaltet sich komplex und kann sowohl intern wie erfolgen. Externe Einflüsse, etwa ultraviolette auch extern Strahlung und Zigarettenrauch, können zu einer erhöhten Kollagenaseaktivität führen. Es konnte gezeigt werden, dass die Synthese der Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1) und MMP-2 sowie MMP-3 in dermalen Fibroblasten durch UV-Licht stimuliert wird [Herrmann et al. 1993; Brennan et al. 2003]. Auch eine Zunahme der Expression von MMP-1 und MMP-8 in Keratinozyten und Fibroblasten konnte nach UV-Exposition festgestellt werden [Fisher et al. 2001]. Bei Rauchern konnte ebenso eine höhere mRNA-Konzentration für MMP-1 im Vergleich zu Nichtrauchern ermittelt werden [Lahmann et al. 2001].

1.1.2.2 Elastin

Elastinfasern setzen sich aus Mikrofibrillenbündeln als Gerüstsubstanz und dem Protein Elastin zusammen. Der molekulare Baustein des Elastins ist eine Polypeptidkette, die wie die Polypeptidketten des Kollagens eine charakteristische Aminosäuresequenz besitzt. Die Polypeptidkette besteht vorwiegend aus kleinen, unpolaren Aminosäuren (¼ Glycin, ¼ Alanin und ¼ Valin) und ist darüber hinaus reich an der Aminosäure Prolin. Im Gegensatz zu Kollagen enthält Elastin Hydroxyprolin, kein Hydroxylysin und wenig polare Reste. Tropoelastin stellt das monomere Protein des Elastins dar. Es aggregiert zum unlöslichen Elastin, das durch Zusammenwirken mit Fibrillin Fasern bildet. Die physikalischen Grundlagen der elastischen Eigenschaft sind bislang nur ungenügend verstanden; es wird eine Schichtung von β-Faltblattstrukturen vermutet, deren hydrophobe Wechselwirkungen untereinander zwar durch Dehnung zeitweilig aufgehoben werden, sich aber nach Entlastung wieder in der alten Form ausbilden. Die 3-D-Struktur wird durch zahlreiche oxidierte Lysinreste stabilisiert, die zum Desmosin, einer für Elastin charakteristischen Strukturkomponente, quervernetzen [Stryer 1990]. Bisher ist nur ein Elastintyp bekannt; seine genaue Struktur sowie die Ursache der enormen Elastizität des Moleküls ist nach wie vor Gegenstand der Forschung.

Im Vergleich zu Kollagen besitzt Elastin nur etwa ¹/₂₅ der Festigkeit, kann aber bis auf seine zwei- bis dreifache Ausgangslänge gedehnt und bei nachlassender Spannung wieder in seine Ausgangslänge zurückgeführt werden. Um die mechanischen Eigenschaften der Haut zu gewährleisten, zeigt sich die Anordnung der bindegewebigen Fasern von Bedeutung; die elastischen Fasern sind in der Umgebung der kollagenen Fasern, die in Form eines lockeren Netzwerkes angeordnet sind, angesiedelt. Bei Überdehnung reißen elastische Fasern; da eine Neubildung nach dem Fötalleben nicht mehr möglich ist, verhalten sich diese Schäden irreversibel.

Während Typ-I-Kollagen mit einem Anteil an der dermalen Matrix von etwa 50 bis 80 Prozent des Trockengewichts die Hauptkomponente der bindegewebigen Fasern darstellt, beträgt der Elastinanteil der Haut nur 2 Prozent des Trockengewichts [Fritsch 1998]. In einigen extrakutanen Strukturen hingegen, wie der Aorta, bildet Elastin den Hauptanteil.

Die elastischen Fasern unterliegen einem sehr langsamen Um- und Abbau, der über verschiedene Enzymsysteme, wie Stromelysine, Gelatinasen, Elastasen und Serinproteasen, erfolgt [Fritsch 1998].

1.1.2.3 Bindegewebige Grundsubstanz

Die gelartige Füllsubstanz der Dermis besteht aus einem Gemisch von Glykosaminglykanen und Proteoglykanen, die trotz eines Trockengewichts der Haut von nur etwa 0,2 Prozent die Hauptkomponenten der Bindegewebsmatrix, integrierender Bestandteil der Basalmembran und der Zelloberflächen ausmachen [Fritsch 1998].

Glykosaminglykane sind unverzweigte Polysaccharide, die alternierend aus Uronsäure und Hexosamin-Anteilen aufgebaut sind, die meist kovalent an Proteine gebunden, also als Proteoglykane vorliegen. Glykosaminglykane und Proteoglykane weisen eine außerordentliche strukturelle und funktionelle Vielfalt auf und bilden aufgrund ihrer Ladungseigenschaften eine stark wasserhaltige, gelartige Grundsubstanz, in welche die Faserproteine eingebettet sind und durch die Ionen, Nährstoffe, Metabolite und Botenstoffe diffundieren können [Oldberg *et al.* 1990]. Aufgrund dieser Eigenschaften kann die dermale Grundsubstanz wichtige Aufgaben im Rahmen der Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolythaushaltes, des Gewebetugors und der viskoelastischen Eigenschaften der Haut ebenso wie eine Funktion bei Zellmigration, -differenzierung und Wundheilung übernehmen [Fritsch 1998].

Ein ubiquitäres Glykosaminoglykan der extrazellulären Matrix ist Hyaluronsäure, die neben der Wasserbindung auch für das Zellwachstum, die Membranrezeptorfunktion und Adhäsion von Wichtigkeit ist. In junger Haut kann Hyaluronsäure in der Umgebung von Kollagen- und Elastinfasern gefunden werden. Im Alter kommt es physiologisch zu einer Abnahme des Hyaluronsäuregehaltes [Ghersetich *et al.* 1994].

Es besteht ein Gleichgewicht zwischen Biosynthese und Degradation der gelartigen Grundsubstanzmoleküle, das durch Metalloproteinasen maßgeblich bestimmt wird. Der enzymatische Abbau erfolgt auch durch Enzyme wie Hyaluronidasen beziehungsweise lysosomale Glukosidasen und Sulfatasen. Dieser Abbau kann relativ schnell geschehen, insofern Hyaluronsäure eine Halbwertszeit von nur etwa drei Tagen aufweist [Firtsch 1998].

1.2 Zigarettenrauch

Der Konsum von Tabakwaren gilt als ein Risikoverhalten mit den deutlichsten Auswirkungen auf die Gesundheit der Bevölkerung [Schmidt *et al.* 2001]. Kein anderes Verhalten übt einen vergleichbar starken Einfluss auf die Gesamtsterblichkeit aus und viele Krankheiten treten als eine direkte Konsequenz aus chronischer Rauchexposition auf. Die pathologischen Effekte von Zigarettenrauch auf innere Organe, etwa die Lunge, sind im Gegensatz zur Auswirkung auf die Haut bereits gut analysiert und dokumentiert. Eine der vergleichsweise gut untersuchten Auswirkungen von Zigarettenrauch auf die Haut betrifft den vorzeitig induzierten Hautalterungsprozess [Donald *et al.* 1991; Model 1985]. Epidemiologische Untersuchungen weisen darauf hin, dass Tabakrauch ein Faktor darstellt, der unabhängig vom Lebensalter und von der Sonnenexposition zur Hautalterung beiträgt [Yin *et al.* 2001]. Starke Raucher (> 50 *pack-years*) tragen im Gegensatz zu Nichtrauchern ein 4,7fach höheres Risiko, frühzeitig Falten zu entwickeln [Gross *et al.* 2003]. Als *,pack-years*' wird das Produkt aus der Anzahl der Raucherjahre und der gerauchten Zigarettenschachteln pro Tag bezeichnet. Mit steigender Anzahl der *pack-years* stieg in dieser Studie das Risiko für eine vorzeitige Faltenbildung.

1.2.1 Zusammensetzung des Zigarettenrauches

Zigarettenrauch, der durch Pyrolyse von Tabak entsteht, setzt sich aus dem vom Raucher inhalierten Hauptstromrauch (HS, *mainstream*, MS) und dem zwischen den Zügen unter geringerer Hitze entweichenden Nebenstromrauch (NS, *sidestream*, SS) zusammen. Im Gegensatz zum Hauptstromrauch entsteht der Nebenstromrauch als Produkt der unvollständigen Verbrennung, da durch das langsame Abglimmen gegenüber dem aktiven Anziehen niedrigere Temperaturen auftreten und weniger Sauerstoff verbraucht wird. Diese Ströme unterscheiden sich daher in ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung sowie in der daraus resultierenden Toxizität (Abb. 6 und Tab. 4). Nebenstromrauch enthält aufgrund der unvollständigen Verbrennung Kanzerogene in bis zu hundertfach höherer Konzentration als Hauptstromrauch. Der Hauptstromrauch erfährt zudem eine Filterung durch Tabakstab und Zigarettenfilter (siehe auch Tab. 5).



Abb. 6: Schema der Zigarettenrauchverteilung einer Zigarette; modifiziert nach [Lüth 2002]

Der Tabakrauch in der Raumluft (*Environmental Tabacco Smoke'*, ETS) setzt sich zu 85 Prozent aus dem Nebenstromrauch, der sich allerdings relativ schnell in der Raumluft verdünnt, und zu 15 Prozent aus exhaliertem Hauptstromrauch zusammen, wobei die Lunge hier wie ein guter Filter wirkt.

Die ausgeatmeten Partikel des Hauptstromrauchs fügen dem gesamten Tabakrauch in der Raumluft – je nach gemessener Komponente – einen Anteil von 1 bis 43 Prozent der Bestandteile hinzu [Baker *et al.* 1990]. Der größte Teil des Tabakrauchs in der Raumluft besteht jedoch aus den Substanzen des Nebenstromrauchs [Witschi *et al.* 1997]. Der Nebenstromrauch enthält fast alle gasförmigen und über die Hälfte der partikelförmigen Komponenten des Tabakrauchs in der Raumluft [CEPA 1997; EPA 1993].

In Tabelle 4 werden die wesentlichen Unterschiede zwischen Nebenstrom-, Hauptstromund Tabakrauch in der Raumluft zusammengefasst:

	Nebenstromrauch	Hauptstromrauch	Tabakrauch in der
	(NS)	(HS)	Raumluft (ETS)
Entstehung	Entsteht beim Glimmen	Wird von dem Raucher	Setzt sich aus dem
	der Zigarette	inhaliert	vom Raucher
	(Zugpause)		exhalierten Rauch und
			dem Nebenstromrauch
			zusammen
Temperatur	400-600 °C	700-900 °C	
Verbrennung	Unvollständige	Vollständige	
	Verbrennung	Verbrennung	
Prozentualer Anteil	Circa 85 % des	Circa 15 % des	
	Zigarettenrauchs	Zigarettenrauchs	
Toxizität	Aufgrund der	Weniger toxisch, auch	Geringere Toxizität, da
	unvollständigen	da er durch Tabakstab	die Konzentrationen
	Verbrennung	und Zigarettenfilter	der schädigenden
	Kanzerogene in bis zu	gefiltert wird	Stoffe im exhalierten
	100facher		Rauch sehr gering
	Konzentration des HS		ausfallen, weil die
			Lunge wie ein guter
			Filter wirkt und sie im
			Nebenstromrauch in
			der Raumluft stark
			verdünnt werden
Belastete Personen	Raucher und	Raucher	Raucher und
	Nichtraucher		Nichtraucher
	gleichermaßen		gleichermaßen

Tab. 4: Vergleich von Nebenstrom-, Hauptstrom- und Tabakrauch in der Raumluft

Die Gesamtzahl der im Zigarettenrauch vorhandenen Verbindungen wird auf 12.000 geschätzt, wovon bisher circa 4.800 Verbindungen isoliert und identifiziert wurden [Richter *et* Scherer 2004; Hoffmann *et* Hoffmann 1997]. Es befinden sich darunter organspezifische Kanzerogene, Kokanzerogene sowie Promotoren und Inhibitoren der Tumorigenese [Hoffmann *et* Hecht 1990; Anon 1986]. Das größte kanzerogene Potenzial im Tabakrauch wird den Substanzgruppen der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK), der aromatischen Amine und den tabakspezifischen

Nitrosaminen (TSNA) zugeschrieben. Einige der wichtigsten Schadstoffe des Hauptund Nebenstromrauchs sind in der Tabelle 5 dargestellt:

Substanz	Nebenstrom (µg/Zigarette)	Nebenstrom : Hauptstrom (Verhältniszahlen, gerundet)
Kohlendioxid	160-440 mg	8-11
Kohlenmonoxid	30-115 mg	3-5
Nikotin	3-7,5 mg	3
Acetaldehyd*	500-1.200	-
Essigsäure	660-3240	2-4
Methylchlorid*	300-1800	2-3
Stickstoffmonoxid	400-6000	4-10
Blausäure (Cyanwasserstoff)	40-150	0,1-0,3
Ameisensäure	420-980	2
Katechol	100-360	1
Hydrochinon*	110-300	1
Aceton	200-1250	2-5
Toluol	600-1600	6-8
Acrolein*	480-1500	8-15
Phenol*	120-420	2-3
Formaldehyd*	7-5000	0,1-50
Benzol*	60-480	5-10
Pyridin	112-800	7-20
Diethylnitrosamin*	1	< 40
DimethyInitrosamin*	0,2-4	20-100
Staubpartikel (PAK- haltig*)	30-80 mg	2

Tab. 5: Überblick über einige wichtige Schadstoffe im Nebenstromrauch und das Verhältnis von Neben- und Hauptstromrauch [nach US-EPA 1993; Deutsche Forschungsgemeinschaft 1999] * krebserzeugend

Die Tabelle 5 macht deutlich, dass zahlreiche Noxen im Nebenstromrauch um ein Vielfaches stärker vertreten sind als im Hauptstromrauch. Der Nebenstromrauch, dem Raucher und Nichtraucher gleichermaßen ausgesetzt sind, ist für die schädliche Wirkung des Passivrauchens auf die Gesundheit verantwortlich. In ländlichen Gebieten Chinas führt die Passivrauchbelastung in der Kindheit zu einem signifikant erhöhten

Lungenkrebsrisiko [Wang *et al.* 2000]. Welche Auswirkungen die Passivrauchbelastung auf die Haut haben kann, wurde bisher nur unzureichend untersucht.

Die Tabelle 6 zeigt, welche Konzentrationen die aus dem Tabakrauch stammenden Schadstoffe in verschiedenen Innenräumen in der Regel erreichen und demzufolge mit der Haut in Kontakt treten können.

Substanz	Räume	Konzentration [Mikrogramm pro Kubikmeter]
Acetaldehyd	Restaurants	170-630
Acrolein	Restaurants	30-100
Benzo(a)pyren	Restaurants	0,002-0,76
Blausäure (Cyanwasserstoff)	Wohnzimmer Büros Restaurants	8-120 3-49 50-150
Formaldehyd	Wohnhäuser Büros	8-280 12-1.300
Kohlenmonoxid	Büros Restaurants	1.160-3.830 580-11.480
Nikotin	Büros Öffentliche Gebäude Restaurants Bars Privatwohnungen	0,8-37 1-37 1-80 7,4-110 1,6-21
Partikel	Büros Privatwohnungen Restaurants	6-256 32-700 27-690
Stickstoffdioxid	Arbeitsplätze Restaurants	68-410 40-190
Stickstoffmonoxid	Arbeitsplätze Restaurants	50-440 17-270

Tab. 6: Ausgewählte toxische und kanzerogene Substanzen in tabakrauchverunreinigter Raumluft [nach Deutsche Forschungsgemeinschaft 1999]

An dieser Stelle der Ausführungen wird auf zwei Hauptschadstoffe des Zigarettennebenstromrauchs eingegangen: auf das Nikotin, einem Hauptbestandteil der partikulären Phase, und auf das Kohlenmonoxid, einem Hauptbestandteil der Gasphase.
1.2.1.1 Nikotin

Die akuten und kardiovaskulären Wirkungen des Zigarettenrauchens stehen in einem direkten Zusammenhang mit Nikotin, insofern festgestellt werden konnte, dass sie auch durch die (intravenöse oder intranasale) Zufuhr von reinem Nikotin in Dosen ausgelöst werden können, die den beim Rauchen aufgenommenen Mengen entsprechen ("smoking doses") [Kalman *et al.* 2005]. Das Rauchen einer Zigarette führt zu einer Zunahme der Herz- und Atemfrequenz [Buchkremer *et al.* 1989], einem Anstieg des systolischen und des diastolischen Blutdrucks [Bolinder *et al.* 1998], einer Abnahme der Atemtiefe und der akrodermalen Durchblutung mit konsekutiver Abkühlung der Haut [Balfour 1994] sowie zu charakteristischen Veränderungen im Elektroenzephalogramm.

Beim Rauchen werden etwa 30 Prozent des in der Zigarette enthaltenen Nikotins freigesetzt, wovon bis zu 95 Prozent beim intensiven Inhalieren resorbiert werden und die zentralen Wirkungen des Zigarettenrauchs auslösen. Durch radioaktiv markiertes Nikotin konnten Schmitterlöw und Hanson [1965] nachweisen, dass sich zwei Minuten nach der Rauchinhalation der Großteil des Nikotins in der Lunge und im Gehirn befindet; 25 Prozent des inhalierten Nikotins erreichen bereits innerhalb von 7 bis 8 Sekunden das Gehirn. Ein Teil des Nikotins wird verschluckt und vom Dünndarm aus resorbiert. Bereits bei der ersten Passage durch die Darmwand und die Leber werden circa 70 Prozent des verschluckten Nikotins abgebaut (,Firstpass-effect'), sodass die biologische Verfügbarkeit nur etwa 30 Prozent beträgt. Ein Teil des im Blut (pH-Wert 7) zirkulierenden Nikotins liegt als Base vor und penetriert durch die Magenschleimhaut in den Magensaft (pH-Wert 1). Es wird zum größten Teil in der Leber verstoffwechselt. Nikotin wird zu 70 bis 80 Prozent über Cytochrom P450 2A6 zu Cotinin und trans-3'-Hydroxycotinin abgebaut. Nikotin-1'N-oxid und andere Metaboliten entstehen zu weniger als 10 Prozent (Abb. 7); lediglich etwa zwei Zehntel werden unverändert mit dem Harn ausgeschieden. Die renale Ausscheidung von Nikotin ist pH-abhängig; durch Ansäuern des Harns, zum Beispiel durch Verabreichung von Ammoniumchlorid, kann der Prozess beschleunigt werden [Cherek et al. 1981]. Die Summe der mit dem Harn ausgeschiedenen Nikotinäquivalente (Nikotin plus konjungierte und nicht-konjungierte Metabolite) entspricht etwa der mit dem Tabakrauch aufgenommenen Nikotinmenge.



Abb. 7: Abbauwege von Nikotin [Batra et al. 2003]

Nachdem Nikotin die Blut-Hirn-Schranke passiert hat, wirkt es auf die sogenannten nikotinergen Acetylcholinrezeptoren im zentralen Nervensystem. Die Bindung an nikotinerge Acetylcholinrezeptoren vom Subtyp alpha4beta2 oder alpha7 führt sekundär über Aktivierungen des Neurons zum Anstieg beziehungsweise zur Ausschüttung weiterer Neurotransmitter und Hormone, darunter Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin, Serotonin, Vasopressin, ß-Endorphin, ACTH, Cortisol, Prolactin und Wachstumshormonen [Balfour 1994], wobei durch Ausschüttung des Hormons Vasopressin zum Beispiel eine Verschlechterung der Durchblutung induziert wird, was

äußerlich durch kalte Hände und Füße sowie Hautblässe erkennbar wird [Finch et al. 2004].

Die in der Folge wiederholter Nikotinaufnahme entstehenden Krankheiten betreffen zum Beispiel Herzinfarkt, Schlaganfall, aber auch Impotenz und Konzentrationsschwäche. Nikotin regt andererseits den Stoffwechsel an – allerdings nicht zum Vorteil; es führt zu höheren Fettsäure- und Cholesterinspiegeln im Blut und damit zu einer ,Verkalkung' und Verstopfung der Gefäße (Arteriosklerose) [Ambrose *et al.* 2004; Arosio *et al.* 2006], wodurch unter anderem chronische Durchblutungsstörungen in Armen und Beinen bis hin zum Gefäßverschluss, "Raucherbein" und Herzinfarkt auftreten können.

Bis in jüngster Vergangenheit wurde meist davon ausgegangen, dass Nikotin nicht kanzerogen wirkt. Diese Aussage muss inzwischen aufgrund von in den letzten Jahren durchgeführten wissenschaftlichen *In-vitro*-Studien relativiert und modifiziert werden. Vom Nikotin leiten sich die tabakspezifischen Nitrosamine NNN und NNK ab, die wegen ihrer Gentoxizität den Mehrstufenprozess der Karzinogenese initiieren. Es besteht darüber hinaus die Möglichkeit, dass aus Nikotin auch endogen NNK entstehen kann [Arredondo *et al.* 2006; Masi *et al.* 2005]. Es konnte zudem inzwischen die Nachweise erbracht werden, dass Nikotin selbst sowie NNK zelluläre Signalwege stimulieren, die zur Krebsentwicklung beitragen können und Tumorwachstum promovieren [Arredondo *et al.* 2006]. Es liegen bisher keine Hinweise auf eine Übertragbarkeit der Befunde auf den Menschen vor. Unabhängig von seiner möglichen Kanzerogenität interagiert Nikotin in schädlicher Weise mit dem ebenfalls im Zigarettenrauch enthaltenen Kohlenmonoxid, insbesondere bei der ischämischen Herzkrankheit [Bolinder *et al.* 1997] und beim Rauchen in der Schwangerschaft [Laskowska-Klita *et al.* 2005].

1.2.1.2 Kohlenmonoxid

Bei Kohlenmonoxid handelt es sich um ein unsichtbares, geruchsloses, sehr giftiges Gas, das bei der thermischen Zersetzung beziehungsweise Verbrennung des Tabaks entsteht und beim inhalierenden Rauchen durch das Alveolarepithel hindurch in das Blut aufgenommen wird. Das schlecht lösliche Gas besitzt eine hohe Affinität zum Hämoglobin (200-mal höher als O₂), mit dem es sich unter Bildung von Carboxyhämoglobin (HbCO) verbindet, wodurch die Hämoglobinmenge, die für den

Sauerstofftransport zur Verfügung steht, vermindert und die Sauerstoffbindungskurve nach links verschoben wird (Haldane-Effekt). Dieser Effekt führt zu dem Ergebnis, dass nicht nur weniger Sauerstoff aus der Lunge in die peripheren Gewebe transportiert, sondern auch die Abgabe des Sauerstoffs aus dem Blut in die Gewebe beeinträchtigt wird, wodurch eine Minderversorgung der Gewebe mit Sauerstoff entsteht [Stryer 1990]. Kohlenmonoxid kann die Innenhaut der Blutgefäße (das Endothel) schädigen und dadurch die Arterienverkalkung fördern [Bolinder *et al.* 1997; Ambrose *et al.* 2004]. Insbesondere ungeborene Kinder im Mutterleib sind durch Kohlenmonoxid gefährdet, wenn die Mutter aktiv oder passiv raucht. Rauchen während der Schwangerschaft kann zu Frühgeburten, geringem Geburtsgewicht und Entwicklungsstörungen führen [Leem *et al.* 2006; Bolinder *et al.* 1997].

Der Zigarettenrauch ist ein Aerosol, dessen Gasphase neben Gasen zahlreiche flüchtige organische Substanzen und in Suspension eine Partikelphase enthält, die aus Feststoffen und Flüssigkeiten, die bei der Verbrennungstemperatur des Tabaks verdampfen, zusammengesetzt ist. Eine große Zahl an chemischen Verbindungen befindet sich, entsprechend ihrem Dampfdruck, in der Gasphase oder in der Partikelphase beziehungsweise verteilt sich auf beide Phasen. Von diesen Verbindungen sind bestimmte, wie zum Beispiel Nikotin, bereits im Tabak vorhanden und gelangen durch Destillation in den Rauch, andere werden durch Pyrolyse oder Pyrosynthese in der Verbrennungszone respektive um sie herum gebildet. Mithilfe einer Filterscheibe aus Glasfaser (üblicherweise ein Cambridge-Filter, der 99,9 Prozent der Partikel größer als 0,1 μ m zurückhält) lässt sich der Tabakrauch in Gasphase und Partikelphase ("Teer") unterteilen [Church *et* Pyror 1985].

Auch in der Partikelphase kann eine unterschiedliche Größenverteilung zwischen Hauptund Nebenstromrauch beobachtet werden. Während sich der aerodynamische Partikeldurchmesser im Hauptstromrauch zwischen 0,35 bis 0,4 μ m bewegt, werden mit dem Nebenstromrauch besonders feine Partikel von nur 0,15 bis 0,25 μ m an die Raumluft abgegeben [Scherer Adikofer 1999]. weshalb mit hohen et Innenraumluftbelastungen von gesundheitlich problematischen gasförmigen und partikulären Bestandteilen des Tabakrauchs gerechnet werden muss, die sich lange in der Raumluft halten und ein beständiges Inhalationsrisiko darstellen.

Neben den toxischen Substanzen geht ein besonderes Risiko von sogenannten freien Radikalen (siehe Kapitel 1.2.2) aus. Zigarettenrauch enthält zwei verschiedene Arten von freien Radikalen: in der Teerphase finden sich relativ stabile freie und in der Gasphase weitaus reaktivere und kurzlebigere Radikale [Pryor *et al.* 1983]. Freien Radikalen wird ein starker Einfluss auf die Förderung von Alterungsvorgängen zugeschrieben [Wlaschek *et al.* 2001; Sander *et al.* 2002; Bernstein 2002; Sohal *et al.* 1996].

1.2.2 Freie Radikale, reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

Sauerstoff (O₂) ist zu 21 Prozent in unserer Atemluft enthalten und für ein Überleben der Mehrheit der Organismen auf der Erde unerlässlich. In der mitochondrialen Atmungskette aerober Organismen findet eine Übertragung von Elektronen und Wasserstoffprotonen statt. Molekularer Sauerstoff dient hierbei als terminaler Akzeptor, der zu Wasser reduziert wird. Durch diese Redoxreaktionen wird das energiereiche Adenosintriphosphat (ATP) generiert. Bei der durch Flavoproteine katalysierten Übertragung von Elektronen kann es allerdings gleichzeitig zu einem "Leck' in der Atmungskette kommen. Diese Elektronenübertragungen werden unter anderem für das intrazelluläre Entstehen von reduzierten Sauerstoffformen verantwortlich gemacht [Joenje 1989], die als reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) bezeichnet werden [Jamieson et al. 1986]. ROS können endogen durch phagozytierende Zellen bei der Immunantwort entstehen [Babior et al. 1990]. Exogene Faktoren tragen des Weiteren zu erhöhten Konzentrationen von reaktivem Sauerstoff bei. UV-Exposition führt beispielsweise zu einer erhöhten Entstehung von ROS [Epe 1991; Sies 1991]. Wertz et al. [2004] gelang es, einen Zusammenhang zwischen durch UV generierten Singulett-Sauerstoff und der Induzierung verschiedener MMPs herzustellen. Ebenso konnten Polte et al. [2004] zeigen, dass durch freie Radikale hervorgerufene Lipidperoxidation und Peroxide verschiedene MMPs aktiviert werden, wodurch als Folge vermehrt Kollagen abgebaut wird und die Haut ihre Zug- und Dehnungsfähigkeit verliert. Das Risiko einer Invasion von Tumorzellen in ein derart verändertes Bindegewebe erhöht sich.

Neben der UV-Strahlung sind wir in unserer Umwelt einer Vielzahl von Substanzen (unter anderem auch Zigarettenrauch) sowie auch einigen Nahrungsmitteln ausgesetzt,

die ROS enthalten oder im Metabolismus zur Generation dieser führen können [Frei *et al.* 1991; Nagashima *et al.* 1995; Church *et* Pyror 1985]. Für eine Vielzahl kanzerogener Substanzen wie Benzol und Aflatoxin wird vermutet, dass ihre schädigende Wirkung zum Teil auf die metabolische Entstehung von ROS zurückzuführen ist [Kolachana *et al.* 1993; Li *et al.* 1993].

Zu den ROS zählen verschiedene Sauerstoffspezies, radikalische sowie nichtradikalische Formen. Radikale gehören zu den Atomgruppen mit ungesättigten äußeren "Elektronenschalen", die anderen stabilen Verbindungen Elektronen abnehmen, um sich selbst zu stabilisieren. Sauerstoffhaltige Radikale (O₂-, OH, RO und RO₂) enthalten ein oder mehrere ungepaarte Elektronen und reagieren mit ihresgleichen oder mit nichtradikalischen Molekülen. Nicht-radikalische ROS (H₂O₂, O₃, Singulett-Sauerstoff und HOCI) können leicht in Radikale überführt werden.

Normalerweise besteht ein Gleichgewicht zwischen der Bildung von Sauerstoffradikalen und deren Beseitigung. Bei einer Störung dieses Gleichgewichts durch vermehrt auftretende Radikale oder beeinträchtigte Beseitigung der ROS wird der Begriff "oxidativer Stress" verwendet [Halliwell 1994; Aruoma *et* Halliwell 1998]. Sies [1991] definiert den Begriff als "Störung des Proxidantien-Antioxidantien-Verhältnisses, zugunsten des Ersteren, welches zu einem potentiellen Schaden führt".

Um freie Radikale zu neutralisieren, stehen in der gesunden Haut diverse enzymatische (zum Beispiel Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase und Katalase) wie auch nicht-enzymatische Antioxidantien, zum Beispiel α-Tocopherol (Vitamin E), L-Ascorbinsäure (Vitamin C) und Glutathion, physiologisch zur Verfügung. Im Alter und verstärkt nach bestimmten extrinsischen Einflüssen wie UV-Bestrahlung, Rauchen oder oxidative Umwelttoxine kommt es allerdings zu einer signifikanten Verminderung dieser antioxidativen Schutzmechanismen der Haut. Ist der physiologische antioxidative Status der Haut erschöpft, kann durch freie Radikale die oxidative Schädigung diverser Zellstrukturen wie Proteinen, Lipiden einschließlich Membranen und DNA stattfinden.

1.2.3 ROS und Lipidperoxidation

Reaktive Sauerstoffspezies können in der Zelle mit Proteinen, Lipiden und der DNA reagieren. Proteine werden durch Radikaleinwirkung oxidiert, wobei die entstehenden Produkte eine Bandbreite modifizierter und degradierter Aminosäuren enthalten, die

durch die Radikalreaktion neue funktionelle Gruppen wie Hydroxyl- und Carbonylgruppen erhalten haben. Als Folgereaktionen können Proteinfragmentierung, Crosslinks und Zerstörung der Tertiärstruktur und damit der Verlust der Funktionalität auftreten [Dean *et al.* 1997; Fu *et al.* 1995].

Ebenso wie Proteine können durch ROS auch Lipide oxidiert werden, ein Prozess, der Lipidperoxidation genannt wird. Als Folge der Oxidation ungesättigter Fettsäuren läuft in den Membranen eine radikalische Kettenreaktion ab, deren Hauptprodukt in dem Hydroperoxylradikal besteht [Sies 1991]. Lipidperoxidation führt zu strukturellen und funktionalen Veränderungen in Membranen [Esterbauer et al. 1992], spielt eine Rolle bei verschiedenen degenerativen Krankheiten wird für Alterungsprozesse und verantwortlich gemacht [Pelle et al. 2002]. Die mögliche Bedeutung der Lipidperoxidation war erstmals in Arbeiten von Tappel [1962] vermutet worden. Sukzessive führten Untersuchungen [Hochstein et Ernster 1963; Slater 1972] zu der Erkenntnis, dass die Lipidperoxidation einen grundlegenden Mechanismus für die Toxizität von vielen Chemikalien darstellt. Es wird zwischenzeitlich die These vertreten, dass die Lipidperoxidation eine der wichtigsten Reaktionen beinhaltet, die in der Folge der Bildung von freien Radikalen in Geweben und Zellen abläuft. Die Endprodukte der Lipidperoxidation stehen als Promotoren der Kanzerogenese in der Diskussion [Cheeseman 1993; Cerruti 1985].

Neben Proteinen und Lipiden kann auch die Nukleinsäure durch freie Radikale geschädigt werden. Durch Reaktion mit dem Hydroxylradikal entstandene hydroxylierte Purin- und Pyrimidinbasen können Ursache für DNA-Strangbrüche sein, die Mutationen, Wachstumshemmungen und gestörte Proteinsynthesen nach sich ziehen [Joenje 1989]. Trotz eines effizienten Reparatursystems im Körper, das diese Alterationen zu verhindern versucht, kommt es über viele Jahre hinweg zu Ansammlungen von DNA-Mutationen, die für den Alterungsprozess und das Auftreten von Krebs verantwortlich gemacht werden [Beckman *et* Ames 1998].

1.3 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Untersuchung der Fragestellung, ob bereits das Passivrauchen im Sinne einer topischen Exposition mit Zigarettennebenstromrauch ohne respiratorische Aufnahme zu signifikanten Hautveränderungen führt. Im ersten Versuchsteil werden zunächst geeignete Konditionen in vitro etabliert. Es wird das Wachstum von HaCaT-Zellen in zwei verschiedenen Zellkulturmedien untersucht, um das optimale Kulturmedium für die durchzuführenden Experimente festzulegen. Die Zellen werden anschließend auf 6- beziehungsweise 24-Loch-Platten ausgesät, um die eventuell unterschiedliche Schädigung bei gleicher Noxenkonzentration abhängig von der Fläche, auf der die Zellen kultiviert werden, zu prüfen. Es werden daraufhin HaCaT-Zellen mit Natriumlaurylsulfat (SDS) exponiert, womit eine barrieregeschädigte Haut ,imitiert' wird, sodass die Auswirkungen auf die Membranintegrität der Zellen untersucht werden kann. Um optimale Konditionen zu etablieren, werden die Effekte, die der Zigarettennebenstromrauch auf HaCaT-Zellen ausübt, evaluiert, indem HaCaT-Zellen in der dafür konzipierten Expositionskammer mit Zigarettennebenstromrauch exponiert und die Auswirkung auf die Membranintegrität im Neutralrotfreisetzungstest untersucht wird. Um die Frage zu klären, ob eine vorherige Irritation der Zellen die Auswirkungen auf die Zigarettennebenstromexposition beeinflusst, erfolgt eine entsprechende Evaluation, indem die Zellen mit SDS vor beziehungsweise nach Zigarettennebenstromexposition in der Expositionskammer geschädigt und auf ihre Membranintegrität untersucht werden.

Im zweiten Versuchsteil werden Nichtraucher in der Expositionskammer standardisiert mit Zigarettennebenstromrauch exponiert und in zeitlichen Abständen mit epidermalen und dermalen biophysikalischen Messmethoden und Lipidperoxid-Kit untersucht. Die epidermalen biophysikalischen Untersuchungen beinhalten Messungen des Hautoberflächen-pH-Wertes, der Stratum-corneum-Hydratation, des Transepidermalen während die Wasserverlustes. dermalen biophysikalischen Untersuchungen verschiedene Hauttopografie- und Hautelastizitätsparameter umfassen.

Im dritten Versuchsteil werden die Auswirkungen regelmäßigen Zigarettenkonsums auf die Barrierefunktion der Haut und der Hautoberflächenmorphologie in einer Kohortenstudie untersucht. Es wird zu diesem Zweck die Hautphysiologie von freiwilligen gesunden Probanden nicht-invasiv biophysikalisch und mithilfe eines Lipidperoxid-Kits *in vivo* charakterisiert, um zu prüfen, ob sich diese Parameter zu Alter, Geschlecht und/oder Rauchstatus unterscheiden.

Die Aufklärung dieser Effekte erweist sich von großem wissenschaftlichen Interesse, da sie für die exakte Beurteilung von kosmetischen Strategien, die die Haut vor einem vorzeitigen Alterungsprozess schützen sollen, von nachhaltiger Bedeutung ist.

2 Material und Methoden

In-vitro-Untersuchungen (Teil 1)

2.1 Material zur Etablierung geeigneter Konditionen und Evaluierung der Zigarettennebenstromeffekte (*in vitro*)

2.1.1 HaCaT-Zellen

Um den Einsatz von Versuchstieren zu minimieren, wuchs in den letzten Jahren das Interesse an alternativen Hautverträglichkeitstestungen. Humane Keratinozyten (zum Beispiel des Präpetinums) haben sich für solche Zwecke als besonders geeignet erwiesen. Der Einsatz des Materials aus primärer Zellkultur ist allerdings limitiert, da die Anzahl der Passagen begrenzt ist und die Empfindlichkeit gegenüber Irritanzien mit der Zahl der Passagen abnimmt.

In der vorliegenden Arbeit wird daher eine humane keratinozytäre Zelllinie, sogenannte HaCaT-Zellen (Human Adult Low Calcium High Temperature Keratinocytes), eingesetzt. Der Name dieser Zelllinie weist darauf hin, dass die Ausgangszellen von einem erwachsenen menschlichen Spender (Human adult) stammen und in einem Medium mit niedrigem Kalziumgehalt (Kalzium) bei der vergleichsweise hohen Temperatur von 38,5 °C kultiviert werden. Diese Zelllinie hat sich bereits als Modell für Toxizitätsstudien bewährt [Herzinger *et al.* 1994] und bietet den Vorteil, dass eine unbegrenzte Menge an identischen Keratinozyten zur Verfügung steht, die eine hohe intra- und interlaboratorische Reproduzierbarkeit bieten.

Diese permanente, epitheliale, humane Zelllinie kann als phänotypisch spontan transformiert, aber nicht-tumorigen eingestuft werden. Ihrer Herkunft nach stammt sie aus der Peripherie eines primären malignen Melanoms, das im oberen Bereich der Rückenhaut eines 62 Jahre alten Patienten lokalisiert war. Einen wesentlichen Anteil zur Etablierung dieser Zelllinie leistete die Arbeitsgruppe um Fusenig am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg [Boukamp *et al.* 1988].

Aus der spontanen Transformation ergibt sich eine Immortalität des Stammes, die durchaus mehr als 140 Passagen zulässt. Das Wachstum der Zelllinie vollzieht sich nach einem bestimmten Schema. Es gliedert sich nach dem Einsäen der Zellen zunächst in eine *lag-Phase* verzögerten Wachstums (Anpassung an die Kulturbedingungen), in eine sich anschließende *log-Phase* mit exponentiellem Anstieg der Zellanzahl bis hin zum siebten Tag der Kulturdauer und endet mit der Ausbildung

eines Plateaus beziehungsweise dem Einstellen des Wachstums. Zur Fortsetzung der Kultur über eine längere Kulturperiode ist eine Subkultivierung von Vorteil. In Anbetracht dieser Wachstumscharakteristik, die durch eine Passageunabhängigkeit bei Proliferation und Differenzierung gekennzeichnet ist, kann die HaCaT-Zelllinie verglichen mit nativen Keratinozyten als stabileres *In-vitro*-Modellsystem angesehen werden. In grundlegenden Untersuchungen zur Vergleichbarkeit der Eigenschaften von HaCaT und nativen Keratinozyten konnten Gemeinsamkeiten im biochemischen Verhalten aufgezeigt werden [Geilen *et al.* 1996; Grabbe *et al.* 1996; Neuner *et al.* 1996].

Aufgrund der aufgezeigten Eigenschaften eignet sich diese keratinozytäre Zelllinie hervorragend für Studien zum Proliferations- und Differenzierungsverhalten unter dem Einfluss verschiedener chemischer Substanzen, etwa umweltbedingten Noxen wie Zigarettenrauch. Die *In-vitro*-Reaktionen in HaCaT-Zellkultur lassen Rückschlüsse auf *In-vivo*-Vorgänge in der Haut zu.

2.1.2 Chemikalien

- Agarose, Firma: FMC Bioproducts, Rockland
- CO₂-Flasche, Firma: Linde
- Desinfektionsmittel: Descosept, Firma: Dr. Schumacher GmbH
- EDTA, Firma: Sigma
- Eisessig, Firma: Merck
- Ethanol (mindestens 99,9 % Reinheit), Firma: Merck
- Ethidiumbromid (10 mg/ml), Firma: Sigma
- Glycerin: Wasserfrei zur Synthese, Firma: Merck-Schuchardt
- Tris, Firma: Sigma
- Wasserbadzusatz: Waroklar, Firma: Waldeckgruppe
- Mykoplasmen-Detektions-Kit: VenorGeM[®] Mycoplasma Detection Kit for Conventional PCR Cat No.: VGM

2.1.3 Zellkulturmaterialien

- Amphotericin B: Endotoxin getestet, steril gefiltert, 0,25 mg/ml, Firma: PAA Laboratories GmbH
- Einfrierröhrchen: Cryo Vials steril, Firma: Greiner

- Einmal-Filter: Millex-Filter mit einer Porenweite von 0,22 μ m, Millipore, Firma: Bedford, USA
- FKS (Fötales Kälberserum): Virus-screened, Mycoplasma-screened, Endotoxin getestet, steril gefiltert, Firma: PAA Laboratories GmbH
- L-Glutamin (100 x): Endotoxin getestet, steril gefiltert, 29,3 mg/ml in 200 mM,
 Firma: PAA Laboratories GmbH
- Neutralrot-Lösung: Endotoxin getestet, steril gefiltert, 3,3 g/l in PBS, Firma: Sigma
- PBS: Dulbecco`s phosphate buffered saline, Endotoxin getestet, steril gefiltert, Firma: Sigma
- Penicillin-Streptomycin-Lösung: Endotoxin getestet, steril gefiltert, Hybridoma getestet; 10000 Einheiten Penicillin, 10 mg Streptomycin/ml in 0,9 % Sodium Chlorid, Firma: Sigma
- Petrischalen, Firma: Greiner
- PP-Röhrchen: Cellstar, steril 15 ml, Firma: Greiner
- RPMI mit Phenolrot, ohne L-Glutamin, Endotoxin getestet, steril gefiltert, Firma: PAA Laboratories GmbH
- RPMI ohne Phenolrot, ohne L-Glutamin, Endotoxin getestet, steril gefiltert, Firma: PAA Laboratories GmbH
- 6-Loch-Kultur-Platten: Multi Well 6 Well Tissue, nicht pyrogen, Oberfläche: 4,2 cm², Firma: Becton Dickinson and Company
- 24-Loch-Kultur-Platten: Multi Well 24 Well Tissue, nicht pyrogen, Oberfläche:
 0,31 cm², Firma: Becton Dickinson and Company
- Trypsin-EDTA-Lösung, steril gefiltert, Zellkultur getestet, mit 5,0 g Trypsin vom Schwein und 2,0 g EDTA in 0,9 %iger NaCI-Lösung, Firma: Sigma
- Trypanblau-Lösung 0,4 %: steril gefiltert, Zellkultur getestet, zubereitet in 0,81 % Natriumchlorid- und 0,06 % Kaliumphosphat-Lösung, Firma: Sigma
- Zählkammer: Neubauer Assistent, 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm²
- Zellkulturflaschen: Cellstar, Volumen 50 ml und 250 ml, Firma: Greiner

2.1.4 Zellkulturmedien

Bei allen Zellkulturmedien handelt es sich um isotonische, gepufferte Grundnährmedien mit anorganischen Salzen, energieliefernden Nährstoffen, Aminosäuren und Vitaminen. Bei Medien für eine adhärierende Kultur, wie es die HaCaT-Kultur darstellt, ist ein hoher Anteil an Kalzium- und Magnesiumionen erforderlich, da diese Ionen mit den Adhäsionsproteinen auf der Zelloberfläche in Wechselwirkung treten und dadurch die Anheftung der Zellen erst ermöglichen.

Die HaCaT-Zellen wurden sowohl in RPMI- wie auch DMEM-Medium kultiviert:

RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Medium

Vor allem Lymphozyten von Tier und Mensch werden in RPMI-1640-Medium gezüchtet. Es eignet sich aber auch für die Kultur von HaCaT-Zellen, was mehrfach publiziert wurde [stellvertretend Trouba *et al.* 2002].

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Das DMEM entwickelte sich mittlerweile in vielen Modifikationen zu einem der meistgebrauchten Zellkulturmedien für adhärierende Monolayer. Es handelt sich um eine Modifikation des Basal- und Minimal-Mediums nach Eagle [Eagle *et al.* 1976], wobei eine bis zu vierfache Konzentration von Aminosäuren und Vitaminen enthalten sind. Der NaHCO₃-Gehalt ist gegenüber der Pufferung nach Eagle 1,7fach höher, sodass für dieses Medium mit hoher Pufferkapazität ein CO₂-Schrank auf jeden Fall notwendig ist. Dieses Medium wird üblicherweise zur Kultur von Keratinozyten und HaCaT-Zellen eingesetzt [Herzinger *et al.* 1991].

Diesen käuflichen Basalmedien wurden folgende Mediumzusätze hinzugefügt:

2.1.5 Mediumzusätze

- Amphotericin B: als antimykotischer Zusatz.
- FKS (Fötales Kälberserum): Das fötale Kälberserum liefert Hormone, Bindungsproteine und Anheftungsfaktoren, zahlreiche zur Synthese benötigte Aminosäuren, anorganische Salze, Spurenelemente sowie Puffer-(NaHCO₃) und Neutralisationssysteme, zum Beispiel Albumin und Immunglobuline.

- L-Glutamin: In vielen Fällen fungiert das thermolabile L-Glutamin als wachstumsbegrenzende Aminosäure, sodass ein regelmäßiger Mediumwechsel unumgänglich ist.
- Penicillin-Streptomycin-Lösung: Diese Kombination an Antibiotika wird üblicherweise gegen gramnegative und grampositive Bakterien verwendet. Es muss dabei berücksichtigt werden, dass Penicillin in wässriger Lösung bei 37 °C nur circa drei Tage aktiv bleibt.

2.1.6 Zubereitungen

DMEM-Medium mit Zusätzen (zur Kultivierung von HaCaT-Zellen)

	Volumen	
DMEM	500 ml	
FKS	50 ml	
L-Glutamin (100 x)	10 <i>µ</i> I	
Penicillin-Streptomycin	500 <i>µ</i> I	
[10000 Einheiten Penicillin,		
10 mg Streptomycin/ml]		
Amphotericin B [0,25 mg/ml]	500 <i>µ</i> I	
DMEM entspricht dem in der	Originalpublikation propagierten	vierfach konzentrierten

Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) [Boukamp et al. 1988].

RPMI-Medium mit Zusätzen (zur Kultivierung von HaCaT-Zellen)

	Volumen
RPMI	500 ml
FKS	50 ml
L-Glutamin (100 x)	10 <i>µ</i> I
Penicillin-Streptomycin	500 <i>µ</i> I
[10000 Einheiten Penicillin,	
10 mg Streptomycin/ml]	
Amphotericin B [0,25 mg/ml]	500 <i>µ</i> I

Einfriermedium

	Volumen
Medium	8 ml
FKS	1 ml
Glycerin	1 ml
Anschließend wurde steril gefiltert (Einma	al-Filter, Millex).

Neutralrot-Lösung

Herstellung einer Neutralrot-Lösung der Konzentration 50 μ g/ml.

	Volumen
Neutralrot-Lösung [3,3 μ g/ml]	152 <i>µ</i> I

PBS 9848 μl Anschließend wurde 5 min bei 800 Upm (Heraeus) zentrifugiert, um eine zellschädigende Kristallbildung zu verhindern, und steril gefiltert.

Ethanol/Eisessig-Lösung

	Volumen
Eisessig	1 ml
Ethanol 50 %	50 ml

Mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen.

TAE(Tris-Acetat)-Puffer (50 x)

	Volumen
2,0 M Tris	242,2 g
1,0 M Eisessig	57,1 ml
0,1 M EDTA	18,81 g

Mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen, mit Eisessig auf pH-Wert 8,0 einstellen.

2.1.7 Geräte

- Autoklav: Autoklav 25, Firma: Melag
- Brutschrank: CO₂-Water Incubator Model 3111, Firma: Forma Scientific SN 26524-395
- Küvetten: Einmalküvetten; 1,5 halbmikro, Firma: Brand
- Mikroskop: CK 30, Firma: Olympus
- Gefrierschrank: Refrigerants 86 °C Freezer Non CFC, Firma: Forma Scientific
- Gashahn: DINDVGW, Firma: efka
- Invers Mikroskop (Umkehrmikroskop): CK 40, Firma Olympus
- Pipetten: Finnpipette 200-1000 μ I; 20-100 μ I; 0,5-10 μ I, Firma: Labsystems
- Pipettierhilfe, Firma: Greiner
- PCR: Autocrized Thermo Cycler Master Cycler Personal, Firma: Eppendorf
- PCR-Reaktionsgefäße, Firma
- Fotometer: Perkin Elmer UV/VIS Spektrometer Lambda 2S
- Fotometer: Fotometer 1101 M, Firma: Eppendorf
- Pumpe: Typ 4 EKF 63 CX-4, Firma: Greiffenberger Antriebstechnik GmbH
- System für Agarosegelelektrophorese, Firma IBI, New Haven
- Tischzentrifuge 5415 C, Mastercycle Gradient, Firma: Eppendorf
- UV-Transilluminator (320 nm, 90 W), Firma: Steiner
- Wasserbad, Firma: GFD
- Werkbank: Mikroflow Biological Safety Cabinet, Firma: Nalge Nunc International
- Zentrifuge: Heraeus Instruments Lafafuge 400 e Function Line

2.1.8 Expositionskammer

Um die Zigarettennebenstromexpositionen *in vivo* und *in vitro* unter standardisierten Bedingungen durchführen zu können, wurde eine sogenannte Expositionskammer entwickelt und von der Firma Hartkopp Aquaristik aus Stapelfeld gebaut. Die Expositionskammer ist in Abbildung 8 grafisch und in Abbildung 9 und Abbildung 10 fotografisch dargestellt.



Abb. 8: Grafische Darstellung der Expositionskammer

Die Expositionskammer hat eine Länge und Tiefe von 70 cm und eine Höhe von 40 cm; ihr Volumen beträgt 196.000 cm³, also 0,196 m³. Die Expositionskammer besteht aus 6 mm dicken Glasplatten, die mit Silikonkleber luftdicht zu einer Kammer verbunden wurden. Der Deckel ist abnehmbar, um Zellkulturplatten zur Exposition hineinstellen zu können wie auch eine Reinigung im Anschluss an die Exposition zu ermöglichen. Eine Silikonabdichtung sorgt für den Abschluss der Expositionskammer. Im Deckel gewährleistet eine Bohrung von 4 cm Durchmesser die Installation eines Gashahnes (Firma efka) zur möglichen Gaszufuhr. Die gleiche Bohrung wurde in der linken seitlichen Glasplatte vorgenommen, um eine Gasabfuhr (Gashahn ebenfalls von der Firma efka) sicherzustellen.

Die Glasplatte der Vorderfront enthält zwei Bohrungen mit einem Durchmesser von 10 cm. Diese Bohrungen dienen bei den *In-vivo*-Versuchen als Armöffnungen, um die

Unterarmhaut der Probanden mit Zigarettennebenstromrauch exponieren zu können. Um keinen Zigarettennebenstromrauch während der *In-vivo*-Zigarettenexposition entweichen zu lassen und die Exposition von Armen mit verschiedenen Durchmessern zu ermöglichen, wurden spezielle Armmanschetten (dankenswerterweise mit der Hilfe von Ottmar Neugebauer) entwickelt und angebracht. Damit die Expositionskammer auch für *In-vitro*-Expositionen eingesetzt werden kann, besteht die Möglichkeit, die Armöffnungen komplett zu verschließen.



Abb. 9: *In-vitro*-Exposition von HaCaT-Zellen in Kultur mit Zigarettennebenstromrauch in der ,Expositionskammer'



Abb. 10: *In-vivo*-Exposition der Haut des volaren Unterarmes mit Zigarettennebenstromrauch in der ,Expositionskammer'

Um die Zellen beziehungsweise die Haut des volaren Unterarms der Probanden mit Zigarettennebenstromrauch zu exponieren, wurden zunächst drei standardisierte Forschungszigaretten des Typs 2R4F von ,The Tobacco Institute of the University of Kentucky' (Inhaltstoffe nach Herstellerangaben im Anhang) in der Expositionskammer abgeraucht und anschließend die Zellen beziehungsweise die Unterarme für 15 min exponiert. Es wurden standardisierte Zigaretten eingesetzt, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu ermöglichen [Pelle *et al.* 2002]. Nach Abschluss jeder Exposition wurde der Zigarettenrauch mithilfe einer Pumpe (Firma Greiffenberger Antriebstechnik) aus der Expositionskammer in die Außenraumluft gepumpt, um eine weitere Zigarettenrauch-exposition der Probanden zu verhindern.

2.2 Methoden zur Etablierung geeigneter Konditionen und Evaluierung der Zigarettennebenstromeffekte (*in vitro*)

2.2.1 HaCaT-Zellen

2.2.1.1 Kultur von HaCaT-Zellen

Bei Zellen dieser Zelllinie handelt es sich um immortalisierte, jedoch nicht-tumorige Zellen, die 1988 von Boukamp *et al.* aus spontan transformierten adulten humanen Keratinozyten gewonnen wurden (siehe Kapitel 1.3). HaCaT-Zellen können nahezu beliebig oft subkultiviert werden und sind dennoch ähnlich normaler humaner Keratinozyten zur Differenzierung befähigt [Boukamp *et al.* 1988; Ryle *et al.* 1989]. HaCaT-Zellen wurden für die vorliegenden Untersuchungen dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. Steinkraus und Frau Dr. Möller, Dermatologikum Hamburg, zur Verfügung gestellt.

Die HaCaT-Zellen wurden zunächst in RPMI-Medium kultiviert und dann auf DMEM-Medium umgestellt. Beiden Medien wurde zuvor fötales Kälberserum (FKS), L-Glutamin, Penicillin-Streptomycin und Amphotericin B zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte in 250 ml Gewebekulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO₂ und mindestens 95 % Luftfeuchtigkeit.

Das Medium wurde zweimal wöchentlich durch vorgewärmtes frisches Medium ersetzt, wodurch gleichzeitig tote beziehungsweise nicht-adhärente Zellen entfernt wurden. Bei einer Konfluenz der HaCaT-Zellen von circa 70 bis 80 Prozent wurden die Zellen – wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben – subkultiviert, da die Zellen in Kultur bei Erreichen der Konfluenz im Wachstum inhibiert werden. Für die durchgeführten Zellversuche wurden HaCaT-Zellen der 45.-75. Passage eingesetzt.

2.2.1.2 Subkultivierung von HaCaT-Zellen

Um die Zellen zu subkultivieren (auch passagieren genannt), wurden sie mit 5 ml 37 °C warmen PBS gewaschen, mit 10 ml einer 10 x Trypsin-EDTA-Lösung (gelieferte Trypsin-EDTA-Lösung war 100 x konzentriert, somit wurde zuvor 1 ml dieser Lösung mit 9 ml warmen PBS verdünnt) versetzt und für 5 min im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde durch Beklopfen des Flaschenbodens beschleunigt, um die enzymatische Schädigung der Zellen möglichst gering zu halten. Der Grad der Ablösung der Zellen wurde dabei fortwährend mikroskopisch überprüft. Die proteolytische Reaktion des Trypsins wurde anschließend durch Zugabe von circa 3 ml warmen FKS

gehemmt. Die entsprechende Zellsuspension wurde für 5 min bei 800 Upm zentrifugiert und die Trypsin-EDTA-FKS-Lösung abpipettiert, da Reste von EDTA die Anheftung von Zellen verlangsamen und im Zytoplasma die subtile Regulation des Kalziumions stören können. Auf Resuspendieren und Zellzahlbestimmung folgte die Aussaat (ideal 10⁶ Zellen/250 ml Kulturflasche) in neuen Kulturflaschen. Es wurde dabei darauf geachtet, dass pro Fläche nicht zu wenig Zellen ausgesät wurden (Minimum 2.500 Zellen/cm²), da diese Zellen sonst nicht mehr in der Lage sind, zu proliferieren.

Für die Untersuchungen wurden die HaCaT-Zellen in 6-Loch- beziehungsweise 24-Loch-Platten gezüchtet, wobei die eingesäte Zellkonzentration der Norm 20.000-40.000 Zellen/cm² entsprach. Das Einsaatvolumen in die 6-Loch-Platten betrug 3 ml und in die 24-Loch-Platten 500 μ l Zell-Medium-Suspension pro Loch.

2.2.1.3 Kryokonservierung von HaCaT-Zellen

Zur Langzeitlagerung können Keratinozyten kryokonserviert werden. Die Zellen wurden hierzu wie bei der Passage (siehe Kapitel 2.2.1.2) abtrypsiniert und anschließend abzentrifugiert (2 min bei 1.800 Upm). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in Einfriermedium (siehe Kapitel 2.1.4.2) aufgenommen, wobei das Pellet nicht mehr als 10 Vol% einnehmen sollte. Die Zell-Einfriermedium-Suspension wurde anschließend zu je circa 1 ml in gekühlte Kryo-Röhrchen portioniert und bei – 80 °C eingefroren.

2.2.1.4 Auftauen von HaCaT-Zellen

Glyzerin und Dimethylsulfoxid (DMSO) dienten als Schutzsubstanzen, um die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle sowie die Dehydration des Zytoplasmas zu verhindern, indem sie das Zellwasser ersetzen und binden. Nach dem raschen Auftauen wurde die verdünnte Zellsuspension entweder direkt (vorher wurde die Vitalität, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, getestet, damit die Einsaatdichte eingehalten werden kann) oder die Zellsuspension zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Medium wieder aufgenommen.

In dieser Arbeit wurden die Zellen mit einem Glyzerin enthaltendem Medium eingefroren und die Zellsuspension nach dem Auftauen direkt in das vorgewärmte Medium gegeben. Der erste Mediumwechsel fand spätestens nach 24 Stunden statt.

2.2.2 Vitalitätsuntersuchung und Zellzahlbestimmung

Theoretische Grundlagen

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Es dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Die Farbstoffaufnahme der Zellen ist stark vom pH-Wert abhängig. Die maximale Aufnahme findet bei einem pH-Wert von 7,5 statt. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell im Gegensatz zu toten, die tiefblau gefärbt sind. Die Zellen, die nur schwach blau angefärbt sind, werden als tot betrachtet. Sollte eine Zellzählung wiederholt werden, muss der Testansatz stets neu gemischt werden, da Trypanblau zytotoxisch ist, sodass mit zunehmender Inkubationsdauer mit dem Farbstoff ein Anstieg der toten Zellen zu beobachten ist.

Durchführung

0,1 ml der Zellsuspension wurde mit 3,6 ml PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) verdünnt. Anschließend wurden 2,7 ml der aufgewärmten Trypanblau-Lösung (0,5 %ige Lösung) hinzugegeben. Der Testansatz wurde vorsichtig mit einer Pipette durchmischt und für 2-5 min bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde dann erneut mit einer Pipette durchmischt und sofort in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl zu bestimmen, werden nur die lebenden, nicht angefärbten Zellen in vier der neun großen Quadranten gezählt. Den Mittelwert hieraus multipliziert mit 10⁴ ergibt die Zellkonzentration pro mI; die Gesamtzellzahl resultiert aus dem Volumen der Zellsuspension multipliziert mit der Zellzahl pro mI.

 \sum der Zellen aus 4 Quadranten/4 x 10⁴ = Zellzahl/ml

Vitalitätsuntersuchung

Zur Vitalitätsuntersuchung werden sowohl die gefärbten wie auch die ungefärbten Zellen gezählt. Den Prozentsatz an lebenden Zellen wird mit folgender Gleichung ermittelt:

ungefärbte Zellen / (ungefärbte Zellen + gefärbte Zellen) x 100 = % lebende Zellen

2.2.3 Mykoplasmen

Theoretische Grundlagen

Mykoplasmen sind die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryonten. Sie greifen in den Stoffwechsel der befallenen Zellen ein. Kontaminationen mit Mykoplasten treten häufig auf, bleiben meist lange unentdeckt und sind schwer zu behandeln.

Um einen Mykoplasmenbefall auszuschließen, wurde die verwendete Zelllinie in regelmäßigen Abständen getestet. Bei dem verwendeten VenorGeM[®]-Mykoplasmen-Detektionskit handelt es sich um ein Nukleinsäure-Amplifikationstest auf Basis der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Die PCR-Methode gewährleistet eine schnelle und sehr sensitive Detektion von Mykoplasmenkontaminationen in biologischen Proben. Mit VenorGeM[®] können 1 bis 5 fg Mykoplasmen-DNA, entsprechend 2-5 Mykoplasmen pro Probenvolumen, detektiert werden. Die im Kit enthaltenen Primer erlauben der DNA-Polymerase die Vervielfältigung eines Abschnitts der 16S rRNA-Region des Mykoplasmengenoms. Das amplifizierte PCR-Produkt hat eine Größe von circa 270 bp; dieses gewählte Template ist innerhalb der Spezies Mycoplasma hochkonserviert, zeigt jedoch auch deutliche Sequenzhomologien zu verschiedenen Ureaplasmen.

Das Testsystem beinhaltet eine interne Kontrolle, die im PCR-Ansatz mitgeführt werden kann. Die interne Kontrolle liefert in einer erfolgreich durchgeführten PCR ein 191 bp großes Produkt, welches im Agarosegel kurz unterhalb der Bande einer Mykoplasmenpositiven Probe erscheint. Die hohe Empfindlichkeit der PCR-Methode kann die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse erhöhen, zum Beispiel durch Kreuzkontaminationen oder unsauberes Arbeiten.

Durchführung

Es wurde der VenorGeM®-Mykoplasmen-Detektionskit verwendet und nach den Herstellerangaben durchgeführt. Da Antibiotika die Mykoplasmenkonzentration unter die Nachweisgrenze des Tests von 2 x 10³ Mykoplasmen/ml drücken können, wurden die Zellen vor dem Test für mindestens eine Passage in antibiotikafreiem Medium kultiviert. Die Zellkulturen wurden bei 90 bis 100 %iger Konfluenz getestet. Als Probe wurde der Zellkulturüberstand verwendet. Das gegebenenfalls amplifizierte PCR-Produkt und die Kontrolle können direkt im Agarosegel sichtbar gemacht werden.

Herstellung eines 1,5 %igen Agarosegels

1,5 % Agarose wurden in 1 x TAE-Puffer eingewogen und in der Mikrowelle aufgekocht, bis eine homogene Lösung resultierte. Nach dem Abkühlen der Lösung auf circa 60 °C wurden 2 μ l Ethidiumbromid [10 mg/ml] (interkaliert zwischen den Basen der DNA und fluoreziert unter UV-Anregung) pro 100 ml Agarose-Lösung hinzugefügt. Die Lösung wurde anschließend in die vorbereitete Elektrophoresekammer gegossen und der Probenkamm eingehängt, wobei das Gel circa 5 mm dick sein sollte, mit einem Kamm von 5 mm.

Agarosegelelektrophorese

Nach dem Erkalten des Agarosegels wurde 1 TAE-Puffer die Х in Elektrophoresekammer gefüllt, der Probenkamm herausgenommen und in die entstandenen Slots die vorbehandelten Proben pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt und nach circa 2 cm Wegstrecke (etwa 20 min) gestoppt. Die DNA-Banden konnten anschließend durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Der Mykoplasmentest war stets negativ.

2.2.4 Neutralrotfreisetzungstest [nach Reader et al. 1989]

Theoretische Grundlagen

Mit dem Neutralrotfreisetzungstest lässt sich der Einfluss von Tensiden und anderen Chemikalien auf die Membranintegrität von Zellen untersuchen. Das Prinzip dieser Tests besteht in der kurzzeitigen Exposition eines konfluenten Zellrasens gegenüber vergleichsweise hohen Konzentrationen der zu untersuchenden Noxe. Die Zellen werden hierzu mit dem bei pH 7,4 ungeladenen Vitalfarbstoff Neutralrot (5-,3-Amino-7dimethyl-amino-2-methylphenazinium-chlorid) inkubiert. Dieser Vitalfarbstoff wird von lebenden Zellen aufgenommen und in die intakten Lysosomen und zum Teil auch in die proliferierende DNA eingelagert. Aufgrund des starken pH-Gradienten wird das zunächst ungeladene Molekül zum Ion und färbt sich zugleich deutlich rot an (Abb. 11). Es kann dann die Lysosomen aufgrund seiner Ladung nicht mehr verlassen (,Ionenfalle') und der Zellrasen erscheint makroskopisch rot. Tote Zellen werden nicht angefärbt, da sie weder intakte Lysosomen aufweisen noch proliferierende DNA besitzen.



Abb. 11: Strukturformel von Neutralrot

In Abhängigkeit von Art und Konzentration des Teststoffes kommt es in unterschiedlichem Ausmaß zur Desintegration der lysosomalen Membran und damit zur Freisetzung des Farbstoffs in den Überstand. Die Menge des in den Zellen verbliebenen Farbstoffs verhält sich der Zahl der vitalen Zellen proportional und kann fotometrisch bestimmt werden.

Durchführung

Die Zellen wurden wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben passagiert, ausgezählt und bis zur gewünschten Zellkonzentration mit Medium verdünnt. Die zu stimulierenden Zellen wurden vor Beginn eines Experiments in 6- beziehungsweise 24-Loch-Platten mit 2 ml

beziehungsweise 500 μ l Medium pro Loch überführt. Um ausschließen zu können, dass im FKS undefinierte Faktoren die Stimulierbarkeit der Zellen beeinflussen, wurde das Zellmedium 12 Stunden vor dem Versuch nach zweimaligem Waschen mit PBS durch FKS-freies Nährmedium ersetzt. Unter den oben beschriebenen Bedingungen bildete sich nach 3-4 Tagen ein konfluenter Zellrasen. Das Kulturmedium wurde aus den Platten abgesaugt, mit vorgewärmtem PBS gewaschen und durch 500 μ l pro Loch bei den 6-Loch-Platten beziehungsweise 200 μ l pro Loch bei den 24-Loch-Platten Neutralrot-Lösung ersetzt, welche den Farbstoff in einer Endkonzentration von 50 μ g/ml enthielt. Nach Inkubation für 3 Stunden bei 37 °C im Brutschrank wurde die Neutralrot-Lösung abgesaugt, erneut mit warmen PBS gewaschen und durch 2 ml pro Loch bei den 6-Loch-Platten und 500 μ l pro Loch bei den 24-Loch-bei den 6-Loch-Platten und 500 μ l pro Loch bei den 24-Loch-Platten Neutralrot-Lösung ersetzt. Die Versuche wurden binnen einer Stunde durchgeführt.

Vor der entsprechenden Exposition wurde das Medium abgesaugt und die Zellen erneut mit warmem PBS gewaschen. Nach Exposition erfolgte wiederum die Waschung mit PBS. Das in den Zellen verbliebene Neutralrot wurde mit 2 ml pro Loch der 6-Loch-Platten und 1 ml pro Loch der 24-Loch-Platten Eisessigethanol unter sanfter Horizontalbewegung für 5 min eluiert. In einem Fotometer wurde die Extinktion bei 540 nm gemessen [Borenfreund *et al.* 1984; Lasarow *et al.* 1992].

2.2.5 Statistische Auswertung der Zellkultur

Für die deskriptive Statistik wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus Mehrfachbestimmungen mit Microsoft[®] Excel 2000 berechnet. Auf eine Analyse mittels Interferenzstatistik wurde aufgrund der geringen Stichprobenumfänge verzichtet. Die Ergebnisse werden grafisch dargestellt; alle Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichung an.

In-vivo-Untersuchungen (Teil 2 und Teil 3)

2.3 Probanden

Zunächst wurden die Probanden nach den Kriterien Alter, Geschlecht und Rauchverhalten in verschiedene Gruppen eingeteilt, wobei die Altersgruppen nach Varani *et al.* [2000] definiert wurden: 20-29 Jahre; 30-59 Jahre und älter als 60 Jahre; männlich/weiblich und Raucher/Nichtraucher. Für den zweiten Teil dieser Arbeit wurden zehn Nichtraucher aus dem Probandenpool nach der Eingangsuntersuchung standardisiert mit Zigarettennebenstromrauch exponiert. Im dritten Teil wurde in einer Kohortenstudie die Hautphysiologie nicht-invasiv biophysikalisch und mithilfe eines Lipidperoxid-Kits *in vivo* charakterisiert, um zu prüfen, ob sich diese Parameter zu Alter, Geschlecht und/oder Rauchstatus unterscheiden. Es wurden dafür Probanden im Alter von 20 bis 90 Jahren untersucht; Frauen im Alter über 47 Jahren wurden als postmenopausal eingestuft [Sumino *et al.* 2004].

Das Studiendesign wurde in einem ausführlichen Prüfplan (siehe Anhang) niedergelegt. Eine Ethikkommission, die "Freiburger Ethikkommission", gab ihr Einverständnis für die durchgeführten Versuche (Juli 2002). Vor den Untersuchungen erklärten sich die Probanden nach ausführlicher Aufklärung schriftlich mit der Teilnahme an den Experimenten einverstanden. Es wurden folgende Ein- und Ausschlusskriterien festgelegt:

2.3.1 Ein-/Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien:

- Freiwillige Teilnahme an der Untersuchung
- Aufklärung über Versuchsablauf, Risiken und Freiwilligkeit der Untersuchung

Ausschlusskriterien und Kontraindikationen:

- Vorliegen einer aktiven Hauterkrankung, einer allergischen Erkrankung der Atemwege (allergisches Asthma, Rhinoconjunctivitis allergica) oder eines allergischen Kontaktekzems
- Erkrankungen der inneren Organe
- Schwangerschaft oder Stillzeit

- Starke Sonnenbestrahlung während der letzten zwei Monate vor Versuchsbeginn
- Eincremen des Prüfareals vor weniger als 10 Stunden
- Minderjährigkeit oder verminderte Geschäftsfähigkeit
- Unterbringung in einer Anstalt
- Sensibilisierung gegenüber einem Bestandteil der topischen Anwendung
- Einnahme von Medikamenten oder Impfungen in den letzten zwei Monaten

2.3.2 Abbruchkriterien (individuell und für die Gesamtstudie)

- Entscheidung eines Probanden, die Studie abzubrechen
- Nicht mit der Studie in Zusammenhang stehende Erkrankung eines Probanden (zum Beispiel Grippe)
- Einnahme von Medikamenten oder Impfungen
- MangeInde Compliance eines Probanden
- Neu auftretende Sensibilisierung gegenüber einem Bestandteil der getesteten Zubereitungen
- Schwangerschaft

2.4 Material zur Evaluierung der Zigarettennebenstromeffekte (in vivo)

2.4.1 Chemikalien und Präparate

- Ethanol (mindestens 99,9 % Reinheit), Firma: Merck
- Lipidperoxid-Test: LPO-CC (Lipid Peroxides) Kit, Firma: Kamiya Biomedical Company
- Zigaretten: 2R4F (Zigarettennebenstromrauch), Firma Reynolds, Tabacco Institute of the University of Kentucky

2.4.2 Durchführung der In-vivo-Versuche

Die Probanden wurden über Ziel und Art der verschiedenen Untersuchungen sowie Risiken aufgeklärt und erhielten einen Informationsbogen. Nachdem sie ihre Bereitschaft zur Teilnahme an der Studie schriftlich erklärt hatten, wurden die Probanden in die Studie aufgenommen. Um zu gewährleisten, dass bei den zu untersuchenden Kollektiven im Mittel von den gleichen Eingangsvoraussetzungen in Bezug auf mögliche Hautbelastungen neben dem Rauchen ausgegangen werden konnten, wurden im Rahmen einer breit angelegten Befragung diejenigen Lebensumstände und gewohnheiten abgefragt, die bekanntermaßen einen Einfluss auf die Hautbiologie ausüben. Für die Bewertung der Ernährungsgewohnheiten wurde ein dreigliedriger, für den Alkoholkonsum ein viergliedriger, für den Kaffeekonsum ein dreigliedriger, für die tägliche Flüssigkeitszufuhr ein zweigliedriger, für die Freiluftaufenthalte ein dreigliedriger, für die Sportgewohnheiten ein dreigliedriger, für die Hautpflege unterteilt in Gesicht und Körper ein dreigliedriger und für den letzten Zeitpunkt des Eincremens des Unterarms ein zehngliedriger Score eingesetzt. Ein entsprechender Fragenkatalog wurde in einem Interview mit dem Probanden ausgefüllt und befindet sich im Anhang.

Bei dem Testareal handelte es sich um die Volarseite beider Unterarme bei einem Mindestabstand von distal 7,5 cm zum Handgelenk und proximal 5 cm zur Ellenbogenbeuge. Die Untersuchungen fanden an den Unterarm-Innenseiten der Probanden statt, da sich an dieser Lokalisation im Gegensatz zum Gesicht gute, reproduzierbare Ergebnisse mithilfe biophysikalischer Messmethoden erzielen lassen. Zudem sind die Unterarm-Innenseiten weniger sonnenexponiert und mit dem anderen Unterarm kann eine unbehandelte Kontrollstelle als Referenz in die Untersuchung einbezogen werden. Der volare Unterarm gilt als internationale Standardlokalisation für biophysikalische Untersuchungen. Es wurde randomisiert festgelegt, an welchem Unterarm (links oder rechts) die biophysikalischen Messmethoden beziehungsweise der Lipidperoxid-Test durchgeführt werden soll. Zur Akklimatisierung mussten sich die Probanden vor den In-vivo-Messungen 20 Minuten in einem klimatisierten Behandlungsraum aufhalten. Alle Untersuchungen wurden in einem klimatisierten Raum bei 22 °C und 40 % Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Zur Erhebung reproduzierbarer Messwerte besteht die Notwendigkeit, Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit konstant zu halten, wobei eine Raumtemperatur von 20-22 °C und eine Luftfeuchtigkeit von circa 40 % für die Messungen als ideal gilt [Pinnagoda et al. 1990].

Die Probanden durften während der gesamten Versuchsdauer ihrem gewohnten Tagesablauf nachgehen. Ein Kontakt des Testareals mit Wasser oder Seife musste jedoch vermieden werden, ebenso mit starkem Schwitzen verbundene körperliche Anstrengung sowie eng anliegende, zu mechanischer Reizung führender Kleidung.

50

Beim Expositionsversuch wurden an dem durch Randomisierung ermitteltem Unterarm acht Felder mit einem wasserfesten Filzstift markiert, sodass zu jedem Messzeitpunkt im entsprechenden Feld derselbe biophysikalische Parameter bestimmt werden konnte.

2.4.2.1 Zigarettennebenstromexposition (in vivo)

Um zu untersuchen, wie Zigarettennebenstromrauch die Hautphysiologie verändert und beeinflusst, wurden drei standardisierte Zigaretten (2R4F) in der von uns entwickelten Expositionskammer abgeraucht. Beide Unterarme der 10 Probanden wurden anschließend für 15 min dem Zigarettennebenstrom exponiert. PH-Wert, Stratumcorneum-Hydratation, TEWL-Wert und Lipidperoxid-Konzentration der Probanden wurde vor, direkt nach Exposition, nach 2 Stunden, nach 6 Stunden und nach 24 Stunden bestimmt.

2.4.2.2 Kohortenstudie

Mithilfe biophysikalischer Messmethoden wurden Hautoberflächen-Gesamtlipidgehalt, pH-Wert, Stratum-corneum-Hydratation, TEWL-Wert, verschiedene Hauttopografie- wie auch Elastizitätsparameter bestimmt, zudem erfolgte eine Bestimmung der Lipidperoxid-Konzentration. Die einzelnen Parameter der Raucher in unterschiedlichen Altersgruppen und Geschlechtern wurden mit denen der Nichtraucher in unterschiedlichen Altersgruppen und Geschlechtern bezüglich verschiedener Fragestellungen miteinander in Korrelation gesetzt und einer Analyse und Bewertung unterzogen.

2.4.3 Geräte

- Corneometer[®] CM 825; Firma: Courage und Khazaka
- Küvetten: Einmalküvetten, 1,5 halbmikro; Firma: Brand
- Fotometer: Perkin Elmer UV/VIS Spektrometer Lambda 2S;
 Firma Perkin Elmer
- PP-Röhrchen: Cellstar, steril 15 ml; Firma: Greiner
- Rotationsevaporator: Rotavapor; Firma: Büchi
- Rotor: SLA-1500-Super-Lite; Firma: Sorvall
- Sebumeter[®] SM 810; Firma: Courage und Khazaka
- Skin pH-Meter[®] PH 900; Firma: Courage und Khazaka

- Spitzkolben: DIN N8 14/23; Firma: Lenz
- Tewameter[®] TM 210; Firma: Courage und Kazaka
- Expositionskammer (siehe Kapitel 2.1.7)
- Visioscan[®] VC 98; Firma: Courage und Khazaka
- Wasserbäder:

Für folgende Temperaturen verwendet:

- o 20 °C: Heidolph Instruments
- o 30 °C: GFL Gesellschaft für Labortechnik Typ 1004
- o 37 °C: Köttermann
- Zentrifuge: RC 5 C Plus; Firma: Sorvall
- Zylinder mit einem Durchmesser von 25 mm

2.5 Methoden zur Evaluierung der Zigarettennebenstromeffekte (in vivo)

2.5.1 Epidermale biophysikalische Messmethoden

2.5.1.1 Hautoberflächen-pH-Wert (Skin pH-Meter[®] PH 900)

Bei der Bestimmung des pH-Wertes der Hautoberfläche durch einen Skin pH-Meter[®] PH 900 handelt es sich um eine elektrochemische Messung mittels einer Glaselektrode, deren Besonderheit darin besteht, dass sie an ihrer Oberfläche eine selektive Durchlässigkeit für Wasserstoffprotonen besitzt. Bringt man eine solche Glaselektrode in eine Lösung unbekannten pH-Wertes, stellt sich über die Glaselektrode ein Gleichgewicht ein, das sich mit der Nernstschen Gleichung mathematisch fassen und woraus sich der pH-Wert ermitteln lässt. Bei dem verwendeten Gerät wird eine sogenannte Einstabmesskette eingesetzt, bei der eine Messglaselektrode und eine Referenzelektrode in einer einzigen Messsonde integriert sind. Die Ableitung des Potentials erfolgte mittels Elektroden aus Silberchlorid-Draht. Physiologisch liegen die pH-Werte an der Oberfläche der Haut zwischen 4,3 und 5,5 [Korting *et al.* 1990].

2.5.1.2 Stratum-corneum-Hydratation (Corneometer[®] CM 825)

Bei der Stratum-corneum-Hydratation handelt es sich um eine kapazitative Messung der Haut, das heißt, man bestimmt mittels eines Kondensators die Dielektrizität der Haut als einen relativen Wert. Sie beträgt für das reine Stratum corneum 3 und für reines Wasser 81. Je höher der Wassergehalt des Stratum corneums ausfällt, desto höher liegen die Messwerte bei der Dielektrizitätskonstante von Wasser. Im Sondenkopf des Corneometers befinden sich metallische Leiterbahnen aus Gold, die durch ein Glasplättchen von der Haut getrennt sind. Zwischen diesen Metallbahnen entsteht ein elektrisches Feld mit Elektronenüberschuss auf der einen Seite und Elektronenmangel auf der anderen Seite. Während der Messung durchdringt dieses elektrische Streufeld, was durch die Auflagefläche von 49 mm² und eine Messtiefe von circa 20 μ m definiert ist, die oberste Hautschicht, und die Dielektrizität wird gemessen [Nilsson 1977; Barel *et al.* 1996]. Bei sehr trockener Haut sind im Bereich des Gesichtes und des oberen Stammes Werte von unter 50, bei trockener Haut um 50-60 und bei ausreichend feuchter Haut über 60 zu erwarten (arbitrarische Einheiten). Im Bereich der Extremitäten liegen die Werte bei sehr trockener Haut unter 35, bei trockener Haut zwischen 35-50 und bei ausreichend feuchter Haut über 50.

2.5.1.3 Transepidermaler Wasserverlust (TEWL) (Tewameter® TM 210)

Die Messung des Transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) eignet sich insbesondere für die Quantifizierung von irritativen Reaktionen, da er die Integrität der Hautbarriere in entscheidendem Maße widerspiegelt [Pinnagoda *et al.* 1990]. Die Grundlage der Messung des Transepidermalen Wasserverlustes bildet die Tatsache, dass auch bei intakter Hautbarriere Wasser an die Umgebung durch Verdunstung abgegeben wird und sich dieser Effekt mithilfe des Diffusionsgesetzes nach Fick von 1855 $dm / dt = -D \times A \times dc / dx$ mathematisch fassen lässt. Der Diffusionsstrom von Wassermolekülen kann mithilfe von Elektronen, den sogenannten Hygrosensoren, gemessen werden. Schaltet man zwei Hygrosensoren hintereinander, sodass die Wassermoleküle beide Detektoren mit kurzem zeitlichem Abstand passieren, kann anhand der Zeitdifferenz die Menge an Wasser in g/m²h ermittelt werden. Der TEWL unterliegt physiologischen, hauttypabhängigen Schwankungen. Beim Hautgesunden liegen die Werte bei 2-5 g/m²h. Des Weiteren unterliegt der TEWL auch regionalen und tageszeitlichen Schwankungen [Pinnagoda *et al.* 1990].

2.5.1.4 Sebumetrie (Sebumeter[®] SM 810)

Die Messung der Hautoberflächenlipide, die sich aus Talgdrüsen- und interzellulären Stratum-corneum-Lipiden zusammensetzen, dient in erster Linie zur Bestimmung des Talgdrüsensekretionszustandes und eignet sich aus diesem Grund sehr gut zur Bewertung des Hautzustandes. Sebumeter ermöglichen die Quantifizierung der Hautoberflächenlipide. Das Prinzip eines Sebumeters besteht darin, dass ein lipidempfindliches, aber wasserunempfindliches Kunststoffband über einen bestimmten Zeitraum auf die Haut aufgebracht wird. Bei der Berührung mit Lipiden wird die Transparenz des Bandes erhöht. Diese Transparenzerhöhung wird im Anschluss fotometrisch gemessen. Die Änderung der Lichtdurchlässigkeit gilt als ein Maß für den Lipidgehalt der Hautoberfläche. Bei dem von uns verwendetem Gerät wird der Messkopf 30 s lang auf die Haut aufgebracht und anschließend der Fettgehalt mittels eines sogenannten Fettfleckfotometers in mg/cm² berechnet. Die Normalwerte unterliegen regionalen Schwankungen. Im Bereich der talgdrüsenreichen Hautareale, etwa im Gesicht, werden bei "trockener", sebostatischer Haut Werte von 40-100 mg/cm² angegeben; bei ,normaler' Haut liegen die Werte in talgdrüsenreichen Arealen bei 40-220 mg/cm²; bei ,fettiger', seborrhoischer Haut gehen die Werte über 100 mg/cm², die auf 220 mg/cm² und mehr ansteigen können. In Körperregionen mit wenigen Talgdrüsen, etwa den Extremitäten, liegen die Werte mit 0-6 mg/cm² wesentlich niedriger [Cunliffe et al. 1980; Pinnagoda et al. 1990; Nordstrom et al. 1986].

2.5.2 Dermale biophysikalische Messmethoden

2.5.2.1 Hauttopografie (Visioscan[®] VC 98)

Die Visioscan[®] bietet eine Methode zur Quantifizierung des Hautoberflächenreliefs. Sie funktioniert durch Auswertung fotografischer Aufnahmen mit einem mathematischen Berechnungsmodell für die aus den Materialwirtschaften entlehnten Parameter wie beispielsweise die mittlere Rautiefe. Außer den üblichen Rauigkeitsparametern können mit dem System zusätzliche sogenannte SELS(Surface Evaluation of Living Skin)-Parameter berechnet werden [Tronnier *et al.* 1997; Tronnier 2000]. Diese Messparameter entsprechen qualitativ und quantitativ den physiologischen Zuständen der Hautoberfläche, wodurch konstitutionelle, topische und altersabhängige Oberflächenstrukturen der Haut erfasst werden können.

Rauigkeitsparameter

In der in dieser Arbeit verwendeten Visioscan[®]-FireWire-Software werden die Ergebnisse nur als Index (in Graustufen) ausgedrückt und lehnen sich daher nur an die ursprünglichen Ra-Rz-Werte an. Die Rauigkeitsparameter werden als Mittelwert für mehrere Linien berechnet, die vorher ausgewählt wurden. Für die Berechnungen wurden kreisförmig angeordnete Linien gewählt, da hiermit der Einfluss der Richtung der Falten auf die Messung ausgeglichen wird. Von größerer Bedeutung für die Aussagekraft der durchgeführten Untersuchungen erwiesen sich die sogenannten SELS-Parameter, die eine Weiterentwicklung der Rauigkeitsparameter darstellen.

SELS(Surface Evaluation of Living Skin)-Parameter

Die SELS-Parameter, die von Tronnier *et al.* entwickelt wurden, um die Hautoberfläche zu charakterisieren, entsprechen sowohl qualitativ wie auch quantitativ dem physiologischen Zustand der Haut [Tronnier *et al.* 1997].

SEsc (scaliness, Schuppigkeit der Haut)

Der Parameter SE_{sc} gibt die Schuppigkeit der Haut wieder und zeigt damit den Trockenheitsgrad des Stratum corneums an.

ISup: Anzahl der Pixel, deren Grauwert höher ist als der Schwellenwert von SE_{sc} . SE_{sc} wird durch den Wendepunkt (Schlaufe) des Histogramms bestimmt (Punkt, an dem fiktive Tangenten die Richtung ändern würden) (Abb. 12). Je kleiner SE_{sc} , desto geringer die Schuppigkeit der Hornschicht (deutet auf höhere Hautfeuchtigkeit hin).



Abb. 12: Berechnung des Rauigkeitsfaktors SE_{sc}

SE_r, SE_{sm} und SE_w hängen von der Anzahl der Falten und ihrer Breite ab. Im gewählten Berechnungsrechteck werden rechnerisch horizontale und vertikale Linien gezogen. Aus diesen Profilen wird die mittlere Anzahl der Falten (Fax und Fay) und deren mittlere Breite (Fmx und Fmy) ermittelt.

SEr (roughness, Hautrauigkeit)

SE_r bezeichnet den Rauigkeitsfaktor und berechnet die Grauwerte oberhalb des gesetzten Limits im Verhältnis zum Gesamtbild (Abb.13).

linf: Anzahl der Pixel, deren Grauwert kleiner ist als der Schwellenwert von SE_r. SE_r wird durch den Inflexionspunkt (Wendepunkt) des Histogramms festgelegt.

Fa: Mittlere Anzahl der Falten horizontal und vertikal.

Je kleiner dieser Wert, desto weniger rau ist die Haut.



Abb. 13: Berechnung des Rauigkeitsfaktors SE_r

SE_{sm} (smoothness, Hautglätte)

Der Parameter SE_{sm} spiegelt die Hautglätte wider.

Co, Cu: Schwellenwerte von SE_{sm} als %-Anteil des Maximums des Histogramms. Dieser Faktor schneidet den unteren Teil des Histogramms ab, in dem häufig alle möglichen

Artefakte mitgemessen werden. Der Wert berechnet sich aus der mittleren Breite der Falten (Abb. 14).

Fm: Die mittlere Faltenbreite horizontal und vertikal.



Abb. 14: Berechnung des Rauigkeitsfaktors SE_{sm}

SE_w (wrinkles, Falten)

Der Faktor SE_w errechnet sich aus der Anzahl und mittleren Breite von horizontalen und vertikalen Falten.

Je mehr Falten und je breiter diese sind, desto höher der Ergebniswert.

 $SE_w = (Fmx + Fmy) \times 100/(Fax + Fay)$ mittlere Faltenbreite/mittlere Faltenanzahl

[Tronnier et al. 1997]

2.5.2.2 Elastizität (Cutometrie) (Cutometer[®] SEM 575)

Das Messprinzip zur Bestimmung der Elastizität der Hautoberfläche basiert auf der sogenannten Saugmethode (Suction/Elongation). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Unterdruck von 450 mbar angelegt. Die zu untersuchende Hautstelle wird während der Messung einige Millimeter in die Öffnung der Messsonde hineingesogen [Both 1998]. Die Eindringtiefe der Haut in die Öffnung wird durch ein optisches Messsystem erfasst. Die Öffnung der verwendeten Sonde besitzt einen Durchmesser von 2 mm. Das

optische Messsystem besteht aus einem Lichtsender und einem Lichtempfänger sowie zwei gegenüberliegenden Glasprismen, die das Licht vom Sender zum Empfänger leiten. Das Lichtverhältnis wird durch die Eindringtiefe der Haut proportional verändert, das heißt, das optische System misst in Abhängigkeit von der Hauteindringung die Abnahme der Lichtintensität eines infraroten Lichtstrahls [Pie`rard-Franchimont *et al.* 1996; Berardesca *et al.* 1995; Frosch *et* Kligman 1993; Blanken *et al.* 1987; Elsner *et al.* 1990; Marks 1997; Muizzuddin *et al.* 1990; Nilsson 1977].



Abb. 15: Schematische Darstellung einer Cutometriemessung. Auf der y-Achse ist die Eindringtiefe der Haut, auf der x-Achse der zeitliche Verlauf des Messvorganges dargestellt [Courage/Khazaka 2002]

Der erste Teil des Kurvenverlaufs wird als elastischer Teil angesehen, der in der Literatur als Ue (elastische Dehnung) bezeichnet wird: Ue = Uf - Uv (Abb.15).

Die Ue wird ungefähr nach einer Ansaugzeit von 0,1 s erreicht. Der zweite, sich abflachende Teil der Kurve stellt den viskoelastischen Anteil der Haut dar. Dieser Anteil der Kurve wird als Uv (viskoelastische Dehnung) bestimmt. Da vorwiegend die plastische Komponente gemessen wird, ist dieser Kurventeil bei einem hochelastischen
Material nicht oder kaum vorhanden. Die maximale Amplitude der Kurve Uf ergibt sich aus den ersten beiden Anteilen Ue und Uv: Uf = Ue + Uv.

Nach Beenden der Ansaugphase wird das Vakuum in der Messsonde auf 0 mbar zurückgestellt. Bei einem hochelastischen Material fällt die Kurve sofort senkrecht auf den Ausgangswert zurück, sodass Ur (elastische Rückstellung) = Uf wäre. Bei einem viskoelastischen Material können, je nach elastischer Beschaffenheit, erneut zwei Kurventeile beobachtet werden: der senkrecht abfallende elastische Anteil (Ur) und der sich gegen null abflachende viskoelastische, plastische Anteil (Ua – Ur).

Eine junge Haut zeigt, dass die Strecken Ur und Uf fast identisch sind; bei einer älteren Haut ist Ur deutlich kürzer (siehe Abb. 16).

Die Strecke Uf – Ua gibt die gesamte Eigenkraft der Haut zur Rückbildung wieder.

Die Ansaug- oder Aktionszeit entspricht dem Zeitraum, in dem die Haut in die Messsonde eingezogen wird. Sie stellt den ersten Teil der Messkurve dar und kann im Bereich zwischen 0,1 und 60 s liegen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Ansaugzeit von 5 s gewählt. Die Relaxationszeit (off-time) wird in dem von uns verwendeten Messmodus durch den zweiten Teil der Kurve dargestellt. Der Unterdruck ist hierbei abgeschaltet, sodass also das Verhalten der eingezogenen Haut bei Umgebungsdruck dokumentiert wird. Es ergeben sich dabei Anhaltspunkte über die Fähigkeit der Haut, ihre ursprüngliche Form wieder einzunehmen, wobei hier sowohl Elastizitäts- als auch Plastizitätseigenschaften der Haut eine Rolle spielen. Der mögliche Zeitraum entspricht dem der Ansaugzeit (5 s). Über die Anzahl der Messungen und das Verhalten der Haut lässt sich eine Aussage über deren Ermüdung treffen. In diesen Studien wurde ein Messzyklus aus fünf Wiederholungen verwendet. Abbildung 16 zeigt eine exemplarische Elastizitätsmessung einer reifen und einer jungen Haut:



Abb. 16: Exemplarische Darstellung zweier Elastizitätsmessungen; die blaue Kurve entspricht dem Kurvenverlauf einer alten Haut, die rote Kurve dem einer jungen

Elastizitätsparameter

Als Basis für die Berechnung der verschiedenen Elastizitätsparameter dienen zwölf Basiswerte (R0 bis R9, F0 und F1), die aus den aufgezeichneten Kurven (zum Beispiel Abb. 16) berechnet werden können und in den folgenden Ausführungen entsprechend ihren elastischen Eigenschaften aufgelistet werden:

Dynamik der Dehnung und Rückstellung:

R0-Wert: R0 = e(a) = Uf = Erste maximale Amplitude: Höchster Punkt der ersten Kurve; der Wert gibt Aufschluss über die Festigkeit der Haut; je niedriger die Amplitude, desto fester die Haut. Es wird das Verhalten der Haut auf passive Kraft dargestellt.

R1-Wert: R1 = e(a+b) = Niedrigster Punkt der ersten Kurve als Zeichen der Rückbildungsfähigkeit der Haut.

R8-Wert: R8 = e(b) = Ua der ersten Kurve. Je ähnlicher Ua und Uf, desto höher ist die Rückbildungsfähigkeit der Haut.

Elastische Eigenschaften:

R2-Wert: R2 = (e(a) - e(a+b)) / e(a) = Ua / Uf = Verhältnis zwischen maximaler Amplitude und Fähigkeit der Rückbildung (Bruttoelastizität); je näher an 1 (100 %), desto elastischer ist die Haut.

R5-Wert: |R5 = (e(a) - e(a + 0, 1)) / e(0, 1)| = Ur / Ue = Nettoelastizität; je näher an 1 (100 %), desto elastischer die Haut.

R6-Wert: R6 = (e(a) - e(0,1) / e(0,1)] = Uv / Ue = Anteil der Viskoelastizität am elastischen Teil der Kurve; je kleiner der Wert, desto höher die Elastizität.

R7-Wert: $\boxed{R7 = (e(a) - e(a+0,1)) / e(a)} = Ur / Uf = Anteil der Elastizität an der Gesamtkurve; je näher der Wert an 1 (100 %), desto elastischer die Haut.$

Ermüdungserscheinungen:

R3-Wert: $\boxed{R3 = e((r^*a) + ((r-1^*b)))} =$ Höchster Punkt der letzten Kurve. Verglichen mit der maximalen Amplitude der ersten Kurve lassen sich "Ermüdungserscheinungen" der Haut durch das Ansaugen feststellen, da die Fähigkeit zur Rückbildung immer mehr abnimmt und somit die Amplitude mit jeder Wiederholung höher wird.

R4-Wert: R4 = e((a + b)*r) = Letzter Messpunkt.

R9-Wert: R9 = R3 - R0: Gibt die ,Ermüdungserscheinungen' der Haut nach mehrmaligem Ansaugen wieder; je kleiner der Wert, desto niedriger die ,Ermüdungserscheinungen'.

Flächenparameter:

F0-Wert: Fläche über der Kurve während der Dehnung der Haut.

F1-Wert: Fläche unter der Kurve während der Relaxation der Haut.

Zur Erklärung:

a = eingestellte Ansaugzeit

b = eingestellte Relaxionszeit

r = eingestellte Anzahl der Wiederholungen

e(x) = Amplitude an der Stelle t = x

2.5.3 Lipidperoxid-Test

Theoretische Grundlagen

Mit dem Lipidperoxid-Test kann die Lipidperoxid-Konzentration auf der Hautoberfläche bestimmt werden. In der Anwesenheit von Hämoglobin werden Lipidhydroperoxide zu Hydroxylderivaten (Hydroxycarbonsäure) reduziert. Das 10-*N*-Methylcarbamoyl-3,7-dimethylamino-10 H-phenothiazin(MCDP)-Chromogen wird in äquivalenter molarer Reaktion zu Methylblau oxidiert (siehe Abb. 17). Die Lipidperoxide können durch kolometrische Messung des Methylblaus bei 675 nm quantifiziert werden [Ohishi *et al.* 1985; Pervaiz *et al.* 1992; Wang *et al.* 1994; Brown *et al.* 2003].





Der in dieser Arbeit verwendete LPO-CC-Kit baut auf dieser theoretischen Grundlage auf. Reagenz 1 setzt sich aus Ascorbat-Oxidase und Lipoprotein-Lipase und Reagenz 2 aus MCDP und Hämoglobin zusammen.

Durchführung

Nach randomisierter Zuordnung der Unterarme wurden an einem Unterarm die Lipide des Stratum corneums zunächst mit anhydriertem, nicht denaturiertem Ethanol herausgewaschen. Es wurde dafür ein offener Zylinder mit einem Durchmesser von 25 mm auf die Haut aufgesetzt und das Areal dreimalig mit jeweils einem Milliliter Ethanol gespült. Dieses Verfahren wurde an sechs nicht überlappenden Hautstellen wiederholt. Nach der Extraktion wurden die Proben entweder mit einem 0,22 µm Millex-Filter gefiltert oder 3 min bei 2500 Upm (Sorwall) zentrifugiert. 5 ml des Überstandes wurden in einen Spitzkolben überführt und in einem Rotationsevapurator bei einer Temperatur von 20 °C (Wasserbad) getrocknet. Die Probe wurde anschließend in 100 µl Ethanol resuspendiert. Nach Inkubation des Reagenz 1 (Enzym) und 2 (Chromogen) des LPO-CC-Kits für 15 min bei 37 °C wurden 0,1 ml der Probe beziehungsweise des Standards

mit 1 ml des Reagenz 1 versetzt und für 5 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde Reagenz 2 hinzugefügt und diese Lösung wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Lipidperoxide wurden im Anschluss durch kolometrische Messung des Methylenblaus bei 675 nm quantifiziert [Pelle *et al.* 2002, Picardo *et al.* 1991]. Der Kit wurde mit den Proben von sechs Probanden und einem Kit-internen Standard jeweils parallel laufen gelassen.

LPO-Wert-Bestimmung:

Der LPO-Wert kann mit folgender Gleichung bestimmt werden:

LPO in nmol/ml = $(EP - E0) \times 50,0 / (Estd - E0)$

- EP: Extinktion der Probe
- E0: Extinktion Null-Wert (Küvette mit Ethanol)
- Estd: Extinktion des Standards

2.6 Statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung

Ein Signifikanzniveau von p = 0 wurde als höchst signifikant gewertet, das von p \leq 0,1 als hoch signifikant sowie p \leq 0,5 als statistisch signifikant.

Fragen zu Lebensgewohnheiten

Zur Analyse der erhobenen Score-Werte für die Lebensgewohnheiten von Rauchern beziehungsweise Nichtrauchern wurden die Mittelwerte errechnet und statistisch aufgrund der Ordinalskalierung unabhängig von ihrer Verteilungsform mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Statistikprogramms SPSS 11,5 für Windows [Glantz 1998].

Biophysikalische In-vivo-Messungen an der Haut des Unterarms von Nichtrauchern nach Zigarettennebenstromexposition

Die erhobenen Messwerte (intervall- oder verhältnisskaliert) der einzelnen biophysikalischen Parameter und der Lipidperoxid-Konzentration vor, unmittelbar nach, 2 Stunden nach, 6 Stunden nach und 24 Stunden nach Exposition wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Anschließend wurden die Messwerte der einzelnen Parameter bei Normalverteilung mit dem t-Test (bei gepaarten Stichproben) und bei Nichtnormalverteilung mit dem Wilcoxon-Test (Test bei zwei verbundenen Stichproben) auf signifikante Unterschiede zu den Ausgangswerten geprüft. Auch hier erfolgte die Auswertung mithilfe des Statistikprogramms SPSS 11,5 für Windows [Glantz 1998].

Biophysikalische Messungen, klinische Evaluation und Lipidperoxid-Konzentration an der Haut von Rauchern und Nichtrauchern unterschiedlichen Alters und Geschlecht Zur Analyse der erhobenen Messwerte (intervall- oder verhältnisskaliert) der einzelnen biophysikalischen Parameter sowie der Lipidperoxid-Konzentration wurden die Mittelwerte errechnet und statistisch mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Die Messwerte der einzelnen Parameter wurden anschließend mit dem t-Test (für unabhängige Variablen) bei Normalverteilung und mit dem Mann-Whitney-U-Test bei Nichtnormalverteilung auf Signifikanz geprüft. Auch hier erfolgte die Auswertung mithilfe des Statistikprogramms SPSS 11,5 für Windows [Glantz 1998].

Mittelwerte, Standartfehler und Standartabweichung sind im Anhang aufgeführt.

3 Ergebnisse

In-vitro-Untersuchungen (Teil 1)

Mithilfe einer humanen keratinozytären Zelllinie wurden zunächst *in vitro* geeignete Konditionen etabliert, welche im Anschluss auf *In-vivo*-Versuche übertragen werden.

3.1 Etablierung geeigneter Konditionen

3.1.1 Kultivierung von HaCaT-Zellen

Die HaCaT-Zellen wurden parallel in RPMI-Medium mit Phenolrot und in phenolrotfreiem DMEM-Medium kultiviert. Es konnte vor allem in Bezug auf die Zellmorphologie und das Zellwachstum kein Unterschied zwischen RPMI- und DMEM-Medium festgestellt werden. Die HaCaT-Zellen wurden daraufhin ausschließlich in DMEM-Medium mit Zusätzen kultiviert. Die derart kultivierten HaCat-Zellen sind in den Abbildungen 18, 19 und 20 dargestellt (Invert-Lichtmikroskop: Olympus CK 40):



Abb. 18: Fotografische Darstellung (im Invert-Lichtmikroskop) konfluenter HaCaT-Zellen (Vergrößerung: 10 x)



Abb. 19: Fotografische Darstellung (im Invert-Lichtmikroskop) konfluenter HaCaT-Zellen (Vergrößerung: 20 x)

Keratinozyten in den lebenden Schichten der Epidermis nehmen eine geometrische Form (sogenannte Tetrakaidekaeder, ein Körper mit acht hexagonalen und sechs quadratischen Seitenflächen) an. Diese Form bietet den Keratinozyten die Möglichkeit, am oberflächensparensten zwischenraumlos gepackt werden zu können [Fritsch 1998]. Die verwendeten Zellen der permanenten humanen HaCaT-Zelllinie wiesen die typische Morphologie von Keratinozyten auf [Boukamp *et al.*1988; Ryle *et al.*1989].

In der Zellkultur nahmen die HaCaT-Zellen im konfluenten Zustand wie auch die Keratinozyten in den lebenden Schichten der Epidermis eine polygonale Form an. Befanden sich die Zellen in einem nicht konfluentem Zustand, so versuchten sie mit anderen Zellen durch Ausbildung von langen, dünnen Zellfortsätzen in Verbindung zu treten.



Abb. 20: Fotografische Darstellung (im Invert-Lichtmikroskop) nicht-konfluenter HaCaT-Zellen mit Zellfortsätzen (dankenswerterweise von Dr. D. Möller, Dermatologikum Hamburg, zur Verfügung gestellt)

Das Wachstumsverhalten der HaCaT-Zellen während der gesamten Kulturdauer verhielt sich wie in der Literatur beschrieben [Boukamp *et al.*1988; Ryle *et al.*1989].

Für die folgenden Zellversuche wurden HaCaT-Zellen der 45.-75. Passage, die eine 60-70 %ige Konfluenz aufwiesen, eingesetzt.

Wenn nicht anders beschrieben, werden in den folgenden Abbildungen die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen aus mindestens drei wiederholten Versuchen dargestellt.

3.1.2 Zytotoxizität verschiedener SDS-Konzentrationen

Um für die nachfolgenden Versuche geeignete Konditionen zu etablieren, wurde zunächst die Auswirkung von Natriumlaurylsulfat (SDS) auf die Membranintegrität von HaCaT-Zellen im Neutralrotfreisetzungstest untersucht. Die HaCaT-Zellen wurden erst auf 24- und anschließend auf 6-Loch-Platten kultiviert.

HaCaT-Zellen auf 24-Loch-Platten kultiviert

Ohne SDS-Exposition lag die optische Dichte bei 0,617 \pm 0,037, fiel mit zunehmender SDS-Molarität ab, um bei 0,75 mM einen Tiefpunkt (0,494 \pm 0,005) zu erreichen (Abb. 21). Wurde eine Molarität von 1 mM überschritten, begannen einige Zellen zu lysieren.



Abb. 21: Grafische Darstellung der zytotoxischen Wirkung verschiedener SDS-Konzentrationen (n = 9) [Fotometer: Eppendorf]

HaCaT-Zellen auf 6-Loch-Platten kultiviert

Die HaCaT-Zellen wurden auf 6-Loch-Platten kultiviert. Die optische Dichte im Neutralrotfreisetzungstest lag ohne SDS-Exposition bei 0,800 \pm 0,01. Wurden die Zellen mit ansteigender SDS-Molarität exponiert, kam es zu einem starken Abfall der optischen Dichte auf 0,603 \pm 0,047 bei einer Molarität von 0,4 mM. Bei 0,5 mM reduzierten sich die Werte auf 0,588 \pm 0,007, die dann noch weiter auf 0,520 \pm 0,031 bei 0,7 mM und 0,483 \pm 0,023 bei 0,8 mM abfielen (Abb. 22).



Abb. 22: Grafische Darstellung der zytotoxischen Wirkung verschiedener SDS-Konzentrationen (n = 6) [Fotometer: Eppendorf]

Wurden die optischen Dichten von auf 24-Loch-Platten mit denen auf 6-Loch-Platten kultivierten Zellen, die mit verschiedenen SDS-Konzentrationen exponiert wurden, verglichen, wiesen die beiden Ausgangswerte die größte Differenz auf (0,183 \pm 0,03). Mit zunehmender SDS-Konzentration reduzierte sich die Differenz der optischen Dichten, bei einer SDS-Konzentration von 0,7mM lag die Differenz bei 0,026 \pm 0,03 (Abb. 23).



SDS [mM]

Abb. 23: Grafische Darstellung der Differenz zwischen auf 6- und 24-Loch kultivierten Zellen nach Exposition mit verschiedenen SDS-Konzentrationen

3.2 Evaluierung der Zigarettennebenstromeffekte (in vitro)

3.2.1 PBS-Überstand

Zur Evaluierung der zytotoxischen Auswirkungen verschiedener Volumina PBS-Überstand nach Zigarettennebenstromexposition in der Expositionskammer wurden 6-Loch-Platten kultivierte HaCaT-Zellen mit verschiedenen PBS-Volumina 15 min mit Zigarettennebenstrom exponiert und im Neutralrotfreisetzungstest untersucht.

Bei einem Überstand von 0 μ l PBS lag der Ausgangswert bei einer optischen Dichte von 0,780 ± 0,041, fiel dann bis zu einem Überstand von 1000 μ l kontinuierlich auf 0,622 ± 0,087 ab, um sich dann wieder dem Ausgangswert asymptotisch anzunähern. Bei einem Überstand von 2000 μ l stiegen die Werte (0,705 ± 0,067) fast wieder auf das Ausgangsniveau (Abb. 24).



Abb. 24: Grafische Darstellung der Zytotoxizität verschiedener Volumina PBS-Überstand bei Zigarettennebenstromexposition (n = 12) [Fotometer: Eppendorf]

Die optische Dichte für 0 μ l, 100 μ l, 1000 μ l und 2000 μ l PBS-Überstand werden zur besseren Übersicht in einem Säulendiagramm erneut dargestellt (Abb. 25).



Volumen-PBS [µl]

Abb. 25: Grafische Darstellung der Zytotoxizität von 0 μ , 500 μ l, 1000 μ l und 2000 μ l PBS-Überstand bei Rauchexposition (n = 12) [Fotometer: Eppendorf]

3.2.2 pH-Werte von PBS nach Zigarettennebenstromexposition

Um die Veränderung des pH-Wertes von PBS nach Zigarettennebenstromexposition zu bestimmen, wurden Petrischalen (35/10 mm) mit 1 ml PBS 15 min lang in dem zuvor generierten Zigarettennebenstromrauch exponiert. Der pH-Wert des PBS stieg von 7,3 \pm 0,1 vor Exposition auf 8,0 \pm 0,1 nach Exposition höchst signifikant an (p < 0,001) (Abb. 26).



Abb. 26: Grafische Darstellung der pH-Werte von 1 ml PBS in einer Petrischale vor und nach 15 min Zigarettennebenstromexposition (n = 9)

3.2.3 Zytotoxizität von Zigarettennebenstrom

Die optische Dichte der unbehandelten, auf 6-Loch-Platten kultivierten Zellen im Neutralrotfreisetzungstest lag bei 0,79 \pm 0,015. Dieser Wert reduzierte sich deutlich nach 15 min Zigarettennebenstromexposition auf 0,71 \pm 0,002 (Abb. 27).



Abb. 27: Grafische Darstellung der Zytotoxizität von Zigarettennebenstrom (n = 9) [Fotometer: Perkin Elmer]

3.2.4 Zytotoxizität von Zigarettennebenstrom mit anschließender SDS-Exposition

Auf 6-Loch-Platten kultivierte Zellen wurden nach Zigarettennebenstromexposition mit zwei verschiedenen SDS-Konzentrationen exponiert. Die optische Dichte lag bei einer Exposition mit 0,8 mM SDS bei 0,435 \pm 0,0028 und mit 1,0 mM SDS bei 0,400 \pm 0,02 (Abb. 28).





Abb. 28: Grafische Darstellung der Zytotoxizität von Zigarettennebenstrom mit anschließender SDS-Exposition (n = 9) [Fotometer: Eppendorf]

Auf 6-Well-Platten kultivierte Zellen wurden einerseits mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen, andererseits zunächst mit verschiedenen SDS-Konzentrationen und im Anschluss mit Zigarettennebenstrom exponiert. Bei gleicher SDS-Konzentration wiesen die Zellen mit zusätzlicher Zigarettennebenstromexposition deutlich niedrigere optische Dichten im Neutralrotfreisetzungstest auf. Die Differenz der einfach und doppelt exponierten Werte nahm bis zu einer Konzentration von 0,8 mM zu und pendelte sich dann auf eine gleich bleibende Differenz ein (Abb. 29).



Abb. 29: Grafische Darstellung der Zytotoxizität von verschiedenen SDS-Konzentrationen ohne/mit anschließender Zigarettennebenstromexposition (n = 9) [Fotometer: Eppendorf]

3.2.5 Vergleich der Zytotoxizität von SDS-Exposition vor und nach Zigarettennebenstromexposition

Wurden Zellen, die auf 6-Loch-Platten kultiviert wurden, im Neutralrotfreisetzungstest untersucht, so ergab sich ohne Exposition ein Ausgangswert von $0,79 \pm 0,006$. Bei Zigarettennebenstromexposition reduzierte sich die optische Dichte auf $0,711 \pm 0,002$. Eine 0,8 mM SDS-Exposition reduzierte die optische Dichte auf $0,60 \pm 0,026$. Zu einer weiteren Reduktion kam es, wenn die Zellen erst mit Zigarettennebenstrom und im Anschluss mit 0,8 mM SDS exponiert wurden ($0,44 \pm 0,028$). Wurden die Zellen hingegen erst mit 0,8 mM SDS und anschließend mit Zigarettennebenstrom exponiert, so reduzierte sich die optische Dichte noch weiter auf $0,23 \pm 0,020$ (Abb. 30).



Abb. 30: Grafische Darstellung des Vergleichs der Zytotoxizität von 0,8 mM SDS-Exposition vor und nach Zigarettennebenstromexposition (n=9) [Fotometer: Eppendorf]

In-vivo-Untersuchungen (Teil 2 und Teil 3)

3.3 Lebensgewohnheiten der Probanden

Die Probanden wurden einer Befragung hinsichtlich allgemeiner hautbelastender Faktoren unterzogen (Fragebogen siehe Anhang), um der Frage nachzugehen, ob die ermittelten Unterschiede bezüglich der Hautphysiologie zwischen Rauchern und Nichtrauchern in erster Linie auf das Rauchen als Hauptnoxe zurückzuführen sind.

Raucher und Nichtraucher unterschieden sich statistisch bei folgenden Faktoren nicht signifikant: Anzahl an Sonnenbädern, Anzahl an Solariumbesuchen im Jahr, Freiluftaufenthalten, Ernährungsgewohnheiten, tägliche Flüssigkeitszufuhr und letzter Zeitpunkt des Eincremens des zu untersuchenden Unterarms. Statistisch signifikante Unterschiede bestanden hingegen in den folgenden Merkmalen: Raucher konsumierten mehr Alkohol (p = 0,005) und Kaffee (p = 0), trieben weniger Sport (p = 0,0003) und benutzten häufiger Pflegeprodukte (p = 0,004).

Es wurden die Sebumetrie-Werte der Probanden erhoben, um zu kontrollieren, ob das Prüfareal vor weniger als zehn Stunden entgegen der Vorschrift topisch behandelt worden war. Bei zwei Probanden wurden erhöhte Sebumetrie-Werte gemessen, was zum Ausschluss dieser Probanden aus den Studien führte.

Aus dem Probandenpool wurden zehn Nichtraucher im Alter von 32-50 Jahren (mittleres Alter + SD ($36,0 \pm 6,55$); 8 Frauen und 2 Männer) nach der Eingangsuntersuchung mit standardisiertem Zigarettennebenstromrauch exponiert.

In die Kohortenstudie zum Vergleich der Hautphysiologie von Rauchern/Nichtrauchern in den verschiedenen Altersgruppen und Geschlechtern wurden 103 Probanden im Alter von 20 bis 90 Jahren aufgenommen (mittleres Alter + SD (43,87 \pm 19,93); 54 Frauen und 49 Männer; 49 Raucher und 54 Nichtraucher).

3.4 Evaluierung der Zigarettennebenstromeffekte (in vivo)

Die Unterarme der Probanden wurden mit Zigarettennebenstromrauch exponiert. PH-Wert, Stratum-corneum-Hydratation, TEWL-Wert und Lipidperoxid-Konzentration der Probanden wurden vor, direkt nach Exposition, nach zwei Stunden, nach sechs Stunden und nach 24 Stunden bestimmt.

3.4.1 Hautoberflächen-pH-Wert

Die Messung des pH-Wertes der Hautoberfläche erfolgte an dem durch Randomisierung ermittelten Unterarm. Vor Zigarettennebenstromexposition betrug der mittlere pH-Wert 5,07 \pm 0,47 (n = 9). Unmittelbar nach Exposition stieg der mittlere pH-Wert auf einen Wert von 6,08 \pm 0,41 höchst signifikant an (p = 0) (Abb. 31). Zwei Stunden nach Exposition reduzierte sich der mittlere pH-Wert auf 5,61 \pm 0,54, was einen höchst statistischen Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert (p = 0) darstellt. Nach sechs Stunden reduzierte sich der mittlere pH-Wert auf 5,27 \pm 0,51. Ein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert bestand nicht mehr (p = 0,067). Der mittlere pH-Wert lag 24 Stunden nach Exposition bei 4,99 \pm 0,46 und unterschied sich nicht signifikant zum Ausgangswert (p = 0,169).



Zeitpunkte

Abb. 31: Hautoberflächen-pH-Werte vor und nach Zigarettennebenstromexposition im Zeitverlauf (t0 = vor Exposition; t1 = direkt nach Exposition; t2 = 2 h nach Exposition; t6 = 6 h nach Exposition; t24 = 24 h nach Exposition; * = statistisch signifikant)

3.4.2 Stratum-corneum-Hydratation

Bei der Stratum-corneum-Hydratationsmessung lagen die gemessenen Ausgangswerte mit 37,76 \pm 6,83 (n = 9) im physiologischen Bereich. Die Werte bewegten sich zu keinem Zeitpunkt nach der Exposition aus diesem physiologischen Bereich (t1 = 38,77 \pm

7,34; t2 = $38,5 \pm 5,99$; t6 = $39,76 \pm 6,67$; t24 = $39,17 \pm 6,5$) (Abb. 32). Es gab zu keinem Zeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied zum Ausgangswert (p(t2 vs t0) = 0,415; p(t6 vs t0) = 0,157; p(t24 vs t0) = 0,261).



Abb. 32: Stratum-corneum-Hydratations-Werte vor und nach Zigarettennebenstromexposition im Zeitverlauf (t0 = vor Exposition; t1 = direkt nach Exposition; t2 = 2 h nach Exposition; t6 = 6 h nach Exposition; t24 = 24 h nach Exposition)

3.4.3 Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)

Die Ausgangswerte der TEWL-Messung lagen mit 13,21 g/m²xh \pm 2,2 g/m²xh im physiologischen Bereich. Direkt nach Rauchexposition konnte keine signifikante Veränderung der TEWL-Werte festgestellt werden (im Mittel 12,87 g/m²xh \pm 2,97 g/m²xh). Zwei Stunden nach Exposition kam es zu einem leichten Anstieg auf 13,97 g/m²xh \pm 2,57 g/m²xh und nach sechs Stunden auf 14,2 g/m²xh \pm 3,43 g/m²xh. Der Wert betrug 24 Stunden nach Exposition 13,31 g/m²xh \pm 2,16 g/m²xh (Abb. 33). Es gab zu keinem Zeitpunkt eine statistische Signifikanz im Vergleich zum Ausgangswert (p(t2 vs t0) = 0,595; p(t6 vs t0) = 0,416; p(t24 vs t0) = 0,810).



Abb. 33: TEWL-Werte vor und nach Zigarettennebenstromexposition im Zeitverlauf. (t0 = vor Exposition; t1 = direkt nach Exposition; t2 = 2 h nach Exposition; t6 = 6 h nach Exposition; t24 = 24 h nach Exposition)

3.4.4 Lipidperoxid-Konzentration

Die Ausgangskonzentrationen befanden sich mit 131,93 nmol/ml \pm 123,95 nmol/ml (n = 9) in dem als physiologisch angegebenen Bereich. Direkt nach Exposition kam es zu einem geringfügigen, jedoch nicht signifikanten Abfall der Konzentration auf 113,51 nmol/ml \pm 100,88 nmol/ml, die zwei Stunden nach Exposition statistisch signifikant auf die Werte von 109,97 nmol/ml \pm 107,22 nmol/ml (p = 0,028) und sechs Stunden nach Exposition auf die Werte 109,33 nmol/ml \pm 104,95 nmol/ml (p = 0,60) weiter sanken. 24 Stunden nach Rauchexposition gab es hingegen einen deutlichen Anstieg auf 158,09 nmol/ml \pm 127,64 nmol/ml, der statistisch jedoch nicht signifikant zum Ausgangswert war (p = 0,93) (Abb. 34).



Abb. 34: LPO-Werte [nmol/ml] vor und nach Zigarettennebenstromexposition im Zeitverlauf (t0 = vor Exposition; t1 = direkt nach Exposition; t2 = 2 h nach Exposition; t6 = 6 h nach Exposition; t24 = 24 h nach Exposition)

3.5 Kohortenstudie in vivo (Teil 3)

In einer Kohortenstudie wurden biophysikalische Messungen und Lipidperoxid-Konzentrationen an der Haut von Rauchern und Nichtrauchern unterschiedlichen Alters und Geschlechts ermittelt. Die einzelnen Parameter der Raucher in unterschiedlichen Geschlechtern Altersgruppen und wurden mit denen der Nichtraucher in unterschiedlichen Geschlechtern Altersgruppen und bezüglich verschiedener Fragestellungen miteinander verglichen.

3.5.1 Epidermale biophysikalische Messungen

3.5.1.1 Hautoberflächen pH-Wert

Die erhobenen mittleren pH-Werte der Hautoberfläche aller Raucher (5,03 \pm 0,60), unabhängig von ihrem Alter oder Geschlecht, waren signifikant (p = 0,021) gegenüber denen aller Nichtraucher (4,77 \pm 0,52) erhöht (Abb. 35).



Abb. 35: Vergleich der Hautoberflächen-pH-Werte von Rauchern (schwarz) versus Nichtrauchern (blau-pink)

Wurden die mittleren pH-Werte der Männer, unabhängig von ihrer Altersgruppe oder ihren Rauchgewohnheiten (4,66 \pm 0,50), mit denen der Frauen, ebenfalls unabhängig

von ihrer Altersgruppe oder ihren Rauchgewohnheiten (5,12 \pm 0,55), verglichen, waren die pH-Werte der Männer höchst signifikant niedriger (p = 0) (Abb. 36).



Abb. 36: Vergleich der Hautoberflächen-pH-Werte von Männern (blau) versus Frauen (pink)

Die pH-Werte der Raucherinnen (5,24 \pm 0,56) waren gegenüber denen der Raucher (4,81 \pm 0,57) signifikant erhöht (p = 0,09). Auch beim Vergleich der mittleren pH-Werte der Nichtraucherinnen (5,01 \pm 0,53) mit denen der Nichtraucher (4,51 \pm 0,38) konnte eine signifikante Erhöhung ermittelt werden (p = 0) (Abb. 37).



Abb. 37: Vergleich der Hautoberflächen-pH-Werte von Rauchern (blau)/Nichtrauchern (blau-schwarz) versus Raucherinnen (pink)/Nichtraucherinnen (pink-schwarz)

Vergleicht man die mittleren Hautoberflächen-pH-Werte aller Raucherinnen (5,24 \pm 0,56), so waren sie gegenüber denen aller Nichtraucherinnen (5,01 \pm 0,53) nicht signifikant erhöht (p = 0,123). Der Vergleich aller Männern, die rauchen (4,81 \pm 0,57), mit allen, die nicht rauchen (4,51 \pm 0,37), ergab eine signifikante Erhöhung (p = 0,03). Der mittlere Hautoberflächen-pH-Wert von Männern der Altersgruppe 1 und 3, die rauchen (Altersgruppe 1: 4,93 \pm 0,59; Altersgruppe 3: 5,10 \pm 0,61), waren gegenüber den mittleren pH-Werten von Nichtrauchern derselben Altersgruppen (Altersgruppe 1: 4,47 \pm 0,51; Altersgruppe 3: 4,42 \pm 0,33) deutlich erhöht. Dieser Vergleich erwies sich nur bei der Altersgruppe 3 als statistisch signifikant (p = 0,025). In der Altersgruppe 2 waren die mittleren pH-Werte der Nichtraucher (4,61 \pm 0,24) leicht, allerdings statistisch nicht signifikant gegenüber denen der Raucher (4,41 \pm 0,23) erhöht (p = 0,093) (Abb. 38). Der Vergleich der Altersgruppen der Männer untereinander hinsichtlich des Hautoberflächen-pH-Wertes erbrachte keine statistische Signifikanz.



Abb. 38: Vergleich der Hautoberflächen-pH-Werte von Männern verschiedener Altersgruppen und Rauchgewohnheiten (Raucher blau-schwarz; Nichtraucher blau)

Der mittlere pH-Wert von Raucherinnen der Altersgruppe 1 (5,56 \pm 0,48) war statistisch hoch signifikant gegenüber dem mittleren pH-Wert der Nichtraucherinnen derselben Altersgruppe (4,81 \pm 0,43) erhöht (p = 0,004). In der Altersgruppe 2 war der mittlere Hautoberflächen-pH-Wert der Raucherinnen (4,96 \pm 0,48) gegenüber dem der Nichtraucherinnen (5,22 \pm 0,65) etwas erniedrigt, der Unterschied erwies sich jedoch statistisch als nicht signifikant (p = 0,335), wohingegen in der Altersgruppe 3 der mittlere pH-Wert der Raucherinnen (5,28 \pm 0,60) gegenüber dem der Nichtraucherinnen (4,98 \pm 0,41) wieder leicht erhöht war (p = 0,252) (Abb. 39). Dieser Unterschied ergab keine statistische Signifikanz. Bei dem Vergleich der verschiedenen Altersgruppen untereinander konnte ebenfalls keine statistische Signifikanz ermittelt werden.



Abb. 39: Vergleich der Hautoberflächen-pH-Werte von Frauen verschiedener Altersgruppen und Rauchgewohnheiten (Raucherinnen pink-schwarz; Nichtraucherinnen pink)

Auch beim Vergleich von Frauen unter 47 Jahren mit Frauen, die 47 Jahre und älter waren, wie auch beim Vergleich von Raucherinnen mit Nichtraucherinnen unter 47 Jahren und Raucherinnen mit Nichtraucherinnen, die 47 Jahre und älter waren, konnte hinsichtlich der mittleren Hautoberflächen-pH-Werte kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden. Wurden jedoch die pH-Werte von Männern der Altersgruppe 1 (4,71 ± 0,59) mit denen von Frauen der entsprechenden Altersgruppe (5,16 ± 0,59) verglichen, so waren die pH-Werte der Frauen statistisch signifikant höher (p = 0,027). Auch der Vergleich von Raucherinnen der Altersgruppe 1 (5,56 ± 0,48) mit Rauchern derselben Altersgruppe (4,93 ± 0,59) ergab eine statistisch signifikante Erhöhung (p = 0,027), während derselbe Vergleich unter Nichtrauchern keine statistische Signifikanz aufwies. Der Vergleich der mittleren pH-Werte von Männern der Altersgruppe 2 (4,51 ± 0,25) mit denen von Frauen derselben Altersgruppe (5,09 ± 0,57) erwies sich als statistisch signifikant, die pH-Werte der Frauen waren hierbei höchst signifikant erhöht (p = 0). Beim Vergleich von Rauchern der Altersgruppe 2 (4,41 ± 0,23) gegenüber Raucherinnen der entsprechenden Altersgruppe 2 (4,41 ± 0,23)

statistisch hoch signifikante Erniedrigung festgestellt werden (p = 0,009). Ebenso verhielt sich der Vergleich von Nichtrauchern der Altersgruppe 2 (4,61 \pm 0,24) mit Nichtraucherinnen der Altersgruppe 2 (5,22 \pm 0,65) hinsichtlich der mittleren pH-Werte. Es konnte hierbei ebenfalls eine statistisch hoch signifikante Erniedrigung ermittelt werden (p = 0,017).

3.5.1.2 Stratum-corneum-Hydratation

Die mittleren Stratum-corneum-Hydratationswerte aller Raucher (40,12 \pm 8,72), unabhängig von ihrem Alter oder Geschlecht, waren gegenüber denen aller Nichtraucher (42,65 \pm 9,44) statistisch nicht signifikant reduziert (p = 0,164) (Abb. 40).



Abb. 40: Vergleich der Stratum-corneum-Hydratationswerte von Rauchern (schwarz) versus Nichtrauchern (blau-pink)

Beim Vergleich der Stratum-corneum-Hydratationswerte aller Männer (41,52 \pm 10,4) mit denen aller Frauen (41,42 \pm 7,95) konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden (p = 0,952). Auch der Vergleich von Männern, die rauchen (40,58 \pm 10,61), mit Männern, die nicht rauchen (42,39 \pm 10,35), erbrachte keinen statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich der mittleren Stratum-corneum-Hydratationswerte (p = 0,551).

Ebenso verhielt es sich bei den Raucherinnen (39,67 \pm 6,63) mit Nichtraucherinnen (42,87 \pm 8,75) (p = 0,147). Die Stratum-corneum-Hydratationswerte von Männern der Altersgruppe 1 waren im Vergleich zu denen von Männer der anderen Altersgruppen am niedrigsten (Raucher: 34,96 \pm 7,68; Nichtraucher: 34,22 \pm 6,13). In der Altersgruppe 2 waren die Werte der Raucher (44,33 \pm 9,78) verglichen mit denen der Nichtraucher (44,21 \pm 10,86) nahezu identisch. Die Stratum-corneum-Hydratationswerte von Männern der Altersgruppe 3 waren im Vergleich zu den anderen Altersgruppen am höchsten (Raucher: 45,79 \pm 13,34; Nichtraucher: 50,57 \pm 6,19). Keiner der Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern erwies sich als statistisch signifikant. Die Altersgruppe 2 (44,27 \pm 10,03) war hingegen gegenüber der Altersgruppe 1 (34,61 \pm 6,81) hinsichtlich der Stratum-corneum-Hydratationswerte statistisch hoch signifikant erhöht (p = 0,002) (Abb. 41).



Abb. 41: Stratum-corneum-Hydratationswerte von Männern verschiedener Altersgruppen und Rauchgewohnheiten im Vergleich (Raucher blau-schwarz; Nichtraucher blau)

Beim Vergleich der mittleren Stratum-corneum-Hydratationswerte von Raucherinnen mit Nichtraucherinnen verschiedener Altersgruppen waren die Werte der Raucherinnen der Altersgruppe 1 ($36,3 \pm 3,93$) am niedrigsten, die der Nichtraucherinnen derselben Altersgruppe ($44,34 \pm 10,71$) deutlich, wenngleich statistisch nicht signifikant höher (p = 0,061). Ebenfalls geringer im Vergleich zu den Nichtraucherinnen ($44,75 \pm 9,21$) waren die Werte der Raucherinnen in der Altersgruppe 3 ($40,60 \pm 6,13$). Die Werte der Raucherinnen in der Altersgruppe 2 ($41,82 \pm 7,97$) waren gegenüber denen der Nichtraucherinnen ($39,68 \pm 5,85$) leicht erhöht (Abb. 42). Weder die Unterschiede zwischen Raucherinnen und Nichtraucherinnen noch die der Altersgruppen untereinander erwiesen sich als statistisch signifikant.



Abb. 42: Stratum-corneum-Hydratationswerte von Frauen verschiedener Altersgruppen und Rauchgewohnheiten im Vergleich (Raucherinnen pink-schwarz; Nichtraucherinnen pink)

Beim Vergleich aller Männer der Altersgruppe 1 (34,61 \pm 6,81) gegenüber allen Frauen derselben Altersgruppe (40,55 \pm 9,01) konnte hingegen hinsichtlich der Stratumcorneum-Hydratationswerte eine statistisch signifikante Erniedrigung ermittelt werden (p = 0,031). Der Vergleich der mittleren Stratum-corneum-Hydratationswerte von Rauchern der Altersgruppe 1 (34,96 \pm 7,68) mit denen von Raucherinnen der Altersgruppe 1 $(36,40 \pm 3,93)$ erwies sich als statistisch nicht signifikant. Die Stratum-corneum-Hydratationswerte von Nichtrauchern der Altersgruppe 1 ($34,22 \pm 6,13$) waren hingegen gegenüber denen von Raucherinnen derselben Altersgruppe ($44,34 \pm 10,71$) signifikant niedriger (p = 0,026). Alle weiteren Vergleiche erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

3.5.1.3 Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)

Die erhobenen TEWL-Werte aller Raucher (11,05 g/m²xh \pm 3,04 g/m²xh), unabhängig von ihrem Alter oder Geschlecht, waren gegenüber denen aller Nichtraucher (11,33 g/m²xh ± 2,21 g/m²xh) minimal reduziert. Diese Reduktion wies keine statistische Signifikanz auf (p = 0,617). Auch der Vergleich der mittleren TEWL-Werte von allen Männern (11,56 g/m²xh ± 2,51) mit denen von allen Frauen (10,92 g/m²xh ± 2,74 g/m^2xh) erbrachte keinen statistisch signifikanten Unterschied (p = 0,249). Ebenso verhielt es sich beim Vergleich von Männern, die rauchen (11,94 g/m²xh ± 3,03 g/m²xh), mit Männern, die nicht rauchen (11,17 g/m²xh \pm 1,82 g/m²xh), wie auch bei Raucherinnen (10,37 g/m²xh ± 2,93 g/m²xh) mit Nichtraucherinnen (11,44 g/m²xh ± 2,48 g/m²xh). Auch die Vergleiche der mittleren TEWL-Werte von Männern unterschiedlicher Altersgruppe und unterschiedlichen Rauchverhaltens mit Frauen entsprechender Altersgruppe und entsprechenden Rauchverhaltens erwiesen sich als statistisch nicht signifikant. Die mittleren TEWL-Werte von Männern, die rauchen, waren in der Altersgruppe 2 (13,95 g/m²xh ± 3,12 g/m²xh) und der Altersgruppe 3 (12,75 g/m²xh ± 0,87 g/m²xh) deutlich höher gegenüber denen der Männer, die nicht rauchen (Altersgruppe 2: 11,78 g/m²xh ± 1,80 g/m²xh; Altersgruppe 3: 9,78 g/m²xh ± 0,87 g/m²xh). In der Altersgruppe 1 waren die Werte der Raucher (10,41 g/m²xh ± 2,86 g/m²xh) gegenüber denen der Nichtraucher (11,35 g/m²xh ± 1,97 g/m²xh) hingegen reduziert. Die Unterschiede waren statistisch jedoch nicht signifikant. Es konnte beim Vergleich von Männern der Altersgruppe 1 unabhängig von ihren Rauchgewohnheiten (10,83 g/m²xh ± 2,48 g/m²xh) mit Männern der Altersgruppe 2 ebenfalls unabhängig von ihren Rauchgewohnheiten (12,77 g/m²xh \pm 2,64 g/m²xh) jedoch eine statistisch signifikante Erniedrigung ermittelt werden (p = 0.045) (Abb. 43).



Altersgruppe

Abb. 43: TEWL-Werte von Männern verschiedener Altersgruppen und Rauchgewohnheiten im Vergleich (Raucher blau-schwarz; Nichtraucher blau)

Die mittlerern TEWL-Werte von Nichtraucherinnen (Altersgruppe 1: 10,200 g/m²xh \pm 2,133 g/m²xh; Altersgruppe 2: 12,880 g/m²xh \pm 2,710 g/m²xh; Altersgruppe 3: 11,050 g/m²xh \pm 1,743 g/m²xh) waren gegenüber denen der Raucherinnen der entsprechenden Altersgruppen (Altersgruppe 1: 9,064 g/m²xh \pm 1,302 g/m²xh; Altersgruppe 2: 12,090 g/m²xh \pm 3,191 g/m²xh; Altersgruppe 3: 9,525 g/m²xh \pm 2,978 g/m²xh) deutlich erhöht (siehe Abb. 44). Die Unterschiede erwiesen sich allerdings als statistisch nicht signifikant. Wohingegen die mittleren TEWL-Werte aller Frauen in der Altersgruppe 2 (12,49 g/m²xh) gegenüber denen der Altersgruppe 1 (9,67 g/m²xh \pm 1,83 g/m²xh) höchst signifikant erhöht waren (p = 0,001). Auch der mittlere TEWL-Wert von Frauen der Altersgruppe 2 (12,49 g/m²xh \pm 2,91 g/m²xh) war gegenüber dem von Frauen der Altersgruppe 3 (10,29 g/m²xh \pm 2,91 g/m²xh) erhöht. Dieser Unterschied erwies sich als statistisch signifikant (p = 0,022).

Der Vergleich von Frauen in der Altersgruppe 1 mit denen von Frauen in der Altersgruppe 3 ergab hingegen keine statistische Signifikanz hinsichtlich der TEWL-Werte (Abb. 44).



Abb. 44: TEWL-Werte von Frauen verschiedener Altersgruppen im Vergleich (Raucherinnen pinkschwarz; Nichtraucherinnen pink)

Alle weiteren durchgeführten Vergleiche besaßen keine statistische Signifikanz.

3.5.2 Dermale biophysikalische Messungen

3.5.2.1 Hauttopografie

Die mit dem Visioscan® ermittelten Messparameter entsprechen qualitativ und quantitativ den physiologischen Zuständen der Hautoberfläche, wobei die einzelnen Parameter jeweils unterschiedliche Zustände der Hautoberfläche beschreiben. Von besonderem Interesse hierbei waren die sogenannten SELS-Parameter, da sie eine Weiterentwicklung der Rauigkeitsparameter, die der Vollständigkeit halber mit aufgeführt wurden, darstellen. Der SE_{sc}-Parameter beschreibt die Schuppigkeit der Haut, der SE_r-Parameter die Hautrauigkeit, der SE_{sm}-Parameter die Hautglätte und der SE_w-Parameter die Falten.

Beim Vergleich der erhobenen mittleren Visioscan®-Werte von allen Rauchern, unabhängig von Geschlecht oder Alter, mit denen von allen Nichtrauchern konnte bei folgenden Parametern ein signifikanter Unterschied ermittelt werden:

Der R1- und R2-Wert von Rauchern (R1: 21,13 \pm 4,52; R2: 17,97 \pm 3,58) war gegenüber dem von Nichtrauchern (R1: 18,79 \pm 2,87; R2: 16,08 \pm 2,42) signifikant erhöht. Auch der R3- (14,52 \pm 2,86), R4- (10,79 \pm 2,30), R5- (2,31 \pm 0,57) und SE_{sc}-Wert (0,0192 \pm 0,0085) der Raucher war gegenüber dem entsprechendem Parameter der Nichtraucher (R3: 12,95 \pm 1,70; R4: 9,69 \pm 1,84; R5: 2,68 \pm 0,77; SE_{sc}: 0,0342 \pm 0,080) signifikant erhöht (siehe auch Abb. 45). Die p-Werte der Parameter, die statistische Signifikanz aufwiesen, werden in der Tabelle 7 aufgeführt:

Visioscan®-Parameter	p-Wert	Signifikanz
R1	0,008	++
R2	0,008	++
R3	0,004	++
R4	0,023	+
R5	0,017	+
SE _{sc}	0,006	++

Tab. 7: Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Rauchern versus Nichtrauchern (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)


Abb. 45: Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Rauchern (schwarz) versus Nichtrauchern (pink-blau)

Wurden die Visioscan®-Ergebnisse von Männern, unabhängig von Altersgruppe oder Rauchgewohnheit, mit denen von Frauen verglichen, so konnte ein signifikanter Unterschied bei den Rauigkeitsparametern R1-R3 wie auch bei dem SELS-Parameter SE_r, ermittelt werden (Abb. 46). Die Werte der Männer (R1: 21,06 ± 5,13; R2: 18,0 ± 4,04; R3: 14,43 ± 3,14; SE_r: 0,074 ± 0,191) waren gegenüber denen der Frauen (R1: 19,02 ± 2,20; R2: 16,19 ± 1,89; R3:13,14 ± 1,52; SE_r: 0,0121 ± 0,0288) erhöht. Die p-Werte sind in der Tabelle 8 zusammengefasst:

Visioscan®-Parameter	p-Wert	Signifikanz
R1	0,023	+
R2	0,019	+
R3	0,031	+
SEr	0,04	+

Tab. 8: Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Männern versus Frauen (- = nicht signifikant; ++ = hoch signifikant; ++ = hoch signifikant; ++ = hoch signifikant;



Abb. 46: Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Männern (blau) versus Frauen (pink)

Der Vergleich von Männern, die rauchen, mit Frauen derselben Rauchgewohnheit ergab signifikante Unterschiede bei den fünf Rauigkeitsparametern wie auch bei dem SELS-Parameter SE_r. So waren die Werte der Männer (R1: 23,37 ± 5,18; R2: 19,74 ± 4,13; R3: 15,79 ± 3,34; R4: 11,79 ± 2,70; R5: 3,05 ± 0,85; SE_r: 0,1126 ± 0,250) gegenüber denen der Frauen (R1: 18,89 ± 2,16; R2: 16,21 ± 1,62; R3: 13,26 ± 1,52; R4: 9,79 ± 1,23; R5: 2,32 ± 0,48; SE_r: 0,0089 ± 0,160) signifikant erhöht. In der Tabelle 9 sind die p-Werte aufgeführt, die statistische Signifikanz aufwiesen:

Visioscan®-Parameter	p-Wert	Signifikanz
R1	0,002	++
R2	0,002	++
R3	0,005	++
R4	0,007	++
R5	0,003	++
SEr	0,014	+

Tab. 9: Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter des Vergleiches von Rauchern versus Raucherinnen (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)

Der Vergleich von Nichtrauchern mit Nichtraucherinnen erwies sich als statistisch nicht signifikant.

Beim Vergleich der mittleren Visioscan®-Werte von Männern, die rauchen, mit Männern, die nicht rauchen, konnte ein statistisch signifikanter Unterschied bei den Visioscan®-Parametern R1, R2, R3, R4, R5 und SE_{sc} ermittelt werden. Die Werte der Raucher (R1: $23,37 \pm 5,18$; R2: $19,74 \pm 4,13$; R3: $15,79 \pm 3,34$; R4: $11,79 \pm 2,70$; R5: $3,05 \pm 0,85$ und SE_{sc}: $0,055 \pm 0,11$) waren gegenüber denen der Nichtraucher (R1: $18,31 \pm 3,57$; R2: $15,94 \pm 2,86$; R3: $12,81 \pm 1,94$; R4: $9,44 \pm 2,31$; R5: $2,13 \pm 0,62$; SE_{sc}: $0,037 \pm 0,13$) erhöht (Abb. 47). Die statistisch signifikanten Ergebnisse werden in der Tabelle 10 zusammengefasst:

Visioscan®-Parameter	p-Wert	Signifikanz
R1	0,001	+++
R2	0,002	++
R3	0,004	++
R4	0,01	++
R5	0,004	++
SE _{sc}	0,048	+

Tab. 10: Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Männern, die rauchen, mit Männern, die nicht rauchen (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)



Abb. 47: Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Männern, die rauchen, mit Männern, die nicht rauchen

Der Vergleich der Visioscan®-Werte von Raucherinnen mit denen von Nichtraucherinnen ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Beim Vergleich von Männern der Altersgruppe 1, die rauchen, mit denen, die nicht rauchen, konnte bei den Rauigkeitsparametern R1-R5 ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden. Die Werte der Raucher (R1: $21,63 \pm 5,01$; R2: $18,63 \pm 4,24$; R3: $14,75 \pm 3,41$; R4: $11,50 \pm 2,88$; R5: $1,46 \pm 0,12$) waren gegenüber denen der Nichtraucher (R1: $16,50 \pm 2,98$; R2: $14,50 \pm 2,14$; R3: $11,75 \pm 1,16$; R4: $8,63 \pm 1,60$; R5: $1,88 \pm 0,35$) erhöht. Die p-Werte werden in der Tabelle 11 aufgeführt:

Visioscan®-Parameter	p-Wert	Signifikanz
R1	0,026	+
R2	0,028	+
R3	0,044	+
R4	0,027	+
R5	0,028	+

Tab. 11: Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Männern der Altersgruppe 1 Raucher versus Nichtraucher (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)

Ebenso ergab der Vergleich von Männern der Altersgruppe 2, die rauchen, mit denen, die nicht rauchen, bei den Rauigkeitsparametern R1 und R2 einen statistisch signifikanten Unterschied. Der mittlere R1- und R2-Wert der Raucher (R1: 25,86 ± 6,15; R5: 3,43 ± 0,98) war gegenüber dem der Nichtraucher (R1: 20,13 ± 3,31; R5: 2,38 ± 0,74) erhöht. Die p-Werte sind in der Tabelle 12 aufgelistet:

Visioscan®-Parameter	p-Wert	Signifikanz
R1	0,039	+
R5	0,034	+

Tab. 12: Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Männern Altersgruppe 2 Raucher versus Nichtraucher (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)

Der Vergleich von Männern der Altersgruppe 1 mit denen der Altersgruppe 2 erwies sich als statistisch nicht signifikant hinsichtlich der Visioscan®-Werte.

Die Vergleiche der Raucherinnen mit denen der Nichtraucherinnen in den Altersgruppen 1 und 2 erwiesen sich statistisch als nicht signifikant. Hingegen ergab der Vergleich der Visioscan®-Parameter von Raucherinnen mit denen von Nichtraucherinnen der Altersgruppe 3, dass die SE_{sm}- und SE_w-Werte der Raucherinnen (SE_{sm}: 21,51 ± 0,242; SE_w: 45,52 ± 0,322) gegenüber denen der Nichtraucherinnen (SE_{sm}: 22,94 ± 0,358; SE_w: 50,99 ± 0,799) statistisch höchst signifikant niedriger, während die SE_{sc}-Werte der Raucherinnen (0,01 ± 0,001) gegenüber denen der Nichtraucherinnen (0,0033 ± 0,0052) signifikant erhöht waren. Die p-Werte der Parameter, deren Vergleich einen statistisch signifikanten Unterschied erbrachte, werden in Tabelle 13 zusammengefasst:

Visioscan®-Parameter	p-Wert	Signifikanz
SE _{sm}	0	+++
SE _w	0	+++
SE _{sc}	0,025	+

Tab. 13: Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Frauen der Altersgruppe 3
 Raucherinnen versus Nichtraucherinnen (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)

Beim Vergleich von Frauen der Altersgruppe 1 mit Frauen der Altersgruppe 2 unterschieden sich die Visioscan®-Parameter SE_w und SE_{sc} statistisch signifikant, wobei die SE_w-Werte der Altersgruppe1 (42,97 ± 3,59) hierbei gegenüber der Altersgruppe 2 (46,76± 3,24) reduziert, die SE_{sc}-Werte der Altersgruppe 1 (0,0194 ± 0,0279) gegenüber der Altersgruppe 2 (0,0031 ± 0,0060) hingegen erhöht waren. Die p-Werte, die statistisch signifikant waren, werden den Parametern entsprechend in der Tabelle 14 zusammengefasst:

Visioscan®-Parameter	p-Wert	Signifikanz
SEw	0,004	++
SE _{sc}	0,037	+

Tab. 14: Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich der Visioscan®-Ergebnisse von Frauen Altersgruppe 1 versus Altersgruppe 2 (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)

Beim Vergleich der Visioscan®-Ergebnisse von Frauen der Altersgruppe 2 versus Frauen der Altersgruppe 3 waren die SE_{sm}-Werte in der Altersgruppe 2 (21,18 ± 1,38) signifikant gegenüber der Altersgruppe 3 (22,37 ± 0,80) erniedrigt (p = 0,022). Wurden die Visioscan®-Ergebnisse von Frauen der Altersgruppe 1 mit denen der Altersgruppe 3 verglichen, so konnte bei den SE_{sm}-Werten (Altersgruppe 1: 20,64 ± 0,87; Altersgruppe 3: 22,37 \pm 0,80) und den SE_w-Werten (Altersgruppe 1: 42,97 \pm 3,59; Altersgruppe 3: 48,80 \pm 2,89) eine höchst signifikante Erniedrigung ermittelt werden (p = 0).

Bei den SELS-Parametern SE_{sm} und SE_w konnte beim Vergleich von Frauen unter 47 Jahren (SE_{sm}: 20,79 ± 1,17; SE_w: 44,53 ± 3,88) mit Frauen, die 47 Jahren und älter waren (SE_{sm}: 22,18 ± 0,84; SE_w: 48,33 ± 3,01), eine statistisch signifikante Erniedrigung festgestellt werden. Die statistisch signifikanten Parameter sind in der Tabelle 15 zusammengefasst:

Visioscan®-Parameter	p-Wert	Signifikanz
SE _{sm}	0	+++
SEw	0,003	++

Tab. 15: Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Frauen unter 47 Jahren versus Frauen mit 47 Jahren und älter (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)

Beim Vergleich der Visioscan®-Ergebnisse von Frauen mit 47 Jahren und älter erwiesen sich die SE_{sc}-Werte der Raucherinnen ((8,6 ± 3,78) x 10⁻³) gegenüber denen der Nichtraucherinnen ((2,9 ± 4,88) x 10⁻³) als statistisch signifikant erhöht. Hingegen waren die SE_{sm}- und SE_w-Werte der Raucherinnen (SE_{sm}: 21,66 ± 0,67; SE_w: 46,42 ± 2,60) gegenüber denen der Nichtraucherinnen (SE_{sm}: 22,71 ± 0,70; SE_w: 50,24 ± 2,09) statistisch signifikant niedriger (siehe auch Abb. 48). In Tabelle 16 werden die Parameter zusammengefasst, die eine statistische Signifikanz aufwiesen:

Visioscan®-Parameter	p-Wert	Signifikanz
SE _{sc}	0,031	++
SE _{sm}	0,014	++
SEw	0,01	++

Tab. 16: Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Frauen mit 47 Jahren und älter Raucherinnen versus Nichtraucherinnen (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)



Abb. 48: Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Frauen mit 47 Jahren und älter Raucherinnen (pink-schwarz) versus Nichtraucherinnen (pink)

Wurde dieser Vergleich analog mit Frauen unter 47 Jahren durchgeführt, so konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden (siehe Tab. 19 und Tab. 20). Die Vergleiche von Männern der Altersgruppe 1 mit Frauen derselben Altersgruppe wie auch der von Männern der Altersgruppe 1, die rauchen, mit denen von Frauen derselben Altersgruppe und Rauchgewohnheit erwiesen sich als statistisch nicht signifikant (siehe Tab. 19 und Tab. 20). Hingegen konnte beim Vergleich von Männern der Altersgruppe 1, die nicht rauchen, mit Frauen derselben Altersgruppe und Rauchgewohnheit in den Rauigkeitsparametern R1 und R3 ein signifikanter Unterschied ermittelt werden (p(R1) = 0,047; p(R3) = 0,049); hierbei waren die Werte der Männer (R1: 16,5 ± 2,98; R3: 11,75 ± 1,16) gegenüber denen der Frauen (R1: 19,63 ± 2,77; R3: 13,25 ± 1,58) niedriger. Beim Vergleich der Visioscan®-Ergebnisse von Männern der Altersgruppe 2 mit denen von Frauen der Altersgruppe 2 konnte ein signifikanter Unterschied bei den Rauigkeitsparametern R1-R4 sowie beim SELS-Parameter SE_r ermittelt werden. So waren die der Männer (R1: 22,80 ± 5,52; R2: 19,27 ± 4,35; R3:

15,40 ± 3,44; R4: 11,47 ± 3,09; SE_r: 0,1347 ± 0,278) gegenüber denen der Frauen (R1: 18,50 ± 2,34; R2: 15,69 ± 2,24; R3: 12,75 ± 1,73; R4: 9,44 ± 1,55; SE_r: 0,100 ± 0,025) erhöht.

Visioscan®-Parameter	p-Wert	Signifikanz
R1	0,012	+
R2	0,01	++
R3	0,014	+
R4	0,033	+
SEr	0,027	+

Tab. 17: Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von M\u00e4nnern der Altersgruppe 2 versus Frauen Altersgruppe 2 (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = h\u00f6chst signifikant)

Es konnte beim Vergleich von Männern der Altersgruppe 2, die rauchen, mit Frauen derselben Altersgruppe und Rauchgewohnheit in den fünf Rauigkeitsparametern signifikante Unterschiede ermittelt werden. Die Werte der Männer (R1: 25,86 ± 6,15; R2: $21,43 \pm 4,93$; R3: $17,14 \pm 4,02$; R4: $12,86 \pm 3,08$; R5: $3,43 \pm 0,98$) waren gegenüber denen der Frauen (R1: $18,14 \pm 2,12$; R2: $15,43 \pm 1,72$; R3: $12,57 \pm 1,51$; R4: $9,14 \pm 1,21$; R5: $2,29 \pm 0,49$) statistisch signifikant erhöht. Die Parameter, die statistische Signifikanz aufwiesen, sind mit den entsprechenden p-Werten in der Tabelle 18 zusammengefasst:

Visioscan®-Parameter	p-Wert	statistische Signifikanz
R1	0,009	+
R2	0,01	++

R3	0,016	+
R4	0,012	+
R5	0,017	+

Tab. 18: Statistisch signifikante Visioscan®-Parameter beim Vergleich von Rauchern Altersgruppe 2 versus Raucherinnen Altersgruppe 2 (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)

Wurde dieser Vergleich analog mit Nichtrauchern durchgeführt, so konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden (siehe Tab. 19 und Tab. 20).

In den Tabellen 19 und 20 werden sämtliche den Fragestellungen entsprechenden p-Werte aufgeführt:

Fragestellung	p(R1)	p(R2)	p(R3)	p(R4)	p(R5)
R/NR	0,008	0,008	0,004	0,023	0,017
F R/NR	0,735	0,951	0,648	0,85	0,435
F1 R/NR	0,772	0,555	0,375	0,506	1
F2 R/NR	0,607	0,698	0,729	0,521	0,547
F3 R/NR	0,16	0,242	1	0,6	0,175
F 1/2	0,132	0,184	0,151	0,128	0,564
F 2/3	0,884	0,363	0,609	0,363	0,484
F 1/3	0,098	0,452	0,187	0,391	0,22
F unter 47					
Jahre/über 47					
Jahre	0,817	0,589	0,8	0,68	0,468
F uber 47					
Jahre R/NR	0,205	0,312	0,796	0,205	0,273
		0.740	0 504	0.004	0.040
Janre R/NR	0,866	0,719	0,564	0,894	0,916
M R/NR	0,001	0,002	0,004	0,01	0,004
M1 R/NR	0,026	0,028	0,044	0,027	0,028
M2 R/NR	0,039	0,069	0,063	0,105	0,034
M 1/2	0,053	0,078	0,7	0,187	0,095
M/F	0,023	0,019	0,031	0,091	0,199
MR/FR	0,002	0,002	0,005	0,007	0,03
MNR/FNR	0,388	0,769	0,682	0,477	0,095
M1/F1	0,582	0,91	0,656	0,808	0,434
M1R/F1R	0,418	0,331	0,586	0,38	0,506
M1NR/F1NR	0,047	0,12	0,049	0,117	0,065
M2/F2	0,012	0,01	0,014	0,033	0,232
M2R/F2R	0,009	0,01	0,016	0,012	0,017
M2NR/F2NR	0,362	0,286	0,325	0,605	0,826

Tab. 19: Zusammenfassung der p-Werte der Rauigkeitsparameter R1-R5 (1: M = Männer; F = Frauen;
2: R = Raucher; NR = Nichtraucher; 3: fett gedruckt = statistisch signifikant)

Fragestellung	p(SE _{sm})	p(SE _w)	p(SE _r)	p(SE _{sc})
R/NR	0,329	0,252	0,098	0,060
F R/NR	0,636	0,198	0,895	0,1
F1 R/NR	0,222	0,263	0,517	0,439
F2 R/NR	0,086	0,192	0,67	0,918
F3 R/NR	0	0	0,645	0,025
F 1⁄2	0,19	0,004	0,539	0,037
F 2/3	0,022	0,116	0,897	0,201
F 1/3	0	0	0,586	0,8
F unter 47				
Jahre/über 47				
Jahre	0	0,003	0,742	0,782
F uber 47				
Janre R/NR	0,014	0,01	0,33	0,031
	o =oo	o		
Janre R/NR	0,799	0,57	0,767	0,507
M R/NR	0,416	0,766	0,066	0,048
M1 R/NR	0,208	0,359	0,083	0,165
M2 R/NR	0,657	0,814	0,178	0,336
M ½	0,16	0,292	0,14	0,922
M/F	0,554	0,625	0,04	0,249
MR/FR	0,56	0,907	0,014	0,201
MNR/FNR	0,907	0,495	0,989	0,966
M1/F1	0,934	0,532	0,926	0,956
M1R/F1R	0,708	0,732	0,287	0,272
M1NR/F1NR	0,625	0,581	0,505	0,231
M2/F2	0,75	0,47	0,027	0,101
M2R/F2R	0,159	0,189	0,141	0,1
M2NR/F2NR	0,273	0,919	0,34	0,541

Tab. 20: Zusammenfassung der p-Werte der SELS-Parameter (1: M = Männer; F = Frauen; 2: R = Raucher; NR = Nichtraucher; 3: fett gedruckt = statistisch signifikant)

3.5.2.2 Elastizität

Beim Vergleich der erhobenen mittleren Elastizitätswerte von Rauchern mit denen von Nichtrauchern konnte bei Rauchern eine statistisch signifikante Erhöhung der Parameter R6, R9 und F0 ermittelt werden (siehe auch Abb. 49). Die übrigen Elastizitätsparameter erbrachten bei diesem Vergleich keine statistische Signifikanz. Die Ergebnisse werden in Tabelle 21 zusammengefasst:

Elastizitätsparameter	Nichtraucher	Raucher	p-Wert	statistische Signifikanz
R6 [x 10 ⁻¹]	11,11 ± 1,60	12,32 ± 1,78	0,003	++
R9 [x10 ⁻²]	2,29 ± 0,604	2,841 ± 0,9315	0,004	++
F0 [x10 ⁻²]	2,287 ± 0,605	2,841 ± 0,931	0,004	++

Tab. 21: Statistisch signifikante Ergebnisse beim Vergleich der Elastizitätsparameter von Nichtrauchern versus Rauchern (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)



Abb. 49: Vergleich der statistisch signifikanten Elastizitätsparameter von Rauchern (schwarz) mit Nichtrauchern (pink-blau)

Der Vergleich der mittleren Elastizitätswerte von Männern mit denen von Frauen erwies sich als statistisch nicht signifikant. Auch der Vergleich von Männern, die rauchen, mit Frauen entsprechender Rauchgewohnheit, und der von Männern, die nicht rauchen, mit Frauen, die nicht rauchen, erbrachte keine statistisch signifikanten Unterschiede (siehe Tab. 31).

Beim Vergleich der Elastizitätswerte von Männern, die rauchen, mit denen, die nicht rauchen, konnte eine statistische Signifikanz beim R6-Parameter ermittelt werden (p = 0,046). Der mittlere R6-Wert der Raucher ($1,22 \pm 0,17$) war gegenüber dem der Nichtraucher ($1,10 \pm 0,16$) erhöht. Wurden die Elastizitätswerte von Raucherinnen mit denen von Nichtraucherinnen verglichen, so erwiesen sich die Parameter R5, R6, R9, F0 sowie F1 als statistisch signifikant. Die Zusammenfassung der signifikanten Ergebnisse erfolgt in Tabelle 22:

				statistische
Elastizitätsparameter	Nichtraucherinnen	Raucherinnen	p-Wert	Signifikanz
R5 [x 10 ⁻¹]	13,38 ± 3,01	15,18 ± 2,54	0,045	+
R6 [x 10 ⁻¹]	11,19 ± 1,65	12,43 ± 1,89	0,032	+
R9 [x10 ⁻²]	2,32 ± 0,59	3,14 ± 0,73	0	+++
F0 [x10 ⁻²]	2,32 ± 0,59	3,14 ± 0,73	0	+++
F1 [x10 ⁻²]	2,63 ± 0,76	3,18 ± 0,87	0,038	+

Tab. 22: Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitätsparameter von Nichtraucherinnen versus Raucherinnen (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)

Der Vergleich von Männern der Altersgruppe 1, die rauchen, mit denen, die nicht rauchen, erwies sich lediglich bei dem Elastizitätsparameter R5 als statistisch signifikant (p = 0,030). Die mittleren R5-Werte der Nichtraucher (1,46 ± 0,12) waren hierbei gegenüber denen der Raucher (1,63 ± 0,17) signifikant niedriger, wohingegen der Vergleich von Männern der Altersgruppe 2, die rauchen, mit denen, die nicht rauchen, keine statistischen Signifikanzen hinsichtlich eines Elastizitätsparameters ergab (siehe Tab. 31). Wurden hingegen die mittleren Elastizitätswerte von Männern der Altersgruppe 1 mit denen der Altersgruppe 2 verglichen, so konnte bei den Elastizitätsparametern R2, R4 und R7 ein statistisch hoch signifikanter Unterschied festgestellt werden (p(R2) = 0,007; p(R4) = 0,007; p(R7) = 0,002). Hierbei waren die Elastizitätsparameter R2 ((9,50)

 \pm 0,28) x 10⁻¹) und R7 ((7,29 \pm 0,61) x 10⁻¹) der Altersgruppe 1 gegenüber der Altersgruppe 2 (R2: (9,16 \pm 0,36) x 10⁻¹; R7: (6,55 \pm 0,56) x 10⁻¹) erhöht, der mittlere R4-Wert (Altersgruppe 1: (0,96 \pm 0,56) x 10⁻²; Altersgruppe 2: (1,66 \pm 0,73) x 10⁻²) hingegen reduziert. Der Vergleich der Elastizitätswerte von Frauen der Altersgruppe 1, die rauchen, mit Frauen derselben Altersgruppe, die nicht rauchen, erbrachte statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich der Elastizitätsparameter R5, R6, R9, F0 und F1. Die Werte dieser Parameter waren bei Raucherinnen im Vergleich zu denen der Nichtraucherinnen erhöht. Die entsprechenden signifikanten Ergebnisse werden in der Tabelle 23 zusammengefasst:

				statistische
Elastizitätsparameter	Nichtraucherinnen	Raucherinnen	p-Wert	Signifikanz
		47.07.4.00	0.010	
R5 [x 10]	$14,4 \pm 1,46$	$17,27 \pm 1,99$	0,012	+
R6 [x 10 ⁻¹]	10,27 ± 1,00	12,81 ± 2,18	0,022	+
R9 [x10 ⁻²]	$1,99 \pm 0,41$	$2,78 \pm 0,32$	0,002	++
F0 [x10 ⁻²]	$1,99 \pm 0,41$	$2,78 \pm 0,32$	0,002	++
F1 [x10 ⁻²]	2,10 ± 0,31	2,71 ± 0,53	0,027	+

Tab. 23: Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitätsparameter von Raucherinnen der Altersgruppe 1 versus Nichtraucherinnen entsprechender Altersgruppe (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)

Wurden die mittleren Elastizitätswerte von Raucherinnen der Altersgruppe 2 mit denen von Nichtraucherinnen der entsprechenden Altersgruppe verglichen, so konnte lediglich bei den Parametern R9 und F0 eine statistische Signifikanz festgestellt werden. Die mittleren R9- und F0-Werte der Raucherinnen (R9: $(2,89 \pm 0,43) \times 10^{-2}$; F0: $(2,89 \pm 0,43) \times 10^{-2}$) waren gegenüber denen der Nichtraucherinnen (R9: $(2,39 \pm 0,59) \times 10^{-2}$; F0: $(2,39 \pm 0,59) \times 10^{-2}$; F0: $(2,39 \pm 0,59) \times 10^{-2}$) signifikant erhöht (p(R9) = 0,049; p(F0) = 0,049). Beim Vergleich der Elastizitätswerte von Raucherinnen der Altersgruppe 3 mit denen von Nichtraucherinnen derselben Altersgruppe konnten statistisch signifikante Unterschiede

in den Parametern R3, R4, R9 und F0 ermittelt werden. Die Werte der erwähnten Elastizitätsparameter von Raucherinnen gegenüber denen von Nichtraucherinnen waren hierbei signifikant erhöht. Die Ergebnisse, die statistische Signifikanzen aufwiesen, werden in Tabelle 24 zusammengefasst:

				statistische
Elastizitätsparameter	Nichtraucherinnen	Raucherinnen	p-Wert	Signifikanz
R3 [x 10 ⁻²]	15,33 ± 1,76	20,58 ± 3,18	0,037	+
R4 [x 10 ⁻²]	3,18 ± 0,53	4,40 ± 0,38	0,01	++
R9 [x10 ⁻²]	2,64 ± 0,75	$4,40 \pm 0,46$	0,007	++
F0 [x10 ⁻²]	2,64 ± 0,75	$4,40 \pm 0,46$	0,007	++

Tab. 24: Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitätsparameter von Raucherinnen der Altersgruppe 3 versus Nichtraucherinnen entsprechender Altersgruppe (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)

Wurden die mittleren Elastizitätswerte von Frauen der Altersgruppe 1 mit denen Frauen der Altersgruppe 2 verglichen, so konnten statistisch signifikante Unterschiede bei den Parametern R1, R2, R4 und R7 ermittelt werden. Die mittleren Werte der R1- und R4-Parameter waren bei der Altersgruppe 1 im Vergleich mit der Altersgruppe 2 reduziert, wohingegen die mittleren R2- und R7-Werte erhöht waren. Die Ergebnisse werden in der Tabelle 25 zusammengefasst:

				statistische
Elastizitätsparameter	Altersgruppe 1	Altersgruppe 2	p-Wert	Signifikanz
R1 [x 10 ⁻²]	0,38 ± 0,23	0,80 ± 0,53	0,005	++
R2 [x 10 ⁻¹]	9,57 ± 0,24	9,03 ± 0,87	0,033	+
R4 [x10 ⁻²]	0,80 ± 0,37	1,55 ± 0,86	0,002	++
R7 [x10 ⁻¹]	7,37 ± 0,57	6,57 ± 0,89	0,006	++

Tab. 25: Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitätsparameter von Frauen der Altersgruppe 1 versus Frauen der Altersgruppe 2 (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)

Bei dem Vergleich der mittleren Elastizitätswerte von Frauen der Altersgruppe 2 versus Frauen der Altersgruppe 3 konnte eine statistische Signifikanz hinsichtlich der Elastizitätsparameter R0, R1, R3, R4, R5, R7, R8, R9, F0 und F1 ermittelt werden. Während die Parameter R0, R1, R3, R4, R8, R9, F0 und F1 der Altersgruppe 2 gegenüber denen der Altersgruppe 3 reduziert waren, waren die Parameter R5 und R7 der Altersgruppe 2 gegenüber denen der Altersgruppe 3 erhöht. Eine Zusammenfassung der signifikant statistischen Ergebnisse zeigt Tabelle 26:

				statistische
Elastizitätsparameter	Altersgruppe 2	Altersgruppe 3	p-Wert	Signifikanz
R0 [x 10 ⁻²]	10,28 ± 2,73	14,44 ± 2,86	0,001	+++
R1 [x 10 ⁻²]	0,80 ± 0,53	1,74 ± 0,50	0	+++
R3 [x 10 ⁻²]	12,90 ± 3,09	17,96 ± 3,68	0,001	+++
R4 [x 10 ⁻²]	1,55 ± 0,86	3,79 ± 0,78	0	+++
R5 [x 10 ⁻¹]	14,35 ± 2,52	11,13 ± 2,08	0,004	++
R7 [x 10 ⁻¹]	6,57 ± 0,89	5,29 ± 0,75	0,001	+++
R8 [x 10 ⁻²]	9,47 ± 2,60	12,70 ± 2,46	0,006	++
R9 [x 10 ⁻²]	2,63 ± 0,57	3,52 ± 1,10	0,009	++
F0 [x 10 ⁻²]	2,63 ± 0,57	3,52 ± 1,10	0,009	++
F1 [x 10 ⁻²]	2,84 ± 0,73	3,88 ± 0,89	0,004	++

Tab. 26: Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitätsparameter von Frauen der Altersgruppe 2 versus Frauen der Altersgruppe 3 (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)

Der Vergleich von Frauen der Altersgruppe 1 versus Frauen der Altersgruppe 3 erwies sich als statistisch signifikant hinsichtlich der folgenden Elastizitätsparameter: R0, R1, R2, R3, R4, R5, R7, R8, R9, F0 und F1. Die Ergebnisse werden in Tabelle 27 zusammengefasst:

				statistische
Elastizitätsparameter	Altersgruppe 1	Altersgruppe 3	p-Wert	Signifikanz
R0 [x 10 ⁻²]	8,92 ± 2,54	14,44 ± 2,86	0	+++
R1 [x 10 ⁻²]	0,38 ± 0,23	1,74 ± 0,50	0	+++
R2 [x 10 ⁻¹]	9,57 ± 0,24	8,79 ± 0,21	0	+++
R3 [x 10 ⁻²]	11,36 ± 2,75	17,96 ± 3,68	0	+++
R4 [x 10 ⁻²]	0,80 ± 0,37	3,79 ± 0,78	0	+++
R5 [x 10 ⁻¹]	16,04 ± 2,26	11,13 ± 2,08	0	+++
R7 [x 10 ⁻¹]	7,36 ± 0,57	5,29 ± 0,75	0	+++
R8 [x 10 ⁻²]	8,53 ± 2,46	12,70 ± 2,46	0,001	+++
R9 [x 10 ⁻²]	2,44 ± 0,53	3,52 ± 1,10	0,029	+
F0 [x 10 ⁻²]	2,44 ± 0,53	3,52 ± 1,10	0,029	+
F1 [x 10 ⁻²]	2,45 ± 0,53	3,88 ± 0,89	0	+++

Tab. 27: Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitätsparameter von Frauen der Altersgruppe 1 versus Frauen der Altersgruppe 3 (- = nicht signifikant; ++ = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)

Wurden die mittleren Elastizitätswerte von Frauen unter 47 Jahren mit denen von Frauen mit oder über 47 Jahren verglichen, so konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in den folgenden Parametern ermittelt werden: R0, R1, R2, R3, R4, R5, R7, R8 und F1. Die Ergebnisse werden in Tabelle 28 zusammengefasst:

	Frauen unter	Frauen mit oder		statistische
Elastizitätsparameter	47 Jahre	über 47 Jahre	p-Wert	Signifikanz
R0 [x 10 ⁻²]	9,48 ± 2,78	13,39 ± 2,85	0	+++
R1 [x 10 ⁻²]	0,61 ± 0,47	1,39 ± 0,71	0	+++
R2 [x 10 ⁻¹]	9,36 ± 0,44	8,70 ± 0,92	0	+++
R3 [x 10 ⁻²]	12,03 ± 3,06	16,60 ± 3,73	0	+++
R4 [x 10 ⁻²]	1,19 ± 0,74	3,03 ± 1,41	0,001	+++
R5 [x 10 ⁻¹]	15,16 ± 2,50	12,23 ± 2,81	0,002	++
R7 [x 10 ⁻¹]	6,92 ± 0,87	5,81 ± 1,08	0,001	+++

R8 [x 10 ⁻²]	8,86 ± 2,62	12,00 ± 2,29	0,001	+++
F1 [x 10 ⁻²]	2,63 ± 0,63	$3,58 \pm 0,98$	0,001	+++

Tab. 28: Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitätsparameter von Frauen unter 47 Jahren versus Frauen mit oder über 47 Jahren (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = höchst signifikant)

Der Vergleich von Frauen mit oder über 47 Jahren, die rauchen, mit denen, die nicht rauchen, erwies sich hinsichtlich der folgenden Elastizitätsparameter als statistisch signifikant: R0, R3, R8, R9, F0 und F1. Die Zusammenfassung der statistisch signifikanten Ergebnisse findet sich in der Tabelle 29:

				statistische
Elastizitätsparameter	Nichtraucherinnen	Raucherinnen	p-Wert	Signifikanz
R0 [x 10 ⁻²]	12,04 ± 1,83	15,27 ± 3,11	0,046	+
R3 [x 10 ⁻²]	14,54 ± 2,12	19,47 ± 3,70	0,015	+
R8 [x10 ⁻²]	10,92 ± 1,60	13,51 ± 2,40	0,048	+
R9 [x10 ⁻²]	2,51 ± 0,73	4,20 ± 0,60	0,002	++
F0 [x10 ⁻²]	2,51 ± 0,73	4,20 ± 0,60	0,002	++
F1 [x10 ⁻²]	$3,04 \pm 0,75$	4,33 ± 0,78	0,016	+

Tab. 29: Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitätsparameter von Frauen, die
47 Jahren oder älter sind, Raucherinnen versus Nichtraucherinnen (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)

Wurden die Elastizitätswerte von Frauen unter 47 Jahren, die rauchen, mit denen, die nicht rauchen, verglichen, so konnte bei den Elastizitätsparametern R5, R6, R9 und F0 ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden. Die statistisch signifikanten Ergebnisse werden in Tabelle 30 zusammengefasst:

				statistische
Elastizitätsparameter	Raucherinnen	Nichtraucherinnen	p-Wert	Signifikanz
R5 [x 10 ⁻¹]	16,00 ± 2,08	14,11 ± 2,66	0,040	+
R6 [x 10 ⁻¹]	12,61 ± 1,92	11,22 ± 1,67	0,050	+
R9 [x10 ⁻²]	$2,80 \pm 0,36$	2,22 ± 0,51	0,002	++
F0 [x10 ⁻²]	2,80 ± 0,36	2,22 ± 0,51	0,002	++

Tab. 30: Statistisch signifikante Ergebnisse des Vergleiches der Elastizitätsparameter von Frauen unter 47 Jahren, Raucherinnen versus Nichtraucherinnen (- = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hoch signifikant; +++ = höchst signifikant)

In der Tabelle 31 werden sämtliche den Fragestellungen entsprechenden p-Werte aufgeführt:

Fragestellung	p(R0)	p(R1)	p(R2)	p(R3)	p(R4)	p(R5)
R/NR	0,357	0,38	0,559	0,159	0,24	0,052
F R/NR	0,193	0,576	0,35	0,071	0,598	0,045
F1R/NR	0,167	0,655	0,272	0,062	0,584	0,012
F 2 R/NR	0,707	0,586	0,486	0,499	0,591	0,349
F 3 R/NR	0,085	0,104	0,487	0,037	0,01	0,619
F 1/2	0,155	0,005	0,033	0,147	0,002	0,056
F 2/3	0,001	0	0,458	0,001	0	0
F 1/3	0	0	0	0	0	0
F unter 47 Jahre/über 47 Jahre	0	0	0	0	0,001	0,002
F über 47 Jahre R/NR	0,046	0,121	0,613	0,015	0,103	0,769
F unter 47 Jahre R/NR	0,239	0,899	0,712	0,113	0,85	0,04
M R/NR	0,946	0,507	0,687	0,887	0,252	0,68
M1 R/NR	0,346	0,294	0,279	0,464	0,749	0,03
M2 R/NR	0,948	0,248	0,235	0,763	0,148	0,443
M 1/2	0,768	0,078	0,007	0,989	0,007	0,063
M/F	0,754	0,997	0,643	0,506	0,901	0,824
M R/F R	0,63	0,874	0,408	0,736	0,499	0,248
M NR/F NR	0,419	0,942	0,677	0,252	0,836	0,451
M 1/F1	0,253	0,17	0,497	0,51	0,379	0,343
M 1R/F1R	0,049	0,306	0,765	0,094	0,645	0,823
M 1NR/F1NR	0,835	0,54	0,607	0,55	0,509	0,298
M 2/F2	0,646	0,989	0,631	0,539	0,71	0,846
M 2R/F2R	0,895	0,51	0,797	0,978	0,331	0,996
M 2NR/F2NR	0,618	0,153	0,451	0,374	0,279	0,608

Tab. 31: Teil 1 der Zusammenfassung der p-Werte aller Elastizitätsparameter

Fragestellung	p(R6)	p(R7)	p(R8)	p(R9)	p(F0)	p(F1)
R/NR	0,003	0,647	0,392	0,004	0,004	0,069
F R/NR	0,032	0,337	0,17	0	0	0,038
F1R/NR	0,022	0,122	0,139	0,002	0,002	0,027
F 2 R/NR	0,335	0,988	0,762	0,049	0,049	0,293
F 3 R/NR	0,767	0,499	0,093	0,007	0,007	0,07
F ½	0,391	0,006	0,302	0,355	0,355	0,099
F 2/3	0,054	0,001	0,006	0,009	0,009	0,004
F 1/3	0,362	0	0,001	0,029	0,029	0
F unter 47 Jahre/über 47 Jahre	0,408	0,001	0,001	0,063	0,063	0,001
F über 47 Jahre R/NR	0,512	0,807	0,048	0,002	0,002	0,016
F unter 47 Jahre R/NR	0,05	0,293	0,215	0,002	0,002	0,078
M R/NR	0,046	0,621	0,838	0,414	0,414	0,655
M1 R/NR	0,062	0,358	0,403	0,627	0,627	0,762
M2 R/NR	0,67	0,193	0,93	0,22	0,22	0,556
M 1/2	0,133	0,002	0,605	0,196	0,196	0,831
M/F	0,665	0,541	0,722	0,069	0,069	0,379
M R/F R	0,722	0,248	0,592	0,718	0,718	0,906
M NR/F NR	0,674	0,78	0,342	0,031	0,031	0,194
M 1/F1	0,355	0,717	0,303	0,032	0,032	0,691
M 1R/F1R	0,805	0,864	0,064	0,924	0,924	0,136
M 1NR/F1NR	0,3	0,566	0,787	0,006	0,006	0,508
M 2/F2	0,702	0,946	0,637	0,282	0,282	0,412
M 2R/F2R	0,877	0,676	0,786	0,403	0,403	0,85
M 2NR/F2NR	0,703	0,433	0,739	0,034	0,034	0,13

Tab. 31: Teil 2 der Zusammenfassung der p-Werte aller Elastizitätsparameter (1: M = Männer; F = Frauen; 2: R = Raucher; NR = Nichtraucher; 3: fett gedruckt = statistisch signifikant)

3.5.3 Lipidperoxid-Konzentration

Der Vergleich der mittleren Lipidperoxid(LPO)-Konzentration von Rauchern (65,63 nmol/ml \pm 37,03 nmol/ml) mit der von Nichtrauchern (76,99 nmol/ml \pm 70,75 nmol/ml) erwies sich als statistisch nicht signifikant (p = 0,699). Ebenso erbrachte der Vergleich von allen Männern (60,91 nmol/ml \pm 30,36 nmol/ml), unabhängig von ihrem Alter oder ihren Rauchgewohnheiten, mit allen Frauen (83,04 nmol/ml \pm 75,38 nmol/ml) keinen statistisch signifikanten Unterschied (p = 0,341). Auch der Vergleich von Männern, die rauchen (62,07 nmol/ml \pm 31,18 nmol/ml), mit Männern, die nicht rauchen (59,89 nmol/ml \pm 30,22 nmol/ml), wie auch der von Raucherinnen (69,54 nmol/ml \pm 43,06 nmol/ml) mit Nichtraucherinnen (93,43 nmol/ml \pm 92,53 nmol/ml) erwies sich als statistisch nicht signifikant.

Die mittleren LPO-Werte von Männern, die rauchen, waren in der Altersgruppe 1 (69,19 nmol/ml \pm 41,14 nmol/ml) und in der Altersgruppe 3 (56,96 nmol/ml \pm 22,39 nmol/ml) gegenüber den Werten der entsprechenden Altersgruppe, die nicht rauchen, (Altersgruppe 1: 60,20 nmol/ml ± 18,89 nmol/ml; Altersgruppe 3: 43,24 nmol/ml ± 13,46 nmol/ml) erhöht, wenngleich statistisch nicht signifikant. Beim Vergleich der mittleren LPO-Werte der Frauen waren die der Nichtraucherinnen (93,43 nmol/ml ± 92,53 nmol/ml) gegenüber denen der Raucherinnen (69,54 nmol/ml ± 43,06 nmol/ml) erhöht, dieser Unterschied besaß jedoch keine statistische Signifikanz. Die mittleren LPO-Werte der Raucherinnen (Altersgruppe 1: 51,25 nmol/ml ± 23,11 nmol/ml; Altersgruppe 2: 88,67 nmol/ml ± 52,68 nmol/ml; Altersgruppe 3: 56,08 nmol/ml ± 31,09 nmol/ml) aller drei Altersgruppen waren gegenüber denen der Nichtraucherinnen (Altersgruppe 1: 83,37 nmol/ml ± 82,68 nmol/ml; Altersgruppe 2: 132,58 nmol/ml ± 126,19 nmol/ml; Altersgruppe 3: 60,31 nmol/ml ± 32,72 nmol/ml) der entsprechenden Altersgruppe leicht, allerdings statistisch nicht signifikant niedriger. Auch der Vergleich verschiedener Altersgruppen untereinander erbrachte keinen statistisch signifikanten Unterschied. Ebenso verhielt es sich bei dem Vergleich von Frauen unter 47 Jahren mit denen, die 47 Jahre und älter, wie auch bei Raucherinnen mit Nichtraucherinnen, die 47 Jahren und älter, und bei Raucherinnen und Nichtraucherinnen, die unter 47 Jahren waren. Die Vergleiche von Männern unterschiedlicher Altersgruppen und Rauchverhaltens mit Frauen entsprechender Altersgruppe und Rauchverhaltens erbrachte ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede.

4 Diskussion

Die Haut als ein wichtiges Kommunikationsorgan des Menschen tritt nicht nur in Kontakt zu ihrer Umwelt, sondern auch zu ihren Mitmenschen und setzt sich somit ihrer Beurteilung aus. Eine glatte, reine Haut stellt ein begehrtestes Attribut der Attraktivität und das augenfälligste Merkmal für Jugend und Gesundheit dar. In den letzten Jahrzehnten wurde medial die Botschaft vermittelt, dass mit dem Konsum von Zigaretten ein Stück Lebensfreude, Schönheit, Freiheit und Jugend zu erhalten sei. Betrachtet man die Ergebnisse von epidemiologischen Untersuchungen, zeigt sich ein deutlicher Widerspruch, da sie darauf hinweisen, dass Tabakrauch ein Faktor darstellt, der unabhängig vom Lebensalter und von der Sonnenexposition zur Hautalterung beiträgt [Yin et al. 2001]. Die Abbildung 50 dokumentiert anhand von zwei Beispielen anschaulich den unterschiedlichen Hautalterungsprozess aufgrund von Zigarettenkonsum trotz identischer genetischer Voraussetzung.



Raucherin



Nichtraucherin



Raucherin



Nichtraucherin

Abb. 50: Vergleich eineiigiger Zwillinge mit unterschiedlichen Rauchgewohnheiten [Jung et al. 1995]

Der vorzeitig induzierte Hautalterungsprozess als Auswirkung des Hauptstromrauchs von Zigaretten wurde vergleichsweise gut untersucht [Donald *et al.* 1991; Model 1985], wohingegen die Untersuchung der Auswirkungen des Zigarettennebenstromrauchs bislang ausstand. Dem Zigarettennebenstromrauch sind die Haut des Rauchers wie auch die des Nichtrauchers ausgesetzt. Während der Hauptstrom, der vom Raucher inhaliert wird, indirekt über die Blutbahn zur Haut gelangt, kann davon ausgegangen werden, dass der Nebenstrom direkt mit den Lipiden des Stratum corneums in Wechselwirkung tritt. Die kutanen Effekte des Zigarettennebenstromrauchs *in vitro* und *in vivo* standen daher in dieser Arbeit im Fokus des Forschungsinteresses.

Um eine realitätsnahe Exposition von Zigarettenrauch zu erzielen, wurde ausschließlich Zigarettennebenstromrauch in relevanten Konzentrationen, wie sie etwa bei einem Restaurantbesuch vorliegen, experimentell eingesetzt.

Im ersten Abschnitt wurden zunächst *in vitro* geeignete Konditionen etabliert, sodass anschließend erstmals die Effekte von Zigarettennebenstrom *in vitro* auf eine keratinozytäre Zelllinie (HaCaT-Zellen) mittels Neutralrotfreisetzungstest untersucht werden konnten. Im zweiten Abschnitt erfolgte die Evaluierung der Effekte von Zigarettennebenstrom auf die Hautphysiologie von Nichtrauchern mittels nicht-invasiver biophysikalischer Messmethoden und einem Lipidperoxid-Kit. Im dritten Abschnitt der Arbeit wurde in einer Kohortenstudie die Hautphysiologie von Rauchern und Nichtrauchern mithilfe biophysikalischer Messmethoden und eines Lipidperoxid-Kits *in vivo* charakterisiert, um Unterschiede in den verschiedenen Altersgruppen und dem Geschlecht und/oder dem Rauchstatus zu evaluieren und auf der Grundlage der vorangegangenen theoretischen Ausführungen des Hautaufbaus unter Berücksichtigung maßgebender wissenschaftlicher Literatur zu diskutieren und zueinander in Beziehung zu setzen.

In-vitro-Untersuchungen

4.1 Etablierung geeigneter Konditionen in vitro

In den letzten Jahren ist das Interesse an alternativen Testverfahren zur Untersuchung von Kosmetika, die auf Einsatz lebender Versuchstiere verzichten, stark angestiegen. Mit gut reproduzierbarem Erfolg werden heute vermehrt kultivierte Keratinozyten zur Testung von potenziell hautirritierenden Produkten eingesetzt [Korting *et al.* 1994]. Bei Keratinozyten handelt es sich um Zellen, die, nachdem das Stratum corneum passiert wurde, als Erstes mit Umweltirritanzien wie Zigarettenrauch in Kontakt treten und somit um die ersten lebenden Kontaktzellen in der Haut [Müller-Decker *et al.* 1994].

In den *In-vitro*-Untersuchungen wurde die etablierte immortalisierte, humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT verwendet. Der entscheidende Vorteil dieser kontinuierlichen Zelllinie besteht in der nahezu unbegrenzten Lebensdauer. Durch Passagieren der Zelllinie und die Möglichkeit der Kryokonservierung wird ein

unlimitiertes Reservoir an Zellen verfügbar, wodurch eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie Kontinuität und Vergleichbarkeit der Untersuchungen ermöglicht wird.

Mit dieser keratinozytären Zelllinie wurde versucht, ein zelluläres Modellsystem zu entwickeln, welches realitätsnah die Situation der Keratinozyten, die dem Zigarettennebenstromrauch ausgesetzt sind, widerspiegelt. Das entwickelte *In-vitro*-Modellsystem wurde anschließend *in vivo* weiter evaluiert.

Für die Entwicklung eines *In-vitro*-Modells zur Evaluierung der zytotoxischen Effekte von Zigarettennebenstromrauch wurde die Auswirkung von Natriumlaurylsulfat auf die Membranintegrität zur Bewertung der Hautverträglichkeit im Neutralrotfreisetzungstest nach Reader *et al.* [1989] herangezogen [Herzinger *et al.* 1991]. Bei Natriumlaurylsulfat handelt es sich um ein anionisches Detergenz, dem eine Affinität zu Lipiden und Proteinen *in vitro* wie auch *in vivo* zugesprochen wird [Patil *et al.* 1995]. Da davon ausgegangen werden kann, dass einige Bestandteile des Zigarettenrauchs ebenfalls diese Affinität besitzen, wurde angenommen, dass Natriumlaurylsulfat wie auch Bestandteile des Zigarettennebenstromrauchs *in vitro* mit den Lipiden der Zellmembran, vermutlich mit Phospholoipiden, die Doppelschichten bilden und das Grundgerüst der Membran darstellen, in Interaktion treten könnten [Thiele *et al.* 2001]. In Folge der Wechselwirkung mit Lipiden kann ein Einfluss auf die Membranfluidität, eine der wichtigsten Charakteristika biologischer Membranen, da sie vor allem die dynamischen Eigenschaften und Prozesse der Lipiddoppelschicht widerspiegelt, vermutet werden.

Um analog zur Oberfläche der Haut eine möglichst große Oberfläche dem Zigarettennebenstrom auszusetzen, wurde die von Herzinger *et al.* [1991] etablierte Methode modifiziert und die Zellen statt auf 96-Loch-Platten zunächst auf 24-Loch-Platten und anschließend auf 6-Loch-Platten kultiviert. Die Exposition mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen brachte für beide Expositionsoberflächen nach Reader *et al.* [1989] die erwartete Reduktion der optischen Dichte im Neutralrotfreisetzungtest und damit einen Anstieg der *In-vitro*-Toxizität, vermutlich bedingt durch eine Steigerung der Desintegration der Iysosomalen Membranen, die durch die Interaktion von SDS mit den Phospholipiden der Membranen zustande gekommen sein könnte.

Die auf 6-Loch-Platten kultivierten Zellen wiesen im Gegensatz zu den auf 24-Loch-Platten kultivierten Zellen bei den Ausgangs- und Expositionswerten mit geringen SDS- Konzentrationen eine geringere *In-vitro*-Toxizität auf. Die Differenz der optischen Dichten reduzierte sich mit zunehmender SDS-Konzentration, um sich bei Konzentrationen über 0,7 mM nahezu anzugleichen. Die Betrachtung der Ergebnisse zeigt, dass die Expositionsoberfläche bei geringen Konzentrationen einen Einfluss auf die Zytotoxizität des Irritanz zu nehmen scheint.

In den folgenden Versuchen wurde daher mit SDS-Konzentrationen, die über 0,7 mM lagen, exponiert; es kamen zudem nur Zellen, die auf 6-Loch-Platten kultiviert wurden, zum Einsatz.

4.2 Zigarettennebenstromexposition in vitro

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der Zigarettennebenstromrauch einen zytotoxischen Effekt auf HaCaT-Zellen ausübt. Es wurden Zellen in der Expositionskammer 15 min mit Zigarettennebenstromrauch exponiert. Luftexponierte HaCaT-Kulturen weisen deutliche Differenzen in Bezug auf die Zusammensetzung und Mengenanteile der abgesonderten Lipide auf, daher wurden die Zellen mit einem gewissen Volumen an PBS als Überstand exponiert [Boelsma et al. 1999]. PBS hat einen pH-Wert von 7,4 und verhält sich als Überstand neutral. Zudem besitzt PBS analog dem Hydrolipidfilm der Haut eine gewisse Pufferkapazität. Für den pH-Wert in der Epidermis wird ein Gradient beschrieben, der an der Oberfläche des Stratum corneums zwischen 4,5 und 5,5 liegt und im Inneren kontinuierlich ansteigt. In den unteren Schichten wird ein pH-Wert von 7 erreicht, welcher dem pH-Wert in der Epidermis entspricht [Öhmann et al. 1994; Turner et al. 1998].

Um geeignete Konditionen zu etablieren, wurde der Einfluss des PBS-Überstandvolumens auf die Zytotoxizität bei der Exposition evaluiert. Mit zunehmenden Überstandvolumen erhöhte sich der zytotoxische Effekt bis zu einem Volumen von 1000 μ l, eine weitere Volumenzunahme führte hingegen zur Reduzierung der Zytotoxizität. Ein möglicher Erklärungsansatz für die anfängliche Zunahme der Zytotoxizität könnte darin bestehen, dass sich mit zunehmender Überstandsmenge mehr Inhaltstoffe des Zigarettenrauchs lösen und zytotoxisch agieren, bevor eine Sättigung erreicht wird. Ab einem Volumen von mehr als 1000 μ l kann davon ausgegangen werden, dass die Verdünnungseffekte überwiegen und so zu einer Reduzierung der zytotoxischen Effekte führen. Da der Zigarettenrauch ein Aerosol darstellt, dessen Gasphase neben Gasen zahlreiche flüchtige organische Substanzen enthält und in Suspension eine Partikelphase, die aus Feststoffen zusammengesetzt die bei und Flüssigkeiten ist. der Verbrennungstemperatur des Tabaks verdampfen, kann die Annahme getroffen werden, dass Bestandteile des Zigarettenrauchs in Lösung gegangen sind und zytotoxische Effekte ausgeübt haben. Ein Aerosol ist ein dynamisches System und unterliegt ständigen Änderungen durch Kondensation von Dämpfen an bereits vorhandenen Partikeln, Verdampfen flüssiger Bestandteile der Partikel, Koagulation kleiner Teilchen zu großen oder Abscheidung von Teilchen an umgebenden Gegenständen. Durch den Luftwiderstand weisen Aerosole eine maximale Sinkgeschwindigkeit auf, die beim Gleichgewicht von Gravitationskraft und Luftreibung erreicht wird. Bezogen auf die maximale Sinkgeschwindigkeit bedeutet die Halbierung des Durchmessers eines Partikels eine Verringerung der Masse und damit der Gravitationskraft um den Faktor 8 und die der Querschnittsfläche und damit die Luftreibungskraft um den Faktor 4. Da die Luftreibungskraft quadratisch von der Geschwindigkeit abhängt, folgt daraus für die maximale Sinkgeschwindigkeit, dass bei Halbierung des Partikeldurchmessers die Sinkgeschwindigkeit um den Faktor $\sqrt{1/2} = 0,707$ abnimmt [Feichter 2003].

Die Gase des Zigarettennebenstroms diffundieren vermutlich in den Überstand, während die Aerosolpartikel sich nach dem Sinken zum einen Teil im PBS lösen und zum anderen eine Suspension bilden. Diese in Lösung oder Suspension gegangenen Bestandteile könnten ihre zytotoxischen Effekte auf die HaCaT-Zellen ausgelöst haben. Es ist davon auszugehen, dass einige Bestandteile des Zigarettennebenstroms in Lösung gegangen sind, die mit ihren chemischen Strukturformeln, ihrer Wasserlöslichkeit und ihren pK-Werten in der Tabelle 32 zusammengefasst werden.

Nomenklatur	Chemische	Löslichkeit	pK-Werte	Vorkommen
	Strukturformel			
Acetaldehyd	Н	unbegrenzt mit Wasser (bei 20	pKs = 15	Gasphase
	н₃с——с́	°C) mischbar		
Acrolein	Н	gut wasserlöslich		Gasphase
(Propanal)	H₂C ^{−C} −C ^{−O} H			
Ameisen-	.0	gut löslich in	pKs = 3,75	Gasphase
säure		Wasser, Ethanol		
(Methansaure)	н—————————————————————————————————————	und Glykol		
	ОН			
Ammoniak	н	gut in Wasser	pKb = 4,77	Gasphase
		löslich;		
		in 1 Liter Wasser		
	, Н	20 °C 702 Liter		
		NH ₃		
Anilin	NH ₂	gut in Wasser	pKb = 9,37	Partikelphase
		löslich (36 g/l bei		
		20 °C), Ethanol,		
	~	Lösemitteln		
Cyanwasserstoff		in Wasser in	pKs = 9,31	Gasphase
(Blausäure)	$H - C \equiv N$	jedem Verhältnis		
		IOSIICN		
Formaldehyd		400 g/l Wasser		Gasphase
(Methanal)	<mark>0</mark>	(bei 20 °C), gut		
	н	löslich in Ethanol,		
		Ether		
(Propanal) <i>Ameisen-säure</i> (Methansäure) <i>Ammoniak</i> <i>Ammoniak</i> <i>Ammoniak</i> <i>Cyanwasserstoff</i> (Blausäure) <i>Formaldehyd</i> (Methanal)	$H_{2}C = C = O$ $H_{2}C = O$	gut löslich in Wasser, Ethanol und Glykol gut in Wasser löslich; in 1 Liter Wasser lösen sich bei 20 °C 702 Liter NH ₃ gut in Wasser löslich (36 g/l bei 20 °C), Ethanol, organischen Lösemitteln in Wasser in jedem Verhältnis löslich 400 g/l Wasser (bei 20 °C), gut löslich in Ethanol, Ether	рКs = 3,75 рКb = 4,77 рКb = 9,37 рКs = 9,31	Gasphase Gasphase Partikelphase Gasphase Gasphase

Nomenklatur	Chemische	Löslichkeit	pK-Werte	Vorkommen
	Strukturformel			
Hydrochinon (1,4-Dihydroxy- benzol)	OH	mischbar mit Wasser	pKs = 10	Partikelphase
	о́н			
Kohlendioxid	(0=C=0)	in Wasser (aus Luft, 1 bar) 0,5 mg/l (20 °C) 1,0 mg/l (0 °C)	dissoziert zu geringem Teil in Koh- lensäure	Gasphase
Kohlenmonoxid	c≡≡o	in Wasser 30 mg/l (20 °C)		Gasphase
<i>Nikotin</i> (3-(1-Methyl-2- pyrrolidinyl)- pyridin)	H N N	mit Wasser in jedem Verhältnis mischbar	pKs = 3,22 pKs = 7,81 bei 20 °C	Partikelphase
Phenol (Hydroxybenzol)	OH	gut in Wasser (84 g/l bei 20 °C) löslich	pKs = 9,95	Partikelphase

Nomenklatur	Chemische	Löslichkeit	pK-Werte	Vorkommen
	otraktanormer			
Pyridin		mit Wasser	pKb = 8,94	Gasphase
		mischbar		
	N [×]			
Stickstoffdioxid	ы ^{+•}	gut wasserlöslich		Gasphase
	o [™] `o			

Tab. 32: Zusammenfassung der pK-Werte und der Wasserlöslichkeit einiger Bestandteile des Zigarettennebenstromrauchs (pK-Werte: Fieser und Fieser [1982]; D`Ans-Lax [1992])

Die Frage, inwiefern sich der pH-Wert nach Zigarettennebenstromexposition verändert, wurde evaluiert, indem eine Petrischale (35/10 mm) ohne Zellen mit 1 ml PBS in der Expositionskammer für 15 min mit Zigarettennebenstromrauch exponiert wurde. Es konnte dabei ein Anstieg des pH-Wertes des gepufferten PBS von 7,3 vor und 8,0 nach Exposition ermittelt werden. Dieses Ergebnis deutet auf alkalische Eigenschaften des Zigarettennebenstromrauchs hin. Ein wesentlicher Faktor für den Anstieg des pH-Wertes könnte das Nikotin (Abb. 51) sein, da es ausgeprägte basische Eigenschaften aufweist.



Abb. 51: Strukturformel von Nikotin (3-(1-Methyl- 2-pyrrolidinyl)-pyridin)

Nikotin besitzt zwei dreiwertige Stickstoffatome und ist damit ein polares Molekül. Dem Stickstoffatom im Pyridinring wird ein pKs-Wert von 3,22, dem im Pyrrolidinring ein Wert von 8,11 bei 20 °C zugeschrieben [William *et al.* 1993], womit sich das basische Verhalten in Lösung erklären lässt. Das Nikotin stellt mit 3-7,5 mg pro Zigarette im Nebenstrom zudem einen Hauptbestandteil der partikulären Phase dar, während die Hauptbestandteile der Gasphase im Nebenstrom, nämlich Kohlendioxid (160-440

mg/Zigarette) und Kohlenmonoxid (30-115 mg/Zigarette), die schwer in Lösung gehen, keinen Einfluss auf die Basizität auszuüben scheinen. Weiterführende Experimente in dieser Arbeit konnten bestätigen, dass auch der pH-Wert der Hautoberfläche *in vivo* nach Exposition mit Zigarettennebenstrom ansteigt. Bei den pH-Wert-Anstiegen *in vitro* und *in vivo* handelt es sich um eine Größenordnung, die dem pH-Wert-Anstieg durch Seifen vergleichbar ist. Es kann somit die Aussage abgeleitet werden, dass Zigarettennebenstromrauch zu ähnlichen Störungen der Hautoberflächen-pH-Werte und damit zu funktionellen Änderungen der Barrierefunktion der Haut führen kann, wie sie für Seifen beschrieben werden [Korting *et al.* 1996].

4.3 Vergleich der Zytotoxizität von SDS-Exposition vor und nach Zigarettennebenstromexposition

Die Auswirkung von Zigarettennebenstromrauch auf HaCaT-Zellen führte zu einer deutlichen Reduktion der optischen Dichte im Neutralrotfreisetzungstest. Dieser Anstieg der In-vitro-Toxizität könnte auf eine Interaktion zwischen den Bestandteilen des Zigarettennebenstroms und den Phospholipiden der Membranen hinweisen, verbunden mit einer Steigerung der Desintegration von lysosomalen Membranen. Die Interaktion scheint auch durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt worden sein, da durch Zigarettennebenstromrauch freie Radikale generiert werden. Die Arbeitsgruppe um Pryor et al. geht davon aus, dass es sich bei diesen freien Radikalen um NO-Radikale handelt [Pryor et al. 1983; Church et Pryor 1985]. Es besteht die Wahrscheinlichkeit, dass eine Lipidperoxidation der Membranlipide durch die generierten freien Radikale hervorgerufen wird. Als Folge der Oxidation ungesättigter Fettsäuren läuft in den Membranen eine radikalische Kettenreaktion ab. deren Hauptprodukt das Hydroperoxylradikal ist [Sies 1991]. Lipidperoxidation kann zu strukturellen Veränderungen in Membranen führen [Esterbauer et al. 1992], was eine Veränderung der Membranfluidität mit sich bringen kann und damit die Beeinträchtigung ihrer Die Kombination aus Zigarettennebenstromexposition Barriereeigenschaft. mit anschließender SDS-Exposition (in zwei verschiedenen Konzentrationen) erbrachte einen weiteren erheblichen Anstieg der In-vitro-Toxizität. Das Ergebnis lässt vermuten, eine Vorschädigung der Zellen bei weiterer Exposition zu möglichen dass synergistischen zytotoxischen Effekten führen kann. Die Frage, ob die Reihenfolge der Exposition einen Einfluss auf die Zytotoxizität ausübt, wurde untersucht, indem die Zellen mit verschiedenen SDS-Konzentrationen präexponiert und anschließend mit Zigarettennebenstrom exponiert wurden. Durch diese Versuchsanordnung konnte eine weitere Erhöhung der Zytotoxizität des Zigarettennebenstromrauchs ermittelt werden. Klinisch könnte dieser Befund bedeuten, dass bei Menschen mit geschädigter epidermaler Barriere, wie zum Beispiel bei atopischer Dermatitis, Psoriasis oder auch Ichthyosis, der Zigarettennebenstromrauch zu stärkeren Schäden in der Hautfunktion führt. Die Differenz der optischen Dichte von der Exposition mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen nahm, verglichen mit der optischen Dichte von SDS- (derselben Konzentrationen) mit anschließender Zigarettennebenstromexposition, mit zunehmender SDS-Konzentration zu. Bei den Konzentrationen 0,8 und 1 mM pendelte sich die optische Dichte von SDS-exponierten und doppelt exponierten Zellen auf eine nahezu gleich bleibende Differenz ein. Die Ergebnisse zeigen, dass Zigarettennebenstromrauch sowohl eine primär zytotoxische Wirkung als auch einen synergistischen Effekt bei (mit SDS-) vorgeschädigten Keratinozyten zu haben scheint. Dieser Effekt verhält sich in umgekehrter Expositionsreihenfolge ebenfalls synergistisch, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß. Wigger et al. [2000] konnten in vivo nachweisen, dass die hautschädigende Wirkung des organischen Lösungsmittels Toluol nach vorheriger SDS-Behandlung einen additiven Effekt hervorruft, wohingegen die Reihenfolge der Exposition auf die Hautschädigung keinen Einfluss ausübte. Auch in den vorliegenden In-vitro-Ergebnissen konnte eine Toxizitätszunahme bei Doppelexposition festgestellt werden. Im Gegensatz zu den von Wigger et al. [2000] beschriebenen Ergebnissen spielte die Expositionsreihenfolge in vitro eine wichtige Rolle. Die zytotoxischen Effekte verhielten sich bei Präexposition mit SDS und anschließender Zigarettennebenstromexposition multiplikatorisch, wohingegen bei umgekehrter Expositionsreihenfolge eher ein additiver Effekt festzustellen war. Extrapoliert man die erhaltenen *In-vitro*-Ergebnisse auf mögliche In-vivo-Reaktionen, könnte die Vorschädigung durch das anionische Detergenz Natriumlaurylsulfat eine subklinische oder klinisch manifeste Hautschädigung simuliert werden. Kommt es nun zu einer zusätzlichen Zigarettennebenstromexposition, kann nach den erhobenen In-vitro-Ergebnissen nicht nur von einer Addition, sondern von einer Potenzierung der schädlichen Wirkung ausgegangen werden. Eine Vorschädigung der Barrierefunktion im Berufsleben sowie im Haushalt kann durch den Kontakt mit irritativen Substanzen zustande kommen. Wasser und Detergenzien schädigen bei jedem Kontakt den Lipidfilm der Haut und führen zum Herauslösen interzellulärer Lipide des Stratum corneums [Fartasch 1995]. Es kommt zu einer verstärkten Austrocknung der Epidermis; bei Folgeexposition wie dem Zigarettennebenstromrauch könnten die Irritanzien ungehindert in die Epidermis eindringen, die Keratinozyten schädigen und eine histologisch und immunologische Veränderung in Gang setzen. Weitere *In-vivo*-Untersuchungen zur Auswirkung und den möglichen synergistischen Effekten von Zigarettenrauch in der Innenraumluft auf die Haut stehen noch aus.

In-vivo-Untersuchungen (Teil 2 und 3 der Arbeit)

4.4 Zigarettennebenstromexposition in vivo

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals der Nachweis geführt werden, dass Zigarettennebenstromrauch in vitro einen Anstieg der Toxizität auf eine keratinozytäre Zelllinie (HaCaT-Zellen) im Neutralrotfreisetzungstest verursacht. Im nächsten Schritt wurden die Effekte in vivo untersucht, um zu überprüfen, ob sich dieses Ergebnis auf Invivo-Konditionen übertragen lässt. Es konnte auch in vivo gezeigt werden, dass der Zigarettennebenstromrauch mit Auswirkungen auf die Hautphysiologie verbunden ist, wobei insbesondere der pH-Wert beeinflusst wurde. Direkt nach Exposition kam es zu einem kurzzeitigen pH-Wert-Anstieg von 5,07 auf 6,06, der sich im Verlauf von sechs Stunden wieder normalisierte. In Anbetracht der Ausgangssituation, dass es sich bei Zigarettenrauch um ein komplexes Gemisch handelt, lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht exakt beurteilen, welche Komponente eine wesentliche alkalisierende Wirkung entfaltet. Möglicherweise spielt das Nikotin dabei eine wichtige Rolle, da es basisch wirkt und mit 3-7,5 mg pro Zigarette im Nebenstrom ein Hauptbestandteil der partikulären Phase darstellt. In Bezug auf die Bedeutung eines durch den Zigarettennebenstrom induzierten Anstieges des pH-Wertes auf die Funktion der Hautbarriere gilt es festzuhalten, dass in den Ergebnissen der Arbeit zwar kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen pH-Wert und Barrierefunktion nachgewiesen werden konnte, es aber zu einem Anstieg des TEWLs nach zwei Stunden gekommen ist. Auch in der Literatur wurden Zusammenhänge zwischen dem

pH-Wert der Hautoberfläche und der Barrierefunktion der Haut beschrieben [Eberlein-König et al. 2000]. Durch Veränderung des pH-Wertes der Hautoberflächen können werden; Folgereaktionen induziert die Synthese einiger barrierewirksamer Hornschichtlipide aus Vorstufen, wie die Bildung von Ceramiden durch die saure Sphingomyelinase, ist beispielsweise vom sauren Milieu abhängig [Mauro et al. 1998]. Experimentell konnte eine Hemmung der Barriereregeneration nach Stripping oder Acetonbehandlung der Hornschicht unter Einwirkung eines Puffers mit pH-Wert 7 im Vergleich zu pH-Wert 5,5 beobachtet werden [Mauro et al. 1998]. Das saure Milieu in der Hornschicht stabilisiert weiterhin die doppellamelläre Struktur der interzellulären Lipide [Osborne et al. 1998]; pH-Werte unter 4,5 und über 6,0 lassen die geordneten Strukturen und ihre Funktionsfähigkeit als Penetrationsbarriere zusammenbrechen; die mikrobielle Besiedlung der Haut wird zudem vom pH-Wert der Hautoberfläche gesteuert [Schmid et al. 1995]. Eine vorübergehende Anhebung des pH-Wertes, wie sie etwa die Verwendung alkalischer Seife hervorruft, kann somit die Hautbarrierefunktion beeinflussen [Korting et al. 1996]. Diese Effekte sind meist reversibel, wenngleich eine repetitive Anhebung pH-Wertes, des wie es bei wiederholter Zigarettennebenstromexposition der Fall ist, zu einer ausgeprägten Barriereschädigung führen könnte [Korting et al. 1996; Kindl et Raab 1988]. So kann ein wiederholter Kontakt der Haut mit schwach irritativen Substanzen, wie es der Zigarettennebenstromrauch in der vorliegenden Untersuchung zeigte, zum kumulativsubtoxischen Ekzem führen [Frosch et al. 1996].



Abb. 52: Kumulativ-toxisches Hautekzem [Jung et al. 1995]

Eine nur einmalige Exposition mit Zigarettennebenstromrauch in der gewählten Konzentration führt nicht zu klinisch sichtbaren Symptomen, ähnlich wie bei anderen toxischen Substanzen. Folgen aber einzelne Expositionen rasch und mehrfach hintereinander, sodass der pH-Wert sich nicht normalisieren kann, könnte es zu einem kumulativen Effekt kommen. Dieser Vorgang würde mit der Zeit zur Erschöpfung der Reparationsvorgänge der geschädigten Haut führen. Durch weitere Expositionen könnten Bestandteile des Zigarettennebenstromrauchs nun in tiefere Hautschichten gelangen und die lebenden Epidermiszellen schädigen. Auch diese Effekte haben bei Menschen mit bereits vorgeschädigter Barrierefunktion, wie zum Beispiel bei atopischer Dermatitis, Psoriasis, Neurodermitis oder Ichthyosis, eine besondere Bedeutung. Das kumulative irritative Kontaktekzem kann klinisch sehr unterschiedliche Erscheinungsformen annehmen, wobei die Hautreaktion von der Irritanzienart, konzentration, dem Expositionsmodus und der individuellen Hautreaktion abhängig ist. Dauer und Intensität der schädigenden Einwirkung zum Beispiel des Zigarettenrauchs sind neben dem Reparationsvermögen der Haut für das Manifestwerden derartiger Abnutzungsdermatosen maßgebend. Die Reizschwelle schwankt und hängt sowohl von angeborenen und erworbenen Hautfaktoren als auch von Alter, Geschlecht und Rasse ab [Ziegler et Rast 1995; Berardesca et al. 1994]. Langzeiteffekte, wie eine
Beeinträchtigung des Hydrolipidmantels, können somit nach Zigarettennebenstromexposition nicht ausgeschlossen werden.

Die Lipidperoxid-Konzentration der Hautoberflächenlipide stieq nach Zigarettennebenstromexposition deutlich an. Die Arbeitsgruppe um Pelle et al. [2002] untersuchten im Gegensatz zum Forschungsdesign der hier vorliegenden Arbeit, in der die Effekte des Zigarettennebenstromrauchs im Sinne einer topischen Exposition evaluiert wurden, die Lipidperoxid-Konzentration der Hautoberflächenlipide nach Zigarettenhauptstromexposition. Auch hier konnte ein Anstieg der Lipidperoxid-Konzentration ermittelt werden. Pryor et al. [1983] erbrachten den Nachweis, dass im Zigarettenneben- wie auch Zigarettenhauptstromrauch eine ähnliche Konzentration an Radikalen zu detektieren sind, von denen ausgegangen werden kann, dass sie in der Lage sind, eine Lipidperoxidation der Hautoberflächenlipide hervorzurufen [Niki et al. 1993]. Die freien Radikale, die durch Zigarettennebenstromrauch generiert wurden, könnten somit eine Lipidperoxid-Reaktion hervorgerufen haben, die wiederum zu einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion infolge veränderter Membranfluidität führen kann. Bereits durch einmalige Exposition der Haut mit Zigarettennebenstromrauch im Sinne des Passivrauchens wurde die Hautphysiologie geändert, es kam zu einem Anstieg des pH-Wertes. Dieser Trend könnte in Studien mit einer größeren Probandenanzahl sicher deutlicher herausgestellt werden.

4.5 Kohortenstudie

In einer groß angelegten Kohortenstudie wurde erstmals die Hautphysiologie mithilfe biophysikalischer Messmethoden und eines Lipidperoxid-Kits *in vivo* von Rauchern und Nichtrauchern charakterisiert und die Unterschiede bezüglich Alter, Geschlecht und/oder Rauchstatus evaluiert.

4.5.1 Epidermale Parameter

Der mittlere Hautoberflächen-pH-Wert von Männern zeigte sich signifikant gegenüber dem der Frauen reduziert. In der Literatur wird der pH-Wert der Hautoberfläche kontrovers diskutiert. Während Braun-Falco *et al.* [1986] einen pH-Wert-Bereich von 5,4 bis 5,9 beschreiben und die Bedeutung des Geschlechts auf den pH-Wert eher gering einschätzen, wird von Öhmann *et al.* [1994] bei Männern ein pH-Wert von 4,5 ± 0,2 und bei Frauen von 5,3 \pm 0,5 angegeben. Die von Öhmann *et al.* [1994] bestimmten pH-Werte stimmten nahezu mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Werten überein. Eine mögliche Ursache für den geschlechtsspezifischen Unterschied könnten zum Beispiel männliche und weibliche Hormone und ihr Einfluss auf die Hautanhangsgebilde, wie die ekkokrinen und apokinen Schweißdrüsen, sein. Männer verfügen im Gegensatz zu Frauen über weniger Schweißdrüsen.

In der Literatur wird kein signifikanter Unterschied der mittleren Hautoberflächen-pH-Werte in verschiedenen Altersgruppen beschrieben, was in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden konnte [Öhmann *et al.* 1994].

Wurden die erhobenen mittleren pH-Werte von Rauchern beider Geschlechter mit denen von Nichtrauchern verglichen, so bestand ein signifikanter Unterschied mit höheren Werten bei Rauchern, wobei sich die Werte noch im physiologischen Bereich bewegten. Eine mögliche Ursache für den erhöhten Hautoberflächen-pH-Wert von Rauchern könnten alkalische Bestandteile des Zigarettenrauchs sein, etwa Ammoniak, Nikotin oder einer seiner Metaboliten. Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, besitzt Nikotin basische Eigenschaften. Auch seinem Abbauprodukt Cotinin [Benowitz et al. 1999] wird diese Eigenschaft zugeschrieben. Die Metabolisierung von Nikotin gestaltet sich komplex. Nach der Inhalation des Zigarettenhauptstromrauchs wird Nikotin schnell resorbiert. Mit einer Halbwertszeit von 20 Stunden wird Nikotin zu 90 Prozent von der Leber zu Hydroxynikotin und Cotinin, die pharmakologisch unbedenklich sind, abgebaut [Spielmann et Steinhoff 1990]. Etwa 10 Prozent des aufgenommenen Nikotins werden nicht abgebaut, sondern unverändert über die Niere ausgeschieden [siehe Kapitel 1]. Es wäre denkbar, dass systemisch resorbiertes Ammoniak, Nikotin oder sein Abbauprodukt Cotinin zum Teil über die Haut ausgeschieden werden. Aus Untersuchungen ist bekannt, dass zum Beispiel Ammoniak über die Haut an die Umgebung abgegeben werden kann [Reuther et al. 2006]. Die Anwesenheit dieser Stoffe könnte aufgrund ihrer Basizität den pH-Wert der Hautoberfläche ansteigen lassen.

Bei der Stratum-corneum-Hydratation konnte kein geschlechtsspezifischer Einfluss ermittelt werden, was Bestätigung in der Literatur findet [Wilhelm *et al.* 1991; Maibach *et* Baran 1998]. Beim Vergleich der Werte aller Raucher gegenüber denen aller Nichtraucher waren die der Raucher tendenziell reduziert. Eine Reduktion der Stratumcorneum-Hydratationswerte durch systemisch resorbierten Zigarettenrauch könnte etwa durch eine Störung der Hautbarriere zum Beispiel in Form der Beeinflussung des Ceramidmetabolismus verursacht worden sein. Auch Effekte systemisch resorbierten Nikotins müssen bei der Betrachtung in Erwägung gezogen werden. *In vitro* wird Nikotin unter anderem eine Inhibition der keratinozytären Beweglichkeit wie auch ein Einfluss auf die keratinozytäre Differenzierung zugeschrieben [Grando *et al.* 1995; Grando *et al.* 1996]; zudem konnte *in vitro* ein Einfluss auf Zellzyklus- und Zelldifferenzierungsmarker wie Filaggrin verzeichnet werden [Arredondo *et al.* 2001].

Mit der Bestimmung des Transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) lässt sich *in vivo* eine Aussage über die Integrität der epidermalen Barrierefunktion treffen [Gfesser *et al.* 1996]. So weist intakte Haut mit einer funktionierenden Barriere in der Regel niedrigere TEWL-Werte auf als chemisch oder durch Erkrankung beeinträchtigte Haut. Beim Vergleich der erhobenen TEWL-Werte von Männern mit denen von Frauen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden, was in verschiedenen Studien Bestätigung findet [Panisset *et al.* 1992; Agner 1991; Tupker *et al.* 1990].

Für die epidermalen Parameter müsste in fortführenden Studien detailliert die Frage untersucht werden, ob sich Nikotin, einer seiner Metaboliten oder Ammoniak in der Hydrolipidschicht der Haut von Rauchern determinieren lassen.

4.5.2 Dermale Parameter

Auch die Untersuchung dermaler Strukturen zeigte im Hinblick auf die Oberflächenstruktur und elastische wie auch viskoelastische Eigenschaften des Gewebes interessante Ergebnisse.

Bildanalytische Bewertungen der Oberflächenstruktur der Haut erfolgten mithilfe des SELS-Verfahrens (Surface Evaluation of Living Skin) (Visioscan®), das gleichzeitig die vier Parameter Hautrauigkeit, -schuppigkeit, -glätte und -faltigkeit erfasst [Tronnier *et al.* 2000]. Die Messparameter geben qualitativ und quantitativ Auskunft über den physiologischen Zustand der Hautoberfläche. Die Rauigkeitsparameter R1 bis R5, die ursprünglich aus der Metallverarbeitung stammen, wurden der Vollständigkeit halber mit ausgewertet.

Der Vergleich der erhobenen mittleren Visioscan®-Werte von allen Rauchern, unabhängig von Geschlecht oder Alter, mit denen von allen Nichtrauchern zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied bei den Rauigkeitsparametern R1 bis R5 sowie bei dem SELS-Parameter SE_{sc}. Die Haut von Rauchern wies somit gegenüber der von Nichtrauchern eine erhöhte Schuppigkeit auf, möglicherweise verursacht durch systemisch resorbiertes Nikotin, dem verhornungsfördernde Eigenschaften zugeschrieben werden [Patil et al. 1999]. Systemisch resorbiertes Nikotin induziert zudem die Ausschüttung von Vasopressin. Dieses Hormon kann durch Engerstellung der Blutgefäße eine Verschlechterung der Durchblutung hervorrufen, was klinisch unter anderem durch kalte Hände und Füße sowie Hautblässe erkennbar wird [Dalla Vecchia et al. 2004; Finch et al. 2004; West et al. 1987]. Diese Verschlechterung der Durchblutung könnte zu einer Minderversorgung der unteren Hautschichten führen, was eine erhöhte Schuppigkeit der Haut zu Folge haben könnte [Silverstein 1992; Arredondo et al. 2003]. Auch eine Minderversorgung der unteren Hautschichten verursacht durch systemisch resorbiertes Kohlenmonoxid könnte das Ergebnis erklären. Kohlenmonoxid weist eine zweihundertfach höhere Affinität zu Hämoglobin auf als Sauerstoff, wodurch nicht nur weniger Sauerstoff aus der Lunge in die peripheren Gewebe transportiert wird, sondern auch die Abgabe des Sauerstoffs aus dem Blut in die Gewebe beeinträchtigt wird [Silverstein 1992].

Weitere mögliche epidermale Auswirkungen von systemisch resorbiertem Nikotin, die bereits in vitro gezeigt werden konnten, betreffen eine verstärkte Desquamation [Grando et al. 1996; Theilig et al. 1994] wie auch Inhibition der keratinozytären Beweglichkeit und Einfluss auf die keratinozytäre Differenzierung [Grando et al. 1995; Grando et al. 1996]. Es konnte darüber hinaus in vitro gezeigt werden, dass durch Nikotinexposition bei mRNAund Proteinebene verschiedene Keratinozyten auf Zellzyklusund Zelldifferenzierungsmarker, wie zum Beispiel Filaggrin, verändert werden konnten [Arredondo et al. 2001]. Durch einen reduzierten Filaggringehalt kann eine erhöhte Schuppigkeit der Haut hervorgerufen werden, da Metaboliten des Filaggrins einen Beitrag zum sogenannten "Natural Moisturizing Factor' (NMF) liefern. Durch den NMF wird der Hydratationszustand der Korneozyten wesentlich bestimmt [Rawling et al. 1994], was den Schluss zulässt, dass systemisch resorbiertes Nikotin einen Einfluss auf den Filaggrinmetabolismus nehmen und dadurch eine erhöhte Schuppigkeit der Haut verursachen könnte.

Da die Hauttopografie auch durch Veränderungen im dermalen Bindegewebe beeinflusst wird, müssen bei der Analyse ebenso dermale Stoffwechselveränderungen in Erwägung gezogen werden.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass viele der zuvor für UV beschriebenen Mechanismen der Induktion von Hautalterungsvorgängen auch für die durch Zigarettenrauch induzierte Hautalterung relevant sind [Yin *et al.* 2000; Arredondo *et al.* 2003]. So führt nicht nur UV-Bestrahlung, sondern auch die Exposition mit Zigarettenrauch in dermalen Fibroblasten zu einer signifikanten Aufregulation der Expression der Matrixmetalloproteinase-1 [Yin *et al.* 2000; Arredondo *et al.* 2003], wobei auch hier Nikotin und seinen Metaboliten eine besondere Bedeutung zukommt [Carty *et al.* 1996]. Es zeigte sich zudem in humanen Fibroblasten, die mit einem wasserlöslichen Tabakrauchextrakt exponiert wurden, dass es zu einem verminderten Gehalt an Kollagen im Überstand der Zellen kam. Dieser Prozess ging einher mit einer circa vierzigprozentigen Reduktion der Kollagenbiosynthese [Yin *et al.* 2000]. In Anbetracht der Ergebnisse dieser Studien könnte die topografische Veränderung der Haut durch Effekte systemisch resorbierter Bestandteile des Zigarettenhauptstroms auf den Kollagenmetabolismus hervorgerufen worden sein, die im folgenden Abschnitt weiter diskutiert werden.

Wurden die Visioscan®-Ergebnisse von Männern, unabhängig von Altersgruppe oder Rauchgewohnheiten, mit denen von Frauen verglichen, so konnte ein signifikanter Unterschied bei den Rauigkeitsparametern R1 bis R3 wie auch bei dem SELS-Parameter SE_r, ermittelt werden, wobei die Werte der Männer gegenüber denen der Frauen erhöht waren. Der SELS-Parameter SE_r beschreibt die Hautrauigkeit und hängt – wie auch die Parameter SE_{sm} und SE_w– von der Anzahl der Falten und ihrer Breite ab. In der vorliegenden Untersuchung konnte somit bei Männern eine signifikant höhere Rauigkeit der Haut ermittelt werden. Auch von der Arbeitsgruppe um Lagarde *et al.* [2005], die die Haut mithilfe von Silikonabdrücken auf topografische Unterschiede untersuchte, konnte eine höhere Rauigkeit bei Männern im Vergleich zu Frauen festgestellt werden. Da in der vorliegenden Untersuchung in Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen weder bei der Stratum-corneum-Hydratation noch beim Transepidermalen Wasserverlust (TEWL) ein signifikanter Unterschied zwischen Frauen und Männern zu ermittelt war, muss davon ausgegangen werden, dass die Ursachen dieser geschlechtsspezifischen Unterschiede unter anderem mit männlichen und weiblichen Hormonen und ihrem Einfluss auf die Zusammensetzung des dermalen Bindegewebes zu erklären sind [Maibach *et* Baran 1998]. Frauen haben weniger Kollagen als Männer, zudem ist die Haut der Männer nicht nur um 25 Prozent dicker, sondern auch die Kollagendichte, welche sich aus dem Verhältnis von Kollagen zur Hautdicke berechnet, signifikant gegenüber Frauen erhöht [Shuster 2005; Maibach *et* Baran 1998; Markova *et al.* 2004]. Auch wurde das Kollagen, vermutlich aufgrund des Einflusses der Androgene, bei Frauen als weniger dicht beschrieben [Shuster 2005; Maibach *et* Baran 1998; Boukhris 1989]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen findet man bei Frauen, die unter Virilismus leiden und einen erhöhten Androgenspiegel aufweisen, eine signifikant höhere dermale Kollagendichte [Shuster 2005; Maibach *et* Baran 1998].

Der Vergleich von rauchenden Männern mit Frauen, die rauchen, bestätigte signifikante Unterschiede hinsichtlich der Parameter R1 bis R5 und des SELS-Parameters SE_r, wohingegen sich bei den Nichtrauchern keine Unterschiede ermitteln ließen. Männer, die rauchen, hatten gegenüber Männern, die nicht rauchen, einen signifikant erhöhten R1-R5-Wert wie auch einen erhöhten SE_{sc}-Wert, während dieser Vergleich bei Frauen zwar einen deutlichen Unterschied erbrachte, der allerdings keine statistische Signifikanz erreichte. Die Symptome der Hautalterung scheinen sich bei Frauen im Gegensatz zu Männern bereits in früheren Jahren zu manifestieren. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnte darin bestehen, dass die männliche Haut nicht nur mehr Kollagen enthält als die weibliche, sondern auch um 25 Prozent dicker ist [Shuster *et al.* 1975]. Die von Maibach *et* Baran [1998] beschriebene geschlechtsunspezifische lineare Abnahme des Hautkollagens um 1 Prozent pro Jahr mit zunehmendem Alter scheint bei Frauen zu deutlich früheren Hautalterungssymptomen, wie etwa das Auftreten von Falten, zu führen als bei Männern [Shuster *et al.* 1975].

Die Zunahme der Falten in der Altersgruppe 2 im Vergleich zur Altersgruppe 1 bei Frauen könnte sich auch mit Faktoren intrinsischer Hautalterung erklären lassen. Der intrinsische Alterungsprozess zeigt sich in der Epidermis vor allem durch die Verlangsamung des keratinozytären Stoffwechsels und der Proliferation [Gilchrecht *et al.* 1996; Fenske *et al.* 1986]. Die Hautdicke nimmt alle 10 Jahre um circa 6 Prozent ab, wovon auch die Epidermis betroffen ist, damit einhergehend sinkt auch der Gehalt an wichtigen Matrixbestandteilen der Epidermis [Robert 2001; Hashiew *et al.* 2000], wobei vor allem Filaggrin und die damit zusammenhängenden Verbindungen zu nennen sind. Filaggrin übernimmt im Verlauf der keratinozytären Differenzierung wichtige Funktionen. Metaboliten von Filaggrin (Filament Aggregating Protein) bilden unter anderem den natürlichen Feuchthaltefaktor der Haut (Natural Moisturizing Factor; NMF), der Wasser im Stratum corneum hält und die Haut vor Austrocknung schützt [Harding *et al.* 2000]. Da sich der Filaggringehalt wie auch die Stratum-corneum-Hydratation mit zunehmendem Alter reduziert, wird von einem Zusammenhang von Filaggringehalt und trockener, schuppiger Haut ausgegangen [Tezuka *et al.* 1994]. Die Ursache der erhöhten Faltigkeit der Haut in der Altersgruppe 2 könnte somit aus dem altersbedingten reduzierten Filaggringehalt resultieren, da die Faltigkeit auch von der epidermalen Hydratation abhängt.

Die Ursache der erhöhten Faltigkeit könnte in intrinsisch bedingten Veränderungen der Dermis liegen. Vergleicht man als Maß für die Syntheseaktivität die mRNA der Fibroblasten einer jungen Altersgruppe mit der einer alten, so stellt man für zum Beispiel Prokollagen Typ I eine Abnahme der Syntheseaktivität von circa 60 Prozent fest [Varani et al. 2000]; zudem steigt die Syntheserate der Kollagenasen an [Varani et al. 2000]. Im Alter wird also nicht nur weniger Kollagen hergestellt, sondern dieses wenige Kollagen wird auch noch verstärkt abgebaut. Beide Effekte zusammen führen dazu, dass der Kollagengehalt wie bereits angemerkt im Schnitt um 1 Prozent pro Lebensjahr abnimmt [Maibach et Baran 1998], wodurch es zu einer Abnahme der Zugfestigkeit der Haut und damit zum Auftreten von Falten kommen kann. Weitere Polymerfamilien in der extrazellularen Matrix sind Proteoglykane, Glykosaminoglykane, zu denen zum Beispiel die Hyaluronsäure gehört, und strukturelle Glykoproteine, wie Fibronectin und Laminin. Proteoglykane und Glykosaminoglykane füllen den Raum zwischen den Fasern aus und sind an der strukturellen Ausrichtung und einer ausreichenden Hydratisierung der Kollagenfaserbündel beteiligt [Robert 2001]. Die Hyaluronsäure ist ein hochmolekulares Polysaccharid, das große Wassermengen binden kann. Die Abnahme der Hautfeuchtigkeit im Alter wird unter anderem mit der Abnahme der Produktion hauteigener Hyaluronsäure erklärt [Robert 2001: Vaillant et al. 1996]. Zusammenfassend betrachtet können diese Veränderungen dazu führen, dass sich Falten bilden, da das stützende Gewebe einsinkt. Auch der Zusammenhalt von Dermis und Epidermis wird mit zunehmendem Alter geschwächt, was wiederum zu einer erhöhten Faltigkeit führen kann [Fenske *et al.* 1986; Amano *et al.* 2000].

Bezüglich des Vergleichs der verschiedenen Altersgruppen von Frauen untereinander konnte erwartungsgemäß beim Vergleich der Altersgruppe 1 und 3 nicht nur eine reduzierte Faltigkeit, sondern auch eine glattere Haut in der jüngeren Altersgruppe ermittelt werden, was in Übereinstimmung mit verschiedenen Studien steht [Manuskiatti *et al.* 1998; Lagarde *et al.* 2005]. Auch im Vergleich der Altersgruppe 2 mit der Altersgruppe 3 konnte gezeigt werden, dass die Probandinnen der Altersgruppe 2 eine glattere Haut aufwiesen.

Bei Frauen war kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der topografischen Oberfläche beim Vergleich von Raucherinnen mit Nichtraucherinnen in den Altergruppen 1 und 2 zu ermitteln. Hingegen unterschieden sich Raucherinnen in der Altersgruppe 3 statistisch höchst signifikant von Nichtraucherinnen in den SELS-Parametern SE_{sc}, SE_w und SE_{sm}. Der Parameter SE_w gibt Hinweise zur Faltigkeit der Haut und errechnet sich aus der Anzahl und mittleren Breite von horizontalen und vertikalen Falten. Der Parameter SE_{sm} beschreibt die Hautglätte, die sich aus der mittleren Breite der Falten berechnet. Die Schuppigkeit der Raucherinnen in dieser Altersgruppe viel größer aus, allerdings waren erstaunlicherweise die Falten reduziert und die Haut glatter. Die erhöhte Schuppigkeit könnte sich mit der oben diskutierten verhornungsfördernden Eigenschaft des Nikotins erklären lassen [Patil *et al.* 1999]. Möglicherweise manifestiert sich diese verhornungsfördernde Eigenschaft des Nikotin den altersbedingt bereits reduzierten Filaggringehalt weiter negativ beeinflusst.

Der Vergleich von Raucherinnen mit Nichtraucherinnen prämenopausal erbrachte keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Hautoberflächentopografie, wohingegen derselbe Vergleich postmenopausal signifikante Unterschiede zeigte.

In Ergänzung zur Hauttopografie wurden die biomechanischen Eigenschaften der Haut evaluiert. Als Hintergrund für die Berechnung der Hautelastizität wurden in der vorliegenden Arbeit die zwölf Cutometer-Basiswerte (R0 bis R9, F0 und F1) verwendet, denen verschiedene elastische Eigenschaften der Haut zugeordnet werden. Die Haut von Rauchern unterschied sich signifikant von der der Nichtraucher in den Elastizitätsparametern R6, R9 und F0. So war die Haut der Nichtraucher elastischer (R6) und zeigte niedrigere "Ermüdungserscheinungen" (R9, F0). Anhand dieses Befundes kann davon ausgegangen werden, dass Zigarettenrauch einen Einfluss sowohl auf die elastischen wie auch viskoelastischen Eigenschaften des Bindegewebes zu nehmen scheint. Kollagenfasern stellen ein relativ dehnsteifes, fibröses Material von außerordentlich hoher Reiß- und Zugfestigkeit dar. Relaxationsvorgänge innerhalb der Kollagenfasern beziehungsweise an der Grenzfläche zwischen Fasern und Matrix, die unter anderem vom Wassergehalt abhängig sind, werden für die viskoelastischen Eigenschaften verantwortlich gemacht [Purslow et al. 1998; Wilhelmi et al. 1998]. Die Rückstellung der Kollagenfasern in ihren relaxierten Zustand werden auf die elastischen Fasern zurückgeführt [Gibson et Kenedi 1967; Uitto 1986]. Kollagen und Elastin bilden offensichtlich die für die Hautelastizität entscheidenden Matrixproteine [Robert 2001]. Die viskoelastischen Eigenschaften der Haut werden maßgeblich von den Interaktionen zwischen den makromolekularen Komponenten in der extrazellulären Matrix beeinflusst [Hsu et al. 1994]. Die Matrix ist wasserunlöslich, besitzt aber eine enorme Wasserbindungskapazität und stellt ein viskoses Material dar. Von den viskosen Anteilen der Viskoelastizität wird angenommen, dass sie von den Komponenten der amorphen Grundsubstanz abhängig sind [Daly et Odland 1979; Vogel 1981]. Die Matrix beinhaltet Glukosaminoglykane, die, teilweise an Peptidketten geknüpft, Proteoglykane bilden, welche insbesondere durch ihre Wasserbindungsfähigkeit für die Hydratation verantwortlich sind [Benedetto 1998]. Diese Eigenschaft gilt auch für Hyaluronsäure, die ebenfalls eine hohe Wasserbindungsfähigkeit besitzt.

Es muss davon ausgegangen werden, dass Bestandteile des Zigarettenrauchs, wie zum Beispiel Nikotin oder Kohlenmonoxid, Einfluss auf den Metabolismus der kollagenen und elastischen Fasern wie auch auf den einiger Bestandteile der bindegewebigen Grundsubstanz genommen haben könnten.

In vitro konnte gezeigt werden, dass nicht nur eine UV-Bestrahlung, sondern auch eine Exposition mit Zigarettenrauch in primären humanen dermalen Fibroblasten zu einer signifikanten Aufregulation der Expression der Matrixmetalloproteinase-1 und darüber hinaus die kombinierte Exposition zu einem additiven Effekt führt [Yin *et al.* 2000]. Neben Induktion der Matrixmetalloproteinase-1 wurde in *In-vitro*-Untersuchungen nach

Exposition von Fibroblasten auch eine deutliche Aufregulation der Matrixmetalloproteinase-3-Expression sowohl auf mRNS- wie auch auf Proteinebene beobachtet. Im Gegensatz hierzu kam es zu keiner veränderten Expression der gewebespezifischen Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen, etwa TIMP-1 und TIMP-3 [Yin et al. 2000]. Zigarettenrauch scheint auch direkten Einfluss auf die Kollagenbiosynthese zu nehmen. So zeigte sich in vitro in humanen Fibroblasten, die mit einem wasserlöslichen Extrakt, der aus Zigarettenrauch hergestellt worden war, behandelt wurden, ein verminderter Gehalt an Kollagen im Überstand der Zellen, wobei der Prozess mit einer circa vierzigprozentigen Reduktion der Kollagenbiosynthese einherging [Yin et al. 2000]. Der Einfluss der verminderten Expression der Matrixmetalloproteinase-1 bei durch Zigarettenrauch induzierter vorzeitiger Hautalterung wurde zudem in In-vivo-Untersuchungen bestätigt [Lahmann et al. 2001]. In weiterführenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die durch Zigarettenrauch induzierten Veränderungen, wie auch die durch UV-Licht induzierten, durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt werden. So war es möglich, die Veränderungen durch Zugabe von Antioxidantien, insbesondere von Singulett-Sauerstofffängern, zu inhibieren [van Antwerpen et al. 1995]. Mittels real time-PCR konnte nachgewiesen werden, dass der Gehalt an MMP-1 mRNS in der Haut von Rauchern signifikant höher ist als in der Haut von Nichtrauchern, wohingegen kein Unterschied beobachtet werden konnte, wenn die Expression des gewebespezifischen Inhibitors der Matrixmetalloproteinase-1 (TIMP-1) untersucht wurde [Morimoto et al. 1997]. Es ist somit davon auszugehen, dass Zigarettenrauch nicht nur einen Effekt auf die Kollagensynthese, sondern auch auf den Kollagenabbau ausübt, was wiederum Auswirkungen auf die Elastizität der Haut hat.

In der Literatur wird außerdem eine Zunahme an Elastose bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern beschrieben [Boyd *et al.* 1999; Kennedy *et al.* 2003]. Diese bei Rauchern zu beobachtende Elastose ist mit einer solaren Elastose vergleichbar und in UV-exponierten Stellen noch verstärkt [Boyd *et al.* 1999; Kennedy *et al.* 2003]. *In vitro* wie auch im Tierversuch konnte eine Zunahme von MMP-9 bei Rauchern festgestellt werden [An *et al.* 2003; Russell *et al.* 2002; Seagrave *et al.* 2004]. Eine erhöhte Expression dieser Metalloproteinase konnte ebenfalls nach UV-Exposition nachgewiesen werden [Patroi *et al.* 2003]. Neben dem Elastinabbau werden auch andere extrazelluläre

Matrixproteine durch diese Matrixmetalloproteinase beeinflusst [Kerscher *et* Williams 2004; Rodiguez-Pla *et al.* 2005; Patroi *et al.* 2003]. Der Vergleich der Elastizitätsparameter von Männern mit denen von Frauen erwies sich als statistisch nicht signifikant. Von Maibach *et* Baran [1998] und Escoffier *et al.* [1989] wurden ebenfalls keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bezüglich der elastischen Eigenschaften der Haut beschrieben. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede hinsichtlich Hautdicke und Kollagenmenge scheinen sich somit nicht auf die biomechanischen Eigenschaften der Haut auszuwirken [Maibach *et* Baran 1998].

Bei geschlechtsspezifischen statistischen Analysen fanden sich folgende Ergebnisse: Beim Vergleich der Elastizitätsparameter von Männern, die rauchen, mit denen, die nicht rauchen, konnte eine statistische Signifikanz beim R6-Parameter ermittelt werden. Dieser Parameter beschreibt das Verhältnis der viskösen zur elastischen Deformation. Die Haut der männlichen Raucher besaß eine niedrigere Elastizität als die der Nichtraucher. Wurden die Elastizitätsparameter von Raucherinnen mit denen von weiblichen Nichtraucherinnen verglichen, so erwiesen sich die Parameter R5, R6, R9, F0 sowie F1 als statistisch signifikant verschlechtert. Somit wurden bei den Frauen, die rauchen, nicht nur elastische, sondern zusätzlich viskoelastische Parameter durch Zigarettenrauch beeinflusst, möglicherweise resultierend aus einer Beeinflussung der extrazellulären Matrixproteine durch Zigarettenrauch.

Eine getrennte Analyse der verschiedenen Altersgruppen mit Vergleich von Rauchern mit Nichtrauchern deutet darauf hin, dass elastische und kollagene Fasern jüngerer Menschen unter Umständen stärker durch Zigarettenrauch beeinflusst werden. Eine Ursache für diesen Befund könnte das spätere Überwiegen des Einflusses intrinsischer Alterungsfaktoren auf die Hautalterung älterer Probanden sein. Diese Aussage bedarf jedoch zur Verifizierung weiterer Untersuchungen.

In den nachfolgenden Vergleichen wurden die elastischen Parameter der Haut unterschiedlicher Altersgruppen zueinander in Beziehung gesetzt. Der Vergleich der Elastizität jüngerer Altersgruppen mit älteren zeigte, dass sich zumeist eine bessere Elastizität und verringerte "Ermüdungserscheinungen" bei jüngeren Probanden feststellen ließ. Die Erklärung dieses Ergebnisses kann auf die intrinsische Veränderung dermaler Bestandteile zurückgeführt werden. Bei Frauen der Altersgruppe 3 (im postmenopausalen Stadium) kann zudem davon ausgegangen werden, dass durch den Rückgang der Östrogene vor allem die Biosynthese von Hyaluronsäure und die Hautdicke negativ beeinflusst wird und es dadurch zu einer Verschlechterung der biomechanischen Eigenschaften der Haut kommt [Smith 1989; Berardesca *et al.* 1989]. Die prämenopausalen Frauen wiesen insgesamt eine festere Haut, eine bessere Rückbildungsfähigkeit der Haut, eine bessere Elastizität sowie niedrigere ,Ermüdungserscheinungen' auf. Warum der R5-Parameter, der sich in unserer Untersuchung in älteren Probandengruppen als verbessert darstellte, von dem generellen Trend abwich, bleibt in Folgestudien zu untersuchen.

Wurden die Elastizitätsparameter von Frauen unter 47 Jahren, die rauchen, mit denen, die nicht rauchen, verglichen, so war die Haut der Nichtraucherinnen erwartungsgemäß elastischer und zeigte geringere "Ermüdungserscheinungen". Durch den Vergleich von Frauen mit oder über 47 Jahren, die rauchen, mit denen, die nicht rauchen, konnte ermittelt werden, dass Nichtraucherinnen über eine festere Haut, geringere "Ermüdungserscheinungsricheinungsfähigkeit der Haut verfügten. Es scheint somit, als ob sich die negativen Auswirkungen des Zigarettenrauchs auf den dermalen Bindegewebsstoffwechsel postmenopausal verstärken.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in dieser Studie gezeigt werden konnte, dass Zigarettenrauch einen deutlichen Einfluss auf biomechanische Eigenschaften der Haut zu nehmen scheint. Es ist davon auszugehen, dass sowohl elastische wie auch viskoelastische Bestandteile des Bindegewebes durch Rauchen im Sinne systemisch resorbierten Zigarettenrauchs beeinflusst werden.

4.5.3 Lipidperoxid-Konzentration

Zellmembranen werden aufgrund ihres Gehalts an Polyenfettsäuren (zum Beispiel Linolund Linolensäure) zum häufigen Angriffspunkt einer Lipidperoxidation [Cheesemen 1993]. Die Lipidperoxidation stellt eine physiologisch unerwünschte Reaktion dar. Der durch sie verursachte Abbau von Fettsäuren kann zur Destabilisierung von Zellmembranen führen. Sauerstoff spielt in der Reaktionskaskade eine wichtige Rolle. Reagiert ein Radikal mit einer ungesättigten Fettsäure, entsteht ein Lipidradikal, welches erneut Fettsäuren angreift. Durch die Anwesenheit von Sauerstoff wird dieser Prozess unterhalten (Propagation). Ist der Prozess gestartet, kann er nur durch Scavenger oder der Reaktion zwischen zwei Radikalen unterbrochen werden [Jones *et al.* 1999]. Die Lipide im Stratum corneum setzen sich hauptsächlich aus Ceramiden, Cholesterol, Cholesterolestern und freien Fettsäuren zusammen, die trotz des Fehlens der Phospholipide als physiologische Lipide von Biomembranen in der Lage sind, ein hochgeordnetes, multilamellares System zu bilden. In der Pathogenese von Hautkrankheiten nimmt die Lipidperoxidation eine zentrale Stellung ein, da die Haut eine besonders hohe Konzentration von ungesättigten Fettsäuren in der Membranschicht enthält.

Ob Zigarettenhauptstromrauch im Sinne einer systemischen Resorption einen Einfluss auf die Lipidperoxid-Konzentration der Hautoberfläche nimmt, wurde bislang noch nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit erbrachte der Vergleich der Lipidperoxid-Konzentration der Hautoberfläche von Rauchern mit Nichtrauchern keine statistische Signifikanz. In verschiedenen Studien konnte hingegen gezeigt werden, dass Raucher einen erhöhten MDA-Plasma-Level als Nachweis der Lipidperoxid-Konzentration aufweisen [Solak et al. 2005; Ozguner et al. 2005; Ozbay et al. 2002; Nielson et al. 1997; Lykkesfeldt et al. 2004]. Von Pelle et al. [2002] stellten fest, dass eine Zigarettenhauptstromexposition des volaren Unterarms zu einer Generierung von Hornschicht-Lipidperoxiden über 24 Stunden führte. In der vorliegenden Arbeit konnte ein deutlicher, wenn auch statistisch nicht signifikanter Anstieg der Hornschicht-Lipidperoxide durch Zigarettennebenstromexposition nachgewiesen werden. Ein direkter Kontakt zu Zigarettenneben- oder auch Zigarettenhauptstromrauch scheint somit eine Lipidperoxidation der Hautoberflächenlipide hervorzurufen. Wird Zigarettenrauch inhaliert, läuft eine Lipidperoxidation durch Bildung von freien Radikalen in verschiedenen Geweben und Zellen, etwa der Lunge, ab. Die durch Radikale des Zigarettenrauchs verursachte systemische Reaktion scheint epidermale und dermale lediglich als Folgereaktion hervorzurufen. Schädigungen Endprodukte der Lipidperoxidation stehen unter anderem als Promotoren der Kanzerogenese in der Diskussion [Cheeseman 1993; Cerruti 1985].

Der Vergleich der verschiedenen Altersgruppen erbrachte in unserer Untersuchung keine statistische Signifikanz der Lipidperoxid-Konzentration. Es konnte hingegen gezeigt werden, dass Probanden mit zunehmendem Alter eine erhöhte Plasma-Lipidperoxid-Konzentration aufwiesen [Goraca *et al.* 2005]. Die Lipide der Hautoberfläche unterliegen zwar altersbedingten Veränderungen, die sich allerdings

ohne exogenen Einfluss nicht in Form einer Lipidperoxidation zu manifestieren scheinen [Maibach *et* Baran 1998].

Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass Rauchen im Sinne einer systemischen Resorption des Zigarettenrauchs (ohne direkten Kontakt zur Hautoberfläche) keine Auswirkung auf die Lipidperoxid-Konzentration der Hautoberfläche zu haben scheint.

5 Literatur

Abraham W, Wertz, PW, Landmann L, Downing DT (1987) Stratum corneum lipid liposomes: calcium-induced transformation into lamellar sheets. J Invest Dermatol; 88: 212-4

Adams GR, Huston TL (1975) Social perception of middle-aged persons varying in physical attractiveness. Dev Psychol; 11: 657-8

Agner T (1991) Basal transepidermal water loss, skin thickness, skin blood flow and skin colour in relation to sodium-lauryl-sulphate-induced irritation in normal skin. Contact Dermatitis; 25: 108-14

Amano S, Matsunaga Y, Akutsu N, Kadoya K, Fukuda M, Horii I, Takamatsu T, Adachi E, Nishiyama T (2000) Basement membrane damage, a sign of skin early aging, and laminin 5, a key player in basement membrane player. IFSCC Magazine; 3(4): 15-21

Ambrose JA, Barua RS (2004) The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. J Am Coll Cardiol; 43(10): 1731-7

An L, Zhang HY, Pang BS, Niu SJ, Ma L, Xin P, Weng XZ (2003) Expression of matrix metalloproteinases in lung tissue and levels of some cytokines in bronchoalveolar lavage fluid in the obstructive emphysema rat models. Zhonghua Nei Ke Za Zhi; 42(3): 181-5

Anon (1986) Tobacco Smoking, IARC Monograph Vol. 38, IARC, Lyon

van Antwerpen VL, Theron AJ, Richards GA, Steenkamp KJ, van der Merwe CA, van der Walt R, Anderson R (1995) Vitamin E, pulmonary functions, and phagocytemediated oxidative stress in smokers and nonsmokers. Free Radic Biol Med; 18(5): 935-41

Arredondo J, Nguyen VT, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando SA (2001) A receptor-mediated mechanism of nicotine toxicity in oral keratinocytes. Lab Invest; 81(12): 1653-68

Arredondo J, Hall LL, Ndoye A, Nguyen VT, Chernyavsky Al, Bercovich D, Orr-Urtreger A, Beaudet AL, Grando SA (2003) Central role of fibroblast alpha3 nicotinic acetylcholine receptor in mediating cutaneous effects of nicotine. Lab Invest; 83(2): 207-25 **Arredondo J, Chernyavsky AI, Grando SA (2006)** Nicotinic receptors mediate tumorigenic action of tobacco-derived nitrosamines on immortalized oral epithelial cells. Cancer Biol Ther; 5(5): 511-7

Arosio E, De Marchi S, Rigoni A, Prior M, Lechi A (2006) Effects of smoking on cardiopulmonary baroreceptor activation and peripheral vascular resistance. Eur J Clin Invest; 36(5): 320-5

Aruoma OI, Halliwell B (1998) Molecular Biology of free radicals in human diseases. OICA International, Santa Lucia, London

Babior BM, Woodman RC (1990) Chronic granulomatous disease. Semin-Hematol; 27(3): 247-59

Balfour DJK (1994) Neuronal mechanisms underlying nicotine dependence. Addiction; 89(11): 1419-23

Barel AO, Clary P (1996) Measurement of epidermal capacitance. In: Serup J, Jemes GBE (Eds.) Non invasive methods and the skin. Boca Raton, Florida: CRC; 165-70

Barker JNWN, Mitra RS, Griffiths CEM, Dixit VM, Nickoloff BJ (1991) Keratinocytes as initiators of inflammation. Lancet; 337: 211-4

Batra A, Buchkremer G, Optz K, Tölle R (2003) Tabakabhängigkeit. Suchtmedizinische Reihe Band 2. Herausgegeben vom Wissenschaftlichen Kuratorium der Deutschen Hauptstelle für Suchtfragen e. V. (DHS)

Benedetto AV (1998) The environment and skin aging. Clin Dermatol; 16: 129-39

Benowitz NL (1999) Biomarkers of environmental tobacco smoke exposure. Environmental Health Perspectives; 107(2): 349-55

Berardesca E, Maibach HI (1990) Transepidermal water loss and skin surface hydration in the non-invasive assessment of stratum corneum function. Dermatosen; 38 Heft 2: 50-3

Berardesca E, Fideli D, Borroni G, Rabbiosi G, Maibach HI (1990) In vivo hydration and water-retention capacity of stratum corneum in clinically uninvolved skin in atopic and psoriatic patients Acta Derm Venereol; 70: 400-4

Berardesca E, Distante F (1994) The modulation of skin irritation. Contact Dermatitis; 31(5): 281-7

Berardesca E, Elsner P, Wilhelm KP, Maibach HI (1995) Bioengineering of the skin. Methods and instrumentations. CRC Press

Bernerd F, Asselineau D (1998) UVA exposure of human skin reconstructed in vitro induces apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissue repair and implications in photo-aging. Cell Death Differ; 5: 792-802

Bernstein EF (2002) Reactive oxygen species activate the human elastin promoter in a transgenic model of cutaneous photoaging. Dermatol Surg; 28(2): 132-5

Berton A, Godeau G, Emonard H, Baba K, Belon P, Hornebeck W, Bellon G (2000) Analysis of the ex vivo specificity of human gelatinases A and B towards skin collagen by computerized morphometry. Matrix Biol; 19: 139-48

Blanken R, Van der Valk PGM, Nater JP, Dijkstra H (1987) After work emollient creams effect on irritant skin reactions. Derm Beruf Umwelt; 35: 95-8

Boelsma E, Verheoven MCH, Ponec M (1999) Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line. J Invest Dermatol; 112: 489-98

Bolinder G, Noren A, de Faire U, Waren U (1997) Smokeless tobacco use and atherosclerosis: an ultrasonographic investigation of carotid intima media thickness in healthy middleaged men. Atherosclerosis; 132: 95-103

Bolinder G, de Faire U (1998) Ambulatory 24-h blood pressure monitoring in healthy, middle-aged smokeless tobacco users, smokers, and nontobacco users. Am J Hypertens; 11: 1153-63

Borenfreund EJA (1984) A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). J Tissue Cult Meth; 9: 7-9

Both W, Busch P (1998) Torsion measurement as a means of assessing skin characteristics. SÖFW 4; 182-95

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreuz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. J Cell Biol; 106: 761-71

Boukhris R (1989) Sex hormones and the skin. J Gynecol Obstet Biol Reprod; 18(7): 831-42

Bouwstra JA, Gooris GS, Cheng K, Weerheim A, Bras W, Ponec M (1996) Phase behaviour of isolated skin lipids. J Lipid Res; 37: 999-1011

Boyd AS, Stasko T, King LE (1999) Cigarette smoking- associated elastotic changes in the skin. J Am Acad Dermatol; 41: 23-26

Branchet MC, Boisnic S, Frances C, Robert AM (1990) Skin thickness changes in normal aging skin. Gerontology; 36(1): 28-35

Braun-Falco O, Korting HC (1986) Normal pH value of human skin. Hautarzt; 37(3): 126-9

Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC, Bhagavathula N, Kang S, Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ (2003) Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human. Photochem Photobiol; 78(1): 43-8

Brown MW, Hamilton LG, Long SP (2003) Seife, Öle, Fette und Wachse; 129: 2-12 **Buchkremer G, Rath N (1989)** Raucherentwöhnung – Psychologische und pharmakologische Methoden; Georg Thieme-Verlag; 4-11 und 35-47

Carty CS, Soloway PD, Kayastha S, Bauer J, Marsan B, Ricotta JJ, Dryjski M (1996) Nicotine and cotinine stimulate secretion of basic fibroblast growth factor and affect expression of matrix metalloproteinases in cultured human smooth muscle cells. J Vasc Surg; 24(6): 927-34

CEPA (California Environmental Protection Agency) (1997) Health effects of exposure to environmental tobacco smoke. California Environmental Protection Agency, Sacramento, California

Church DF, Pryor WA (1985) Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. Environ Health Perspect; 64: 111-26

Cerruti PA (1985) Proxidant states and tumor activation. Science; 227: 375-81

Cheeseman KH (1993) Lipid peroxidation and Cancer. In: Halliwell B und Aruoma OI DNA and Free radicals Ellis Horwood, London; 109-44

Cherek DR, Lowe WC, Friedman TT (1981) Effects of ammonium chloride on urinary pH and cigarette smoking behaviour. Clin Pharmacol Ther; 29(6): 762-70

Courage und Khazaka (2002) Informationen und Gebrauchsanweisung zum Cutometer MPA 580. Köln

Cua AB, Wilhelm KP, Maibach HI (1990) Frictional properties of human skin: relation to age, sex and anatomical region, stratum corneum hydration and transepidermal water loss. Br J Dermatol; 123: 473-9

Cua AB, Wilhelm KP, Maibach HI (1990) Elastic properties of human skin: relation to age, sex, and anatomical region. Arch Dermatol Res; 282(5): 283-8

Cunliffe WJ, Kearney JN, Simpson NB (1980) A modified photometric technique for measuring sebum excretion rate. J Invest Dermatol; 77: 394-5

Daly CH, Odland GF (1979) Age-related changes in the mechanical properties of human skin. J Invest Dermatol; 73: 84

Dalla Vecchia L, Palombo C, Ciardetti M, Porta A, Milani O, Kozakova M, Lucini D, Pagani M (2004) Contrasting effects of acute and chronic cigarette smoking on skin microcirculation in young healthy subjects. J Hypertens; 22(1): 129-35

D`Ans-Lax, Heiland W, Hertel P, Jovanovic S, Kratz JV, Lechner MD, Markert B, Neumann M, Nordmeier E, Rosemeyer H, Steinmeier D, Thiemann O, Wöhlecke M (1992) Taschenbuch für Chemiker und Physiker Band 1: Physikalisch-chemische Daten

Dasgupta P, Kinkade R, Joshi B, Decook C, Haura E, Chellappan S (2006) Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and survivin. Proc Natl Acad Sci USA; 103(16): 6332-7

Dean RT, Fu S-L, Stocker R, Davies MJ (1997) Biochemistry and pathology of radicalmediated protein oxidation. Biochemical Journal; 324: 1-18

De Fine Olivarius F, Agner T, Menne T (1993) Skin barrier function and dermal inflammation. An experimental study of transepidermal water loss after dermal tuberculin injection compared with SLS patch testing. Br J Dermatol; 129(5): 554-7

Deutsche Forschungsgemeinschaft (1999) Passivrauchen am Arbeitsplatz. Ethanol-Änderung und Einstufung krebserzeugender Arbeitsstoffe. Wiley-VCH, Weinheim, New York

Donald P, Kadunce M, Randy Burr MD, Richarg Gress MS, Richard Kanner MD, Joseph L, Lyon MD, John J Zone, MD (1991) Cigarette Smoking: Risk Factor for Premature Facial Winkling. Annals of Internal Medicine; 114: 840-4

Eagle (1976) Tissue Culture Assoc Manual; 3: 517-20

Eberlein-König B, Schafer T, Huss-Marp J, Darsow U, Mohrenschlager M, Herbert O, Abeck D, Kramer U, Behrendt H, Ring J (2000) Skin surface pH, stratum corneum hydration, trans-epidermal water loss and skin roughness related to atopic eczema and skin dryness in a population of primary school children. Acta Derm Venereol; 80(3): 188-91

Epe B (1991) Chem Biol Interact; 80: 239-60

Elias PM, Brown BE, Ziboh VA (1980) The permeability barrier in essential fatty acid deficiancy: evidence for direct role for linoleic acid in barrier function. J Invest Dermatol; 74: 230-3

Elias PM (1983) Epidermal lipids, barrier function and desquamation. J Invest Dermatol; 80: 44-49

Elias PM (1990) The importance of epidermal lipids for the stratum corneum barrier. In: Osborne, DW, Amann, AH (Eds.), Topical drug delivery formulations; 13-28

Elsner P, Wilhelm D, Maibach HI (1990) Mechanical properties of human forearm and vulvar skin. Br J Dermatol; 122: 607-14

Ennen J, Jaspers S, Sauermann G, Hoppe U (1995) Measurement of biomechanical properties of human skin. In: Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide; 95-101

EPA (Environmental Protection Agency) (1993) Respiratory health effects of passive smoking: lung cancer and other disorders. The report of the US Environmental Protection Agency. US Department of Health and Human Services, Environmental Protection Agency, Washington DC

Escoffier C, de Rigal J, Rochefort A, Vasselet R, Leveque JL, Agache PG (1989) Age-related mechanical properties of human skin: an in vivo study. J Invest Dermatol; 93(3): 353-7

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radic Biol Med; 13(4): 341-90

Fartasch M (1995) Human barrier formation and reaction to irritation. Curr Probl Dermatol; 23: 95-103

Fazio MJ, Olsen DR, Uitto JJ (1989) Skin aging: lessons from cutis laxa and elastoderma. Cutis; 43: 437-44

Feichter J (2003) Aerosole und das Klimasystem. Physik in unserer Zeit; 34(2): 72-79

Fenske NA, Lober CW (1986) Structural and functional changes of normal aging skin. J Am Acad Dermatol; 15: 571-85

Fieser und Fieser (1982) Organische Chemie, 2. Auflage, Weinheim, Deerfield Beach, Basel: Verlag Chemie

Finch CK, Andrus MR, Curry WA (2004) Nicotine replacement therapy-associated syndrome of inappropriate antidiuretic hormone. South Med J; 97(3): 322-4

Fisher GJ, Choi HC, Bata-Csorgo Z, Shao Y, Datta S, Wang ZQ, Kang S, Vorhees JJ (2001) Ultraviolet irradiation increases matrix metallo-proteinase-8 protein in human skin in vivo. J Invest Dermatol; 117: 219-26

Fluhr JW, Pelosi A, Lazzerini S, Dikstein S, Berardesca E (2001) Differences in corneocyte surface area in pre- and post-menopausal women. Assessment with the noninvasive videomicroscopic imaging of corneocytes method (VIC) under basal conditions. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol; 14(1): 10-6

Frei B, Forte TM, Ames BN, Cross CE (1991) Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. Protective effects of ascorbic acid. Biochem J; 277(1): 133-8

Fritsch P (1998) Dermatologie und Venerologie: Lehrbuch und Atlas; Berlin, Heidelberg: Springer

Frosch PJ, Kligman AM (1993) Non-invasive methods for the qualification of skin functions. Springer

Frosch PJ, Rustemeyer T, Schnuch A (1996) Kontaktdermatitis, Teil I. Hautarzt; 47(11): 874-82

Fu S, Gebicki S, Jessup W, Gebicki J, Dean RT (1995) Biological fate of amino acid, peptide and protein hydroperoxides. Biochemical Journal; 311: 821-7

Geilen CC, Wieder T, Boremski S, Wieprecht M, Orfanos CE (1996) c-Ha-ras oncogene expression increases choline uptake, CTP: phosphocholine cytidylyltransferase activity and phosphatidylcholine biosynthesis in the immortalized human keratinocyte cell line HaCaT. Biochim Biophys Acta; 1299(3): 299-305

Gfesser M, Rakoski J, Ring J (1996) The disturbance of epidermal barrier function in atopy patch test reactions in atopic eczema. Br J Dermatol; 135: 560-5

Ghersetich I, Lotti T, Campanile G, Grappone C, Dini G (1994) Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging. Int J Dermatol; 33(2): 119-22

Gibson T, Kenedi R (1967) Biochemical properties of skin. Surg Clin North Am; 3: 279-94

Gilchrest BA (1996) A review of skin aging and its medical therapy. Br J Dermatol; 135(6): 867-75

Glantz SA (1998) Biostatistik. 4. Auflage, Mc Graw-Hill, London

Gonzalez S, Moran M, Kochevar IE (1999) Chronic photodamage in skin of mast celldeficient mice. Photochem Photobiol; 70(2): 248-53

Goraca A, Skibska B (2005) Plasma antioxidant status in healthy smoking and nonsmoking men. Bratisl Lek Listy; 106(10): 301-6

Grabbe J, Welker P, Rosenbach T, Nurnberg W, Kruger-Krasagakes S, Artuc M, Fiebiger E, Henz BM (1996) Release of stem cell factor from a human keratinocyte line, HaCaT, is increased in differentiating versus proliferating cells. J Invest Dermatol; 107(2): 219-24

Grando SA, Horton RM, Pereira EFR (1995) A nicotinic acetylcholine receptor regulating cell adhesion and motility is expressed on human keratinocytes. J Invest Dermatol; 105: 774-81

Grando SA, **Horton RM**, **Mauro TM**, **Kist DA**, **Lee TX**, **Dahl MV** (1996) Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. J Invest Dermatol; 107(3): 412-8

Grayson S, Elias PM (1982) Isolation and lipid biochemical characterization of stratum corneum membrane complexes: implications for the cutaneous permeability barrier. J Invest Dermatol; 78(2): 128-35

Gross B, Landthaler M, Hohenleutner U (2003) Rauchen – Auswirkungen auf die Haut. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft; 10: 801

Guinot C, Malvy D, Ambroisine L, Latreille J, Mauger E, Guehenneux S, Morizot F, Tschachler E (2005) Effect of hormonal replacement therapy on skin biophysical properties of menopausal women. Skin Res Technol; 11(3): 201-4

Hadshiew IM, Eller MS, Gilchrest BA (2000) Skin aging and photoaging: the role of DNA damage and repair. Am J Contact Dermatitis; 11: 19-25

Halliwell B (1994) Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, corse of consequence. Lancet; 344: 721-4

Hansen HS, Jensen B (1985) Essential function of linoleic acid esterfied in acylglucosylceramide and acylceramide in maintaining the epidermal permeability barrier. Evidence from feeding studies with oleate, linoleate, arachidonate, colombinate and α -linoleate. Biochim Biophys Acta; 834: 357-63

Harding CR, Bartolone J, Rawlings AV (2000) Effects of natural moisturizing factor and lactic acid isomers on skin function. In: Loden M, Maibach HI (2000) Dry Skin and Moisturizers: Chemistry and Function. Dermatology: Clinical and Basic Science Series New York: CRC Press; 229-41

Heinrich U, Koop U, Leneveu-Duchemin M-C, Osterrieder K, Bielfeldt S, Chkarnat C, Degwert J, Häntschel D, Jaspers S, Nissen H-P, Rohr M, Schneider G, Tronnier H (2003) Multicentre comparison of skin hydration in terms of physical-, physiologicaland product-dependent parameters by the capacitive method (Corneometer CM 825) International Journal of Cosmetic Science; 45

Herrmann G, Wlaschek M, Lange TS, Prenzel K, Goerz G, Scharffetter-Kochanek K (1993) UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts. Exp Dermatol; 2(2): 92-7

Herzinger T, Korting HC (1991) In-vitro-Verfahren zur Bewertung der Hautverträglichkeit von Chemikalien – speziell Detergentien. Dermatosen; 39(4): 117-23 Herzinger T, Korting HC, Hartinger A, Kerscher M, Angerpointner T, Maibach HI (1994) Discrimination of the irritancy potential of surfactants in vitro by two cytotoxicity assays using normal human keratinocytes, HaCaT cells and 3T3 mouse fibroblasts: correlation with in vivo data from a soap chamber assay. J Dermatol Sci; 7(2): 119-29

Hochstein P, Ernster L (1963) ADP-Activated lipid peroxidation coupled to the TPNH oxidase system of microsomes. Biochem Biophys Res Commun; 12: 388-94

Hoffmann D, Hecht S (1990) Advances in tobacco carcinogenesis. In: Cooper, CS, Grover, PL (Eds.) Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York; 63-102

Hoffmann D, Hoffmann I (1997) The changing cigarette, 1950-1995. J Toxicol Environ Health; 50: 307-64

Hsu S, Jamieson AM, Blackwell J (1994) Viscoelastic studies of extracellular matrix interactions in a model native collagen gel system. Biorheology; 31(1): 21-36

Jamieson D, Chance B, Cadenas E, Boveris A (1986) The relation of free radical production to hyperoxia. Ann Rev Physiol; 48: 703-19

Joenje H (1989) Genetic toxicology of oxygen. Mutat Res; 219: 193-208

Jones SA, McArdle F, Jack CI, Jackson MJ (1999) Effect of antioxidant supplementation on the adaptive response of human skin fibroblasts to UV-induced oxidative stress. Redox Rep; 4(6): 291-9

Jung EG (1995) Dermatologie. Stuttgart, Hippokrates-Verlag

Kahari VM, Saarialho-Kere U (1999) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. Ann Med; 31: 34-45

Kalman D, Smith SS (2005) Does nicotine do what we think it does? A meta-analytic review of the subjective effects of nicotine in nasal spray and intravenous studies with smokers and nonsmokers. Nicotine Tob Res; 7(3): 317-33

Kennedy C, Bastiaens MT, Bajdik CD, Willemze R, Westendorp RG, Boyd AS, Stasko T, King LE Jr, Cameron GS, Pearse AD, Gaskell SA (1999) Cigarette smoking-associated elastotic changes in the skin. J Am Acad Dermatol; 41(1): 23-6

Kerscher M, Williams S (2004) Dermatokosmetik. Steinkopff Verlag Darmstadt

Kindl G, Raab W (1988) Licht und Haut. Govi Verlag

Klingman AM (1978) Regression method for assessing the efficacy of moisturizers. Cosm Toilietr; 93: 27-35

Kligman AM, Graham JA (1989) The psychology of appearance in the eldery. Clin Geriatr Med; 5: 213-22

Kolachana P, Subrahmanyam VV, Meyer KB, Zhang L, Smith MT (1993) Benzene and is phenolic metabolites produce oxidative DNA damage in HL60 cells in vitro and in the bone marrow in vivo. Cancer Res; 53: 1023-6

Korting HC, Hübner K, Greiner K, Hamm G, Braun-Falco O (1990) Differencies in the skin surfaces pH and bacterial microflora due to the longterm application of synthetic detergent preparations of pH 5,5 and pH 7,0. Acta Dermato Venereol; 70: 429-57

Korting HC, Herzinger T, Hartinger A, Kerscher M, Angerpointner T, Maibach HI (1994) Discrimination of the irritancy potential of surfactants in vitro by two cytotoxicity assays using normal human keratinocytes, HaCaT cells and 3T3 mouse fibroblasts: correlation with in vivo data from a soap chamber assay. J Dermatol Sci; 7(2): 119-29

Korting HC, Braun-Falco O (1996) The effect of detergents on skin pH and its consequences. Clinics in Dermatology; 14: 23-7

Krane SM, Byrne MH, Lemaitre V, Henriet P, Jeffrey JJ, Witter JP, Liu X, Wu H, Jaenisch R, Eeckhout Y (1996) Different collagenase gene products have different roles in degradation of type I collagen. J Biol Chem; 271: 28509-15

Krusche T, Worret WI (1995) Mechanical properties of keloids in vivo during treatment with intralesional triamcinolone avcetonide. Arch Dermatol Res; 287: 289-93

Krutmann J, Diepgen TL (2003) Hautalterung. Grundlagen Prävention Therapie. Springer-Verlag

Lagarde JM, Rouvrais C, Black D (2005) Topography and anisotropy of the skin surface with ageing. Skin Res Technol; 11(2): 110-9

Lahmann C, Bergmann J, Harrison G (2001) Matrix metalloproteinase-1 and skin aging in smokers. Lancet; 357: 935-7

Lahmann C, Young AR, Wittern KP, Bergemann J (2001) Induction of mRNA for matrix metalloproteinase 1 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in human skin in vivo by solar simulated radiation. Photochem Photobiol; 73(6): 657-63

Lampe MA, Burlingame AL, Whitney JA, Williams ML, Brown BE, Roitman E, Elias PM (1983) Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. J Lipid Res; 24: 121-9

Landmann L (1986) Epidermal permeability barrier: transformation of lamellar granuledisks into intercellular sheets by a freeze fracture study. J Invest Dermatol; 87: 202-9

Landmann L (1991) Die Permeabilitätsbarriere der Haut, Pharmazie in unserer Zeit; 4: 155-63

Lasarow RM, Isseroff RR, Gomez EC (1992) Quantitative in vitro assessment of phototoxity by fibroblast neutral red assay. J Invest Dermatol; 98(5): 725-9

Laskowska-Klita T, Chelchowska M, Leibschang J (2005) Concentrations of cotinine in serum and urine of smoking pregnant women and in placenta and umbilical cord blood. Przegl Lek; 62(10): 1007-9

Lavker RM (1995) Cutaneous aging: chronic versus photo-aging. In: Gilchrest BA (Ed.) Photodamage. Blackwell Science, Cambridge Mass; 123-35

Leem JH, Kaplan BM, Shim YK, Pohl HR, Gotway CA, Bullard SM, Rogers JF, Smith MM, Tylenda CA (2006) Exposures to air pollutants during pregnancy and preterm delivery. Environ Health Perspect; 114(6): 905-10

Lehmann P, Neumann N (1993) Photodiagnostische Testverfahren bei Patienten mit Verdacht auf Lichtdermatosen. Jahrbuch der Dermatologie 1992/93, Licht und Haut: 81 ff.

Lévêque JL, De Rigal J, Agache PG, Monneur C (1980) Influence of ageing on the in vivo extensibility of human skin at low stress. Arch Dermatol Res; 269: 127-35

Lévêque JL, Corcuff P, de Rigal J, Agache P (1984) In vivo studies of the evolution of physical properties of the human skin with age. Int J Dermatol; 23: 322-9

Li Y, Trush MA (1993) DNA damage resulting from the oxidation of hydroquinone by copper: role for a Cu(II)/Cu(I) redox cycle and reactive oxygen generation. Carcinogenesis; 14(7): 1303-11

Lotti N, Mac Cuser EJ, Campell A (1984) Nicotine is chemotactic for neurophils and enhances neutrophil responsiveness to chemotactic peptides. Science; 223: 169-71

Lowe NJ, Stoughton RB (1977) Essential fatty acid deficient hairless mouse: a model of chronic epidermal hyperproliferation. Br J Dermatol; 96: 155-62

Lüth P (2002) Passivrauchen am Arbeitsplatz – Analytische Verfahren. ICOH/ Deutschlandgruppe, Sitzung 11.04.2002 in München

Lykkesfeldt J, Viscovich M, Poulsen HE (2004) Plasma malondialdehyde is induced by smoking: a study with balanced antioxidant profiles. Br J Nutr; 92(2): 203-6

Mackenzie IC (1973) An examination of cellular organization within the stratum corneum by a silver staining method. J Invest Dermatol; 61: 245-50

Maibach HI, Baran R (1998) Textbook of cosmetic dermatology. Dunitz Verlag, 2. Auflage

Manuskiatti W, Schwindt DA, Maibach HI (1998) Influence of age, anatomic site and race on skin roughness and scaliness. Dermatology; 196(4): 401-7

Markova MS, Zeskand J, McEntee B, Rothstein J, Jimenez SA, Siracusa LD (2004) A role for the androgen receptor in collagen content of the skin. J Invest Dermatol; 123(6): 1052-6

Marks R (1997) Emollients. Dunitz. London; 16-7

Masi T, Cekanova M, Walker K, Bernert H, Majidi M, Becker JM, Schuller HM (2005) Nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary adenocarcinomas in Syrian golden hamsters contain beta 2-adrenergic receptor singlenucleotide polymorphisms. Genes Chromosomes Cancer; 44(2): 212-7

Mauro, T, Holleran WM, Grayson S, Gao WN, Man MQ, Kriehuber E, Behne M, Feingold KR, Elias PM (1998) Barrier recovery is impeded at neutral pH, independent of ionic effects: Implications for extracellular lipid processing. Arch Dermatol Res; 290: 215-22

Miao FJ, Green PG, Benowitz N, Levine JD (2004) Central terminals of nociceptors are targets for nicotine suppression of inflammation. Neuroscience; 123(3): 777-84

Mils C (1998) Cigarette smoking, cutaneous immunity, and inflammatory response. Clin Dermatol; 16: 589-94

Model D (1985) Smoker's face: an underrated clinical sign? Br Med J [Clin Res]; 291: 1760-2

Motta S, Monti M, Sesana S, Melessi L, Ghidoni R, Caputo R (1994) Abnormality of water barrier function in psoriasis. Arch Dermatol; 130: 452-6

Müller-Decker K, Fürstenberger G, Marks F (1994) Keratinocate-derived proinflammatory key mediators and cell viability as in vitro parameters of irritancy: A possible alternative to the Draize skin irritation test. Toxicol Appl Pharmacol; 127: 99-108

Müller P, Imhof PR, Mauli D (1989) Human pharmacological investigations of transdermal nicotine system. Method Find Exp Clin Pharmacol; 197-204

Muizzuddin N, Marenus K, Maes D (1990) Use a chromameter in assessing the efficacy of anti-irritants and tanning accelerators. J Cosmet Chem; 41: 359-84

Nagashima, Kazuo, Yukiko Fujii, Tetsu Tsukamoto, Souichi Nukuzuma, Mami Satoh, Miri Fujita, Yasunori Fujioka, Hirokatsu Akagi (1995) Apoptotic Process of Cerebellar Degeneration in Experimental Methylmercury Intoxication of Rats. Acta Neuropathologica: 91: 72-7

Neubert R, Heinemann C, Paschold C, Fluhr J, Wigger-Alberti W, Schliemann-Willers S, Farwanah H, Raith K, Elsner P (2005) Induction of a hardening phenomenon by repeated application of SLS: analysis of lipid changes in the stratum corneum. Acta Derm Venereol; 85(4): 290-5

Neuner P, Pourmojib M, Klosner G, Trautinger F, Knobler R (1996) Increased release of the tumour necrosis factor receptor p75 by immortalized human keratinocytes results from an activated shedding mechanism and is not related to augmented steady-state levels of p75 mRNA. Arch Dermatol Res; 288(11): 691-6

Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P (1997) Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of lifestyle factors. Clin Chem; 43(7): 1209-14

Niki E, Minanisawa S, Oikawa M, Komuro E (1993) Membrane Damage from lipid oxidation induced by free radicals and cigarette smoke; in Diana JN, Pyror WA (Eds.): Tobacco smoking and nutrition. Influence of nutrition on tobacco-associated health risks. Ann NY Acad Sci; 686: 29-38

Nilsson GE (1977) Measurement of water exchange through the skin. Med Biol Eng Comp; 15: 209-18

Nordstrom KM, Schmes HG, Mc Ginley K (1986) Measurement of sebum output using a lipid absorband tape. J Invest Dermatol; 87: 260-3

Ohishi N, Ohkawa H, Miike A, Tatano T, Yagi K (1985) A new assay for lipid peroxides using a methylene blue derivate. Biochem; 10: 205-11

Öhman H, Vahlquist A (1994) In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. Acta Derm Venereol; 74(5): 375-9

Oikarinen A (1990) The aging of the skin: Chronoaging versus Photoaging. Photodermatol Photoimmunol Photomed; 7: 3-4

Oldberg A, Antonsson P, Hedbom E, Heinegard D (1990) Structure and function of extracellular matrix proteoglycans. Biochem Soc Trans; 18(5): 789-92

Osborne W, Friberg SE (1998) Role of stratum corneum lipids as moisture retaining agents. J Dispers Science Technol; 8: 173-9

Ozbay B, Dulger H (2002) Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: relation to age, gender, exercise, and smoking. Tohoku J Exp Med; 197(2): 119-24

Ozguner F, Koyu A, Cesur G (2005) Active smoking causes oxidative stress and decreases blood melatonin levels. Toxicol Ind Health; 21(1-2): 21-6

Paige DG, Morse-Fisher N, Harper JI (1994) Quantification of stratum corneum ceramides and lipid envelope ceramides in the hereditary ichthyosis. Br J Dermatol; 131: 23-7

Panisset F, Treffel P, Faivre B, Lecomte P B, Agache P (1992) Transepidermal water loss related to volar forearm sites in humans. Acta Derm Venerol; 72: 4-5

Pascher I (1976) Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. Biochim Biophys Acta; 455: 433-51

Patil S, Patil S, Bhaktaraj B, Patil SB (1999) Effect of graded doses of nicotine on ovarian and uterine activities in albino rats. Indian J Exp Biol; 37(2): 184-6

Patroi I, Annessi G, Girolomoni G (2003) Mid-dermal elastolysis: a clinical, histologic, and immunohistochemical study of 11 patients. J Am Acad Dermatol; 48(6): 846-51

Pelle E, Miranda EP, Fthenakis C, Mammone T, Marenus K, Maes D (2002) Cigarette smoke-induced lipid peroxidation in human skin and its inhibition by topically applied antioxidants. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol; 15(1): 63-8

Pervaiz S, Harriman A, Gulliya KS (1992) Protein damage by photoproducts of merocyanine 540. Free Radical Biol Med; 12 (5): 389-96

Picardo M, Zombetta C, De Luca C, Amantea A, Faggioni A, Nazzaro-Porro M, Passi S (1991) Squalene peroxides may contribute to ultraviolet light-induced immunological effects. Photodermatol Photoimmunol Photomed; 8: 105-10 **Pie`rard-Franchimont C, Henry F, Crielaard JM, Pie`rard GE (1996)** Mechanical properties of skin in recombinant human growth factor abusers among adult bodybuilders. Dermatology; 192: 389-92

Pinnagoda J, Tupker RA, Agner T, Serup J (1990) Guidliness for transepidermal waterloss (TEWL) measurement. Contact Dermatitis; 22: 164-78

Polte T, Tyrrell RM (2004) Involvement of lipid peroxidation and organic peroxides in UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. Free Radic Biol Med; 36(12): 1566-74

Prottey C, Hartop PJ, Press M (1975) Correction of cutaneous manifestations of essential fatty acid deficiancy in man by application of sunflower seed oil to the skin. J Invest Dermatol; 64: 228-34

Pryor WA, Prier DG, Church DF (1983) Elektron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase and in cigarette tar. Environ Health Perspect; 47: 345-55

Purslow PP, Wess TJ, Hukins DW (1998) Collagen orientation and molecular spacing during creep and stress-relaxation in soft connective tissues. J Exp Biol; 201: 135-142

Rawlings AV, Scott IR, Harding CR, Bowser PA (1994) Stratum corneum moisturization at the molecular level. J Invest Dermatol; 103(5): 731-41

Reader SJ, Blackwell V, O'Hara R, Clothier RH, Griffin G, Balls M (1989) A vital dye release method for assessing the short-term cytotoxic effects of chemicals and formulations. ATLA-Altern Lab Anim; 17: 28-37

Rees J, Shuster S (1981) Pupertal induction of sweat gland activity. Clin Sci; 60: 689-92

Reeve VE, **Widyarini S**, **Domanski D**, **Chew E**, **Barnes K** (2005) Protection against photoaging in the hairless mouse by the isoflavone equal. Photochem Photobiol; 81(6): 1548-53

Reuther T, Neugebauer O, Kemper M, Kerscher M (2006) Einfluss von Zigarettennebenstromqualm auf den pH-Wert der Hautoberfläche. Gesellschaft für Dermatopharmazie

160

Richter E, Scherer G (2004) Aktives und passives Rauchen. In: Marquardt H, Schäfer SG (Eds.) Lehrbuch der Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart; 897-918

Robert L (2001) Extracellular matrix and aging: A review of mechanisms and interventions. Cosmetics Toiletries; 116: 61-73

Rodriguez-Pla A, Bosch-Gil JA, Rossello-Urgell J, Huguet-Redecilla P, Stone JH, Vilardell-Tarres M (2005) Metalloproteinase-2 and -9 in giant cell arteritis: involvement in vascular remodeling. Circulation; 112(2): 264-9

Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ (2002) Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Cell Mol Biol; 26(5): 602-9

Ryle CM, Breitkreutz D, Stark HJ, Leigh IM, Steinert PM, Roop D, Fusenig NE (1989) Density dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HaCaT and in rastransfected tumorigenis clones. Differentiation; 40: 42-54

Sander CS, Chang H, Salzmann S, Muller CS, Ekanayake-Mudiyanselage S, Elsner P, Thiele JJ (2002) Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. J Invest Dermatol; 118(4): 618-25

Scherer G, Adlkofer F (1999) Tabakrauch in der Raumluft – Erfassung der Schadstoffbelastung durch Passivrauchen zur Bewertung des gesundheitlichen Risikos. Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft; 59: 435-43

Schmid MH, Korting HC (1995) The concept of the acid mantle of the skin: Its relevance for the choice of skin cleansers. Dermatology; 191: 276-80

Schürer N, Ruzicka T (1998) Exzeme. Springer-Verlag

Schwartz E, Cruickshank FA, Christensen CC, Perlish JS, Lebwohl M (1993) Collagen alterations in chronically sun-damaged human skin. Photochem Photobiol; 58(6): 841-4

Schwartzendruber DC, Wertz PW, Kitko DJ, Madison KJ, Downing DT (1989) Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. J Invest Dermatol; 92: 251-7 **Seagrave J, Barr EB, March TH, Nikula KJ (2004)** Effects of cigarette smoke exposure and cessation on inflammatory cells and matrix metalloproteinase activity in mice. Exp Lung Res.; 30(1): 1-15

Shuster S, Black MM, Mc Vitie E (1975) Influence of age and sex on skin thikness, skin collagen and density. Br J Dermatol; 93: 639-43

Shuster S (2005) Osteoporosis, a unitary hypothesis of collagen loss in skin and bone. Med Hypotheses; 65(3): 426-32

Sies H (1991) Oxidative stress – oxidants and antioxidants. Academic Press New York Silverstein P (1992) Smoking and wound healing. Am J Med; 93(1A): 22-4

Simon M, Green H (1984) Participation of membrane-associated proteins in the formation of the cross-linked envelope of the keratinocyte. Cell; 36(4): 827-34

Slater TF (1972) Free Radical Mechanism in Tissue Injury, Pion Limited, London Smith WP, Christensen MS, Nacht S, Gans EH (1982) Effects of lipids on the

aggregation and permeability of human stratum corneum. J Invest Dermatol; 78: 7-11

Smith LS (1989) Histopathologic characteristic and ultrastructure of aging skin. Cutis; 43: 414-24

Sohal RS, **Weindruch R (1996)** Oxidative stress, caloric restriction, and aging. Science; 273 (5271): 59-63

Solak ZA, Kabaroglu C, Cok G, Parildar Z, Bayindir U, Ozmen D, Bayindir O (2005) Effect of different levels of cigarette smoking on lipid peroxidation, glutathione enzymes and paraoxonase 1 activity in healthy people. Clin Exp Med; 5(3): 99-105

Sopori ML, Kozak W, Savage SM, Geng Y, Soszynski D, Kluger MJ, Perryman EK, Snow GE (1998) Effect of nicotine on the immune system: possible regulation of immune responses by central and peripheral mechanisms. Psychoneuroendocrinology; 23(2): 189-204

Spielmann H, Steinhoff R (1990) Taschenbuch der Arzneimittelverordnung in Schwangerschaft und Stillperiode. 3. Auflage, Gustav Fischer, Stuttgart

Spuitt D (1997) The interference of some substances with the water vapor loss of human skin. Dermatologica; 142: 89-92

Stryer L (1990) Biochemie. Spektrum der Wissenschaft-Verlagsgesellschaft, Heidelberg

Sumino H, Ichikawa S, Abe M, Endo Y, Ishikawa O, Kurabayashi M (2004) Effects of aging, menopause, and hormone replacement therapy on forearm skin elasticity in women. J Am Geriatr Soc; 52(6): 945-9

Tagami H (**1989**) Aging and the hydration state of the skin. University of Tokyo Press; 99-109

Tappel AL (1962) Vitamins and Hormons; 20: 493-510

Tezuka T, Qing J, Saheki M, Kusuda S, Takahashi M (1994) Terminal differentiation of facial epidermis of the aged: immunohistochemical studies. Dermatology; 188(1): 21-4 Theilig C, Bernd A, Ramirez-Bosca A, Gormar FF, Bereiter-Hahn J, Keller-Stanislawski B, Sewell AC, Rietbrock N, Holzmann H (1994) Reactions of human keratinocytes in vitro after application of nicotine. Skin Pharmacol; 7(6): 307-15

Thiele JJ, **Weber SU**, **Packer L** (1999) Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin. J Invest Dermatol; 113(6): 1006-10

Thiele JJ (2001) Oxidative targets in the stratum corneum. A new basis for antioxidative strategies. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol; 14 Suppl 1: 87-91

Tronnier H, Wiebusch M, Heinrich U, Stute R (1997) Surface evaluation of living skin. Adv Exp Med Biol; 455: 507-16

Tronnier H (2000) Bildanalytische Testverfahren. Akt Dermatologie; 26: 200-6

Trouba K, Geisenhoffer K, Germolec D (2002) Sodium Arsenite-Induced Stress-Related Gene Expression in Normal Human Epidermal, HaCaT, and HEL30 Keratinocytes. Environ Health Perspect; 110(5):761-6

Tupker RA, Pinnagoda J, Coenraads PJ, Nater JP (1989) The influence of repeated exposure to surfactants on the human skin as determined by transepidermal water loss and visual scoring. Contact Dermatitis; 20: 108-14

Tupker RA, Pinnagoda J, Coenraads PJ, Nater JP (1990) Susceptibility to irritants: role of barrier function, skin dryness and history of atopic dermatitis. Br J Dermatol; 123: 199-205

Tupker RA, Willis C, Berardesca E, Lee SH, Fartasch M, Agner T, Serup J (1997) Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure testing. Contact Dermatitis; 37: 53-69 **Turner NG, Cullander C, Guy RH (1998)** Determination of the pH gradient across the stratum corneum. J Investig Dermatol Symp Proc; 3(2): 110-3

Uitto H (1986) Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Dermatol Clin; 4: 433-7

Uitto J, Jazio MJ, Olsen DR (1989) Molecular mechanisms of cutaneous aging. J Am Acad Dermatol; 21: 614-22

Uitto J (1997) Understanding premature skin aging. N Engl J Med; 337: 1463-5

US-EPA (United States Environmental Protecting Agency) (1993) Estimation of environmental tobacco smoke exposure

Vaillant L, Callens A (1996) Hormone replacement treatment and skin aging. Therapie; 51(1): 67-70

Varani J, Warner, Gharaee-Kermani, Phan, Sewon Kang, JingHo Chung, ZengQuan Wang, Datta, Fisher, Voorhees (2000) Vitamin A antagonizes decreased cell groth and elevated collagen-degrading Matrix Metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. J Invest Dermatol; 114: 480-83 Vogel HG (1981) Directional variations of mechanical parameters in rat skin depending on maturation and age. J Invest Dermatol; 76: 493-7

Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ (2003) Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. Nature; 421(6921): 384-8

Wang L, Lubin JH, Zhang SR, Metayer C, Xia Y, Brenner A, Shang B, Wang Z, Kleinerman RA (2000) Lung cancer and environmental tobacco smoke in a nonindustrial area of China. Int J Cancer; 88(1): 139-45

Wang M-Y, Liehr J (1994) Identification of fatty acid hydroperoxide cofactors in the cytochrome P450-mediated oxidation of estrogens to quinone metabolites. Role and balance of lipid peroxides during estrogen-induced carcinogenesis. J Biol Chem; 269: 284-91

Warner RR, Myers MC, Taylor DA (1988) Electron probe analysis of human skin: determination of the water concentration profile. J Invest Dermatol; 90(2): 218-24

Weber SU, Thiele JJ, Cross CE, Packer L (1999) Vitamin C, uric acid, and glutathione gradients in murine stratum corneum and their susceptibility to ozone exposure. J Invest Dermatol; 113(6): 1128-32

Werner Linde Y, Bengtsson A, Lodien M (1989) Dry skin in Atopic Dermatitis II. A surface profilometry study. Acta Derm Venereol; 69: 315-19

Wertz PW, Swartzendruber D C, Madison K C, Downing DT (1987) Composition and orphology of epidermal cyst lipids. J Invest Dermatol; 89: 419-25

Wertz PW, Downing DT (1989) Stratum corneum: Biological and biochemical considerations, in: Hadgraft J Guy RH (Eds.), Transdermal drug delivery. Vol. 35 Kap. 1, Marcel Dekker Inc., New York und Basel; 1-17

Wertz PW (1992) Epidermal lipids. Semin Dermatol; 11(2): 145-56

Wertz PW (1996) The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects. Adv Drug Delivery Rev; 18: 283-94

Wertz K, Seifert N, Hunziker PB, Riss G, Wyss A, Lankin C, Goralczyk R (2004) Beta-carotene inhibits UVA-induced matrix metalloprotease 1 and 10 expression in keratinocytes by a singlet oxygen-dependent mechanism. Free Radic Biol Med; 37(5): 654-70

West RJ, Russell MA (1987) Cardiovascular and subjective effects of smoking before and after 24 h of abstinence from cigarettes. Psychopharmacology; 92(1): 118-21

von Weymarn LB, Brown KM, Murphy SE (2006) Inactivation of CYP2A6 and CYP2A13 during nicotine metabolism. J Pharmacol Exp Ther; 316(1): 295-303

Wigger-Alberti W, Krebs A, Elsner P (2000) Experimental irritant contact dermatitis due to cumulative epicutaneous exposure of sodium lauryl sulfate and toluene – single and concurrent application. Br J Dermatol; 143: 551-6

Wilhelm KP, Cua AB, Maibach HI (1991) Skin Aging Effekt on Transepidermal Water Loss, Stratum Corneum Hydration, Skin Surface pH and Casual Sebum Content. Arch Dermatol; 127: 1806-9

Wilhelmi BJ, Blackwell SJ, Mancoll JS, Phillips LG (1998) Creep vs. stretch: a review of the viscoleastic properties of skin. Ann Plast Surg; 41(2): 215-9

William H, Oldendorf T, Barret E. Stoller, Francis L (1993) Blood-brain barrier penetration abolished by N-methyl quaternization of nicotine. Proc Nati Acad Sci; 90: 307-11

Williams ML (1992) Epidermal lipids and scaling diseases of the skin. Semin Dermatol; 11(2): 169-75

Witschi H, Joad JP, Pinkerton KE (1997) The toxicology of environmental tobacco smoke. Annual Review of Pharmacology and Toxicology; 37: 29-52

Wlaschek M, Tantcheva-Poor I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Schuller J, Scharffetter-Kochanek K (2001) Solar UV irradiation and dermal photoaging. J Photochem Photobiol B; 63(1-3): 41-51

Yardley HJ, Summerly R (1981) Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis. Pharmacol Ther; 13(2): 357-83

Yin L, Morita A, Tsuji (2000) Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. Archives of Dermatogical Research; 292: 188-94

Yin L, Aleichmichi M, Takuo T (2001) Skin aging induced by ultraviolet exposure and tabacco smoking: evidence from epidemiological and molecular studies. Photoderm Photoimmunol and Photomedicine; 17: 178-83

Ziegler G, Rast H (1995) Berufliche Hautkrankheiten, SUVA, 6. Auflage, Luzern
Zusammenfassung

Der vorzeitig induzierte Hautalterungsprozess als Auswirkung des Hauptstromrauchs von Zigaretten wurde vergleichsweise gut untersucht, wohingegen die Untersuchung der Auswirkungen des Zigarettennebenstromrauchs bislang ausstand. Die kutanen Effekte des Zigarettennebenstromrauchs *in vitro* und *in vivo* standen daher in der vorliegenden Arbeit im Fokus des Forschungsinteresses.

Zunächst wurde mithilfe einer keratinozytären Zelllinie ein zelluläres Modellsystem für die Evaluation der Effekte von Zigarettennebenstromrauch auf Keratinozyten entwickelt. Das entwickelte In-vitro-Modellsystem wurde nach Etablierung geeigneter Konditionen in konnte der Nachweis vivo weiter evaluiert. Es geführt werden, dass Zigarettennebenstromrauch in vitro zu einem Anstieg der In-vitro-Toxizität führte. In vivo konnte ein deutlicher Einfluss auf die Hautphysiologie insbesondere auf den pH-Wert der Haut evaluiert werden. Wenngleich die Effekte reversibel waren, könnte eine repetitive wie bei wiederholter Anhebung des pH-Wertes. es Zigarettennebenstromexposition der Fall ist, zu einer ausgeprägten Barriereschädigung führen.

In einer groß angelegten Kohortenstudie bei Rauchern und Nichtrauchern wurde erstmals die Hautphysiologie mithilfe biophysikalischer Messmethoden und eines Lipidperoxid-Kits *in vivo* charakterisiert und die Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern evaluiert und unter Einbeziehung wissenschaftlicher Literatur diskutiert.

Der durchgeführte Direktvergleich der Hautoberflächen-pH-Werte von Rauchern mit Nichtrauchern konnte aufzeigen, dass bei Rauchern der Hautoberflächen-pH-Wert erhöht ist, was möglicherweise auf die systemische Resorption von Nikotin oder einem seiner Metaboliten zurückzuführen ist. Der Vergleich der Stratum-corneum-Hydratation-Werte der Raucher gegenüber denen der Nichtraucher erbrachte eine Reduktion, die durch eine Störung der Hautbarriere etwa in Form der Beeinflussung des Ceramidmetabolismus verursacht worden sein könnte.

Auch die Untersuchung dermaler Strukturen zeigte im Hinblick auf die Oberflächenstruktur der Haut und deren elastische wie auch viskoelastische Eigenschaften interessante Ergebnisse.

167

So wies die Haut von Rauchern gegenüber der von Nichtrauchern eine erhöhte Schuppigkeit auf, möglicherweise verursacht durch systemisch resorbiertes Nikotin, dem verhornungsfördernde Eigenschaften zugeschrieben werden.

Bei der Untersuchung der mechanischen Eigenschaften der Haut von Rauchern und Nichtrauchern konnte ermittelt werden, dass die Haut der Nichtraucher nicht nur elastischer war, sondern auch weniger schnell bei Belastung ermüdet, möglicherweise bedingt durch Interaktion des Nikotins mit den kollagenen und elastischen Fasern der Dermis.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Gesamtheit der Ergebnisse einen deutlichen Einfluss von Nikotinkonsum auf die biomechanischen Eigenschaften der Haut widerspiegelt. Es ist davon auszugehen, dass sowohl elastische wie auch viskoelastische Bestandteile des Bindegewebes durch systemisch resorbierten Zigarettenrauch beeinflusst werden.

Eine wesentliche Aufgabe der Forschung der nächsten Jahre wird darin bestehen, die bislang dokumentierten Beobachtungen und Ergebnisse zu einem Gesamtkonzept zusammenzufügen, das es erlaubt, Epiphänomene von kausal bedeutsamen Veränderungen zu unterscheiden. Dies wird wiederum die Möglichkeit eröffnen, die Anstrengungen zur Entwicklung effektiver protektiver Therapiekonzepte auf eine wissenschaftlich fundierte, evidenzbasierende Basis zu stellen.

Abstract

Premature skin aging as a result of mainstream cigarette smoke has been well researched compared with the effects of sidestream tobacco smoke. This dissertation focusses on the *in vitro* as well as *in vivo* effects of sidestream tobacco smoke on the skin.

A cellular model system to evaluate the effects of sidestream tobacco smoke on ceratinocytes was developed with the help of a ceratinocyte cell line. This *in-vitro* model system was further evaluated following the set-up of suitable *in vivo* conditions. The evidence could then be established that *in vitro* sidestream tobacco smoke leads to an increase of *in-vitro* toxicity. *In vivo* studies showed a distinct influence on the skin physiology, in particular on the pH value of the skin. Although the effects were reversible, a repetitive increase of the pH value, as induced by repeated exposure to sidestream tobacco smoke, could lead to a pronounced barrier damage.

In a comprehensive cohort study of smokers and non-smokers, skin physiology was for the first time characterized *in vivo* using biophysical measuring methods and a lipid peroxide kit. The differences between smokers and non-smokers were then evaluated and discussed in the context of scientific literature.

The conducted direct comparison of skin surface pH values of smokers and nonsmokers showed that the skin surface pH value of smokers was higher, possibly due to the systemic reabsorption of nicotine or one of its metabolites. The stratum corneum hydratation values of smokers was lower than those of non-smokers, possibly caused by a skin barrier that was dysfunctional due to, for example, the influence of the ceramide metabolism.

The examination of dermal structures also showed interesting results in regard to the surface structure of the skin and its elastic as well as viscoelastic properties. For example, the skin of smokers was scalier than that of non-smokers, perhaps due to systemically reabsorbed nicotine, which is said to promote cornification.

The examination of the mechanical properties of the skin of smokers and non-smokers showed that the skin of non-smokers was not only more elastic but that it also withstood stress longer. This may be due to the interaction of nicotine with the collageneous and elastic fibers of the dermis.

In conclusion it can be said that the entirety of results indicate a distinct influence of nicotine consumption on the biomechanical properties of the skin. It can be assumed that both elastic as well as viscoelastic components of the connective tissue is influenced by systemically reabsorbed cigarette smoke.

The main research task of the coming years will consist of integrating the documented observations into an overall concept that will allow to distinguish epiphenomena from significant causal changes. This will, in turn, open the possibility to align efforts to develop effective protective therapy concepts onto a scientific and evidence-based foundation.

Anhang

3.1 Etablierung geeigneter Konditionen (in vitro)

HaCaT auf 24-Loch Platten (n=9)

Konzentration	PBS	0,1 mM	0,25 mM	0,5 mM	0,75 mM	1 mM	1,25 mM
O.D. MW	0,617375	0,61	0,5925	0,52375	0,49375	0,5025	0,4525
Min	0,56	0,6	0,58	0,52	0,49	0,49	0,48
Max	0,66	0,62	0,61	0,53	0,5	0,51	0,52
STABW	0,03744687	0,00912871	0,01258306	0,00478714	0,00478714	0,00645497	0,02397916

Konzentration	1,5 mM	1,75 mM	2,0 mM	3,0 mM
O.D. MW	0,5025	0,4925	0,51625	0,51125
Min	0,48	0,435	0,5	0,5
Max	0,52	0,54	0,525	0,535
STABW	0.01848423	0.04330127	0.01181454	0.01652019

HaCaT auf 6-Loch Platten n=6

Konzentration	0	0,1 mM	0,2 mM	0,3 mM	0,4 mM	0,5 mM	0,6 mM
O.D. MW	0,8	0,80333333	0,73166667	0,67	0,60333333	0,58833333	0,52533333
Min	0,79	0,78	0,715	0,66	0,55	0,58	0,496
Max	0,81	0,83	0,74	0,68	0,64	0,595	0,57
STABW	0,01	0,02516611	0,01443376	0	0,04725816	0,00763763	0,03931073

Konzentration	0,7 mM	0,8 mM	0,9 mM
O.D. MW	0,52	0,48333333	0,49333333
Min	0,495	0,47	0,48
Max	0,555	0,51	0,51
STABW	0,03122499	0,02309401	0,01527525

3.2 Evaluierung der Zigarettennebenstromeffekte (in vitro)

3.2.1 PBS-Überstand (n=12)

Volumen [µl]	0	250	500	1000	1250	1750	3000
O.D. MW	0,78027778	0,73916667	0,65384615	0,62227273	0,73166667	0,75	0,785
Min	0,69	0,695	0,575	0,495	0,71	0,7	0,77
Max	0,88	0,825	0,745	0,735	0,75	0,775	0,8
STABW	0,04135471	0,0387787	0,07569549	0,08678605	0,01722401	0,02701851	0,015

3.2.2 pH-Werte von PBS nach Zigarettennebenstromexposition (n=9)

O.D. MW	7,3	8,0
Min	7,01	7,89
Max	7,39	8,1
STABW	0,1	0,1

 $3.2.4\ Zytotoxizit"at\ von\ Zigarettennebenstrom\ mit\ anschließender\ SDS-Exposition\ (n=9)$

Konzentration	0,8 mM	1 mM
O.D. MW	0,435	0,4
Min	0,400	0,385
Max	0,455	0,415
STABW	0,0028	0,02

Konzentration	0	0,2 mM	0,4 mM	0,6 mM	0,8 mM	1 mM
O.D. MW	0,71133333	0,61	0,43333333	0,305	0,24333333	0,245
Min	0,71	0,57	0,37	0,255	0,225	0,23
Max	0,714	0,63	0,475	0,365	0,265	0,27
STABW	0,0023094	0,03464102	0,05575243	0,05567764	0,02020726	0,02179449

3.2.5 Vergleich der Zytotoxizität von SDS-Exposition vor und nach Zigarettennebenstromexposition

	ohne Exp	Zig Exp	SDS Exp	Zig dann SDS	SDS dann Zig
O.D. MW	0,79	0,711	0,60	0,44	0,23
Min	0,785	0,71	O,57	0,41	0,225
Max	0,80	0,714	0,61	0,465	0,265
STABW	0,06	0,002	0,026	0,028	0,02

3.3 Lebensgewohnheiten der Probanden

Raucher

	Mittelwert	Min	Max	StABW
Alkohol	2,67	0	4	0,902
Kaffee	2,89	1	3	0,563
Sport	1,78	0	3	0,879
Ernährung	1,79	1	3	0,543
Flüssigkeit	1,63	1	2	0,122
Freiluft	1,87	1	3	0,132
Pflege	6,98	1	9	0,876

Nichtraucher

	Mittelwert	Min	Max	StABW
Alkohol	2,05	0	3	0,872
Kaffee	2,76	0	3	0,634
Sport	2,51	0	3	0,731
Ernährung	1,98	1	3	0,443
Flüssigkeit	1,76	1	2	0,128
Freiluft	1,88	1	3	0,129
Pflege	5,98	1	8	0,765

Alter der Probanden Zigarettennebenstromexposition (n=10)

inition of t	IVIIII	Max	Stabw
Probanden			
[Jahre] 36,0	32	50	6,55

Alter der Probanden Kohortenstudie (n=103)

	Mittelwert	Min	Max	StABW
Probanden				
[Jahre]	43,87	20	79	19,93

3.4 Evaluierung der Zigarettennebenstromeffekte (in vivo)

					Standartfehler
	Mittelwert	Min	Max	STABW	des
					Mittelwertes
рН 0	5,0655	4,18	5,9	,46642	,14063
pH 1	6,0773	5,7	6,73	,40844	,12315
pH 2	5,6091	4,56	6,37	,54069	,16303
pH 6	5,2700	4,32	6,02	,51213	,15441
pH 24	4,9909	4,1	5,86	,45827	,13817
SC Hydratation 0	37,7591	27,5	45,8	6,83341	2,06035
SC Hydratation 1	38,7682	03,5	54,9	7,33602	2,21189
SC Hydratation 2	38,5027	28,6	54,9	5,98622	1,80491
SC Hydratation 6	39,7627	30,7	52,3	6,67091	2,01136
SC Hydratation 24	39,1727	31,0	54,3	6,49617	1,95867
TEWL0	13,4714	9,9	16,8	2,47300	,93471

TEWI 1	12 8700	75	15.09	2 96507	1 12069
	12,0700	7,5	10,00	2,00007	1,12000
TEWL2	13,9714	10,0	16,09	2,57405	,97290
TEWL6	14,2000	9,6	18,01	3,43414	1,29798
TEWL24	13,3143	10,3	16,5	2,11536	,79953
LPO0	131,9263	51,32	198,7	123,94962	43,82281
LPO1	113,5063	56,71	172,3	100,88464	35,66811
LPO2	109,9700	39,15	160,35	107,21776	37,90720
LPO6	109,3287	35,98	153.6	104,95008	37,10546
LPO24	158,0850	41,8	259,3	127,63781	45,12678

3.5 Kohortenstudie (in vivo)

Raucher versus Nichtraucher

	Rauch- status	N	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
рН	R	51	5,0306	,59958	,08396
	NR	52	4,7725	,52309	,07185
SC	R	51	40,1151	8,71651	1,27143
Hydratation	NR	52	42,6500	9,43770	1,28431
TEWL	R	51	11,05239	3,044171	,448838
	NR	52	11,33043	2,210366	,325901
Topografie	R	51	21,1316	4,52125	,73344
RIV	NR	52	18,7949	2,86705	,45910
Topografie	R	51	17,9737	3,57534	,58000
R2V	NR	52	16,0769	2,42123	,38771
Topografie	R	51	14,5263	2,86391	,46459
R3V	NR	52	12,9487	1,70060	,27231
Topografie	R	51	9,6923	1,83753	,29424
R4V	NR	52	10,7895	2,30344	,37367
Topografie	R	51	2,3077	,56911	<u> </u>
R5V	NR	52	2,6842	,77478	
SESM	R	51	2,6842	,77478	
	NR	52	2,3077	,56911	
SESC	R	51	,0608	,18278	
	NR	52	,0203	,04710	
SER	R	51	,0192	,08471	
	NR	52	,034	,08019	
SEW	R	51	21,0253	1,343061	,21796
	NR	52	21,3210	1,29935	,20806
R0	R	51	,10851	,035547	,005692
	NR	52	,10144	,029349	,004961
R1	R	51	,00903	,007462	,001195
	NR	52	,00767	,005619	,000950
R2	R	51	,92359	,047363	,007584
	NR	52	,91535	,072127	,012192
R3	R	51	,13694	,042317	,006776
	NR	52	,12422	,033469	,005657
R4	R	51	,01885	,015725	,002518
	NR	52	,01521	,010320	,001744
R5	R	51	1,48961	,248499	,039792
	NR	52	1,37618	,245009	,041414
R6	R	51	1,23188	,177997	,028502

	NR	52	1,11092	,160163	,027072
R7	R	51	,67088	,095610	,015310
	NR	52	,66004	,107171	,018115
R8	R	51	,09949	,030839	,004938
	NR	52	,09361	,027449	,004640
R9	R	51	,02841	,009315	,001492
	NR	52	,02287	,006045	,001022
F0	R	51	,02841	,009315	,001492
	NR	52	,02287	,006045	,001022
LPO	R	51	65,6314	37,0307	
	NR	52	76,9869	70,75412	

Frauen Raucher versus Nichtraucher

	Rauch- status	N	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
рН	R	27	5,2427	,56040	,10990
	NR	28	5,0107	,52650	,09950
SC	R	27	39,6738	6,62772	1,35288
Hydratation	NR	28	42,8717	8,75401	1,62558
TEWL	R	27	10,36962	2,929492	,574521
	NR	28	11,44444	2,477333	,476763
Topografie	R	27	18,8947	2,15754	,49497
RIV	NR	28	19,1304	2,28243	,47592
Topografie	R	27	16,2105	1,61861	,37133
RZV	NR	28	16,1739	2,12458	,44301
Topografie	R	27	13,2632	1,52177	,34912
Rav	NR	28	13,0435	1,55149	,32351
Topografie	R	27	9,7895	1,22832	,28180
R4V	NR	28	9,8696	1,45553	,30350
Topografie R5V	R	27	2,3158	,47757	
	NR	28	2,4348	,50687	
SER	R	27	,0089	,01595	
	NR	28	,0148	,03642	
SESC	R	27	,0137	,02385	
	NR	28	,0070	,01363	
SESM	R	27	21,1547	1,04783	,24039
	NR	28	21,3417	1,42061	,29622
SEW	R	27	44,9173	4,14447	,95081
	NR	28	46,5297	3,82655	,79789
R0	R	27	,11284	,036161	,007891
	NR	28	,09933	,028478	,006368
R1	R	27	,00895	,006761	,001475
	NR	28	,00780	,006307	,001410
R2	R	27	,92657	,038218	,008340
	NR	28	,90646	,089349	,019979
R3	R	27	,14420	,041776	,009116
	NR	28	,12253	,032133	,007185
R4	R	27	,01836	,014012	,003058
	NR	28	,01620	,011786	,002635
R5	R	27	1,51781	,254466	,055529
	NR	28	1,33790	,300605	,067217

R6	R	27	1,24321	,189062	,041257
	NR	28	1,11945	,164798	,036850
R7	R	27	,67492	,083673	,018259
	NR	28	,64284	,124724	,027889
R8	R	27	,10389	,030987	,006762
	NR	28	,09142	,025766	,005762
R9	R	27	,03136	,007343	,001602
	NR	28	,02320	,005949	,001330
F0	R	27	,03136	,007343	,001602
	NR	28	,02320	,005949	,001330
LPO	R	14	69,5440	43,05872	
	NR	12	93,4300	92,529	

Frauen Altersgruppe 1 (20-29 Jahre) Raucher versus Nichtraucher

	Rauch- status	N	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
pН	R	8	5,5563	,48258	,17062
	NR	9	4,8089	,43190	,14397
SC	R	8	36,3000	3,93113	1,38986
Hydratation	NR	9	44,3367	10,70763	3,56921
TEWL	R	8	9,06375	1,301515	,460155
	NR	9	10,20000	2,133073	,711024
Topografie	R	8	20,0000	2,26779	,80178
RIV	NR	9	19,6250	2,77424	,98084
Topografie	R	8	17,0000	1,69031	,59761
RZV	NR	9	16,3750	2,38672	,84383
Topografie	R	8	14,0000	1,69031	,59761
RJV	NR	9	13,2500	1,58114	,55902
Topografie	R	8	10,5000	1,19523	,42258
K4V	NR	9	10,0000	1,69031	,59761
Topografie R5V	R	8	2,5000	,53452	,18898
	NR	9	2,5000	,53452	,18898
SER	R	8	,0125	,01753	,00620
	NR	9	,0263	,05579	,01972
SESC	R	8	,0250	,03423	,01210
	NR	9	,0138	,02066	,00730
SESM	R	8	20,3625	,96447	,34099
	NR	9	20,9075	,72318	,25568
SEW	R	8	41,9360	3,87320	1,36938
	NR	9	44,0030	3,19078	1,12811
R0	R	6	,09675	,031346	,011083
	NR	8	,07906	,009446	,003856
R1	R	6	,00358	,001788	,000632
	NR	8	,00417	,002972	,001213
R2	R	6	,96308	,015320	,005417
	NR	8	,94839	,031784	,012976
R3	R	6	,12454	,031273	,011057
	NR	8	,09900	,011983	,004892
R4	R	6	,00750	,003132	,001107
	NR	8	,00867	,004662	,001903
R5	R	6	1,72711	,199495	,070532

	NR	8	1,44017	,145573	,059430
R6	R	6	1,28098	,218282	,077174
	NR	8	1,02712	,100195	,040904
R7	R	6	,75741	,048387	,017107
	NR	8	,70968	,059217	,024175
R8	R	6	,09317	,030141	,010657
	NR	8	,07489	,008312	,003394
R9	R	6	,02779	,003236	,001144
	NR	8	,01994	,004068	,001661
F0	R	6	,0277917	,00323639	,00114424
	NR	8	,0199444	,00406840	,00166092
LPO	R	6	51,2460	23,10882	10,33458
	NR	8	83,3683	82,68462	33,75585

Frauen Altersgruppe 2 (30-59 Jahre) Raucher versus Nichtraucher

	Rauch- status	N	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
рН	R	9	4,9640	,48319	,15280
	NR	10	5,2180	,65200	,20618
SC	R	9	41,8190	7,97201	2,52097
Hydratation	NR	10	39,6800	5,85160	1,85044
TEWL	R	9	12,09000	3,191116	1,009120
	NR	10	12,88000	2,710392	,857101
Topografie	R	9	18,1429	2,11570	,79966
RIV	NR	10	18,7778	2,58736	,86245
Topografie	R	9	15,4286	1,71825	,64944
RZV	NR	10	15,8889	2,66667	,88889
Topografie	R	9	12,5714	1,51186	,57143
Rov	NR	10	12,8889	1,96497	,65499
Topografie	R	9	9,1429	1,21499	,45922
r:4 v	NR	10	9,6667	1,80278	,60093
Topografie	R	9	2,2857	,48795	,18443
Rov	NR	10	2,4444	,52705	,17568
SER	R	9	,0071	,01890	,00714
	NR	10	,0122	,02587	,00862
SESC	R	9	,0029	,00488	
	NR	10	,0033	,00707	
SESM	R	9	21,8571	,82619	,31227
	NR	10	20,6600	1,54165	,51388
SEW	R	9	47,9789	3,30849	1,25049
	NR	10	45,8053	3,01624	1,00541
R0	R	9	,10537	,024724	,008241
	NR	10	,10046	,030508	,009648
R1	R	9	,00867	,002901	,000967
	NR	10	,00730	,006847	,002165
R2	R	9	,91779	,023663	,007888
	NR	10	,88981	,119720	,037859
R3	R	9	,13428	,027067	,009022
	NR	10	,12433	,034670	,010963
R4	R	9	,01661	,005159	,001720

	NR	10	,01447	,011052	,003495
R5	R	9	1,49257	,130459	,043486
	NR	10	1,38358	,325544	,102946
R6	R	9	1,26919	,184478	,061493
	NR	10	1,19418	,144584	,045721
R7	R	9	,65742	,012975	,004325
	NR	10	,65679	,125530	,039696
R8	R	9	,09670	,023271	,007757
	NR	10	,09293	,029364	,009286
R9	R	9	,02891	,004271	,001424
	NR	10	,02387	,005878	,001859
F0	R	9	,02891	,004271	,001424
	NR	10	,02387	,005878	,001859
LPO	R	8	,0238667	,00587777	,00185871
	NR	6	,0289074	,00427128	,00142376

Frauen Altersgruppe 3 (60-79 Jahre) Raucher versus Nichtraucher

	Rauch- status	N	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
рН	R	7	5,2775	,60320	,21326
	NR	6	4,9822	,41270	,13757
SC	R	7	40,5967	6,13140	2,50313
Hydratation	NR	6	44,7450	9,21377	2,91365
TEWL	R	7	9,52500	2,978374	1,053014
	NR	6	11,05000	1,742740	,616152
Topografie	R	7	18,0000	1,15470	,57735
RIV	NR	6	19,0000	,89443	,36515
Topografie	R	7	16,0000	,00000	,00000
RZV	NR	6	16,3333	,51640	,21082
Topografie	R	7	13,0000	,00000	,00000
R3V	NR	6	13,0000	,89443	,36515
Topografie	R	7	9,5000	,57735	,28868
R4V	NR	6	10,0000	,00000	,00000
Topografie	R	7	2,0000	,00000	,00000
Rov	NR	6	2,3333	,51640	,21082
SER	R	7	,0050	,00577	,00289
	NR	6	,0033	,00516	,00211
SESC	R	7	,0100	,00000	,00000
	NR	6	,0033	,00516	,00211
SESM	R	7	21,5100	,24249	,12124
	NR	6	22,9433	,35837	,14630
SEW	R	7	45,5220	,32216	,16108
	NR	6	50,9850	,79898	,32618
R0	R	7	,16183	,027135	,013568
	NR	6	,12692	,018823	,009412
R1	R	7	,02033	,005004	,002502
	NR	6	,01450	,003085	,001543
R2	R	7	,87330	,011316	,005658
	NR	6	,88517	,028838	,014419
R3	R	7	,20583	,031754	,015877
	NR	6	,15333	,017628	,008814

R4	R	7	,04400	,003849	,001925
	NR	6	,03183	,005260	,002630
R5	R	7	1,15597	,011470	,005735
	NR	6	1,07033	,309374	,154687
R6	R	7	1,10918	,081156	,040578
	NR	6	1,07112	,231904	,115952
R7	R	7	,54933	,025865	,012933
	NR	6	,50769	,107077	,053539
R8	R	7	,14150	,022132	,011066
	NR	6	,11242	,018998	,009499
R9	R	7	,04400	,004619	,002309
	NR	7 ,04400 ,00349 6 ,03183 ,005260 7 1,15597 ,011470 6 1,07033 ,309374 7 1,10918 ,081156 6 1,07112 ,231904 7 ,54933 ,025865 6 ,50769 ,107077 7 ,14150 ,022132 6 ,11242 ,018998 7 ,04400 ,004619 6 ,02642 ,007510 7 ,04400 ,004619 6 ,02642 ,007510 7 ,04400 ,004619 6 ,02642 ,007510 7 ,04400 ,004619 6 ,02642 ,007510 7 ,04400 ,004619 6 ,02642 ,007510 7 ,04400 ,31,08813 4 60,3130 32,71525	,003755		
F0	R	7	,04400	,004619	,002309
	NR	6	,02642	,007510	,003755
LPO	R	6	56,0800	31,08813	12,69168
	NR	4	60,3130	32,71525	10,34547

Frauen Altersgruppe 1, 2 und 3

	Altersgruppe	N	Mittelwert	STABW	Standard-fehler
pH	1	20	5,1606	,58567	,14205
	2	20	5.0910	.57353	.12825
	3	13	5,1212	,51713	,12542
SC Hydratation	1	20	40.5547	9.01024	2.18531
	2	20	40,7495	6,89403	1,54155
	3	13	43,1894	8,23223	2,05806
TEWL	1	20	9,66529	1,832444	,444433
	2	20	12,48500	2,909924	,650679
	3	13	10,28750	2,485391	,621348
Topografie	1	20	19,8125	2,45544	,61386
R1V	2	20	18,5000	2,33809	,58452
RIV	3	13	18,6000	1,07497	,33993
Topografie	1	20	13,6250	1,62788	,40697
R2V	2	20	12,7500	1,73205	,43301
	3	13	16,2	0,4264	
Topografie	1	20	16,6875	2,02382	,50595
R3V	2	20	15,6875	2,24258	,56065
R3V	3	13	13,0000	,66667	,21082
	1	20	10,2500	1,43759	,35940
Topografie	2	20	9,4375	1,54785	,38696
R4V	3	13	9,8	,42164	
Topografie	1	20	2,5	0,51640	
R5V	2	20	2,375	0,5	
	3	13	2,2	0,4164	
SER	1	20	0,0194	0,04057	
	2	20	0,01	0,02251	
	3	13	0,0040	0,00516	
SESC	1	20	0,0194	0,02792	
	2	20	0,0031	0,00602	
	3	13	0,006	0,00516	
SESM	1	20	20,6350	,87026	,21757
	2	20	21,1838	1,38449	,34612
	3	13	22,3700	,79925	,25274
SEW	1	20	42,9695	3,59044	,89761
	2	20	46,7563	3,23584	,80896
	3	13	48,7998	2,88925	,91366
R0	1	20	,08917	,025416	,006793
	2	20	,10279	,027265	,006255
	3	13	,14437	,028562	,010098
R1	1	20	19,8125	2,45544	,61386
	2	20	18,5000	2,33809	,58452
	3	13	,01742	,004953	,001751
R2	1	20	,95678	,023912	,006391
	2	20	,90306	,087301	,020028
	3	13	,87923	,021249	,007513
R3	1	20	,11360	,027457	,007338

	2	20	,12904	,030864	,007081
	3	13	,17958	,06781	,013004
R4	1	20	,00800	,003742	,001000
	2	20	,01548	,008609	,001975
	3	13	,03792	,007778	,002750
R5	1	20	1,60414	,226484	,060530
	2	20	1,43521	,252349	,057893
	3	13	1,11315	,207777	,073460
R6	1	20	1,17219	,215671	,057640
	2	20	1,22971	,164495	,037738
	3	13	1,09015	,162127	,057321
R7	1	20	,73695	,056658	,015142
	2	20	,65709	,089184	,020460
	3	13	,52851	,075471	,026683
R8	1	20	,08533	,024574	,006568
	2	20	,09472	,025991	,005963
	3	13	,12696	,024623	,008705
R9	1	20	,02443	,005315	,001420
	2	20	,02625	,005663	,001299
	3	13	,02625	,005663	,001299
F0	1	20	,02443	,005315	,001420
	2	20	,02625	,005663	,001299
	3	13	,0352083	,01102945	,00389950
	1	15	68,7673	62,55711	18,86168
LPO	2	14	111,7900	98,50275	22,59808
	3	9	8,7256	31,12370	7,78143

Frauen unter 47 Jahre versus über 47 Jahren

	Alter	Ν	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
рН	Unter 47	32	5,1067	,55540	,09668
	Über 47	21	5,1471	,55538	,12119
SC	Unter 47	32	41,0194	8,02289	1,39661
Tryuralation	Über 47	21	42,0905	8,00101	1,78908
TEWL	Unter 47	32	11,28818	2,976835	,518200
	Über 47	21	10,30500	2,222013	,496857
Topografie	Unter 47	32	19,0714	2,52291	,47679
RIV	Über 47	21	18,9286	1,43925	,38465
Topografie	Unter 47	32	16,0714	2,20989	
RZV	Über 47	21	16,4286	1,01635	
Topografie	Unter 47	32	13,1071	1,74991	,33070
Rov	Über 47	21	13,2143	,97496	,26057
Topografie	Unter 47	32	9,7857	1,59530	,30148
r:4 v	Über 47	21	9,9286	,61573	,16456
Topografie R5V	Unter 47	32	2,4286	,50395	
	Über 47	21	2,2857	,46881	
SER	Unter 47	32	,0139	,03224	
	Über 47	21	,0086	,02107	
SESC	Unter 47	32	,0121	,02283	
	Über 47	21	,0057	,00514	
SESM	Unter 47	32	20,7939	1,17076	,22125
	Über 47	21	22,1836	,85455	,22839
SEW	Unter 47	32	44,5344	3,87739	,73276
	Über 47	21	48,3319	3,01090	,80470
R0	Unter 47	32	,09483	,027751	,005153
	Über 47	21	,13386	,028499	,008227
R1	Unter 47	32	,00613	,004706	,000874
	Über 47	21	,01386	,007109	,002052
R2	Unter 47	32	,93624	,044062	,008182

	Über 47	21	,86967	,091975	,026551
R3	Unter 47	32	,12025	,030645	,005691
	Über 47	21	,16597	,037281	,010762
R4	Unter 47	32	,01191	,007448	,001383
	Über 47	21	,03033	,014080	,004065
R5	Unter 47	32	1,51570	,250074	,046438
	Über 47	21	1,22307	,280530	,080982
R6	Unter 47	32	1,19856	,191758	,035608
	Über 47	21	1,14485	,174181	,050282
R7	Unter 47	32	,69181	,087162	,016185
	Über 47	21	,58064	,108085	,031202
R8	Unter 47	32	,08863	,026249	,004874
	Über 47	21	,11997	,022927	,006618
R9	Unter 47	32	,02542	,005168	,000960
	Über 47	21	,03211	,010890	,003144
F0	Unter 47	32	,0254195	,00516755	,00095959
	Über 47	21	,0321111	,01089002	,00314368
LPO	Unter 47	27	92,3537	90,88849	
	Über 47	19	69,8163	44,21040	

Frauen über 47 Jahren Raucher versus Nichtraucher

	Rauch- status	Ν	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
рН	R	11	5,2064	,61883	,18658
	NR	10	5,0820	,50095	,15841
SC	R	11	39,9611	5,98458	1,99486
пушацаціон	NR	10	43,8327	9,24980	2,78892
TEWL	R	11	9,80000	2,552254	,769534
	NR	10	10,92222	1,674648	,558216
Topografie	R	11	18,4286	1,39728	,52812
RIV	NR	10	19,4286	1,39728	,52812
Topografie	R	11	16,1429	,89974	,34007
RZV	NR	10	16,7143	1,11270	,42056
Topografie	R	11	13,1429	,89974	,34007
R3V	NR	10	13,2857	1,11270	,42056
Topografie	R	11	9,7143	,75593	,28571
R4V	NR	10	10,1429	,37796	,14286
Topografie	R	11	2,1429	,37796	,14286
Rov	NR	10	2,4286	,53452	,20203
SER	R	11	,0029	,00488	,00184
	NR	10	,0143	,02936	,01110
SESC	R	11	,0086	,00378	,00143
	NR	10	,0029	,00488	,00184
SESM	R	11	21,6586	,66804	,25250
	NR	10	22,7086	,70201	,26533
SEW	R	11	46,4193	2,59533	,98094
	NR	10	50,2444	2,09072	,79022
R0	R	11	,15273	,031085	,013902
	NR	10	,12038	,018332	,006929
R1	R	11	,01767	,007371	,003296
	NR	10	,01114	,005978	,002259

R2	R	11	,88665	,031426	,014054
	NR	10	,85753	,120160	,045416
R3	R	11	,19473	,037045	,016567
	NR	10	,14543	,021248	,008031
R4	R	11	,03820	,013391	,005989
	NR	10	,02471	,012470	,004713
R5	R	11	1,25321	,217677	,097348
	NR	10	1,20154	,333754	,126147
R6	R	11	1,18637	,186363	,083344
	NR	10	1,11520	,173218	,065470
R7	R	11	,57095	,053281	,023828
	NR	10	,58755	,139253	,052633
R8	R	11	,13507	,023965	,010717
	NR	10	,10919	,015979	,006039
R9	R	11	,04200	,006000	,002683
	NR	10	,02505	,007329	,002770
F0	R	11	,0420000	,00600000	,00268328
	NR	10	,0250476	,00732936	,00277024
LPO	R	5	71,6025	50,98577	18,02619
	NR	6	68,5173	41,27553	12,44504

Frauen unter 47 Jahren Raucher versus Nichtraucher

	Rauch- status	N	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
рН	R	15	5,2693	,53430	,13796
	NR	17	4,9711	,55023	,12969
SC	R	15	39,5013	7,18432	1,85498
пушацаціон	NR	17	42,2844	8,65605	2,04025
TEWL	R	15	10,78733	3,198456	,825838
	NR	17	11,70556	2,801779	,660386
Topografie	R	15	19,1667	2,51661	,72648
RIV	NR	17	19,0000	2,60768	,65192
Topografie	R	15	16,2500	1,95982	,56575
RZV	NR	17	15,9375	2,43499	,60875
Topografie	R	15	13,3333	1,82574	,52705
Rov	NR	17	12,9375	1,73085	,43271
Topografie	R	15	9,8333	1,46680	,42343
R4V	NR	17	9,7500	1,73205	,43301
Topografie R5V	R	15	2,4167	,51493	
	NR	17	2,4375	,51235	
SER	R	15	,0125	,01913	
	NR	17	,0150	,0400	
SESC	R	15	,0167	,02995	
	NR	17	,0088	,01586	
SESM	R	15	20,8608	1,13905	,32881
	NR	17	20,7438	1,22862	,30716
SEW	R	15	44,0411	4,70745	1,35892
	NR	17	44,9044	3,23574	,80894
R0	R	15	,10037	,028099	,007025
	NR	17	,08800,	,026804	,007434
R1	R	15	,00623	,003639	,000910

	NR	17	,00600	,005924	,001643
R2	R	15	,93904	,031417	,007854
	NR	17	,93280	,057210	,015867
R3	R	15	,12841	,029047	,007262
	NR	17	,11021	,030638	,008497
R4	R	15	,01216	,006458	,001614
	NR	17	,01162	,008782	,002436
R5	R	15	1,60049	,207539	,051885
	NR	17	1,41133	,265880	,073742
R6	R	15	1,26097	,192314	,048078
	NR	17	1,12174	33904 ,031417 93280 ,057210 12841 ,029047 11021 ,030638 01216 ,006458 01162 ,008782 ,60049 ,207539 ,41133 ,265880 ,26097 ,192314 ,12174 ,167280 70741 ,062037 67261 ,110416 09415 ,026492 08185 ,025298 0220312 ,005109 0222051 ,00510907 38,1717 39,28181 111,6993 115,00743	,046395
R7	R	15	,70741	,062037	,015509
	NR	17	,67261	,110416	,030624
R8	R	15	,09415	,026492	,006623
	NR	17	,08185	,025298	,007017
R9	R	15	,02803	,003568	,000892
	NR	17	,02221	,005109	,001417
F0	R	15	,0280312	,00356849	,00089212
	NR	17	,0222051	,00510907	,00141700
LPO	R	6	68,1717	39,28181	11,33968
	NR	7	111,6993	115,00743	29,69479

Männer Raucher versus Nichtraucher

	Rauch- status	N	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
pН	R	23	4,8100	,56779	,11356
	NR	24	4,5056	,37495	,07499
SC	R	23	40,5757	10,60681	2,21167
пушацаціон	NR	24	42,3928	10,35198	2,07040
TEWL	R	23	11,94000	3,031310	,677822
	NR	24	11,16842	1,817218	,416898
Topografie	R	23	23,3684	5,17698	1,18768
RIV	NR	24	18,3125	3,57246	,89312
Topografie	R	23	19,7368	4,13444	,94850
κzν	NR	24	15,9375	2,86284	,71571
Topografie	R	23	15,7895	3,34297	,76693
КJV	NR	24	12,8125	1,93972	,48493
Topografie	R	23	11,7895	2,69936	,61928
K4V	NR	24	9,4375	2,30850	,57712
Topografie R5V	R	23	3,0526	,84811	
	NR	24	2,1250	,61914	
SER	R	23	,1126	,5048	
	NR	24	,0281	,05969	
SESC	R	23	,0547	,10844	
	NR	24	,0369	,13169	
SESM	R	23	20,8958	1,60548	,36832
	NR	24	21,2912	1,14697	,28674
SEW	R	23	45,0881	4,79272	1,09953
	NR	24	45,5760	4,80473	1,20118
R0	R	23	,10346	,035156	,008286

	NR	24	,10426	,031248	,008068
R1	R	23	,00913	,008406	,001981
	NR	24	,00749	,004756	,001228
R2	R	23	,92011	,057204	,013483
	NR	24	,92721	,039193	,010120
R3	R	23	,12846	,042527	,010024
	NR	24	,12647	,036189	,009344
R4	R	23	,01943	,017918	,004223
	NR	24	,01389	,008177	,002111
R5	R	23	1,45670	,244387	,057603
	NR	24	1,42721	,135155	,034897
R6	R	23	1,21866	,168596	,039738
	NR	24	1,09954	,158737	,040986
R7	R	23	,66616	,110242	,025984
	NR	24	,68298	,076127	,019656
R8	R	23	,09435	,030730	,007243
	NR	24	,09654	,030210	,007800
R9	R	23	,02498	,010360	,002442
	NR	24	,02498	,010360	,002442
F0	R	23	,0249815	,01036048	,00244199
	NR	24	,0224389	,00635464	,00164076
LPO	R	8	62,0745	31,17590	6,64672
	NR	7	59,8860	30,22296	6,04459

Männer Altersgruppe 1 (20-29 Jahre) Raucher versus Nichtraucher

	Rauch- status	N	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
pН	R	9	4,9280	,58526	,18508
	NR	8	4,4656	,51216	,17072
SC	R	9	34,9600	7,68300	2,42958
пушаганоп	NR	8	34,2222	6,12672	2,04224
TEWL	R	9	10,41000	2,855190	,902890
	NR	8	11,35000	1,973394	,697700
Topografie	R	9	21,6250	5,01248	1,77218
RIV	NR	8	16,5000	2,97610	1,05221
Topografie	R	9	18,6250	4,24054	1,49926
κzν	NR	8	14,5000	2,13809	,75593
Topografie	R	9	14,7500	3,41216	1,20638
RJV	NR	8	11,7500	1,16496	,41188
Topografie	R	9	11,5000	2,87849	1,01770
K4V	NR	8	8,6250	1,59799	,56497
Topografie R5V	R	9	2,75	,88641	
	NR	8	1,875	,35355	
SER	R	9	,0388	,06266	
	NR	8	,0250	,07071	
SESC	R	9	,0900	,15721	,05558
	NR	8	,0038	,00744	,00263
SESM	R	9	20,0563	2,04912	,72447
	NR	8	21,1350	1,06539	,37667
SEW	R	9	42,7514	5,35241	1,89236

	NR	8	45,1370	4,69362	1,65945
R0	R	9	,09346	,030688	,010850
	NR	8	,10822	,031699	,010566
R1	R	9	,00433	,002867	,001014
	NR	8	,00611	,003742	,001247
R2	R	9	,95826	,020884	,007384
	NR	8	,94324	,032246	,010749
R3	R	9	,11437	,034998	,012374
	NR	8	,12756	,036986	,012329
R4	R	9	,00908	,005817	,002056
	NR	8	,01000	,005757	,001919
R5	R	9	1,62648	,171531	,060645
	NR	8	1,45583	,119270	,039757
R6	R	9	1,18306	,136137	,048132
	NR	8	1,04442	,145748	,048583
R7	R	9	,74402	,042502	,015027
	NR	8	,71596	,073288	,024429
R8	R	9	,08913	,028636	,010124
	NR	8	,10174	,031453	,010484
R9	R	9	,02092	,005039	,001781
	NR	8	,01970	,005032	,001677
F0	R	9	,0209167	,00503874	,00178146
	NR	8	,0197037	,00503169	,00167723
LPO	R	8	69,1911	41,01489	13,67163
	NR	7	60,1989	18,89369	6,29790

Männer Altersgruppe 2 (30-59 Jahre) Raucher versus Nichtraucher

	Rauch- status	Ν	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
pН	R	9	4,4075	,22531	,07966
	NR	9	4,6100	,23828	,07943
SC Hydratation	R	9	44,3338	9,76386	3,45205
Tryuralation	NR	9	44,2056	10,86043	3,62014
TEWL	R	9	13,95000	3,120737	1,274036
	NR	9	11,75714	1,799868	,680286
Topografie	R	9	25,8571	6,14894	2,32408
RIV	NR	9	20,1250	3,31393	1,17165
Topografie	R	9	21,4286	4,92805	1,86263
RZV	NR	9	17,3750	2,87539	1,01660
Topografie	R	9	17,1429	4,01782	1,51859
кэv	NR	9	13,8750	2,03101	,71807
Topografie	R	9	12,8571	3,07834	1,16350
K4V	NR	9	10,2500	2,71241	,95898
Topografie R5V	R	9	3,4286	,97590	,36886
	NR	9	2,3750	,74402	,26305
SER	R	9	,2529	,38331	,14488
	NR	9	,0313	,05111	,01807
SESC	R	9	,0429	,05438	
	NR	9	,0700	,18601	
SESM	R	9	21,1900	,83807	,31676

	NR	9	21,4475	1,27598	,45113
SEW	R	9	45,4594	3,46189	1,30847
	NR	9	46,0150	5,19597	1,83705
R0	R	9	,09689	,040100	,016371
	NR	9	,09831	,032487	,013263
R1	R	9	,00639	,002768	,001130
	NR	9	,00956	,005691	,002323
R2	R	9	,92887	,031704	,012943
	NR	9	,90315	,038467	,015704
R3	R	9	,11744	,044224	,018054
	NR	9	,12485	,038380	,015668
R4	R	9	,01350	,005336	,002179
	NR	9	,01972	,008133	,003320
R5	R	9	1,45455	,147814	,060345
	NR	9	1,38427	,157163	,064161
R6	R	9	1,22893	,212691	,086831
	NR	9	1,18223	,151299	,061767
R7	R	9	,67673	,054800	,022372
	NR	9	,63352	,052347	,021371
R8	R	9	,09055	,039234	,016017
	NR	9	,08875	,029172	,011909
R9	R	9	,02050	,009444	,003855
	NR	9	,02654	,006236	,002546
F0	R	9	,0205000	,00944398	,00385549
	NR	9	,0265417	,00623649	,00254603
LPO	R	6	57,2625	24,42417	8,63525
	NR	6	72,5233	42,72145	14,24048

Männer Altersgruppe 3 (60-79 Jahre) Rauche versus Nichtraucher

	Rauch- status	Ν	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
рН	R	3	5,1014	,61499	,23244
	NR	4	4,4229	,33190	,12545
SC	R	3	45,7940	13,34180	5,96663
пушацаціон	NR	4	50,5671	6,19002	2,33961
TEWL	R	3	12,75000	,866025	,433013
	NR	4	9,77500	,873212	,436606
Topografie	R	3	22,5000	1,73205	,86603
RIV	NR	4			
Topografie	R	3	19,0000	1,15470	,57735
RZV	NR	4			
Topografie	R	3	15,5000	,57735	,28868
R3V	NR	4			
Topografie	R	3	10,5000	,57735	,28868
R4V	NR	4			
Topografie R5V	R	3	3,0000	,00000	,00000
1.07	NR	4			
SER	R	3	,0150	,01732	,00866
	NR	4			
SESC	R	3	,0050	,00577	,00289

	NR	4			
SESM	R	3	22,0600	,61199	,30600
	NR	4			
SEW	R	3	49,1115	3,24644	1,62322
	NR	4			
R0	R	3	•		-
	NR	4	,13333	,024152	,012076
R1	R	3			
	NR	4	,02283	,006455	,003227
R2	R	3			
	NR	4	,83068	,033922	,016961
R3	R	3			
	NR	4	,17317	,026346	,013173
R4	R	3			
	NR	4	,04900	,013089	,006545
R5	R	3			
	NR	4	1,12039	,075483	,037742
R6	R	3			
	NR	4	1,27444	,186262	,093131
R7	R	3			
	NR	4	,49458	,063317	,031658
R8	R	3			
	NR	4	,11050	,020563	,010282
R9	R	3			
	NR	4	,03983	,004694	,002347
F0	R	3			•
	NR	4	,0398333	,00469436	,00234718
LPO	R	3	56,9640	22,39124	10,01367
	NR	4	43,2357	13,45782	5,08658

Männer Altersgruppe 1 und 2

	Alters- gruppe	N	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
рН	1	19	4,7089	,58662	,13458
	2	17	4,5147	,24789	,06012
SC	1	19	34,6105	6,80738	1,56172
Tryuralation	2	17	44,2659	10,03429	2,43367
TEWL	1	19	10,82778	2,479992	,584540
	2	17	12,76923	2,640513	,732346
Topografie	1	19	19,0625	4,78147	1,19537
	2	17	22,8000	5,51880	1,42495
Topografie	1	19	16,5625	3,88104	,97026
r\2 V	2	17	19,2667	4,35015	1,12320
Topografie	1	19	13,2500	2,90975	,72744
КЭV	2	17	15,4000	3,43927	,88802
Topografie	1	19	10,0625	2,69490	,67373
rx4 v	2	17	11,4667	3,09069	,79801
Topografie R5V	1	19	2,3125	,79320	,19830
	2	17	2,8667	,99043	,25573
SER	1	19	,0319	,06493	

	2	17	,1347	,27815	
SESC	1	19	,0469	,11637	
	2	17	,0573	,13698	
SESM	1	19	20,5956	1,67317	,41829
	2	17	21,3273	1,06431	,27480
SEW	1	19	43,9442	5,01673	1,25418
	2	17	45,7557	4,32639	1,11707
R0	1	19	,10127	,031179	,007562
	2	17	,09760	,034802	,010047
R1	1	19	,00527	,003381	,000820
	2	17	,00797	,004576	,001321
R2	1	19	,95031	,027756	,006732
	2	17	,91601	,036194	,010448
R3	1	19	,12135	,035579	,008629
	2	17	,12115	,039667	,011451
R4	1	19	,00957	,005621	,001363
	2	17	,01661	,007319	,002113
R5	1	19	1,53613	,166413	,040361
	2	17	1,41941	,150019	,043307
R6	1	19	1,10966	,154330	,037431
	2	17	1,20558	,177658	,051286
R7	1	19	,72916	,060699	,014722
	2	17	,65512	,055854	,016124
R8	1	19	,09580	,029926	,007258
	2	17	,08965	,032975	,009519
R9	1	19	,02027	,004915	,001192
	2	17	,02352	,008257	,002384
F0	1	19	,0202745	,00491488	,00119203
	2	17	,0235208	,00825678	,00238353
LPO	1	12	64,6950	31,32131	7,38250
	2	9	65,3418	35,14535	8,52400

Männer versus Frauen

	Rauch- status	N	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
рН	М	47	4,6578	,50040	,07077
	F	53	5,1224	,55049	,07491
SC	М	47	41,5221	10,40314	1,50156
пушацаціон	F	53	41,4236	7,95460	1,09265
TEWL	М	47	11,56410	2,512243	,402279
	F	53	10,91717	2,736563	,375897
Topografie	М	47	21,0571	5,13318	,86767
RIV	F	53	19,038	2,20297	,33993
Topografie	М	47	18,000	4,04388	,68354
RZV	F	53	16,1905	1,89013	,29165
Topografie	М	47	14,4286	3,13693	,53024
Rov	F	53	13,1429	1,52334	,23506
Topografie	М	47	10,7143	2,76077	,46666
K4V	F	53	9,8333	1,3494	,20707
Topografie	М	47	2,6286	,87735	

R5V F	53	2,3810	,49151	
SER M	47	,0740	,19135	
F	53	,0121	,02884	
SESC M	47	,0466	,11815	
F	53	,0100	,01900	
SESM M	47	21,0766	1,40887	,23814
F	53	21,2571	1,25451	,19357
SEW M	47	45,3111	4,73352	,80011
F	53	45,8002	4,00720	,61833
R0 M	47	,10382	,032923	,005731
F	53	,10625	,032951	,005146
R1 M	47	,00838	,006937	,001208
F	53	,00839	,006488	,001013
R2 M	47	,92334	,049227	,008569
F	53	,91676	,068014	,010622
R3 M	47	,12756	,039176	,006820
F	53	,13363	,038513	,006015
R4 M	47	,01691	,014410	,002509
F	53	,01730	,012858	,002008
R5 M	47	1,44330	,199858	,034791
F	53	1,43005	,289115	,045152
R6 M	47	1,16451	,172488	,030026
F	53	1,18284	,186265	,029090
R7 M	47	,67380	,09526	,016573
F	53	,65927	,105609	,016493
R8 M	47	,09535	,030036	,005229
F	53	,09780	,028901	,004514
R9 M	47	,02383	,008737	,001521
F	53	,02738	,007798	,001218
F0 M	47	,02383	,008737	,001521
F	53	,02738	,007798	,001218
LPO M				
	23	60,9104	30,35621	

Männer Raucher versus Frauen Raucher

	Geschlecht	N	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
рН	F	27	5,2427	,56040	,10990
	М	23	4,8100	,56779	,11356
SC	F	27	39,6738	6,62772	1,35288
пушацаціон	М	23	40,5757	10,60681	2,21167
TEWL	F	27	10,36962	2,929492	,574521
	М	23	11,94000	3,031310	,677822
Topografie	F	27	18,8947	2,15754	,49497
RIV	М	23	23,3684	5,17698	1,18768
Topografie	F	27	16,2105	1,61861	,37133
RZV	М	23	19,7368	4,13444	,94850
Topografie	F	27	13,2632	1,52177	,34912
RJV	М	23	15,7895	3,34297	,76693
Topografie	F	27	9,7895	1,22832	,28180

R4V	М	23	11,7895	2,69936	,61928
Topografie R5V	F	27	2,3158	,47757	
	М	23	3,0526	,84811	
SER	F	27	,0089	,01595	
	М	23	,1126	,25048	
SESC	F	27	,0137	,02385	
	М	23	,0547	,10844	
SESM	F	27	21,1547	1,04783	,24039
	М	23	20,8958	1,60548	,36832
SEW	F	27	44,9173	4,14447	,95081
	М	23	45,0881	4,79272	1,09953
R0	F	27	,09933	,028478	,006368
	М	23	,10426	,031248	,008068
R1	F	27	,00780	,006307	,001410
	М	23	,00749	,004756	,001228
R2	F	27	,90646	,089349	,019979
	М	23	,92721	,039193	,010120
R3	F	27	,12253	,032133	,007185
	М	23	,12647	,036189	,009344
R4	F	27	,01620	,011786	,002635
	М	23	,01389	,008177	,002111
R5	F	27	1,33790	,300605	,067217
	М	23	1,42721	,135155	,034897
R6	F	27	1,11945	,164798	,036850
	М	23	1,09954	,158737	,040986
R7	F	27	,64284	,124724	,027889
	М	23	,68298	,076127	,019656
R8	F	27	,09142	,025766	,005762
	М	23	,09654	,030210	,007800
R9	F	27	,02320	,005949	,001330
	М	23	,02244	,006355	,001641
F0	F	27	,0232000	,00594851	,00133013
	М	23	,0224389	,00635464	,00164076
LPO	F	20	69,5440	43,05872	9,62822
	М	22	62,0745	31,17590	6,64672

Männer Nichtraucher versus Frauen Nichtraucher

	Geschlecht	Ν	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
pН	F	26	5,0107	,52650	,09950
	М	24	4,5056	,37495	,07499
SC	F	26	42,8717	8,75401	1,62558
пушацаціон	М	24	42,3928	10,35198	2,07040
TEWL	F	26	11,44444	2,477333	,476763
	М	24	11,16842	1,817218	,416898
Topografie	F	26	19,1304	2,28243	,47592
RIV	М	24	18,3125	3,57246	,89312
Topografie	F	26	16,1739	2,12458	,44301
R2V	М	24	15,9375	2,86284	,71571
Topografie	F	26	13,0435	1,55149	,32351

R3V	М	24	12,8125	1,93972	,48493
Topografie	F	26	9,8696	1,45553	,30350
r:4 v	М	24	9,4375	2,30850	,57712
Topografie R5V	F	26	2,4348	,50687	
	М	24	2,125	,61914	
SER	F	26	,0148	,03642	
	М	24	,0281	,05969	
SESC	F	26	,0070	,01363	
	М	24	,0369	,13169	
SESM	F	26	21,3417	1,42061	,29622
	М	24	21,2912	1,14697	,28674
SEW	F	26	46,5297	3,82655	,79789
	М	24	45,5760	4,80473	1,20118
R0	F	26	,11284	,036161	,007891
	М	24	,10346	,035156	,008286
R1	F	26	,00895	,006761	,001475
	М	24	,00913	,008406	,001981
R2	F	26	,92657	,038218	,008340
	М	24	,92011	,057204	,013483
R3	F	26	,14420	,041776	,009116
	М	24	,12846	,042527	,010024
R4	F	26	,01836	,014012	,003058
	М	24	,01943	,017918	,004223
R5	F	26	1,51781	,254466	,055529
	М	24	1,45670	,244387	,057603
R6	F	26	1,24321	,189062	,041257
	М	24	1,21866	,168596	,039738
R7	F	26	,67492	,083673	,018259
	М	24	,66616	,110242	,025984
R8	F	26	,10389	,030987	,006762
	М	24	,09435	,030730	,007243
R9	F	26	,03136	,007343	,001602
	М	24	,02498	,010360	,002442
F0	F	26	,0313571	,00734285	,00160234
	M	24	,0249815	,01036048	,00244199
LPO	F	16	93,4300	92,52983	18,14659
	М	13	59,8860	30,22296	6,04459

Männer Altersgruppe 1 versus Frauen Altersgruppe 1

	Geschlecht	Ν	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
pН	F	19	5,1606	,58567	,14205
	М	19	4,7089	,58662	,13458
SC	F	19	40,5547	9,01024	2,18531
Hyuralalion	М	19	34,6105	6,80738	1,56172
TEWL	F	19	9,66529	1,832444	,444433
	М	19	10,82778	2,479992	,584540
Topografie	F	19	19,8125	2,45544	,61386
KIV	М	19	19,0625	4,78147	1,19537
Topografie	F	19	16,6875	2,02382	,50595

R2V	М	19	16,5625	3,88104	,97026
Topografie	F	19	13,6250	1,62788	,40697
RJV	М	19	13,2500	2,90975	,72744
Topografie	F	19	10,2500	1,43759	,35940
R4V	М	19	10,0625	2,69490	,67373
Topografie R5V	F	19	2,5000	,51640	,12910
	M	19	2,3125	,79320	,19830
SER	F	19	,0194	,04057	
	М	19	,0319	,06493	
SESC	F	19	,0194	,02792	,00698
	М	19	,0469	,11637	,02909
SESM	F	19	20,6350	,87026	,21757
	М	19	20,5956	1,67317	,41829
SEW	F	19	42,9695	3,59044	,89761
	М	19	43,9442	5,01673	1,25418
R0	F	19	,08917	,025416	,006793
	М	19	,10127	,031179	,007562
R1	F	19	,00383	,002282	,000610
	М	19	,00527	,003381	,000820
R2	F	19	,95678	,023912	,006391
	М	19	,95031	,027756	,006732
R3	F	19	,11360	,027457	,007338
	М	19	,12135	,035579	,008629
R4	F	19	,00800,	,003742	,001000
	М	19	,00957	,005621	,001363
R5	F	19	1,60414	,226484	,060530
	М	19	1,53613	,166413	,040361
R6	F	19	1,17219	,215671	,057640
	М	19	1,10966	,154330	,037431
R7	F	19	,73695	,056658	,015142
	М	19	,72916	,060699	,014722
R8	F	19	,08533	,024574	,006568
	М	19	,09580	,029926	,007258
R9	F	19	,02443	,005315	,001420
	М	19	,02027	,004915	,001192
F0	F	19	,0244286	,00531476	,00142043
	М	19	,0202745	,00491488	,00119203
LPO	F	11	68,7673	62,55711	18,86168
	М	10	64,6950	31,32131	7,38250

Männer Altersgruppe 1 Raucher versus Frauen Altersgruppe 1 Raucher

	Geschlecht	Ν	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
pН	F	9	5,5563	,48258	,17062
	М	10	4,9280	,58526	,18508
SC	F	9	36,3000	3,93113	1,38986
пушаганоп	М	10	34,9600	7,68300	2,42958
TEWL	F	9	9,06375	1,301515	,460155
	М	10	10,41000	2,855190	,902890
Topografie	F	9	20,0000	2,26779	,80178

R1V	М	10	21,6250	5,01248	1,77218
Topografie	F	9	17,0000	1,69031	,59761
RZV	М	10	18,6250	4,24054	1,49926
Topografie	F	9	14,0000	1,69031	,59761
N3V	Μ	10	14,7500	3,41216	1,20638
Topografie	F	9	10,5000	1,19523	,42258
IN4 V	М	10	11,5000	2,87849	1,01770
Topografie R5V	F	9	2,5000	,53452	,18898
	Μ	10	2,7500	,88641	,31339
SER	F	9	,0125	,01753	,00620
	М	10	,0388	,06266	,02216
SESC	F	9	,0250	,03423	,01210
	М	10	,0900	,15721	,05558
SESM	F	9	20,3625	,96447	,34099
	М	10	20,0563	2,04912	,72447
SEW	F	9	41,9360	3,87320	1,36938
	Μ	10	42,7514	5,35241	1,89236
R0	F	9	,07906	,009446	,003856
	М	10	,10822	,031699	,010566
R1	F	9	,00417	,002972	,001213
	М	10	,00611	,003742	,001247
R2	F	9	,94839	,031784	,012976
	М	10	,94324	,032246	,010749
R3	F	9	,09900	,011983	,004892
	М	10	,12756	,036986	,012329
R4	F	9	,00867	,004662	,001903
	М	10	,01000	,005757	,001919
R5	F	9	1,44017	,145573	,059430
	М	10	1,45583	,119270	,039757
R6	F	9	1,02712	,100195	,040904
	М	10	1,04442	,145748	,048583
R7	F	9	,70968	,059217	,024175
	М	10	,71596	,073288	,024429
R8	F	9	,07489	,008312	,003394
	М	10	,10174	,031453	,010484
R9	F	9	,01994	,004068	,001661
	М	10	,01970	,005032	,001677
F0	F	9	,0199444	,00406840	,00166092
	М	10	,0197037	,00503169	,00167723
LPO	F	5	51,2460	23,10882	10,33458
	М	9	69,1911	41,01489	13,67163

Männer Altersgruppe 1 Nichtraucher versus Frauen Altersgruppe 1 Nichtraucher

	Geschlecht	Ν	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
рН	М	10	4,4656	,51216	,17072
	F	10	4,8089	,43190	,14397
SC Hydratation	М	10	34,2222	6,12672	2,04224
	F	10	44,3367	10,70763	3,56921
TEWL	М	10	11,35000	1,973394	,697700

	F	10	10,20000	2,133073	,711024
Topografie	М	10	16,5000	2,97610	1,05221
RIV	F	10	19,6250	2,77424	,98084
Topografie	М	10	14,5000	2,13809	,75593
RZV	F	10	16,3750	2,38672	,84383
Topografie	М	10	11,7500	1,16496	,41188
Rov	F	10	13,2500	1,58114	,55902
Topografie	М	10	8,6250	1,59799	,56497
R4V	F	10	10,000	1,69031	,59761
Topografie R5V	М	10	1,8750	,35355	
	F	10	2,5000	,53452	
SER	М	10	,0250	,07071	
	F	10	,0263,05579		
SESC	М	10	,0038	,00744	,00263
	F	10	,0138	,02066	,00730
SESM	М	10	21,1350	1,06539	,37667
	F	10	20,9075	,72318	,25568
SEW	М	10	45,1370	4,69362	1,65945
	F	10	44,0030	3,19078	1,12811
R0	М	10	,09346	,030688	,01085
	F	10	,09675	,03134	,011083
R1	М	10	,00433	,002867	,001014
	F	10	,00358	,001788	,000632
R2	М	10	,95826	,020884	,007384
	F	10	,96308	,015320	,005417
R3	М	10	,11437	,034998	,012374
	F	10	,12454	,031273	,011057
R4	М	10	,00908	,005817	,002056
	F	10	,00750	,003132	,00107
R5	М	10	1,62648	,171531	,060645
	F	10	1,72711	,199495	,070532
R6	М	10	1,18306	,136137	,048132
	F	10	1,28098	,218282	,077174
R7	М	10	,74402	,042502	,015027
	F	10	,75741	,048387	,017107
R8	М	10	,08913	,028636	,010124
	F	10	,09317	,030141	,010657
R9	М	10	,02092	,005039	,001781
	F	10	,02779	,003236	,001144
F0	М	10	,02092	,005039	,001781
	F	10	,02779	,003236	,001144
LPO	M	9	60,1989	18,89369	
	F	9	83,3683	82,68462	

Männer Altersgruppe 2 versus Frauen Altersgruppe 2

	Geschlecht	Ν	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
pН	М	10	4,5147	,24789	,06012
	F	10	5,0910	,57353	,12825
SC	М	10	44,2659	10,03429	2,43367

Hydratation	F	10	40,7495	6,89403	1,54155
TEWL	М	10	12,76923	2,640513	,732346
	F	10	12,48500	2,909924	,650679
Topografie	М	10	22,8000	5,51880	1,42495
RIV	F	10	18,5000	2,33809	,58452
Topografie	М	10	19,2667	4,35015	1,12320
RZV	F	10	15,6875	2,24258	,56065
Topografie	М	10	15,4000	3,43927	,88802
N3V	F	10	12,7500	1,73205	,43301
Topografie	М	10	11,4667	3,09069	,79801
1144	F	10	9,4375	1,54785	,38696
Topografie R5V	М	10	2,8667	,99043	
	F	10	2,3750	,5000	
SER	М	10	,1347	,27815	
	F	10	,0100	,02251	
SESC	М	10	0,0573	,1368	
	F	10	,0031	,00602	
SESM	М	10	21,3273	1,06431	,27480
	F	10	21,1838	1,38449	,34612
SEW	М	10	45,7557	4,32639	1,11707
	F	10	46,7563	3,23584	,80896
R0	М	10	,09760	,034802	,010047
	F	10	,10279	,027265	,006255
R1	М	10	,00797	,004576	,001321
	F	10	,00795	,005260	,001207
R2	М	10	,91601	,036194	,010446
	F	10	,90306	,087301	,020028
R3	М	10	,12115	,039667	,011451
	rrafie M 10 F 10 grafie M 10 F 10 prafie M 10 F 10 prafie M 10 prafie M 10 prafie M 10 prafie M 10 F 10 10 prafie M 10 F 10 10 F 10 </td <td>10</td> <td>,12904</td> <td>,030864</td> <td>,007081</td>	10	,12904	,030864	,007081
R1V Topografie R2V Topografie R4V Topografie R5V SER SESC SESM SEW R0 R1 R2 R3 R4 R2 R3 R4 R5 R6 R7 R8 R9 F0 LPO	М	10	,01661	,007319	,002113
	F	10	,01548	,008609	,001975
TEWL Topografie R1V Topografie R2V Topografie R3V Topografie R4V Topografie SER SESC SESM SEW R0 R1 R2 R3 R4 R5 R6 R7 R8 R9 F0 LPO	М	10	1,41941	,150019	,043307
	F	10	1,43521	,252340	,057893
R6	М	10	1,20558	,177656	,051286
	F	10	1,22971	,164495	,037738
R7	М	10	,65512	,055854	,016124
	F	10	,65709	,089184	,020460
R8	М	10	,08965	,032975	,009519
	F	10	,09472	,025991	,005963
R9	М	10	,02352	,008257	,002384
	F	10	,02625	,005663	,001299
F0	М	10	,02352	,008257	,002384
	F	10	,02625	,005663	,001299
LPO	M	9	65,3418	35,14535	8,52400
	F	9	111,7900	98,50275	22,59808

Männer Altersgruppe 2 Raucher versus Frauen Altersgruppe 2 Raucher

	Geschlecht	Ν	Mittelwert	STABW	Standard- fehler des Mittelwertes
pН	F	10	4,9640	,48319	,15280

	М	8	4,4075	,22531	,07966
SC	F	10	41,8190	7,97201	2,52097
Hydratation	М	8	44,3338	9,76386	3,45205
TEWL	F	10	12,09000	3,191116	1,009120
	М	6	13,95000	3,120737	1,274036
Topografie	F	7	18,1429	2,11570	,79966
RIV	М	7	25,8571	6,14894	2,32408
Topografie	F	7	15,4286	1,71825	,64944
1\2 V	М	7	21,4286	4,92805	1,86263
Topografie	F	7	12,5714	1,51186	,57143
11.5 V	М	7	17,1429	4,01782	1,51859
Topografie	F	7	9,1429	1,21499	,45922
1141	М	7	12,8571	3,07834	1,16350
Topografie R5V	F	7	2,2857	,48795	,18443
	М	7	3,4286	,97590	,36886
SER	F	7	,0071	,01890	,00714
	М	7	,2529	,38331	,14488
SESC	F	7	,0029	,00488	,00184
	М	7	,0429	,05438	,02055
SESM	F	7	21,8571	,82619	,31227
	М	7	21,1900	,83807	,31676
SEW	F	7	47,9789	3,30849	1,25049
	М	7	45,4594	3,46189	1,30847
R0	F	10	,10046	,030508	,009648
	М	6	,09831	,032487	,013263
R1	F	10	,00730	,006847	,002165
	М	6	,00956	,005691	,002323
R2	F	10	,88981	,119720	,037859
	М	6	,90315	,038467	,015704
R3	F	10	,12433	,034670	,010963
	М	6	,12485	,038380	,015668
R4	F	10	,01447	,011052	,003495
	М	6	,01972	,008133	,003320
R5	F	10	1,38358	,325544	,102946
	М	6	1,38427	,157163	,064161
R6	F	10	1,19418	,144584	,045721
	М	6	1,18223	,151299	,061767
R7	F	10	,65679	,125530	,039696
	М	6	,63352	,052347	,021371
R8	F	10	,09293	,029364	,009286
	М	6	,08875	,029172	,011909
R9	F	10	,02387	,005878	,001859
	М	6	,02654	,006236	,002546
F0	F	10	,0238667	,00587777	,00185871
	М	6	,0265417	,00623649	,00254603
LPO	F	9	88,6856	52,67735	17,55912
	М	8	57,2625	24,42417	8,63525

Männer Altersgruppe 2 Nichtraucher versus Frauen Altersgruppe 2 Nichtraucher

	N	Mittohwort	STABW/	Standard-	
Gesc	chlecht IN	witterwert	STADW	fehler	des

					Mittelwertes
рН	F	10	5,2180	,65200	,20618
	М	9	4,6100	,23828	,07943
SC	F	10	39,6800	5,85160	1,85044
Hydratation	М	9	44,2056	10,86043	3,62014
TEWL	F	10	12,88000	2,710392	,857101
	М	7	11,75714	1,799868	,680286
Topografie	F	9	18,7778	2,58736	,86245
R1V	М	8	20,1250	3,31393	1,17165
Topografie R2V	F	9	15,8889	2,66667	,88889
	М	8	17,3750	2,87539	1,01660
Topografie R3V	F	9	12,8889	1,96497	,65499
	М	8	13,8750	2,03101	,71807
Topografie R4V	F	9	9,6667	1,80278	,60093
	М	8	10,2500	2,71241	,95898
Topografie R5V	F	9	2,4444	,52705	,17568
	М	8	2,3750	,74402	,26305
SER	F	9	,0122	,02587	,00862
	М	8	,0313	,05111	,01807
SESC	F	9	,0033	,00707	
	М	8	,0700	,18601	
SESM	F	9	20,6600	1,54165	,51388
	М	8	21,4475	1,27598	,45113
SEW	F	9	45,8053	3,01624	1,00541
	М	8	46,0150	5,19597	1,83705
R0	F	9	,10537	,024724	,008241
	М	6	,09689	,040100	,016371
R1	F	9	,00867	,002901	,000967
	М	6	,00639	,002768	,001130
R2	F	9	,91779	,023663	,007888
	М	6	,92887	,031704	,012943
R3	F	9	,13428	,027067	,009022
	М	6	,11744	,044224	,018054
R4	F	9	,01661	,005159	,001720
	М	6	,01350	,005336	,002179
R5	F	9	1,49257	,130459	,043486
	М	6	1,45455	,147814	,060345
R6	F	9	1,26919	,184478	,061493
	М	6	1,22893	,212691	,086831
R7	F	9	,65742	,012975	,004325
	М	6	,67673	,054800	,022372
R8	F	9	,09670	,023271	,007757
	М	6	,09055	,039234	,016017
R9	F	9	,02891	,004271	,001424
	М	6	,02050	,009444	,003855
F0	F	9	,0289074	,00427128	,00142376
	М	6	,0205000	,00944398	,00385549
LPO	F	10	132,5840	126,19331	39,90583
	М	9	72.5233	42.72145	14,24048
		J.	,0_00	,	,



Anhang

Spezielle Probandeninformation

"Untersuchungen der epidermale Oberflächenbeschaffenheit von Nichtrauchern, sowie der epidermalen Barriere und deren Beeinflussung durch Zigarettennebenstromrauch."

> Universität Hamburg, Kosmetik und Körperpflege Prof. Dr. med. M. Kerscher, Dr. med. T. Reuther, M. Kemper Dipl. Biochemikerin, Doris Kraus

Inhaltsverzeichnis

- 1. Hintergrund
- 2. Ziel der Prüfung an der Sie teilnehmen
- 3. Design der Prüfung
- 4. Prüfpräparate und Behandlung
- 5. Spezielle Einschlussbedingungen
- 6. Weitere spezielle Bedingungen für diese Prüfung
- 7. Prüfungsablauf
- 8. Risiken, Komplikationen
- 9. Allgemeine Bedingung für jede Prüfung
 - 9.1. Begleitmedikation
 - 9.2. Versicherung
 - 9.3. Weitere Verpflichtungen
 - 9.4. Datenschutz
 - 9.5. Information oder medizinischer Rat
- 10. Aufwandsentschädigung
- 11. Einverständniserklärung

Sehr geehrte Probandin, sehr geehrter Proband,

mit dieser speziellen Probandeninformation möchten wir Sie über Art, Zweck und Risiken unserer Untersuchungen aufklären:

1. Hintergrund der Studie

Wie Sie sicherlich wissen, können Umweltschadstoffe mit der Hautoberfläche in Wechselwirkung treten. Dies gilt nach heutiger Erkenntnis insbesondere für den Umweltschadstoff: Zigarettenrauch. Durch diese Wechselwirkung kann die Schutzfunktion der Hautoberfläche beeinträchtigt werden und die Haut kann trockener und schuppiger werden. Außerdem wird die Haut von Rauchern durch die gefäßverengende Wirkung von Nikotin schlechter durchblutet und damit schlechter mit ausreichenden Nährstoffen versorgt. Es kommt zu vorzeitiger Hautalterung.

2. Ziel der Studie, an der Sie teilnehmen

Mit dieser Studie sollen die Hautbarrieren von Nichtrauchern nach Zigarettenrauchexposition untersucht werden.

3. Design der Prüfung

An dieser Studie nehmen ca. 20 Personen teil.

4. Prüfpräparate und Behandlung

Es wird der rechte oder der linke Unterarm (welcher Arm mit biophysikalischen Methoden und an welchem Lipiperoxide herausgewaschen werden, wird mit einem Zufallsgenerator bestimmt) mit Hilfe biophysikalischer Meßmethoden nicht – invasiv gemessen. Bei den biophysikalischen Meßmethoden handelt es sich um s.g. nicht - invasive Meßmethoden, d.h. hier wird die Haut gemessen ohne sie zu verletzten. Entsprechend sind diese Untersuchungen vollkommen schmerzfrei. Anschließend werden Lipidperoxide aus dem anderem Unterarm mit Ethanol (Alkohol) herausgewaschen. Auch dieses ist absolut schmerzfrei. Später wird im Labor die Konzentration der Lipidperoxide mit biochemischen Methoden bestimmt.

1. Hautoberflächen pH-Wert

Mit Hilfe einer Glassonde wird der pH-Wert der Hautoberfläche bestimmt, dieses Gerät wird häufig in Kosmetikinstituten eingesetzt.

2. Stratum Corneum Hydratation

Hiermit wird der Wassergehaltes der Hornschicht bestimmt.

3. <u>TEWL (Transepidermaler Wasserverlust)</u>

Mit dieser Methode wird die Wasserverdunstung der Haut gemessen. Eine erhöhte Wasserverdunstung lässt auf eine nicht intakte Hautbarriere schließen.

3. Sebumetrie

Mit Hilfe der Sebumetrie kann die Konzentration der Talgfette an der Hautoberfläche gemessen werden. Auch dieses Gerät kommt häufig in Kosmetikinstituten zum Einsatz.

4. Hauttopografie

Mit dem Visioscan lässt sich die Rauhheit mit Hilfe einer Schwarz-Weiß Aufnahme bestimmen.

5. <u>Elastizität</u>

Mit dem Cutometer kann die Elastizität der Haut untersucht werden, indem die Haut leicht angesaugt und dann wieder entspannt wird.

6. Lipidperoxid-Test

Mit Hilfe von reinem Ethanol (Alkohol) werden die Lipidperoxide aus der Haut herausgewaschen. Anschließend wird die Konzentration im Labor bestimmt. Die Konzentration gibt Aufschluss über den Schutz der Haut

7. Spezielle Einschlussbedingungen

Folgende Einschlussbedingungen müssen Sie erfüllen:

- Freiwillige Teilnahme an der klinischen Untersuchung

- Männer oder Frauen im Alter von 18 bis 85 Jahren

- schriftliche Einverständniserklärung des Probanden

Sie dürfen nicht an dieser Prüfung teilnehmen, wenn eines der Kriterien auf Sie zutritt:

- Vorliegen einer Hauterkrankung oder einer allergischen Erkrankung der Atemwege (allergisches Asthma, Rhinokonjunktivitis allergica)
- Chronische Infektionen oder Zustände, die das Studienziel beeinträchtigen könnten

- Krebs in der Vorgeschichte
- Schwangerschaft oder Stillzeit
- Starke Sonnenbestrahlung während der letzten zwei Monaten vor Versuchsbeginn
- Hinweise auf Drogen oder Alkoholmissbrauch in der Vergangenheit
- Mentale Voraussetzungen, die dazu f
 ühren, dass der Proband die Beschaffenheit, den Umfang und die m
 öglichen Konsequenzen der Pr
 üfung nicht versteht
- Minderjährigkeit oder verminderte Geschäftsfähigkeit
- Unterbringung in einer Anstalt
- Einnahme von Medikamenten oder Impfungen
- eingecremen oder waschen des zu untersuchenden Unterarm im Zeitraum von 24 h vor der Untersuchung
- MangeInde Compliance

8. Weitere spezielle Bedingungen für diese Prüfung

Versuchen Sie während der Studie Ihre Unterarme weder mit Seife oder Creme zu behandeln, da dies die Studienergebnisse verfälschen könnte.

Frauen im gebärfähigen Alter:

- Dürfen nicht an der Prüfung teilnehmen, wenn sie vorhaben während der Prüfungsphase schwanger zu werden
- Müssen dem Prüfarzt unverzüglich mitteilen, wenn der Verdacht einer Schwangerschaft besteht, oder sie keine medizinisch akzeptierte Verhütungsmethode mehr verwenden
- Werden von der Prüfung ausgeschlossen, wenn es zu einer Schwangerschaft kommt

9. Prüfungsablauf

Die Prüfung wird in der Universität Hamburg, Studiengang Kosmetik und Körperpflege (FB13), Papendamm 21, 20146 Hamburg, Tel.: 040-42838-5905, durchgeführt.

Die Studie wird in einem Zeitraum von sechs Tagen durchgeführt. Die Studientage können individuell festgelegt werden. Von Vorteil für die Studie wäre es, wenn während der gesamten Studiendauer beide Unterarme weder mit Seife noch mit Creme behandelt werden würden.

Den Prüfablauf entnehmen Sie dem folgenden Schema:

Prüfablaufschema:

Tag 0: Ausführliche Aufklärung Tag 1.: Untersuchung 1:

- Randomisierung der Unterarme
- Untersuchung der epidermalen Barriere des zu untersuchenden Unterarmes mit biophysikalischen Meßmethoden
- Lipidperoxidtest am anderem Unterarm

Nach 15 min Zigarettenrauchexposition beider Unterarme Untersuchung 2:

- direkt im Anschluss Untersuchung der epidermalen Barriere mit biophysikalischen Meßmethoden
- Lipidperoxidtest am anderem Unterarm

2 Stunden nach der Rauchexposition Untersuchung 3:

- Untersuchung der epidermalen Barriere mit biophysikalischen Meßmethoden
- Lipidperoxidtest am anderem Unterarm

6 Stunden nach der Rauchexposition Untersuchung 4:

- direkt im Anschluss Untersuchung der epidermalen Barriere mit biophysikalischen Meßmethoden
- Lipidperoxidtest am anderem Unterarm

24 Stunden nach der Rauchexposition

Untersuchung 5:

- direkt im Anschluss Untersuchung der epidermalen Barriere mit biophysikalischen Meßmethoden
- Lipidperoxidtest am anderem Unterarm

10. Risiken, Komplikationen

.Mit Nebenwirkungen ist also nicht zurechnen. Beim Auswaschen der Lipidperoxide mit Ethanol (Alkohol) könnte es zu einer kurzfristigen Trockenheit der Haut kommen, die sich aber durch eincremen mit einer handelsüblichen Körpercreme beheben lässt.

1. Allgemeine Bedingungen für jede Prüfung

Sie haben das Recht, jederzeit Fragen zu stellen. Die Teilnahme an dieser Studie ist vollkommen freiwillig und kann von Ihnen ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteil abgebrochen werden. Sie sind allerdings verpflichtet während der Studie den Prüfärzten mitzuteilen, wenn irgendwelche Veränderungen in Ihrem Befinden eintreten oder Sie, bedingt durch einen Notfall, einen Arzt aufsuchen müssen. Es wird sich vorbehalten, Ihre Teilnahme jederzeit aus wissenschaftlichen Gründen, aus Gründen der Gewährleistung eines ordnungsgemäßen Ablaufs der Studie, zur Gewährleistung Ihrer Sicherheit oder aus sonstigen Gründen zu beenden. Falls sich im Verlauf dieser Studie neue Erkenntnissen ergeben, werden wir Sie umgehend davon unterrichten. Die Studie wird streng nach der Deklaration von Helsinki, Tokio, Venedig und Hongkong der Generalversammlung des Weltärztebundes, nach dem Arzneimittelgesetz der Bundesrepublik Deutschland sowie den Grundsätzen für die ordnungsgemäße Durchführung der klinischen Prüfung von Arzneimitteln in der Fassung vom 10.12.1987 (Bundesanzeiger, S.:16617 vom 31.12.1987) durchgeführt und wurde einer unabhängigen Ethikkommission vorgelegt.

a. Begleitmedikation

Sie werden gebeten, während der gesamten Studiendauer auf die Einnahme von Medikamenten zu verzichten. Sollte dies aus gesundheitlichen Gründen nicht möglich sein, so unterrichten Sie bitte den Prüfarzt. über jede Einnahme oder Verabreichung. Ebenso werden Sie gebeten einen Monat vor Studienbeginn, sowie während der gesamten Studiendauer beide Unterarme weder mit Seife noch mit Cremes zu behandeln.

Versicherung

h

Bei der beschriebenen Untersuchung sind Sie Maßgabe der geltenden Allgemeinen Versicherungsbedingungen (AVB/P) versichert. Der Versicherungsschutz erstreckt sich auf alle Gesundheitsschädigungen, die innerhalb von drei Jahren als Folge von den angewendeten Arzneimitteln und Stoffen oder von Maßnahmen eintreten, die im Zusammenhang mit der Prüfung am Körper des Probanden durchgeführt werden.

Ersetzt wird der Vermögensschaden, der durch die Gesundheitsschädigung herbeigeführt wird; im Falle des Todes werden die in § 844 BGB bestimmten Leistungen erbracht. Der Umfang der Versicherung für den Proband beträgt mindestens 500.000 Euro.

Ausgeschlossen von der Versicherung sind Schäden oder Verschlimmerungen bereits bestehender Leidenszustände, die auch ohne Teilnahme an der klinischen Prüfung eingetreten wären oder fortbestünden, genetische Schädigungen sowie Schädigungen, die darauf beruhen, dass die Versuchsperson vorsätzlich ausdrücklichen Anweisungen bei der klinischen Prüfung zu wider gehandelt hat.

Um den Versicherungsschutz nicht zu gefährden, müssen Sie folgendes beachten:

- Während der Dauer der klinischen Prüfung dürfen Sie sich keiner anderen medizinischen Behandlung nur im Einvernehmen mit Prof. Dr. med. Kerscher oder Dr. med. Reuther unterziehen. Dies gilt nicht in einem medizinischen Notfall; der klinische Prüfer ist von einer Notfallbehandlung unverzüglich zu unterrichten.

- Eine Gesundheitsschädigung, die als Folge der klinischen Prüfung eingetreten sein kann, müssen Sie dem Versicherer (Gerling Konzern Hannover GmbH, Georgstr. 44, 30159 Hannover, Tel.: 0511-3031-1, Police-Nr. Des Versicherungsscheins) unverzüglich anzeigen. Beim etwaigen Eintritt des Todes ist dies dem Versicherungsunternehmen durch den Rechtsnachfolger (Erben) telegraphisch binnen 48 Std. anzuzeigen.

- Sie müssen alle zweckmäßigen Maßnahmen treffen, die der Aufklärung der Ursache oder des Umfanges eines Schadens sowie dessen Minderung dienen.

- Verletzen Sie vorsätzlich oder grob fahrlässig eine nach Eintritt eines Schadens von ihr zu erfüllende Obliegenheit,
ist der Versicherer von der Verpflichtung der Leistung frei.

Weitere Verpflichtungen

c. Datenschutz

Die Datenschutzbestimmungen (§40(1) 2. AMG) werden wie folgt eingehalten:

Die von Ihnen erhobenen Daten werden ausschließlich zum Zweck der Durchführung der Studie gespeichert und ausgewertet. Alle persönlichen Angaben, die Sie uns gegenüber machen, unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht und werden nur in kodierter Form weitergegeben. Die Regelungen des Datenschutz werden eingehalten. Allerdings sieht das Gesetz vor, dass Ihre im Rahmen der Studie aufgezeichneten Daten zur Überprüfung an den Auftraggeber, die zuständige Überwachungsbehörde weitergegeben werden können. Das schließ auch die Aufhebung Ihrer Anonymität ein. Sollte dieser fall eintreten, werden wir Sie davon in Kenntnis setzen. Sie haben jederzeit das Recht, Ihre persönlichen Daten einzusehen und sie gegebenenfalls zu korrigieren.

d. Information oder medizinischer Rat

Sollten Sie zur Studie oder zu Ihrer rechtlichen Situation noch Fragen haben, wenden Sie sich bitte an den Prüfarzt. Da es sich um eine klinische Studie handelt, werden die Daten wissenschaftlich ausgewertet. Alle Daten und Angaben werden höchst vertraulich behandelt, eine Weitergabe persönlicher Daten an Dritte erfolgt nicht.

2. Aufwandsentschädigung

Wichtig für diese Studie ist die Einhaltung vereinbarter Termine. Sollten Sie zu dem vereinbarten Termin nicht rechtzeitig oder überhaupt nicht kommen können, teilen Sie uns bitte telefonisch möglichst rechtzeitig diese Änderung mit, damit wir den Prüfungsablauf entsprechend ändern können. Denn die Zuverlässigkeit der Prüfungsergebnisse ist entscheidend von der Zuverlässigkeit der Probanden abhängig. Für die ordnungsgemäße vollständige Teilnahme an der Prüfung erhalten Sie am letzten Prüfungstag eine Aufwandsentschädigung von 50 EUR. Für eine eventuelle Versteuerung des Betrages sind Sie selbst verantwortlich.

Muster für die schriftlich zu erteilende Einwilligungserklärung

Probanden-Einwilligungserklärung

"Untersuchungen der epidermalen Oberflächenbeschaffenheit von Nichtrauchern, sowie der epidermalen Barriere und deren Beeinflussung durch Zigarettennebenstrom"

Universität Hamburg, Kosmetik und Körperpflege Prof. Dr. med. M. Kerscher

Datum:

Proband: Name, Vorname, Geburtsdatum (Probanden Nr.)

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, an der genannten Studie teilzunehmen, und bestätige, dass ich

- über Art und Zweck der Studie ausführlich sowohl mündlich als auch mit dieser Information aufgeklärt wurde.

- den Prüfarzt unverzüglich informieren werde, falls unerwartete oder ungewöhnliche Symptome während der Studie auftreten.

- alle Fragen zu meiner vollen Zufriedenheit beantwortet habe.
- eine schriftliche Probandeninformation, sowie eine Kopie der Einwilligungserklärung erhalten habe.
- dem Prüfarzt alle meine früheren oder aktuellen Krankheiten und Medikamenteneinnahmen sowie Arztbesuche innerhalb des letzten Monats vor der Studie mitgeteilt habe.
- mit den Prüfungsbedingungen einverstanden bin.
- über den zeitlichen Ablauf informiert worden bin.

- über jede Einnahme oder Verabreichung von Medikamenten in der Zeit der Studie den Prüfarzt unterrichten werde.

- vom Abs. 9.4. zum Datenschutz in Kenntnis gesetzt wurde und mit der dort dargestellten Vorgehensweise einverstanden bin.

Zu dem habe ich das Recht diese Studie jederzeit auch ohne Angabe von Gründen und ohne nachteile zu beenden. Sollte ich von diesem Recht gebrauch machen, erkläre ich mich aus Gründen der eigenen Sicherheit bereit eventuell eine ärztliche Abschlussuntersuchung vornehmen zu lassen.

Ort und Datum

Unterschrift (Proband)

Hiermit bestätige ich, dass ich persönlich Art, Ziel, Dauer, vorhersehbare Risiken und Wirkung der Studie dem oben genannten Probanden erklärt habe.

Ort und Datum

Unterschrift (aufklärender Arzt)

Studiengang Kosmetik und Körperpflege (FB 13)



Univ.-Prof. Dr. med. Martina Kerscher Dr. med. Tilmann Reuther Dr. med. Stefanie Williams Maren Kemper

UHH • Fachbereich Chemie • Von-Melle-Park 8 • 20146 HAMBURG



Universität Hamburg Tel. 040-42838-5963 • Fax 040-42838-527

Prüfplan (Studienprotokoll)

"Untersuchungen der epidermalen Oberflächenbeschaffenheit, sowie der epidermalen Barriere und deren Beeinflussung durch Zigarettennebenstrom, von Nichtrauchern."

Studienprotokoll:

"Untersuchungen der epidermalen Oberflächenbeschaffenheit, sowie der epidermalen Barriere und deren Beeinflussung durch Zigarettennebenstrom, bei Nichtrauchern."

Versuchsdurchführung: Datum: ____ Proband: Name, Vorname Probanden Nr: Geburtsdatum: Phototyp: _ Ungefähre Anzahl an Sonnenbränden: Anzahl der Solariumbesuche/Jahr:_____ Raucher/Nichtraucher: _____ Zigaretten/Tag:_____ ____ Zeitraum des Zigarettenkonsums:_____ Gruppe: _____ Allgemeine Fragen: Ernährungsgewohnheiten: 1-3 Alkoholkonsum: 1-4 Kaffeekonsum: 1-3 Tägliche Flüssigkeitszufuhr: 1-2 Freiluftaufenthalt 1-3 Sportgewohnheiten: 1-3 Hautpflege: 1-3 Letzter Zeitpunkt des Eincremen (Arm): 1-10 Durchführung: Tag 0: Ausführliche Aufklärung,

Randosimierung der Unterarme.

Untersuchung des einen Unterarmes mit Hilfe biophysikalischer Meßmethoden in jeweils festgelegten Arealen (unterteilt in jeweils acht Areale A1, A2, B1, B2, C1 und C2 mit einer Größe von ca. 2 cm x 2 cm). Es ist darauf zu achten, dass die entsprechenden Parameter immer in den gleichen Arealen gemessen werden.

Untersuchungen der Lipidperoxidkonzentration finden an dem anderen Unterarme statt, durch rauswaschen der Lipidperoxide mit Ethanol.

Die zu untersuchende biophysikalischen Parameter werden an dem einen Unterarm in der aufgeführten Reihenfolge gemessen:

Untersuchung 1:

- 1. Hautoberflächen pH-Wert
- 2. Stratum Corneum Hydratation
- 3. Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)
- 4. Sebumetrie
- 5. Hauttopografie (Visioscan)
- 6. Hautelastizität (Cutometer)

an dem anderem Unterarm werden mit jeweils 1 ml an 6 Stellen Lipidperoxide herausgewaschen, um anschließend im Labor die Konzentration zu bestimmen.

Anschließende Zigarettennebenstromexposition der Unterarme für 15 min. und erneute Bestimmung sämtlicher Parameter:

Untersuchung 2:

- 1. Hautoberflächen pH-Wert
- 2. Stratum Corneum Hydratation
- 3. Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)
- 4. Sebumetrie
- 5. Hauttopografie (Visioscan)
- 6. Hautelastizität (Cutometer)

am anderen Unterarm herauswaschen der Lipidperoxide.

Wiederholung dieser Untersuchungen nach 6 h

Untersuchung 3:

- 1. Hautoberflächen pH-Wert
- 2. Stratum Corneum Hydratation
- 3. Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)
- 4. Sebumetrie
- 5. Hauttopografie (Visioscan)
- 6. Hautelastizität (Cutometer)

am anderen Unterarm herauswaschen der Lipidperoxide

und nach 24 h:

Untersuchung 4:

- 1. Hautoberflächen pH-Wert
- 2. Stratum Corneum Hydratation
- 3. Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)
- 4. Sebumetrie
- 5. Hauttopografie (Visioscan)
- 6. Hautelastizität (Cutometer)

am anderen Unterarm herauswaschen der Lipidperoxide

Untersuchung 1:

Randomisierung der Unterarme:

Rechter Unterarm: 0 - 0,5

Linker Unterarm: 0,5 - 1,0

Vor Zigarettennebenstromexposition

Areal	pН	TEWL	Stratum Corneum Hydratation	Sebumetrie	Hauttopografie	Elastizität
A1						
A2						
B1						

B2			
C1			
C2			

an dem anderem Unterarm werden mit jeweils 1 ml an 6 Stellen Lipidperoxide herausgewaschen

Untersuchung 2:

nach 15 min. Zigarettennebenstromexposition:

Areal	pН	TEWL	Stratum Corneum Hydratation	Sebumetrie	Hauttopografie	Elastizität
A1						
A2						
B1						
B2						
C1						
C2						

an dem anderem Unterarm werden mit jeweils 1 ml an 6 Stellen Lipidperoxide herausgewaschen

Untersuchung 3:

6 h nach Exposition

Areal	pН	TEWL	Stratum Corneum Hydratation	Sebumetrie	Hauttopografie	Elastizität
A1						
A2						
B1						
B2						
C1						
C2						

an dem anderem Unterarm werden mit jeweils 1 ml an 6 Stellen Lipidperoxide herausgewaschen

Untersuchung 4

24 h nach Exposition

Areal	pН	TEWL	Stratum Corneum Hydratation	Sebumetrie	Hauttopografie	Elastizität
A1						
A2						
B1						
B2						
C1						
C2						

an dem anderem Unterarm werden mit jeweils 1 ml an 6 Stellen Lipidperoxide herausgewaschen

Die Ergebnisse werden miteinander verglichen und ausgewertet.

Studiengang Kosmetik und Körperpflege (FB 13)



Univ.-Prof. Dr. med. Martina Kerscher Dr. med. Tilmann Reuther Dr. med. Stefanie Williams Maren Kemper

Tel. 040-42838-5963 • Fax 040-42838-5277



UHH • Fachbereich Chemie • Von-Melle-Park 8 • 20146 HAMBURG

Prüfplan (Studienprotokoll)

"Vergleich der Lipidkonzentration und der epidermalen Oberflächenbeschaffenheit von Rauchern und Nichtrauchern in den verschiedenen Altersgruppen und Geschlechtern."

Studienprotokoll:

"Vergleich der Lipidkonzentration und der epidermalen Oberflächenbeschaffenheit von Rauchern und Nichtrauchern in den verschiedenen Altersgruppen und Geschlechtern."

Versuchsdurchführung:	Datum:
Proband: Name, Vorname	
	Probanden Nr:
	Geburtsdatum:
	Phototyp:
	Ungefähre Anzahl an Sonnenbränden:
	Anzahl der Solariumbesuche/Jahr:
	Raucher/Nichtraucher:
	Zigaretten/Tag:
	Zeitraum des Zigarettenkonsums:
	Gruppe:
Abfragen der Lebensgewohnheiten:	
Ernährungsgewohnheiten: 1-3	
Alkoholkonsum: 1-4	
Kaffeekonsum: 1-3	
Tägliche Flüssigkeitszufuhr: 1-2	
Freiluftaufenthalt 1-3	
Sportgewohnheiten: 1-3	

Hautpflege: 1-3

Letzter Zeitpunkt des Eincremen (Arm): 1-10

Tag 0: Ausführliche Aufklärung,

Randosimierung der Unterarme.

Untersuchung des einen Unterarmes mit biophysikalische Meßmethoden in jeweils festgelegten Arealen (unterteilt in jeweils acht Areale A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 und D2 mit einer Größe von ca. 2 cm x 2 cm). Es ist darauf zu achten, dass die entsprechenden Parameter immer in den gleichen Arealen gemessen werden.

Untersuchung der Lipidperoxidkonzentration findet an dem anderen Unterarme statt, indem die Lipidperoxide mit Ethanol herrausgewaschen werden.

Die zu untersuchende biophysikalischen Parameter werden an dem einen Unterarm in der aufgeführten Reihenfolge gemessen:

Untersuchung 1:

1.Hautoberflächen pH-Wert

2. Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)

- 3. Stratum Corneum Hydratation
- 4. Sebumetrie
- 5. Hauttopografie (Visioscan)
- 6. Hautelastizität (Cutometer)

an dem anderem Unterarm werden mit jeweils 1 ml an 6 Stellen Lipidperoxide herrausgewaschen, um anschließend im Labor die Konzentration zu bestimmen.

Untersuchung 1:

Randomisierung der Unterarme

Rechter Unterarm 0 – 0,5

Linker Unterarm: 0,5 – 1,0

Areal	pН	TEWL	Stratum	Sebumetrie	Hauttopografir	Elastizität
			Corneum			
			Hydratation			
			riyuratation			
A1	Х					
A2				x		
D1						
ы			x			
B2		x				
C1					x	
C2						х

Veröffentlchungen

- Williams S, Kemper M, Kraus D, Reuther T, Kerscher M (2002) Cutaneous lipid contend hydration and pH of human face. World congress of dermatology
 P0472
- Williams S, Kemper M, Kraus D, Reuther T, Kerscher M (2002) Influence of different O/W emollients on acute UV-damage. World congress of dermatology - P1877
- Williams S, Kemper M, Kraus D, Reuther T, Kerscher M (2002) No relation between hydration of human epidermis and erythema response to UVB-light. World congress of dermatology - P1878
- 4. Neugebauer O, Reuther T, Kemper M, Kerscher M (2004) Influence of side stream cigarette smoke exposure on skin surface pH. European Academy of Dermatology and Venerology Florence November
- Reuther T, Kemper M, Kerscher M (2005) Assessment of acute effects of sidestream cigarette smoke on HaCaT-keratinocytes in vitro. ADF-Tagung 2005 - P250
- Reuther T, Kemper M, Kerscher M (2006) Analysis of skin roughness in smoking and non-smoking volunteers. Journal of American Academy of Dermatology - P202
- Neugebauer O, Reuther T, Kemper M, Kerscher M (2006) Einfluss von Zigarettennebenstromqualm auf den pH-Wert der Hautoberfläche. GD Gesellschaft dermatopharmazie

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die an der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt gewesen sind. Mein ganz besonderer Dank gilt hierbei Prof. Steinkraus nicht nur für die Herstellung des Kontaktes zur Arbeitsgruppe Prof. Kerscher, sondern vielmehr für seine stetige und besonders großzügige Unterstützung.

Frau Prof. Kerscher danke ich für die Überlassung des spannenden Themas, Dr. Reuther für die interessanten Einführungen in die Welt der Dermatologie und Dr. Williams für die immerwährende Diskussionsbereitschaft.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Prof. Kerscher und des Dermatologikums Hamburg für die freundliche und sehr angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken, durch die mir das Arbeiten große Freude bereitet hat.

Ein weiterer großer Dank für die liebevollste Kinderbetreuung, die man sich wünschen kann und ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht durchzuführen gewesen wäre, gilt meinem Mann André Kemper sowie meinen Schwiegereltern Elke und Wulf Kemper.

Last but not least möchte ich mich bei meiner allerbesten Freundin Manuela Böhm und der von Andreas eingerichteten Flatrate bedanken; so wurde Berlin nach Hamburg gelegt und ich hatte nicht nur einen Diskussionspartner, sondern wurde auch stetig zum Durchhalten angehalten.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Maren Kemper (geb. Beutler)
Geburtsdatum, -ort	29.10.1971, Halle/Saale
Familienstand	verheiratet, zwei Kinder

Schulbildung

Grundschule Steilshoop, Hamburg
Grundschule Würm, Pforzheim
Orientierungsstufe, Stade
Gymnasium Loxstedt
Euregiogymnasium, Bocholt
Abitur

Studium

1990-1996

August 1996 1996-Ende 1997

Promotion

Seit 2001

Freie Universität Berlin Diplomabschluss Studium der Betriebswirtschaft, Freie Universität Berlin

Studium der Biochemie,

Promotion am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg, Abteilung Kosmetik und Körperpflege Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass gegen mich weder gerichtliche Vorstrafen vorliegen, noch staatsanwaltliche Ermittlungen oder Disziplinarverfahren anhängig sind.

Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass ich bisher keine andere Arbeit zur Promotion eingereicht noch mit einer anderen Arbeit den Versuch zur Promotion unternommen habe.

Hamburg, den 05. Januar 2007