Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Dermatologie und Allergologie
Ärztliche Direktorin: Prof. Dr. med. Karin Scharffetter-Kochanek

Antioxidative Verteidigung und phototoxische Schädigung der Haut nach UVA-Bestrahlung *in vivo*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Katharina Raizner
Ulm
2016

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Lars Alexander Schneider

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Huber-Lang

Tag der Promotion: 14.06.2018

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS I

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS III

1. EINLEITUNG 1

1.1 UV-STRAHLUNG 1
1.2 EFFEKTE DER UV-STRAHLUNG AUF DIE MENSCHLICHE HAUT 2
1.3 MECHANISMEN DER SCHÄDIGUNG DURCH UV-STRAHLUNG 8
1.4 VERTEIDIGUNGSSTRATEGIEN DER HAUT 13
1.5 FRAGESTELLUNGEN UND ZIELE DER ARBEIT 19

2. MATERIAL UND METHODEN 21

2.1 PROBANDENREKRUTIERUNG 21
2.2 LICHTTESTUNG 22
2.3 GEWINNUNG DER HAUTPROBEN 24
2.4 HERSTELLUNG EINES GEWEBELYSATES AUS DEN HAUTPROBEN 25
2.5 BESTIMMUNG DES GESAMTPROTEINGEHALTS NACH BRADFORD 26
2.6 AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DER CU/ZN SOD 27
2.7 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER CU/ZN SOD 29
2.8 GEWINNUNG VON SAUGBLASENFLÜSSIGKEIT ZUR BESTIMMUNG VON 8-HYDROXYDESOXYGUANOSIN (8-OHDG) 30
2.9 BESTIMMUNG DES 8-ISOPROSTAN GEHALTES 33
2.10 STATISTISCHE AUSWERTUNG 35

3. ERGEBNISSE 36

3.1 AUSWERTUNG DER LICHTTESTUNG 36
3.2 BESTIMMUNG DES GEHALTES AN CU/ZN SOD IN UNBESTRAHLTER HAUT 44
3.3 UNTERSUCHUNG DER INTRA-ASSAY VARIANZ 45
3.4 AKTIVITÄT DER CU/ZN SOD NACH EINER UVA-BESTRAHLUNG MIT EINER ZEITKINETIK 47
3.5 AKTIVITÄT DER CU/ZN SOD NACH EINER UVA-HOCHDOSISBESTRAHLUNG 48
3.6 8-OHDG GEHALT IN EINER SAUGBLASENFLÜSSIGKEIT NACH EINER UVA-BESTRAHLUNG 50
3.7 8-ISOPROSTAN KONZENTRATION NACH EINER UVA-BESTRAHLUNG MIT EINER ZEITKINETIK 55

3.8 8-ISOPROSTAN KONZENTRATION NACH EINER UVA-BESTRAHLUNG MIT EINER DOSISKINETIK **56**

4. DISKUSSION **59**

5. ZUSAMMENFASSUNG **70**

6. LITERATURVERZEICHNIS **71**

DANKSAGUNG **79**

LEBENSLAUF **80**

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AP-Endonuklease	apurinische/apyrimidinische-Endonuklease
C	Cytosin
cGPX	zytosolische Glutathion-Peroxidase
CPD	Cyclobutan-Pyrimidindimere
Cu/Zn SOD	Kupfer-Zink-Superoxiddismutase
DETAPAC	Diethylenetriaminepentaacetic Acid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ecCu/Zn SOD	extrazellulär vorkommende Kupfer-Zink-Superoxiddismutase
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Fe^{2+}	zweiwertiges Eisen
Fe^{3+}	dreiwertiges Eisen
G	Guanin
giGPX	gastrointestinale Glutathion-Peroxidase
GSH	Glutathion
GSSG	zwei Moleküle Glutathion über eine Disulfidbrücke verbunden
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes
HCl	Chlorwasserstoff
$HO^{\cdot}$	Hydroxylradikal
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
ICAM-1	intercellular Adhesion Molecule 1
Ig G	Immunglobulin G
IL-10	Interleukin-10
IPD	immediate pigmentation dose, Sofortpigmentierungsschwelle
J	Joule, SI-Einheit der Energie
K	Kalibrator

KP_i	Kaliumphosphatpuffer
MDA	Malondialdehyd
MHC	Major Histocompatibility Complex, Oberflächen-protein, an der Antigenpräsentation beteiligt
mJ	Millijoule, 1 mJ = 10^{-3} Joule
Mn SOD	Mangan-Superoxiddismutase
NaCl	Kochsalz
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, Coenzym
NaOH	Natronlauge
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
nm	Nanometer, 1 nm = 10^{-9} Meter
8-OHdG	8-Hydroxydesoxyguanosin
O_2	Sauerstoff
$O_2^{\cdot -}$	Superoxidanion
phGPX	Phospholipidhydroperoxid-Glutathion-Peroxidase
6-4 PP	Pyrimidin(6-4)Pyrimidon-Photoprodukte
PPD	persistent pigmentation dose, verzögerte Pigmentierungsschwelle
PUVA	Psoralen plus UVA
RE	relative Einheit
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPM	revolutions per minute
SI	Internationales Einheitensystem
snGPX	sperm nucleus Glutathion-Peroxidase
SOD	Superoxiddismutase
T	Thymin
T-C	Pyrimidin(6-4)Pyrimidon-Photoprodukt, bestehend aus Thymin und Cytosin
T=C	Cyclobutan-Pyrimidindimer, bestehend aus Thymin und Cytosin
TFIIH	Transkriptionsfaktor IIH
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha

T-T	Pyrimidin(6-4)Pyrimidon-Photoprodukt, bestehend aus zwei Basen Thymin
T=T	Cyclobutan-Pyrimidindimer, bestehend aus zwei Basen Thymin
U	Unit, Aktivitätseinheit
UV	ultraviolett
UVA	ultraviolett A
UVB	ultraviolett B
UVC	ultraviolett C

1. Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den photochemischen Effekten von langwelligen ultravioletten Strahlen auf die menschliche Haut *in vivo*.
Eine chronische UV-Exposition wird mit Hautkrebsentstehung und Photoalterung der Haut in Zusammenhang gebracht (Scharffetter-Kochanek et al. 2000 & Hönigsmann and Diepgen 2005). Die UV-Strahlung stellt damit die bedeutendste exogene Noxe der Haut dar.

1.1 UV-Strahlung

Die UV-Strahlung ist eine elektromagnetische Strahlung. Ihre wichtigste natürliche Quelle ist die Sonne, die sowohl die UV-Strahlung (Wellenlängenbereich: 100 nm bis 400 nm) als auch das sichtbare Licht (Wellenlängenbereich: 400 nm bis 760 nm) und die Infrarotstrahlung (Wellenlängenbereich: 760 nm bis 1 mm) emittiert.
Die UV-Strahlung hat einen Anteil von 6 % an der gesamten solaren Strahlung. Sie wird unterteilt in:

- Langwellige UVA-Strahlung 320 nm bis 400 nm: weitere Unterteilung in
  UVA1-Strahlung 340 nm bis 400 nm und
  UVA2-Strahlung 320 nm bis 340 nm
- Mittelwellige UVB-Strahlung 290 nm bis 320 nm
- Kurzwellige UVC-Strahlung 200 nm bis 290 nm
- Ultrakurzwellige UV-Strahlung 100 nm bis 200 nm

Die biologische Wirksamkeit korreliert mit der Wellenlänge. Je kürzer die Wellenlänge desto energiereicher ist die Strahlung. Eine kurzwellige, energiereiche Strahlung hat damit auch das höchste Potenzial einen Schaden in der Haut hervorzurufen.

Durch die Atmosphäre wird ein Teil der Strahlung gefiltert, so dass nicht die ganze UV-Strahlung die Erdoberfläche erreicht.

Die sehr energiereiche UVC-Strahlung spielt auf der Erdoberfläche keine Rolle, da sie in der Stratosphäre (zwischen 7 km und 17 km bis 50 km über Meereshöhe) durch die Ozonschicht gefiltert wird.
Die UVB-Strahlung wird auch, aber nur teilweise, in Abhängigkeit vom Zustand der Ozonschicht gefiltert. So erreichen bei intakter Ozonschicht nur etwa 5 % der solaren UVB-Strahlung die Erdoberfläche, dieser Anteil vergrößert sich je nach Defekt der Ozonschicht (Narayanan et al. 2010).
Von der langwelligen UVA-Strahlung erreichen circa 95 % die Erdoberfläche, woraus man folgern kann, dass es sich bei der UVA-Strahlung um eine biologisch bedeutsame Noxe handelt (Ibrahim and Brown 2008).
Unabhängig davon wird die Intensität der UV-Strahlung und somit deren photobiologische Wirkung durch Parameter wie Breitengrad, Höhe über dem Meeresspiegel, Jahreszeit, Dicke der Ozonschicht, Vorhandensein von Nebel, Dunst, Schmutzpartikel, usw. beeinflusst. So ist zum Beispiel die UV-Strahlung im Bereich des Äquators höher als in unseren Breitengraden (Madronich et al. 1998 & Narayanan et al. 2010).

In Abhängigkeit der Wellenlänge der einzelnen Strahlenarten dringen diese unterschiedlich tief in die menschliche Haut ein. Die langwelligen UVA-Strahlen erreichen zu 19 % bis 50 % das Stratum basale, wo sich die Melanozyten befinden, und tiefere Schichten der Dermis. Die UVB-Strahlen erreichen nur zu 9 % bis 14 % das Stratum basale und tiefer gelegene Hautschichten (Wang et al. 2001).

1.2 Effekte der UV-Strahlung auf die menschliche Haut

Die menschliche Haut ist der UV-Strahlung als Grenzorgan stark ausgesetzt. Die Auswirkungen der UV-Strahlung auf die Haut sind sowohl positiver Natur, zum Beispiel durch die Beteiligung der UVB-Strahlung an der Biosynthese von Vitamin D, welchem eine antikanzerogene Schutzwirkung zugesprochen wird (Chiang und Chen 2013), als auch negativer Natur wie in Form von Sonnenbrand, Hautalterung und Photokarzinogenese (Scharffetter-Kochanek et al. 2000 & Narayanan et al. 2010).

Jedoch reagiert jeder Mensch in Abhängigkeit von der individuellen Sonnenempfindlichkeit unterschiedlich auf die UV-Strahlung.

1.2.1 Hauttypen nach Fitzpatrick

Bereits 1975 etablierte der amerikanische Dermatologe T. B. Fitzpatrick ein Schema zur Einteilung der Haut, die Hauttypen nach Fitzpatrick, um ursprünglich bei hellhäutigen Menschen die initiale UVA-Dosis bei der neu entwickelten PUVA-Therapie besser abschätzen zu können.
Initial erfolgte eine Einteilung in vier Gruppen, Hauttyp I bis Hauttyp IV, anhand der Hautreaktion, das heißt die Sonnenbrandneigung und Fähigkeit eine Bräune zu entwickeln, auf eine erst- und einmalige Sonnenexposition im Frühsommer in den nördlichen Breitengraden.
Im weiteren Verlauf wurde dieses Schema noch mit den Hauttypen V und VI für dunkelhäutige Menschen ergänzt (Fitzpatrick 1988).
Die einzelnen Hauttypen sind wie folgt gekennzeichnet:

Tab. 1: Klassifikation der Hauttypen nach Fitzpatrick
Hautreaktion nach einer einmaligen und erstmaligen Sonnenexposition im Frühsommer in den nördlichen Breiten (Fitzpatrick 1988). Die Tabelle wurde erstellt anhand einer Tabelle aus dem Buch „Dermatologie und Venerologie“ von Prof. Dr. med. O. Braun-Falco, Prof. Dr. med. G. Plewig, Prof. Dr. med. H. H. Wolff, Prof. Dr. med. H. C. Burgdorf und Prof. Dr. med. M. Landthaler, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 5. Auflage, 2005.

Hauttyp	Entwicklung eines Erythems	Entwicklung einer Bräune
I	immer	nie
II	immer	gelegentlich
III	gelegentlich	immer
IV	nie	immer
V	Dunkelhäutige Menschen wie Mittelmeerbewohner, Mexikaner, usw.	
VI	Schwarze	

Darüber hinaus gibt es auch noch konstitutionelle Merkmale, welche die einzelnen Hauttypen unterscheiden:

- Hauttyp I: ist meist gekennzeichnet durch sehr helle, extrem empfindliche Haut, Sommersprossen, eine helle Augenfarbe und rotblondes Haar
- Hauttyp II: ist meist gekennzeichnet durch helle, empfindliche Haut, häufig Sommersprossen, eine helle Augenfarbe und helles/blondes Haar
- Hauttyp III: ist meist gekennzeichnet durch mittelhelle Haut, eine helle oder auch dunkle Augenfarbe und braunes Haar
- Hauttyp IV: ist meist gekennzeichnet durch bräunliche Haut, eine dunkle Augenfarbe und dunkelbraunes bis schwarzes Haar
- Hauttyp V: ist meist gekennzeichnet durch dunkle Haut, eine dunkle Augenfarbe und schwarzes Haar
- Hauttyp VI: ist meist gekennzeichnet durch schwarze Haut, eine dunkle Augenfarbe und schwarzes Haar

Zwischen den einzelnen Hauttypen herrscht jedoch ein fließender Übergang, eine strenge Einteilung auch anhand der Merkmale kann daher nicht erfolgen.
Insbesondere die Hauttypen I und II werden mit einem erhöhten Risiko der Entstehung von Melanomen und anderen Hauttumoren in Verbindung gebracht (Sachdeva 2009).

1.2.2 UVB-vermittelte akute Entzündungsreaktion

Eine der häufigsten akuten, sichtbaren Auswirkungen von UV-Strahlung ist der Sonnenbrand (Dermatitis solaris). Die UVB-Strahlen haben dabei den größten Anteil an der Entstehung, jedoch auch die UVA-Strahlung trägt zur Entstehung der Dermatitis solaris bei (Young et al. 2010).
Die Dermatitis solaris tritt mit einer Latenzzeit von einer Stunde bis sechs Stunden nach einer UVB-Exposition in dem bestrahlten Hautareal auf. Die UVB-Strahlen dringen bis in die obere Dermis ein und verursachen dort und in der Epidermis eine akute Entzündungsreaktion mit Rötung, Überwärmung, Schmerz-

empfindlichkeit und Ausbildung eines Ödems. In schweren Fällen kann es auch zur Blasenbildung kommen.
Die Ausbildung eines Sonnenbrandes ist von vielen Faktoren abhängig. Dazu gehören der Hauttyp nach Fitzpatrick, der Wassergehalt der Haut, das Alter, Ort der betroffenen Haut, Hautdicke, Wellenlänge und -dosis, geographische Faktoren wie Breitengrad und Längengrad, Reflektion der Umgebung (Schnee reflektiert 80 % der UV-Strahlen, Sand dagegen nur 20 %) und Faktoren des Wetters wie zum Beispiel Wind und Temperatur (Scharffetter-Kochanek et al. 2000).

1.2.3 Pigmentierung

Eine weitere akute Reaktion der Haut auf die UV-Strahlung ist die Pigmentierung. Dabei unterscheidet man:

- Sofortpigmentierung (IPD, immediate pigmentation dose)
  Bereits während einer UVA-Exposition kommt es zu einer Sofort-pigmentierung durch sauerstoffabhängige Photooxidation des bestehenden Melanins und durch räumliche Neuanordnung der Melanosomen in den Keratinozyten und Melanozyten.
  Die Sofortpigmentierung ist instabil und verschwindet innerhalb weniger Stunden (Routaboul et al. 1999). Im Gegensatz zur Spätpigmentierung wird kaum photoprotektive Wirkung ausgebildet (Hönigsmann et al. 1986).

- Spätpigmentierung (PPD, persistent pigmentation dose)
  Sie ist die eigentliche als Sonnenbräune sichtbare Pigmentierung. Stimuliert durch UVA- und UVB-Strahlen produzieren die Melanozyten vermehrt Melanin, welches in den Keratinozyten eingelagert wird. Durch Absorption von Photonen schützt das eingelagerte Melanin das Genom vor direkten Schäden durch die UV-Strahlung. Darüber hinaus kommt es zu einer Verdickung des Stratum basale und der Epidermis. Beide Mechanismen tragen nach drei bis fünf Tagen zur photoprotektiven Wirkung der Spätpigmentierung bei (Matsumura und Ananthaswamy 2004 & Ibrahim und Brown 2008).

1.2.4 Lichtschwiele

Ein weiterer Photoadaptationsmechanismus stellt die so genannte „Lichtschwiele“ dar. Auf eine wiederholte (2- bis 3-wöchige) UV-Exposition reagiert die Epidermis mit einer Hyperkeratose und einer Akanthose. Diese Schutzreaktion wird vor allem durch UVB-Strahlen verursacht und vermindert so die UV-Penetration in die unteren Hautschichten (Lee et al. 2002).

1.2.5 Immunsuppression

Sowohl UVA- als auch UVB-Strahlung können zu einer lokalen und systemischen Immunsuppression führen, was bereits am Tiermodell und am Menschen gezeigt werden konnte (Katiyar 2007).
Die Beeinflussung des Immunsystems erfolgt über mehrere unterschiedliche Mechanismen. So führt eine UV-Exposition, insbesondere UVB, zu einer Inhibition der Antigenpräsentation durch Langerhans-Zellen, indem diese funktionell und morphologisch verändert werden. Diese funktionelle und morphologische Veränderung umfasst die Inhibition der Expression von MHC Klasse II Molekülen auf deren Oberfläche und eine verminderte Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, was zu einer Inhibition der Interaktion mit T-Zellen führt und somit zu einer fehlenden Immunantwort auf ein Antigen (Schwarz 2005 & Katiyar 2007).
Des Weiteren führen UV-induzierte DNA-Schäden, vor allem in Form der Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPDs), zu einer Migration der Antigen-präsentier-enden Zellen in die lokalen Lymphknoten, wodurch sich deren Anzahl in der Haut verringert (Schwarz 2005 & Katiyar 2007).
Darüber hinaus führt eine UV-Exposition zur Expression von regulatorischen T-Zellen, welche unter anderem durch Freisetzung von immunsuppressiv-wirkenden Zytokinen wie IL-10 zu einer systemischen Immunsuppression führen (Rivas und Ullrich 1994 & Schwarz 2005).
Diese immunmodulatorischen Effekte der UV-Strahlung macht man sich zum Beispiel bei der Therapie von entzündlichen Hauterkrankungen wie der atopischen Dermatitis zu Nutze.

1.2.6 Hautalterung

Beim Prozess der Hautalterung unterscheidet man zwei verschiedene Alterungsprozesse (Scharffetter-Kochanek et al. 2000).

Die intrinsische Hautalterung entspricht dem normalen Alterungsprozess. Dabei kommt es zu einer Atrophie von Dermis und Epidermis, welche zu einer Abnahme der Hautdicke führt. Die Haut erscheint ebenmäßig, blass und weist ein feines Faltenrelief auf (Gonzaga 2009).

Die extrinsische Hautalterung wird auch als Photoaging bezeichnet. Dieser Alterungsprozess wird durch UV-Strahlung ausgelöst und ist abhängig vom Ausmaß der UV-Exposition (Fisher et al. 2002). Photoaging ist lediglich in Hautarealen, welche dem Sonnenlicht ausgesetzt waren, wie Nacken, Dekolleté, Gesicht, Unterarme und Hände, zu finden (Berneburg et al. 2000).

Das Hauterscheinungsbild ist gekennzeichnet durch ein grobes Faltenrelief, verminderte Elastizität, erhöhte Fragilität, Blasenbildung, unregelmäßige Pigmentierung, eine erschwerte Wundheilung und Teleangiektasien (Berneburg et al. 2000 & Scharffetter-Kochanek et al. 2000). Diese klinischen Veränderungen beruhen hauptsächlich auf einer Schädigung der dermalen extrazellulären Matrix, bestehend aus Kollagen und Elastin, in Form einer Elastose und eines Verlustes an kollagenen Fasern, hervorgerufen durch eine Aktivierung und vermehrte Synthese von Matrix-Metalloproteasen. Des Weiteren findet sich in Licht-gealterter Haut eine basophile Degeneration von kollagenen Fasern, eine vermehrte Ablagerung von Glykosaminoglykanen und dystrophem, elastotischem Material (Berneburg et al. 2000 & Scharffetter-Kochanek et al. 2000).

Neben diesen Veränderungen ist auch die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies und freien Radikalen ein entscheidender Bestandteil des Photoagings. Insbesondere auf Licht-gealterter Haut kann es zu einer Photokarzinogenese kommen.

1.2.7 Photokarzinogenese

Die UV-Strahlung hat sowohl eine mutagene als auch eine zytotoxische Wirkung und stellt daher eine der Hauptgründe für Hautkrebsentstehung dar (Armstrong und Kricker 2001, Hussein 2005 & Emanuele et al. 2014).
Insbesondere der UVB-Strahlung wurde auf Grund ihres höheren Energiegehaltes eine karzinogene Wirkung zugesprochen, jedoch wurde in den letzten Jahren auch die Rolle der UVA-Strahlung an der Photokarzinogenese näher erforscht (Tewari et al. 2012).
So demonstrierten de Gruijl et al. bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen sowohl eine Beteiligung von UVB- als auch von UVA1-Strahlung. Dies wurde in der Arbeit von Huang et al. bestätigt, indem er zeigte, dass sogar mehr UVA-Mutationen als UVB-Mutationen an der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen beteiligt sind (de Gruijl et al. 1993 & Huang et al. 2009).
Die detaillierten Mechanismen der Photokarzinogenese werden in den folgenden Kapiteln erläutert.

1.3 Mechanismen der Schädigung durch UV-Strahlung

1.3.1 Phototyp-1- und Phototyp-2-Reaktion

Bei den durch UV-Strahlen ausgelösten Erbgutveränderungen, welche zur Karzinogenese führen können, unterscheidet man zwei verschiedene Reaktionstypen.
Die Phototyp-1-Reaktion, bei der es zu einer direkten Schädigung der DNA kommt, wird vor allem durch UVB-Strahlung aber auch zu einem geringeren Anteil durch UVA-Strahlung verursacht (Tewari et al. 2012).
Die Energie der Strahlung wird direkt von der DNA absorbiert, dabei entsteht im Falle von UVB vor allem Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD). Dabei bildet sich zwischen dem Kohlenstoffatom 5 und 6 beider Basen, unter Formation eines Cyclobutanringes, eine kovalente Bindung aus (T=T und T=C). Des Weiteren kommt es zur Bildung von Pyrimidin(6-4)Pyrimidon-Photoprodukten (6-4 PP). In diesem Fall entsteht zwischen dem Kohlenstoffatom in Position 6 und dem Kohlenstoffatom in Position 4 von zwei benachbarten Pyrimidinen eine kovalente

Bindung (T-T und T-C) (Clingen et al. 1995). Bei der Absorption von UVA kommt es lediglich zur Entstehung von Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD), Pyrimidin(6-4)Pyrimidon-Photoprodukte (6-4 PP) werden nicht gebildet (Ikehata et al. 2008, Ichihashi et al. 2009 & Tewari et al. 2012).

Bei mangelhafter Beseitigung der CPDs und 6-4 PPs durch spezifische Reparaturmechanismen (siehe Kapitel 1.4) können die für die UV-Strahlung spezifischen „UV fingerprint“ Mutationen entstehen (Ikehata et Ono 2011). Betreffen diese Mutationen zum Beispiel das p53 Gen so spricht man von den so genannten fingerprint Mutationen, welche unter anderem auch an der Entstehung von Hauttumoren, wie dem Basaliom oder dem spinozellulären Karzinom, beteiligt sind (Ziegler et al. 1993, Brash 1997 & Hönigsmann und Diepgen 2005). Das p53-Protein, welches durch das p53-Tumorsuppressorgen kodiert wird, besitzt die Fähigkeit den Zellzyklus zu stoppen um Schäden am Genom zu beheben oder kann die Apoptose einleiten. Bei einer Mutation der p53-Gens kommt es zu einem Verlust dieser Fähigkeiten und somit zu einer unkontrollierten Proliferation von geschädigter DNA, welche letztendlich zu Tumoren führen kann (Brash et al. 1991 & Bosch et al. 2015).

Neben der Phototyp-1-Reaktion gibt es noch die Phototyp-2-Reaktion, welche andere Veränderungen am menschlichen Genom hervorruft. Bei dieser Reaktion kommt es zu einer indirekten Schädigung der DNA, verantwortlich dafür sind vor allem die langwelligen UVA-Strahlen.

Der Mechanismus ist folgender: Die UV-Strahlung wird von organischen Chromophoren, wie Porphyrine, Flavine, Quinone und andere absorbiert (Klotz et al. 2001). Über direkten Elektronentransfer mit Abspaltung von Wasserstoff oder durch die Übertragung von Energie auf molekularen Sauerstoff kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS):

- Singulett-Sauerstoff (O_2)
- Superoxidanionen ($O_2^{\cdot -}$)
- Wasserstoffperoxid (H_2O_2)
- Hydroxylradikale ($HO^{\cdot}$)

(Cunningham et al. 1985 & Svobodova et al. 2006).

Diese freien Radikale schädigen ubiquitär andere Zellbestandteile und verursachen:

- Protein-DNA-Verbindungen und DNA-Einzelstrangbrüche
- Lipidperoxidation von Zellmembranlipiden, wodurch die Zellintegrität beeinflusst werden kann (Girotti 2001)
- Proteinoxidation, was zu Enzyminaktivierung führen kann (Vile und Tyrrell 1995 & Marnett et al. 2003).

Sind die schädigenden Wirkungen der UV-Strahlung und die körpereigenen Abwehrmechanismen (siehe Kapitel 1.4) im Gleichgewicht so kompensiert der Körper die Umweltnoxe UV-Strahlung im betroffenen Hautareal.
Verschiebt sich jedoch das Gleichgewicht zugunsten der UV-generierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und der oxidativen Schädigung der Makromoleküle, so entsteht (photo)oxidativer Stress in der Haut (Sies 1991). Viel (photo)oxidativer Stress führt zu einer Akkumulation von Defekten auf molekularer Ebene, welche zu Photoaging und Photokarzinogenese führen können (Wlaschek et al. 2001 & Fisher et al. 2002).

1.3.2 Entstehung von 8-Hydroxydesoxyguanosin

Eine der häufigsten Schädigungen der nukleären und der mitochondrialen DNA durch ROS ist die oxidative Hydroxylierung von Guanin. Die Purinbase Guanin, welche ein geringes Ionisierungspotential besitzt, wird bevorzugt am Kohlenstoffatom in der C8-Position hydroxyliert, 8-Hydroxydesoxyguanosin entsteht (8-OHdG) (Svobodova et al. 2006 & Emanuele et al. 2014).

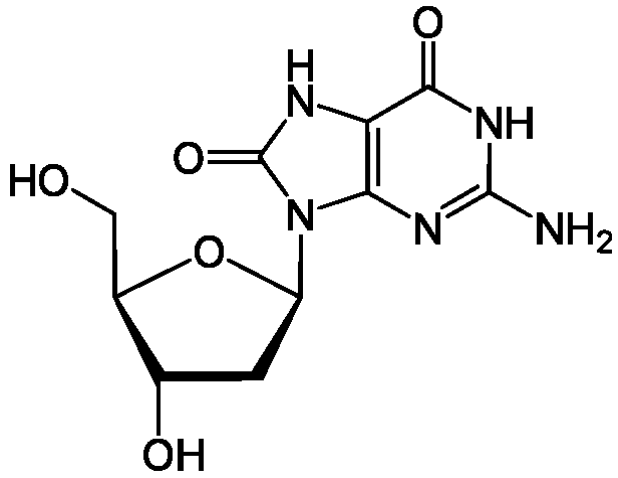

Abb. 1: Struktur des DNA-Oxidationsproduktes 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG)

8-OHdG kann dann durch eine fehlerhafte DNA-Replikation zu einer mutagen wirkenden A:T zu C:G Transversion führen (Drobetsky et al. 1995 & Huang et al. 2009). Diese führen hauptsächlich zu p53 Mutationen mit der oben genannten Bedeutung für die Entstehung von Hauttumoren.
Heute ist 8-Hydroxydesoxyguanosin als Marker für oxidativen Stress anerkannt und kann unter anderem mittels ELISA im Urin nachgewiesen werden (Wu et al. 2004).

1.3.3 Lipidperoxidation

Unter Lipidperoxidation versteht man den oxidativen Abbau von Phospholipiden und Cholesterol durch reaktive Sauerstoffspezies, welcher die Zellintegrität stört.
Ein häufiges Substrat der Lipidperoxidation ist die ubiquitär vorkommende Arachidonsäure. Sie ist ein wichtiger Bestandteil der Phospholipide in den Zellmembranen. Bei ihrer oxidativen Degradation durch das hochreaktive Hydroxylradikal ($HO^{\cdot}$) entsteht unter anderem das stabile Endprodukt 8-Isoprostan, dessen Entstehung in der Abbildung 2 dargestellt ist.
8-Isoprostan findet vor allem als Biomarker für oxidativen Stress Verwendung.

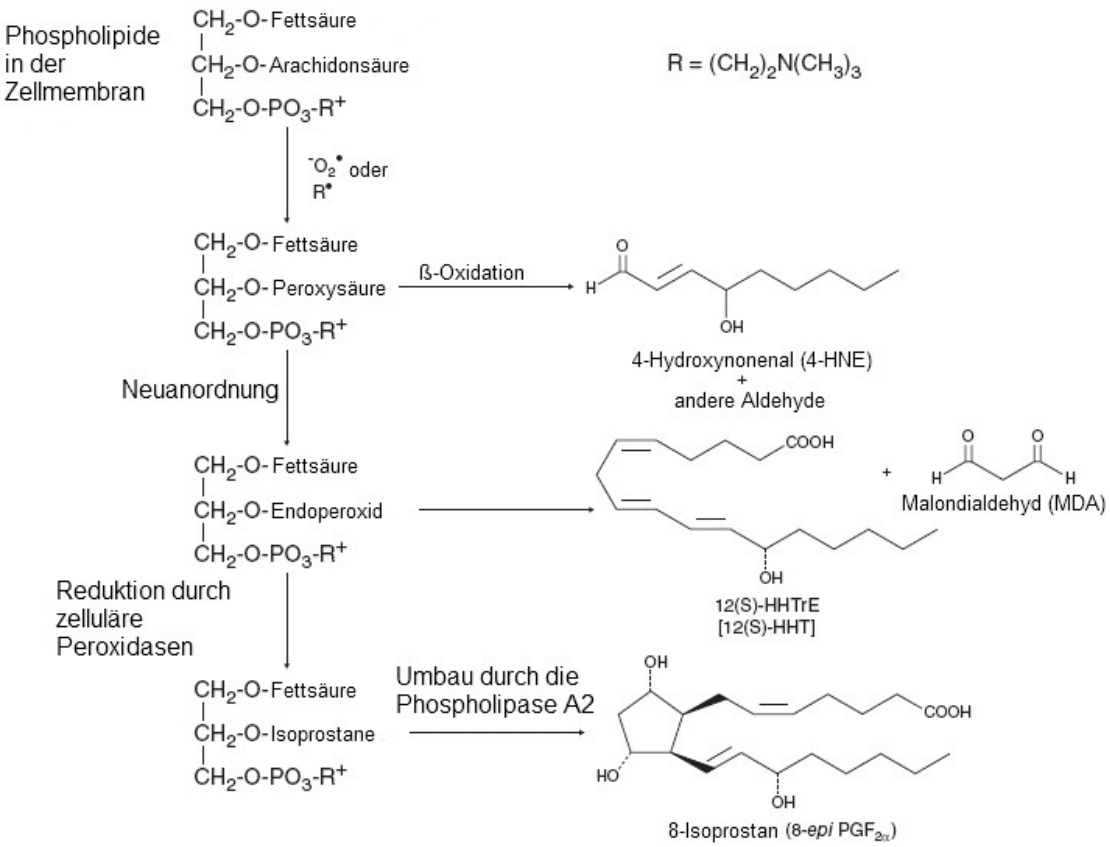

Abb. 2: Darstellung der Lipidperoxidation mit Entstehung von 8-Isoprostan

Die Arachidonsäure stellt als vierfach ungesättigte Fettsäure einen geeigneten Angriffspunkt für das hochreaktive Hydroxylradikal und andere Radikale dar.

An eine der vier Doppelbindungen der Arachidonsäure entzieht das Radikal der Arachidonsäure ein Wasserstoffatom wodurch die Arachidonsäure selbst zum Radikal wird. Durch eine Neuanordnung des Lipidgerüstes entsteht ein Endoperoxid am Arachidonsäurerest. Durch zelluläre Peroxidasen und der Phospholipase A2 wird das Endoperoxid in 8-Isoprostan umgewandelt. 8-Isoprostan stellt ein stabiles Endprodukt der Lipidperoxidation dar und wird als Biomarker für diese in der Forschung verwendet.

Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung modifiziert nach der „8-Isoprostane ELISA Kit“ Produktbeschreibung der Firma Cayman Chemicals, Ann Arbor (MI), USA.

1.4 Verteidigungsstrategien der Haut

1.4.1 Antioxidative Enzyme

Die Haut besitzt einige Schutzmechanismen um sich gegen die UV-Strahlung und deren direkte und indirekte Auswirkungen zur Wehr zu setzen. Dazu gehören die bereits erwähnte Ausbildung einer Lichtschwiele sowie die Pigmentierung.
Des Weiteren verfügt die Haut über antioxidative Enzyme, welche in einer Enzymkaskade die ROS-Bausteine koordiniert entgiften. Zu dieser Enzymkaskade gehören:

- Superoxiddismutase (SOD)
  Die SOD katalysiert die Umwandlung von Superoxidanionen ($O_2^{\cdot -}$) zu Sauerstoff (O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2):

$$2\ O_2^{\cdot -} + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

  Beim Menschen existieren drei Unterformen der SOD. Man unterscheidet die Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD), die extrazellulär vorkommende Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (ecCu/Zn SOD) und die intrazellulär vorkommende Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (Cu/Zn SOD).
  Die Mangan-Superoxiddismutase besteht aus vier identischen Untereinheiten, die je ein Mangan-Ion im Zentrum haben. Lokalisiert ist diese in der mitochondrialen Matrix (Weisiger und Fridovich 1973).
  Die Kupfer-Zink-Superoxiddismutase, welche im extrazellulären Kompartment vorkommt, ist ein Tetramer mit je einem Kupfer-Ion und einem Zink-Ion im Zentrum.
  Die im Zytosol vorkommende Kupfer-Zink-Superoxiddismutase ist ein Homodimer, welche zwei identische Untereinheiten mit je einem Kupfer-Ion und einem Zink-Ion im Zentrum besitzt.

- Katalase

  Die Katalase befindet sich überwiegend in den Peroxisomen und katalysiert dort die Umwandlung von Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff (Wlaschek et al. 2001):

  $$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

  Sie ist ein Homotetramer mit einer Hämgruppe.

- Glutathion-Peroxidase

  Die Glutathion-Peroxidasen stellen eine weitere Möglichkeit dar Wasserstoffperoxid zu detoxifizieren:

  $$2\ GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2\ H_2O$$

  Während der Reduktion des Wasserstoffperoxids, wird die SH-Gruppe des Cysteins oxidiert und es lagern sich zwei Glutathionmoleküle über eine Disulfidbrücke zusammen. Mittels der Glutathion-Reduktase wird das Glutathion unter Verbrauch von NADPH wieder regeneriert.

  Man unterscheidet fünf Subtypen der Glutathion-Peroxidase, die alle selenhaltig sind.

  Die zytosolische Glutathion-Peroxidase (cGPX) ist ein Selenocystein-haltiges Homotetramer. Sie ist in fast allen Geweben zu finden.

  Die Phospholipidhydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (phGPX) ist ein Monomer und kommt sowohl im Zytosol als auch in den Mitochondrien vor. Im Gegensatz zu den anderen Glutathion-Peroxidasen kann sie Membranen direkt vor oxidativen Schäden schützen indem sie Phospholipid- und Cholesterol-Hydroperoxide direkt reduziert.

  Die gastrointestinale Glutathion-Peroxidase (giGPX) ähnelt im Aufbau der cGPX und wird vor allem im Gastrointestinaltrakt exprimiert.

  Die Plasma Glutathion-Peroxidase ist ein Glykoprotein, das sich primär im Blutplasma befindet.

  Die sperm nucleus Glutathion-Peroxidase (snGPX), befindet sich in den Kernen der Spermatiden und schützt dort die DNA vor oxidativen Schäden.

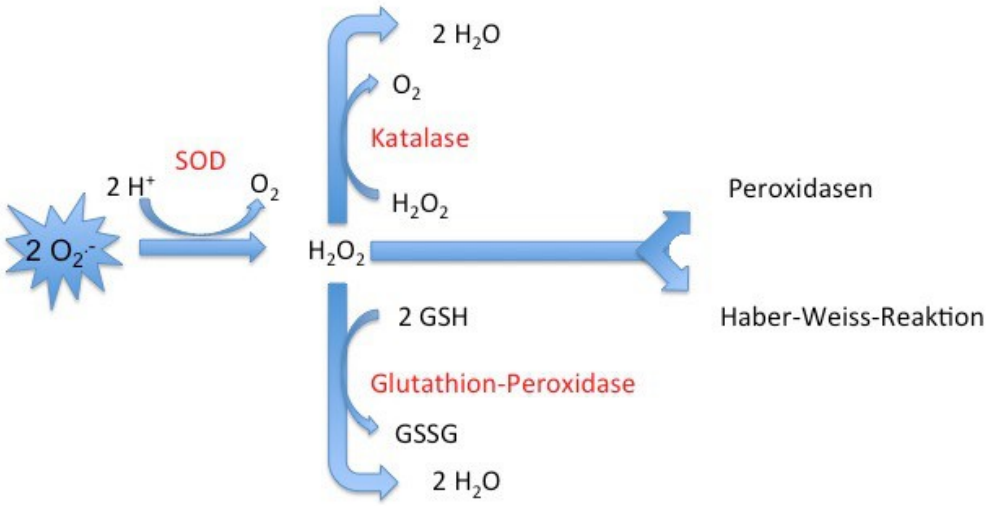

Abb. 3: Reaktionsschema der antioxidativen Enzymkaskade der Haut

Das Radikal Superoxidanion (2 $O_2^{\cdot-}$) wird durch die Superoxiddismutase (SOD) in Sauerstoff (O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt, welches wiederum mittels der Katalase bzw. Glutathion-Peroxidase in Wasser (H_2O) abgebaut werden kann. Ein weiterer möglicher Abbauweg des Wasserstoffperoxides (H_2O_2) erfolgt mittels Peroxidasen oder mittels der Haber-Weiss-Reaktion.

2 $O_2^{\cdot-}$ = Superoxidanion, SOD = Superoxiddismutase, O_2 = Sauerstoff, H_2O_2 = Wasserstoffperoxid, H_2O = Wasser, GSH = Glutathion, GSSG = zwei Moleküle Glutathion über eine Disulfidbrücke verbunden

Bei einer mangelnden Interaktion der drei antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase, Katalase und Glutathion-Peroxidase kommt es zu einer Anhäufung von überschüssigem Wasserstoffperoxid.

Wasserstoffperoxid kann auf zwei Wegen entgiftet werden, wobei weitere hochreaktive Sauerstoffradikale entstehen, welche wiederum abgebaut werden müssen.

Ein möglicher Abbau des Wasserstoffperoxids erfolgt über ubiquitär vorkommende Peroxidasen. Ein weiterer Abbauweg stellt die Haber-Weiss-Reaktion

dar. In zwei aufeinander folgenden Teilreaktionen wird das Wasserstoffperoxid in das hochreaktive Hydroxylradikal ($HO^{\cdot}$) umgewandelt:

$$Fe^{3+} + O_2^{\cdot -} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + HO^{\cdot}$$

$$\text{Nettogleichung: } O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + HO^{\cdot}$$

Im ersten Reaktionsschritt kommt es zur Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+}.
Im zweiten Reaktionsschritt, auch bekannt als Fenton-Reaktion, wird Wasserstoffperoxid durch Fe^{2+} zu einem Hydroxylradikal und einem Hydroxidanion reduziert. Das hochreaktive Hydroxylradikal ist in der Lage die Lipidperoxidationskaskade durch oxidative Degradation von ungesättigten Fettsäuren in Gang zu setzen (siehe Kapitel 1.3.3).

1.4.2 Nicht-enzymatische Antioxidantien

Neben den enzymatischen Antioxidantien gibt es auch zahlreiche nicht-enzymatische Antioxidantien wie Ascorbinsäure (Vitamin C), α-Tocopherol (Vitamin E), β-Carotin und Glutathion.
Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie durch das Abfangen von Radikalen selbst zu Radikalen werden. Durch andere Antioxidantien werden diese oxidierten Radikalfänger wieder in ihren ursprünglichen Zustand überführt.
Das in allen Membranen vorkommende α-Tocopherol schützt mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie zum Beispiel die Arachidonsäure vor Radikalen indem es mit dem bei der Lipidperoxidation entstehenden Fettsäure-Peroxylradikal reagiert. Die Lipidperoxidationskette wird unterbrochen. Bei diesem Vorgang wird das α-Tocopherol selbst zum Radikal oxidiert. Das neu entstandene α-Tocopheryl–Radikal wird durch Ascorbinsäure (Vitamin C) oder durch Abgabe eines Elektrons und Protons unschädlich gemacht.

1.4.3 DNA-Reparaturmechanismen

Für die oxidativ geschädigten Makromoleküle wie Lipide, Proteine und DNA besitzt der menschliche Organismus ebenso Reparatursysteme.
Im Falle der CPDs und der 6-4 PPs handelt es sich um den Nukleotid-exzisionsmechanismus. Dieser Mechanismus ist sehr komplex und umfasst folgende fünf Schritte:

- Lokalisation des Schadens durch Multiproteinkomplex
- Öffnen der DNA-Doppelhelix durch den Transkriptionsfaktor IIH (TFIIH)
- Exzision des geschädigten Oligonukleotids
- Reparatursynthese durch die DNA-Polymerase δ oder durch die DNA-Polymerase ε
- Ligation

Bei einem Defekt des Nukleotidexzisionsmechanismus, bekannt als Xeroderma pigmentosum, kommt es auf UV-exponierten Hautarealen zu einem gehäuften auftreten von Hauttumoren (Sijbers et al. 1996).
Dies verdeutlicht den Stellenwert den dieser Reparaturmechanismus bei der Abwehr der Photokarzinogenese einnimmt.

Im Falle von oxidativ veränderten Basen wie 8-OHdG kommt der Basenexzisionsmechanismus zum Einsatz. Dieser setzt sich aus folgenden Schritten zusammen (siehe Abbildung 4):

- Auffinden und Entfernung der veränderten Base durch die DNA-Glykosylase
- Einführung eines Einzelstrangbruches durch die AP-Endonuklease
- Synthese einer Base, welche komplementär zur Base des fehlerfreien Stranges ist, durch eine DNA-Polymerase
- Ligation durch die DNA-Ligase

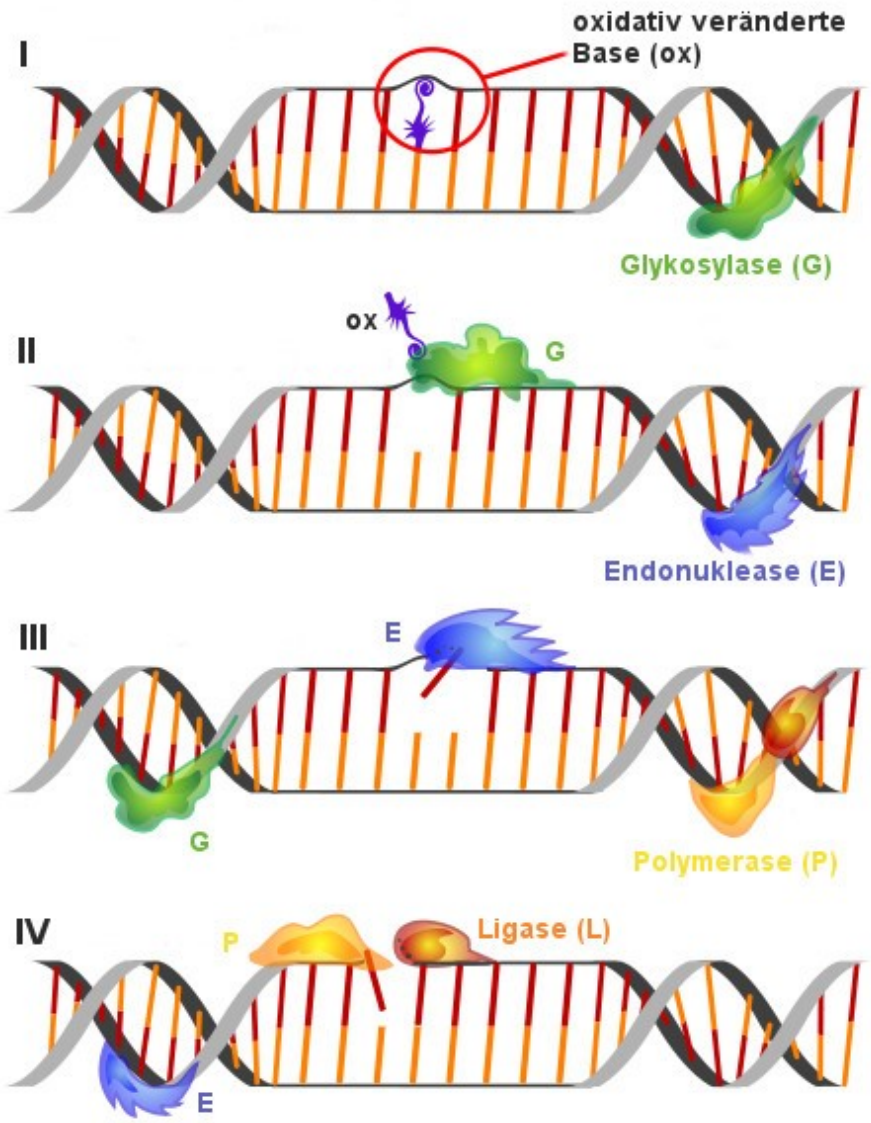

Abb.4: Basenexzisionsmechanismus

Dargestellt ist der schematische Ablauf des Basenexzisionsmechanismus, ein wesentlicher Bestandteil der DNA-Reparaturmechanismen.

Die DNA-Glykosylase findet die oxidativ veränderte Base innerhalb der DNA auf (siehe Punkt I und II). Ein Einzelstrangbruch wird durch die AP-Endonuklease eingeführt (siehe Punkt III). Es folgt die Synthese einer Base, welche komplementär zur Base des fehlerfreien DNA-Stranges ist, durch die DNA-Polymerase (siehe Punkt IV). Zuletzt kommt es zur Ligation durch die DNA-Ligase (siehe Punkt IV).

Modifizierte Abbildung von https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Dna_repair_base_excersion_de.svg Stand 25.03.2014.

G = DNA-Glykosylase, ox = oxidativ veränderte Base, E = AP-Endonuklease = apurinische/ apyrimidinische-Endonuklease, P = DNA-Polymerase, L = DNA-Ligase

1.5 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Aus den dargestellten Mechanismen ergeben sich multiple photochemische Angriffspunkte der UV-Strahlung auf die Haut sowie ein komplexes Verteidigungssystem derselben gegen die UV-Strahlung.
Sind die schädigenden Wirkungen der UV-Strahlung und die körpereigenen Abwehrmechanismen im Gleichgewicht so resultiert nur ein geringer Schaden für das betroffene Hautareal, welcher behoben werden kann. Verschiebt sich jedoch das Gleichgewicht zugunsten der UV-generierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und der oxidativen Schädigung der Makromoleküle, so entsteht (photo)oxidativer Stress, welcher letztendlich zu Photoaging und Photokarzinogenese führen kann (Sies 1991, Wlaschek et al. 2001 & Fisher et al. 2002).

Die photochemischen Effekte auf die menschliche Haut *in vivo* wurden bisher nur durch wenige Studien charakterisiert, da es sich hierbei um ein sehr komplexes System handelt, wie es aus dem bisher erörterten ersichtlich ist. Im Gegensatz dazu gibt es viele *in vitro* Versuche zu einzelnen Effekten und Studien am Tiermodell. In allen wurde deutlich, dass es sich bei den photochemischen Effekten auf die Haut um ein komplexes System mit vielen Interaktionen handelt.
Insbesondere ist bisher wenig bekannt wie empfindlich die menschliche Haut auf die Umweltnoxe UVA reagiert, da das Verhältnis zwischen individueller UVA-Suszeptibilität und der Umweltnoxe UVA bis jetzt wenig erforscht wurde.
Um in diesem Bereich nähere Erkenntnisse zu sammeln, haben wir untersucht, ob es zwischen den durch UVA hervorgerufenen Schäden auf DNA- und Lipid-Ebene und der sichtbaren Reaktion auf die UVA-Strahlung eine Korrelation gibt. Dazu wurde einerseits die Schädigung der Haut durch UVA bestimmt, andererseits wurden *in vivo* verschiedene Faktoren, welche an der Verteidigung beteiligt sind, gemessen um individuell das Verhältnis zwischen Schädigung und Verteidigung genauer zu charakterisieren.
Anhand von etablierten Markern wurde das Zusammenspiel von photodynamischer Belastung durch UVA und individueller antioxidativer Verteidigung exemplarisch untersucht.

Auf Seite der Verteidigung durch Messung der Cu/Zn SOD, auf Seite der oxidativen Schädigung der DNA unter Zuhilfenahme von 8-OHdG und auf Seite der Schädigung der Lipide durch Messung von 8-Isporostan.
In diesem Rahmen wurden folgende Versuche durchgeführt:

- Messung des Gehaltes an Cu/Zn SOD in unbestrahlter Haut
- Messung der Aktivität der Cu/Zn SOD nach einer UVA-Bestrahlung mit einer Zeitkinetik
- Messung der Aktivität der Cu/Zn SOD nach einer UVA-Hochdosisbestrahlung
- Bestimmung der oxidativ veränderten Base 8-OHdG als möglicher Marker für oxidative Schädigung durch UVA-Bestrahlung
- Bestimmung des Lipidperoxidationsproduktes 8-Isoprostan als möglicher Marker für oxidative Schädigung durch UVA-Bestrahlung

2. Material und Methoden

Grundlage der Arbeit war das Zusammentragen der experimentellen Methoden und der Rohdaten, welche während der Postdoc-Phase von PD Dr. med. Lars Alexander Schneider im Labor von Frau Prof. Dr. med. Karin Scharffetter-Kochanek 2000 bis 2001 an der Universitätsklinik Köln sowie 2004 an der Universitätsklinik Ulm erhoben wurden. Die Rohdaten wurden von mir ausgewertet, die Versuchsergebnisse in einen wissenschaftlichen Kontext gestellt und hieraus die Arbeit angefertigt.

2.1 Probandenrekrutierung

Es wurden 41 Probanden rekrutiert, die alle den Hauttyp II, III und IV nach Fitzpatrick aufweisen (Fitzpatrick 1988 & Sachdeva 2009).
In 34 von 41 Fällen wurden detailliert anhand eines Fragebogens der Hauttyp, analog den Fitzpatrick Kriterien, sowie die konstitutionellen Merkmale Haar-, Augenfarbe und Teint erfasst.
Alle Probanden wurden im Voraus über die Versuche und die eventuell entstehenden Risiken und Nebenwirkungen aufgeklärt.

Ausschlusskriterien für diese Studie waren:

- Alter < 18 Jahren
- Fehlende Urteilsfähigkeit des Probanden
- Unmöglichkeit einer protokollkonformen Behandlung (mangelnde Compliance)
- Immobilität
- Schwangerschaft und Stillzeit
- In den letzten sechs Monaten stattgefundene Sonnenstudiobesuche
- In den letzten sechs Monaten Sonnenbaden ohne Bekleidung
- Kardiovaskuläre Erkrankungen wie zum Beispiel: dekompensierte Herzinsuffizienz, frischer Myokardinfarkt, schwere arterielle Hypertonie oder Blutungsneigung
- Respiratorische Erkrankungen wie zum Beispiel schweres Asthma

- Gastrointestinale Erkrankungen wie zum Beispiel Leberinsuffizienz Child Pugh > 9, Hepatitis
- Neurologische Erkrankungen wie zum Beispiel Demenz, Schlaganfall
- Infektionen: HIV
- Dermatosen, welche mit einem erhöhten Risiko von Hauttumoren, Sonnenbränden sowie einer Exazerbation vorbestehender Erkrankungen einhergehen, dazu gehören: Xeroderma pigmentosum, Pseudoxanthoma elasticum, Gorlin-Goltz Syndrom, Lupus erythematodes und dysplastisches Nävussyndrom
- Malignes Melanom in der Vorgeschichte

Die Probanden waren alle Nichtraucher und im Alter zwischen 22 und 55 Jahren**.** Das Durchschnittsalter lag bei 29 Jahren.
Von den detailliert befragten Probanden (n= 34) waren 21 Probanden Frauen und 13 Probanden Männer**.**
Genehmigt wurde die Studie durch die zuständigen Ethikkommissionen der Universität Köln (Aktenzeichen 00051/2000), an der diese Studie begonnen wurde, und der Universität Ulm (Aktenzeichen 177/2003), wo sie fortgesetzt wurde.

2.2 Lichttestung

34 der 41 Probanden wurden vor den Versuchen einer UVA-Lichtschwellen Testung unterzogen. Bei dieser Testung wurden zwei Parameter erhoben:

- die Sofortpigmentierungsschwelle (immediate pigmentation dose, IPD):
  diese wurde 20 Minuten nach der UVA-Exposition bestimmt (Routaboul et al. 1999)

- die verzögerte Pigmentierungsschwelle (persistent pigmentation dose, PPD):
  diese wurde 24 Stunden nach der UVA-Exposition ermittelt (Matsumura und Ananthaswamy 2004 & Ibrahim und Brown 2008).

Beides sind klinisch etablierte Empfindlichkeitsparameter, die auch in der Industrie, zum Beispiel für Wirksamkeitsbestimmungen von Sonnenschutzmitteln verwendet werden (Moyal et al. 2007).

Zur Bestimmung dieser Werte wurde die Glutealhaut verwendet da diese keiner UV-Exposition ausgesetzt ist.

Als UVA-Quelle diente die UVA1 Liege Medisun 24.000, welche für Ganzkörper UV-Therapie wie zum Beispiel bei der Neurodermitis verwendet wird. Diese emittiert UVA1-Strahlen in einem Wellenlängenbereich von 340 nm bis 400 nm (Schneider et al. 2007).

Den Probanden wurde auf das Gesäß eine Schablone mit acht rechteckigen 4 cm^2 großen Aussparungen fest aufgelegt. Anschließend wurde der restliche Körper abgedeckt, so dass keine andere Körperregion der UVA-Strahlung ausgesetzt war. Die acht Bestrahlungsfelder wurden vor Anschalten der UVA1 Liege Medisun 24.000 ebenfalls abgedeckt.

Nach 10 Minuten Einbrennzeit wurde mittels eines UVA-Meters der Firma Dr. Hönle AG UV Technology die Bestrahlungsintensität in mW/cm^2 in den einzelnen, noch abgedeckten Testfeldern, bestimmt. Anhand dieser Werte kann man die individuell benötigten Bestrahlungszeiten in den einzelnen Feldern berechnen.

In aufsteigenden Schritten wurde jeweils ein Testfeld mit 10 J/cm^2, 20 J/cm^2, 30 J/cm^2, 40 J/cm^2, 50 J/cm^2, 60 J/cm^2, 70 J/cm^2 und 90 J/cm^2 bestrahlt, wofür das jeweilige Testfeld für die vorher ausgerechnete Bestrahlungszeit aufgedeckt wurde. Nach der jeweiligen Bestrahlungszeit wurde das Feld wieder abgedeckt.

Eine Luftkühlung verhinderte die Überhitzung der zu bestrahlenden Hautregion.

Im Durchschnitt dauerte eine solche Bestrahlung insgesamt 30 Minuten.

Das Ablesen der Sofortpigmentierungsschwelle (IPD) erfolgte 20 Minuten nach Beendigung der Bestrahlung. Die verzögerte Pigmentierungsschwelle (PPD) wurde erst 24 Stunden nach Beendigung der Bestrahlung ermittelt. Beides erfolgte mittels visueller Kontrolle.

2.3 Gewinnung der Hautproben

2.3.1 Gewinnung der Hautbiopsien zur Bestimmung des individuellen Gehalts der Cu/Zn SOD

Für diesen Versuch wurden bei 12 Probanden aus unbestrahlter Glutealhaut Proben entnommen. Die Hautbiopsien wurden bis zur weiteren Verarbeitung mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.2 Gewinnung der Hautbiopsien aus verschiedenen Körperregionen um die intra-assay Varianz zu bestimmen

An diesem Versuch nahmen vier Probanden teil. Bei den Hautproben der vier teilnehmenden Probanden handelte es sich um Vorhautpräparate von Zirkumzisionen sowie um Hautpräparate aus Mamma- /Bauchdeckenplastiken, welche bei Operationen als Gewebeüberschuss anfielen.
Aus diesen Hautproben wurden je drei Hautspindeln der Größe 8 mm entnommen, welche bis zur weiteren Verarbeitung, mittels flüssigem Stickstoff, tiefgefroren und bei -80°C gelagert wurden.

2.3.3 Gewinnung der Hautbiopsien zur Bestimmung der individuellen Aktivität der Cu/Zn SOD

Zur Bestimmung der Cu/Zn SOD Aktivität wurde bei drei Probanden ein rechteckiges 80 cm^2 großes Feld in der Glutealregion bestrahlt. Dieses wurde einmalig einer zweifachen PPD-Dosis ausgesetzt. Unter sterilen Bedingungen wurden 6 Stunden, 12 Stunden und 24 Stunden nach der Bestrahlung Hautstanzen der Größe 8 mm aus der exponierten Hautregion entnommen. Aus unbestrahlter, benachbarter Haut wurde zur Kontrolle zu jedem Zeitpunkt eine Stanze derselben Größe entnommen.
Die so gewonnenen Biopsien wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in diesem Zustand bei -80°C bis zur weiteren Untersuchungen gelagert.

2.3.4 Gewinnung von abdominellen Hautpräparaten und deren Bestrahlung mit sehr hohen UVA-Dosen

Die bei diesem Versuch verwendeten abdominellen Hautpräparate von drei Probanden stammten aus Hautgewebe, das bei Bauchdeckenplastiken der Patienten überschüssig anfiel.
Nach der Freipräparation vom subkutanen Fettgewebe wurden die Hautpräparate in 4 cm^2 große Teile geschnitten.
Für die Bestrahlung wurden die Präparate in eine Petrischale mit 0,9 % NaCl Lösung (Boeringer Ingelheim, Pfullingen) gelegt, wobei darauf geachtet wurde die Oberfläche der Hautpräparate nicht zu bedecken.
Die so vorbereiteten Präparate wurden mit 120 J/cm^2 unter der UVA1 Medisun 24.000 Liege bestrahlt. Als Kontrolle wurden nicht bestrahlte Hautpräparate verwendet.
Sowohl die nicht bestrahlten als auch die bestrahlten Hautpräparate wurden bis zur weiteren Analyse mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.4 Herstellung eines Gewebelysates aus den Hautproben

Die tiefgefrorenen Hautbiopsien wurden manuell und mittels eines Dismembrators der Firma B. Braun, Melsungen mit 18500 RPM für 90 Sekunden unter ständiger Kühlung zerkleinert. Dafür wurde die Kapsel des Dismembrators ständig mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Das entstandene Pulver wurde in Kaliumphosphat-puffer (pH 7,8) aufgenommen, dreimal je 15 Sekunden lang unter Zuhilfenahme einer Ultraschall-Sonotrode lysiert und 10 Minuten bei 12 000 RPM zentrifugiert. Dies alles geschah unter ständiger Kühlung. Das hieraus gewonnene Proteinlysat wurde mittels eines Falcon™ Zellsiebes mit der Porengröße 45 µm (Becton Dickinson, Düsseldorf) filtriert, aliquotiert und erneut bei -80°C tiefgefroren.

2.5 Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach Bradford

Der Gesamtproteingehalt des Proteinlysates wurde mittels eines Protein-Assays der Firma Bio-Rad Laboratories, München bestimmt. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Methode der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford1976).
Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue an Proteine. Den Farbstoff gibt es in drei Formen:

- kationisch: rote Färbung
- neutral: grüne Färbung
- anionisch: blaue Färbung

In einem sauren Milieu liegt der Farbstoff in der kationischen, zweifach protonierten Form vor. Durch Bindung an Proteine geht er in die anionische, unprotonierte Form über und zeigt die typische blaue Färbung, die spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen wird (Quick Start Bradford Protein Assay Instruction Manual).
Für jede zu bestimmende Probe wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg) 200 µl Bradford-Reagenz zu 800 µl destilliertes H_2O gegeben und gemischt. Zu jedem dieser Ansätze wurde proteinhaltige Lösung in unterschiedlichen Mengen (3 µl bis 10 µl) hinzu pipettiert und unter Zuhilfenahme eines Vortex (IKA Labortechnik, Staufen) gemischt. Danach folgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Im Anschluss erfolgte die photometrische Absorptionsbestimmung bei 595 nm (Spektrophotometer: Ultrospec 3000 Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg).
Für den Leerwert wurde nur der entsprechende Puffer eingesetzt.
Die Proteinkonzentration der Proben wurde durch vergleichen mit der Absorption einer Verdünnungsreihe mit 1 µg bis 10 µg Rinderserumalbumin bestimmt.

2.6 Aktivitätsbestimmung der Cu/Zn SOD

Zur Bestimmung der Cu/Zn SOD Aktivität wurde die Methode von Beauchamp und Fridovich verwendet, welche durch Oberley und Spitz modifiziert wurde (Oberley und Spitz 1984). Das Prinzip dieser Bestimmung beruht auf der Reduktion des p-Nitroblautetrazolium durch Superoxidanionen ($O_2^{\cdot -}$), welche in dem Xanthin/Xanthin-Oxidase System entstehen:

$$\text{Hypoxanthin} + O_2 + H_2O \rightarrow \text{Xanthin} + H_2O_2 + O_2^{\cdot -}$$
$$\text{Xanthin} + O_2 + H_2O \rightarrow \text{Harnsäure} + H_2O_2 + O_2^{\cdot -}$$

Bei dieser Reduktion kommt es zur Bildung eines blauen Farbstoffes mit einem Absorptionsmaximum bei 560 nm. Die Cu/Zn SOD konkurriert mit dem p-Nitroblautetrazolium um das neu entstandene Superoxidanion ($O_2^{\cdot -}$) wodurch der Superoxidanionengehalt verringert wird und somit die Blaufärbung geringer ausfällt. Die Hemmung der p-Nitroblautetrazolium-Reduktion ist somit ein Maß für die vorhandene Cu/Zn SOD Aktivität.
1 U (unit, Aktivitätseinheit) ist definiert als die Menge an Protein, die unter Reaktionsbedingungen eine halbmaximale Hemmung der NBT-Reduktion, das heißt eine halbmaximale Verringerung der Steigung erzeugt (Oberley und Spitz 1984).
Benötigt wurden folgende Lösungen (bezogen von Sigma, Deisenhofen, soweit nicht anders erwähnt):

- 50 mM KP_i, pH 7,8/1,26 mM DETAPAC: dafür werden 49,5 mg DETAPAC in 100 ml KP_i gelöst
- 10 mM Xanthin-Lösung: dafür werden 1,52 mg Xanthin in 1 ml KP_i, unter Zugabe von 60 µl 1 N NaOH, gelöst
- 1,12 mM Nitroblautetrazolium (NBT)-Lösung: dafür werden 0,92 mg NBT in 1 ml KP_i gelöst
- 0,4 U/ml Xanthin-Oxidase (Roche): dafür werden 20 µl Xanthin-Lösung in 3 ml KP_i /DETAPAC gelöst

Die Nitroblautetrazolium-Lösung (NBT-Lösung) und die Xanthin-Oxidase wurden lichtgeschützt, die Xanthin-Oxidase zusätzlich noch auf Eis, gelagert.
Der Reaktionsansatz für eine Probe setzte sich wie folgt zusammen:

- 840 µl – x µl KP_i/DETAPAC
- x µl Zelllysat (in steigender Konzentration)
- 50 µl NBT
- 10 µl Xanthin-Lösung

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden 50 µl der Xanthin-Oxidase-Lösung hinzugegeben. Es folgte die spektrophotometrische Messung der Enzymaktivität bei 560 nm über einen Zeitraum von 120 Sekunden.
Die maximal mögliche NBT-Reduktion wurde durch Messen eines Reaktionsansatzes ohne Zelllysat bestimmt, dieser Wert stellte den „Leerwert“ dar.
Die Steigung ΔA_{560}/Minute ist ein Maß für die Bildung von Superoxidanionen. Je größer der Zelllysatanteil im Reaktionsansatz desto stärker verringert sich die Steigung ΔA_{560}/Minute. Dies weist auf die Dismutation der Superoxidanionen durch die SOD hin.
Anhand folgender Formel lässt sich die prozentuale Hemmung für die eingesetzte Menge an Zelllysat berechnen:

$$\% \text{ Hemmung} = \frac{\Delta A \text{ Probe} \times 100}{\Delta A \text{ Leerwert}}$$

Unter Zuhilfenahme der prozentualen Hemmung und unter Berücksichtigung der Definition von Units, lässt sich die Aktivität der Cu/Zn SOD pro mg Gesamtprotein berechnen.

2.7 Konzentrationsbestimmung der Cu/Zn SOD

Darauf folgte die Bestimmung der Konzentration, in Enzymprotein/ml eingesetzter Flüssigkeit, der Cu/Zn SOD mit einem ELISA-Assay (Serazym® Cu/Zn SOD) der Firma Seramun Diagnostics GmbH.
Folgende Reagenzien und Materialien wurden verwendet (im ELISA-Assay Kit enthalten sofern nicht anders erwähnt):

- Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, beschichtet mit polyklonalen anti-human Cu/Zn SOD Antikörpern
- Waschpuffer, 10-fach, für 1000 ml Lösung, 100 ml Konzentrat
- Verdünnungsmedium, 100 ml gebrauchsfertig
- Kalibratoren 1 - 4, Cu/Zn SOD, 1 ml gebrauchsfertig
  K1 = 3 ng/ml
  K2 = 12,5 ng/ml
  K3 = 50 ng/ml
  K4 = 100 ng/ml
- negative Kontrolle, 1 ml gebrauchsfertig
- positiv Kontrolle Cu/Zn SOD, 1 ml gebrauchsfertig
- Sekundärantikörper, Cu/Zn SOD IgG (Maus), gekoppelt mit Peroxidase, 15 ml gebrauchsfertig
- Farbstoff, 3,3‘,5,5‘-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid, 15 ml gebrauchsfertig
- Stopplösung, 0,25 M Schwefelsäure, 15 ml gebrauchsfertig

Vor Beginn wurden alle Reagenzien, Proben (Zelllysat) und Materialien auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reagenzien wurden vor Gebrauch geschüttelt.
In jeder Vertiefung wurden 100 µl des Sekundärantikörpers pipettiert. Dazu wurden 100 µl der verdünnten Probe (verdünnt mit Verdünnungsmedium auf eine Million Zellen pro Milliliter) hinzugefügt. In zwei der Vertiefungen wurden statt der Probe 100 µl der negativen bzw. positiven Kontrolle hinzu pipettiert. Nach sorgfältigem Abkleben der Mikrotiterplatte wurden die Proben bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert.

Darauf folgte ein dreimaliger Waschvorgang mit je 300 µl der Waschlösung, die im Voraus im Verhältnis 1:9 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde. Der Waschvorgang wurde wie folgt durchgeführt: Abschütten der Proben, Befüllen der Vertiefungen mit der Waschlösung, fünf Sekunden Einwirkzeit und anschließendes Ausschlagen der Platte auf sauberen Zellstoff damit die Restflüssigkeit entfernt wird. Dieser Vorgang wurde noch weitere zwei Male durchgeführt.
Darauf folgte das Hinzufügen von 100 µl Substrat in jede Vertiefung.
Nach einer 15-minütigen lichtgeschützten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Hinzugabe von je 100 µl Stopplösung beendet.
Anschließend wurde die Extinktion innerhalb der nächsten 30 Minuten bei 450 nm gegen 620 nm gemessen. Anhand der Extinktionen der Cu/Zn SOD Kalibratoren lässt sich eine Bezugskurve erstellen mit deren Hilfe man die Werte der Proben in Cu/Zn SOD Konzentrationen umwandeln kann.
Letztendlich konnte man unter Zuhilfenahme des ermittelten Gesamtprotein-gehalts die Cu/Zn SOD Konzentrationen in µg Enzym/mg Gesamtprotein umrechnen.

2.8 Gewinnung von Saugblasenflüssigkeit zur Bestimmung von 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG)

Vor Gewinnung der Saugblasenflüssigkeit wurde das Bestrahlungsfeld, ein 80 cm^2 großes Rechteck, rechts und links gluteal, nach zwei verschiedenen Bestrahlungs-schemata bestrahlt.
Die 19 teilnehmenden Probanden lagen dazu auf einer Liege und wurden komplett abgedeckt. Nach einer Einbrennzeit der Lampe von 10 Minuten wurde der zu bestrahlende Bereich aufgedeckt und der Strahlung je nach Schema ausgesetzt.

Schema 1: einmalige Bestrahlung des glutealen Bestrahlungsfeldes mit zweifacher PPD-Dosis

Schema 2: dreimalige Bestrahlung des glutealen Bestrahlungsfeldes mit 0,75-facher PPD-Dosis im Abstand von 12 Stunden

Die Probanden wurden, je nach ihrer Bereitschaft sich den Bestrahlungen auszusetzen, auf die beiden Bestrahlungsschemata verteilt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Geschlechterverteilung und die Verteilung der Hauttypen ähnlich waren:

- Schema 1: 11 Probanden
- Schema 2: 14 Probanden

Jedem Proband wurde zu drei Zeitpunkten interstitielle Flüssigkeit der Epidermis sowohl aus bestrahlten als auch aus unbestrahlten Hautarealen, mittels der Erzeugung von Saugblasen entzogen. Diese Methode wurde 1968 von Kiistala etabliert (Kiistala 1968).
Für die Erzeugung der Saugblasen wurde ein Absauggerät (Atmoforte 350/Record 500) der Firma ATMOS MedizinTechnik, Lenzkirch verwendet. Ein Vakuum von 200 mm Wassersäule wurde auf dem entsprechenden Hautareal angelegt bis sich eine Blase mit dem Flüssigkeitsvolumen von 50 µl bis 150 µl gebildet hat. Unter sterilen Bedingungen wurde die Flüssigkeit abpunktiert, aliquotiert, mittels flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.8.1 Bestimmung des 8-OHdG Gehaltes in der Saugblasenflüssigkeit

Das in der Saugblasenflüssigkeit enthaltene 8-OHdG wurde mittels eines ELISA Kit der Firma Kamiya Biomedical Company quantitativ bestimmt.
Folgende Reagenzien und Materialien wurden verwendet (im ELISA Kit enthalten sofern nicht anders erwähnt):

- 1 beschichtete 8-OHdG Mikrotiterplatte mit 96 wells
- Primärantikörper: monoklonaler anti-8-OHdG Antikörper
- Primärantikörperlösung: phosphatgepufferte Salzlösung, 6 ml
- Sekundärantikörper: anti-Maus Antikörper mit gebundener Meerrettich-peroxidase (HRP)
- Sekundär-Antikörper Lösung: phosphatgepufferte Salzlösung, 12 ml
- Farblösung: 3,3‘,5,5‘-tetramethylbenzidin, 0,25 ml

- Verdünnungslösung: Hydrogenperoxid-/Citratphosphat-gepufferte Salzlösung, 12 ml
- Waschlösung (5X): konzentrierte, phosphatgepufferte Salzlösung, 2 x 26 ml
- Stopplösung: 1M Phosphorsäure
- 8-OHdG Kalibrierungslösung: gereinigtes 8-OHdG (0,5 ng/ml; 2 ng/ml; 8 ng/ml; 20 ng/ml; 80 ng/ml; 200 ng/ml)
- 2 Abdichtungsplatten

Vor Beginn wurden alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur erwärmt.
Je 50 µl der Probe wurden in eine Vertiefung der Mikrotiterplatte eingebracht, dazu kamen je 50 µl der Primärantikörperlösung, die mit den Primärantikörpern vermischt wurden. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte geschwenkt, abgedichtet und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
Die Waschlösung (5X) wurde im Verhältnis 1:4 mit destilliertem Wasser verdünnt.
Nach der einstündigen Inkubation wurde der Inhalt der Vertiefungen abgeschüttet und mit je 50 µl der verdünnten Waschlösung befüllt. Nach sorgfältigem Schwenken der Mikrotiterplatte wurde die Waschlösung wieder abgeschüttet, die Platte umgedreht und auf einem sauberen Papiertuch abgeklopft. Dieser Reinigungsvorgang wurde noch zwei Mal wiederholt.
Nun wurden je 100 µl der Sekundärantikörperlösung, welche mit den Sekundärantikörpern davor vermischt wurde, in jede Vertiefung gefüllt. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte geschwenkt, abgedichtet und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.
Darauf folgte der Reinigungsvorgang wie oben beschrieben.
Die Farblösung wurde im Verhältnis 1:100 mit der Verdünnungslösung vermischt und je 100 µl dieser Lösung wurden in jede Vertiefung gefüllt. Anschließend wurde die Platte geschwenkt und für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.
Nach der Inkubation wurden je 100 µl der Stopplösung in jede Vertiefung hinzugefügt. Nach erneutem sorgfältigen Schwenken der Mikrotiterplatte wurde die Absorption bei 450 nm gemessen.
Unter Zuhilfenahme einer Kalibrierungskurve, welche mittels der 8-OHdG Kalibrierungslösung erstellt wurde, konnte man den Gehalt an 8-OHdG in jeder Probe bestimmen.

2.9 Bestimmung des 8-Isoprostan Gehaltes

Bei diesem Versuch wurden acht Probanden mit der UVA1 Medisun 24.000 Liege bestrahlt. Jeder Proband hatte vier Bestrahlungsfelder der Größe 2 cm x 3 cm auf seiner Gesäßregion. Der Rest des Körpers wurde sorgfältig abgedeckt.
Nach einer notwendigen Einbrennzeit der Strahlungsquelle von 10 Minuten (Schneider et al. 2007), bei der auch das Bestrahlungsfeld abgedeckt wurde, folgte je nach Proband eines der beiden verschiedenen Bestrahlungsschemata:

- Schema 1 - Zeitkinetik:
  Bestrahlung mit zweifacher PPD (60 J/cm^2 bis 80 J/cm^2) mit Stanzbiopsie im Durchmesser von 5 mm nach 30 Minuten, 90 Minuten, 120 Minuten und 240 Minuten UVA-Bestrahlung
- Schema 2 - Dosiskinetik:
  Bestrahlung mit 30 J/cm^2, 90 J/cm^2 und 120 J/cm^2 und jeweiliger Stanzbiopsie im Durchmesser von 5 mm 30 Minuten nach der entsprechenden Strahlungsdosis

Bei beiden Schemata wurde jeweils zusätzlich eine Kontrollprobe aus unbestrahlter Haut entnommen.
Am Bestrahlungsschema 1 nahmen fünf Probanden teil, am Bestrahlungsschema 2 drei Probanden.

2.9.1 immunhistochemische Analyse

Die Hautbiopsien wurden, eingebettet in Tissue-Tek® OCT™ Compound der Firma Pelco International, auf Trockeneis tiefgefroren und in 7 µm dünne Scheiben geschnitten. Diese wurden mit 4 % Paraformaldehyd fixiert.
Bei der immunhistochemischen Färbung wurde die Streptavidin-Biotin-Methode angewandt.
Das Prinzip beruht auf einer sehr hohen Affinität des Streptavidins für Biotin. Nach Bindung des Primärantikörpers an das Antigen wird ein biotinylierter Sekundärantikörper hinzugegeben, welcher an das Fc-Fragment des

Primärantikörpers bindet. Darauf folgt das Hinzufügen des enzymmarkierten Streptavidins, welches an das Biotin bindet und nach Zugabe eines Substrates in einer Enzym-Substrat-Reaktion einen Farbnachweis erbringt.
Es wurden folgende Reagenzien benötigt:

- Primärantikörper: polyklonaler anti-8-epi-PGF-2alpha Ziegen-Antikörper (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI)
- Sekundärantikörper: anti-Ziegen Kaninchen-Antikörper
- Streptavidin, mit Meerrettichperoxidase (HRP) markiert
- Substrat: 3,3‘-diaminobenzidin-tetrahydrochlorid in 0,05 mol/l Tris-HCl und 0,1 % H_2O_2

Auf das fixierte Schnittpräparat wurde zunächst der im Verhältnis 1:500 mit de-ionisiertem Wasser verdünnte Primärantikörper gegeben. Es folgte der biotin-ylierte Sekundärantikörper, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist. Auch dieser wurde vorher im Verhältnis 1:400 verdünnt. Nun folgte die Anlagerung des Markierungskomplexes, bestehend aus dem mit Meerrettich-peroxidase (HRP) markiertem Streptavidin. Durch Hinzugabe des Substrates kam es nach drei bis fünf Minuten zur Ausbildung einer schwarz-braunen Färbung.
Für die quantitative Analyse wurde die Intensität der Färbung auf 8-Isoprostan mittels eines Zeiss Axiophot Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), das mit einer 3-Chip CCD Kamera (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) verbunden war, gemessen. Dabei wurden in 10 zufällig ausgewählten Feldern jeder gefärbten Probe die Grauwerte bestimmt. Die Grauwerte des Hintergrundes wurden in zellfreien Bereichen der Probe bestimmt. Diese wurden von den Grauwerten der zellreichen Bereiche abgezogen. Durchgeführt wurden diese Berechnungen von dem Labor von Professor Dr. W. Bloch an der Deutschen Sporthochschule in Köln mit dem Programm Optimas 6.01 image analysis software (Optimas 6.01 Imaging Technology Inc., San Diego, CA, USA) im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation.

2.10 statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Prism für den Mac der Firma GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA. Auf Grund der geringen Probandenanzahl wurden keine statistischen Tests durchgeführt, lediglich der Mittelwert und die Standardabweichungen wurden bestimmt.
Die Ergebnisse hatten auf Grund der geringen Probandenzahl nur einen explorativen Charakter. Für eine aussagekräftige, statistische Analyse ist eine größere Anzahl von Probanden notwendig, jedoch finden sich für solche *in vivo* Untersuchungen nur sehr wenige Freiwillige.

3. Ergebnisse

3.1 Auswertung der Lichttestung

Vor Beginn der eigentlichen Versuche wurden 34 der 41 Probanden einer Lichttestung unterzogen um die individuelle IPD (immediate pigmentation dose) und PPD (persistent pigmentation dose) zu bestimmen. Nebenbei wurden noch folgende Parameter bestimmt: Haarfarbe, Augenfarbe und Teint. Diese finden auch in der Hauttyp-Einteilung nach Fitzpatrick Verwendung.
Von den 34 Probanden haben 11 Probanden den Hauttyp II, 22 Probanden den Hauttyp III und ein Proband den Hauttyp IV.

3.1.1 immediate pigmentation dose

Die IPD wurde in Stufen von 10 J/cm^2 bestimmt. Die Ergebnisse zeigt die Abbildung 5:

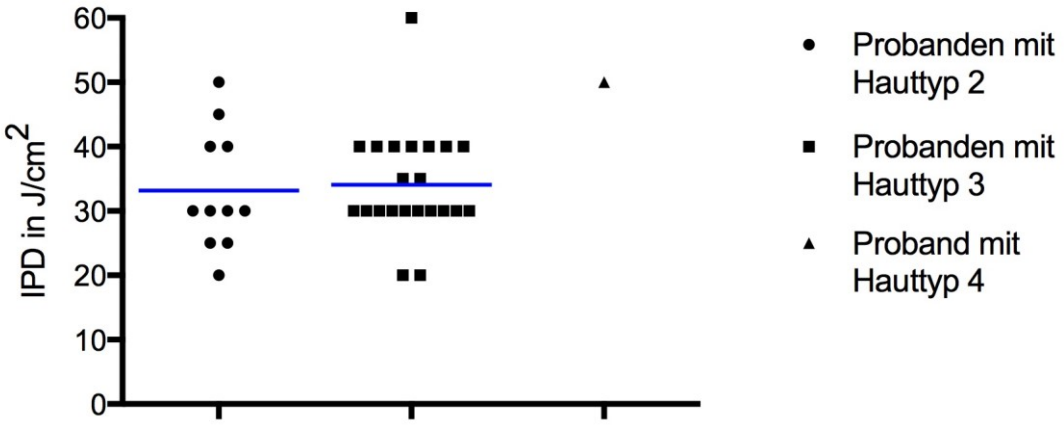

Abb. 5: immediate pigmentation dose (IPD)
Darstellung der IPD der 34 Probanden in Abhängigkeit des Hauttyps. Jedes Symbol entspricht dem Wert eines Probanden. Der Mittelwert wurde blau markiert. 26 Probanden wurden an der Universitätsklinik Köln von 2000-2001 untersucht, acht Probanden an der Universitätsklinik Ulm 2004.
IPD = immediate pigmentation dose, Sofortpigmentierungsschwelle, J = Joule

Bei der Vermessung der IPD hatten die Probanden mit dem Hauttyp II (n=11) Werte zwischen 20 J/cm^2 und 50 J/cm^2. Der Mittelwert, welcher in der Abbildung blau markiert wurde, liegt bei 33,18 J/cm^2.
Die Probanden mit dem Hauttyp III (n=22) erreichten Werte zwischen 20 J/cm^2 und 60 J/cm^2. Der Mittelwert beträgt hier 34,09 J/cm^2.
Der Proband mit dem Hauttyp IV hatte eine IPD von 50 J/cm^2.
Es fällt auf, dass die Werte der Probanden mit dem Hauttyp II und dem Hauttyp III sich überlappen bzw. deckungsgleich sind und daher anhand der IPD keine Unterscheidung der Hauttypen II und III möglich ist.

3.1.2 persistent pigmentation dose

Bei der Bestimmung der PPD wurden die Werte 24 Stunden nach der UVA-Bestrahlung abgelesen. Es ergibt sich folgendes Bild:

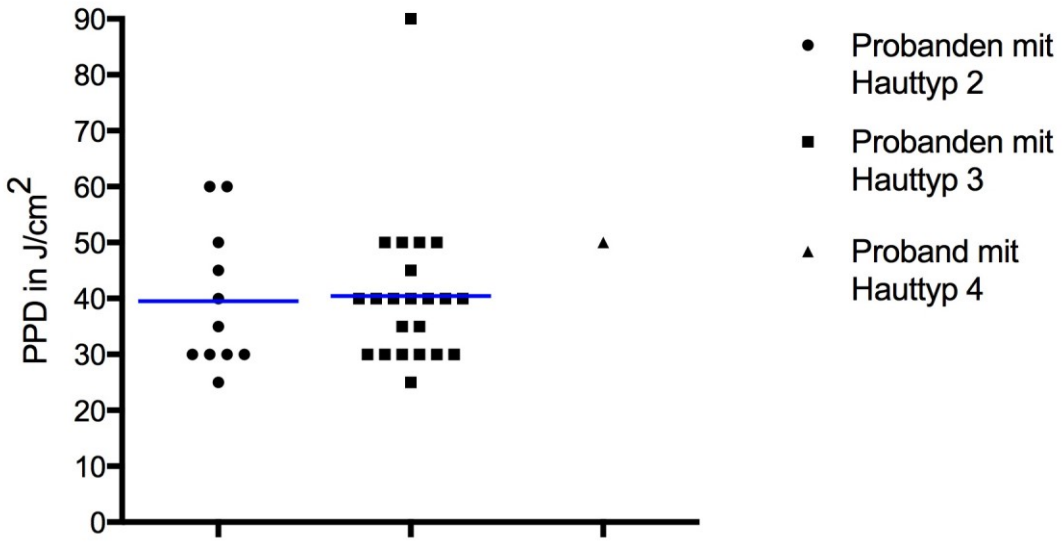

Abb. 6: persistent pigmentation dose

Darstellung der PPD der 34 Probanden in Abhängigkeit des Hauttyps. Jedes Symbol entspricht dem Wert eines Probanden. Der Mittelwert wurde blau markiert. 26 Probanden wurden an der Universitätsklinik Köln von 2000-2001 untersucht, acht Probanden an der Universitätsklinik Ulm 2004.

PPD = persistent pigmentation dose, verzögerte Pigmentierungsschwelle, J = Joule

Die Probanden mit dem Hauttyp II (n=11) hatten Werte zwischen 25 J/cm^2 und 60 J/cm^2. Der Mittelwert, welcher in dem Schaubild mit einer blauen Linie markiert wurde, beträgt 39,55 J/cm^2.
Die Probanden mit dem Hauttyp III (n=22) hatten Werte zwischen 25 J/cm^2 und 90 J/cm^2. Der Mittelwert liegt bei 40,45 J/cm^2.
Auch bei den PPD-Werten der Probanden mit dem Hauttyp II und dem Hauttyp III fällt eine Übereinstimmung auf. Es ist daher auch hier keine Unterscheidung zwischen den Hauttypen II und III möglich.

3.1.3 Haarfarbe

Laut Fitzpatrick werden zur Einteilung der Hauttypen Unterscheidungsmerkmale wie die Haarfarbe herangezogen. Wir bestimmten daher in einer weiteren Subanalyse die Haarfarbe bei unseren Probanden in Abhängigkeit des Hauttyps. Es zeigt sich folgende Verteilung:

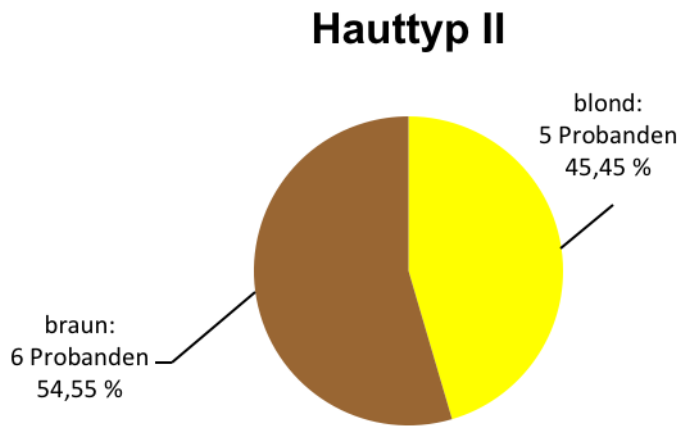

Abb. 7: Haarfarbe Hauttyp II

Darstellung der Verteilung der Haarfarbe, welche die Probanden mit dem Hauttyp II aufweisen (n= 11). Sieben Probanden wurden an der Universitätsklinik Köln von 2000-2001 untersucht, vier Probanden an der Universitätsklinik Ulm 2004.

Innerhalb der Probandengruppe mit dem Hauttyp II (n=11) hatten fünf Probanden die Haarfarbe blond und sechs Probanden die Haarfarbe braun. Die prozentuale Verteilung zeigt Abbildung 7.

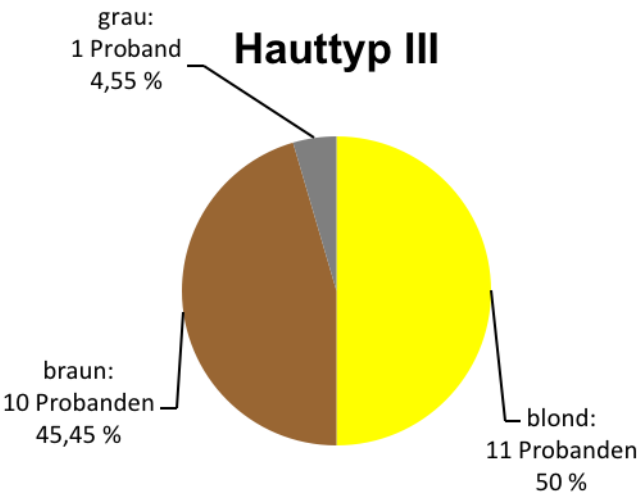

Abb. 8: Haarfarbe Hauttyp III

Darstellung der Haarfarben blond, braun und grau innerhalb der Probanden mit dem Hauttyp III (n=22). 18 Probanden wurden an der Universitätsklinik Köln von 2000-2001 untersucht, vier Probanden an der Universitätsklinik Ulm 2004.

Der Hauttyp IV ist mit nur einem Probanden vertreten. Aussagen zu diesem Hauttyp lassen sich daher nicht machen.

Sowohl beim Hauttyp II als auch beim Hauttyp III hat der Großteil der Probanden die Haarfarben blond und braun. Ein Rückschluss auf den Hauttyp ist daher allein aufgrund der Haarfarbe nicht möglich.

3.1.4 Augenfarbe

Als ein weiterer möglicher Differenzierungswert zwischen den Hauttypen wurde analog zur Fitzpatrick-Einteilung die Augenfarbe der Probanden bestimmt. Die Verteilung stellt sich wie folgt dar:

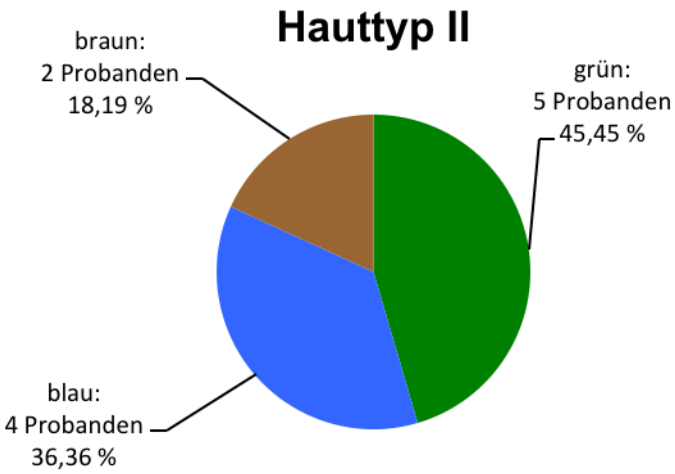

Abb. 9: Augenfarbe Hauttyp II

Grafische Darstellung der Verteilung der Augenfarben grün, blau und braun innerhalb der Probanden mit dem Hauttyp II (n=11). Sieben Probanden wurden an der Universitätsklinik Köln von 2000-2001 untersucht, vier Probanden an der Universitätsklinik Ulm 2004.

Innerhalb der Probandengruppe mit dem Hauttyp II (n=11) hatten fünf Probanden die Augenfarbe grün, vier Probanden die Augenfarbe blau und zwei Probanden die Augenfarbe braun. Die Verteilung in Prozenten angegeben, kann der Abbildung 9 entnommen werden.

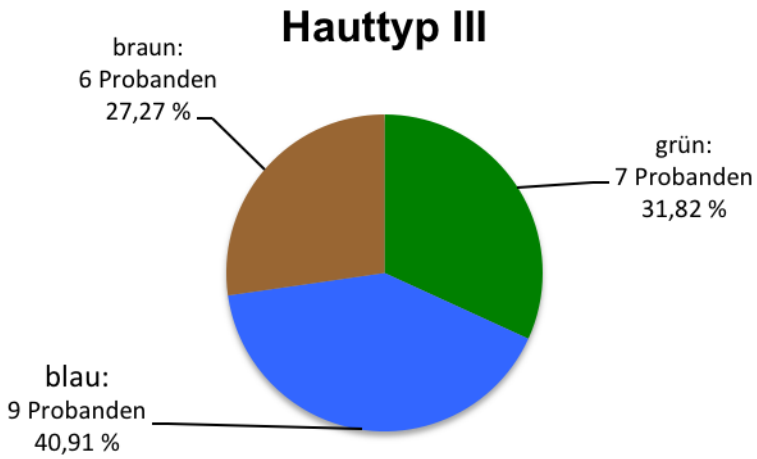

Abb. 10: Augenfarbe Hauttyp III

Grafische Darstellung der Augenfarben grün, blau und braun innerhalb der Gruppe der Probanden mit dem Hauttyp III (n=22). 18 Probanden wurden an der Universitätsklinik Köln von 2000-2001 untersucht, vier Probanden an der Universitätsklinik Ulm 2004.

Innerhalb der Probandengruppe mit dem Hauttyp III hatten sieben Probanden die Augenfarbe grün, neun Probanden die Augenfarbe blau und sechs Probanden die Augenfarbe braun. Die prozentualen Anteile sind in Abbildung 10 dargestellt.
Der Proband mit dem Hauttyp IV hat grüne Augen.

Sowohl beim Hauttyp II als auch beim Hauttyp III sind die Augenfarben grün und blau am stärksten vertreten. Die Zuordnung zu einem Hauttyp allein aufgrund der Augenfarbe ist demnach nicht möglich.
Wie schon bei dem konstitutionellen Merkmal Haarfarbe, sind bei dem Probanden mit dem Hauttyp IV keine validen Unterscheidungsmerkmale in Bezug auf die Hauttypeinstufung zu erkennen.

3.1.5 Teint

Bezüglich des Teints, welcher natürlicherweise als einer der ersten subjektiven Einschätzungsmerkmale herangezogen wird, zeigte sich folgende Verteilung:

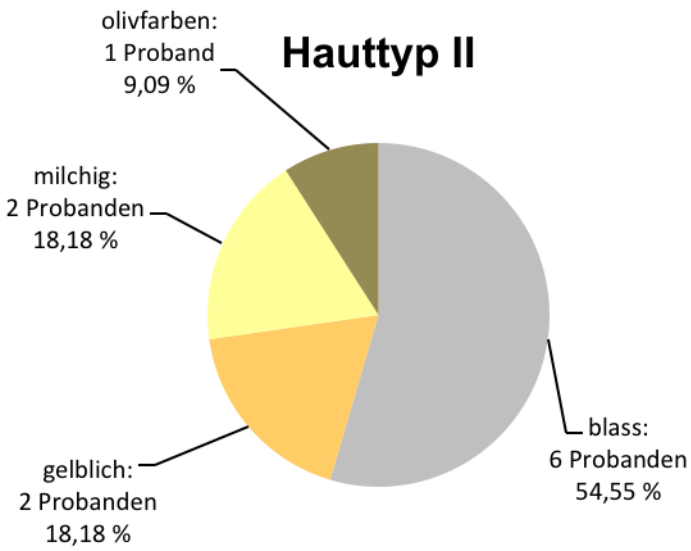

Abb. 11: Teint Hauttyp II

Darstellung des Teints der Probanden mit dem Hauttyp II (n=11). Sieben Probanden wurden an der Universitätsklinik Köln von 2000-2001 untersucht, vier Probanden an der Universitätsklinik Ulm 2004

Innerhalb der Probandengruppe mit dem Hauttyp II (n=11) hatten sechs Probanden einen blassen Teint, zwei Probanden einen gelblichen Teint, zwei Probanden einen milchigen Teint und ein Proband einen olivfarbenen Teint. Die prozentualen Werte können der Abbildung 11 entnommen werden.

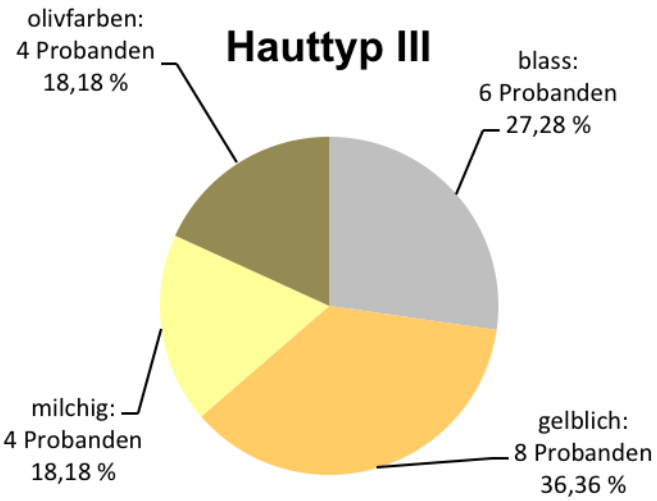

Abb. 12: Teint Hauttyp III

Abbildung zur Verteilung des Teints blass, gelblich, milchig und olivfarben innerhalb der Probandengruppe mit dem Hauttyp III (n=22). 18 Probanden wurden an der Universitätsklinik Köln von 2000-2001 untersucht, vier Probanden an der Universitätsklinik Ulm 2004

In der Gruppe der Probanden mit dem Hauttyp III (n=22) hatten sechs Probanden einen blassen Teint, acht Probanden einen gelblichen Teint, vier Probanden einen milchigen Teint und vier Probanden einen olivfarbenen Teint. Die Verteilung in Prozenten angegeben, kann der Abbildung 12 entnommen werden.
Man erkennt eine Verschiebung der Teintverteilung in Richtung olivfarben und gelblich. Davon findet man beim Hauttyp III 54,54 %, bei Hauttyp II lediglich 27,27 %. Der Anteil der Probanden mit blassem bzw. milchigem Teint verringert sich beim Hauttyp III entsprechend (45,46 % bei Hauttyp III und 72,73 % bei Hauttyp II).

Der Proband mir dem Hauttyp IV hatte einen olivfarbenen Teint.

Wie auch schon bei den beiden anderen konstitutionellem Merkmalen Haar- und Augenfarbe beobachtet, ist es nicht möglich aufgrund der Haarfarbe, Augenfarbe oder des Teints einen eindeutigen Rückschluss auf den Hauttyp zu machen. Bei den Hauttypen II und III gibt es insgesamt zu viele Überlappungen.
In der Summe ergeben sowohl die Auswertung der Lichttestung als auch die detaillierte Auswertung der konstitutionellen Merkmale der Hauttypen II und III,

dass diese Hauttypen sich so überlappen, dass sie nicht anhand dieser Werte unterschieden werden können.

3.2 Bestimmung des Gehaltes an Cu/Zn SOD in unbestrahlter Haut

Die Cu/Zn SOD macht circa 80 % der gesamten Superoxiddismutase-Aktivität der Haut aus und stellt somit einen wichtigen Vertreter der antioxidativen Enzymkette dar. Sie wurde daher in den folgenden Versuchen als Biomarker für die anti-oxidative, enzymatische Photoprotektion der Haut verwendet.
Um sich einen Überblick über den Gehalt an natürlichen Cu/Zn SOD zu verschaffen wurde zusätzlich bei 12 Probanden die Enzymmenge in der Glutealhaut bestimmt.
Die Bestimmung erfolgt wie in Kapitel 2 Material und Methoden beschrieben und ergibt folgendes Bild:

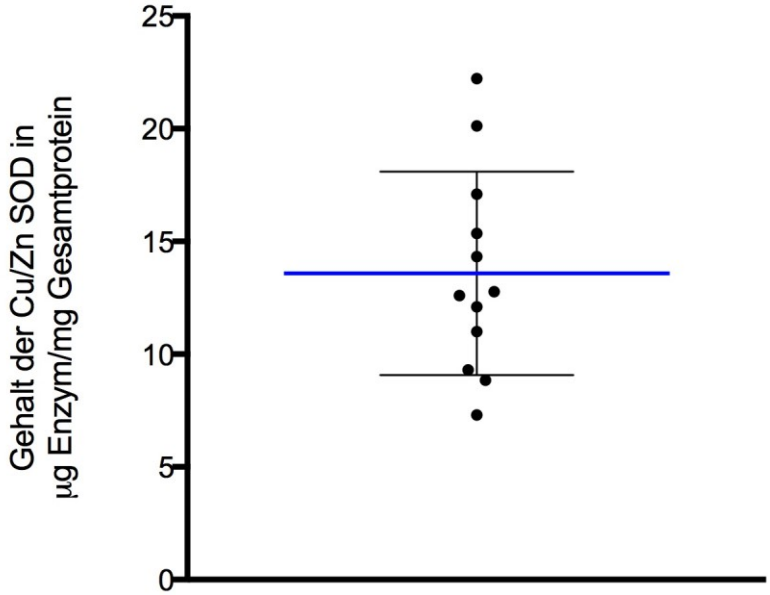

Abb. 13: Gehalt an Cu/Zn SOD in unbestrahlter Haut

Dargestellt ist der natürlich vorkommende Gehalt an Cu/Zn SOD in unbestrahlter Haut (Glutealhaut) von 12 Probanden (n = 12, Proband 1 bis Proband 12), welche an der Universitätsklinik in Köln 2000 bis 2001 untersucht wurden. Die einzelnen Werte der Probanden wurden mit einem Punkt dargestellt. Zusätzlich wurde der Mittelwert von 13,59 µg Enzym/mg Gesamtprotein (blauer Querstrich) und die Standardabweichung von +/- 4,52 (schwarze Querstriche) angegeben.

Cu/Zn SOD = Kupfer-Zink-Superoxiddismutase

Man kann erkennen, dass der Gehalt an Cu/Zn SOD in dem Probandenkollektiv (n=12; Proband 1 bis einschließlich Proband 12) zwischen den einzelnen Probanden variiert. Das Spektrum reichte von 7,30 µg Enzym/mg Gesamtprotein Cu/Zn SOD bis 22,22 µg Enzym/mg Gesamtprotein Cu/Zn SOD. Der Mittelwert betrug 13,59 µg Enzym/mg Gesamtprotein, die Standardabweichung belief sich auf +/- 4,52.

3.3 Untersuchung der intra-assay Varianz

Um die Präzision der vorherigen Werte zu überprüfen, wurde dann der Cu/Zn SOD Gehalt in verschiedenen Hautproben bei vier Probanden im Sinne einer intra-assay Varianz bestimmt. Die intra-assay Varianz gibt Auskunft über

Messwertschwankungen innerhalb einer Messreihe und lässt somit Aussagen über die Präzision der Bestimmungsmethode zu.
Die Werte wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben und in Abbildung 14 dargestellt:

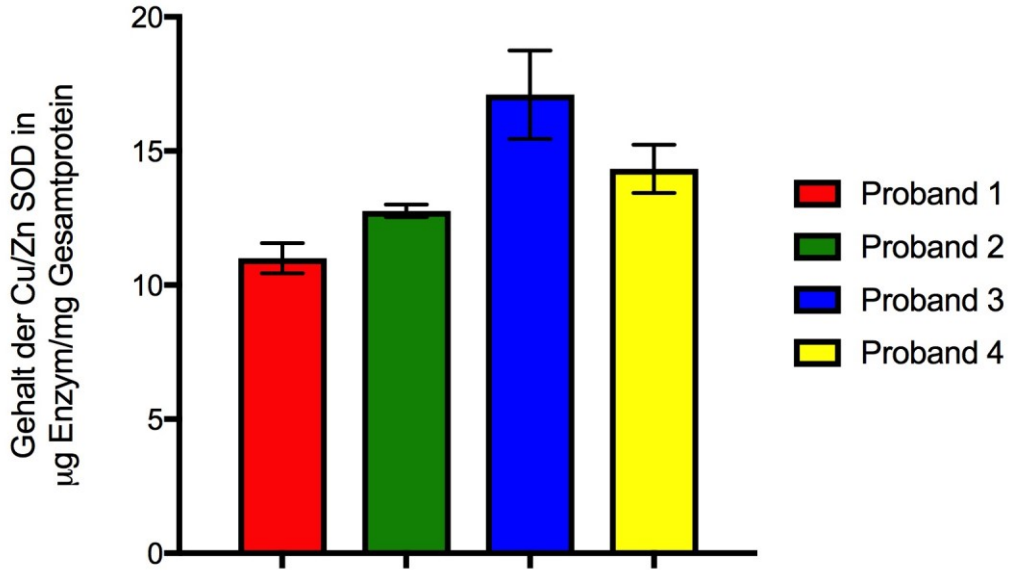

Abb. 14: Intra-assay Varianz

Um die Präzision der Methode der Konzentrationsbestimmung zu untersuchen erfolgte die Ermittlung der intra-assay Varianz. An vier Probanden der Universitätsklinik Köln (2000-2001) wurde die Konzentration der Cu/Zn SOD in verschiedenen, unbestrahlten Hautproben untersucht (n=4, Proband 1 bis Proband 4). Die Abbildung zeigt den Mittelwert des Gehaltes an Cu/Zn SOD eines jeden Probanden, sowie die Standardabweichung.
Cu/Zn SOD = Kupfer-Zink-Superoxiddismutase

Es zeigt sich eine Variation der Cu/Zn SOD Menge zwischen den vier Probanden (Proband 1 bis einschließlich Proband 4). Den höchsten Gehalt an Cu/Zn SOD wies Proband 3 mit 17,10 µg Enzym/mg Gesamtprotein +/- 1,65 auf. Den niedrigsten Gehalt an Cu/Zn SOD besaß Proband 1 mit 11,00 µg Enzym/mg Gesamtprotein +/- 0,57.
Trotz gewisser Unterschiede fällt aber auf, dass bei drei der vier Probanden die Standardabweichung kleiner 1 ist und dies trotz einer deutlichen Variation der gemessenen Werte. Man kann daher den Schluss ziehen, dass die intra-assay Varianz gering ist und somit die Bestimmungsmethode präzise.

3.4 Aktivität der Cu/Zn SOD nach einer UVA-Bestrahlung mit einer Zeitkinetik

Nun wurde untersucht wie sich die enzymatische Aktivität der Cu/Zn SOD *in vivo* unter einer UVA-Exposition verändert. Dazu wurde als Dosis eine Bestrahlung mit zweifacher PPD gewählt. Diese Dosis ist hoch, jedoch noch im physiologischen Bereich. Sie entspricht in etwa der Dosis eines Sommertages.
Über ein Zeitintervall von 24 Stunden wurden drei Probanden untersucht, welche mit dieser Dosis bestrahlt wurden.
Es ergibt sich folgendes Bild (siehe Abbildung 15):

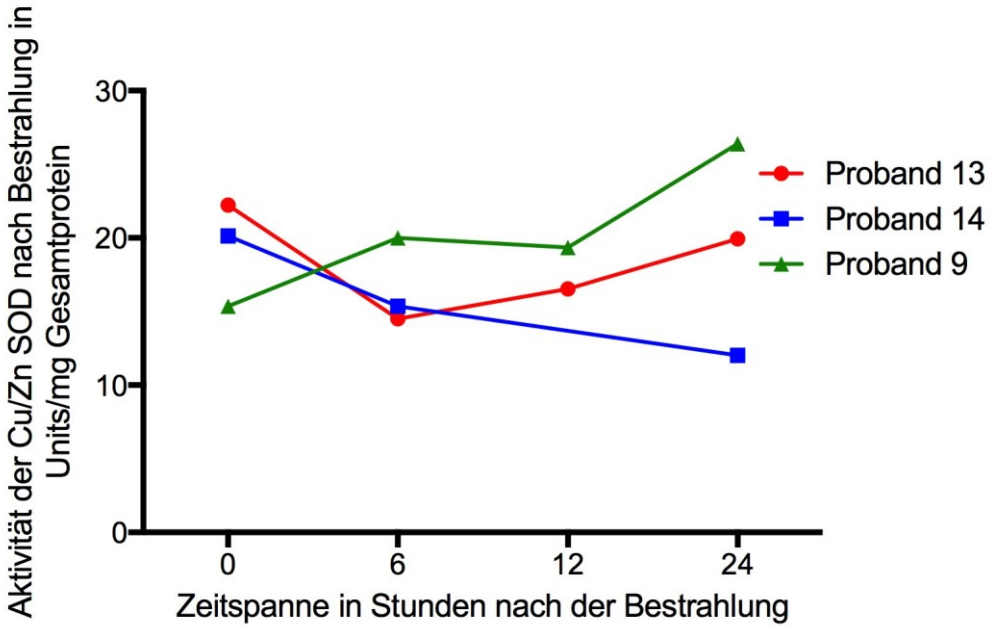

Abb. 15: Aktivität der Cu/Zn SOD nach einer UVA-Bestrahlung

Die Abbildung zeigt die Aktivität der Cu/Zn SOD vor sowie nach UVA-Bestrahlung mit zweifacher PPD bei drei Probanden der Universitätsklinik Köln (2001). Gemessen wurde bei jedem Probanden vor Bestrahlung sowie 6 Stunden, 12 Stunden und 24 Stunden nach Bestrahlung, lediglich bei Proband 14 konnte zum Messzeitpunkt 12 Stunden kein Wert erhoben werden.
Cu/Zn SOD = Kupfer-Zink-Superoxiddismutase, UVA = ultraviolett A, PPD = persistent pigmentation dose

Man erkennt schon vor der Bestrahlung, dass die Aktivität der Cu/Zn SOD unter den drei Probanden variiert. Proband 13 hatte eine Aktivität von 22,22 Units/mg Gesamtprotein. Proband 14 hatte eine Aktivität von 20,13 Units/mg Gesamtprotein und Proband 9 eine Aktivität von 15,36 Units/mg Gesamtprotein. Analog wie beim

Cu/Zn SOD Gehalt der Haut sieht man also auch bei der Ausgangsaktivität dieses Enzyms eine interindividuelle Varianz.
Sechs Stunden nach der Bestrahlung reagierten Proband 13 und 14 mit einer Aktivitätsminderung um 7,71 Units/mg Gesamtprotein bzw. 4,77 Units/mg Gesamtprotein. Proband 9 dagegen reagierte mit einer Steigerung der Aktivität auf 20,00 Units/mg Gesamtprotein.
Nach weiteren sechs Stunden wurde die zweite Probe entnommen und auch deren Cu/Zn SOD Aktivität wurde bestimmt. Proband 13 reagierte mit einem Anstieg der Aktivität von 14,51 Units/mg Gesamtprotein auf 16,54 Units/mg Gesamtprotein. Proband 9 dagegen reagierte mit einem leichten Rückgang der Aktivität von 20,00 Units/mg Gesamtprotein auf 19,35 Units/mg Gesamtprotein. Proband 14 war zu diesem Zeitpunkt nicht anwesend, ein Wert konnte daher bei ihm nicht bestimmt werden.
24 Stunden nach der Bestrahlung wurde die letzte Probe entnommen.
Die Analyse der letzten Probe ergab folgende Werte:

- Proband 13: 19,93 Units/mg Gesamtprotein
- Proband 14: 12,02 Units/mg Gesamtprotein
- Proband 9: 26,40 Units/mg Gesamtprotein

Bei allen drei Probanden ergab sich ein unterschiedliches Bild des zeitlichen Verlaufes der Enzymaktivität sowie der Endwerte 24 Stunden nach der UVA-Bestrahlung *in vivo*. Die SOD Aktivität in der Haut *in vivo* ist daher analytisch nicht vorhersagbar.

3.5 Aktivität der Cu/Zn SOD nach einer UVA-Hochdosisbestrahlung

Als nächstes wurde eine Hochdosis-UVA-Belastung simuliert und deren Einfluss auf die Schutzaktivität der Cu/Zn SOD untersucht.
Hierfür wurden abdominelle Hautpräparate einer UVA-Dosis von 120 J/cm^2 ausgesetzt. Da es sich hierbei um eine hohe Strahlendosis handelt, wurde dieser Versuch *ex vivo* durchgeführt.

Die gemessenen Werte sind als Mittelwerte angegeben und in der Abbildung 16 grafisch dargestellt.

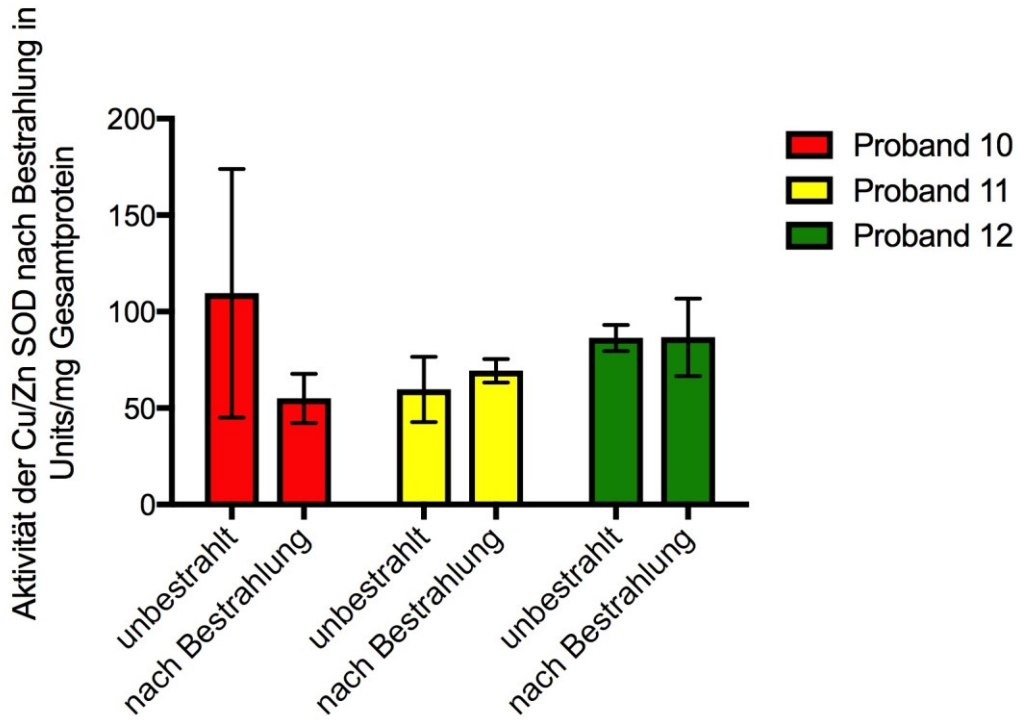

Abb. 16: Aktivität der Cu/Zn SOD vor und nach einer Hochdosisbestrahlung mit UVA

Darstellung der Aktivität der Cu/Zn SOD vor und nach einer UVA-Bestrahlung mit 120 J/cm^2 bei abdominellen Hautpräparaten, die 2000-2001 an der Universitätsklinik Köln erhoben wurden. Jede Säule stellt den Mittelwert der Aktivität der Cu/Zn SOD vor Bestrahlung (linke Säule) sowie nach Bestrahlung (rechte Säule) dar. Zusätzlich wurde die Standardabweichung angegeben.

Cu/Zn SOD = Kupfer-Zink-Superoxiddismutase, J = Joule

Bereits vor der Bestrahlung sieht man wiederum, dass die abdominellen Hautpräparate der Probanden eine variable Aktivität der Cu/Zn SOD aufweisen. Sie reichte von 59,67 Units/mg Gesamtprotein bis 109,50 Units/mg Gesamtprotein.

Auch nachdem die Hautpräparate den 120 J/cm^2 exponiert wurden, ergab sich bei dem Aktivitätsmuster der Cu/Zn SOD kein uniformes Bild. Bei Proband 10 fiel die Aktivität von 109,50 Units/mg Gesamtprotein auf 55,00 Units/mg Gesamtprotein, dagegen stieg die Aktivität bei Proband 11 von 59,67 Units/mg Gesamtprotein auf 69,33 Units/mg Gesamtprotein an. Bei Proband 12 veränderte sich die Cu/Zn SOD

Aktivität kaum, lediglich wurde eine geringe Zunahme von 0,34 Units/mg Gesamtprotein verzeichnet.
Die Cu/Zn SOD Aktivität ist also bei verschiedenen Menschen unterschiedlich robust gegenüber einer hohen UVA-Belastung. Analog zur vorher erhobenen interindividuell unterschiedlichen Reaktion im Zeitverlauf reagiert die Haut von verschiedenen Menschen *ex vivo* auch deutlich unterschiedlich auf eine Hochdosis-UVA-Bestrahlung.

3.6 8-OHdG Gehalt in einer Saugblasenflüssigkeit nach einer UVA-Bestrahlung

Nach Charakterisierung des Reaktionsmusters des antioxidativen Biomarkers Cu/Zn SOD wurde nun der durch UVA-Strahlung hervorgerufene Zellschaden anhand des DNA-Oxidationsmarkers 8-OHdG untersucht.
Es wurde analysiert wie sich der 8-OHdG Gehalt der Haut bei unterschiedlicher UVA-Exposition verändert.
Eine einmalige UVA-Exposition mit zweifacher PPD wurde mit einer dreifachen repetitiven Bestrahlung (3 x 0,75 PPD) verglichen. An diesem Versuch nahmen insgesamt 19 Probanden teil.
Gemessen wurde die interstitielle Flüssigkeit der Epidermis anhand von Saugblasenflüssigkeit.

Die Abbildung 17 demonstriert die Messergebnisse nach einer einmaligen Bestrahlung mit zweifacher PPD:

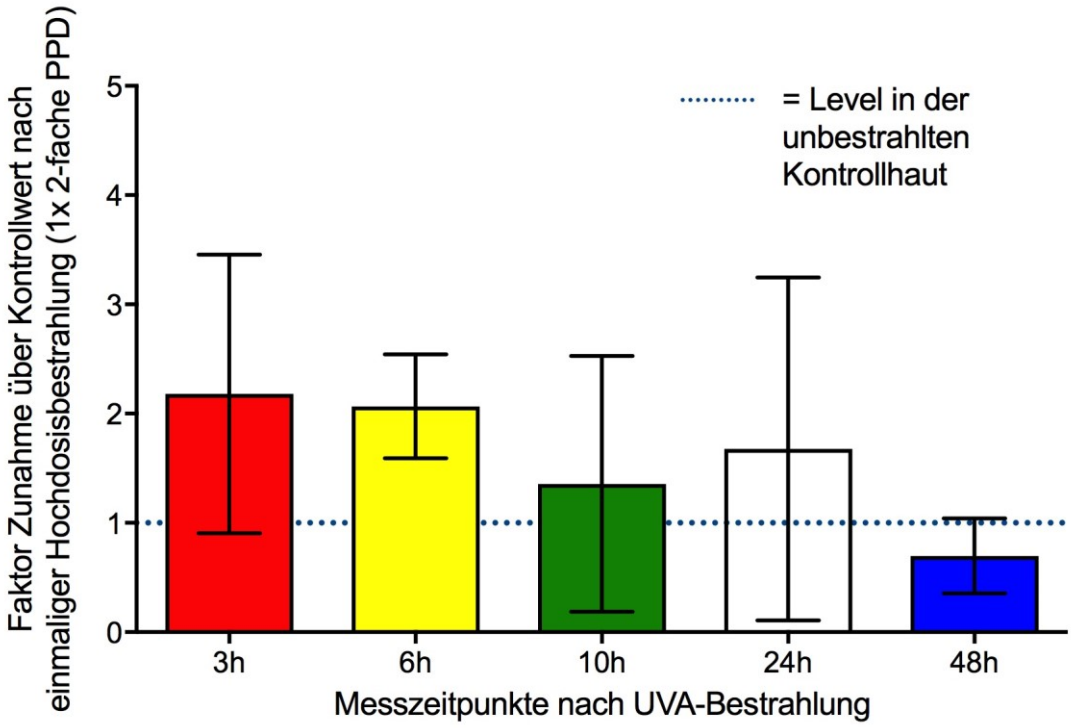

Abb. 17: Zeitliche Entwicklung von 8-OHdG nach einer UVA-Hochdosisbestrahlung mit zweifacher PPD

Die Abbildung zeigt den Gehalt an 8-OHdG in Saugblasenflüssigkeit nach einer UVA-Hochdosisbestrahlung mit zweifacher PPD. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte 3 Stunden, 6 Stunden, 10 Stunden, 24 Stunden sowie 48 Stunden nach der UVA-Exposition. Für eine bessere Darstellung und Vergleichbarkeit wurden die Werte normiert. Der Ausgangswert der unbestrahlten Kontrollhaut wurde mit 1 gleichgesetzt und die zu den Messzeitpunkten erhobenen Werte wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Als farbige Säule wurde der Mittelwert der erhobenen 8-OHdG Konzentration zum jeweiligen Messzeitpunkt dargestellt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Standardabweichung. Die blaue Punkte-Linie entspricht dem Gehalt an 8-OHdG in unbestrahlter Haut. An diesem Bestrahlungsschema haben 11 Probanden der Universitätsklinik Köln im Zeitraum 2000-2001 teilgenommen.

8-OHdG = 8-Hydroxydesoxyguanosin, UVA = ultraviolett A, PPD = persistent pigmentation dose, h = Stunde

Nach der einmaligen Hochdosisbestrahlung (zweifache PPD) zeigte sich ein Konzentrationsanstieg von 8-OHdG und somit eine Schädigung der DNA durch UVA.

Bereits drei Stunden nach Beendigung der Bestrahlung wurde der maximale Anstieg der 8-OHdG Konzentration beobachtet. Der Mittelwert des Konzentrationsanstieges lag zu diesem Messzeitpunkt bei dem 2,18-fachen des Ausgangswertes, die Standardabweichung betrug +/-1,28.

Sechs Stunden nach Ende der Bestrahlung wurde ein durchschnittlicher Konzentrationsanstieg von dem 2,07-fachen +/-0,48 des Ausgangswertes von unbestrahlter Haut erhoben.
Zehn Stunden nach Bestrahlung erreichte der Mittelwert das 1,35-fache des Ausgangswertes von unbestrahlter Haut mit einer Standardabweichung von +/-1,17.
Im weiteren Verlauf fand sich 24 Stunden nach der UVA-Exposition eine durchschnittliche 8-OHdG Konzentrationserhöhung auf das 1,68-fache des Ausgangswertes. Die Standardabweichung zu diesem Zeitpunkt betrug +/-1,57.
Erst 48 Stunden nach Ende der Bestrahlung erreichte die 8-OHdG Konzentration wieder das Niveau von unbestrahlter Haut. Der Mittelwert lag zu diesem Messzeitpunkt bei dem 0,70-fachen +/-0,34 des Ausgangswertes von unbestrahlter Haut.

Um diesen Verlauf nach einmaliger Hochdosis-Exposition mit einer UVA-Belastung nach repetitiver Niedrigdosis-Exposition zu vergleichen wurden weitere Probanden dreimalig im Abstand von 12 Stunden mit einer niedrigeren Dosis (jeweils 0,75-fache PPD) bestrahlt.
Diese Ergebnisse werden in Abbildung 18 dargestellt:

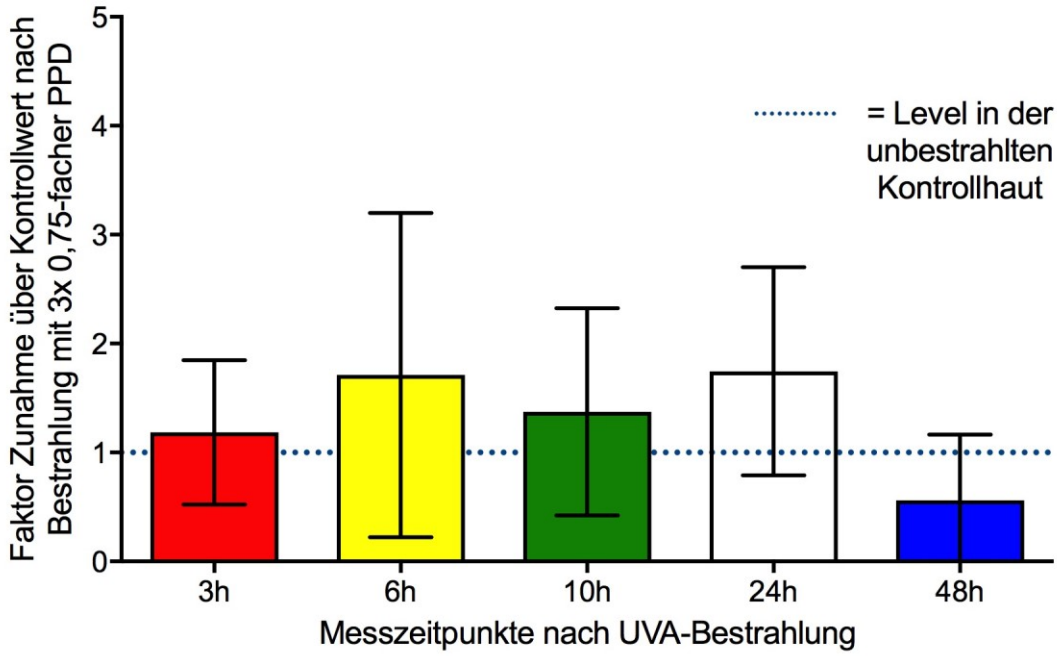

Abb. 18: Änderung von 8-OHdG nach einer dreimaligen Bestrahlung mit 0,75-facher PPD im 12 Stunden Abstand

Die Abbildung zeigt den Gehalt an 8-OHdG in Saugblasenflüssigkeit nach einer dreimaligen UVA-Bestrahlung mit 0,75-facher PPD im 12 Stunden Abstand. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte 3 Stunden, 6 Stunden, 10 Stunden, 24 Stunden sowie 48 Stunden nach der UVA-Exposition. Für eine bessere Darstellung und Vergleichbarkeit wurden die Werte normiert. Der Ausgangswert der unbestrahlten Kontrollhaut wurde mit 1 gleichgesetzt und die zu den Messzeitpunkten erhobenen Werte wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Als farbige Säule wurde der Mittelwert der erhobenen 8-OHdG Konzentration zum jeweiligen Messzeitpunkt dargestellt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Standardabweichung. Die blaue Punkte-Linie entspricht dem Gehalt an 8-OHdG in unbestrahlter Haut. An diesem Versuchsteil nahmen 14 Probanden der Universitätsklinik Köln im Zeitraum 2000-2001 teil.

8-OHdG = 8-Hydroxydesoxyguanosin, UVA = ultraviolett A, PPD = persistent pigmentation dose, h = Stunde

Nach der repetitiven UVA-Bestrahlung mit 0,75-facher PPD im Abstand von 12 Stunden manifestierte sich ebenso ein Anstieg der 8-OHdG Konzentration als Ausdruck einer DNA-Schädigung.

Drei Stunden nach Abschluss der repetitiven Bestrahlung zeigte sich ein durchschnittlicher Konzentrationsanstieg auf das 1,19-fache des Ausgangswertes von unbestrahlter Haut. Die Standardabweichung beläuft sich zu diesem Messzeitpunkt auf +/-0,66.

Sechs Stunden nach Ende der letzten Bestrahlung betrug die durchschnittliche 8-OHdG Konzentrationserhöhung das 1,71-fache +/-1,49 des Ausgangswertes von unbestrahlter Haut.
Zehn Stunden nach Abschluss der Bestrahlung wurde eine durchschnittliche 8-OHdG Konzentrationserhöhung von dem 1,37-fachen des Ausgangswertes von unbestrahlter Haut erreicht mit einer Standardabweichung von +/-0,95.
24 Stunden nach Ende der Bestrahlung wurde die maximale, durchschnittliche 8-OHdG Konzentrationserhöhung gemessen. Diese betrug das 1,75-fache des Ausgangswertes von unbestrahlter Haut. Die Standardabweichung betrug +/-0,96.
Nach 48 Stunden erreichten die Werte wieder das Niveau von unbestrahlter Haut. Die durchschnittliche Konzentrationsänderung belief sich auf das 0,56-fache +/-0,60 des Ausgangswertes von unbestrahlter Haut.

In der Summe reagierten die Probanden in den beiden Versuchsreihen mit einem ähnlichen Muster, das heißt mit einem Anstieg der 8-OHdG Konzentration im erhobenen Messzeitraum. Es zeigte sich, dass *in vivo* durchaus relevante DNA-Schäden bei einzelnen Probanden auftreten, die mindestens 24 Stunden lang nach der letzten UVA-Exposition nachweisbar bleiben.
Bei der Hochdosis-Exposition findet sich in unserer Messreihe der maximale 8-OHdG Konzentrationsanstieg drei Stunden nach der Bestrahlung. Der durch die Exposition entstandene DNA-Schaden ist auch 24 Stunden nach Bestrahlung nachweisbar. Erst 48 Stunden nach Exposition fällt die 8-OHdG Konzentration auf bzw. unter den Ausgangswert der unbestrahlten Haut ab.
Im Vergleich dazu zeigt sich in unseren Messungen bei der repetitiven Niedrigdosis-Exposition ein verzögerter Anstieg der 8-OHdG Konzentration. Erst nach sechs Stunden lässt die maximale Konzentrationserhöhung nachweisen. Diese Erhöhung lässt sich ebenfalls bis 24 Stunden nach Exposition nachweisen. Analog der Hochdosisexposition erreicht bzw. unterschreitet die 8-OHdG Konzentration nach 48 Stunden den Ausgangswert der unbestrahlten Haut.

Nach der UV-induzierten Schädigung der DNA in der Haut wurde ein zweiter Schadensort, die Zellmembranen, genauer untersucht. Der oxidative Schaden in diesem Hautkompartiment wurde *in vivo* mittels des Markers 8-Isoprostan analysiert.

3.7 8-Isoprostan Konzentration nach einer UVA-Bestrahlung mit einer Zeitkinetik

Um zu untersuchen wie sich 8-Isoprostan, ein Metabolit der Lipidperoxidation, nach einer UVA-induzierten Zellmembranschädigung verhält, wurde bei fünf Probanden ein Bestrahlungsfeld im Bereich der Glutealregion mit einer zweifachen PPD (60 J/cm^2 bis 80 J/cm^2) bestrahlt. 30 Minuten, 90 Minuten, 120 Minuten und 240 Minuten nach Ende der Bestrahlung wurden Hautproben entnommen und auf deren 8-Isoprostan Gehalt untersucht.

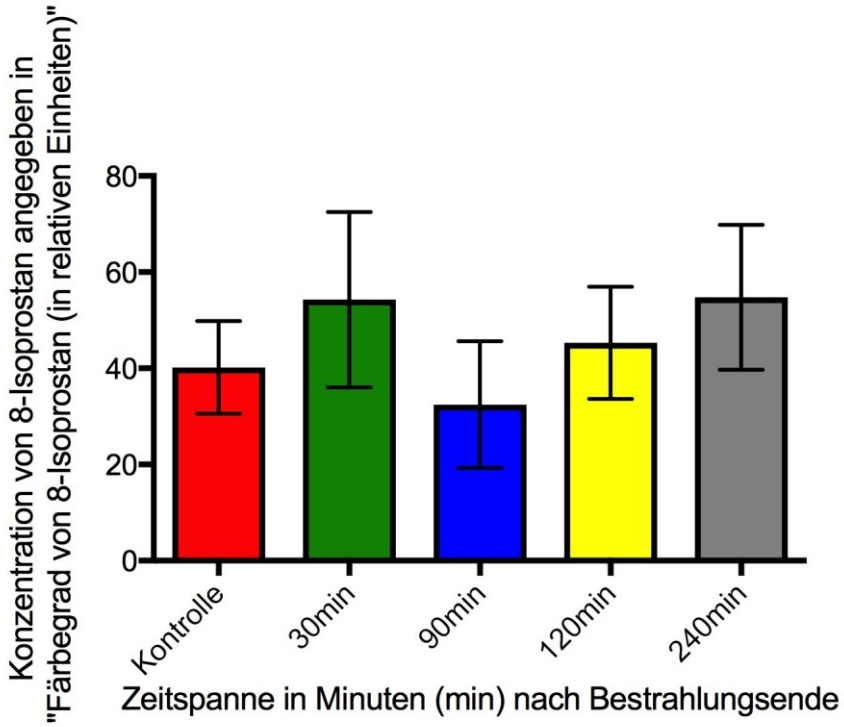

Abb. 19: Gehalt an 8-Isoprostan nach einer UVA-Bestrahlung mit zweifacher PPD

Die Grafik zeigt den zeitlichen Verlauf der Konzentration von 8-Isoprostan in Glutealhaut nach einer UVA-Bestrahlung mit zweifacher PPD. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte vor der UVA-Exposition sowie 30 Minuten, 90 Minuten, 120 Minuten und 240 Minuten nach Abschluss der Bestrahlung. Zum jeweiligen Messzeitpunkt wurde der Mittelwert der 8-Isoprostan Konzentration als farbige Säule dargestellt. Zudem wurde die Standardabweichung angegeben. An diesem Versuch nahmen fünf Probanden der Universitätsklinik Ulm (2004) teil.

UVA = ultraviolett A, PPD = persistent pigmentation dose

Die Messergebnisse sind bei diesem Versuch als Mittelwert +/- Standard-abweichung angegeben.

Bei den fünf teilnehmenden Probanden betrug der natürlich vorkommende Gehalt an 8-Isoprostan in unbestrahlter Haut 40,17 relative Einheiten (RE) +/- 9,63.
Bereits 30 Minuten nach Bestrahlungsende wurde eine deutliche Konzentrationssteigerung auf durchschnittlich 54,29 RE +/- 18,23 sichtbar. Der Höchstwert wurde 240 Minuten nach Abschluss der Bestrahlung mit durchschnittlich 54,78 RE +/- 15,06 erreicht. Es fällt auf, dass 90 Minuten nach der Bestrahlung der Gehalt an 8-Isoprostan unter den Wert des natürlich vorkommenden 8-Isoprostan in unbestrahlter Haut fällt, dann aber jedoch wieder ansteigt.
Es entsteht also *in vivo* ein sofortiger oxidativer Membranschaden nach einer mittleren UVA-Dosis, der nach vier Stunden immer noch messbar ist.

3.8 8-Isoprostan Konzentration nach einer UVA-Bestrahlung mit einer Dosiskinetik

Um zu untersuchen ob dieser oxidative Membranschaden direkt Dosis-korreliert ist wurde in diesem letzten Versuch das gluteale Bestrahlungsfeld der drei teilnehmenden Probanden mit unterschiedlichen Strahlungsintensitäten (30 J/cm^2, 90 J/cm^2 und 120 J/cm^2) bestrahlt. 30 Minuten nach Ende der Bestrahlung wurden Proben entnommen um zu untersuchen ob der Anstieg der 8-Isoprostan Konzentration mit der steigenden UVA-Dosis korreliert.
Das Ergebnis dieses Versuches zeigt die Abbildung 20.

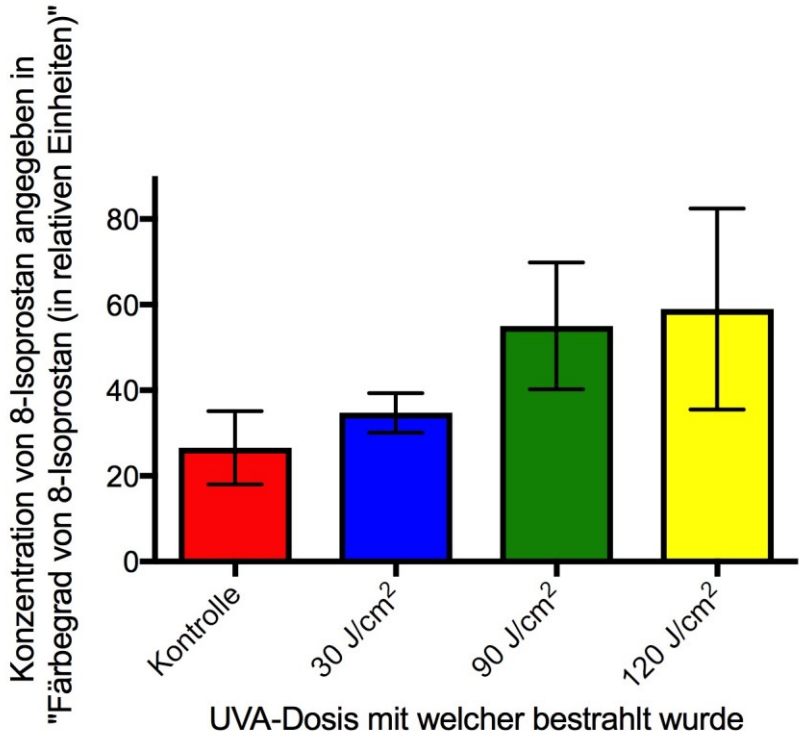

Abb. 20: 8-Isoprostan Gehalt nach einer UVA-Bestrahlung mit ansteigender Dosis

Das Diagramm zeigt die 8-Isoprostan Konzentration nach einer UVA-Bestrahlung mit ansteigender Dosis. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte sowohl vor der Exposition (Kontrolle, erste Säule) als auch nach der UVA-Bestrahlung mit jeweils 30 J/cm^2, 90 J/cm^2 und 120 J/cm^2. Jede Säule gibt den Mittelwert der 8-Isoprostan Konzentration nach der jeweiligen Bestrahlungsdosis an. Zusätzlich zum Mittelwert wurde die Standardabweichung angegeben. An diesem Versuch nahmen drei Probanden der Universitätsklinik Ulm (2004) teil.

UVA = ultraviolett A, J = Joule

Die Messergebnisse wurden bei diesem Versuch als Mittelwert +/- Standard-abweichung angegeben. Bei den drei Probanden, die an diesem Versuch teilnahmen, betrug die natürlich vorkommende 8-Isoprostan Konzentration 26,57 RE +/- 8,54.

Bereits bei einer Bestrahlungsintensität von 30 J/cm^2 stieg die Konzentration von 26,57 RE auf 34,75 RE +/- 4,61. Der Gehalt an 8-Isoprostan stieg parallel mit der steigenden UVA-Dosis bis zum maximalen Wert von 58,99 RE +/- 23,48 bei einer Bestrahlungsdosis von 120 J/cm^2 an.

Ab einer Bestrahlungsdosis von 90 J/cm^2 kann man eine Sättigung erkennen. Trotz einer weiteren Dosissteigerung von 90 J/cm^2 auf 120 J/cm^2 kommt es zum

gewählten Messzeitpunkt zu keiner nennenswerten Konzentrationssteigerung des Lipidperoxidationsmarkers 8-Isoprostan.

4. Diskussion

In den letzten 30 Jahren ist durch natürliche Faktoren wie das Ozonloch und Zivilisationsfaktoren wie vermehrtes Reisen, Freizeitaktivitäten und Sonnenstudiobesuche, die UV-Exposition der breiten Bevölkerung angestiegen (Xu et al. 2001, Leiter und Garbe 2008 & Zhang et al. 2012).
Parallel dazu stiegen UV-assoziierte Hauterkrankungen, darunter vor allem Hauttumore, an (Diepgen and Mahler 2002 & Narayanan et al. 2010 & Kanavy and Gerstenblith 2011). Da 95 % der natürlichen UV-Belastung durch UVA hervorgerufen wird (Ibrahim and Brown 2008) und UVA maßgeblich an der Photokarzinogenese und Hautalterung beteiligt ist (Tewari 2012), ist es sehr wichtig, dass man versucht die Mechanismen individueller UVA-Empfindlichkeit zu analysieren und mögliche Biomarker für die Stressreaktion der Haut näher zu charakterisieren. Gerade für den UVA-Bereich gab es bisher wenige *in vivo* Untersuchungen.

Um die individuelle Reaktion der Haut auf eine UVA-Exposition zu charakterisieren ist es wichtig, dass man die klinische Reaktion mit der molekularen Reaktion korreliert. Es wurden deshalb Probanden mit einer entsprechenden standardisierten Lichttestung vermessen und neben den etablierten Parametern IPD und PPD auch konstitutionelle Marker wie Haarfarbe, Augenfarbe und Teint erhoben. Diese Ergebnisse wurden daraufhin analysiert ob es hierbei zu einer Korrelation mit der Hauttypeinstufung nach Fitzpatrick kommt.
Wie schon 2010 Mette Henriksen Ravnbak in ihrem Review „objective determination of Fitzpatrick skin type“ zeigte, konnte in den hier vorliegenden Untersuchungen ebenso keine Korrelation zwischen Hauttyp und UVA-Lichtempfindlichkeit festgestellt werden (Ravnbak 2010). Vielmehr ließ sich herausarbeiten, dass sowohl bei den klinischen Merkmalen der Probanden (Haarfarbe, Augenfarbe und Teint) als auch bei den etablierten Parametern IPD und PPD eine Überlappung der Hauttypen II und III vorliegt (siehe Abbildung 5 bis Abbildung 12), so dass anhand dieser Merkmale eine Einstufung in die Hauttypen nach Fitzpatrick nicht präzise möglich ist.
Insbesondere die Ergebnisse der Erhebung der Parameter IPD und PPD bestätigen die Resultate der Untersuchungen von K. Gethöffer, welche in ihrer

Arbeit ebenfalls eine Überlappung bei den Hauttypen II und III in Bezug auf die IPD und PPD feststellen konnte (Gethöffer 2010).
Interessanterweise werden aber unter anderem gerade die konstitutionellen Merkmale Haarfarbe, Augenfarbe und Teint zur Bestimmung des Hauttyps nach Fitzpatrick herangezogen (Fitzpatrick 1988), obwohl bereits in mehreren Studien die Zuverlässigkeit der Fitzpatrick Hauttypeinteilung in Bezug auf die UV-Empfindlichkeit in Frage gestellt wurde (Ravnbak 2010 & Falk 2014).
Wie ungenau diese zumindest in Bezug auf die Empfindlichkeit der Haut gegenüber UVA ist, zeigen unsere Untersuchungen deutlich.

Von der klinischen Situation ausgehend wurden mögliche Biomarker für die UVA-Empfindlichkeit untersucht. Dazu wurden sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* Versuche durchgeführt.
In diesen Experimenten wurde die Cu/Zn SOD als Parameter für den enzymatischen Schutz vor einer Schädigung durch UVA-Strahlung näher charakterisiert und darüberhinaus die durch UVA-Strahlung verursachten oxidativen Schäden auf DNA- und auf Lipid-Ebene analysiert.

Die Cu/Zn SOD wurde für die Versuche ausgewählt, da sie ein wichtiges, erstes Enzym der antioxidativen Enzymkette darstellt und daher als Marker für oxidative Schäden durch UVA dienen könnte.
Als einer der ersten Schritte wurde der Gehalt der Cu/Zn SOD in unbestrahlter Haut bestimmt. Es zeigten sich hierbei deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden. Um die Präzision der Methodik zu überprüfen wurde daher die intra-assay Varianz bestimmt, welche sich als gering darstellte, so dass nicht von einer Messungenauigkeit ausgegangen werden kann. Viel mehr wird deutlich, dass die Konzentration der Cu/Zn SOD in der Haut variiert.
Um genauere Aussagen über die Konzentration der Cu/Zn SOD in Abhängigkeit des Hauttyps machen zu können, müssten hierfür ein größeres Probanden-kollektiv untersucht werden.

Als nächstes wurde untersucht wie sich die Aktivität der Cu/Zn SOD nach einer UVA-Bestrahlung *in vivo* mit einer physiologischen Dosis verhält. Ob es zu einer Aktivitätsminderung kommt, was auf eine Schädigung bzw. Zerstörung der Cu/Zn

SOD durch UVA-Strahlung hinweisen würde, oder ob es zu einer Steigerung der Aktivität im Sinne eines adaptiven Schutzmantels der Haut kommt. Bei den Probanden ließ sich zu keinem der drei Messzeitpunkten eine uniforme Tendenz der Cu/Zn SOD Aktivität detektieren (siehe Abbildung 15).

Diese Ergebnisse ergänzen bereits veröffentlichte *in vitro* Studien zur Mn SOD, einen anderen Subtyp der antioxidativ wirkenden Superoxiddismutasen. So entdeckte Arndt Poswig in Fibroblastenkulturen, dass es *in vitro* nach einer UVA-Bestrahlung zu einer zeit- und dosisabhängigen Aktivitätssteigerung der Mn SOD, ein mitochondrial lokalisiertes Enzym der antioxidativen Enzymkette, kommt und man demnach im Zusammenhang mit der Mn SOD jedenfalls *in vitro* von einem adaptiven, induzierbaren enzymatischen Schutz der Haut ausgehen kann. Er zeigte, dass es 3 Stunden und 12 Stunden nach einer UVA-Bestrahlung mit einer Intensität von 15 J/cm^2 und 30 J/cm^2 zu einer Aktivitätssteigerung kam, welche jedoch 24 Stunden nach der Exposition wieder auf den Basislevel abfiel. Zusätzlich kam es nach einer repetitiven low-dose UVA-Exposition mit 20 J/cm^2 zu einem Anstieg der Mn SOD Aktivität. Analog zu unserer Studie wurde von Arndt Poswig für die Mn SOD *in vitro* gezeigt, dass die spontane Aktivität der Mn SOD starken interindividuellen Schwankungen unterliegt (Poswig et al. 1999). In diesem Punkt scheint es Parallelen zu unseren Ergebnissen zu geben.

Im Kontrast zu den Erkenntnissen von Arndt Poswig veröffentlichte Lale Naderi-Hachtroudi eine Studie in der sie zeigte, dass es nach einer UVB-Bestrahlung von Fibroblastenkulturen mit 30 mJ/cm^2 zu keiner Steigerung der Mn SOD Aktivität innerhalb der ersten 24 Stunden kam (Naderi-Hachtroudi et al. 2002).

Letztendlich ergänzen unsere Untersuchungen die *in vitro* Versuche, wie sie von Arndt Poswig und Lale Naderi-Hachtroudi gemacht wurden. Unsere Ergebnisse machen deutlich, dass die *in vivo* Situation viel komplexer ist und sich keinesfalls analog zu den Zellkulturen mit kleinen Fallzahlen klare uniforme Reaktionen auf den Stressor UVA finden lassen.

Im nächsten Schritt wurde analysiert ob sich die Cu/Zn SOD durch eine UVA-Hochdosisbestrahlung mit 120 J/cm^2 schädigen lässt und ob es somit zu einer Aktivitätsminderung der Cu/Zn SOD kommt. Diese Dosis entspricht *in vivo* dem was im Rahmen einer UVA-Therapie bei einer schweren Neurodermitis als therapeutische Hochdosis verwendet wird (Krutmann et al. 1998) und befindet sich

somit im therapeutischen Dosisbereich. Die erhobenen Ergebnisse zeigen, dass sowohl vor der Bestrahlung als auch nach der Bestrahlung die Werte der Cu/Zn SOD Aktivität interindividuell stark variieren (siehe Abbildung 16).
Ein einheitliches Reaktionsmuster auf die UVA-Hochdosisbestrahlung scheint es nicht zu geben. Eine vollständige Zerstörung des enzymatischen Schutzmantels scheint bei solchen Einmaldosen unwahrscheinlich zu sein, viel mehr zeigt sich eine Widerstandsfähigkeit der Cu/Zn SOD.
In einem Mausmodell konnte bereits 1997 Evelson et al. diese Widerstandsfähigkeit der Superoxiddismutase gegenüber der Noxe UVA-Strahlung nachweisen. In dieser Untersuchung wurde die Haut von Mäusen einer UVA-Bestrahlung mit 4 mJ/cm^2 ausgesetzt und daraufhin untersucht wie sich die Aktivität der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase und Katalase verhält. Erst nach einer Bestrahlungszeit von zwei Stunden zeigte sich eine Reduktion der Enzymaktivität von 40 % bei der Superoxiddismutase und eine Reduktion von 45 % bei der Katalase (Evelson et al. 1997). Auch wenn es sich hierbei um eine geringe Bestrahlungsdosis handelt, kann man daraus schließen, dass die antioxidativen Enzyme bis zu einer Expositionsdauer von zwei Stunden robust gegen die schädigende Wirkung der UVA-Strahlung sind.
Letztendlich können wir aus den erhobenen Daten und den oben genannten Veröffentlichungen schließen, dass die Cu/Zn SOD bei UVA-Dosen im therapeutischen Bereich stabil ist. Da jedoch die Cu/Zn SOD nur ein Enzym von vielen im Entgiftungsprozess ist und ihr andere Enzyme nachgeschaltet sind, müsste man weiter Untersuchungen initiieren um eine valide Aussage über die Empfindlichkeit der gesamten antioxidativen Schutzkette machen zu können.

Als nächstes wurde *in vivo* die oxidative Schädigung der DNA durch UVA-induzierte ROS analysiert.
Als Marker für die oxidative Schädigung von DNA diente der Basenmarker 8-OHdG, welcher in Saugblasenflüssigkeit gemessen wurde. In den letzten Jahren hat sich 8-OHdG als Marker für oxidativen Stress etabliert, dieser kann im Rahmen der DNA-Reparatur im Urin nachgewiesen werden (Wu et al. 2004). In mehreren Studien wurden auch erhöhte Werte in einigen Tumoren wie dem invasiven duktalen Karzinom der Mamma, dem Plattenepithelkarzinom der Lunge

sowie dem Prostatakarzinom nachgewiesen (Toyokuni et al. 1995 & Hideaki et al. 2004).

Bereits 1999 ging Ahmed et al. einer ähnlichen Fragestellung jedoch bezogen auf UV-Strahlung mit einem Spitzenemissionswert im UVB-Bereich (305 nm) nach. Er untersuchte den zeitlichen Verlauf der Generierung und des Abbaus von 8-OHdG in der menschlichen Epidermis nach einer UV-Bestrahlung. Bei diesem Versuch wurde die 8-OHdG Konzentration in der humanen Epidermis zu 11 Messzeitpunkten von 30 Minuten bis 168 Stunden nach einer UV-Bestrahlung bestimmt. Drei Stunden nach der Exposition wurde die höchste 8-OHdG Konzentration detektiert, welche 72 Stunden bis 96 Stunden nach Expositionsende wieder den Ausgangswert erreichte (Ahmed et al. 1999). Man kann demzufolge davon ausgehen, dass die 8-OHdG Konzentrationserhöhung nach einer UV-Bestrahlung einer Zeitkinetik über maximal 72 Stunden bis 96 Stunden folgt.

In unseren Versuchen konnte mit UVA und einer Probandenzahl von 19 Probanden in beiden Versuchsserien ebenfalls eine temporäre 8-OHdG Konzentrationssteigerung in der interstitiellen Zellflüssigkeit nach einer UVA-Exposition nachgewiesen werden. Auch bei uns zeigte sich, parallel zu den Daten von Ahmed et al., in der Versuchsreihe mit einer UVA-Hochdosisbestrahlung (2-fache PPD) der maximale 8-OHdG Konzentrationsanstieg nach drei Stunden. Bei der repetitiven Niedrigdosisbestrahlung (3x 0,75-fache PPD) zeigt sich dieser Effekt etwas zeitlich verzögert nach sechs Stunden, jedoch im Verlauf ähnlich. Bei beiden Versuchsreihen konnte eine erhöhte 8-OHdG Konzentration bis 24 Stunden nach Expositionsende beobachtet werden. Zudem zeigte sich, dass die 8-OHdG Konzentration als Zeichen der DNA-Schädigung 48 Stunden nach Expositionsende wieder das Niveau von unbestrahlter Haut erreichte. Man kann daher vermuten, dass der Basenexzisionsmechanismus innerhalb der ersten 48 Stunden nach Exposition aktiv ist und den DNA-Schaden, welcher durch ROS entstanden ist, abbaut.

Einen ähnlichen Ansatz, jedoch für den Nukleotid-Exzisionsmechanismus untersuchte Hemminiki et al. In deren Studie wurde die Reparaturrate von CPDs (T=C und T=T) und 6-4 PPs (T-C und T-T) nach einer UV-Bestrahlung mit 40 mJ/cm^2 von Gesäßhaut an 17 Probanden untersucht. Dabei zeigten sich im Bezug

auf die Reparaturrate nicht nur Unterschiede zwischen den einzelnen DNA-Läsionen sondern auch Differenzen zwischen den Hauttypen I und IV.
48 Stunden nach der Bestrahlung lag die Reparaturrate der 6-4 PPs (T-C und T-T) unabhängig des Hauttyps bei über 99 %, drei Wochen nach der Exposition waren alle Läsionen behoben. Bei den CPDs dagegen zeigte sich eine verzögerte Reparaturrate. Nach 48 Stunden zeigten die Probanden mit dem Hauttyp I eine Reparaturrate von 75,8% bis 77,8% (TT=C) bzw. 54,1% bis 67,3% (TT=T). Bei den Probanden mit dem Hauttyp IV ergab sich eine Reparaturrate von 70,7% (TT=C) bzw. 44,6% (TT=T). Nach drei Wochen waren bei beiden Hauttypen analog zu den 6-4 PPs keine TT=C Läsionen mehr nachweisbar. Für die TT=T Läsion ergab sich eine Reparaturrate von 91% bis 97,6% bei den Probanden mit dem Hauttyp I und eine Reparaturrate von 91,1% bei den Probanden mit dem Hauttyp IV.
Man kann daher aus dieser Arbeit schließen, dass innerhalb der ersten drei Wochen nahezu die gesamten direkten DNA-Schäden durch den Nukleotid-Exzisionsmechanismus behoben werden (Hemminki et al. 2002).
Ergänzend dazu fanden Zhao et al. heraus, dass sich die Reparaturrate der CPDs in gesunder Haut, bei malignen Melanomen und Pigmentnaevi bei einer UV-Bestrahlung mit 40 mJ/cm^2 nicht signifikant unterscheidet (Zhao et al. 2002).

Um den in unserer Arbeit ermittelten Zeitabschnitt von 48 Stunden, in welchem die oxidative DNA-Schädigung abgebaut wird, zu bestätigen, bedarf es weitere *in vivo* Studien mit einer größeren Probandenzahl sowie einem längeren und genaueren Beobachtungszeitraum mit dichteren Messzeitintervallen. Damit kann der Zeitpunkt genauer definiert werden in welchem der Basenexzisionsmechanismus aktiv ist. Es bestünde dann die Möglichkeit die körpereigenen Reparatur-mechanismen zu unterstützen und so einer Photokarzinogenese entgegen zu wirken.
Eine Möglichkeit hierfür wäre die Behandlung mit Silymarin, ein Wirkstoffkomplex der Mariendistel (Sylibum marianum) bestehend aus Silibin, Silicristin und Silidianin. Sylimarin wird heute zur unterstützenden Behandlung von chronisch-entzündlichen Lebererkrankungen und toxischen Leberschäden eingesetzt (Féher and Lengyel 2012). Svobodova et al. entdeckten 2007, dass Silymarin bei HaCaT Zellen *in vitro* zu einer Verminderung der UVA-induzierten Schäden führt

(Svobodova et al. 2007). In dieser Studie wurden HaCaT Zellen mit UVA in einer Intensität von 20 J/cm^2 bestrahlt und währenddessen mit Silymarin behandelt. Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verminderung der UVA-induzierten ROS. Insbesondere wurde eine Reduktion des Verbrauchs der Zellspeicher an Glutathion und eine Verminderung der Lipidperoxidation gemessen. Bei einer Behandlung mit Silymarin nach einer UVA-Exposition wurde eine Verringerung der UVA-induzierten DNA-Einzelstrangbrüche entdeckt. Demnach führt sowohl eine präventive als auch eine post-expositionelle Behandlung mit Silymarin zu einer Reduktion der UVA-induzierten Schäden *in vitro*. In weiteren Studien müsste überprüft werden ob sich diese positiven Effekte auch *in vivo* erzielen lassen.

Eine Korrelation zwischen Bestrahlungsdosis und 8-OHdG Konzentration wie Liardet et al. und Ikehata et al. sie nachweisen konnten, lies sich in unseren Versuchen nicht eindeutig nachweisen (Liardet et al. 2001 & Ikehata et al. 2008). Dazu waren die Unterschiede in den von uns gemessenen 8-OHdG Konzentrationen über die Zeitspanne (drei Stunden bis 48 Stunden) zwischen der Hochdosisbestrahlung und der repetitiven Niedrigdosisbestrahlung zu gering. Die kumulative Gesamtdosis in beiden Versuchsreihen lag etwa im selben Bereich (2- bzw. 2,25-fache PPD). Dies ist eventuell der Grund für die ähnlichen Ergebnisse.
Liardet et al. konnten bereits 2001 eine Dosis-abhängige Konzentrationserhöhung von 8-OHdG *in vivo* nach einer UV-Bestrahlung mit Sonnenlichtspektrum nachweisen. Dabei zeigte sich nach einer Bestrahlung der Gesäßhaut von vier Probanden mit ½-facher und 1-facher MED eine Dosis-abhängige 8-OHdG Konzentrationssteigerung (Liardet et al. 2001).
Analog zu dieser Studie konnten Ikehata et al. eine UVA-Dosis-abhängige Konzentrationszunahme in der Epidermis und Dermis von transgenen Mäusen nach einer UVA1-Bestrahlung mit 0,85-3 MJ/m^2 nachweisen (Ikehata et al. 2008).

Wie die oben erwähnten Arbeiten sowie unsere Versuche zeigten, ist die Zellschädigung durch UVA und ROS sehr komplex. UVA beeinflusst neben dem Genom auch die Integrität der Zellmembran und stört damit die Hämostase der Hautzelle empfindlich (Nechifor et al. 2012).

Deswegen haben wir uns noch zum Schluss der Versuche mit der Schädigung der Zellmembran durch UVA-generierte Sauerstoffspezies befasst. Als Marker für einen durch photooxidativen Stress erzeugten Zellmembranschaden wurde 8-Isoprostan, ein Endprodukt der Lipidperoxidation, herangezogen. 8-Isoprostan wurde bereits im Zusammenhang mit interstitiellen Lungenerkrankungen, Arteriosklerose, Asthma, chronischen Lebererkrankungen, ischämischen Herz-muskelerkrankungen und zahlreichen anderen Erkrankungen als Marker für oxidativen Stress verwendet (Montuschi et al. 2004 & Schneider et al. 2006).

Es galt zu überprüfen ob es *in vivo* bei klinisch bedeutsamen UVA-Dosen eine relevante oxidative Zellmembranschädigung gibt und ob diese Zeit- bzw. Dosis-korreliert ist. Wie schon in den vorherigen Untersuchungen lässt sich keine Zeitkinetik nach der UVA-Exposition nachweisen. Betrachtet man jedoch die Messzeitpunkte insgesamt, so kann man schließen, dass der UVA-induzierte Membranschaden *in vivo* bei einer mittleren therapeutischen Dosis sofort eintritt und persistiert (siehe Abbildung 19). Die Persistenz des Zellmembranschadens würde sich dadurch erklären lassen, dass es sich bei der Lipidperoxidation um eine Kettenreaktion handelt, welche durch immer wieder neu entstehende Radikale aufrechterhalten wird. Darüber hinaus kann man erkennen, dass es *in vivo* zu keiner Akkumulation des photooxidativ erzeugten Membranschadens kommt. Dies liegt vermutlich daran, dass *in vivo* der Zellschaden in Form von 8-Isoprostan durch den Blutfluss abtransportiert wird und sich nicht wie *in vitro* in der Petrischale anhäuft, wie es Nechifor et al. in ihrer Arbeit zeigte. Sie untersuchte an Zellkulturen von dysplastischen Keratinozyten die oxidative Membranschädigung durch UVA. Es gelang ihr zu demonstrieren, dass es *in vitro* nach einer UVA-Exposition zu einer zeitabhängigen, progredienten Lipidperoxidation kommt, welche 24 Stunden nach der Exposition ihr Maximum erreicht. Man kann anhand diesen Ergebnisses davon ausgehen, dass die Endprodukte der Lipidperoxidation in der Petrischale akkumulieren (Nechifor et al. 2012).

Eine zeitabhängige Konzentrationssteigerung des Lipidperoxidationsmarkers Malondialdehyd (MDA) nach einer UVA-Bestrahlung wiesen Dissemond et al. sowohl *in vitro* als auch *in vivo* anhand eines Mausmodells nach. Laut ihren Versuchen kommt es *in vitro* nach einer einmaligen UVA-Bestrahlung mit 90 J/cm^2 zu einer zeitabhängigen, signifikanten MDA-Konzentrationssteigerung, welche vier Stunden nach Expositionsende ihr Maximum erreichte (Dissemond et al 2003).

Die von Dissemond et al. zum selben Thema durchgeführten *in vivo* Untersuchungen anhand eines Mausmodells bestätigen die *in vitro* Ergebnisse. Nach einer UVA-Exposition von 90 J/cm^2 (dieser Wert entspricht der humanen IPD) konnte man in der Dermis von Mäusen eine zeitabhängige MDA-Konzentrationszunahme detektieren, welche eine Stunde nach Expositionsende ihr Maximum erreichte (Dissemond et al 2003).
Der scheinbare Kontrast von unseren Versuchsergebnissen und den Ergebnissen, welche Dissemond et al. erzielt hatten, kommt daher zustande, dass es sich um unterschiedliche Versuchsaufbauten handelt: zwei verschiedene Lipid-peroxidationsmarker, verschiedene Analyseverfahren, verschiedene Bestrahlungs-dosen, unterschiedliche Bestrahlungsquellen und unterschiedliche Messzeit-punkte. Die Daten, welche *in vitro* bzw. *in vivo* an einem Mausmodell erhoben wurden, lassen sich daher nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen und lassen deshalb einen direkten Vergleich nicht zu.

Zuletzt haben wir untersucht ob es *in vivo* einen Zusammenhang zwischen der UVA-Bestrahlungsdosis und der 8-Isoprostan Konzentration gibt.
Linear zur UVA-Dosis zeigt sich eine kontinuierliche, treppenförmige Zunahme der Lipidperoxidation in Form der ansteigenden 8-Isoprostan Konzentration (siehe Abbildung 20), jedoch ist die Konzentrationssteigerung auf Grund der geringen Probandenzahl (n=3) nicht signifikant und statistisch nicht valide, jedoch in der Tendenz klar.
Dies wurde auch analog *in vitro* in der oben genannten Studie von Dissemond et al. gezeigt. Als Lipidperoxidationsmarker wurde in dieser Untersuchung Malondialdehyd (MDA) verwendet. Nach einer Bestrahlung mit einer Dosis von 100 kJ/m^2 bis 400 kJ/m^2, wurde die MDA-Konzentration bestimmt, welche ab einer Bestrahlungsdosis von 200 kJ/m^2 eine signifikante, dosisabhängige Konzentrationssteigerung ergab (Dissemond et al. 2003).
Daraus kann man folgern, dass auch beim Menschen eine UVA-Bestrahlung, zum Beispiel bei einer UVA1-Therapie, mit einer steigenden UVA-Dosis mit einem zunehmenden photooxidativen Stress für die Haut verbunden ist. Es wäre daher möglich 8-Isoprostan als *in vivo* Biomarker für UVA erzeugten photooxidativen Stress zu etablieren.

Bereits 2005 wurde nachgewiesen, dass sich 8-Isoprostan als potentieller *in vivo* Biomarker für photooxidativen Stress, jedoch erzeugt durch UVB-Strahlen, eignen würde. Auch in dieser Arbeit wurde eine Korrelation zwischen Strahlendosis und 8-Isoprostan Konzentration nachgewiesen (Schneider et al. 2006). Schneider et al. bestrahlten in diesem Versuch die Gesäßhaut von vier Probanden mit einer UVB-Dosis von 20 mJ/cm^2 bis 90 mJ/cm^2 und konnten eine UVB-dosiskorrelierte Konzentrationszunahme von 8-Isoprostan zeigen. Dies hat Bedeutung für die Suche nach einem Biomarker für übergreifende Sonnenschädigung der Haut, der sowohl UVA-induzierte als auch UVB-induzierte Effekte erfassen würde.

Die von uns verwendeten UVA-Dosen für die Bestrahlung sind insgesamt in einem Bereich wie sie in der UVA-Phototherapie bei verschiedenen entzündlichen Hauterkrankungen wie zum Beispiel der atopischen Dermatitis eine bewährte Behandlungsmöglichkeit darstellen (Krutmann et al. 1998). Der positive Effekt der UVA-Bestrahlung auf die atopische Dermatitis beruht auf einer Induktion der T-Zell Apoptose und einer Reduktion der Anzahl der Langerhans-Zellen und der Mastzellen. Dieser Effekt wird vor allem bei einer Bestrahlung im medium-dose (30 J/cm^2 bis 50 J/cm^2) und high-dose (130 J/cm^2) Bereich erzielt (Mang und Krutmann 2005), in welchem sich auch unsere Bestrahlungsdosen bewegt haben. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass es auch bei diesen Bestrahlungsdosen *in vivo* zu einer erheblichen Schädigung der Zellmembranen in Form der Lipidperoxidation kommt und es neben den gewünschten positiven Effekten einer solchen UVA-Phototherapie auch zu *in vivo* nachweisbaren negativen Effekten auf Zellmembranebene kommt.

Laut Wang et al. ist es nicht auszuschließen, dass eine UVA-Bestrahlung, neben den akuten Nebenwirkungen wie Erythem, Pigmentierung und photoallergischer Reaktion auch die Entwicklung eines malignen Melanoms fördern kann (Wang et al. 2001). Darüber hinaus wurde bereits in tierexperimentellen Untersuchungen nachgewiesen, dass die UVA-Strahlung zu der Entstehung von malignen Melanomen entscheidend beiträgt. So zeigten Sterenborg und van der Leun (Sterenborg und Leun 1990), dass eine tägliche UVA-Bestrahlung mit 22 J/cm^2 bei haarlosen Albinomäusen zu einer Hauttumorentstehung führt.

Tewari et al. ergänzte 2012 die bisher bekannten UVA-induzierten Mechanismen der Photokarzinogenese (siehe Kapitel 1.3.1) in dem er in einer *in vivo* Studie demonstrierte, dass ebenso UVA1 zur Generierung von CPDs führt und somit

über die Phototyp-1-Reaktion entscheidend zur Entstehung von Hauttumoren beiträgt. Es gilt daher zu bedenken, dass eine chronische Belastung mit den von uns verwendeten UVA-Dosen langfristig mit dem Auftreten einer Photokarzinogenese im Zusammenhang stehen kann (Tewari et al. 2012).

5. Zusammenfassung

Die Ultraviolett-A-Strahlung (UVA) ist eine wichtige Umweltnoxe, welche langfristig zu Photoalterung und Photokarzinogenese führt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Effekten der UVA-Strahlung auf die menschliche Haut *in vivo*.

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass die konstitutionellen Merkmale eines Probanden nur unscharfe Auskunft über seine Hautreaktion auf eine UVA-Exposition geben. Die Einteilung nach den Fitzpatrick-Kriterien versagt hier.

Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass es in der Konzentration des antioxidativen Enzyms Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (Cu/Zn SOD) in unbestrahlter Haut *in vivo* interindividuelle Unterschiede gibt und dass die Cu/Zn SOD selbst bei sehr hohen UVA-Dosen robust, jedoch interindividuell unterschiedlich reagiert.

Bei allen Probanden konnte eine interindividuell unterschiedlich ausgeprägte Reaktion auf die Noxe UVA beobachtet werden.

Im Bezug auf die oxidative DNA-Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), gemessen anhand 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG), konnte in beiden gewählten Bestrahlungsserien ein ähnliches zeitliches Schädigungsmuster nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass innerhalb der ersten 48 Stunden nach Exposition der Basenexzisionsmechanismus aktiv ist und die oxidative Schädigung abgebaut wird. Eine Korrelation zwischen den gewählten Bestrahlungsdosen und der 8-OHdG Konzentration war nicht erkennbar.

Eine weitere Erkenntnis dieser Studie ist, dass 8-Isoprostan als Biomarker für eine photooxidative UVA-Hautschädigung verwendet werden könnte, da 8-Isoprostan sowohl robust als auch dosiskorreliert auf UVA-Strahlung reagiert.

Insgesamt konnte mit den Versuchen dieser Dissertation ansatzweise die Komplexität der Reaktionen der Haut sowie deren Verteidigungsmechanismen nach einer UVA-Exposition dargestellt werden. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen mit einer größeren Probandenzahl um die Reaktionen und Verteidigungsmechanismen näher zu charakterisieren und statistisch auszuwerten.

6. Literaturverzeichnis

1. Ahmed N. U., Ueda M., Nikaido O., Osawa T. and Ichihashi M.: High levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine appear in normal human epidermis after a single dose of ultraviolet radiation. British Journal of Dermatology 140: 226-231 (1999)
2. Armstrong B. K. and Kricker A.: The epidemiology of UV induced skin cancer. Journal of Photochemistry and Photobiology B 63: 8-18 (2001)
3. Berneburg M., Plettenberg H., Krutmann J.: Photoaging of human skin. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine 16: 239-244 (2000)
4. Bosch R., Philips N., Suárez-Pérez J. A., Juarranz A., Devmurari A., Chalensouk-Khaosaat J. and González S.: Mechanisms of Photoaging and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies with Phytochemicals. Antioxidants 4: 248-268 (2015)
5. Bradford M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254 (1976)
6. Brash D. E.: Sunlight and the onset of skin cancer. Trends in Genetics 13: 410–414 (1997)
7. Brash D. E., Rudolph J. A., Simon J. A., Lin A., McKenna G. J., Baden H. P., Halperin A. J. and Pontén J.: A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88: 10124-10128 (1991)
8. Chiang, Kun-Chun and Chen, Tai C. : The anti-cancer actions of vitamin D. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry 13: 126-139 (2013)
9. Clingen P. H., Arlett C. F., Cole J., Waugh A. P., Lowe J. E., Harcourt S. A., Hermanova N., Roza L., Mori T., Nikaido O. et al.: Correlation of UVC and UVB cytotoxicity with the induction of specific photoproducts in T-lymphocytes and fibroblasts from normal human donors. Photochemistry and Photobiology 61: 163-170 (1995)
10. Cunningham M. J., Krinsky N. I., Giovanazzi S. M., Peak M. J.: Superoxide anion is generated from cellular metabolites by solar radiation and its components. Journal of Free Radical Biology Medicine 1: 381-385 (1985)

11. de Gruijl F. R., Sterenborg H. J., Forbes P. D., Davies R. E., Cole C., Kelfkens G., van Weelden H., Slaper H., van der Leun J. C.: Wavelength dependence of skin cancer induction by ultraviolet irradiation of albino hairless mice. Cancer Research 53: 53-60 (1993)
12. Diepgen T. L. and Mahler V.: The epidemiology of skin cancer. British Journal of Dermatology, 146: 1-6 (2002)
13. Dissemond J., Schneider L. A., Brenneisen P., Briviba K., Wenk J., Wlaschek M. and Scharffetter-Kochanek K.: Protective and determining factors for the overall lipid peroxidation in ultraviolet A1-irradiated fibroblasts: in vitro and in vivo investigations. British Journal of Dermatology 149: 341–349 (2003)
14. Drobetsky E.A., Turcotte J., Châteauneuf A.: A role for ultraviolet A in solar mutagenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 2350–2354 (1995)
15. Emanuele E., Spencer J. M., Braun M.: From DNA repair to proteome protection: new molecular insights for preventing non-melanoma skin cancers and skin aging. Journal of Drugs in Dermatology 13: 611-618 (2014)
16. Evelson P., Ordónez C. P., Llesuy S., Boveris A.: Oxidative stress and in vivo chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 38: 215-9 (1997)
17. Falk M.: Self-estimation or phototest measurement of skin uv sensitivity and its association with people's attitudes towards sun exposure. Anticancer Research 34: 797-804 (2014)
18. Féher J. and Lengyel G.: Silymarin in the prevention and treatment of liver diseases and primary liver cancer. Current Pharmaceutical Biotechnology 13: 210-217 (2012)
19. Fitzpatrick T. B.: The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. Archives of Dermatology 124: 869-871 (1988)
20. Fisher G. J., Kang S., Varani J., Bata-Csorgo Z., Wan Y., Datta S., Voorhees J.J.: Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. Archives of Dermatology 138: 1462-1470 (2002)
21. Gethöffer K.: Analyse der zeitabhängigen Konzentration entzündlicher Zytokine nach UVA-Bestrahlung als möglicher Biomarker für die individuelle

UVA-Suszeptibilität in vivo. Medizinische Dissertation, Universität Ulm (2010)

22. Girotti A. W.: Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 63: 103-113 (2001)
23. Gonzaga E. R.: Role of UV light in photodamage, skin aging, and skin cancer. American Journal of Clinical Dermatology 10: 19-24 (2009)
24. Hemminki K., Xu G., Kause L., Koulu L. M., Zhao C. and Jansen C. T.: Demonstration of UV-dimers in human skin DNA in situ 3 weeks after exposure. Carcinogenesis 23: 605-609 (2002)
25. Hideaki M., Isao H., Sadao K., Hiroshi E.: Oxidative DNA damage in patients with prostate cancer and ist response to treatment. The Journal of Urology 171: 1533-1536 (2004)
26. Hönigsmann H. and Diepgen T. L.: UV-Hauttumoren. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 3: 26-31 (2005)
27. Hönigsmann H., Schuler G., Aberer W., Romani N. and Wolff, K.: Immediate pigment darkening phenomenon. A reevaluation of ist mechanisms. The Journal of Investigative Dermatology 87: 648-652 (1986)
28. Huang X. X., Bernerd F., Halliday G. M.: Ultraviolet A within sunlight induces mutations in the epidermal basal layer of engineered human skin. The American Journal of Pathology 174: 1534-1543 (2009)
29. Hussein M. R.: Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. Journal of Cutaneous Pathology 32: 191-205 (2005)
30. Ibrahim S. F. and Brown M. D.: Tanning and cutaneous Malignancy. Dermatologic Surgery 34: 460-474 (2008)
31. Ichihashi M., Ando H., Yoshida M., Niki Y., Matsui M.: Photoaging of the skin. Japanese Society of Anti-Aging Medicine 6: 45-59 (2009)
32. Ikehata H., Kawai K., Komura J., Sakatsume K., Wang L., Imai M., Higashi S., Nikaido O., Yamamoto K., Hieda K., Watanabe M., Kasai H. and Ono T.: UVA1 genotoxicity is mediated not by oxidative damage but by cyclobutane pyrimidine dimers in normal mouse skin. Journal of Investigative Dermatology 128: 2289-2296 (2008)
33. Ikehata H. and Ono T.: The mechanisms of UV mutagenesis. Journal of Radiation Research 52: 115-125 (2011)

34. Kanavy H. E. and Gerstenblith M. R.: Ultraviolet radiation and melanoma. Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery 30: 222-228 (2011)
35. Katiyar S. K.: UV-induced immune suppression and photocarcinogenesis: Chemoprevention by dietary botanical agents. Cancer Letters 255: 1-11 (2007)
36. Kiistala, U.: Suction blister device for separation of viable epidermis from dermis. Journal of Investigative Dermatology 50: 129-137 (1968)
37. Klotz L.-O., Holbrook N. J., Sies H.: UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events. In: Thiele J., Elsner P. (Hrsg) Oxidants and antioxidants in cutaneous biology. Current Problems in Dermatology, Band 29, Basel Karger, S. 95-113 (2001)
38. Krutmann J., Diepgen T. L., Luger T. A., Grabbe S., Meffert H., Sönnichsen N., Czech W., Kapp A., Stege H., Grewe M., Schöpf E.: High-dose UVA1 therapy for atopic dermatitis: results of a multicenter trial. Journal of the American Academy of Dermatology 38: 589-593 (1998)
39. Lee J. H., An H. T., Chung J. H., Kim K. H., Eun H. C., Cho K. H.: Acute effects of UVB radiation on the proliferation and differentiation of keratinocytes. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine 18: 253-261 (2002)
40. Lehmann P.: Photodermatosen. In: Braun-Falco O. , Plewig G., Wolff H. H., Burgdorf H. C. und Landthaler M. (Hrsg) Dermatologie und Venerologie, 5. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg, S. 548 (2005)
41. Leiter U., Garbe C.: Epidemiology of Melanoma and nonmelanoma skin cancer – the role of sunlight. In: Reichrath J. (Hrsg) Sunlight, Vitamin D and skin cancer. Advances in Experimental Medicine and Biology, Band 624, Springer New York, S. 89-103 (2008)
42. Liardet S., Scaletta C., Panizzon R., Hohlfeld P., Laurent-Applegate L.: Protection against pyrimidine dimers, p53, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine expression in ultraviolet-irradiated human skin by sunscreens: difference between UVB + UVA and UVB alone sunscreens. Journal of Investigative Dermatology 117: 1437-1441 (2001)
43. Madronich S., McKenzie R. L., Björn L. O., Caldwell M. M.: Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 46: 5-19 (1998)

44. Mang R. and Krutmann J.: UVA-1 Phototherapy. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine 21: 103-108 (2005)
45. Marnett L. J., Riggins J. N., West J. D.: Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. The Journal of Clinical Investigation 111: 583-593 (2003)
46. Matsumura Y. and Ananthaswamy H. N.: Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. Toxicology and Applied Pharmacology 195: 298-308 (2004)
47. Montuschi P., Barnes P. J. and Roberts II L. J.: Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. The Official Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology 18: 1791-1800 (2004)
48. Moyal D., Pissavini M., Boyer F., Perier V. and Frelon J. H.: In vivo persistent pigment darkening method: proposal of a new standard product for UVA protection factor determination. International Journal of Cosmetic Science 29: 443-449 (2007)
49. Naderi-Hachtroudi L., Peters T., Brenneisen P., Meewes C., Hommel C., Razi-Wolf Z., Schneider L. A., Schüller J., Wlaschek M., and Scharffetter-Kochanek K.: Induction of manganese superoxide dismutase in human dermal fibroblasts: a UV-B-mediated paracrine mechanism with the release of epidermal interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor alpha. Archives of Dermatology 138: 1473-1479 (2002)
50. Narayanan, D. L., Saladi R. N. and Fox, J. L.: Ultraviolet radiation and skin cancer. International Journal of Dermatology 49: 978-986 (2010)
51. Nechifor M. T., Niculite C. M., Urs A. O., Regalia T., Mocanu M, Popescu A., Manda G., Dinu D. and Leabu M.: UVA irradiation of dysplastic keratinocytes: oxidative damage versus antioxidant defense. International Journal of Molecular Sciences 13: 16718-16736 (2012)
52. Oberley L. W. and Spitz D. R.: Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. Methods of Enzymology 105: 457-464 (1984)
53. Poswig A., Wenk J., Brenneisen P., Wlaschek M., Hommel C., Quel G., Faisst K., Dissemond J., Briviba K., Krieg T. and Scharffetter-Kochanek K.: Adaptive antioxidant response of manganese-superoxide dismutase following repetitive UVA irradiation. Journal of Investigative Dermatology 112: 13-18 (1999)

54. Ravnbak M. H.: Objective determination of Fitzpatrick skin type. Danish Medical Bulletin 57: B4153 (2010)
55. Rivas J. M. and Ullrich S. E.: The role of IL-4, IL-10, and TNF- α in the immune suppression induced by ultraviolet radiation. Journal of Leukocyte Biology 56: 769-775 (1994).
56. Routaboul C., Denis A., Vinche A.: Immediate pigment darkening: description, kinetic and biological function. European Journal of Dermatology 9: 95-99 (1999)
57. Sachdeva S.: Fitzpatrick skin typing: applications in dermatology. Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology 75: 93-6 (2009)
58. Scharffetter-Kochanek K., Brenneisen P., Wenk J., Herrmann G., Ma W., Kuhr L., Meewes C., Wlaschek M.: Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. Experimental Gerontology 35: 307-316 (2000)
59. Schneider L. A., Bloch W., Kopp K., Hainzl A., Rettberg P., Wlaschek M., Horneck G. and Scharffetter-Kochanek K.: 8-Isoprostane is a dose-related biomarker for photo-oxidative ultraviolet (UV) B damage in vivo: a pilot study with personal UV dosimetry. British Journal of Dermatology 154: 1147-1154 (2006)
60. Schneider L. A., Wlaschek M., Dissemond J., Scharffetter-Kochanek K.: Examples for the importance of radiophysical measurements in clinical phototherapy. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 5: 384-389 (2007)
61. Schwarz T.: Ultraviolette Strahlung – Immunantwort. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 3: 11-18 (2005)
62. Sies H.: Oxidative stress: oxidants and antioxidants. New York: Academic Press (1991)
63. Sijbers A. M., de Laat W. L., Ariza R. R., Biggerstaff M., Wie Y. F., Moggs J. G., Carter K. C., Shell B. K., Evans E., de Jong M. C., Rademakers S., de Rooij J., Jaspers N. G., Hoeijmakers J. H., Wood R. D.: Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. Cell 86: 811-822 (1996)
64. Sterenborg H. J. C. M. and van der Leun J. C.: Tumorgenesis by a long wavelength UV-A source. Photochemistry and Photobiology, 51: 325–330 (1990)

65. Svobodova A., Walterova D., Vostalova J.: Ultraviolet light induced alteration to the skin. Biomedical Paperof the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia 150: 25-38 (2006)
66. Svobodova A., Zdarilova A., Maliskova J., Mikulkova H., Walterova D., Vostalova J.: Attenuation of UVA-induced damage to human keratinocytes by silymarin. Journal of Dermatological Science 46: 21-30 (2007)
67. Tewari A., Sarkany R. P. and Young A. R.: UVA1 induces cyclobutane pyrimidine dimers but not 6-4 photoproducts in human skin *in vivo*. Journal of Investigative Dermatology 132: 394-400 (2012)
68. Toyokuni S., Okamoto K., Yodoi J., Hiai H.: Persistent oxidative stress in cancer. Federation of European Biochemical Societies Letters 358: 1-3 (1995)
69. Vile G. F., Tyrrell R. M.: UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. Free Radical Biology & Medicine 18: 721-730 (1995)
70. Wang S. Q., Setlow R., Berwick M., Polsky D., Marghoob A. A., Kopf A. W. and Bart R. S.: Ultraviolet A and melanoma: A review. Journal of the American Academy of Dermatology 44: 837-846 (2001)
71. Weisiger R. A., Fridovich I.: Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondriallocalization. The Journal of Biological Chemistry 248: 4793-4796 (1973)
72. Wlaschek M., Tantcheva-Poor I., Naderi L., Ma W., Schneider L. A., Razi-Wolf Z., Schüller J., Scharffetter-Kochanek K.: Solar UV irradiation and dermal photoaging. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 63: 41-51 (2001)
73. Wu L. L., Chiou C. C., Chang P. Y., Wu J. T.: Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. Clinica Chimica Acta 339: 1-9 (2004)
74. Xu G., Marcusson J. A., Hemminki K.: DNA photodamage induced by UV phototherapy lamps and sunlamps in human skin in situ and its potential importance for skin cancer. Journal of Investigative Dermatology 116: 194-195 (2001)
75. Young A. R., Boles J., Herzog B., Osterwalder U., Baschong W.: A sunscreen's labeled sun protection factor may overestimate protection at

temperate latitudes: a human in vivo study. Journal of Investigative Dermatology 130: 2457-2462 (2010)

76. Zhang M., Qureshi A. A., Geller A. C., Frazier L., Hunter D. J., and Han J.: Use of tanning beds and incidence of skin cancer. Journal of Clinical Oncology 30: 1588-1593 (2012)
77. Zhao C., Snellman E., Jansen C. T. and Hemminki K.: In situ repair of cyclobutane pyrimidine dimers in skin and melanocytic nevi of cutaneous melanoma patients. International Journal of Cancer 98: 331-334 (2002)
78. Ziegler A., Leffel D. J., Kunala S., Sharma H. W., Gailani M., Simon J. A., Halperin A. J., Baden H. P., Shapiro P. E., Bale A. E.: Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90: 4216-4220 (1993)

Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.