

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka

Photoprotektion durch Antioxidantien

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Urs Kerkmann

aus

Stadthagen

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Przybilla

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Sander
Priv. Doz. Dr. med. Matthias Kramer

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. M. Placzek
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2011

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	6
2. Material und Methode	11
2.1 Material	11
2.1.1 Reagentien	11
2.1.2 Medien, Seren und Antibiotika	11
2.1.3 Enzyme, Antikörper und Marker	12
2.1.4 Kommerzielle Komplettsysteme	12
2.1.5 Labormaterialien und Geräte	12
2.1.6 Zellen	13
2.2 Patienten und Probanden	13
2.3 Methoden	14
2.3.1 Studienablauf zur Antioxidantien-Bestimmung im Blut	14
2.3.1.1 Messung der Antioxidantien	15
2.3.2 Studienablauf zur minimalen Erythemdosis und zur Proliferationsanalyse mittels Hautbiopsien	17
2.3.2.1 Bestimmung der minimalen Erythemdosis	17
2.3.2.2 Gewebeproben zur Proliferationsanalyse	19
2.3.2.3 Immunhistochemische Untersuchung	19
2.3.2.4 APAAP-Färbung und histologische Auswertung	20
2.3.2.5 Statistische Berechnungen	21
2.3.3 In-vitro-Untersuchungen	22
2.3.3.1 Zellkultur	22
2.3.3.2 Vorbereitung der Zellen zur Bestrahlung	23
2.3.3.3 Bestrahlungen	23
2.3.3.4 Zellproliferation nach Bestrahlung	24
2.3.3.5 Fixierung der Zellen nach Bestrahlung	25
2.3.3.6 DNA-Doppelmarkierung	26
2.3.3.7 Datenanalyse	27
3. Ergebnisse	29
3.1 Patienten und Probanden	29
3.1.1 Verteilung der Probanden	29
3.2 In vivo Untersuchungen	29
3.2.1 Antioxidantien-Bestimmung	29
3.2.1.1 L-Ascorbinsäure	29
3.2.1.2 D-alpha-Tocopherol-Spiegel	30
3.2.1.3 Antioxidantien-Spiegel der Probanden zur Bestimmung der minimalen Erythemdosis	32

3.2.2	Minimale Erythemdosis für UV-B-Bestrahlung	33
3.2.3	Einfluss der Antioxidantien-Applikation und der UV-B-Bestrahlung auf die Proliferationsaktivität in der Epidermis	35
3.3	In vitro Untersuchungen	38
3.3.1	Zellzyklus-Progressionsanalysen	38
3.3.2	UV-A-Effekte auf die Zellzyklusprogression	40
3.3.3	UV-B-Effekte auf die Zellzyklusprogression	42
3.3.4	Effekte ionisierender Strahlung auf die Zellzyklusprogression	44
4.	Diskussion	46
4.1	Funktion und Eigenschaften der Vitamine C und E auf die Lichtsensibilität der Haut und auf UV-induzierte DNA-Schäden	46
4.1.1	Vitamin C	46
4.1.3	Vitamin E	46
4.1.4	Synergismus zwischen Vitamin C und E	47
4.1.4	Allgemeiner Einfluss der Vitamine C und E auf UV-Strahleneffekte	48
4.1.5	L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol und ihr Einfluss auf die UV-Strahleneffekte der Studienteilnehmer	50
4.1.6	L-Ascorbinsäure- und D-alpha-Tocopherol-Spiegel versus Veränderung der minimalen Erythemdosis	51
4.1.7	DNA-Strahlenschäden und Messung der Zellzyklusproliferation	52
4.1.8	Epidermale Proliferation nach UV-B-Bestrahlung	53
4.1.9	Einfluss der L-Ascorbinsäure und des D-alpha-Tocopherol auf die epidermale Proliferation nach UV-B-Bestrahlung	54
4.2	Einfluss der Bestrahlung mit UV-A-, UV-B- und mit ionisierender Strahlung auf die Proliferationskinetik der IPC-298-Zellen	55
4.2.1	Einfluss von UV-A-, UV-B- und ionisierender Strahlung auf den Zellzyklus	55
4.2.2	Einfluss von UV-A-, UV-B- und ionisierender Strahlung auf die IPC-298-Zellen	56
4.3	Schlussfolgerung	57
5	Zusammenfassung	59
6	Literaturverzeichnis	62
7	Anhang	75
8	Danksagung	81

1. Einleitung

Das elektromagnetische Strahlenspektrum umfasst u.a. UV-C (200 - 290 nm), UV-B (290 – 320 nm), UV-A (320 – 400 nm), sichtbares Licht (400 - 800 nm) und Infrarot (>800 nm). Die Sonnenstrahlung auf der Erdoberfläche enthält UV-B (oberhalb von 290 nm), UV-A, sichtbares Licht und Infrarot. Die Strahlenintensität und Strahlenszusammensetzung auf der Erde wird u.a. durch die Ozonschicht, Luftverschmutzung, Bewölkung und Tageszeit beeinflusst. Die Absorption elektromagnetischer Strahlung durch die Ozonschicht ist im kürzerwelligen UV-Spektrum stärker (unter 290 nm: Teile von UV-B und komplett UV-C) als im langwelligen (38, 66). Daher führt die Abnahme der Ozonschicht zum Anstieg der UV-Belastung auf der Erde, wie z.B. auf dem Jungfrauojoch (3576m), wo der UV-B-Strahlenanteil zugenommen hat (3).

Bei UV-Strahlenexposition reagiert die Haut beim Überschreiten der individuell unterschiedlichen Schwellendosis obligat mit einer Dermatitis solaris (Sonnenbrand) und einer Pigmentierung. Eine weitere akute Reaktion in der Haut ist die Immunsuppression durch UV. Der Einfluss von Lichtsensibilisatoren, wie z.B. Arzneiwirkstoffen (112), kann die UV-Empfindlichkeit (Phototoxizität) erhöhen und nachfolgend auch die Prävalenz aktinischer Keratosen (AK) steigern (107).

Als chronische, langjährige Folge von UV-Strahlung kann die Hautalterung beschleunigt sein. Betroffen bzw. geschädigt sind Kollagen- und Elastinfasern des dermalen Bindegewebes (38). Gravierendere, chronische Folgen der Photokarzinogenese sind die Ausbildung von Präkanzerosen oder malignen Hauttumoren.

Die Entstehung von Hauttumoren, wie z.B. von AK, spinozellulären Karzinomen (SK) oder Basalzellkarzinomen (BK) korreliert mit einer hohen kumulativen Lebenszeitdosis der UV-Exposition und hängt zudem von der Strahlungsempfindlichkeit der Haut (2, 5, 38, 77, 134) ab. Als begünstigende Risikofaktoren gelten ein heller Hauttyp (v.a. I und II nach Fitzpatrick), rot-blondes Haar, blaue Augen und Sommersprossen (41, 48, 49, 50, 62, 134). Die höhere Lichtempfindlichkeit heller Hauttypen kann die kutane Tumorgenese begünstigen und es scheinen bereits suberythematische Dosen zur Tumorgenese auszureichen (38). Auch die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung (IR), z.B. in der Diagnostik (42, 127, 128, 136) kann zur Hauttumorgenese unter anderem von BK beitragen.

Mit der Entwicklung des von Melanozyten ausgehenden malignen Melanoms (MM), aber z.T. auch von nicht melanozytären Hauttumoren (NMM), scheinen vermehrte, schmerzhaft akute Sonnenbrände im Kindes- und Jugendalter (13, 38, 51, 74) assoziiert zu sein. Zudem scheinen ein heller Hauttyp, melanozytäre Naevi, insbesondere atypische bzw. dysplastische Naevi (52), ebenso das Risiko für ein MM zu erhöhen wie auch häufige Aufenthalte mit intensiver UV-Strahlung in Freizeit oder im Beruf (8, 38, 139). Insbesondere Solarienbesucher scheinen häufiger an einem MM oder NMM zu erkranken (32, 67, 140). Künstliches UV-A-Licht aus Solarien scheint bei 6% der Todesfälle des MM ursächlich zu sein (33). Die Datenlage zeigt einen ähnlichen ätiologischen Beitrag des UV-A in der Tumorgenese von nicht melanozytären Hauttumoren und dem MM wie das UV-B (117, 130).

Die zunehmende UV-Belastung scheint zu einem Inzidenzanstieg maligner Hauttumoren in vielen Regionen beizutragen (116). Betrachtet man die australische alters-standardisierte Inzidenzrate aus Queensland, so gab es für das invasive MM bei Männern einen Anstieg von 46,9 (1982) auf 82,1 (2002) und bei Frauen von 37,4 (1982) auf 55,3 (2002) pro 100000 Einwohner und Jahr (25). Beim nicht-invasivem In-situ-Melanom stieg die Inzidenz in diesem Zeitraum von 5,3 auf 49,9 bei Männern und von 5,4 auf 37,5 bei Frauen je 100000 Einwohner und Jahr (25). Im Vergleich hierzu liegen die Inzidenzraten der Jahre 1998-2001 aus Deutschland (Schleswig-Holstein) für das invasive MM bei 12,3 bei Männern und bei 14,8 bei Frauen je 100000 Einwohner. Das In-situ-Melanom wies zur gleichen Zeit eine Inzidenz von 2,9 bei Männern und von 4,5 bei Frauen je 100000 Einwohner (73) auf. Insgesamt liegt das Lebenszeitrisiko der deutschen Bevölkerung für ein MM bei etwa 1:100 und in Australien bei 1:25 (38, 119). Die Mortalität durch das MM in Deutschland lag im Jahr 2000 bei 2,9 bei Männern und bei 2,4 bei Frauen pro 100000 Einwohner und ist in den letzten 30 Jahren nahezu konstant geblieben (119).

Die Inzidenz der epithelialen Hauttumoren zwischen 1998 und 2001 lag in Schleswig-Holstein bei 100,2 bei Männern und bei 72,6 bei Frauen je 100000 Einwohner (73). Dem gegenüber waren 1989 die Inzidenzen im Saarland für NMM mit 93,4 bei Männern und mit 55,8 bei Frauen pro 100000 Einwohner und Jahr (116) geringer. Starke Inzidenzzunahmen der epithelialen Tumoren von 174 (1988) auf 265 (1998) pro 100000 Einwohner und Jahr sind auch in der englischen Bevölkerung zu verzeichnen (65).

Die Problematik der Inzidenzzunahme von Hauttumoren verdeutlicht die Notwendigkeit, Risikofaktoren ihrer Entstehung zu erkennen und zu minimieren. Gleichzeitig ist die Entwicklung und konsequente Anwendung von effektiven Hautschutzmaßnahmen gegenüber der UV-Strahlung erforderlich (38).

In der Haut werden die Strahlen reflektiert, gebeugt und gestreut. Langwellige Strahlung dringt tiefer in die Haut ein als kurzwellige. Vereinfacht kann man annehmen, dass UV-A bis in die Dermis, UV-B überwiegend bis in die Epidermis und UV-C bis in die Hornschicht eindringt. Die Absorption von Strahlenenergie erfolgt z.B. an der Zellmembran, der DNA oder dem Pigment Melanin und es entstehen instabile, energetisch angeregte Moleküle, die die Energie zur Erlangung eines stabilen Zustands auf Sauerstoff übertragen. Die hierbei entstehenden instabilen, reaktiven freien Sauerstoffradikale wie Singulett-Sauerstoff, Superoxid-Anionen und Hydroxylradikale (105) können indirekt schädigend mit DNA-Pyrimidinbasen, mit Porphyrinen, Aminosäuren und Lipiden reagieren (27, 103). Daneben finden durch Energieabsorption der UV-Strahlung v.a. an der Zielstruktur DNA auch direkte Schädigungen statt, die typischerweise als DNA-Punktmutationen, 6-4-Photoprodukte (38, 89) oder als UV-A- bzw. UV-B-induzierte Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (z.B. Thymindimere) auftreten (20, 91). Vor allem UV-A und UV-B können aber auch indirekte, oxidative Photoprodukte wie z.B. 8-oxy-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin (16, 91) induzieren. Fibroblasten zeigten bei UV-A- und UV-B-Strahlung mutagene, oxidative DNA-Veränderungen durch Photooxidation von Guanin (79). UV-A ist häufig auch an direkt gebildeten Photoprodukten wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (91) oder Chromosomenstrangbrüchen beteiligt (101). Insgesamt können sowohl hohe als auch niedrige Dosen von UV-A (18) und von UV-B (20) zu einer direkten und indirekten DNA-Schädigung führen und zur Karzinogenese beitragen. Die DNA-schädigende Wirkung einer wiederholten, 2-wöchigen UV-Bestrahlung beim Menschen wurde durch den Anstieg von Pyrimidindimeren und der p53-Expression in Keratinozytenzellkulturen nachgewiesen (141).

Der Zellzyklus einer Zelle beschreibt die G₁-, S- und G₂/M- Phase, die innerhalb von 24 Stunden von der Zelle zur Replikation der DNA durchlaufen werden. Die durch UV oder IR induzierte Schädigung von Zellstrukturen kann eine Apoptose, einen Zellzyklusblock und DNA-Reparaturmechanismen auslösen (30, 38, 100, 104, 142). Die Apoptose bewahrt die Zellen vor der Weitergabe von irreparablen Mutationen

(78). Das p53-Tumor-Suppressor-Gen ist ein wichtiger Faktor zur Zellzyklusregulation nach einem Schaden (58) und sorgt mit dem Proteinprodukt p53 für einen Zellzyklusblock in der G₁-Phase zur Reparatur von DNA-Schäden (26). Fehlerhafte DNA-Sequenzen, z.B. Dimere, werden bei der Exzisionsreparatur durch Enzyme herausgeschnitten (DNA-Polymerase) und wieder ersetzt (DNA-Ligase). Bei irreparablen DNA-Schäden kann p53 die Apoptose einleiten (78). Auch oxidativer Stress kann zur Apoptose führen (111). Die erfolgte Replikation bzw. Reparatur der DNA nach Bestrahlung mit UV oder IR wird vor der Zellteilung am Übergang von der G₂- zur M- (Mitose-) Phase (26, 64, 68) durch einen weiteren Zellzyklusblock überprüft.

Nicht reparierte Mutationen in UV- oder IR-geschädigten Zellen können zum Verlust von Funktionen und bei ungehinderter Proliferation zur malignen Entartung führen. Die Haut schützt sich durch Melanin und bei wiederholter UV-Exposition durch die entstehende Verdickung der Epidermis (Lichtschwiele) vor den Strahlen. Ein antioxidatives Verteidigungssystem aus enzymatischen (z.B. Superoxid-Dismutase und Peroxidase) und nicht-enzymatischen (z.B. Ascorbinsäure [Vitamin C], Tocopherol [Vitamin E]) Antioxidantien (AO) schützt zudem die Epidermis und Dermis vor freien Radikalen (44, 46, 125). AO überführen als Reduktionsmittel Radikale wieder in einen stabilen Zustand und schützen vor oxidativen Schäden. Vitamin C schützt hydrophile und Vitamin E lipophile Strukturen, z.B. Membranen (19, 23, 125). Beide arbeiten synergistisch, indem oxidiertes Vitamin E in der Zellmembran durch Vitamin C regeneriert wird (21, 59, 60).

Sowohl die Vitamin-E-Konzentration als antioxidativer Schutz für Membranen und Proteine (132) als auch die Vitamin-C-Konzentration wird in der Haut durch Strahlung reduziert (46, 124, 126). Die additive Anwendung von Ascorbinsäure und Tocopherol allein oder kombiniert als Schutzmassnahme in menschlicher oder Tierhaut kann die Entstehung von UV-induzierten Schäden reduzieren (14, 28, 83, 110, 113).

In der Lichttherapie nutzt man UV-Strahlung zur Behandlung unterschiedlicher Dermatosen. Der Ermittlung der therapeutischen Strahlendosis des Patienten dient die Lichttreppe, bei der man die minimale Erythemdosis (MED) als Maß der individuellen Lichtempfindlichkeit bestimmt. Die Lichttreppe eignet sich auch für die Untersuchung photoprotektiver Massnahmen (z.B. Wirksamkeit UV-absorbierender Substanzen) an der Haut. Die MED ist die schwächste, noch scharf gegen die nicht

bestrahlte Umgebung begrenzte Hautrötung 24 Stunden nach UV-Bestrahlung (143) und variiert mit dem Hauttyp und mit der Körperregion (94).

Ein protektiver Effekt von Vitamin C kombiniert mit Vitamin E auf die UV-Empfindlichkeit wurde mittels MED-Bestimmung nachgewiesen (36, 45). Nach 8 Tagen oraler L-Ascorbinsäure- und D-alpha-Tocopherol-Applikation zeigte sich eine Verminderung der UV-Empfindlichkeit durch einen MED-Anstieg von 80 auf 96,5 mJ/cm² (36). Eine weitere Studie zeigte zudem die bessere Wirkung der AO-Kombination gegenüber der Einzelapplikation (45).

Ziel der Arbeit

Insgesamt sollte die mögliche Photoprotektion durch den systemischen Einsatz der AO (Kombination aus L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol) als eine Strategie zur Reduktion von UV-induzierten Hautschäden an der menschlichen Haut und als Prophylaxe vor malignen Hauttumoren untersucht sowie mögliche unterschiedliche Strahlenantworten in der Zellkultur analysiert werden.

Hierzu sollte in einer in vivo-Untersuchung über 3 Monate überprüft werden, ob eine längerfristige, systemische AO-Applikation die UV-Empfindlichkeit (MED) der Haut weiter verringert und somit eine protektive Wirkung vor der UV-Strahlung erzeugt.

Parallel untersuchte eine doppelblind, placebokontrollierte Studie mit HPLC-Analysen die AO-Spiegel der täglich applizierten L-Ascorbinsäure und des D-alpha-Tocopherols. Damit sollte der Frage nachgegangen werden, ob die zu beobachtenden Einflüsse der AO mit einer Steigerung der Blutspiegel und somit einer höheren Verfügbarkeit einhergehen.

Der Einfluss der UV-Strahlung auf die Proliferation der Epidermiszellen sollte mittels des Proliferationsmarkers (Bromodeoxyuridin, BrdU) an bestrahlten Hautbiopsien im Vergleich zu unbestrahlten Biopsien analysiert werden. Das Interesse galt vor allem Proliferationsänderungen als Indikator für UV-induzierte Schäden. Begleitend sollte der Einfluss der L-Ascorbinsäure und des D-alpha-Tocopherols auf die Hautproliferation in bestrahlten und unbestrahlten Biopsien untersucht werden.

Ein in vitro-Teil sollte die unterschiedliche Wirkung verschiedener Strahlenarten wie UV-A-, UV-B- und ionisierender Strahlung auf die Zellzykluskinetik und Proliferation einer Melanomzelllinie mittels BrdU-Technik untersuchen (54, 55, 57).

2. Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Reagentien

DAKO® Antikörperverdünnungslösung	Dako (Glostrup, Dänemark)
DMSO	Sigma (St. Louis, USA)
Ethanol 80%	Neolab (Heidelberg)
Formalin-ETOH (5%)	Neolab (Heidelberg)
Hämatoxylin	Sigma (St. Louis, USA)
Isopropanol	Neolab (Heidelberg)
Kaisers Glycerin-Gelatine	Merck (Darmstadt)
Meta-Phosphorsäure	Merck (Darmstadt)
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Sigma (St. Louis, USA)
Salzsäure 2 mol/l	Neolab (Heidelberg)
Salzsäure, rauchend, 37%	Merck (Darmstadt)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Trizma® Base	Sigma (St. Louis, USA)
Xylol	Merck (Darmstadt)
Zitronensäure	Sigma (St. Louis, USA)

2.1.2 Medien, Seren und Antibiotika

RPMI 1640 Medium (mit L-Glutamine)	Gibco BRL® (Eggenstein)
Fetales Kälberserum (FCS)	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Antibiotics-Antimycotics (Pen-Strep-AmphoB)	Gibco BRL® (Eggenstein)
Albumin, bovin (Fraction V)	Sigma (St. Louis, USA)

2.1.3 Enzyme, Antikörper und Marker

Enzyme

Pepsin (70 FIP- U/g)	Merck (Darmstadt)
Ribonuklease A (RNase)	Sigma (St. Louis, USA)
Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (1x)	Gibco BRL® (Eggenstein)

Antikörper

Alkalische Phosphatase Antialkalische Phosphatase, Maus, monoklonal	Dako (Glostrup, Dänemark)
Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin	Dako (Glostrup, Dänemark)
Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin (FITC-markiert)	Dako (Glostrup, Dänemark)
Maus-Anti-BrdU	Becton Dickinson (San Jose, USA)

Marker

5-Bromo-2`deoxyuridin (BrdU)	Serva (Heidelberg)
Propidium Jodid	Sigma (St. Louis, USA)
Sigma Fast™ Fast Red (TR/Naphthol AS-MX)	Sigma (St. Louis, USA)

2.1.4 Kommerzielle Komplettsysteme

Komplett-Kit zur Vitamin-C-Bestimmung aus Plasma mittels HPLC-Analytik (KC 2900)	Immundiagnostik (Bensheim)
Reagenzienkit für die HPLC-Analytik der Vitamine A und E in Serum/Plasma (34000 u. 34100)	Chromsystems (München)

2.1.5 Labormaterialien und Geräte

Arbeitsmaterialien

Cellstar®PP-Röhrchen 50 ml	Greiner (Nürtingen)
----------------------------	---------------------

Cellstar®PP-Röhrchen 15 ml	Greiner (Nürtingen)
Gewebekulturflaschen 750 ml, 175 cm ²	Becton Dickinson (San Jose, USA)
Gewebekulturflaschen 250 ml, 75 cm ²	Becton Dickinson (San Jose, USA)
Gewebekulturflaschen 50 ml, 25 cm ²	Becton Dickinson (San Jose, USA)
Multifly®Kanülen-Set 20G	Sarstedt (Nümbrecht)
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell (Dassel)
Reaktionsgefäße Safe-Lock 2 ml Amber	Eppendorf (Hamburg)
Rundbodenröhrchen 5 ml (FACS-Analyse)	Becton Dickinson (San Jose, USA)
S-Monovette® 9 ml Kalium-EDTA	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturschale 100 x 20 mm	Becton Dickinson (San Jose, USA)
Zentrifugenröhrchen 15 ml	TPP (Trasadingen, Schweiz)

Geräte

FACS-Scan Durchflußzytometer	Becton Dickinson (San Jose, USA)
UVB-Waldmann 800 mit UV-Röhren Philips TL 20 W/12 UV	Waldmann (Schwenningen) Philips (Hamburg)
UVASUN 5000	Mutzhas (München)
Waldmann UV-Meter Typ 585	Waldmann (Schwenningen)
Röntgenröhre 240 kV Röntgenstrahlen; 13 mA; Isovolt 320/10; 3 mm Be-Filter	Seifert (Ahrensburg)

2.1.6 Zellen

Die Melanomzellen IPC-298 (erhalten von V. Meineke, München) sind humane Tumorzellen, die von einem bei einer 64-jährigen Patientin am Hals lokalisierten kutanen Melanom abstammen. Sie wurden von Dr. C. Aubert (INSERM U.119, Institut Paoli Calmette, Marseille, Frankreich) erstmals kultiviert (7).

2.2 Patienten und Probanden

Die insgesamt 80 Studienteilnehmer (43 Frauen, 37 Männer) wurden im Zeitraum von März 2000 bis Februar 2002 in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und

Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Frauenlobstr.9-11 in 80337 München rekrutiert. Es wurden Patienten mit malignem Melanom (MM), Basalzellkarzinom (BK), spinozellulärem Karzinom (SK) und Kontrollpersonen (KP) ausgewählt. Die Studie wurde gemäß der 1989 in Hongkong revidierten Fassung der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Ausschlusskriterium war die Einnahme von Vitaminpräparaten zur Vermeidung eines dietätisch erhöhten AO-Spiegels. Auf eine zusätzliche intensive Sonnenexposition wurde vor und während der 3 Monate verzichtet. Es wurden nur Probanden mit Hauttyp 2 und 3 nach Fitzpatrick ausgewählt. Einzelheiten zu den Patienten sind bei den jeweiligen Teilstudien dargestellt.

Nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch über die Durchführung und Zielsetzung sowie Risiken der Studie wurden das schriftliche Einverständnis, der Hauttyp nach Fitzpatrick, die Haarfarbe, die Medikamentenanamnese und die Rauchgewohnheiten sowie die Freizeit- und Sonnengewohnheiten der Teilnehmer in einem Aufklärungsbogen dokumentiert. Keiner der Teilnehmer nahm Medikamente ein, von denen bekannt war, dass sie die Lichtempfindlichkeit verändern würden, oder hatte eine bekannte abnorme Empfindlichkeit gegenüber UV.

2.3 Methoden

2.3.1 Studienablauf zur Antioxidantien-Bestimmung im Blut

62 der insgesamt 80 Probanden wurden in einer doppelblind, placebokontrollierten Studie für die Analyse der AO-Blutspiegel randomisiert nach 33 Patienten mit Verum- (V, L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol) und 29 mit Placebo-(P, Reisstärke) Applikation. In der V-Gruppe waren 7 Patienten mit MM, 10 mit BK, 6 mit SK und 10 KP. In der P-Gruppe waren 6 Patienten mit MM, 9 mit BK, 4 mit SK und 10 KP (Tabelle 1).

Die Teilnehmer nahmen täglich oral, morgens und abends jeweils 1000 mg L-Ascorbinsäure in je 1 Kapsel und 500 IE (333 mg) D-alpha-Tocopherol in je 1 Kapsel oder ein identisch aussehendes Placebo-Präparat insgesamt über eine Dauer von 3 Monaten ein.

Den Probanden wurden am ersten Tag der Studie vor der 1. Einnahme und nach 1, 2 und 3 Monaten (jeweils +/- 5 Tage Toleranz) jeweils vor der Einnahme der AO etwa 30 ml EDTA-Blut entnommen. Die Entnahme fand zwischen 8:00 und 10:00 Uhr morgens statt. Am Tag der Blutabnahme wurden die AO zur Vermeidung von Spitzenspiegeln erst nach der Blutabnahme eingenommen.

Tabelle 1: Studienteilnehmer (n=62) zur Antioxidantien-Bestimmung im Blut

	Gesamt	Männer	Alter (Jahre)	Hauttyp 2	Hauttyp 3
	n	n (%)	Mittel +/- SA	n (%)	n (%)
MM	13	3 (23,1)	55,5 +/- 11,5	12 (92,3)	1 (7,7)
BK	19	8 (42,1)	60,7 +/- 12,5	19 (100)	0 (0)
SK	10	7 (70)	75,1 +/- 8,9	10 (100)	0 (0)
KP	20	7 (35)	35,9 +/- 12,5	18 (90)	2 (10)
Gesamt	62	25 (40,3)	53,9 +/- 18,1	59 (95,2)	3 (4,8)

SA, Standardabweichung; MM, malignes Melanom; BK, Basalzellkarzinom; SK, spinozelluläres Karzinom; KP, Kontrollpersonen

2.3.1.1 Messung der Antioxidantien

Die Blutproben in den Kalium-EDTA Monovetten wurden sofort nach der Entnahme zentrifugiert (4 °C; 2000 U/min; 15 min). Die Hälfte des gewonnenen Überstandes wurde mit 10% Metaphosphorsäure (1:1) zur Fällung der Proteine und zur Stabilisierung versetzt. Zur Gewinnung von Plasma wurde anschließend noch mal wie oben zentrifugiert. Der gewonnene Überstand diente zur Analyse der L-Ascorbinsäure im Plasma. Die andere Hälfte des Überstandes der primären Zentrifugation wurde für die D-alpha-Tocopherol-Bestimmung im Serum abpipettiert. Die so präparierten Proben wurden in lichtundurchlässigen Reaktionsgefäßen als Plasmaprobe für die L-Ascorbinsäure-Bestimmung bei -70 °C und als Serumprobe für die D-alpha-Tocopherol-Bestimmung bei -20 °C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

Die Analyse der AO-Spiegel im Serum und Plasma erfolgte mit Hilfe von Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC, englisch). Die HPLC gilt als Methode der Wahl zur Vitaminanalyse (31, 118). Die Messungen wurden bei Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ekkehard Haen an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie im Bezirksklinikum Regensburg durchgeführt. Die L-Ascorbinsäure-Bestimmung im Plasma erfolgte mit

einem Kit der Firma Immundiagnostik (Bensheim) und für D-alpha-Tocopherol im Serum mit einem Reagenzienkit der Firma Chromsystems (München). Zum Ausschluss von Messschwankungen durch unterschiedliche Kalibrierungen wurden alle Proben im selben Durchlauf gemessen.

Zur L-Ascorbinsäure-Bestimmung wurde nach dem Auftauen schnellst möglich mit der Analyse begonnen, um Oxidationsprozesse zu vermeiden. Für die L-Ascorbinsäure Bestimmung wurden 200 µl der Plasmaprobe zur Stabilisierung mit 200 µl Fällungsreagenz (Immundiagnostik, Bensheim) versetzt, gemischt, 10 min bei 2-8 °C inkubiert und zentrifugiert (10 min, 10000 G). 20 µl dieses Überstandes wurden in das HPLC-System zur L-Ascorbinsäure Bestimmung injiziert.

Zur D-alpha-Tocopherol-Bestimmung wurden 100 µl des Serums mit 10 µl „Internal Standard“ (Chromsystems, München) sowie mit 12,5 µl „Precipitation Reagent 1“ (Chromsystems, München) versetzt und lichtgeschützt aufbewahrt. Die Proben wurden nach 30 s mit 100 µl „Precipitation Reagent 2“ (Chromsystems, München) versetzt und zentrifugiert (10 min, 9000 G). 50 µl dieses Überstands wurden in das HPLC-System zur D-alpha-Tocopherol-Bestimmung injiziert.

Die Trennung der Substanzen mittels HPLC erfolgt in einem isokratischen Verfahren (HPLC-Pumpe, Injektor und UV-Detektor) bei 20-25 °C auf einer „reversed phase“ Säule (Flussrate für L-Ascorbinsäure 0,75 ml/min, für D-alpha-Tocopherol 1,5 ml/min; Laufzeit 15 min bzw. 17 min). Mit einem UV Detektor (254 nm für L-Ascorbinsäure; 295 nm für D-alpha-Tocopherol) wurden die Chromatogramme aufgenommen und über den mitgelieferten Kalibrator quantifiziert. Mit Hilfe der erhaltenen Daten und der Integration der Peakflächen der Chromatogramme wurde die Konzentration der AO berechnet (externe Standard-Methode).

$$\text{Konzentration}_{\text{Probe (mg/l)}} = \frac{\text{Peakhöhe}_{\text{Patient}} \times \text{Konzentration}_{\text{Kalibrator (mg/l)}}}{\text{Peakhöhe}_{\text{Kalibrator}}}$$

2.3.2 Studienablauf zur minimalen Erythemdosis und zur Proliferationsanalyse mittels Hautbiopsie

Bei 18 der 80 Probanden, die sich für die Bestimmung der MED vor und nach UV-B-Bestrahlung bzw. zur Entnahme der Hautproben (n= 17) zur Verfügung stellten, fanden ebenfalls Blutabnahmen zur Bestimmung der AO-Spiegel im Blut statt. Teilnehmern an dieser Studie wurden ausschließlich L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol verabreicht. Unter den 18 Probanden waren 5 Patienten mit MM, 5 mit BK, 4 mit SK und 4 KP (Tabelle 2). Die Blutabnahmen und auch die Verabreichung der AO erfolgten nach demselben Schema wie in der Studie zur AO-Bestimmung im Blut (s. oben). Insgesamt 17 Probanden (11 männlich; 6 weiblich; 21 bis 77 Jahre; Hauttyp II n=16; Hauttyp III n=2) dieser Gruppe wurden mit UV-B zur MED-Bestimmung bestrahlt und es wurden Ihnen jeweils vor und nach Bestrahlung insgesamt 4 Hautbiopsien entnommen (4 Patienten mit MM, 5 mit BK, 4 mit SK und 4 KP).

Tabelle 2: Studienteilnehmer zur Bestimmung der minimalen Erythemdosis und zur Proliferationsanalyse mittels Hautbiopsie (n=18)

	Gesamt	Männer	Alter (Jahren)	Hauttyp 2	Hauttyp 3
	n	n (%)	Mittel +/- SA	n (%)	n (%)
MM	5	3 (60)	43,4 +/- 10,2	5 (100)	0 (0)
BK	5	4 (80)	60,0 +/- 11,1	3 (91,7)	2 (8,3)
SK	4	3 (75)	70,0 +/- 5,3	4 (100)	0 (0)
KP	4	2 (50)	23,5 +/- 1,0	4 (100)	0 (0)
Gesamt	18	12 (66,7)	49,5 +/- 19	16 (88,9)	2 (11,1)

SA, Standardabweichung; MM, malignes Melanom; BK, Basalzellkarzinom; SK, spinozelluläres Karzinom; KP, Kontrollpersonen

2.3.2.1 Bestimmung der minimalen Erythemdosis

Zur Untersuchung der Hautreaktionen auf UV-B-Strahlung wurden die Testpersonen dem im folgendem beschriebenen Bestrahlungsschema unterzogen (36). Die Bestimmung der MED erfolgte zu Studienbeginn Tag 0 und 24 Stunden später am Tag 1 auf einer Seite des unteren Rückens. Hiernach wurde erstmals mit der

Einnahme der AO begonnen. Am Ende der dreimonatigen AO-Einnahme wurde am vorletzten und letzten Tag auf der gegenüberliegenden Seite erneut eine MED-Bestimmung durchgeführt.

Als Testareal wurde ungebräunte Haut am Gesäß der Probanden ausgewählt. Eine Gummischablone von 1,5 mm Dicke mit 10 kreisrunden Löchern wurde auf die Haut aufgelegt. Die Löcher hatten eine Fläche von $1,8 \text{ cm}^2$. Bei der Platzierung der Schablone achtete man darauf, dass die Haut möglichst rechtwinklig von der einfallenden UV-Strahlung getroffen wurde. Die umgebende Haut wurde sorgfältig mit Tüchern abgedeckt. Die Dosierung der UV-B-Strahlung wurde ansteigend mit 20, 28, 40, 57, 80, 113, 125, 160, 175 bis 200 mJ/cm^2 gewählt.

Die Platzierung des Waldmann-Bestrahlungsgeräts erfolgte mittels eines Abstandhalters in einer Höhe von 40 cm über der Haut. Die Strahlungsintensität der Lampe, ausgestattet mit TL 20 W/12-Strahlern (Philips, Hamburg), wurde vor jeder Bestrahlungsreihe mit Hilfe des UV-Messgerätes (Waldmann, Schweningen) bestimmt und entsprechend die Bestrahlungszeit für die zu applizierenden Dosen berechnet. Die Hauptemission der TL 20 W/12-Lampen liegt im Wellenlängenbereich zwischen 272 und 365 nm mit einem Maximum um 315 nm.

Die Ablesung der Lichttreppe erfolgte 24 h (+/- 2 h) später visuell (Abb. 1). Die niedrigste Dosis, die zu einem scharf begrenzten, homogenen Erythem geführt hatte, wurde als MED definiert.

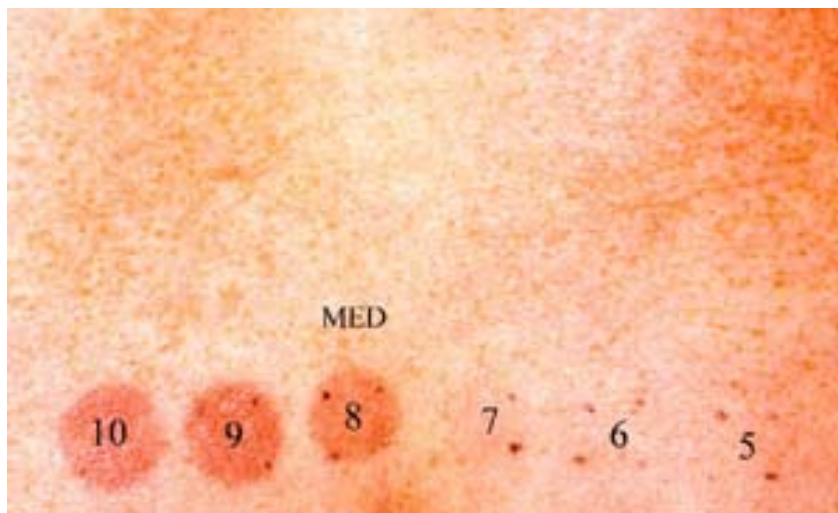


Abbildung 1. Bestimmung der MED

MED ist die minimale Erythemdosis. Dies entspricht der niedrigsten UV-Strahlendosis der MED-Bestimmung, die gegenüber unbestrahlter Haut nach 24 Stunden ein scharf begrenztes Erythem erzeugt (143). In diesem Beispiel entspricht dies Punkt 8, der mit einer Dosis von 160 mJ/cm^2 bestrahlt wurde.

2.3.2.2 Gewebeproben zur Proliferationsanalyse

Unmittelbar vor den MED-Bestimmungen wurden 17 Probanden gluteal eine Hautbiopsie aus unbestrahlter Haut vor (p1) und am Ende der 3-monatigen AO-Einnahme (p3) sowie aus UV-B-bestrahlter Haut aus dem Areal der zweifachen MED vor (p2) und am Ende der 3-monatigen AO-Einnahme (p4) entnommen. Jede Stanzbiopsie hatte einen Durchmesser von 6 mm und wurde sofort nach Entnahme in zwei gleich große Stücke geteilt.

Die Biopsiehälften wurden unmittelbar nach Entnahme in jeweils 5 ml Medium (RPMI 1640 [mit L-Glutamin], 20% FCS, 1% Antibiotic Antimycotic) überführt und für 2 h bei 37 °C im Wasserbad mit 300 µl BrdU-Stammlösung (1 mg/ml; Endkonzentration: 60 µM) inkubiert. BrdU ist ein Proliferationsmarker, der als Analogon des Thymidins in der S-Phase des Zellzyklus eingebaut wird und die Quantifizierung der S-Phase-Zellen erlaubt. Hierdurch ist eine Analyse der Proliferationsaktivität von sich teilenden Zellen in der Epidermis nach Bestrahlung möglich. Nach der BrdU-Inkubation folgte die Fixierung einer Biopsiehälfte in 5%-Formalin-ETOH mit anschließender Entwässerung und Einbettung in Paraffin. Die andere Biopsiehälfte wurde nach stufenweisem Herunterkühlen mit 10 min Verwahrung bei +4 °C, über 30 min bei -20 °C und nochmals 40 min bei -70 °C schließlich in flüssigem Stickstoff für weitere Analysen verwahrt.

2.3.2.3 Immunhistochemische Untersuchung

Die Paraffinblöcke wurden in 5 µm dicke Scheiben geschnitten, auf Objektträger aufgetragen und getrocknet. Anschließend wurde mit Xylol dreimal 6 min entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe entwässert (jeweils 5 min in 99%, 96%, 80%, 70%) und nachfolgend dreimal je 5 min mit Aqua dest. gespült.

Um das Antigen freizulegen, wurden die Schnitte in 10 mM Citratpuffer (s. u.; pH 6.0, 30 min) behandelt. Nach drei Spülungen für jeweils 3 min mit Leitungswasser folgte eine weitere Spülung mit Aqua dest. (3 min). Zur Denaturierung der DNA inkubierten die Schnitte 1 h mit 2 N HCL. Es folgten zwei Spülungen für jeweils 3 min mit Leitungswasser, eine Spülung mit Aqua dest. (3 min) und zwei für 3 min mit Tris-Puffer bevor die Schnitte mit Antikörpern inkubiert wurden.

Tris-Puffer 0,05 M (pH 7.4-7.6):

Stammlösungen: 1) 60,55 g Tris Base ad 1000 ml H₂O

2) 87,66 g NaCl ad 1000 ml H₂O

Gebrauchslösung: 100 ml Lösung 1 + 100 ml Lösung 2 + 800 ml H₂O

Zitrat-Puffer 0,01 M (pH 6.0):

Stammlösungen: 1) 0,1 M Zitronensäure (91,21 g Zitronensäure-Anhydrid ad 1000 ml H₂O)

2) 0,1 M Natriumcitrat (29,41 g tri-Na-zitrat-Dihydrid ad 1000 ml H₂O)

Gebrauchslösung: 9 ml Lösung 1 + 41 ml Lösung 2 ad 500 ml H₂O

2.3.2.4 APAAP-Färbung und histologische Auswertung

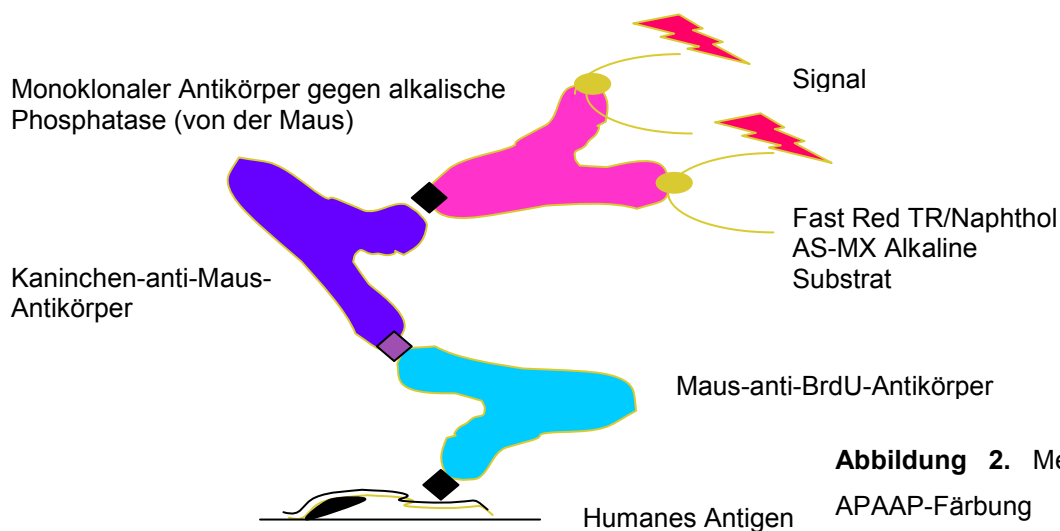


Abbildung 2. Methode der APAAP-Färbung

Die Färbung der Paraffinschnitte erfolgte mittels APAAP-Verfahren (Abb. 2). Als primärer Antikörper diente Maus-anti-BrdU (Becton Dickinson).

Nach der Spülung mit Tris-Puffer wurden alle Schnitte für 20 min mit DAKO-Antikörperverdünnungslösung bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und hierdurch zur Vermeidung von unspezifischen Antikörperbindungen geblockt. 70 µl des Primär-Antikörpers Maus-anti-BrdU (1:30 verdünnt) wurden für 2 h auf den Schnitten in einer feuchten Kammer inkubiert. Bei den Negativ-Kontrollen wurde statt des Antikörpers Tris-Puffer verwendet. Anschließend wurden 3 x 3 min mit Tris-Puffer gespült und die Objektträger getrocknet. 70 µl des Sekundär-Antikörpers Kaninchen-anti-Maus (1:30 verdünnt) wurden 30 min inkubiert. Nach erneuter Spülung für 10 min mit Tris-Puffer wurden 70 µl des dritten Antikörpers APAAP (1:30 verdünnt) für 30 min inkubiert.

Dieser Antikörper besteht aus einem Komplex intestinaler alkalischer Phosphatase und monoklonal-anti-alkalischer Phosphatase der Maus.

Der Einbau des Proliferationsmarkers BrdU in die DNA wurde sichtbar gemacht, indem mit Fast Red (TR/Naphthol AS-MX Alkaline Substrat) Tabletten für 7 min gefärbt wurde (Abb. 3). Die Zellkerne wurden nach Tris-Spülung kurz für 1 min mit Hämatoxylin gefärbt und anschließend mit Leitungswasser gespült. Die getrockneten Objektträger wurden mit Kaisers Glycerin-Gelatine eingedeckt.

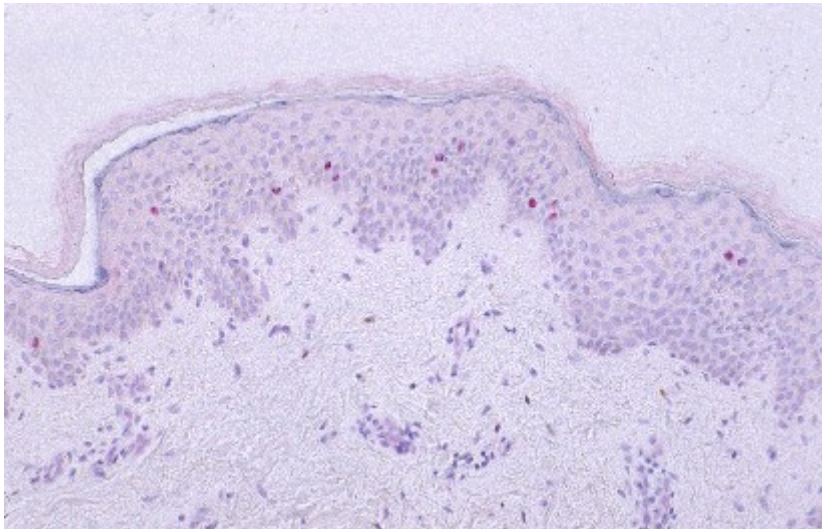


Abbildung 3. BrdU Inkorporation in der Epidermis

Die Zellen, die zum Inkubationszeitpunkt in der S-Phase waren, wurden mit BrdU-positiv markiert und erschienen im Lichtmikroskop rot. Sie wurden als proliferierende Zellen eingestuft. Die Anzahl der positiv rot gefärbten Zellkerne in den Schnitten wurde unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Desweiteren wurde die Oberflächenlänge der Hautbiopsie gemessen. Die Anzahl der markierten Zellen wurde anschließend im Verhältnis zur Hautoberfläche (pro mm) bestimmt.

2.3.2.5 Statistische Berechnungen

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse der Bestimmung der AO-Konzentrationen im Blut wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet und der T-Test für verbundene Stichproben angewendet. Die Analyse der Daten der MED-Bestimmung und der Messung der Zellproliferation erfolgten mittels Wilcoxon-Test. Die Auswertungen wurden mit Hilfe des Instituts für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie und des Statistikprogramms SPSS durchgeführt. Das Signifikanzniveau der AO-Werte wurde bei $p \leq 0,05$ festgelegt.

2.3.3 In-vitro-Untersuchungen

2.3.3.1 Zellkultur

Die IPC-298 Melanomzellen (Abb. 4) wurden bei 37 °C und 5% CO₂-Sättigung der Luft in Gewebekulturflaschen in einem Brutschrank bei zu 95% wasserdampf-gesättigter Atmosphäre inkubiert. Die Zelllinie wurde in speziellem Medium (RPMI 1640 [mit L-Glutamin], 10% FCS, 1% Antibiotic Antimycotic) kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden das Medium gewechselt und die Zellen passagiert. Zur Passagierung/ Trypsinierung wurden die Zellen einmal mit Trypsin/ Ethylendiamintetraacetat (EDTA, 1x) gewaschen und durch Inkubation mit 8 ml Trypsin/ EDTA (1x) abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde durch Hinzufügen von 16 ml Medium inhibiert. Die Zellsuspension wurde bei 20 °C zentrifugiert (5 min, 1200 U) und das Pellet mit 10 ml Medium versetzt. 2 ml dieser Suspension wurden in 25 ml Medium in der Gewebekulturflasche (175 cm² Bodenfläche der Gewebekulturflasche) wieder ausgesät.

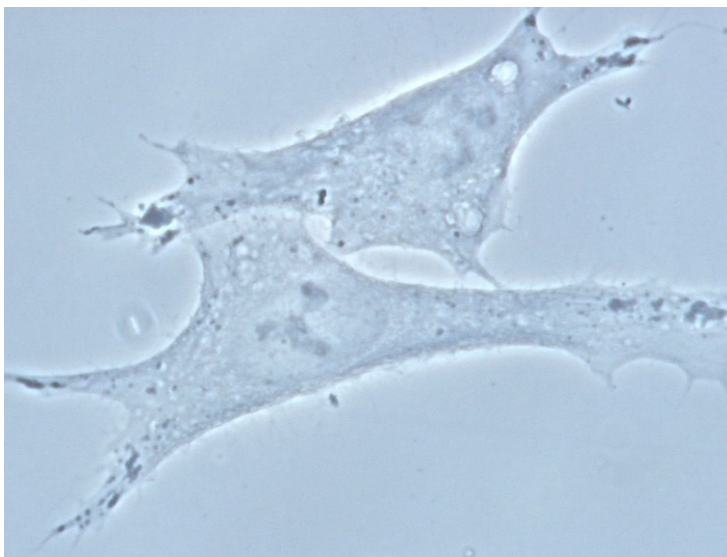


Abbildung 4. IPC-298
Melanomzellen

Zur Lagerung wurden die Zellen nach dem Ablösen und Sedimentieren in 1 ml Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) resuspendiert, bei -70 °C für einen Tag eingefroren und danach in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen für kurze Zeit in ein warmes Wasserbad (37 °C) gestellt und anschließend in ein 50 ml Reagenzgefäß mit 6 ml Medium überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (s.o.) zum Auswaschen des DMSO wurde das Pellet mit 2 ml Medium versetzt, in eine Gewebekulturflasche (25 cm² Bodenfläche der Gewebekulturflasche) mit 4 ml Medium überführt und hier bis zum Erreichen

einer geschlossenen, einschichtigen Zelldichte kultiviert bevor es in die größeren Gewebekulturflaschen überführt wurde.

2.3.3.2 Vorbereitung der Zellen zur Bestrahlung

Die im Brutschrank mit 25 ml Zellkultur-Medium (RPMI 1640, 10% FCS, 1% Antibiotic Antimycotic) in Gewebekulturflaschen (175 cm²) kultivierten IPC-298 Zellen wurden mit 6 ml Trypsin/ EDTA (1x) zur Entfernung von Zellresten gespült und mit 8 ml Trypsin/ EDTA (1x) abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde durch Hinzufügen von 16 ml Medium inhibiert und die Zellsuspension nachfolgend zentrifugiert (s.o.). Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet mit 12 ml Medium versetzt und resuspendiert. Mittels einer Neubauerzählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und 24 h vor Beginn der Bestrahlung durch Hinzufügen einer entsprechenden Menge Medium auf 1×10^5 Zellen/ml (je Petrischale 1,5 Mio. Zellen in 15 ml Medium) eingestellt. Petrischalen eigneten sich durch den abnehmbaren Deckels, da somit die UV-Strahlung ungehindert die Zellkultur erreichen konnte.

Für die Experimente mit ionisierender Strahlung (IR) wurden die Zellen in Gewebekulturflaschen (75 cm²) ausgesät. Die Zellen wurden wie oben mit 4 ml Trypsin/ EDTA (1x) gespült und mit 5 ml Trypsin/ EDTA (1x) abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde dann durch Hinzufügen von 5 ml Medium inhibiert. Nach der Zentrifugation (s.o.) wurden die Zelldichte bestimmt und mit Medium auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt, so dass in den zu bestrahlenden Gewebekulturflaschen (25 cm²) 0,6 Mio. Zellen in 6 ml Medium vorlagen.

2.3.3.3 Bestrahlungen

Die optimale Bestrahlungsdosis für die Progressionsanalysen wurde in Vorversuchen für UV-A und UV-B ermittelt. Die Bestrahlung erfolgte mit Abstand von 40 cm zur Strahlungsquelle. Die 1,5 Mio. Zellen in 15 ml Medium wurden in den Petrischalen bei abgenommenen Deckel mit UV-A-Strahlung der unterschiedlichen Dosisstufen von 0; 2,5; 5; 7,5 oder 10 J/cm² im Wasserbad bei 37 °C bestrahlt. Bei UV-B-Strahlung wurden 1,5 Mio. Zellen mit einer Bestrahlungsdosis zwischen 0, 10, 20, 30

oder 40 mJ/cm^2 bestrahlt. Die unbestrahlten Kontrollzellen wurden während der ganzen Versuchsdurchführung gleich behandelt.

Die deutlichsten Effekte auf die Zellzyklusprogression zeigten sich bei 10 J/cm^2 UV-A und bei 40 mJ/cm^2 UV-B (unterschiedliche Strahleneffekte von 5 J/cm^2 vs. 10 J/cm^2 UV-A beispielhaft im Ergebnisteil, Abb.14).

UV-Bestrahlungen:

Als UV-A-Strahlenquelle diente das Bestrahlungsgerät UVASUN 5000 (Mutzhas, München). Die Strahlenemission liegt zwischen 320-460 nm mit einem Maximum bei 374 nm. Die gemessene UV-A-Strahlungsintensität bei einem Abstand von 40 cm betrug 58 mW/cm^2 . UV-B-Strahlung wurde durch Lampen vom Typ Philips TL 20W/12 mit einer Emission zwischen 275-365 nm (Maximum bei 315 nm) erzeugt. Die Strahlung der UV-Röhren wurde jedes Mal dosimetrisch mit Hilfe des Waldmann-UV-Meter in 40 cm Abstand gemessen und hieraus die Bestrahlungszeit nach der Formel berechnet:

$$\text{Bestrahlungszeit} = \frac{\text{Gewünschte Bestrahlungsdosis (J/cm}^2\text{)}}{\text{Intensität der Strahlung (mW/cm}^2\text{)}}$$

Ionisierende Strahlung:

Die 0,6 Mio. Zellen in 6 ml Medium wurden mit Röntgenstrahlen (240kV; 13 mA; Isovolt 320/10; Seifert, Ahrensburg) und einem Be-Filter (3 mm) in den Gewebekulturschalen bestrahlt. Die Strahlendosis betrug 1 Gy min^{-1} . Die Bestrahlung wurde in Vorversuchen gestaffelt mit 0; 2,5; 5; 7,5 oder 10 Gy durchgeführt. Die unbestrahlten Kontrollzellen wurden während der ganzen Versuchsdurchführung gleich behandelt. Die Bestrahlung mit 7.5 Gy zeigte sich als geeignet zur Analyse der Zellzykluseffekte.

2.3.3.4 Zellproliferation nach Bestrahlung

Eine etablierte Methode zur Bestimmung der Zellzyklusprogression nach Bestrahlung ist die BrdU/DNA-Doppelmarkierungstechnik von DNA-synthetisierenden Zellen (34, 54, 55, 57, 120). BrdU ist ein Proliferationsmarker, der als Analogon des Thymidins in der S-Phase des Zellzyklus eingebaut wird und die Quantifizierung der S-Phase-

Zellen zum BrdU-Inkubationszeitpunkt in asynchron wachsenden Zellkulturen erlaubt. Die Messung der positiv markierten Zellen wird in vitro mittels fluoreszierenden anti-BrdU-Antikörpers im Durchflußzytometer durchgeführt und erlaubt die Trennung von BrdU-positiv und BrdU-negativ markierten Zellen. Desweiteren ermöglicht das Durchflußzytometer, Zellen anhand ihres unterschiedlichen DNA-Gehalts den einzelnen Zellzyklusphasen G₁-, S- oder G₂-Phase zu zuordnen.

Für die Analyse von akuten Zellzykluseffekten wurde in vorausgehenden Versuchen, bei denen die Zellen über einen Zeitraum von 72 h nach UV-Bestrahlung beobachtet wurden, ein optimales Zeitfenster von 0 h bis 24 h zur Beobachtung nach Bestrahlung ermittelt. Zur BrdU-Markierung wurden unmittelbar nach der UV-Bestrahlung die bestrahlten aber auch die unbestrahlten Kulturen in den Petrischalen mit geschlossenem Deckel mit 150 µl BrdU-Stammlösung (1 mg/ml; Endkonzentration 10 µM) für 10 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach Auswaschen des BrdUs mit jeweils 10 ml Medium wurde den Zellen 15 ml Medium zugefügt, um sie im Brutschrank für die Ermittlung der Progressionsanalyse bei 0 h, 6 h, 12 h und 24 h nach Bestrahlung zu verwahren. Für jeden Zeitpunkt wurde eine einzelne Zellkultur vorbereitet.

Bei der BrdU-Markierung nach Bestrahlung mit IR wurden die unbestrahlten und bestrahlten Kulturen sofort im Anschluss an die Bestrahlung, entsprechend des geringeren Volumens der 25 cm² Gewebekulturflaschen, mit 60 µl BrdU-Stammlösung (1 mg/ml; Endkonzentration 10 µM) für 10 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach Auswaschen des BrdUs mit jeweils 3 ml Medium wurde den Zellen 6 ml Medium zugefügt. Die Zellen wurden unmittelbar danach im Brutschrank für die Ermittlung der Progressionsanalyse bei 0 h, 6 h, 12 h und 24 h nach Bestrahlung verwahrt. Für jeden Zeitpunkt wurde eine einzelne Zellkultur vorbereitet.

2.3.3.5 Fixierung der Zellen nach Bestrahlung

Die jeweils für die einzelnen Progressionsanalysen bei 0 h, 6 h, 12 h und 24 h nach Bestrahlung zurückgestellten Zellen wurden vor der Messung mit 2 ml Trypsin gespült und mit 3 ml Trypsin abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde durch Hinzufügen von 6 ml Medium inhibiert. Die Suspension wurde 5 min zentrifugiert (1200 U; 20 °C).

Das Pellet wurde zur Fixierung der Zellen mit 2 ml 80% Ethanol versetzt und bis zur weiteren Behandlung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Bei den Experimenten mit IR wurde abweichend vom oben aufgeführten Protokoll aufgrund des geringeren Zellvolumens mit 1 ml Trypsin gespült und mit 2 ml Trypsin abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde dann durch Hinzufügen von 2 ml Medium inhibiert.

2.3.3.6 DNA-Doppelmarkierung

1 ml der in Ethanol fixierten Zellen wurden 5 min zentrifugiert (1200 U und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und das Pellet mit 2 ml RNase (10% in PBS) für 10 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (1200 U und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde die Suspension 10 min mit 2 ml Pepsin (70 FIP-U/g; 5% in 0,05 N Salzsäure) im Wasserbad inkubiert ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Die Proben wurden für 5 min ins Eisbad gestellt, anschließend mit 4 ml PBS-Albumin (1 g Albumin auf 100 ml PBS) gewaschen und zentrifugiert (1200 U und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Zum aufgeschüttelten Pellet wurde 2 N HCL gegeben und 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, um die DNA zu denaturieren. Nach 3 Waschschritten mit 4 ml PBS-Albumin (1%) wurden die Zellen mit 200 μl eines Maus-Anti-BrdU-Antikörper (1:10 verdünnt in PBS-Albumin, 1%) versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Die Kontrollzellen wurden stattdessen mit 200 μl PBS-Albumin (1%) versetzt. Nach Wasch- und Zentrifugationsschritten wurden die Zellen mit 200 μl eines Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörpers (1:50 verdünnt in PBS-Albumin, 1%) versetzt und 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Gleich im Anschluss wurden zur Gegenfärbung der DNA 350 μl Propidiumiodid (PI)-Stammlösung (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben und wie oben zentrifugiert. Das Pellet wurde hiernach mit 200 μl einer PI-PBS-Albumin-RNase Lösung (PI verdünnt 1:1 mit PBS-Albumin sowie veretzt im Verhältnis 1:50 mit RNase, s.o.) mindestens 15 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln inkubiert. Hiernach konnten der DNA-Gehalt und die BrdU-Inkorporation pro Zelle in den gefärbten Proben am Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson) gemessen und mittels Cell Quest (Software, Becton Dickinson) analysiert werden.

2.3.3.7 Datenanalyse

Mit Hilfe der Messdaten des Durchflusszytometer und der FACScan Research Software und einer überarbeiteten Methodik (55) lassen sich graphisch Histogramme erstellen, die aus 2 Parametern ermittelt werden. Zum einen werden die Zellen nach positiver bzw. negativer PI-Färbung auf der y-Achse unterschieden und auf der x-Achse wird der unterschiedliche DNA-Gehalt dargestellt. Insgesamt wurden 6 Regionen in den Histogrammen definiert (Abb. 5).

Jeweils 3 Regionen auf der x-Achse wurden für die Zellen anhand des unterschiedlichen DNA Gehalts definiert, um die Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen (G1-, S- und G2- Phase) unterscheiden zu können. Jede dieser 3 Regionen wurde auf der y-Achse nochmals unterteilt in Zellen, die positiv oder negativ mit PI gefärbt wurden und somit also BrdU aufgenommen oder nicht aufgenommen hatten. Mit Hilfe dieser Methode konnte in den einzelnen Regionen der Prozentsatz der Zellen in jeder Zellzyklusphase bestimmt und so getrennt für BrdU-markierte (S-Phase-Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung und Inkubation) und nicht markierte Zellen (G1- und G2-Phase-Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung und Inkubation) betrachtet werden.

Die Analyse und Beobachtung jeder einzelnen Phase über mehrere Stunden erlaubt Veränderungen in der Progression und Proliferationsaktivität der Zellen nach Bestrahlung mit UV-A, UV-B oder IR zu bestimmen und mit den unbestrahlten Zellen zu vergleichen. Für die Auswertung wurden die zwei einzelnen Versuchsdurchläufe als Mittelwert zusammengefasst. Die Anzahl der Zellen, die sich zum Bestrahlungszeitpunkt (0 h Wert) jeweils in der G1-, S- oder G2-Phase befanden, wurden in der Auswertung einzeln über die Zeit analysiert und der Ausgangswert am Bestrahlungszeitpunkt wurde in der graphischen Darstellung als 100% gesetzt und normiert. Alle Werte der zeitlich nachgeordneten Messzeitpunkte wurden auf den jeweiligen zugehörigen 0 h-Wert bezogen (s. Formel).

Mit Hilfe dieser Darstellung können die Veränderungen in der Progression und die sich verändernden Mengen an Zellen in den verschiedenen Zellzyklus-Phasen als eine Funktion der Zeit präsentiert werden.

$$\text{Normierter Wert (\%)} = \frac{\text{Gemessener Wert zum jeweiligen Messzeitpunkt}}{\text{Gemessener 0-h-Wert}} * 100$$

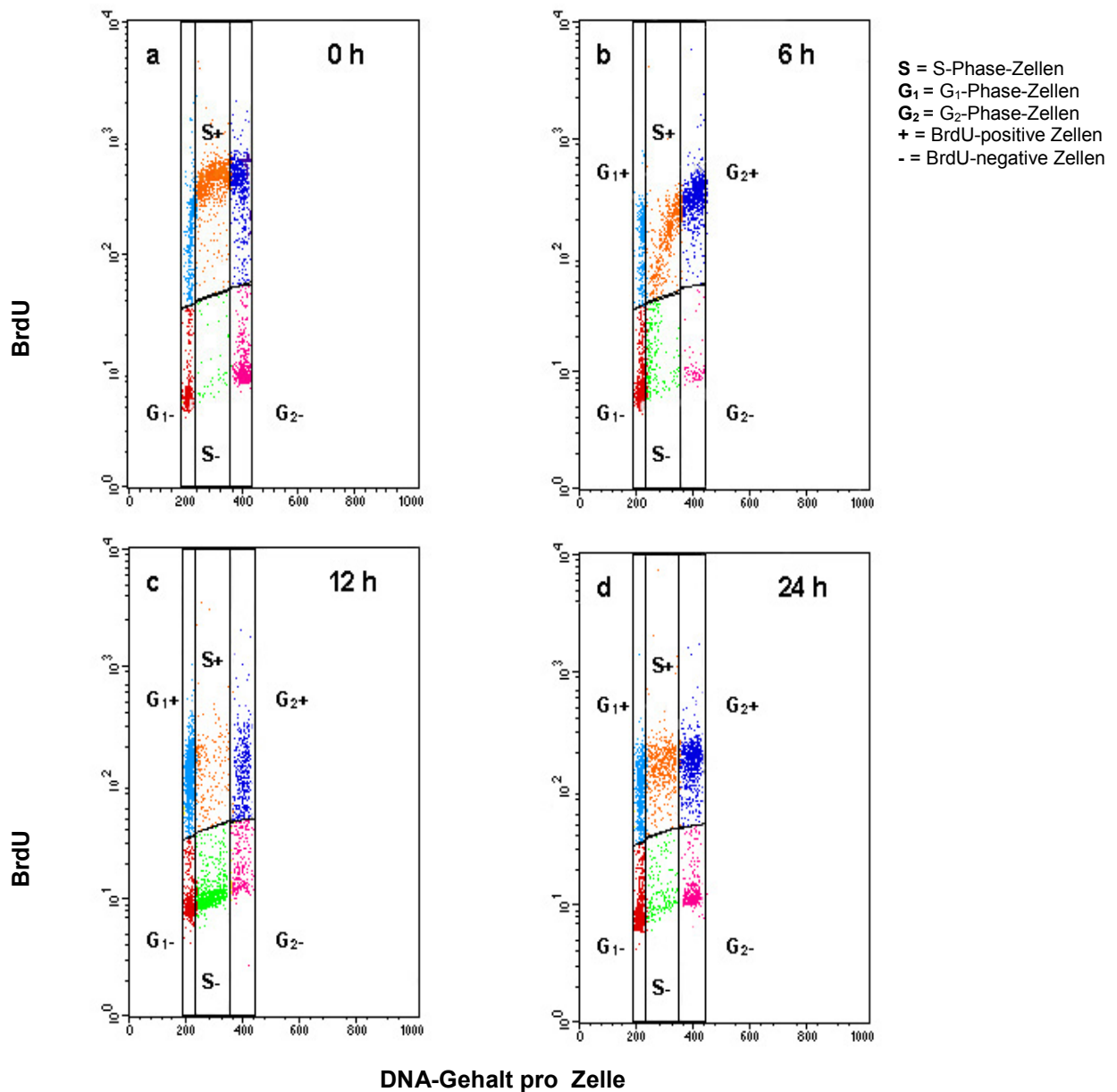


Abbildung 5. Histogramme der IPC-298 Zellen zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h, 12 h und 24 h nach UV-B-Bestrahlung und Bestimmung von 6 Regionen (farbig abgegrenzt) entsprechend des unterschiedlichen DNA-Gehalts (x-Achse) und der BrdU-Markierung (y-Achse). G₁-, S- und G₂/M-Phase wurden nach ihrem zellulären DNA-Gehalt (x-Achse) definiert und unterteilt in BrdU positive und negative Regionen (y-Achse) sowie die Progression im zeitlichen Verlauf (0 h, 6 h, 12 h und 24 h) dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Patienten und Probanden

3.1.1 Verteilung der Probanden

Von den 62 Patienten der Studie zur Bestimmung der Antioxidantien erhielten 33 Patienten Verum und 29 Patienten Placebo während des 3-monatigen Studienzeitraums (s. Tab 4).

Tabelle 4. Verteilung der Probandengruppen nach P oder V

Gruppe	Doppelblind-placebokontrollierte Studie (n=62)	
	Placebo (n)	Verum (n)
MM	6	7
BK	9	10
SK	4	6
KP	10	10
Gesamt	29	33

MM, malignes Melanom; BK, Basalzellkarzinom; SK, spinozelluläres Karzinom; KP, Kontrollpersonen

3.2 In vivo Untersuchungen

3.2.1 Antioxidantien-Bestimmung

3.2.1.1 L-Ascorbinsäure-Spiegel

Der Mittelwert des L-Ascorbinsäure-Spiegels im Plasma lag vor Beginn der Studie für die 33 Probanden der Verumgruppe mit 11,19 mg/l im Normbereich (4-20 mg/l). Bereits nach 1 Monat zeigte sich in der Verumgruppe im Vergleich zum Ausgangswert ein signifikanter Anstieg des L-Ascorbinsäure-Spiegels auf 16,84 mg/l

($p < 0,001$). Dieser Anstieg blieb nach 2 Monaten mit 17,17 mg/l ($p < 0,001$) nach 3 Monaten mit 14,64 mg/l ($p = 0,007$) über den gesamten Studienzeitraum weitgehend erhalten. Es war somit keine weitere Steigerung durch längerfristige Einnahme zu beobachten (s. Abb. 6). In der Placebogruppe ($n = 29$) betrugen die L-Ascorbinsäure-Werte zu Studienbeginn 9,67 mg/l und blieben nach dem 1. Monat mit 11,02 mg/l, nach dem 2. Monat mit 11,37 mg/l und nach dem 3. Monat mit 10,32 mg/l nahezu konstant (s. Abb. 6). Die Veränderungen der L-Ascorbinsäure-Werte in der Placebogruppe waren zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant. Keiner der Probanden berichtete über Nebenwirkungen.

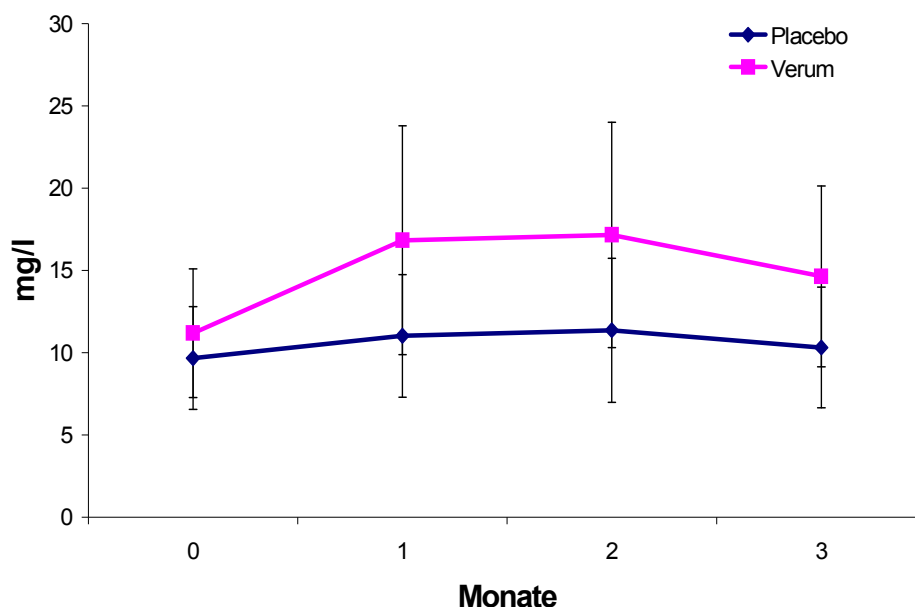


Abbildung 6. Mittelwerte der L-Ascorbinsäure-Blutspiegel der Verumgruppe ($n = 33$) im Plasma bei Studienbeginn (0), nach dem 1. Monat, 1 ($p < 0,001$); 2. Monat, 2 ($p < 0,001$) und 3. Monat, 3 ($p = 0,007$) sowie die Veränderung der Mittelwerte der L-Ascorbinsäure-Spiegel der Placebogruppe ($n = 29$) im gesamten Studienverlauf (n.s., nicht signifikant).

3.2.1.2 D-alpha-Tocopherol-Spiegel

Bei den D-alpha-Tocopherol-Bestimmungen lag der Mittelwert der 33 Probanden der Verumgruppe zu Studienbeginn bei 15,94 mg/l und somit innerhalb des Normbereichs (5-20 mg/l). Bereits nach 1 Monat zeigte sich in der Verumgruppe im

Vergleich zum Ausgangswert ein signifikanter Anstieg des D-alpha-Tocopherol-Spiegels auf 41,55 mg/l ($p < 0,001$). Auch an den Kontrollzeitpunkten nach 2 Monaten blieb der D-alpha-Tocopherol-Spiegel in der Verumgruppe mit 38,62 mg/l ($p < 0,001$) und nach 3 Monaten mit 38,18 mg/l ($p < 0,001$) in etwa konstant (s. Abb. 7). Die Messwerte für D-alpha-Tocopherol in der Placebogruppe ($n=29$) lagen zu Studienbeginn bei 15,93 mg/l. Auch im weiteren Studienverlauf blieben die Werte nahezu konstant in der Placebogruppe (1. Monat, 15,64 mg/l; 2. Monat, 16,23 mg/l und 3. Monat, 16,42 mg/l) und innerhalb des Normbereichs (5-20 mg/l). Die Veränderungen der D-alpha-Tocopherol-Werte in der Placebogruppe waren zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant. In der Verumgruppe überschritten die Werte den Normbereich nach 30-tägiger Verum-Applikation. Keiner der Probanden berichtete über Nebenwirkungen.

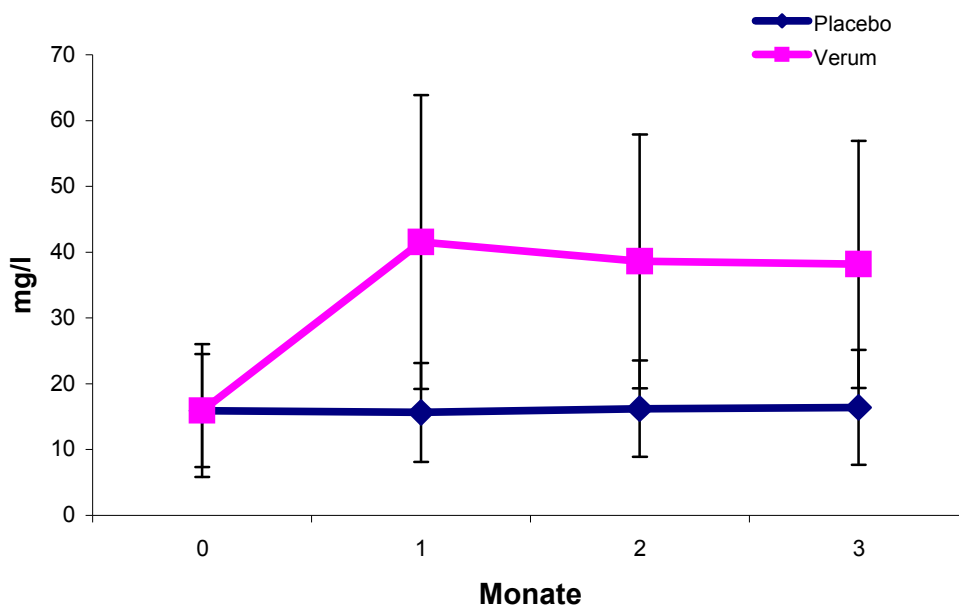


Abbildung 7. Mittelwerte der D-alpha-Tocopherol-Blutpiegel der Verumgruppe ($n=33$) im Serum bei Studienbeginn (0), nach dem 1. Monat, 1 ($p < 0,001$); 2. Monat, 2 ($p < 0,001$) und 3. Monat, 3 ($p < 0,001$) sowie die Veränderung der Mittelwerte der D-alpha-Tocopherol-Spiegel der Placebogruppe ($n=29$) im gesamten Studienverlauf (n.s., nicht signifikant).

3.2.1.3 Antioxidantien-Spiegel der Probanden zur Bestimmung der minimalen Erythemdosis

Der Ausgangsspiegel für L-Ascorbinsäure im Plasma bei der Probandengruppe zur Bestimmung der MED lag bei 11,63 mg/l, stieg nach dem ersten Monat statistisch signifikant zum Ausgangswert auf 19,25 mg/l ($p < 0,001$, $n=18$) und blieb nach 2 Monaten mit 19,03 mg/l ($p < 0,001$, $n=18$) sowie nach 3 Monaten mit 18,15 mg/l ($p < 0,001$, $n=18$) nahezu konstant auf diesem Niveau. Für D-alpha-Tocopherol im Serum lag der Ausgangsspiegel in dieser Gruppe bei 20,96 mg/l und erreichte nach dem ersten Monat statistisch signifikant zum Ausgangswert 36,03 mg/l ($p < 0,001$, $n=18$), nach 2 Monaten 39,54 mg/l ($p < 0,001$, $n=18$) und nach 3 Monaten 38,84 mg/l ($p < 0,001$, $n=18$).

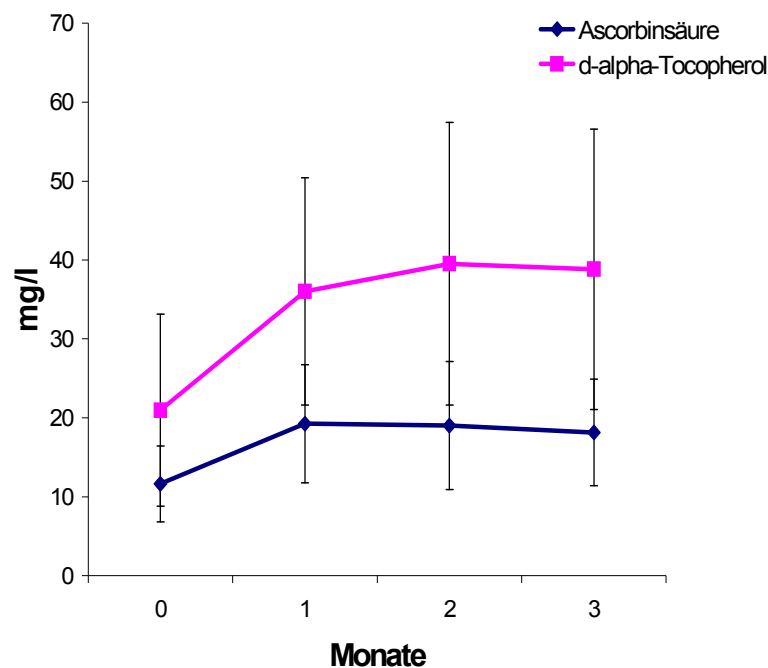


Abbildung 8. L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol Mittelwerte in mg/l in der Patienten- und Probandengruppe zur MED-Bestimmung ($n=18$). Alle Antioxidantien-Werte für L-Ascorbinsäure und für D-alpha-Tocopherol im Studienverlauf waren zum Ausgangswert jeweils statistisch signifikant erhöht ($p < 0,001$).

3.2.2 Minimale Erythemdosis für UV-B-Bestrahlung

Bei 18 Patienten wurde eine MED-Bestimmung für UV-B vor und während der AO-Applikation durchgeführt (s. Tab. 3). Beim Vergleich der zu Studienbeginn und nach 3 Monaten durchgeführten MED-Bestimmung, zeigte sich bei 12 von 18 Probanden eine Abnahme der Lichtempfindlichkeit der Haut gegenüber UV-B. In 6 Fällen war keine Veränderung zu beobachten (Abb. 9). Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Medians der MED für UV-B (Abb. 9). Bei Studienbeginn war der Median der MED 80 mJ/cm^2 und nach 3 Monaten 113 mJ/cm^2 ($p=0,002$).

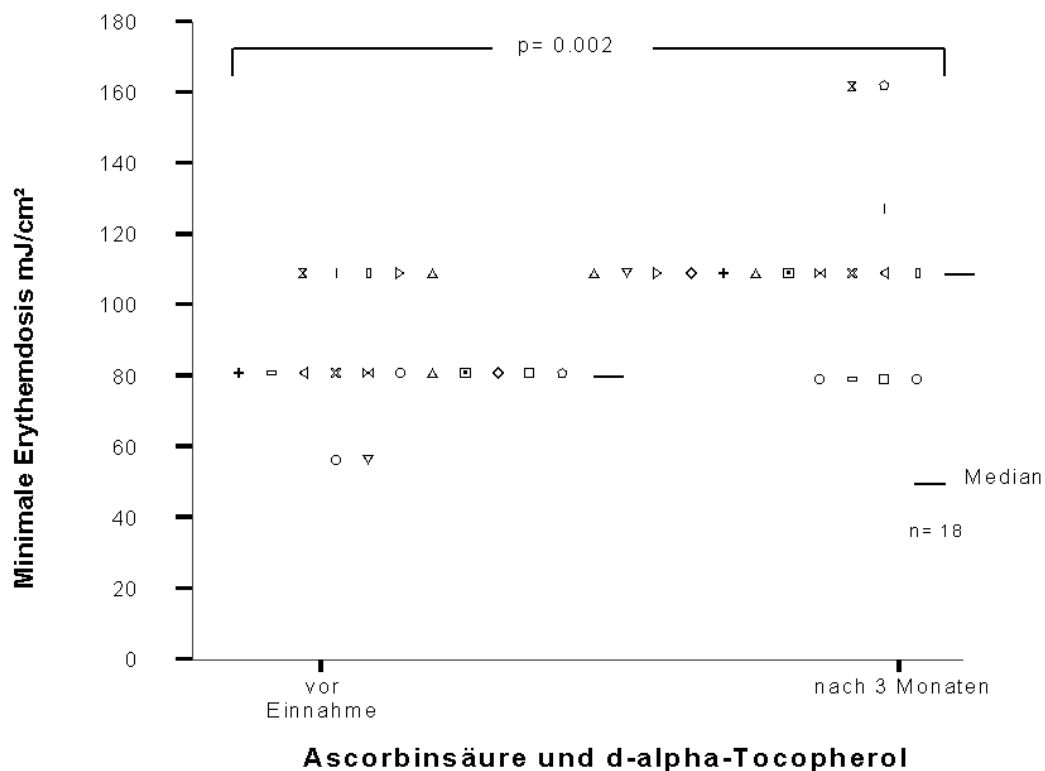


Abbildung 9. Minimale Erythemdosis vor und während Antioxidantien-Applikation (Gabe für 3 Monate von L-Ascorbinsäure- und D-alpha-Tocopherol). Jedes Symbol bezeichnet einen Patienten oder Probanden.

Beim Vergleich der MED mit den L-Ascorbinsäure- und D-alpha-Tocopherol-Werten zeigte sich bei Probanden ohne MED-Veränderung ($n=6$) nach 3 Monaten AO-Einnahme ein höherer AO-Basissspiegel bei Studienbeginn als bei den 12 Probanden mit MED-Veränderung. Der L-Ascorbinsäure-Wert bei Studienbeginn lag bei

14,23 mg/l für die 6 Probanden ohne MED-Änderung und bei 10,33 mg/l für die 12 Probanden mit MED-Änderung. Nach dem 1. Monat stiegen die L-Ascorbinsäure-Spiegel bei Probanden ohne MED-Veränderung auf 22,94 mg/l ($p=0,05$), nach dem 2. Monat auf 21,79 mg/l (n.s.) und nach dem 3. Monat auf 20,32 mg/l (n.s.). In der Gruppe mit MED-Anstieg stiegen die L-Ascorbinsäure-Spiegel nach dem 1. Monat auf 17,41 mg/l ($p=0,003$), nach dem 2. Monat auf 17,65 mg/l ($p=0,01$) und nach dem 3. Monat auf 17,07 mg/l ($p=0,01$) (Abb. 10). Beim D-alpha-Tocopherol-Spiegel zu Studienbeginn verhielt es sich ähnlich. Der Basiswert der 6 Probanden ohne MED-Veränderung war mit 27,34 mg/l im Mittel deutlich höher als 17,78 mg/l für die 12 Probanden mit MED-Änderung (Abb. 11). Der D-alpha-Tocopherol-Spiegel stieg nach dem 1. Monat in der Gruppe ohne MED-Änderung auf 31,69 mg/l (n.s.), nach dem 2. Monat auf 34,24 (n.s.) und nach dem 3. Monat auf 38,95 mg/l (n.s.). Hingegen stieg bei den 12 Probanden mit MED-Änderung der D-alpha-Tocopherol-Spiegel nach dem 1. Monat auf 38,2 mg/l ($p<0,001$), nach dem 2. Monat auf 42,19 mg/l ($p<0,001$) und nach dem 3. Monat auf 38,78 mg/l ($p<0,001$) (Abb. 11). Die MED-Auswertung für die Gruppe mit gleichbleibender MED zeigte zudem zu Studienbeginn am Tag 0 (bzw. am Tag 90) einen Medianwert von $96,5 \text{ mJ/cm}^2$, der somit im Vergleich zu 80 mJ/cm^2 am Tag 0 für die Probanden mit MED-Veränderung höher ausfiel.

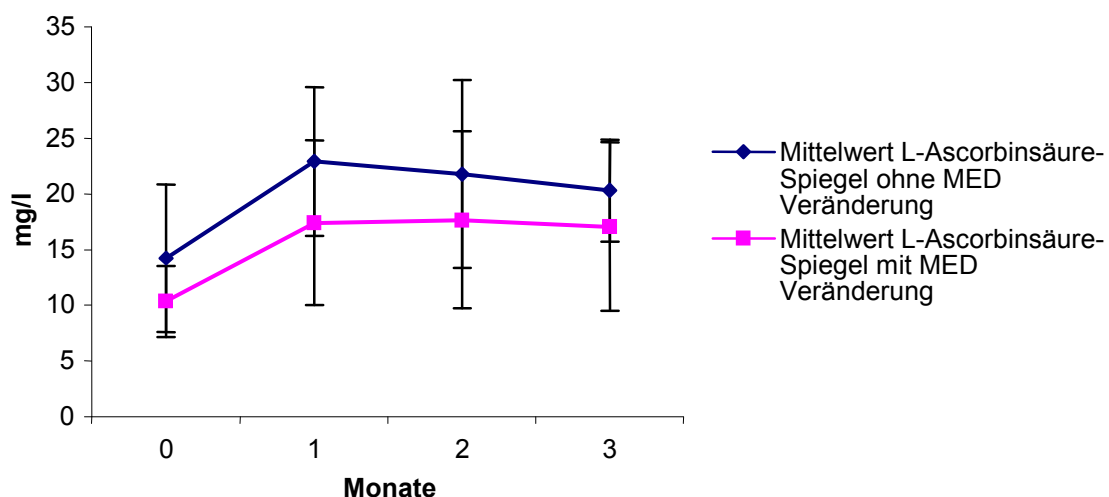


Abbildung 10. Vergleich der L-Ascorbinsäure-Spiegel in mg/l für die Probanden ohne ($n=6$, Monat 1, $p=0,05$ und Monat 2 und 3 jeweils n.s.) und mit ($n=12$, Monat 1, $p=0,003$, Monat 2 und 3 jeweils $p=0,01$) MED-Veränderung.

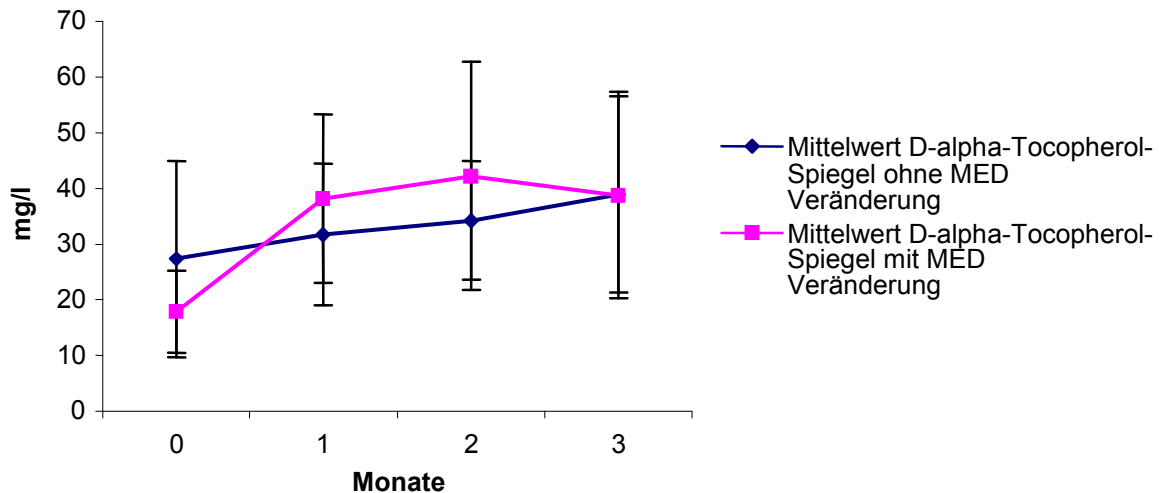


Abbildung 11. Vergleich der D-alpha-Tocopherol-Spiegel in mg/l für die Probanden ohne (n=6, Monat 1 bis 3, n.s.) und mit (n=12, Monat 1 bis 3, $p < 0,001$) MED-Veränderung.

3.2.3 Einfluss der Antioxidantien-Applikation und der UV-B-Bestrahlung auf die Proliferationsaktivität in der Epidermis

Nach UV-B-Bestrahlung der Haut und vor AO-Applikation zeigte sich eine verringerte Proliferationsaktivität der Epidermiszellen im Vergleich zur unbestrahlten Haut. Lediglich 4 Probanden zeigten eine gleichbleibende bzw. leicht ansteigende Proliferationsaktivität (Abb. 12). Der Median der proliferierenden BrdU-positiv markierten Zellen vor AO-Applikation betrug in unbestrahlter Haut 7,8 Zellen/mm und in bestrahlter Haut 5,0 Zellen/mm ($p = 0,02$; Abb. 13).

Die Proliferationsaktivitätsmessung nach 3 Monaten Gabe von AO ergab einen Median der BrdU-positiv markierten Zellen in unbestrahlter Haut von 8,0 Zellen/mm und in bestrahlter Haut von 4,0 Zellen/mm ($p < 0,001$; Abb. 13). Somit wurde der Median der proliferierenden Zellen durch die 3-monatige Gabe von L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol in unbestrahlter Haut nicht signifikant verändert (7,8 Zellen/mm vs. 8,0 Zellen/mm; n.s., Abb. 13). In der bestrahlten Haut zeigte sich jedoch eine signifikante Verringerung der proliferierenden Epidermiszellen nach AO-Applikation (5,0 Zellen/mm vs. 4,0 Zellen/mm; $p = 0,03$, Abb. 13). Bei lediglich einem der 17 Probanden kam es unter AO-Einfluss zu einer leicht erhöhten Proliferation nach Bestrahlung (Abb. 12).

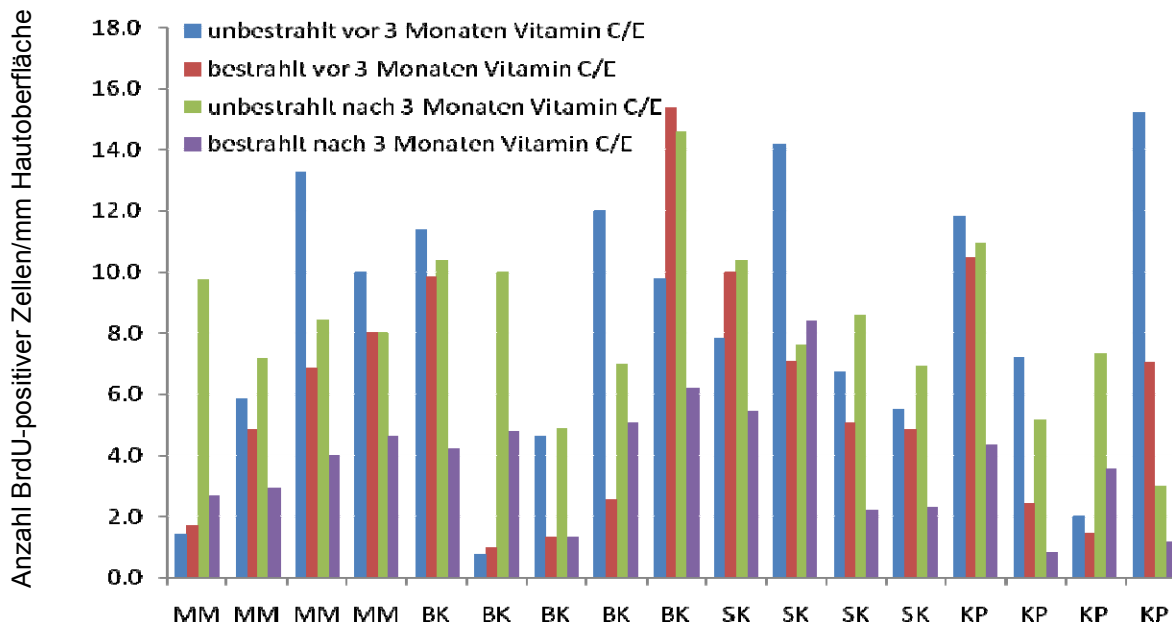


Abbildung 12. Proliferierende Zellen je mm Hautoberfläche in unbestrahlter vs. bestrahlter Haut vor und nach 3 Monaten Antioxidantien (L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol)-Applikation; MM, malignes Melanom; BK, Basaliom; SK, spinozelluläres Karzinom; KP, Kontrollpersonen

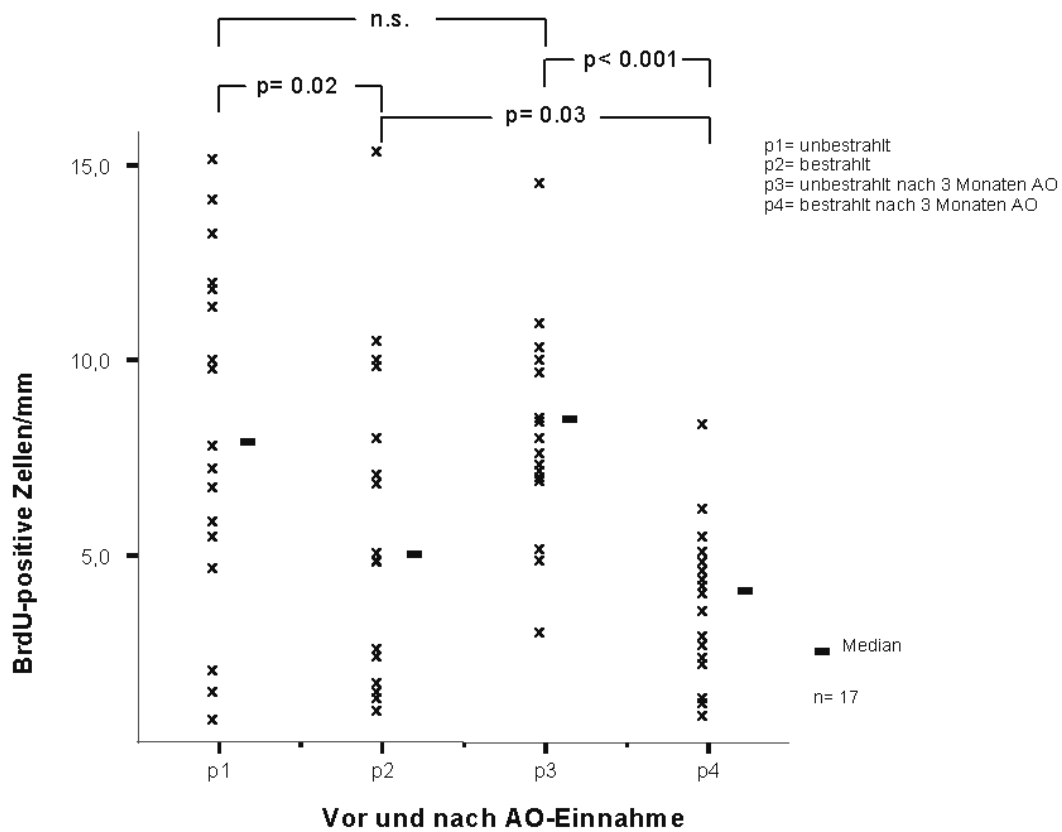


Abbildung 13. BrdU-positive Zellen/mm Hautoberfläche unbestrahlt (p1) und UV-B-bestrahlt (p2) vor Einnahme der Antioxidantien (L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol) sowie unbestrahlt (p3) und UV-B-bestrahlt (p4) während der 3-monatigen Einnahme der Antioxidantien; n.s., nicht signifikant

3.3 In vitro Untersuchungen

3.3.1 Zellzyklus-Progressionsanalysen

Die Beobachtung der Zellzyklusprogression ermöglicht die Beurteilung der Strahlungseffekte in den einzelnen Zellzyklusphasen nach UV-A-, UV-B- und ionisierender Strahlung. Mit der Technik der BrdU-Markierung war es möglich, im Durchflußzytometer die Unterscheidung einzelner Zellzyklusphasen in der nicht synchron wachsenden Zellkultur IPC 298 durchzuführen. Die Zellen konnten in den einzelnen Phasen G_1 , S oder G_2 durch den jeweils unterschiedlichen DNA-Gehalt separiert und getrennt voneinander analysiert werden. Hierdurch konnte der weitere Verlauf jeder einzelnen Zellzyklusphase ab dem Zeitpunkt der Bestrahlung beurteilt werden. Mittels der Messparameter wurde die Progression der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen sowohl über die Zeit als auch getrennt für BrdU-markierte S-Phase-Zellen (BrdU-positiv markierte Zellen) und nicht BrdU-markierte Zellen analysiert.

Die Abbildung 14 demonstriert als ein Beispiel die Zellzykluskinetik von bestrahlten Zellen verglichen mit unbestrahlten Kontrollen. Die Histogramme zeigen eine durch UV-A-Bestrahlung induzierte Verzögerung der Zellen beim Eintritt in den nächsten Zellzyklus und es wird die von der Bestrahlungsdosis abhängige Verstärkung dieser Verzögerung dargestellt (Abb. 14, Pfeil bei 12 h). Ähnliche Histogramme konnten sowohl für UV-B als auch für ionisierende Strahlung ermittelt werden.

Mit Hilfe der Progressionsanalyse konnten strahlungsabhängige Zellzyklusveränderungen und deren Intensität im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen sowie eine Abhängigkeit dieser Effekte von der Bestrahlungsdosis ermittelt werden. In Vorversuchen wurde für alle Strahlungsarten das optimale Zeitfenster für die Untersuchung von Zellzykluseffekten und die geeignete Dosis der Strahlung bestimmt. Die Vorversuche erstreckten sich über 72 h mit Untersuchungen vor und 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h oder 72 h nach der Bestrahlung. Hierbei zeigte sich, dass die Strahlungseffekte in einem Zeitfenster von 24 h (0 h, 6 h, 12 h und 24 h) optimal zu beobachten sind. Zur Dosisfindung wurden Versuche mit UV-A-Dosen von 2,5, 5, 7,5 und 10 J/cm², mit UV-B-Dosen von 10, 20, 30 und 40 mJ/cm² sowie bei ionisierender Strahlung mit 2,5, 5, 7,5 und 10 Gy durchgeführt. Als ideale Dosis für

UV-A-Bestrahlung wurden 10 J/cm^2 und für UV-B 40 mJ/cm^2 ermittelt. Für ionisierende Strahlung zeigten sich die Einflüsse auf den Zellzyklus ideal bei $7,5 \text{ Gy}$.

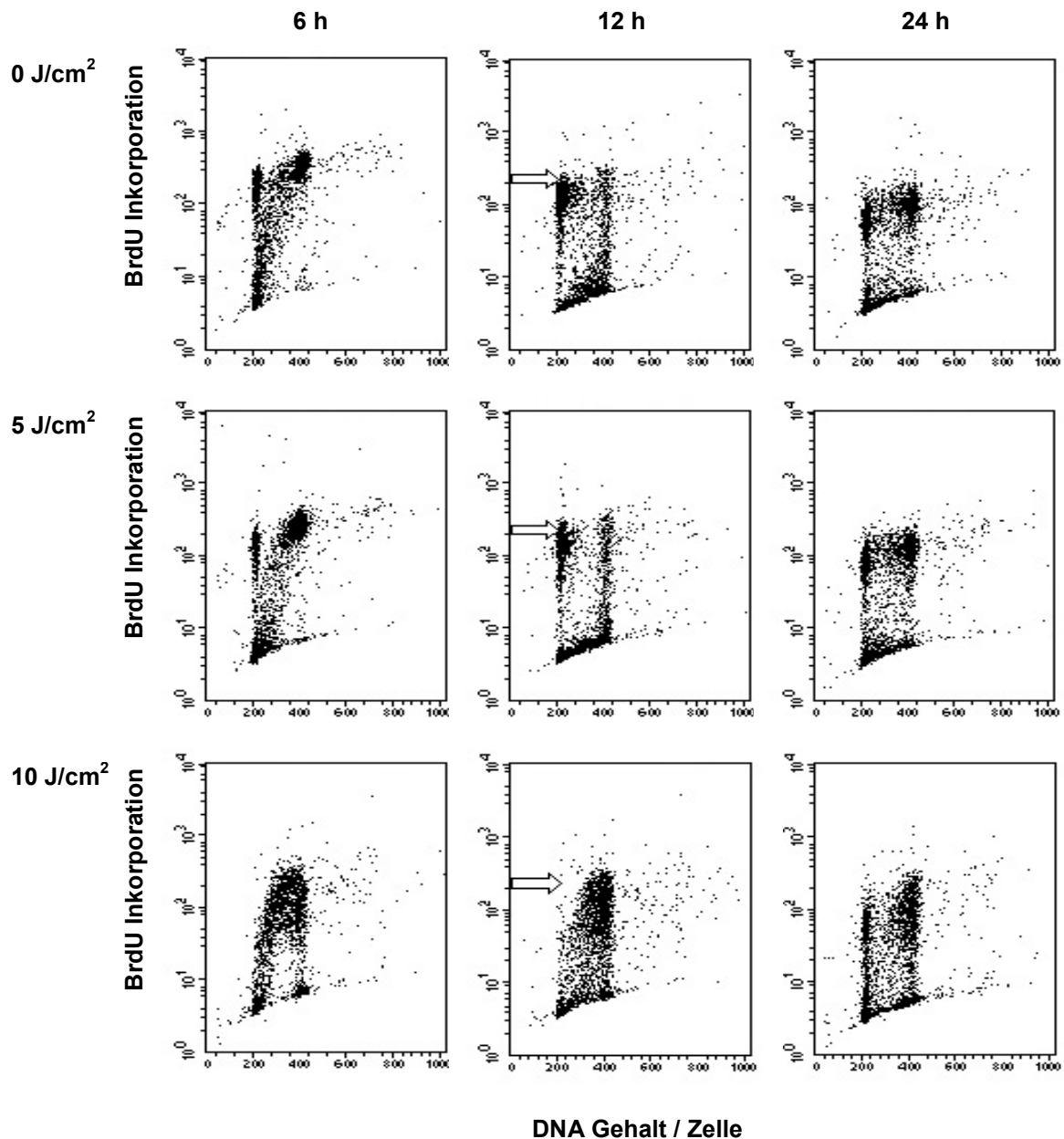


Abbildung 14. BrdU/DNA-Histogramme UV-A-bestrahlter IPC-298 Zellen 6 h, 12 h und 24 h nach Bestrahlung (5 J/cm^2 oder 10 J/cm^2) im Vergleich mit unbestrahlten Kontrollen (0 J/cm^2). Die Pfeile zeigen beispielhaft nach 12 h den verzögerten Übertritt der BrdU-positiven Zellen in die G_1 -Phase in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis.

3.3.2 UV-A-Effekte auf die Zellzyklusprogression

Eine Zelle benötigt circa 24 Stunden, um den Zellzyklus zu durchlaufen. Daher ist die Zellzyklusprogression der IPC-298 Zellen zu je 4 Zeitpunkten nach UV-A-Bestrahlung in den Abbildungen 16 a-f über diesen Zeitraum dargestellt.

In der G₁-Phase befindliche, mit 10 J/cm² UV-A-bestrahlte (BrdU negative Zellen) IPC-298 Zellen wurden nicht in der G₁-Phase blockiert (Abb. 16 d). Die zu beobachtende leicht verlangsamte Progression in der G₁-Phase zwischen 12 h und 24 h nach Bestrahlung ist die Folge einer Blockade der Zellen in der G₂-Phase 6 h nach Bestrahlung (Abb. 16 f).

Die S-Phase durchlaufen die BrdU negativ markierten Zellen ohne eine Verzögerung (Abb. 16 e). Allerdings zeigt sich im weiteren Verlauf sowohl nach 6 h als auch nach 24 h eine Blockade der bestrahlten Zellen in der G₂-Phase (Abb. 16 f). Der höhere Anteil (195,1 %) von UV-A-bestrahlten Zellen nach 24 h in der G₂-Phase im Vergleich mit den unbestrahlten Kontrollen (113,9 %) zeigt, dass Zellen, die während der G₁-Phase bestrahlt worden sind, erst in der nachfolgenden G₂-Phase 24 h nach Bestrahlung blockiert werden (Abb. 16 f).

Die während der G₂-Phase mit UV-A-bestrahlten Zellen (BrdU negative Zellen) zeigten 6 h nach Bestrahlung eine Blockade in dieser Phase (Abb. 16 f). 74,6 % der UV-A-bestrahlten Zellen waren nach 6 h blockiert gegenüber 45,2 % der unbestrahlten Kontrollzellen. Die Folge hiervon war, wie oben bereits erwähnt, der verzögerte Eintritt in die nachfolgende G₁-Phase (Abb. 16 d).

Eine Bestrahlung während der S-Phase (BrdU positive Zellen) führte zwischen 0 h und 12 h zu einer deutlichen Verzögerung der Progression durch die S-Phase (Abb. 16 b). Zum Zeitpunkt 12 h nach Bestrahlung in der S-Phase waren 11,8 % der Kontrollen gegenüber 51,6 % der UV-A-bestrahlten Zellen in der S-Phase. Dadurch kam es zu einer verzögerten Progression in die folgende G₂-Phase und einer sich anschließenden Blockade in der G₂-Phase nach 12 h (Kontrollzellen 164,3 % vs. 293,2 % UV-A bestrahlte Zellen, Abb. 16 c).

Diese beiden Effekte sind der Grund für den verspäteten Übergang der in der S-Phase mit UV-A-bestrahlten Zellen in die nächste G₁-Phase (12 h bis 24 h nach Bestrahlung, Abb. 16 a).

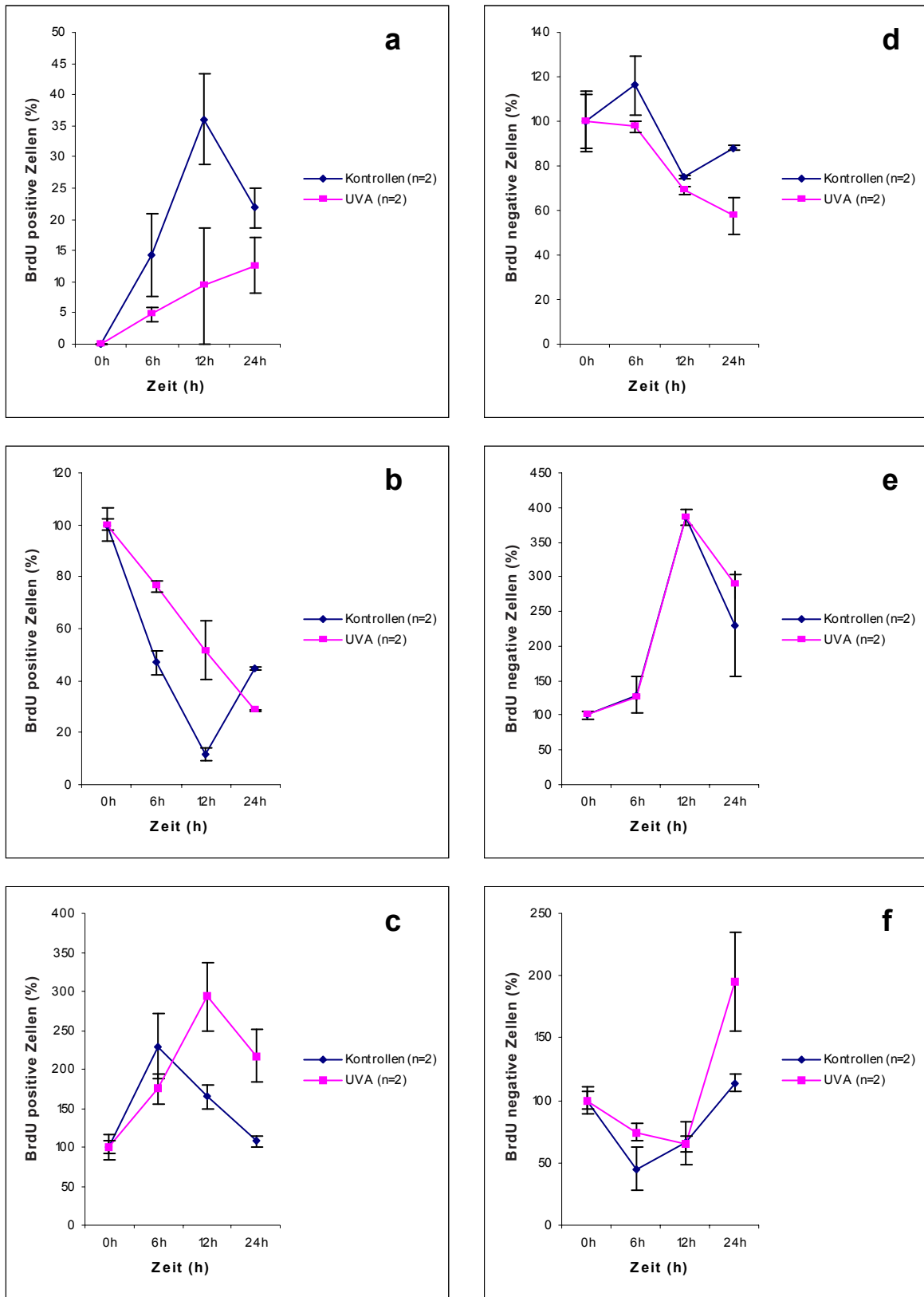


Abbildung 16 a-f: IPC-298-Zellzykluskinetik nach UV-A-Bestrahlung; BrdU-positive (16 a-c) und BrdU-negative (16 d-f) Zellen; G1-Phase (a, d); S-Phase (b, e); G2-Phase (c, f); BrdU: 5-Bromodesoxyuridin.

3.3.3 UV-B-Effekte auf die Zellzyklusprogression

Eine Zelle benötigt circa 24 Stunden, um den Zellzyklus zu durchlaufen. Daher ist die Zellzyklusprogression der IPC-298 Zellen zu je 4 Zeitpunkten nach UV-B-Bestrahlung in den Abbildungen 17 a-f über diesen Zeitraum dargestellt. Im Progressionsverlauf nach Bestrahlung mit 40 mJ/cm² UV-B zeigte sich nach 12 h eine deutliche Blockade im Zellzyklus in der G₁-Phase (Abb. 17 d). 69,4% der unbestrahlten Kontrollen zeigten sich 12 h nach Bestrahlung in der G₁-Phase. Dem gegenüber konnten noch 99,1% der mit UV-B-bestrahlten Zellen zum Messzeitpunkt in der G₁-Phase detektiert werden. Die Progression in und durch die nachfolgende S-Phase (Abb. 17 e) war entsprechend verzögert (s. 12 h-Wert, Abb. 17 e). Diese Verzögerung in der S-Phase führte gleichzeitig zu einem späteren Eintritt (Zeitpunkt 24 h) in die anschließende G₂-Phase für UV-B-bestrahlte Zellen (Abb. 17 f). In der G₂-Phase bestrahlte Zellen (BrdU negative Zellen) zeigten eine leichte Verzögerung der Progression nach 6 h, sie wurden jedoch nicht blockiert. Die verlangsamte Progression der bestrahlten Zellen in der G₂-Phase (Abb. 17 f) im Vergleich zu den Kontrollen und die verringerte Zellzahl nach 24 h wurde durch den Block in der G₁-Phase induziert (Abb. 17 d).

Eine Bestrahlung während der S-Phase (BrdU positive Zellen) sorgte für eine Verzögerung der Progression in der S-Phase des Zellzyklus. Beginnend zwischen 6 h und 12 h nach UV-B-Bestrahlung zeigte sich eine deutliche Verzögerung in der S-Phase (Abb. 17 b). 12 h nach Bestrahlung kumulierten 9,7% der unbestrahlten Zellen gegenüber 55,6% der mit UV-B-bestrahlten Zellen in der S-Phase. Im weiteren Zellzyklusverlauf sorgte die Verzögerung in der S-Phase auch für einen verzögerten Eintritt der Zellen in die folgende G₂-Phase nach Bestrahlung (Abb. 17c). Nach 6 h zeigten sich bereits 226,3% der unbestrahlten Kontrollen in der G₂-Phase gegenüber deutlich weniger UV-B-bestrahlten Zellen (135,8%).

Nach 24 h wurden die in der S-Phase bestrahlten Zellen (BrdU positive Zellen) in der G₂-Phase blockiert. Es befanden sich 101,1% der unbestrahlten Zellen 24 h nach Bestrahlung in der G₂-Phase. Die UV-B-bestrahlten Zellen kumulierten hingegen mit einem Wert von 224,2% in der G₂-Phase 24 h nach Bestrahlung (Abb. 17 c). Als Folge dieser Verzögerung und Blockade war auch die Progression durch die G₁-Phase für die in der S-Phase bestrahlten Zellen verlangsamt (s. 12 h bis 24 h, Abb. 17 a).

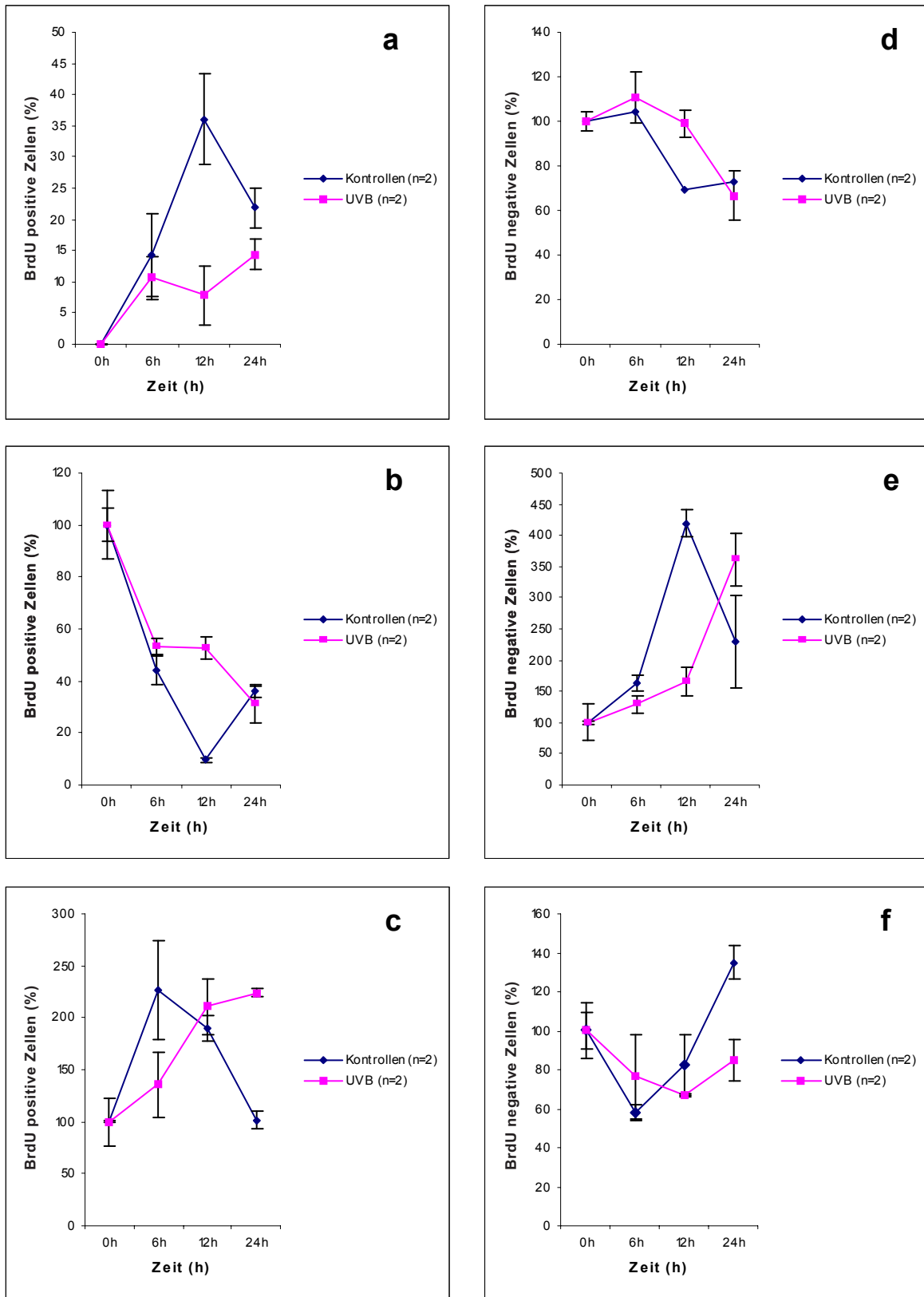


Abbildung 17 a-f: IPC-298-Zellzykluskinetik nach UV-B-Bestrahlung; BrdU-positive (17 a-c) und BrdU-negative (17 d-f) Zellen; G1-Phase (a, d); S-Phase (b, e); G2-Phase (c, f); BrdU: 5-Bromodesoxyuridin.

3.3.4 Effekte ionisierender Strahlung auf die Zellzyklusprogression

Eine Zelle benötigt circa 24 Stunden, um den Zellzyklus zu durchlaufen. Daher ist die Zellzyklusprogression der IPC-298 Zellen zu je 4 Zeitpunkten nach ionisierender Bestrahlung in den Abbildungen 18 a-f über diesen Zeitraum dargestellt.

Die IR-Bestrahlung während der G₁-Phase (BrdU negative Zellen) bewirkte keine Blockade in dieser Phase (Abb. 18 d). Die Progression in und durch die S-Phase (Abb. 18 e) war nicht verzögert und die Zellen zeigten den gleichen Zellzyklusverlauf wie die unbestrahlten Kontrollen. Im weiteren Zellzyklusverlauf zeigte sich 24 h nach IR-Bestrahlung ein Anstieg der Zellzahl in der G₂-Phase im Vergleich mit den Kontrollen (Abb. 18 f). Ursache des Anstiegs ist ein G₂-Block nach 24 h für in der G₁-Phase bestrahlte Zellen. 48,5 % der unbestrahlten Kontrollen befanden sich nach 24 h in der G₂-Phase (Abb. 18 f). Im Gegensatz dazu waren 118,1% der mit 7,5 Gy bestrahlten Zellen nach 24 h in dieser Phase blockiert. Dieser G₂-Block wiederum führte zu einem verzögerten Eintritt der Zellen in die G₁-Phase des nachfolgenden Zellzyklus nach 24 h (Abb. 18 d).

Während der G₂-Phase bestrahlte Zellen (BrdU negative Zellen) wurden beginnend nach 6 h mit Persistenz über 12 h nach Bestrahlung hinaus in der G₂-Phase blockiert (Abb. 18 f). In der Progressionsanalyse wurden nach 6 h 14,7 % der unbestrahlten und dem gegenüber 91,3 % der mit 7,5 Gy bestrahlten Zellen in der G₂-Phase gemessen.

In der S-Phase bestrahlte Zellen (BrdU positive Zellen) wiesen keine Veränderung der Zellzyklusprogression in dieser Phase auf (Abb. 18 b), jedoch 12 h nach Bestrahlung wurden sie stark in der G₂-Phase blockiert (Abb. 18 c). Nach 7,5 Gy IR-Bestrahlung in der S-Phase waren 354,8 % der Zellen gegenüber 85,8 % der unbestrahlten Kontrollen in der G₂-Phase blockiert. Dieser Block führte im Verlauf zu einem verzögerten Eintritt nach 12 h bis 24 h nach Bestrahlung in die nachfolgende G₁-Phase verglichen mit den unbestrahlten Kontrollen (Abb. 18 a).

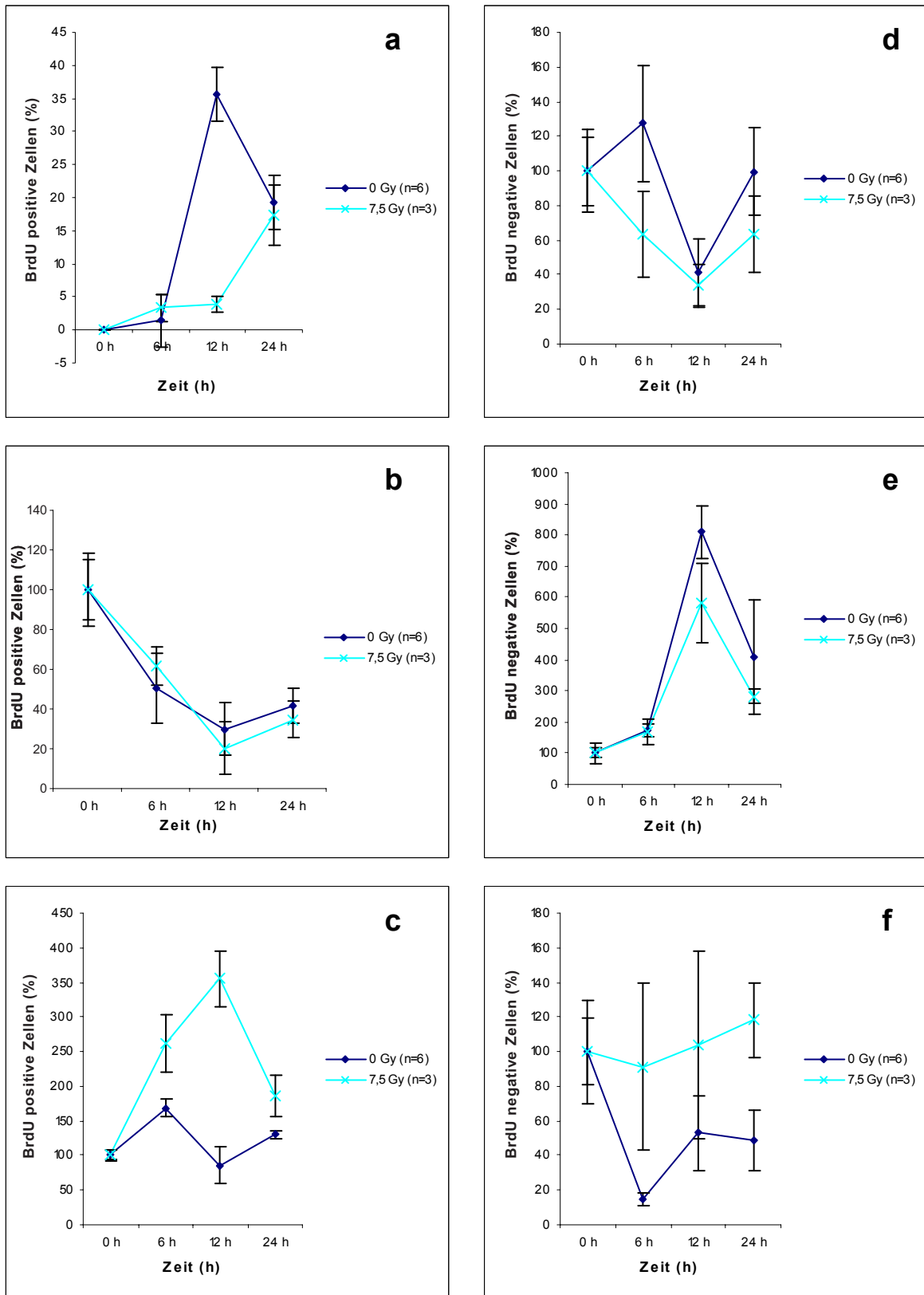


Abbildung 18 a-f: IPC-298-Zellzykluskinetik nach IR-Bestrahlung; BrdU-positive (18 a-c) und BrdU-negative (18 d-f) Zellen; G1-Phase (a, d); S-Phase (b, e); G2-Phase (c, f); BrdU: 5-Bromodesoxyuridin.

4. Diskussion

4.1 Funktion und Eigenschaften der Vitamine C und E auf die Lichtsensibilität der Haut und auf UV-induzierte DNA-Schäden

4.1.1 Vitamin C

Vitamin C ist für die Primaten essentiell, da sie es aufgrund eines fehlenden Enzyms nicht selbst synthetisieren können. Das Derivat L-Ascorbinsäure hat die beste biologische Verfügbarkeit. Andere Derivate wie z.B. D-Ascorbinsäure oder L-Isoascorbinsäure zeigen eine geringere Bioverfügbarkeit. Die Resorption erfolgt an der Mund- und Darmschleimhaut mittels aktivem Transport und passiver Diffusion bei höheren Konzentrationen. Die Resorptionsrate liegt bei Dosierungen von 1 g bei etwa 50 % und sinkt auf 15 % bei 12 g (61). Bei Dosierungen stärker als die Resorptionsrate wird der Rest unverändert renal ausgeschieden. Ascorbinsäure ist hydrophil und somit nicht in lipophilen zellulären Strukturen zu finden. Im Ergebnisteil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass über eine erhöhte, tägliche orale Zufuhr von 2000 mg/d L-Ascorbinsäure nach einem Monat ein signifikanter Anstieg im Blut von 11,19 mg/l auf 16,84 mg/l erfolgt ($p=0,007$). Die Werte lagen damit stets im Normbereich für L-Ascorbinsäure.

Zur Vermeidung einer Hypovitaminose (z.B. Scorbutprophylaxe) sind Gaben von 10 mg/d erforderlich. Für Vitamin C sind keine Hypervitaminosen bisher bekannt. Nebenwirkungen von Vitamin C sogar bei Dosierungen von 10-20 g/d konnten nicht gezeigt werden (12). Es kann lediglich bei sehr hohen Einzeldosen zu einem osmotisch bedingten Durchfall kommen. Die Probanden in dieser Studie zeigten keine Nebenwirkungen im Studienzeitraum von 3 Monaten.

4.1.2 Vitamin E

D-alpha-Tocopherol weist eine bessere Bioverfügbarkeit und Resorption (19, 70, 135) auf und führt somit zu höheren Konzentrationen in der Epidermis (47) als andere Vitamin E-Derivate, wie z.B. β -Tocopherol oder γ -Tocopherol. Messungen beim Menschen haben ergeben, dass nur 20-50% des mit der Nahrung

aufgenommenen Vitamin E resorbiert werden. In der Praxis geht man von einem Wert bei 30% aus (37). Im Blut wird Vitamin E sowohl im Plasma als auch in den zellulären Komponenten (22) transportiert und ist v.a. an die Lipoproteinfraktionen gekoppelt (11, 87). Die Aufnahme in die Zellen des peripheren Gewebes ist eng mit dem Lipoproteinkatabolismus verknüpft und erfolgt parallel zur Spaltung von Triglyceriden durch Lipoproteinlipasen der Zelloberfläche (24).

Eine Erhöhung der D-alpha-Tocopherol-Zufuhr steigert die Blutspiegel wie im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigt. Zu Beginn der Studie lag der D-alpha-Tocopherol-Spiegel bei 15,94 mg/l und stieg signifikant nach einem Monat täglicher Gabe von 1000 IE/d auf 41,55 mg/l ($p < 0,001$). In der Literatur haben ähnliche Analysen ergeben, dass bei Personen, die über 21 Tage 400 IE, 800 IE bzw. 1600 IE all-rac- α -Tocopherol einnahmen, die Plasmakonzentrationen von ca. 12,5 mg/l auf 21 mg/l, 26 mg/l bzw. 42 mg/l anstiegen (39). Tierexperimente an Ratten und Küken konnten zeigen, dass auch die Gewebekonzentrationen an α -Tocopherol in unmittelbarer Abhängigkeit zur Tocopherolaufnahme ansteigen (39).

Für Vitamin E werden orale Gaben bis 100 mg/d als physiologisch gewertet. Dosierungen bis 200 mg/d zeigten bei langfristiger Applikation keine Nebenwirkungen (72). In einer Analyse von Kappus et al. (71) wurde deutlich, dass Vitamin E-Dosierungen bis 300 mg/d ohne Nebenwirkungen toleriert wurden und als sicher zu betrachten sind. Die Probanden, die in der Studie zu dieser Arbeit teilgenommen haben, berichteten ebenfalls über keine Nebenwirkungen im Studienzeitraum von 3 Monaten.

Erst die langfristige Applikation von hohen Vitamin E-Dosierungen (>3000 IE/d) kann Nebenwirkungen, insbesondere ein höheres Blutungsrisiko, hervorrufen. Vor allem bei Personen, die Antikoagulantien einnehmen oder die an einer Blutgerinnungsstörung durch Vitamin K-Mangel leiden, stellen solche Dosierungen eine Kontraindikation dar (71, 88).

4.1.3 Synergismus zwischen Vitamin C und E

Für die Untersuchungen sowohl in vitro als auch in vivo wurde eine Kombination beider Vitamine verwendet. Es gibt Hinweise für eine synergistische Wirkweise beider Vitamine in der antioxidativen Protektion in biologischen Systemen. Diese Interaktion von Vitamin C und E ist für die antioxidative Abwehr ein wesentlicher

Bestandteil. UV-aktivierte Moleküle können als Radikale zelluläre Strukturen oxidieren und eine Kettenreaktion von Lipidperoxidation in Membranen induzieren. Lipophiles membranständiges D-alpha-Tocopherol kann durch Reaktion mit freien Radikalen, z.B. bei der Lipidperoxidation in Membranen durch UV-Strahlung, selbst zum Tocopheroxyl-Radikal oxidiert werden (23, 43). Hierbei fungiert Vitamin E als essentielles schützendes Antioxidans der Membran (19, 92). Der Synergismus mit dem hydrophilen Vitamin C besteht darin, dass Vitamin C als Reduktionsmittel des Vitamin E-Radikals fungieren kann, Vitamin E damit wieder regeneriert wird (97) und erneut als Antioxidans zur Verfügung stehen kann (21, 59, 60, 93). Auch an ungesättigten Fettsäuren in Mizellen (10) oder in Phosphatidylcholinliposomen (93) konnte diese synergistische Reaktionsweise gezeigt werden.

Dieser antioxidative Wirksynergismus beider Vitamine und die damit verbundene Reduktion von freien Radikalen vermindert schädigende Agentien auf zellulärer Ebene. Dieses Funktionsprinzip stellt einen möglichen Ansatz dar, zusätzliche protektive Methoden als Erweiterung der bisher bestehenden Schutzmöglichkeiten (z.B. Sonnenschutzmilch) gegenüber UV-Strahlung zu entwickeln. Ein täglicher Schutz vor UV-Strahlen und eine damit verbundene Reduktion von UV-Schäden gilt als ein wesentlicher Faktor, der steigenden Inzidenz von UV-bedingten Hauttumoren im Menschen vorzubeugen (85). Aus diesem Grund könnte die Kombinationstherapie mit den antioxidativen Vitaminen C und E auch einen Schutz vor solchen Neoplasien bedeuten. Eine zusätzliche orale Applikation zur Verstärkung des Eigenschutzes gegenüber UV-Strahlung würde auch deshalb sinnvoll sein, da sowohl die UV-B- als auch UV-A-Exposition eine Verringerung der beiden antioxidativen Vitamine C und E in betroffenen Zellen und Geweben bewirken (126).

4.1.4 Allgemeiner Einfluss der Vitamine C und E auf UV-Strahleneffekte

In verschiedenen experimentellen Systemen konnte ein protektiver Effekt von topischen Antioxidantien vor UV-bedingten Schäden demonstriert werden (105). In Tierversuchen an Haut von Mäusen bzw. Kaninchen konnte die topische Applikation von α -Tocopherol einen photoprotektiven Effekt (Schutz vor UV-induziertem Erythem) erzeugen (113, 114, 133). Experimentell konnte α -Tocopherol außerdem die Photoalterung der Haut vermindern (14, 69), Lipidperoxidationen (84) verhindern und wie auch L-Ascorbinsäure die Immunsuppression senken, z.B. durch eine

Reduktion einer UV-induzierten Suppression der Kontakthypersensibilität der Haut (53, 129, 144). Einige Autoren konnten im Tiermodell durch topische Behandlung mit Vitamin E auch eine Reduzierung der Photokarzinogenese der Haut nach UV-Strahlung feststellen (14, 17, 53, 144). Systemisch appliziertes Vitamin E konnte im Hamstermodell die Entstehung eines Hauttumors inhibieren (121). Potapenko et al. (109, 110) konnten nach topischer Vitamin E-Behandlung beim Menschen eine Reduktion von UV-B- und PUVA-induzierten Erythemen nachweisen.

Die Anwendung von Ascorbinsäure auf Schweinehaut und menschlicher Haut konnte vor phototoxischer Schädigung durch UV-A und UV-B schützen. Darr et al. 1992 (28) konnten dies durch die Messung der Erytheme und durch die verringerte Bildung von Sonnenbrandzellen nach topischer Applikation nachweisen.

Die Kombination von topischem Vitamin C und E zeigte in der Schweinehaut einen Schutz vor Erythem, Entstehung von Sonnenbrandzellen (29) und Thymindimerbildung (83), die einen Nachweis von Schäden am Genom der Zellen anzeigen. Auch die Applikation von L-Ascorbinsäure oder D- α -Tocopherol allein wirkte bereits protektiv, wobei die Kombination beider Vitamine effektiver wirksam war und nur hierbei UV-Schäden auf DNA-Ebene (Thymindimere) reduziert werden konnten (83).

Eine andere Studie hat gezeigt, dass D- α -Tocopherol und D- α -Tocopherol-Acetat humane Keratinozyten vor UV-B-bedingten DNA-Schäden schützen kann (86). Die systemische Applikation von Vitamin E konnte bei Mäusen die Erythembildung, die Lipidperoxidation und die Bildung von Thymindimeren in der DNA (113) nach UV-A- und UV-B-Strahlung senken. Vitamin C senkte, systemisch appliziert, die Inzidenz und verzögerte die Ausbildung von malignen Hautveränderungen nach UV-A- und UV-B-Strahlung (35). Eine andere Studie stellte allerdings die alleinige systemische Gabe von Vitamin C in ihrer Effektivität in der Prävention bzw. Verminderung von Sonnenbrandreaktionen in Frage (98). Auch die systemische Gabe von 400 IE D-alpha-Tocopherol Acetat pro Tag ohne Vitamin C oder eines Selenium-Kupfer-Vitamin-Komplexes (beinhaltet 40 mg D-alpha-Tocopherol/ Tag, aber kein Vitamin C) konnte in menschlicher Haut die MED als Mass für die Lichtsensibilität im Sinne einer Photoprotektion nicht signifikant beeinflussen (80, 138).

4.1.5 L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol und ihr Einfluss auf die UV-Strahleneffekte der Studienteilnehmer

Die 3-monatige tägliche orale Applikation von L-Ascorbinsäure (2000 mg/d) und D-alpha-Tocopherol (1000 IE/d) in der doppelblind, Placebo-kontrollierten Studie führte zu einer signifikanten Steigerung der Blutspiegel beider Antioxidantien im Vergleich zur Placebogruppe. Eine weitere Steigerung war nicht nachweisbar. Die maximale Blutspiegelsteigerung der beiden applizierten L-Ascorbinsäure- und D-alpha-Tocopherol-Konzentrationen wurde somit wahrscheinlich innerhalb des ersten Monats bzw. zum Ende des ersten Monats erreicht. Ab diesem Zeitpunkt könnte somit von einem annähernd gleichwertigen Wirkspiegel ausgegangen werden.

Auch in der Gruppe zur Bestimmung der MED mit ausschließlicher Verumapplikation zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Antioxidantienspiegel. Der L-Ascorbinsäure-Spiegel im Blut stieg signifikant von 11,63 mg/l nach 1 Monat auf 19,25 mg/l. Für D-alpha-Tocopherol stieg der Blutspiegel signifikant im ersten Monat von 20,96 mg/l auf 36,03 mg/l. Im weiteren Verlauf blieben die AO-Spiegel auf diesem konstant höheren Niveau des ersten Monats.

Einhergehend mit der erhöhten Blutvitaminkonzentration für L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol konnten wir die Sonnenbrandempfindlichkeit nach UV-B-Strahlung der Probanden nach 3 Monaten senken. Untersuchungen von Eberlein-König et al. (36) zeigten nach einer kurzzeitigen 8-tägigen Applikationsphase einen Anstieg des Medians der MED für UV-B-Strahlung von 80 mJ/cm² auf 96,5 mJ/cm². Diese Beobachtung wurde in ähnlicher Weise von Fuchs et al. und Mitarbeitern (45) bestätigt, die aber eine höhere Vitamindosis von 3 g/d L-Ascorbinsäure und 2 g/d D- α -Tocopherol eingesetzt haben und damit einen Anstieg der MED von 103 mJ/cm² auf 183 mJ/cm² nach 50 Tagen messen konnten. Auch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Einzelapplikation von L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol gegenüber der Kombination keinen MED-Anstieg bewirkt. Somit unterstützt diese Beobachtung auch den synergistischen Effekt der beiden AO (45).

Durch die Verlängerung des Applikationszeitraums von L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol in dieser Studie auf 3 Monate konnte gegenüber der 8-tägigen Studie (36) ein noch stärkerer Anstieg der MED von 80 mJ/cm² auf 113 mJ/cm² erreicht werden. Dies zeigt eine noch bessere photoprotektive Wirkung der längerfristigen Vitamineinnahme.

Betrachtet man die Untersuchungen dieser Arbeit und die von Eberlein-König et al. (36), könnte man ableiten, dass die maximalen Blutspiegel und vermutlich auch die Gewebespiegel (nicht bestimmt) dieser L-Ascorbinsäure- und D-alpha-Tocopherol-Dosierung nicht nach 1 Woche sondern innerhalb des ersten Monats erreicht werden und im weiteren Verlauf nach dem ersten Monat annähernd konstant bleiben. Eine noch stärkere Steigerung der MED wäre somit nicht durch eine weitere Verlängerung der Applikation sondern eventuell nur durch eine Erhöhung der täglichen Applikationsdosis (mehr als 2 g L-Ascorbinsäure/d und 1000 IE D-alpha-Tocopherol/d) zu erreichen. Diese würde eventuell noch höhere Blut- und Gewebespiegel ermöglichen und Fuchs et al. (45) konnten diesen stärkeren Effekt auf die MED nach höherer Vitamindosis nachweisen.

Die nachgewiesene Senkung der Sensibilität gegenüber Sonnenbrand zeugt von einem protektiven Effekt der erhöhten Blutspiegel der L-Ascorbinsäure und des D-alpha-Tocopherols. Die mögliche, erhöhte Vitaminkonzentration im Gewebe ist hierbei für den Effekt sicherlich entscheidend wurde aber in dieser Arbeit nicht einzeln gemessen. Insgesamt kommt es vermutlich durch die höhere L-Ascorbinsäure- und D-alpha-Tocopherol-Einnahme zu einer physiologisch wirkungsvollen Steigerung der antioxidativen Kapazität in der Haut, die eine zusätzliche Photoprotektion vor UV-Strahlung erzeugen könnte.

4.1.6 L-Ascorbinsäure- und D-alpha-Tocopherol-Spiegel versus Veränderung der minimalen Erythemdosis

Die Analyse der MED-Bestimmung zeigte bei 6 Probanden keine Veränderung in der UV-Empfindlichkeit nach Vitaminapplikation. Bei vergleichender Betrachtung zwischen Vitaminspiegel und MED-Veränderung hatten diese 6 Probanden jeweils einen höheren Vitaminbasis-Spiegel bei Studienbeginn. Der L-Ascorbinsäure-Spiegel am Tag 0 lag bei 14,23 mg/l für die 6 Probanden ohne MED-Änderung und bei 10,33 mg/l für die 12 Probanden mit MED-Veränderung nach 3 Monaten. Ebenso war der D-alpha-Tocopherol-Ausgangswert bei den 6 Probanden mit 27,37 mg/l um 9,59 mg/l höher als bei den 12 Probanden mit MED-Veränderung (17,78 mg/l). Parallel hierzu lag auch der Median der MED zu Studienbeginn für die 6 Probanden mit 96,5 mJ/cm² höher als bei den 12 Probanden mit 80 mJ/cm². Diese Daten unterstützen den beobachteten Einfluss der antioxidativen Vitamine in der Photoprotektion. Die Höhe

des AO-Spiegels scheint für das einzelne Individuum einen Einfluss auf seine individuelle UV-Empfindlichkeit zu haben. Eine Aufsättigung durch orale Zufuhr kann also die UV-Empfindlichkeit der Haut senken in Abhängigkeit vom individuellen Ausgangswert der beiden Vitamine. Es ist aber nur ein begrenzter Schutz erreichbar, der vermutlich nicht unbegrenzt weiter zu steigern ist.

4.1.7 DNA-Strahlenschäden und Messung der Zellzyklusproliferation

Die Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden erfolgt überwiegend während der Blockierung des Zellzyklus, welches der Zelle durch eine zeitliche Unterbrechung der fortlaufenden Proliferation und Zellteilung die Überprüfung der DNA und Exzision von defekten Elementen ermöglicht. Die erfolgreiche DNA-Reparatur, insbesondere durch Exzision der entstandenen Photodimere, setzt eine Arretierung des Zellzyklus und somit eine Unterbrechung der weiteren Proliferation voraus. Die Regulation des Zellzyklus und somit der Proliferation erfolgt durch verschiedene Signalkaskaden und Signalmoleküle. Zu nennen sind Proteinkinasen, Cycline, Tumorsuppressorgene, wie p53, und Wachstumsfaktoren, wie TGF β . Die Ataxia-Telangiectasia mutierten (ATM) und Ataxia-Telangiectasia mutierten und Rad3-zugehörigen (ATR) Proteinkinasen, die an der zellulären Antwort nach DNA-Schäden beteiligt sind, sind ein Teil der Phosphatidyl Inositol 3-Kinase-artigen Familie der Serin/Threonin-Proteinkinasen (PIKKs) (56). Die Aktivierung von ATM durch z.B. IR-Strahlung führt zur Aktivierung der Zellzyklusblocks zwischen der G1- und S-Phase sowie zwischen der G2- und M-Phase. ATR ist verantwortlich für die gleiche Zellzyklusblockaktivierung nach einem UV-induzierten Schaden (56). Die Interaktion der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), Cycline, CDK-Inhibitoren, von ATM und ATR ist notwendig für die Regulation dieser Zellzykluskontrollpunkte (sog. „Checkpoint“).

Zur Bestimmung der Proliferation nach Bestrahlung eignen sich Marker, wie z.B. das Bromodeoxyuridin (BrdU). Die BrdU-Technik ist eine Methode zur Markierung von DNA-replizierenden Zellen, um darüber Zellproliferation sowohl in vitro (55) und als auch in vivo (122) zu bestimmen. Onuma et al. 2001 (95) ermittelten die BrdU-Inkorporation in einer Hautorgankultur. BrdU ist ein Proliferationsmarker, der als Analogon des Thymidins in der S-Phase des Zellzyklus eingebaut wird und die

Quantifizierung der S-Phase-Zellen erlaubt. Hierdurch ist eine Analyse der Proliferationsaktivität von sich teilenden Zellen in der Epidermis nach Bestrahlung möglich. BrdU ist allerdings auch ein potentiell Mutagen und wird daher in vitro eingesetzt, damit die Gesundheit der Probanden nicht gefährdet wird. Experimente in vitro an einer Zellkultur haben den Nachteil, Interaktionen und Signalwege, die durch interzelluläre Verbände in zusammenhängenden Geweben bestehen (z.B. Zell-zu-Zell Kontakte und parakrine Signalwege), auszublenden. In dieser Arbeit wurde eine neuartige Methode verwendet, mit der eine Bestrahlung der Epidermis in vivo mit einer BrdU-Markierung ex vivo kombiniert wurde. Die Methode ermöglicht die genaue Bestimmung der Zellproliferationskapazität mittels Markierung von S-Phase-Zellen in der Epidermis nach UV-B-Bestrahlung vor und nach Einnahme von AO, ohne die Probanden der Gefahr einer Mutagenität bei systemischer Applikation von BrdU auszusetzen.

4.1.8 Epidermale Proliferation nach UV-B-Bestrahlung

Die Probenentnahme erfolgte vor bzw. 24 h nach Bestrahlung aus unbestrahlter und bestrahlter Haut. Es wurden die Proliferation und die Zellzyklusantwort auf UV-B-Bestrahlung in den Biopsien analysiert, die makroskopisch einen ähnlichen Grad der biologischen Strahlenantwort im MED-Ergebnis aufwiesen. Zusätzlich könnten Variationen in der Epidermisdicke (vor allem des Stratum corneum) an unterschiedlichen Körperregionen sowie Pigmentierungsunterschiede bei der Entnahme von unterschiedlichen Regionen für nicht zu vernachlässigende Unterschiede zwischen einzelnen Individuen sorgen. Deshalb wurden in dieser Studie die Biopsien immer vom wenig pigmentierten unteren Rücken und aus dem Bereich der zweifachen MED entnommen, um etwaige Variationen der Epidermisbeschaffenheit auf die Strahlenantwort als Fehlerquelle zu reduzieren. Diese wichtige Tatsache wurde in anderen Studien zum Teil vernachlässigt, in denen eine unterschiedliche Strahlendosis für Hautproben unterschiedlicher Spender definiert wurden (99).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine reduzierte Zahl von BrdU-markierten Zellen und somit eine verringerte epidermale Proliferation nach UV-B-Bestrahlung im Vergleich mit den unbestrahlten Kontrollbiopsien. Bisherige Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen aus in-vitro- (64, 96) und ex-vivo- (99) Modellen zeigten ebenfalls

einen Rückgang der Zellproliferation nach UV-B-Bestrahlung. Pavey et al. (99) berichtete von einer ähnlichen Verminderung der BrdU-Inkorporation 24 h nach UV-B-Bestrahlung. Jedoch beobachtete diese Arbeitsgruppe einen Anstieg der BrdU-Aufnahme während der ersten 24 h nach UV-B-Bestrahlung. Aufgrund der langen Inkubationszeit von BrdU über 24 h ist es möglich, dass sowohl bei der einsetzenden DNA-Reparatur nach dem UV-B-Strahlenschaden als auch bei der weiteren DNA-Neusynthese BrdU eingebaut wurde und somit zu fälschlich hohen Werten führte.

4.1.9 Einfluss der L-Ascorbinsäure und des D-alpha-Tocopherols auf die epidermale Proliferation nach UV-B-Bestrahlung

Ausgehend von dem protektiven Effekt der AO auf die UV-Lichtsensibilität der Epidermis nach UV-B-Strahlung ergibt sich die Überlegung, dass eine Applikation von L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol auch vor UV-induzierten zellulären Schäden der DNA schützen könnte, die z.B. die Zellproliferation beeinflussen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die UV-induzierte Hemmung der epidermalen Proliferation nach UV-B-Einwirkung in der menschlichen Haut durch die dreimonatige Einnahme von L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol signifikant verstärkt werden konnte (5 Zellen/mm vs. 4 Zellen/mm, $p=0,03$). Die AO verstärkten scheinbar die Inhibition der epidermalen Proliferation im Vergleich zu den unbehandelten Biopsien. Die Tatsache der Verstärkung des Zellzyklusblocks unter AO-Einfluss war unerwartet. Aufgrund des protektiven Einfluss der AO vor freien, UV-induzierten Radikalen war ursprünglich eine weniger starke Inhibition der epidermalen Zellproliferation bei UV- und AO-behandelten Individuen vermutet worden.

Die reduzierte Proliferationsrate könnte ein direkter Effekt des D-alpha-Tocopherols sein, da auch andere Gruppen eine Verminderung der Zellproliferation unter Vitamin E zeigen konnten. Dieser Mechanismus wird hauptsächlich über die Inhibition der Proteinkinase C vermittelt (131).

Die durch AO verstärkte Zellzyklusblockade könnte mit der UV-bedingten Beeinflussung von anderen Signalkaskaden, die nicht direkt eine Zellzyklusblockade auslösen, erklärt werden. UV-Strahlung kann MAP-Kinasekaskaden aktivieren, was vor allem durch die Induktion von ROS geschieht. MAP-Kinase-Aktivierung führt schlussendlich zur Transkription und Induktion des Proto-Onkogens c-fos. C-fos scheint für den Wiedereintritt in den Zellzyklus nach einer Blockade notwendig zu

sein (123). Eine Reduktion der ROS-Spiegel durch die AO könnte somit eine verringerte Aktivierung der MAP-Kinase bedeuten. Die Konsequenz hiervon wäre eine geringere Induktion von c-fos, wodurch der Wiedereintritt in den Zellzyklus bzw. die weitere Proliferation verzögert wird. Dies könnte der Zelle mehr Zeit für eine effektivere DNA-Reparatur geben. Das Risiko für die Replikation von Mutationen könnte somit reduziert sein, da die Zelle genügend Zeit zur Reparatur hat. Die Gefahr einer malignen Entartung der Zelle wäre vermindert.

Unsere Arbeitsgruppe (108) konnte zusätzlich zur Verlängerung der Zellzyklusblockade zeigen, dass die Applikation von L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol über 3 Monate auch zu einer Reduktion des DNA-Schadens 24 h nach UV-Bestrahlung führt. Der photoprotektive Effekt der AO auf direkte DNA-Schäden nach UV-B wurde durch die Verringerung der Thymin-Dimere in der Epidermis nach Bestrahlung und Einfluss der AO gezeigt.

Die Reduktion der Thymindimere, der Erythemreaktion sowie die Verringerung der epidermalen Zellproliferation nach UV-Bestrahlung als Folge der kombinierten Gabe von L-Ascorbinsäure und D- α -Tocopherol zeigen den protektiven Nutzen dieser AO zur Verhinderung von UV-Schäden an der Haut. Die Anwesenheit der AO während und nach der Bestrahlung ist von entscheidender Bedeutung für die protektive Kapazität. Schäden entstehen auch unter AO-Einfluss, allerdings kann die Zelle bei Anwesenheit von ausreichend AO während und nach dem Strahlenschaden anscheinend besser die Schäden reduzieren.

4.2 Einfluss der Bestrahlung mit UV-A-, UV-B- und mit ionisierender Strahlung auf die Proliferationskinetik der IPC-298-Zellen

4.2.1 Einfluss von UV-A-, UV-B- und ionisierender Strahlung auf den Zellzyklus

In der Literatur wird beschrieben, dass unterschiedliche Strahlenarten Zellzykluseffekte in jeder Phase des Zellzyklus auslösen können. UV-A-Strahlung kann z.B. einen G₁-Block im Zellzyklus auslösen (75). UV-A-Strahlung induziert desweiteren eine Reduktion der S-Phasen-Progression (9, 30) und ein G₂-Block wurde beschrieben (9). UV-B kann einen G₁-Block (1, 15, 102, 137) sowie eine Verlangsamung der S-Phasen-Progression (9, 30, 102, 137) induzieren. Ein

Zellzyklusblock in der G₂-Phase wurde ebenso nach UV-B-Strahlung festgestellt (6, 137). IR aktiviert Zellzyklusblockaden in der G₁-Phase (4). Die Progression durch die S-Phase wird durch IR nur selten beeinflusst und nur sehr hohe Dosierungen konnten eine Verlangsamung in der S-Phase auslösen (68, 90). Auch in der G₂-Phase kann es zu Zellzyklusblockaden nach ionisierender Strahlung kommen (76).

Ein Netzwerk an Signalkaskaden mit Sensoren und Mediatoren kontrolliert die zelluläre Strahlenantwort (115). Die Proteinkinasen ATM und ATR sind zentrale Komponenten des den DNA-Schaden erfassenden Netzwerks. ATM und ATR fungieren als Schlüsselmoleküle, mit deren Hilfe das Signal eines DNA-Schadens in zelluläre Handlungsmechanismen der Zelle übersetzt werden kann (56).

ATM und ATR stehen als auslösende Instanz am Beginn der Kette, durch die nachgelagerte Effekte wie z.B. die Induktion von Zellzyklusblockaden initiiert werden (56). Eine selektive Spezifität als Antwort auf verschiedene genotoxische Agentien, wie z.B. Strahlung, scheinen ATM und ATR zu haben (63).

UV-A, UV-B oder IR können verschiedene Arten von DNA-Schäden auslösen. Zum einen zählen zu den unterschiedlichen Schadensmechanismen mehrheitlich über UV-A- oder IR- induzierte und über Radikale sowie reaktive Sauerstoffspezies vermittelte indirekte Schäden der DNA. Zum anderen gibt es v.a. durch UV-B-induzierte direkte Schäden der DNA, wie Thymin-Dimere mit nachfolgenden Strangbrüchen, die eine Exzisionsreparatur erforderlich machen (81). Eine Konsequenz hieraus könnte sein, dass durch unterschiedliche Schäden auch unterschiedliche Signalkaskaden via ATM und bzw. oder ATR und somit unterschiedliche Zellzykluseffekte induziert werden.

4.2.2 Einfluss von UV-A-, UV-B- und ionisierender Strahlung auf die IPC-298-Zellen

Für die Experimente in dieser Arbeit wurde die Melanomzelllinie (IPC-298) verwendet. Die IPC-298 Zellen sind p53 defizient (106). Das Tumorsuppressorgen p53 ist notwendig für die Initialisierung von Zellzyklusblockaden. Der Mangel oder die Mutation an p53 bedeutet, dass diese Zellen nur einen defekten bzw. keinen G₁-Block am Übergang zur S-Phase aktivieren können (40).

Die in vitro-Ergebnisse zeigten, dass die in der G₁-Phase mit UV-A bestrahlten IPC-298-Zellen keinen G₁-Block am Übergang zur S-Phase ausbilden konnten, jedoch

effektiv beim Übertritt von der G₂- zur M-Phase blockiert wurden. Auffällig war, dass trotz p53-Mangel die IPC-298 Melanomzellen einen G₁-Block nach UV-B-Bestrahlung zeigten. IR induzierte ähnlich wie UV-A ebenfalls einen G₂-Block, aber weder einen Block in der G₁-Phase noch eine Verlangsamung der Progression in der S-Phase.

Diese Daten der Zellzykluskinetik nach unterschiedlicher Bestrahlung wurden alle mit der Zelllinie IPC-298 ermittelt. Dadurch können unterschiedliche Effekte in der zellulären Strahlenantwort nicht durch eine unterschiedliche Zellcharakteristik verschiedener Zelllinien, wie oft in der Literatur zu finden, bedingt sein.

DNA-Schäden ausgelöst durch UV-A- oder ionisierende Strahlung aktivieren die ATM-Proteinkinase, die abhängig ist von einem funktionierendem p53-Protein (56). Durch den p53-Mangel der IPC-298 Zellen kann dieser Zelltyp keinen G₁/S-Phasen-Kontrollpunkt des Zellzyklus nach Bestrahlung mit UV-A oder IR ausbilden.

Auf der anderen Seite scheint UV-B-Strahlung die ATR-Proteinkinase zu aktivieren. Über diese Signalkaskade wird nach einem Schaden auch ohne das Vorhandensein von p53 ein G₁-Block eingeleitet. Hieraus kann man auch ableiten, dass UV-A-induzierte Schäden nicht zu einer ATR Aktivierung wie bei UV-B führen können.

Weitere Studien sind notwendig, um die Strahlenantwort anderer Zelltypen, insbesondere von humanen, nicht malignen Zellen zu untersuchen, damit ein breiteres Verständnis für die Tumorgenese an der Haut nach UV- oder IR-Strahlung entwickelt werden kann.

4.3 Schlussfolgerung

Die Studien konnten einen photoprotektiven Effekt einer langfristigen, oralen Einnahme von L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol durch die Reduktion der Erythemreaktion für die Probanden zeigen. Zudem konnte mittels eines neuartigen Ansatzes durch Kombination von Bestrahlung in vivo und BrdU-Markierung ex vivo gezeigt werden, dass UV-B-Bestrahlung der menschlichen Haut in vivo die epidermale Zellproliferation inhibiert. Erstaunlicherweise spiegelte sich der photoprotektive Effekt der AO auf die Sonnenbrandreaktion nicht in einer geringeren Inhibition des epidermalen Wachstums (Proliferation) wieder. Stattdessen war die UV-B-induzierte Proliferationsverzögerung nach der AO-Einnahme deutlich verstärkt. Durch Initiierung oder Verlängerung eines Zellzyklusblocks nach Bestrahlung und durch eine Verringerung der Zellproliferation in menschlicher Haut besteht für die

einzelne Zelle die Möglichkeit, Strahlen-induzierte Schäden der Zelle und DNA effektiver und über ein längeres Zeitintervall zu reparieren bzw., falls erforderlich, die Apoptose der Zelle einzuleiten.

In vitro konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Wellenlängen unterschiedliche Effekte im Zellzyklus der p53-defizienten IPC-298-Melanomzellen auslösen können. UV-A und IR zeigen ähnliche Wirkungen auf die Zellzykluskinetik und führen zu einem Block in der G₂-Phase, jedoch können beide Strahlenarten bei p53-defizienten IPC-298-Zellen keinen G₁-Block induzieren. UV-B hingegen ist trotz p53-Defizienz in der Lage einen G₁-Block zu induzieren. Hieraus kann man ableiten, dass unterschiedliche Strahlenarten unterschiedliche Zellzyklusreaktionen in der Zelle auslösen können. In der Literatur wurde gezeigt, dass UV-B sich zur Aktivierung des G₁-Blocks vermutlich der ATR-Signalkaskade bedient, die unabhängig von p53 ist. Dies steht im Gegensatz zu UV-A und IR, die die p53-abhängige ATM-Signalkaskade zu aktivieren scheinen (56). Die Initiierung eines Blocks ohne die Anwesenheit von p53 kann für die Zelle, trotz Mutation, die Möglichkeit zur Reparatur von weiteren Schäden bedeuten.

Die konsequente Anwendung von Schutzmassnahmen gegenüber der ultravioletten Strahlenbelastung wird empfohlen, um ein weiteres Ansteigen der Inzidenz von Strahlen-induzierten malignen Tumoren der menschlichen Haut zu verhindern (85, 130). Folglich könnte der photoprotektive Effekt der Kombinationstherapie mit L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol einen Schutz vor der Entstehung von Neoplasien darstellen.

Es sind weitere Studien erforderlich, um neben der möglichen photoprotektiven Wirkung von AO gegenüber Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies auch den möglichen protektiven Charakter durch effektivere DNA-Reparaturen nach UV-A-, UV-B- und IR-Strahlung zu bestätigen. Ergebnisse von Lin et al. (82) belegen, dass eine Erweiterung der Kombination von Vitamin C und E um Ferulic Acid (Pflanzenantioxidans) zur Stabilisierung der AO-Lösung einen nahezu doppelt so starken photoprotektiven Effekt vor Erythembildung und Thymindimerentstehung hat und somit eine sinnvolle Strategie darstellen kann. Zusammenfassend ist die orale Applikation von AO ein einfacher, viel versprechender und sicherer Ansatz, um Strahlen-induzierte Effekte in der Haut mit ihren langfristigen Konsequenzen, wie z.B. Tumorgenese, zu reduzieren bzw. zu vermeiden.

5. Zusammenfassung

Die Sonnenstrahlung setzt sich u.a. zusammen aus UV-A, UV-B und sichtbarem Licht. UV-Strahlung wird in der Haut absorbiert und führt zu vielfältigen Effekten auf molekularer Ebene. Eine gravierende Konsequenz einer übermäßigen UV-Exposition für den Menschen ist die Ausbildung von Hauttumoren. Daher ist es notwendig, einfache, additive und effektive Schutzmassnahmen zu untersuchen. Zu den Eigenschutzsystemen der Haut gehören Antioxidantien (AO), wie z.B. die synergistisch wirkenden Verbindungen L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol. Ihre Konzentration in der Haut wird durch UV-Strahlung verringert. In dieser Arbeit sollten die Auswirkungen einer systemischen Applikation dieser beiden AO als Strategie zum Schutz vor UV-Schäden in der Haut untersucht werden.

In einer doppelblinden, placebo-kontrollierten Studie mit 62 Probanden wurden während der 3-monatigen Einnahme von täglich 2 g L-Ascorbinsäure und 1000 IE D-alpha-Tocopherol (n=33) oder Placebo (n=29) die Blutspiegel dieser AO bestimmt. Nach einem Monat war der Mittelwert des L-Ascorbinsäure-Blutspiegel von 11,19 mg/l auf 16,84 mg/l ($p < 0,001$) angestiegen, derjenige von D-alpha-Tocopherol von 15,94 mg/l auf 41,55 mg/l ($p < 0,001$). L-Ascorbinsäure und D-alpha-Tocopherol-Blutspiegel blieben über die gesamten 3 Monate gegenüber den Ausgangswerten signifikant erhöht. Nach 3 Monaten wurde ein L-Ascorbinsäure-Blutspiegel von 14,64 mg/l ($p = 0,007$) und ein D-alpha-Tocopherol-Blutspiegel von 38,18 mg/l ($p < 0,001$) gemessen. In der Placebogruppe blieben die L-Ascorbinsäure- und D-alpha-Tocopherol-Blutspiegel nahezu unverändert.

Bei weiteren 18 Probanden wurde die UV-B-Empfindlichkeit vor und nach der 3-monatigen, täglichen Einnahme von 2 g L-Ascorbinsäure und 1000 IE D-alpha-Tocopherol anhand der minimalen Erythemdosis (MED) untersucht. Auch in dieser Gruppe (n=18) zeigten die Mittelwerte der AO-Blutspiegel im Vergleich zu den Ausgangswerten nach 1 Monat und nach 3 Monaten einen Anstieg (L-Ascorbinsäure-Basiswert: 11,63 mg/l, 1. Monat: 19,25 mg/l, 3. Monat: 18,15 mg/l, gegenüber Basiswert jeweils $p < 0,001$; D-alpha-Tocopherol-Basiswert: 20,96 mg/l, 1. Monat: 36,03 mg/l, 3. Monat: 38,84 mg/l, gegenüber Basiswert jeweils $p < 0,001$).

Nach 3 Monaten AO-Applikation war der Median der MED von 80 mJ/cm² auf 113 mJ/cm² (p= 0,002) angestiegen. Bei 17 dieser Probanden wurden vor und am Ende der AO-Applikation jeweils aus unbestrahlter und mit der 2-fachen MED bestrahlter Haut (nach 24 ± 2 h) Biopsien zur Proliferationsanalyse epidermaler Zellen gewonnen. Die Biopsien wurden nach der Entnahme mit dem Proliferationsmarker BrdU inkubiert, der in der S-Phase des Zellzyklus als Thymidin-Analogon in die DNA eingebaut wird. Der immunhistochemische Nachweis erfolgte mittels BrdU-Antikörperfärbung. Die UV-B-Bestrahlung führte zu einer Hemmung der epidermalen Proliferation vor AO-Einnahme (unbestrahlt: 7,8 markierte Zellen/mm Hautoberfläche; bestrahlt: 5,0 markierte Zellen/mm Hautoberfläche; Medianwerte, p=0,02). Die 3-monatige AO-Applikation verstärkte diesen UV-Effekt (unbestrahlt: 8,0 markierte Zellen/mm Hautoberfläche; bestrahlt: 4,0 markierte Zellen/mm Hautoberfläche; Medianwerte, p<0,001).

Sowohl UV- als auch IR-Strahlen können Zellzyklusblockaden in der G₁-, S- und der G₂-Phase induzieren. Für die Initialisierung von Zellzyklusblockaden u.a. am Ende der G₁- Phase ist die Anwesenheit des Tumorsuppressorgens p53 notwendig. Die Effekte unterschiedlicher Strahlenarten auf die Zellzyklusphasen wurden an p53-defizienten IPC-298-Melanomzellen mittels BrdU-Markierung nach UV-A- (10 J/cm²), UV-B- (40 mJ/cm²) oder ionisierender Strahlung (IR 7,5 Gy) analysiert.

- UV-A-Bestrahlung erzeugte keinen G₁-Phasen-Block. Jedoch wurde die Progression UV-A-bestrahlter Zellen nach 12 h in der S-Phase verzögert und UV-A-Bestrahlung von Zellen in der G₂-Phase erzeugte nach 6 h einen G₂-Phasen-Block.
- 12 h nach UV-B-Bestrahlung war ein G₁-Phasen-Block der IPC-298-Melanomzellen zu messen. UV-B-bestrahlte Zellen zeigten in der S-Phase eine Progressions-verzögerung und einen G₂-Phasen-Block nach 6 h.
- IR-Bestrahlung induzierte keinen G₁-Phasen-Block und keine Verzögerung in der S-Phase. Hingegen erzeugte IR-Bestrahlung während der G₂-Phase nach 6 h einen G₂-Phasen-Block.

Trotz p53-Mangels führte UV-B im Gegensatz zu UV-A und IR zu einem G₁-Block. Der UV-B-induzierte G₁-Block wurde offensichtlich durch einen p53-unabhängigen Signalweg ausgelöst. Dieser Signalweg scheint durch UV-A bzw. IR nicht aktiviert zu werden. Ebenso können UV-A und UV-B im Gegensatz zu IR eine Verzögerung der

S-Phase induzieren. Ein G₂-Phasen-Block wurde nach Bestrahlung mit allen 3 Strahlenarten gemessen. Damit induzierten unterschiedliche Strahlenarten unterschiedliche Zellzyklusreaktionen der IPC-298-Zellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch systemische Gabe von AO die MED ansteigt und eine Verringerung der epidermalen Proliferation nach UV-Bestrahlung eintritt. In vitro konnten Proliferationshemmungen im Zellzyklus der IPC-298-Zellen durch UV-A-, UV-B- oder IR-Strahlung ausgelöst werden, die offensichtlich abhängig von der Strahlenart durch unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden. Diese vielfältige Aktivierung von Zellzyklusblockaden gibt der Zelle vermutlich Zeit zur Reparatur von Strahlenschäden.

Literaturverzeichnis

1. Abdel-Malek Z, Swope V, Smalara D, Babcock D, Dawes S, Nordlund J (1994) Analysis of the UV-induced melanogenesis and growth arrest of human melanocytes. *Pigment Cell Res* 7: 326-332
2. Alam M, Ratner D (2001) Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med* 344(13): 975-983
3. Ambach W, Blumthaler M (1993) Biological effectiveness of solar UV radiation in humans. *Experientia* 49(9): 747-753
4. Antoccia A, Sgura A, Cavinato M, Cherubini R, Tanzarella C (2002) Cell cycle perturbations and cytogenetic damage induced by low energy protons in human fibroblasts. *Radiat Prot Dosimetry* 99(1-4): 197-198
5. Armstrong BK, Kricger A (1995) Skin cancer. *Dermatol Clin* 13(3): 583-594
6. Athar M, Kim AL, Ahmad N, Mukhtar H, Gautier J, Bickers DR (2000) Mechanism of ultraviolet B-induced cell cycle arrest in G2/M phase in immortalized skin keratinocytes with defective p53. *Biochem Biophys Res Comm* 277: 107-111
7. Aubert C, Rouge F, Reillaudou M, Metge P (1993) Establishment and characterization of human ocular melanoma cell lines. *Int J Cancer* 54(5): 784-792
8. Autier P, Dore JF, Lejeune F (1994) Recreational exposure to sunlight and lack information as risk factors for cutaneous malignant melanoma. Results of an European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) case-control study in Belgium, France and Germany. The EORTC Malignant Melanoma Cooperative Group. *Melanoma Res* 4: 79-85
9. Bånrud H, Stokke T, Moan J, Berg K (1995) S phase arrest and induction of multinucleated cells after exposure to ultraviolet radiation. *Carcinogenesis* 16: 1087-1094
10. Barclay LRS, Locke SJ, MacNeil LM (1983) The autooxidation of unsaturated lipids in micelles. Synergism of inhibitors vitamins C and E. *Can J Chem* 61: 1288-1290
11. Behrens WA, Madere R (1985) Transport of alpha- and gamma-tocopherol in human plasma lipoproteins. *Nutr Res* 5: 167-174

12. Bendich A, Langseth L (1995) The health effect of vitamin C supplementation: a review. *J Am Coll Nutr* 14: 124-136
13. Bergner T, Eberlein B, Przybilla B (1992) Sunlight and malignant melanoma. *Fortschr Med* 110(30): 551-553
14. Bisset DL, Chatterjee R, Hannon DP (1990) Photoprotective effect of superoxide-scavenging antioxidants against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 7: 56-62
15. Bologna JL, Sodi SA, Chakraborty AK, Fargnoli MC, Pawelek JM (1994) Effects of ultraviolet irradiation on the cell cycle. *Pigment Cell Res* 7: 320-325
16. Budiyanto A, Ueda M, Ueda T, Ichihashi M (2002) Formation of cyclobutane pyrimidine dimers and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in mouse and organ-cultured human skin by irradiation with broadband or with narrowband UVB. *Photochem Photobiol* 76 (4): 397-400
17. Burke KE, Clive J, Combs GF Jr, Commisso J, Keen CL, Nakamura RM (2000) Effects of topical and oral vitamin E on pigmentation and skin cancer induced by ultraviolet irradiation in Skh: 2 hairless mice. *Nutr Cancer* 38: 87-97
18. Burren R, Scaletta C, Frenk E, Panizzon RG, Applegate LA (1998) Sunlight and carcinogenesis: expression of p53 and pyrimidine dimers in human skin following UVA I, UVA I + II and solar simulating radiations. *Int J Cancer* 76(2): 201-216
19. Burton GW, Traber MD (1990) Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Ann Rev Nutr* 10: 357-382
20. Bykov VJ, Hemminki K (1996) Assay of different photoproducts after UVA, B and C irradiation of DNA and human skin explants. *Carcinogenesis* 17(9): 1949-1955
21. Chan AC (1993) Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharmacol* 71(9): 725-731
22. Chow CK (1985) Vitamin E and Blood. *Wld Rev Nutr Diet* 45: 133
23. Chow CK (1991) Vitamin E and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 11: 215-232

24. Cohn W, Gross P, Grun H, Loechleiter F, Muller DPR, Zulauf M (1992) Tocopherol transport and adsorption. *Proc Nutr Soc* 51: 179-188
25. Coory M, Baade P, Aitken J, Smithers M, McLeod GRC, Ring I (2006) Trend for in situ and invasive melanoma in Queensland, Australia, 1982-2002. *Cancer Causes and Control* 17: 21-27
26. Courtois SJ, Woodworth CD (1997) Early ultraviolet B-induced G1 arrest and suppression of the malignant phenotype by wild-type p53 in human squamous cell carcinoma cells. *Exp Cell Res* 233(1): 135-144
27. Danno K, Horio T, Tagigawa M, Imamura S (1984) Role of oxygen intermediates in UV induced epidermal cell injury. *J Invest Dermatol* 83:166-168
28. Darr D, Combs S, Dunston S, Manning T, Pinnell S (1992) Topical vitamin C protects porcine skin from ultraviolet radiation-induced damage. *Br J Dermatol* 127: 247-253
29. Darr D, Dunston S, Faust H, Pinnell S (1996) Effectiveness of antioxidants (vitamin C and E) with and without sunscreens as topical photoprotectants. *Acta Derm Venereol* 76: 264-268
30. de Laat A, van Tilburg M, van der Leun JC, van Vloten WA, de Gruijl FR (1996) Cell cycle kinetics following UVA irradiation in comparison to UVB and UVC irradiation. *Photochem Photobiol* 63: 492-497
31. Desai ID, Machlin LJ (1985) In: Augustin J, Klein BP (Hrsg.): *Methods of Vitamin Assay 4/E*. J. Wiley and Sons, New York 1985
32. Diffey BL (1987) Analysis of the risk of skin cancer from sunlight and solarium in subjects living in northern Europe. *Photodermatol* 4(3): 118-126
33. Diffey BL (2003) A quantitative estimate of melanoma mortality from ultraviolet A sunbed use in the U.K. *Br J Dermatol* 149: 578-581
34. Dolbeare F, Gratzner HG, Pallavicini MG, Gray JW (1983) Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5573-5577
35. Dunham WB, Zuckerkandl E, Reynolds R, Willoughby R, Marcuson R, Barth R, Pauling L (1982) Effects of intake of L-ascorbic acid on the incidence of dermal neoplasms induced in mice by ultraviolet light. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(23): 7532-7536

36. Eberlein-König B, Placzek M, Przybilla B (1998) Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and d- α -tocopherol (vitamin E). *J Am Acad Dermatol* 38: 45-48
37. Elmadfa I, Schwalbe P (1989) Einige Aspekte der Bioverfügbarkeit von α -Tocopherol. *Fat Sci Technol* 91: 402
38. Elsner P, Hölzle E, Diepgen T, Grether-Beck S, Hönigsmann H, Krutmann J, Scharfetter-Kochanek K, Schwarz T, Luger T (2007) Empfehlung: Täglicher Lichtschutz in der Prävention chronischer UV-Schäden der Haut. *JDDG* 5 (2): 166-174
39. Esterbauer H, Hayn M (1997) Vitamin E. In: Biesalski HK (Hrsg.) *Vitamine: Physiologie, Pathophysiologie, Therapie*. S. 49, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1997
40. Fei P, El-Deiry WS (2003) p53 and radiation responses. *Oncogene* 22: 5774-5783
41. Fitzpatrick TB (1988) The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 124(6): 869-871
42. Freedman D, Sigurdson MA, Rao RS, Hauptmann M, Alexander B, Mohan A, Morin Doody M, Linet MS (2003) Risk of melanoma among radiologic technologists in the United States. *Int J Cancer* 103: 556-563
43. Fryer MJ (1993) Evidence of the photoprotective effects of vitamin E. *Photochem Photobiol* 58: 304-312
44. Fuchs J (1998) Potentials and Limitations of the natural antioxidants α -tocopherol, L-ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection. *Free Radic Biol Med* 25: 848-873
45. Fuchs J, Kern H (1998) Modulation of UV-light-induced skin inflammation by d-alpha-tocopherol and L-ascorbic acid: A clinical study using solar simulated radiation. *Free Rad Biol Med* 25: 1006-1012
46. Fuchs J, Packer L (1990) Ultraviolet irradiation and the skin antioxidant system. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 7: 900-925
47. Fuchs J, Weber S, Podda M, Groth N, Herrling T, Packer L, Kaufmann R (2003) HPLC analysis of vitamin E isoforms in human epidermis: Correlation with minimal erythema dose and free radical scavenging activity. *Free Radic Biol Med* 34: 330-336

48. Gafa L, Filippazzo MG, Tumino R, Dardanoni G, Lanzarone F, Dardanoni L (1991) Risk factors of nonmelanoma skin cancer in Ragusa, Sicily: a case-control study. *Cancer Causes Control* 2(6): 395-399
49. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, Coldman AJ, Fincham S, McLean DI, Threlfall WJ (1995) Sunlight exposure, pigmentation factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. I. Basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 131(2): 157-163
50. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, Coldman AJ, Fincham S, McLean DI, Threlfall WJ (1995) Sunlight exposure, pigmentation factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. II. Squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol* 131(2): 164-169
51. Garbe C (1992) The sun and malignant melanoma. *Hautarzt* 43(5): 251-257
52. Garbe C, Buttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Kruger S, Roser M, Weckbecker J, Panizzon R, Bahmer F, et al. (1994) Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 102(5): 695-699
53. Gensler HL, Magdaleno M (1991) Topical vitamin E inhibition of immunosuppression and tumorigenesis induced by UV irradiation. *Nutr Cancer* 15: 97-110
54. Gilbertz KP, Baaske C, van Beunigen D (1993) Cell kinetic analysis after irradiation in L929- and LLC-MK2-cells by a BrdU/DNA assay. *Strahlenther Onkol* 169(3): 187-95
55. Gilbertz KP, van Beunigen D, Rhein AP (1998) Early changes in cell cycle kinetics after ionizing irradiation below 1 Gy. *Int J Radiat Biol* 73: 187-195
56. Goodarzi AA, Block WD, Lees-Miller SP (2003) The role of ATM and ATR in DNA damage-induced cell cycle control. *Progr Cell Cycle Res* 5: 393-411
57. Gratzner HG, Leif RC (1981) An immunofluorescence method for monitoring DNA synthesis by flow cytometry. *Cytometry* 1: 385-389
58. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54(18): 4855-4878

59. Halpner AD, Handelman GJ, Harris JM, Belmont CA, Blumberg JB (1998) Protection by vitamin C of loss of vitamin E in cultured rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 359(2): 305-309
60. Hamilton IM, Gilmore WS, Benzie IF, Mulholland CW, Strain JJ (2000) Interactions between vitamins C and E in human subjects. *Br J Nutr* 84(3): 261-267
61. Hanck A, Weber P (1997) Vitamin C. In: Biesalski HK (Hrsg.) *Vitamine: Physiologie, Pathophysiologie, Therapie*. S. 133, Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York 1997
62. Healy E, Collins P, Barnes L (1995) Nonmelanoma skin cancer in an Irish population: an appraisal of risk factors. *Ir Med J* 88(2): 58-59
63. Helt CE, Cliby WA, Keng PC, Bambara RA, O'Reilly MA (2005) Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. *J Biol Chem* 280 (2): 1186-1192
64. Herzinger T, Funk JO, Hilmer K, Eick D, Wolf DA, Kind P (1995) Ultraviolet B irradiation-induced G2 cell cycle arrest in human keratinocytes by inhibitory phosphorylation of the cdc2 cell cycle kinase. *Oncogene* 11: 2151-2156
65. Holme SA, Malinowszky K, Roberts DL (2000) Changing trends in non-melanoma skin cancer in South Wales, 1988-98. *Br J Dermatol* 143(6): 1224-1229
66. Hölzle E (2003) *Photodermatosen und Lichtreaktionen der Haut*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, S.15-16, Stuttgart
67. IARC (International Agency for Research on Cancer) (2006) The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer* 120: 1116-1122
68. Iliakis G, Wang Y, Guan J, Hang H (2003) DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing irradiation. *Oncogene* 22: 5834-5847
69. Jurkiewicz BA, Bisset DL, Buettner GR (1995) Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin. *J Invest Dermatol* 104: 484-488

70. Kaplowitz N, Yoshida H, Kuhlenkamp J, Slitzky B, Ren I, Stolz A (1989) Tocopherol binding proteins of hepatic cytosol. *Ann N Y Acad Sci* 570: 85-94
71. Kappus H, Diplock AT (1992) Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. *Free Radic Res Comm* 16: 51-64
72. Kästner W, Kappus H (1990) Sicherheit bei Einnahme von Vitamin E. Toxikologische Aspekte und Verträglichkeit bei oraler Aufnahme. *Veris* 2. Nr.1: 1-24
73. Katalinic A, Kunze U, Schäfer T (2003) Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumor stages and localization (epidemiology of skin cancer). *Br J Dermatol* 149: 1200-1206
74. Kennedy C, Bajdik CD, Willemze R, De Gruijl FR, Bouwes Bavinck JM, Leiden Skin Cancer Study (2003) The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. *J Invest Dermatol* 120(6): 1087-1093
75. Kowalczyk CI, Priestner MC, Pearson AJ, Saunders RD, Bouffler SD (2006) Wavelength dependence of cellular responses in human melanocytes and melanoma cells following exposure to ultraviolet radiation. *Int J Radiat Biol* 82 (11): 781-792
76. Kremer CL, Schmelz M, Cress AE (2006) Integrin-dependent amplification of the G2 arrest induced by ionizing radiation. *Prostate* 66 (1): 88-96
77. Kricger A, Armstrong BK, McMichael AJ (1994) Skin cancer and ultraviolet. *Nature* 368: 594
78. Kulms D, Schwarz T (2000) Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 16(5): 195-201
79. Kvam E, Tyrrell RM (1997) Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis* 18(12): 2379-2384
80. la Ruche G, Cesarini JP (1991) Protective effect of oral selenium plus copper associated with vitamin complex on sunburn cell formation in human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 8(6): 232-235

81. Lehmann J, Pollet D, Peker S, Steinkraus V, Hoppe U (1998) Kinetics of DNA strand breaks and protection by antioxidants in UVA- or UVB-irradiated HaCat keratinocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mut Res* 407: 97-108
82. Lin FH, Lin JY, Gupta RD, Tournas JA, Burch JA, Selim MA, Monteiro-Riviere NA, Grichnik JM, Zielinski J, Pinnell SR (2005) Ferulic Acid Stabilizes a Solution of Vitamins C and E and Doubles its Photoprotection of Skin. *J Invest Dermatol* 125: 826-832
83. Lin JY, Selim MA, Shea CR, Grichnik JM, Omar MM, Monteiro-Riviere NA, Pinnell SR (2003) UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. *J Am Acad Dermatol* 48(6): 866-874
84. Lopez-Torres M, Thiele JJ, Shindo Y, Han D, Packer L (1998) Topical application of α -tocopherol modulates the antioxidant network and diminishes ultraviolet-induced oxidative damage in murine skin. *Br J Dermatol* 138: 207-215
85. Lowe NJ, Meyers DP, Wieder JM, Luftman D, Borget T, Lehman MD, Johnson AW, Scott IR (1995) Low doses of repetitive ultraviolet A induce morphologic changes in human skin. *J Invest Dermatol* 105(6): 739-743
86. Maalouf S, El-Sabban M, Darwiche N, Gali-Muhtasib H (2002) Protective effect of vitamin E on ultraviolet B light-induced damage in keratinocytes. *Mol Carcinog* 34(3): 121-130
87. Massay JB (1984) Kinetics of transfer of α -Tocopherol between model and native plasma lipoproteins. *Biochem Biophys Acta* 793: 387-392
88. Meydani M (1995) Vitamin E. *Lancet* 345: 170-175
89. Mitchell DL, Nairn RS (1989) The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol* 49(6): 805-819
90. Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 261-291
91. Mouret S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T (2006) Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (37): 13765-13770
92. Niki E (1987) Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 44: 227-253

93. Niki E, Kawakami A, Yamamoto Y, Kamiya Y (1985) Oxidation of lipids. VIII. Synergistic inhibition of oxidation of phosphatidylcholine liposome in aqueous dispersion by vitamin E and vitamin C. *Bull Chem Soc Jpn* 58: 1971-1975
94. Olson RL, Sayre RM, Everett MA (1966) Effect of anatomic location and time on ultraviolet erythema. *Arch Dermatol* 93(2): 211-215
95. Onuma H, Mastui C, Morohashi M (2001) Quantitative analysis of the proliferation of epidermal cells using a human skin organ culture system and the effect of DbcAMP using markers of proliferation (BrdU, Ki-67, PCNA). *Arch Dermatol Res* 293(3): 133-138
96. Orren DK, Petersen LN, Bohr VA (1995) A UV-responsive G2 checkpoint in rodent cells. *Mol Cell Biol* 15: 3722-3730
97. Packer JE, Slater TF, Willson RL (1979) Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 287: 737-738
98. Pathak MA (1982) Sunscreens: topical and systemic approaches for protection of human skin against harmful effects of solar radiation. *J Am Acad Dermatol* 7(3): 285-312
99. Pavey S, Russell T, Gabrielli B (2001) G2 phase cell cycle arrest in human skin following UV irradiation. *Oncogene* 20: 6103-6110
100. Pawlik TM, Keyomarsi K (2004) Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59: 928-942
101. Peak JG, Pilas B, Dudek EJ, Peak MJ (1991) DNA breaks caused by monochromatic 365 nm ultraviolet-A radiation or hydrogen peroxide and their repair in human epithelioid and xeroderma pigmentosum cells. *Photochem Photobiol* 54(2): 197-203
102. Petrocilli T, Poon R, Drucker DJ, Slingerland JM, Rosen CF (1996) UVB radiation induces p21^{Cip1/WAF1} and mediates G1 and S phase checkpoints. *Oncogene* 12: 1387-1396
103. Picardo M, Zampetti C, De Luca C, Cirone M, Faggioni A, Nazzaro-Porro M, Passi S, Prota G (1991) Role of skin surface lipids in UV-induced epidermal cell changes. *Arch Dermatol Res* 283: 191-197
104. Pietenpol JA, Stewart ZA (2002) Cell cycle checkpoint signalling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181-182: 475-481

105. Pinnell SR (2003) Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol* 48(1): 1-22
106. Placzek M (2007) Effect of ultraviolet (UV) A, UVB or ionizing radiation on the cell cycle of human melanoma cells. *Br J Dermatol* 156(5): 843-847
107. Placzek M, Eberlein-König B, Przybilla B (1999) Association between Actinic Keratosis and Potentially Photosensitizing Drugs. *N Engl J Med* 341: 1474-1475
108. Placzek M, Gaube S, Kerkmann U, Gilbertz KP, Herzinger T, Haen E, Przybilla B (2005) Ultraviolet B-induced DNA damage in human epidermis is modified by the antioxidants ascorbic acid and D- α -tocopherol. *J Invest Dermatol* 124: 304-307
109. Potapenko A, Abiev GA, Pliquet F (1980) Alpha-tocopherol inhibition of erythema in skin photosensitized by 8-methoxypsoralen. *Byull Eksp Biol Med* 89(5): 560-563
110. Potapenko A, Abijev GA, Pistsov M, Roshchupkin DI, Vladimirov Yu A, Pliquet F, Ermolayev AV, Sarycheva IK, Evstigneeva RP (1984) PUVA-induced erythema and changes in mechanoelectrical properties of skin. Inhibition by tocopherols. *Arch Dermatol Res* 276(1): 12-16
111. Pourzand C, Tyrrell RM (1999) Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. *Photochem Photobiol* 70(4): 380-390
112. Przybilla B, Georgii A, Bergner T, Ring J (1990) Demonstration of quinolone phototoxicity in vitro. *Dermatologica* 181: 98-103
113. Record IR, Dreosti IE, Konstantinopoulos M, Buckley RA (1991) The influence of topical and systemic vitamin E on ultraviolet light-induced skin damage in hairless mice. *Nutr Cancer* 16(3-4): 219-225
114. Roshchupkin DI, Pistsov MY, Popapenko AY (1979) Inhibition of ultraviolet light-induced erythema by antioxidants. *Arch Dermatol Res* 266(1): 91-94
115. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kacmaz K, Linn S (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repairs and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73: 39-85
116. Schaart FM, Garbe C, Orfanos CE (1993) Disappearance of the ozone layer and skin cancer: attempt at risk assessment. *Hautarzt* 44: 63-68
117. Schmitz S, Garbe C, Tebbe B, Orfanos CE (1994) Long-wave ultraviolet radiation (UVA) and skin cancer. *Hautarzt* 45(8): 517-525

118. Schüep W, Rettenmaier (1994) Analysis of vitamin E homologs in plasma and tissue: High performance liquid chromatography. *Meth Enzymol* 234: 294-302
119. Schultz ES, Schuler G (2005) Malignes Melanom. *HNO* 53: 928-939
120. Schutte B, Reynders MM, van Asche CL, Hupperets PC, Bosman FT, Blijham GH (1987) An improved method for the immunocytochemical detection of bromodeoxyuridine labeled nuclei using flow cytometry. *Cytometry* 8: 372-376
121. Schwartz J, Shklar G, Trickler D (1993) p53 in the anticancer mechanism of vitamin E. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 29B: 313-318
122. Sendler A, Gilbertz KP, Becker I, Müller J, Berger U, Fink U, van Beuningen D, Siewert JR (2001) Proliferation kinetics and prognosis in gastric cancer after resection. *Eur J Cancer* 37(13): 1635-1641
123. Shaulian E, Schreiber M, Piu F, Beeche M, Wagner EF, Karin M (2000) The mammalian UV Response: c-Jun Induction Is Required for Exit from p53-Imposed Growth Arrest. *Cell* 103: 897-907
124. Shindo Y, Witt E, Packer L (1993) Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J Invest Dermatol* 100: 260-265
125. Shindo Y, Witt E, Han D, Epstein W, Packer L (1994) Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J Invest Dermatol* 102(1): 122-124
126. Shindo Y, Witt E, Han D, Packer L (1994) Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. *J Invest Dermatol* 102(4): 470-475
127. Shore RE (2001) Radiation-induced skin cancer in humans. *Med Pediatr Oncol* 36: 549-554
128. Stante M, Salvini C, De Giorgi V, Carli P (2002) Multiple synchronous pigmented basal cell carcinomas follow radiotherapy for Hodgkin`s disease. *Int J Dermatol* 41: 208-211
129. Steenvoorden DP, Beijersbergen v Henegouven G (1999) Protection against UV-induced systemic immunosuppression in mice by a single topical application of the antioxidant vitamins C and E. *Int J Radiat Biol* 75: 747-755

130. Stern RS, Bolshakov S, Nataraj AJ, Ananthaswamy HN (2002) p53 mutation in nonmelanoma skin cancers occurring in psoralen ultraviolet a-treated patients: evidence for heterogeneity and field cancerization. *J Invest Dermatol* 119(2): 522-526
131. Tasinato A, Boscoboinik D, Bartoli GM, Maroni P, Azzi A (1995) d-alpha-tocopherol inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentrations, correlates with protein kinase C inhibition, and is independent of its antioxidant properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(26): 12190-12194
132. Thiele JJ (2001) Oxidative targets in the stratum corneum. A new basis for antioxidative strategies. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14 Suppl 1: 87-91
133. Trevithick JR, Xiong H, Lee S, Shum DT, Sanford SE, Karlik SJ, Norley C, Dilworth GR (1992) Topical tocopherol acetate reduces post-UVB, sunburn-associated erythema, edema, and skin sensitivity in hairless mice. *Arch Biochem Biophys* 296(2): 575-582
134. Vitas BC, Taylor HR, Strickland PT, Rosenthal FS, West S, Abbey H, Ng SK, Munoz B, Emmet EA (1990) Association of nonmelanoma skin cancer and actinic keratosis with cumulative solar ultraviolet exposure in Maryland watermen. *Cancer* 65(12): 2811-2817
135. Wallat S (1986) Zur biologischen Wirksamkeit von Vitamin E. *Fette. Seifen. Anstrichmittel*. 88: 485-490
136. Wang JX, Zhang LA, Li BX, Zhao YC, Wang ZQ, Zhang JY, Aoyama T (2002) Cancer incidence and risk estimation among medical x-ray workers in China 1950-1995. *Health Phys* 82: 455-466
137. Weller EM, Hain J, Jung T, Kinder R, Köfferlein M, Burkart W, Nüsse M (1996) UV-B-induced cell cycle perturbations, micronucleus induction, and modulation by caffeine in human keratinocytes. *Int J Radiat Biol* 69: 371-384
138. Werninghaus K, Meydani M, Bhawan J, Margolis R, Blumberg JB, Gilchrest BA (1994) Evaluation of the photoprotective effect of oral vitamin E supplementation. *Arch Dermatol* 130(10): 1257-1261

139. Westerdahl J, Olsson H, Ingvar C, Brandt L, Jonsson PE, Moller T (1992) Southern travelling habits with special reference to tumor site in Swedish melanoma patients. *Anticancer Res* 12: 1539 -1542
140. Westerdahl J, Olsson H, Masback A (1994) Use of sunbeds or sunlamps and malignant Melanoma in southern Sweden. *Am J Epidemiol* 140: 691-699
141. Whitmore SE, Morison WL, Potten CS, Chadwick C (2001) Tanning salon exposure and molecular alterations. *J Am Acad Dermatol* 44(5): 775-780
142. Wilson GD (2004) Radiation and the cell cycle, revisited. *Cancer Metast Rev* 23: 209-225
143. Wucherpfennig V (1931) Biologie und praktische Verwendbarkeit der Erythemschwelle des UV. *Strahlentherapie* 40: 201-244
144. Yuen KS, Halliday GM (1997) Alpha-tocopherol, an inhibitor of epidermal lipid peroxidation, prevents ultraviolet radiation from suppressing the skin immune system. *Photochem Photobiol* 65: 587-592

7. Anhang

Verum	L-Ascorbinsäure				D-alpha-Tocopherol			
	Monat 0	Monat 1	Monat 2	Monat 3	Monat 0	Monat 1	Monat 2	Monat 3
MM2	10,15	29,43	29,13	14,39	4,59	23,07	29,22	29,02
MM3	15,96	31,25	17,83	16,08	11,7	26,36	30,69	28,61
MM5	13,84	20,91	16,9	19,63	10,48	44,64	23,86	29,26
MM7	10	13,9	14,98	12,58	17,92	37,76	40,04	38,42
MM8	12,79	31,94	30,25	24,8	11,16	48,83	45,26	34,58
MM11	9,54	10,87	13,05	14,01	25,49	97,44	64,28	46,34
MM13	11,9	19,55	32,8	21,1	17,03	54,25	63,83	60,44
BK1	14,11	9,36	10,97	11,77	11,38	28,42	27,35	34
BK2	14,54	14,74	15,98	11,9	11,94	25,28	21,71	20,39
BK3	9,85	9,69	21,87	18,99	16,73	27,45	34,88	27,99
BK5	6,57	15,45	28,17	13,27	9,39	30,96	27,26	40,7
BK7	5,93	14,61	21,53	27,91	13,4	26,91	29,43	35,24
BK9	9,19	27,87	21,39	16,4	9,63	28,08	31,16	28,58
BK10	10,18	14,29	14,51	14,59	14,13	21,89	24,05	19,65
BK15	6,59	24,29	19,43	17,08	10,9	43,41	53	44,57
BK17	8,2	16,41	13,57	6,77	48,53	91,15	92,49	96
BK18	9,12	13,35	10,67	13,1	26,91	91,28	45,64	55,28
SK4	13,16	16,11	14,77	12,02	23,3	85,8	88,79	52,79
SK6	4,57	7,92	11,18	11,27	11,85	21,02	23,17	31,76
SK7	10,62	13,32	8,17	11,64	20,52	88,59	41,48	81,48
SK9	7,07	10,87	11,72	11,23	13,42	39,32	76,07	62,8
SK10	9,59	24,35	14,45	17,06	30,36	80,93	50,79	48,29
SK11	11,27	20,46	32,49	6,52	22,51	51,99	55,09	48,93
KP1	4,77	17,71	12,97	12,47	10,78	19,34	40,28	16,94
KP4	14,27	13,37	12,14	6,96	10,15	22,54	18,55	26,16
KP5	15,8	10,05	19,46	13,89	7,79	14,43	15,72	15,46
KP6	15,96	8,84	11,95	12,11	12,13	19,31	11,25	13,62
KP8	14,93	12,46	10,25	14,4	10,53	10,57	13,95	12,69
KP12	11,4	27,36	14,25	13,84	20,97	45,48	34,14	36,85
KP13	9,07	12,58	16,73	30,16	19,24	54,79	31,77	62,97
KP15	12,32	10,48	11,73	9,69	7,63	12,57	19,04	15,49
KP16	23,88	21,41	21,63	17,84	20,28	31	34,31	45,56
KP19	12,08	10,47	9,54	7,74	13,39	26,45	36,44	18,95
M	11,18848	16,83848	17,16545	14,64273	15,94424	41,55485	38,63606	38,17606
SA	3,920823	6,953482	6,851199	5,499568	8,447915	25,66166	20,25061	19,58037

- a. Individuelle L-Ascorbinsäure- und D-alpha-Tocopherol-Blutspiegelwerte jeweils in mg/l der Probanden der Verumgruppe am jeweiligen Messzeitpunkt (Monat 0 bis Monat 3) und Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung. BK, Basalzellkarzinom; KP, Kontrollpersonen; M, Mittelwert; MM, malignes Melanom; SA, Standardabweichung; SK, spinozelluläres Karzinom.

Placebo	L-Ascorbinsäure				D-alpha-Tocopherol			
	Monat 0	Monat 1	Monat 2	Monat 3	Monat 0	Monat 1	Monat 2	Monat 3
MM1	5,48	3,04	5,95	4,59	14,05	19,43	16,1	15,84
MM4	17,53	14,29	25,21	17,45	10,27	14,11	14,49	14,03
MM6	15,2	11,68	16,45	7,91	11,96	10,81	13,42	13,78
MM9	9,8	13,71	14,73	13,21	22,22	20,45	23,21	17,32
MM10	10,89	11,98	9,36	13,51	19,45	24,63	18,12	23,25
MM12	9,49	13,32	13,29	11,46	19,8	18,43	17,57	17,5
BK4	6	6,16	4,77	6,13	9,18	10,39	8,64	11,91
BKC6	11,94	11,77	14,82	9,55	15,87	11,3	9,59	12,52
BK8	10,83	9,28	10,6	8,32	12,98	13,09	10,44	9,74
BK11	13,77	12,94	11,99	11,54	11,34	9,61	16,58	12,43
BK12	8,25	8,43	8,81	10,83	10,02	10,07	13,9	7,91
BK13	11,13	7,35	12,22	12,82	15,54	15,91	18,49	25,99
BK14	5,93	12,83	7,99	7,55	12,62	17,5	24,51	19,09
BK16	12,04	20	16,9	18,22	20,3	15,58	14,7	8,38
BK20	14,78	12,77	16,09	7,78	23,27	23,45	29,95	22
SK1	7,61	11,08	16,75	11,13	31,26	22,86	26,29	23,44
SK2	8,89	11,14	12,39	9,25	48,66	35,48	33,28	41,65
SK5	9,1	9,98	6,73	3,99	27,89	37,19	34,49	41,23
SK8	9,04	9,3	5,76	9,79	16,14	19,16	18,33	26,62
KP2	5,06	11,09	8,16	6,58	7,78	7,29	9,15	8,16
KP3	5,33	11,33	9,35	10,76	10,77	8,31	11,96	8,3
KP7	5,79	10,74	8,21	11,88	8,28	8,62	8,63	10,52
KP9	9,37	5,42	8,09	7,65	14,96	12,39	13,68	13,75
KP10	10,42	18,03	12,72	17,33	10,43	12,97	10,69	12,53
KP11	10,25	11,77	7,93	7,27	11,62	10,88	10,61	11,13
KP14	9,53	12,25	12,01	14,14	11,2	13,79	10,88	14,53
KP17	11,76	15,72	13,4	11,06	8,44	6,4	9,14	10,64
KP18	7,17	4,43	9,68	5,73	11,98	10,83	11,73	10,1
KP20	8,1	8,01	9,25	11,85	13,6	12,6	12,12	11,88
M	9,671724	11,02897	11,36586	10,32	15,9269	15,63897	16,23069	16,41966
SA	3,121948	3,721067	4,380948	3,678479	8,5832	7,543678	7,345361	8,75624

- b. Individuelle L-Ascorbinsäure- und D-alpha-Tocopherol-Blutspiegelwerte jeweils in mg/l der Probanden der Placebogruppe am jeweiligen Messzeitpunkt (Monat 0 bis Monat 3) und Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung. BK, Basalzellkarzinom; KP, Kontrollpersonen; M, Mittelwert; MM, malignes Melanom; SA, Standardabweichung; SK, spinozelluläres Karzinom.

	L-Ascorbinsäure				D-alpha-Tocopherol			
Verum	Monat 0	Monat 1	Monat 2	Monat 3	Monat 0	Monat 1	Monat 2	Monat 3
MM21	14,55	14,92	7,17	9,64	13,3	28,52	22,28	17,5
MM22	15,14	26,13	26,8	24,59	55,7	45,27	42,81	69,99
MM23	10,09	21,08	21,09	19,28	10,18	21,21	26,6	20,6
MM24	11,28	15,33	16,4	15,16	42,8	18,19	13,21	20,13
MM25	13,45	32,58	35,64	33,89	12,64	18,78	27,37	18,49
BK21	10,64	11,38	19,37	14,1	13,26	31,08	35,49	30,28
BK23	14,29	17,69	17,57	13,97	20,1	40,74	35,34	27,61
BK24	12,86	20,22	21,45	18,9	30,94	58,12	39,57	75,37
BK25	5,25	18,97	14,02	23,65	12,59	25,27	36,88	47,11
BK26	13,82	32,76	36,53	23,09	18,28	42,98	40,38	35,54
SK21	7,53	8,29	9,84	6,85	24,41	49,13	76,28	36,49
SK22	3,57	9,12	20,47	13,33	13,17	39,53	54,67	69,78
SK23	7,7	22,73	25,82	21,45	18,94	38,89	42,5	40,17
SK24	7,88	10,01	11,67	16,48	23,38	71,61	87,38	42,72
KP21	11,74	25,56	13	22,21	13,83	35,88	32,94	27,63
KP22	13,45	14,43	12,49	7,45	29	36,53	32,22	48,34
KP23	25,59	26,78	19,39	21,48	14,55	17,69	36,8	33,34
KP24	10,46	18,58	13,8	21,22	10,26	29,13	29	37,95
M	11,62722	19,25333	19,02889	18,15222	20,96278	36,03056	39,54	38,83556
SA	4,805499	7,478683	8,120262	6,760778	12,17135	14,38583	17,90688	17,76033

- c. Individuelle L-Ascorbinsäure- und D-alpha-Tocopherol-Blutspiegelwerte jeweils in mg/l der Probanden der MED Messungen am jeweiligen Messzeitpunkt (Monat 0 bis Monat 3) und Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung. BK, Basalzellkarzinom; KP, Kontrollpersonen; M, Mittelwert; MM, malignes Melanom; SA, Standardabweichung; SK, spinozelluläres Karzinom.

Probanden	MED-Veränderung	
	Monat 0	Monat 3
MM21	57	80
MM22	113	113
MM23	57	113
MM24	113	113
MM25	80	113
BK21	80	160
BK23	80	80
BK24	80	113
BK25	80	80
BK26	113	113
SK21	80	113
SK22	80	113
SK23	80	113
SK24	113	160
KP21	80	113
KP22	113	125
KP23	80	80
KP24	80	113
Median	80	113

- d. Bestimmung der MED in mJ/cm^2 am jeweiligen Messzeitpunkt (Monat 0 und Monat 3) und Berechnung des Medians. BK, Basalzellkarzinom; KP, Kontrollpersonen; MM, malignes Melanom; SK, spinozelluläres Karzinom.

Probanden	Anzahl der gefärbten Zellen pro mm			
	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt nach 3 Monaten AS/AT	bestrahlt nach 3 Monaten AS/AT
MM22	1,4	1,7	9,7	2,7
MM23	5,9	4,8	7,2	2,9
MM24	13,3	6,9	8,4	4,0
MM25	10,0	8,0	8,0	4,6
BK21	11,4	9,8	10,4	4,2
BK23	0,8	1,0	10,0	4,8
BK24	4,6	1,3	4,9	1,3
BK25	12,0	2,5	7,0	5,1
BK26	9,8	15,4	14,6	6,2
SK21	7,8	10,0	10,4	5,5
SK22	14,2	7,0	7,6	8,4
SK23	6,7	5,0	8,5	2,2
SK24	5,5	4,8	6,9	2,3
KP21	11,8	10,5	10,9	4,3
KP22	7,2	2,4	5,1	0,8
KP23	2,0	1,5	7,3	3,6
KP24	15,2	7,0	3,0	1,2
Median	7,8	5,0	8,0	4,0

- e. Bestimmung der epidermalen Zellproliferation in den unbestrahlten und bestrahlten Gewebsschnitten vor und nach 3 Monaten L-Ascorbinsäure (AS)- und D-alpha-Tocopherol (AT)-Applikation. Messwerte als Anzahl der gefärbten Zellen pro mm Hautoberfläche und Berechnung des Medians. BK, Basalzellkarzinom; KP, Kontrollpersonen; MM, malignes Melanom; SK, spinözelluläres Karzinom.

UV-A J/cm2	G1-Phase BrdU positiv			S-Phase BrdU positiv			G2 Phase BrdU positiv			G1 Phase BrdU negativ			S-Phase BrdU negativ			G2-Phase BrdU negativ								
	M	SA	100%	SA	M	SA	100%	SA	M	SA	100%	SA	M	SA	100%	SA	M	SA	100%	SA				
0	0	0	0	0	41,6	0,9	100	2,16	11,5	1,9	100	16,5	31,7	4,4	100	13,9	4,1	0,2	100	4,88	11,5	1,2	100	10,4
6	14,3	6,72	14,3	6,72	19,5	1,8	46,9	4,33	26,4	4,8	230	41,7	36,8	4,2	116	13,2	5,3	1,1	129	26,8	5,2	2	45,2	17,4
12	36	7,27	36	7,27	4,9	1	11,8	2,4	18,9	1,7	164	14,8	23,7	0,2	74,8	0,63	15,8	0,5	385	12,2	7,6	2	66,1	17,4
24	21,82	3,1	21,82	3,1	18,6	0,2	44,7	0,48	12,4	0,8	108	6,96	27,9	0,3	88	0,95	9,4	3	229	73,2	13,1	0,8	114	6,96
10	0	0	0	0	38,6	2,5	100	6,48	8,8	0,7	100	7,95	36,4	4,3	100	11,8	4,6	0,1	100	2,17	12,2	0,9	100	7,38
6	4,74	1,05	4,74	1,05	29,5	0,8	76,4	2,07	15,4	1,7	175	19,3	35,6	0,9	97,8	2,47	5,8	0,2	126	4,35	9,1	0,9	74,6	7,38
12	9,37	9,32	9,37	9,32	19,9	4,4	51,6	11,4	25,8	3,8	293	43,2	25,1	0,6	69	1,65	17,7	0,3	385	6,52	7,9	0,8	64,8	6,56
24	12,54	4,46	12,54	4,46	11	0,1	28,5	0,26	19,1	3	217	34,1	21	3	57,7	8,24	13,3	0,9	289	19,6	23,8	4,8	195	39,3
UV-B mJ/cm2	G1-Phase BrdU positiv			S-Phase BrdU positiv			G2 Phase BrdU positiv			G1 Phase BrdU negativ			S-Phase BrdU negativ			G2-Phase BrdU negativ								
h	M	SA	100%	SA	M	SA	100%	SA	M	SA	100%	SA	M	SA	100%	SA	M	SA	100%	SA	M	SA	100%	SA
0	0	0	0	0	43,1	5,6	100	13	9,5	0,1	100	1,05	33,4	4,3	100	12,9	4,1	1,2	100	29,3	9,7	0,9	100	9,28
6	14,3	6,72	14,3	6,72	18,9	2,4	43,9	5,57	21,5	4,5	226	47,4	34,8	2,9	104	8,68	6,7	0,5	163	12,2	5,6	0,4	57,7	4,12
12	36	7,27	36	7,27	4,2	0,4	9,74	0,93	18	1,2	189	12,6	23,2	4,1	69,5	12,3	17,2	0,9	420	22	8	1,5	82,5	15,5
24	21,82	3,1	21,82	3,1	15,5	1,1	36	2,55	9,6	0,8	101	8,42	24,4	4,3	73,1	12,9	9,4	3	229	73,2	13,1	0,8	135	8,25
40	0	0	0	0	40,1	2,6	100	6,48	9,5	2,2	100	23,2	34,8	1,4	100	4,02	4,1	0,1	100	2,44	10,6	1,5	100	14,2
6	10,6	3,39	10,6	3,39	21,4	1,3	53,4	3,24	12,9	3	136	31,6	38,5	3,9	111	11,2	5,3	0,6	129	14,6	8,1	2,3	76,4	21,7
12	7,85	4,74	7,85	4,74	21,1	1,8	52,6	4,49	20	2,6	211	27,4	34,5	2,1	99,1	6,03	6,8	0,9	166	22	7,1	0,1	67	0,94
24	14,39	2,33	14,39	2,33	12,4	2,8	30,9	6,98	21,3	0,3	224	3,16	23,2	3,8	66,7	10,9	14,8	1,7	361	41,5	9	1,1	84,9	10,4

IR Gy	G1-Phase BrdU positiv			S-Phase BrdU positiv			G2 Phase BrdU positiv			G1 Phase BrdU negativ			S-Phase BrdU negativ			G2-Phase BrdU negativ								
	M	SA	100%	SA	M	SA	100%	SA	M	SA	100%	SA	M	SA	100%	SA	M	SA	100%	SA	M	SA	100%	SA
0	0	0	0	0	44	6,6	100	15	15,5	1,4	100	9,03	25,2	5	100	19,8	2,3	0,8	100	34,8	13,6	2,6	100	19,1
6	1,4	3,9	1,4	3,9	22,2	7,6	50,5	17,3	26,1	1,9	168	12,3	32,1	8,5	127	33,7	4	0,5	174	21,7	2	0,5	14,7	3,68
12	35,6	4	35,6	4	13,1	5,8	29,8	13,2	13,3	4	85,8	25,8	10,3	5	40,9	19,8	18,6	1,9	809	82,6	7,2	2,9	52,9	21,3
24	19,3	4,1	19,3	4,1	18,4	3,9	41,8	8,86	20,2	0,9	130	5,81	25,1	6,4	99,6	25,4	9,4	4,2	409	183	6,6	2,4	48,5	17,6
7,5	0	0	0	0	46	8,4	100	18,3	14,4	1	100	6,94	24,9	6	100	24,1	2,6	0,4	100	15,4	12,7	3,8	100	29,9
6	3,3	2,1	3,3	2,1	28,3	4,4	61,5	9,57	37,7	6	262	41,7	15,8	6,1	63,5	24,5	4,4	1,1	169	42,3	11,6	6,1	91,3	48
12	3,8	1,2	3,8	1,2	9,3	6,1	20,2	13,3	51,1	5,7	355	39,6	8,5	2,9	34,1	11,6	15,1	3,3	581	127	13,2	6,9	104	54,3
24	17,4	4,5	17,4	4,5	16	4,2	34,8	9,13	26,8	4,4	186	30,6	15,7	5,5	63,1	22,1	7,3	0,6	281	23,1	15	2,7	118	21,3

f. Prozentwerte der IPC-298 Zellen 0, 6, 12 oder 24 h unbestrahlt oder nach UV-A-, UV-B- oder IR-Bestrahlung in den einzelnen Zellzyklusphasen und Aufteilung nach positiver oder negativer BrdU-Markierung. Normierung auf 100% zur graphischen Darstellung. M, Mittelwert; SA, Standardabweichung; 100%, Normierung.

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. hc. mult. G. Plewig sowie Herrn Prof. Dr. med. Dr. hc. T. Ruzicka danke ich für die Arbeitsmöglichkeiten in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München und Herrn Dr. V. Meineke für die Übereignung der IPC-298-Kulturen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. B. Przybilla für die Überlassung des Dissertationsthemas und Hilfestellung bei ihrer Konzeption und Dokumentation. Während der ganzen Zeit hat er durch seine spontane Bereitschaft, neue Ideen mit Ratschlägen und Anregungen zu unterstützen, ganz wesentlich zum Fortschritt der Experimente beigetragen.

Des weiteren möchte ich mich ganz besonders bei Frau Priv. Doz. Dr. med. M. Placzek bedanken, die meine Arbeit in der gesamten Zeit gewissenhaft betreut, mich jederzeit unterstützt und mir mit wissenschaftlichem Rat und zahlreichen wertvollen Anregungen zur Seite gestanden hat.

Auch Herrn Dr. K.-P. Gilbertz vom Institut für Radiobiologie der Sanitätsakademie der Bundeswehr in München möchte ich meinen Dank für die tatkräftige wissenschaftliche Unterstützung und Anregung aussprechen.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ekkehard Haen an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie im Bezirksklinikum Regensburg gilt mein Dank für die Kooperation bei der HPLC-Analytik der Antioxidantien.

Auch gilt mein Dank Frau Dr. med. S. Gaube für die weiterführende und ergänzende Mitarbeit an den Projekten und Frau Stefanie Müller für die unentbehrliche, vielfältige Unterstützung und Hilfe sowie für die wichtigen Hinweise im photobiologischen Labor.

Gefördert wurde die Arbeit durch den Bayerischen Forschungsverbund BayFORUV - Erhöhte UV-Strahlung in Bayern Folgen und Maßnahmen. Ich bedanke mich bei den zuständigen Stellen und Behörden, die es ermöglichen, solche kliniknahe Grundlagenforschung zu unterstützen.

