



Gepulste und kontinuierliche in vitro UV-Bestrahlung menschlicher Hautproben – Vergleich der biologischen Wirksamkeit

baua: Bericht

**Forschung
Projekt F 2377**

C. Starzonek
B. Volkmer
R. Greinert
S. Bauer
G. Ott

**Gepulste und kontinuierliche in vitro
UV-Bestrahlung menschlicher Hautproben –
Vergleich der biologischen Wirksamkeit**

1. Auflage 2019
Dortmund/Berlin/Dresden

Diese Veröffentlichung ist der Abschlussbericht zum Projekt F 2377 „Biologische Wirksamkeit von gepulster inkohärenter optischer Strahlung“ der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) in Kooperation mit dem Labor für Molekulare Zellbiologie, Elbe Kliniken Stade-Buxtehude. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.



Autorinnen/Autoren: Christin Starzonek
Dr. rer. nat. Beate Volkmer
Dr. rer. nat. Rüdiger Greinert
Elbe Kliniken Stade-Buxtehude
Klinik für Dermatologie, Labor für Molekulare Zellbiologie
Am Krankenhaus 1, 21614 Buxtehude

Dr. rer. nat. Stefan Bauer
Dipl.-Ing. (FH) Günter Ott
Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

Titelfoto: Radu Bighian/iStock.com

Umschlaggestaltung: Susanne Graul
Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

Herstellung: Druck & Verlag Kettler GmbH, Bönen

Herausgeber: Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA)
Friedrich-Henkel-Weg 1 – 25, 44149 Dortmund
Postanschrift: Postfach 17 02 02, 44061 Dortmund
Telefon 0231 9071-2071
Telefax 0231 9071-2070
E-Mail info-zentrum@buaa.bund.de
Internet www.buaa.de

Berlin: Nöldnerstraße 40 – 42, 10317 Berlin
Telefon 030 51548-0
Telefax 030 51548-4170

Dresden: Fabricestraße 8, 01099 Dresden
Telefon 0351 5639-50
Telefax 0351 5639-5210

Die Inhalte der Publikation wurden mit größter Sorgfalt erstellt und entsprechen dem aktuellen Stand der Wissenschaft. Für die Richtigkeit, Vollständigkeit und Aktualität der Inhalte übernimmt die BAuA jedoch keine Gewähr.

Nachdruck und sonstige Wiedergabe sowie Veröffentlichung, auch auszugsweise, nur mit vorheriger Zustimmung der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin.

doi:10.21934/buaa:bericht20190329 (online)

www.buaa.de/dok/8817076



Inhaltsverzeichnis

	Seite
Kurzreferat	5
Abstract	6
1 Einleitung	7
2 Theorie	9
2.1 Aufbau der menschlichen Haut	10
3 Methoden	13
3.1 Bestrahlungsaufbau	13
3.2 UV-Bestrahlung	14
3.2.1 Hautpräparation für die Bestrahlung	14
3.2.2 Bestrahlungsprotokolle	15
3.3 CPD-Färbung	17
3.4 Apoptose-Färbung	18
3.5 Auswertung	18
4 Ergebnisse	19
4.1 Vorversuch „Dynamikbereich der Haut“	19
4.1.1 Induktion und Reparatur von DNA-Schäden, Dosis-Wirkungs-Beziehung	19
4.1.2 Schadensverteilung und CPD-Reparaturkapazität	24
4.1.3 Einfluss der Epidermis- und Hornschichtdicke sowie von Reteleisten	26
4.1.4 Induktion von Apoptose	29
4.2 Überprüfung des Bunsen-Roscoe-Gesetzes	31
4.2.1 CPD-Analyse, cw und gepulst	31
4.2.2 Schadensverteilung und Reparaturkapazität als Funktion der Strahlungsapplikation	34
4.2.3 Induktion von Apoptose	37
4.3 Impulsbetrieb	38
4.3.1 Induktion und Reparatur von DNA-Schäden	39
4.3.2 Einfluss der Spenderhaut-Morphologie	45
4.3.3 Induktion von Apoptose bei gepulster Exposition	46
5 Diskussion	48
6 Zusammenfassung	55

7	Ausblick	57
	Literaturverzeichnis	59
	Abkürzungsverzeichnis	62
	Anhang	63
Anhang 1	Dynamikbereich der Haut, Ergebnisse der einzelnen Proben	63
Anhang 2	Verifizierung des Bunsen-Roscoe-Gesetzes: Schadenslokalisation und Apoptose-Induktion, einzelne Proben	65
Anhang 3	Spenderhautspezifische Ergebnisse bei gepulster Bestrahlung	68
Anhang 4	Überprüfung auf eine Korrelation zwischen Probandenalter und Reparaturkapazität der Haut	74

Gepulste und kontinuierliche in vitro UV-Bestrahlung menschlicher Hautproben – Vergleich der biologischen Wirksamkeit

Kurzreferat

Biologische Effekte von gepulster inkohärenter UV-Strahlung wurden in Stanzbiopsien humaner Haut untersucht, um mögliche erhöhte gesundheitliche Risiken im Vergleich zu kontinuierlicher (cw) Bestrahlung zu identifizieren. Dafür wurden zunächst die Induktion und Lokalisation von DNA-Schäden in der Epidermis und deren Reparatur sowie die Apoptose nach ansteigenden Dosen kontinuierlicher UV-Strahlung betrachtet. Im Dosisbereich von $H = 0-1500 \text{ J/m}^2$ (ungewichtet) konnte ein linearer Dosis-Effekt der CPD-Induktion für cw UV-Bestrahlung nachgewiesen werden. Die DNA-Reparatur in den basalen Zellschichten war ausgeprägter als in den suprabasalen Schichten. Mit steigender Dosis nahm die Reparaturkapazität in der gesamten Epidermis ab und die Apoptoserate zu.

Bei der Validierung des Bunsen-Roscoe-Gesetzes zeigte sich eine begrenzte Anwendbarkeit, wenn dem betrachteten Endpunkt zelluläre Prozesse zugrunde lagen. Gültigkeit konnte für die CPD-Induktion bei $E = 0,3-3 \text{ W/m}^2$ und für die Apoptose bei $E = 1-3 \text{ W/m}^2$ nachgewiesen werden. Bei der DNA-Reparatur war das Reziprozitätsgesetz nicht gültig. Verstärkte Reparatur und Apoptose traten bei geringen Bestrahlungsstärken, langen Experimentdauern und steigender Anzahl an Impulsen auf. Es konnte kein Unterschied zwischen gepulster und cw inkohärenter UV-Exposition festgestellt werden, was für eine Anwendbarkeit des Akkumulationsprinzips spricht.

Abschließend wurde die biologische Wirkung von UV-Strahlung im Impulsbetrieb als Funktion von Impulsdauer und Impulswiederholfrequenz untersucht. Es konnte kein Einfluss dieser Impulsparameter auf die CPD-Induktion nachgewiesen werden und auch die DNA-Reparatur zeigte keine eindeutige Abhängigkeit. Kürzere Impulsdauern, hohe Impulsanzahlen, geringe Impulswiederholfrequenzen und lange Experimentdauern induzierten hingegen mehr Apoptose. Der Unterschied, dass Basalzellen besser reparieren als suprabasale Zellen, war nicht zu detektieren.

Die CPD-Induktionsdaten sprechen zunächst dafür, dass für gepulste Exposition mit inkohärenter UV-Strahlung am Arbeitsplatz kein neues Expositionsgrenzwertkonzept erstellt werden muss. Jedoch scheinen die Experimentdauer, die Bestrahlungsstärke und auch eine Variation der Impulsparameter wichtige Einflussfaktoren auf die Prozessierung von DNA-Schäden darzustellen. Zu berücksichtigen ist außerdem, dass nur ein kleiner Impulsdauer-Impulswiederholfrequenz-Bereich und auch nur wenige Bestrahlungsstärken untersucht wurden. Die durch diesen Bericht erhaltenen Hinweise müssen weiter überprüft sowie zusätzlich auch der Einfluss unterschiedlicher Bestrahlungsstärken bei variierenden Impulsparametern erforscht werden.

Schlagwörter:

inkohärente UV-Strahlung, in vitro Hautbestrahlung, biologische Wirksamkeit, Impulsdauer, Impulswiederholfrequenz, Schadensinduktion, Reparaturkapazität, Apoptoserate

Pulsed and continuous in vitro UV-irradiation of human skin samples – comparison of biological effectiveness

Abstract

Biological effects of pulsed incoherent UV-radiation were investigated in biopsies of human skin to identify possible increased health risks in comparison to continuous (cw) irradiation. First, the induction and localisation of DNA damage in the epidermis as well as DNA damage repair and apoptosis were analysed after application of increasing doses of continuous UV-exposure. The data showed a linear dose dependence of CPD induction between $H = 0-1500 \text{ J/m}^2$ (unweighted) for continuous UV-irradiation. Furthermore, a better DNA repair was observed in basal as compared to suprabasal cell layers. The repair capacity of all epidermal cells decreased with rising dose whereas apoptosis increased.

The validity of the Bunsen-Roscoe law could be shown for $E = 0.3-3 \text{ W/m}^2$ concerning CPD induction as well as for $E = 1-3 \text{ W/m}^2$ in terms of apoptosis, only, but not for DNA repair. Therefore, the reciprocity law does not apply for biological endpoints that are based on cellular processes. High repair rates and apoptosis occurred with low irradiances, long durations of experiment and increasing number of applied pulses. There were no differences between pulsed and continuous incoherent UV-irradiation indicating the applicability of the principle of accumulation.

Finally the biological damaging potential of pulsed UV-irradiation was investigated as a function of pulse duration and pulse repetition frequency. The results showed no effect of these pulse parameters on CPD induction and no distinct dependence on DNA repair. However, shorter pulses, lower pulse repetition frequencies, higher numbers of applied pulses as well as longer experiment times gave rise to high amounts of apoptotic cells. Stronger repair capacity of basal epidermal cells compared to suprabasal cells could not be found.

These data suggest no need for a new exposure limit value concept regarding exposure to pulsed incoherent UV-radiation at the workplace. However, the duration of the experiment, irradiance and a variation of pulse parameters seem to have a relevant impact on processing of DNA damage. It needs to be taken into consideration that only a small range of pulse duration, pulse repetition frequency and irradiance were investigated and therefore indications from these results have to be further verified. Additionally the impact of diverse irradiances with varying pulse parameters should be examined.

Key words:

incoherent UV-radiation, in vitro skin irradiation, biological effectiveness, pulse duration, pulse repetition frequency, damage induction, repair capacity, rate of apoptosis

1 Einleitung

In diesem Teilprojekt der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) sollte im Zuge der Untersuchung der UV-Strahlungsbelastung beim Schweißen die biologische Wirksamkeit von intermittierender und gepulster inkohärenter optischer Strahlung (IOS) in menschlicher Haut untersucht werden, da für eine Beurteilung dieser Exposition in Bezug auf den Arbeitsschutz der Kenntnisstand nur unzureichend ist. Expositionsgrenzwerte in der Arbeitsschutzverordnung zu künstlicher optischer Strahlung (OStrV) zum Schutz vor Gefährdungen durch UV-Expositionen beruhen bislang auf der biologischen Wirkung kontinuierlicher Strahlung. Aufgrund zunehmender Anwendungen gepulster Strahlung - bei Xenonblitzlampen beim Härten, Tempern oder bei der Desinfektion - besteht daher die Notwendigkeit, auch die biologische Wirksamkeit von gepulster und als Folge auch von intermittierender IOS tiefergehend zu erforschen.

Anhand dieser Untersuchungen sollte die Anwendbarkeit des Akkumulationsprinzips für gepulste inkohärente optische Strahlung in Verbindung mit dem Bunsen-Roscoe-Gesetz überprüft werden, um letztendlich zur Erstellung eines neuen Schutzkonzeptes beizutragen. Eine mögliche Übertragung von Expositionsgrenzwerten für gepulste Laserstrahlung auf gepulste IOS wird erst ab Impulsdauern von 18 μs notwendig und war nicht Gegenstand dieses Projektes, könnte jedoch in weiteren Untersuchungen mit kleineren Impulsdauern relevant werden. Versuche mit intermittierender inkohärenter optischer Strahlung waren aufgrund der technischen Limitierung der Strahlungsquelle nicht möglich. Außerdem ist es sinnvoller, die grundlegenden Untersuchungen mit wohldefinierter gepulster Strahlung durchzuführen.

Den ersten Projektteil stellte zunächst die Untersuchung des Dynamikbereichs der Haut bei kontinuierlicher Bestrahlung zur Validierung eines sensitiven Dosisbereichs dar. Die Bestimmung des Dosis-Effektes sollte durch Messung im Spektralbereich von 215-400 nm und somit ausschließlich mit UV-Strahlung durchgeführt werden. Die Bestimmung der Hautschädigung erfolgte durch Quantifizierung von Cyclobutanpyrimidindimeren (CPD), die aufgrund von UV-bedingten photochemischen Prozessen in der DNA (engl.: deoxyribonucleic acid) entstehen. Zudem wurde ein Vergleich mit weiteren photobiologischen Endpunkten wie der DNA-Reparatur und der Apoptose 24 h nach Bestrahlung vorgenommen. Für eine statistische Auswertung erfolgte der Vorversuch an vier verschiedenen Spenderhäuten, da unterschiedliche Hautdicken und die Morphologie Einfluss auf die Schädigung der Hautzellen haben. Nach dem Aufbau und der Inbetriebnahme der Bestrahlungseinheit wurde für den Vorversuch eine konstante Bestrahlungsstärke von $E = 3 \text{ W/m}^2$ mit variablen Expositionsdauern t und Dosen H (Kontrolle, 300, 600, 900, 1200, 1500 J/m^2) festgelegt.

Im Folgenden sollte sowohl mit kontinuierlicher als auch gepulster UV-Strahlung das Bunsen-Roscoe-Gesetz überprüft werden, welches besagt, dass zur Verursachung eines identischen photochemischen oder photobiologischen Effektes lediglich die Bestrahlung H bei variabler Bestrahlungsstärke E und Expositionsdauer t konstant sein muss. In diesem Zuge sollte auch eine mögliche Linearität zwischen Schädigung und Bestrahlungsstärke untersucht werden. Die Versuchsp Parameter ergaben sich aus den Ergebnissen des Vorversuchs (Dynamikbereich der Haut). Basierend hierauf wurde für die nächsten Untersuchungen des Projektes eine konstante Bestrahlung H von 900 J/m^2 mit variablen Bestrahlungsstärken E (Kontrolle; 0,125; 0,3;

1; 3 W/m²) festgelegt. Für die gepulste Bestrahlung wurden Impulsparameter von 10 ms Impulsdauer τ und eine Impulswiederholfrequenz f_p von 50 Hz ausgewählt. Die Untersuchungen wurden ebenfalls an vier unterschiedlichen Spenderhäuten durchgeführt.

Im Weiteren sollte als zentrale Fragestellung die biologische Effektivität von IOS im Impulsbetrieb bei variierender Impulsdauer τ (1, 5, 10 ms) und variierender Impulswiederholfrequenz f_p (50, 250, 500 Hz) untersucht werden. Die Bestrahlung erfolgte mit konstanter Bestrahlung $H = 900 \text{ J/m}^2$ bei einer konstanten Bestrahlungsstärke $E = 3 \text{ W/m}^2$, die sich ebenfalls aus den Ergebnissen des Vorversuchs und den Untersuchungen zum Bunsen-Roscoe-Gesetz ergaben. Erneut wurden vier verschiedene Spenderhäute untersucht.

Aus den Ergebnissen soll abgeleitet werden, ob der Einsatz gepulster UV-Strahlenquellen im Arbeitsbereich (z. B. Xenonblitzlampen beim Härten) zu einer, im Vergleich zu kontinuierlicher UV-Bestrahlung, höheren Schadensinduktion und/oder zu einer Beeinträchtigung der Schadensprozessierung in Hautzellen (verbunden mit einem erhöhten Hautkrebsrisiko) führt. Die Daten können so dazu beitragen, die Frage zu klären, ob zur Beurteilung gepulster UV-Strahlungsexposition am Arbeitsplatz ein neues Expositionsgrenzwertkonzept erstellt werden muss.

2 Theorie

Optische Strahlung im Wellenlängenbereich von 100 nm bis 400 nm wird als ultraviolette (UV)-Strahlung bezeichnet und in UVC (100-280 nm), UVB (280-315 nm) und UVA (315-400 nm) eingeteilt. Die natürliche Quelle von UV-Strahlung ist die Sonne. Das solare UV-Spektrum auf der Erde besteht zu ca. 5 % aus UVB-Strahlung und zu 95 % aus UVA-Strahlung. UVC-Strahlung kann die Ozonschicht nicht durchdringen. Künstliche UV-Quellen können jedoch zusätzlich zu UVA und UVB auch einen bedeutenden Anteil an UVC aufweisen. Eine Vielzahl epidemiologischer Studien belegt den Zusammenhang von UV-Exposition (solare und UV-Strahlung aus künstlichen Quellen) und der Entstehung von Hautkrebs (malignes Melanom (MM), Basalzellkarzinom (BCC) und Plattenepithelkarzinom (SCC)), z. B. (LUCAS2015; IARC2007). Darüber hinaus gibt es zahlreiche Hinweise auf molekularbiologischer Ebene. So werden UV-spezifische „signature mutations“, die auf UV-induzierte DNA-Schäden (Cyclobutanpyrimidindimere, CPD) zurückgeführt werden können, sehr häufig in Hauttumoren nachgewiesen (ASZTERBAUM1999; BENJAMIN2007; DE GRUIJL2001; PLEASANCE2010). Im Jahr 2009 klassifizierte die WHO deshalb UV-Strahlung im gesamten Spektrum von 100 bis 400 nm als „karzinogen für den Menschen“ (EL GHISSASSI2009).

Wie epidemiologische Untersuchungen zeigten, hängt das Risiko an Hautkrebs zu erkranken neben anderen Faktoren auch vom Expositionsmuster ab. Während für das MM eine intermittierende UV-Exposition (z. B. über Wochen oder Monate) das Risiko erhöht, spielen für das BCC sowohl die intermittierende Exposition als auch die kumulative Lebenszeitdosis eine Rolle. Für das SCC steigt das Risiko mit der kumulativen Lebenszeitdosis (ARMSTRONG2001). Auch in vitro Versuche zeigen, dass das Expositionsmuster (z. B. akut vs. chronisch, hohe vs. niedrige Bestrahlungsstärke) einen Einfluss auf photobiologische Reaktionen haben kann, z. B. (WISCHERMANN2008; VAN DE GLIND2016; DE GRUIJL1983; FORBES1981). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Reziprozitätsregel, welche besagt, dass bei variabler Bestrahlungsstärke und Expositionsdauer lediglich die Dosis das Ausmaß des photochemischen Effektes bestimmt, nicht immer gültig ist, siehe auch (SCHINDL2001). Dies trifft insbesondere auf UV-induzierte Endpunkte zu, denen zelluläre Prozesse zugrunde liegen, welche dem initialen UV-Schaden nachgeschaltet sind (wie z. B. Apoptose- und Mutationsinduktion).

Im Vergleich zu den hier aufgeführten Untersuchungen, einschließlich der epidemiologischen Daten, die sich auf die natürliche UV-Exposition (mit dem solaren UV-Spektrum und einer maximalen, Erythem-gewichteten Bestrahlungsstärke von $0,3 \text{ W/m}^2$ am Äquator) beziehen, sind die Bedingungen der Exposition mit gepulster bzw. intermittierender inkohärenter optischer Strahlung neuer Quellen sehr unterschiedlich in Bezug auf Bestrahlungsstärke und Expositionsmuster.

Ein geeigneter Endpunkt für die Untersuchung der biologischen Wirksamkeit von gepulster inkohärenter UV-Strahlung, ist der Nachweis von Cyclobutanpyrimidindimeren. Zum einen beruht deren Induktion direkt auf photochemischen Prozessen, zum anderen handelt es sich nach heutigem Wissensstand um den DNA-Schaden, dessen Fehlreparatur zu (UV-Signature-) Mutationen führt, die schließlich die Grundlage für die Entstehung von Hautkrebs bilden (BRASH2015; IKEHATA2011; MELNIKOVA2005).

Während das maligne Melanom entartete Melanozyten oder deren Vorläuferzellen zur Grundlage hat, ist nicht abschließend geklärt, welche epidermalen Zellen bei der UV-induzierten Karzinogenese der hellen Hautkrebse (BCC, SCC) eine Rolle spielen. Allerdings gibt es viele Hinweise darauf, dass epidermale Stammzellen (interfollikulär oder follikulär) Zielzellen für die karzinogene Wirkung von UV-Strahlung sind, z. B. (BLANPAIN2013; BOEHNKE2012). Diese Zellen sind, wie auch Melanozyten (oder deren Vorläufer), in der Basalzellschicht der Epidermis oder noch tiefer in der Dermis am Haarfollikel (bulge region) lokalisiert. Es ist deshalb wichtig, die Eindringtiefe der UV-Strahlung (sowie auch von IR und sichtbarem Licht) zu berücksichtigen.

Die Eindringtiefe von UV-Strahlung in die Haut ist von der Wellenlänge abhängig und wird vom Absorptionsverhalten von Chromophoren und der Reflexion im Gewebe beeinflusst. Die Dicke der Haut und der einzelnen Hautschichten ist sehr variabel und hängt unter anderem von der Lokalisation der betrachteten Hautareale ab. Die in-vivo-Transmission kann für die verschiedenen Hautschichten deshalb immer nur als Annäherung angegeben werden. Die Eindringtiefe im UV-Spektralbereich steigt mit steigender Wellenlänge. Bei 250 nm (UVC) werden etwa 82 % der Strahlung in den ersten 20 µm absorbiert. Bei UVB-Strahlung mit 297 nm werden etwa 90 % der Strahlung in den ersten 40 µm absorbiert. UVA-Strahlung mit 365 nm durchdringt zu mehr als 20 % die Epidermis. Im Übergangsbereich zwischen UVA und sichtbarem Licht erreichen ca. 60 % der Strahlung die Cutis (Oberhaut + Lederhaut). Noch etwa 1 % erreicht die Subcutis (Unterhaut) (BRULS1984).

Um diese Bedingungen zu berücksichtigen, ist es sinnvoll, die Untersuchungen in Hautbiopsien durchzuführen. In den nach der Bestrahlung angefertigten Hautschnitten können die induzierten Schäden immunhistologisch nachgewiesen und mit Hilfe digitaler Bildverarbeitung zellschicht-spezifisch quantifiziert werden. Da Hautbiopsien 1-2 Tage stabil kultiviert werden können, ist es möglich, andere Endpunkte, wie z. B. DNA-Reparatur oder das Auftreten apoptotischer Zellen, ebenfalls unter Einsatz immunhistologischer Methoden, zu untersuchen. Dies schafft die Grundlage dafür, den Einfluss gepulster inkohärenter optischer Strahlung sowohl auf photochemische als auch photobiologische Prozesse zu untersuchen, die in Zusammenhang mit der Entstehung von Hautkrebs stehen.

2.1 Aufbau der menschlichen Haut

Die Haut ist mit einer Fläche von ca. 2 m² das größte Organ des Menschen. Sie besteht aus mehreren unterschiedlichen Zelltypen und nimmt eine Vielzahl physiologischer Aufgaben wahr, wie z. B. die Homöostase des Wasserhaushaltes, Stoffwechselfunktionen durch die Vitamin D-Synthese und die Thermoregulation. Zudem stellt die Haut eine physikalische Barriere zum Schutz vor mechanischen, chemischen, physikalischen, thermischen und mikrobiellen Umwelteinflüssen dar und fungiert als bedeutendes peripheres Sinnesorgan, da sie Schmerz-, Wärme- und Tastreizrezeptoren besitzt. Zudem vermittelt die Haut immunstimulatorische Effekte durch antigen-präsentierende Zellen in der Epidermis. Aufgebaut ist die Haut von außen nach innen aus drei Schichten: der Epidermis (Oberhaut), Dermis (Korium, Lederhaut) und Subcutis (Unterhaut). Integrale Bestandteile sind zudem Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen, die bis in die Dermis reichen. In Abb. 2.1 ist ein schematischer Aufbau der Haut mit den unterschiedlichen Hautschichten dargestellt.

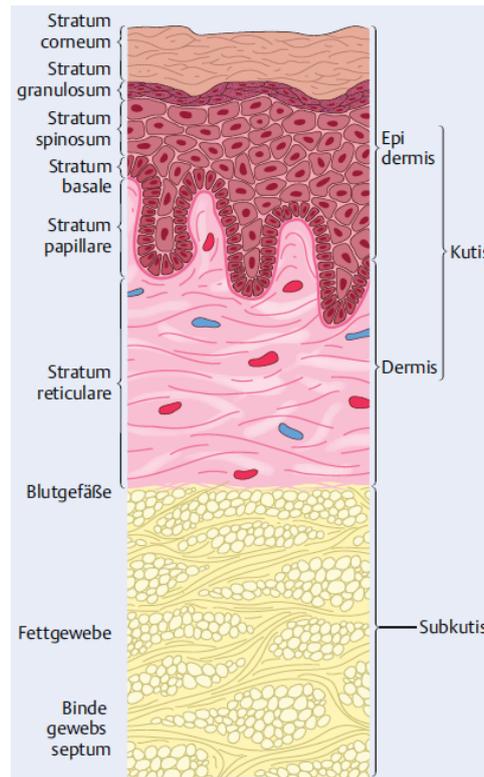


Abb. 2.1 Aufbau der menschlichen Haut (modifiziert nach MOLL2010).

Die Epidermis stellt die äußere Abdeckung des Körpers und die Abgrenzung zur Umwelt dar. Sie ist charakterisiert als ein mehrschichtiges, nach oben verhornendes Plattenepithel von 30-300 µm Dicke und ist ein klassisches Proliferationsgewebe, da sie sich ständig erneuert. Die Epidermis besteht hauptsächlich aus Keratinozyten (90-95 %). Diese sind unterschiedlich differenziert und bilden die verschiedenen epidermalen Schichten, die durch unterschiedliche Keratinproteine charakterisiert sind: Stratum corneum (Hornschicht), Stratum granulosum (Körnerzellschicht), Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und Stratum basale (Basalzellschicht). Keratinozyten werden aus epidermalen Stammzellen gebildet, welche in der Basalzellschicht lokalisiert sind. Es findet eine permanente Zellwanderung von basal nach superfizial statt, während der die Keratinozyten verschiedene Differenzierungsschritte bis zum Korneozyten (Hornzelle) durchlaufen. Die abgeflachten, kernlosen Korneozyten bilden schlussendlich die Hornschicht. So erneuert sich die Epidermis im Laufe von vier Wochen einmal komplett.

In der Basalzellschicht befinden sich neben den epidermalen Stammzellen auch Langerhanszellen, Merkelzellen und Melanozyten. Die Langerhanszellen fungieren als dendritische Zellen der Immunabwehr. Merkelzellen sind mit Nervenzellen assoziiert und dienen dem Tastsinn. Melanozyten bilden induziert durch UV-Strahlung Melanin, welches in Melanosomen (Pigmentkörperchen) gespeichert wird. In dieser Form wird es über Dendriten an die umliegenden Keratinozyten abgegeben, um deren Zellkerne gelagert und bildet so einen Schutz vor UV-Strahlung.

Bei der Dermis handelt es sich um das Bindegewebe unter der Epidermis, das hauptsächlich aus Fibroblasten besteht, welche die Kollagenfasern und Strukturproteine synthetisieren. Sie unterteilt sich in das fein strukturierte Stratum papillare (papilläre Dermis) und das grob strukturierte Stratum reticulare (retikuläre Dermis). Unter

der Dermis liegt die Subkutis. Diese Schicht ist funktionell mit der Haut verbunden, zählt aber im eigentlichen Sinne nicht dazu. Sie besteht größtenteils aus subkutanem Fettgewebe und lockerem Bindegewebe und beinhaltet größere Blutgefäße zur Versorgung der darüber liegenden Hautschichten. Das Fettgewebe dient als Druckpolster oder als Energiespeicher und Wärmeisolator (MOLL2010; LÜLLMANN-RAUCH2006).

3 Methoden

3.1 Bestrahlungsaufbau

Die von einer 450 W Xenonlampe emittierte Strahlung tritt zuerst durch einen Kollimator, um parallele Strahlung zu erzeugen. Ein Kaltlichtspiegel sowie ein optischer Bandpassfilter (UG5) filtern einen Großteil des sichtbaren Lichtes und der IR-Strahlung heraus. Der Kaltlichtspiegel wird mithilfe eines Ventilators gekühlt, um eine Überhitzung zu vermeiden. Anschließend erfolgt eine Begrenzung des Strahlenbündels durch eine auf eine konstante Größe eingestellte Blende und die Strahlung wird mit Hilfe einer UV-optimierten Linse in eine Ulbricht-Kugel fokussiert. Aus der Ulbricht-Kugel tritt homogene Strahlung aus, die letztendlich auf die biologische Probe trifft. Vor der Ulbricht-Kugel ist ein mechanischer Chopper mit rotierenden Frequenzscheiben zur Erzeugung von Rechteckpulsen angebracht. Bei kontinuierlicher Bestrahlung wird die Frequenzscheibe fixiert. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Eine zusätzliche Abdeckung der gesamten Bestrahlungsvorrichtung dient dazu, die Probe von restlichem Streulicht abzuschirmen.

Abhängig von der Anzahl N an Schlitzen der Frequenzscheibe sowie ihrer Drehgeschwindigkeit besteht ein reziprok proportionaler Zusammenhang zwischen der Impulsdauer τ und der Impulswiederholfrequenz f_P (siehe Gleichung 3.1).

$$\tau(\text{ms}) = 25 \cdot N \cdot f_P^{-1} \quad (3.1)$$

Es standen sechs verschiedenen Frequenzscheiben ($N = 1, 2, 5, 10, 15, 20$) zur Verfügung. Aufgrund der maximal zulässigen Experimentdauer t von 4 h und des Umfangs der Bestrahlungen wurden in den vorliegenden Untersuchungen lediglich die Frequenzscheiben mit 2, 10 und 20 Schlitzen verwendet.

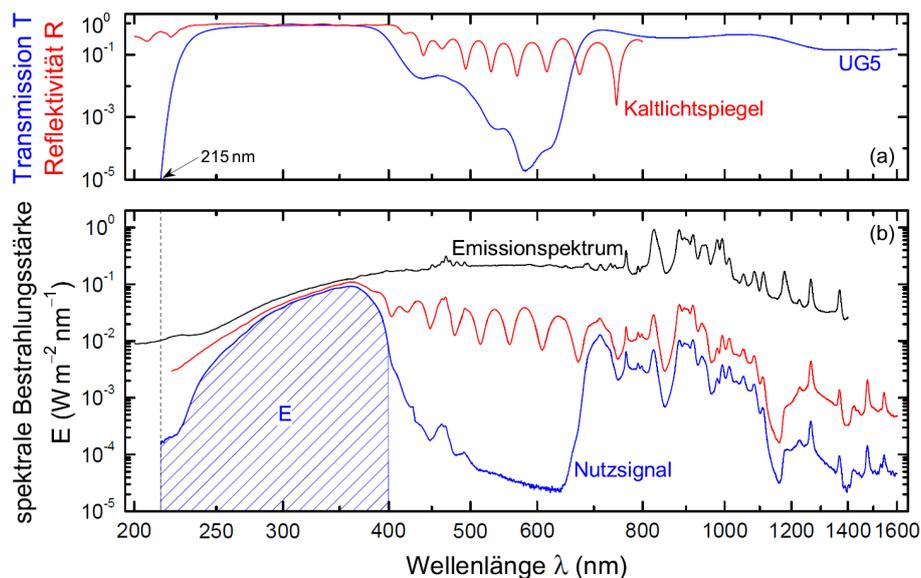


Abb. 3.2 Spektrale Transmission T und Reflektivität R des UG5-Filters bzw. des Kaltlichtspiegels (a) und spektraler Verlauf der Bestrahlungsstärke $E(\lambda)$ mit Integral (schraffierte Fläche) des für die Dosimetrie verwendeten UV-Anteils (b) im Wellenlängenbereich zwischen 200 und 1600 nm.

Die von der Xenonlampe emittierte spektrale Bestrahlungsstärke, das Transmissions- bzw. Reflektivitätsspektrum des UG5-Bandpassfilters und des Kaltlichtspiegels sowie das letztendliche Nutzsignal $E(\lambda)$ zur Bestrahlung der Proben sind in Abb. 3.2 dargestellt. Das genutzte Spektrum weist einen großen Anteil UV-Strahlung auf. Sichtbare Strahlung ist kaum vorhanden und die IR-Strahlung ist deutlich reduziert.

3.2 UV-Bestrahlung

3.2.1 Hautpräparation für die Bestrahlung

Für die Untersuchungen wurden für eine weitere Befundung nicht benötigte Hautproben aus chirurgischen Eingriffen eingesetzt, die normalerweise nicht der Sonne ausgesetzt sind (z. B. Leiste, Axilla). Das Fettgewebe der Hautpräparate wurde abgetrennt und Stanzbiopsien mit einem Durchmesser von 8 mm angefertigt. Die Kultivierung der Hautbiopsien erfolgte jeweils in 1 ml DMEM-Nährmedium in Petrischalen (Durchmesser 35 mm) bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Bestrahlung wurde direkt nach der Präparation der Biopsien, spätestens jedoch am folgenden Tag durchgeführt. Tab. 3.1 enthält eine Übersicht über die Herkunft der verwendeten Spenderhäute.

Tab. 3.1 Herkunft der Spenderhäute.

Spenderhaut (interne Laufnr./Jahr)	Herkunft	Probandenalter in Jahren	Projektabschnitt
30/17	Brust	35	Vorversuch (Dynamikbereich der Haut)
31/17	Axilla	61	
32/17	Axilla	70	
33/17	Leiste	88	
50/17	Axilla	63	Bunsen-Roscoe-Gesetz (kontinuierliche vs. gepulste Bestrahlung)
1/18	Axilla	46	
3/18	Schulter/Rücken	61	
5/18	Axilla	48	
13/18	Axilla	55	Impulsbetrieb
14/18	Leiste	57	
17/18	Axilla	54	
18/18	Leiste	64	

Mit dem Hautmaterial eines Spenders wurde jeweils die vollständige Versuchsreihe des jeweiligen Projektabschnittes durchgeführt und immer auch eine unbestrahlte Hautprobe als Kontrolle mitgeführt. Trotz möglicher interindividueller Varianzen, die bei der viermaligen Wiederholung jeder Versuchsreihe mit unterschiedlichen Spendern zu erwarten sind, können so Unterschiede in den Effekten der angewendeten Expositionsmuster identifiziert werden.

3.2.2 Bestrahlungsprotokolle

Die verwendete Bestrahlungsvorrichtung wurde von der BAuA konzeptioniert, entwickelt und getestet und anschließend im Labor für Molekulare Zellbiologie des Elbeklinikums Buxtehude aufgebaut. Sie verfügt über die Möglichkeit, auch gepulste Strahlung zu emittieren. Ein Kaltlichtspiegel und ein UG5-Filter dienten dazu, Strahlung unerwünschter Wellenlängen herauszufiltern und mögliche Synergieeffekte durch sichtbare oder infrarote Strahlung größtenteils auszuschließen.

Für die Bestrahlung wurden die Petrischalen mit den Hautstanzen im Dunklen zur Bestrahlungsquelle transportiert und in Nährmedium entsprechend der Bestrahlungsparameter bestrahlt. Die Kontrollen wurden auf die gleiche Weise wie die Bestrahlungsproben präpariert, jedoch lediglich für die Dauer der jeweiligen Bestrahlung im Dunkeln belassen. Die Petrischale mit der zu bestrahlenden Hautbiopsie verblieb für die entsprechende Dauer der Bestrahlung ohne Deckel mittig auf dem Proben-tisch unter der aus der Ulbricht-Kugel austretenden Strahlung. Für eine gepulste Bestrahlung war der Motor der Frequenzscheibe auf die entsprechende Geschwindigkeit eingestellt. Die Regulierung der benötigten Bestrahlungsstärken erfolgte durch Einstellung des Proben-tisches auf festgelegte Höhen (siehe Tab. 3.3). Die Dauer und die hieraus resultierenden Dosen der einzelnen Bestrahlungen sind in den Bestrahlungsprotokollen in den Tab. 3.2 - Tab. 3.4 aufgeführt.

Der OStrV-Expositionsgrenzwert von $H_{\text{eff}} = 30 \text{ J/m}^2$ für den UV-Spektralbereich (spektral gewichtet mit der Wichtungsfunktion $S(\lambda)$) diene als Ausgangspunkt für die verwendeten Bestrahlungsstärken und liegt um das etwa 5-fache unter dem Schwellenwert für eine minimale biologische Schädigung. Um eine deutliche Schädigung zu induzieren, wurde dementsprechend für den Vorversuch (Dynamikbereich der Haut) eine maximale Bestrahlung von $H_{\text{eff}} = 150 \text{ J/m}^2$, entspricht ungewichtet einem radiometrischen Wert von $H = 1500 \text{ J/m}^2$, festgelegt. Um zudem auf jeden Fall eine extreme Schädigung zu induzieren, ist das Bestrahlungsprotokoll (Tab. 3.2) um den Wert $H = 3000 \text{ J/m}^2$ erweitert worden. Die Bestrahlungsstärke E betrug konstant 3 W/m^2 .

Tab. 3.2 Bestrahlungsprotokoll des Vorversuchs „Dynamikbereich der Haut“.

Bestrahlungsstärke E	Dosis H	Bestrahlungsdauer t	Reparaturzeit nach der Bestrahlung
3 W/m ²	300 J/m ²	01:40 min	0 h / 24 h
	600 J/m ²	03:20 min	
	900 J/m ²	05:00 min	
	1200 J/m ²	06:40 min	
	1500 J/m ²	08:20 min	
	3000 J/m ²	16:40 min	

Auf Grundlage der Ergebnisse des Vorversuchs wurde für die anschließende Untersuchung des Bunsen-Roscoe-Gesetzes bei kontinuierlicher vs. gepulster Bestrahlung eine konstante Dosis H von 900 J/m² ausgewählt, da bei dieser Dosis sowohl eine weitere Erhöhung als auch eine Verringerung der CPD-Induktion mit der genutzten Färbemethode nachgewiesen werden könnten. Es wurden vier unterschiedliche Bestrahlungsstärken ausgewählt, wobei die minimale Bestrahlungsstärke anhand der höchstmöglichen Experimentdauer von 4 h bei gepulster Applikation und unter Berücksichtigung der Einschränkung der möglichen Abstände der Probe zur Ulbricht-Kugel durch den Aufbau der Bestrahlungsquelle festgelegt wurde (Tab. 3.3). Für die gepulste Bestrahlung mit einer Impulsdauer $\tau = 10$ ms und einer Impulswiederholfrequenz $f_p = 50$ Hz diente die Frequenzscheibe mit 20 Schlitzen. Hierdurch verdoppelte sich die Experimentdauer bei gepulster im Vergleich zu der kontinuierlichen Bestrahlung.

Tab. 3.3 Bestrahlungsprotokoll des Projektabschnitts „Bunsen-Roscoe-Gesetz“.

Dosis H	Bestrahlungsstärke E	Abstand d der Probe zur Ulbricht-Kugel	Bestrahlungsdauer t (cw)	Experimentdauer t (pulse)	Reparaturzeit nach der Bestrahlung
900 J/m ²	0,125 W/m ²	13,2 cm	02:00:00 h	04:00:00 h	0 h / 24 h
	0,3 W/m ²	9,0 cm	50:00 min	01:40:00 h	
	1 W/m ²	5,0 cm	15:00 min	30:00 min	
	3 W/m ²	2,6 cm	05:00 min	10:00 min	

Für den Impulsbetrieb wurden wiederum 900 J/m² als konstante Bestrahlung H sowie 3 W/m² als konstante Bestrahlungsstärke E festgelegt. Die Variation der Impulsparameter erfolgte mit drei verschiedenen Impulswiederholfrequenzen f_p (50, 250, 500 Hz) und zwei unterschiedlichen Impulsdauern τ (1, 5 ms), sodass mit den Parametern (50 Hz, 10 ms) aus dem vorangegangenen Bunsen-Roscoe-Versuchsteil im Pro-

jekt beide Impulsparameter dreimal variiert wurden (Tab. 3.4). Ab der dritten Spenderhaut schloss das Bestrahlungsprotokoll ebenfalls die Parameter (50 Hz, 10 ms) ein, um die Versuchsreihe mit den verschiedenen Impulsparametern komplett an einer Spenderhaut durchzuführen und besser vergleichen zu können. Die effektive Bestrahlungsdauer betrug für alle Proben 5 min.

Tab. 3.4 Bestrahlungsprotokoll für den Impulsbetrieb.

Dosis H	Bestrahlungsstärke E	Impuls wiederholfrequenz f_P	Impulsdauer τ	Schlitzanzahl N	Experimentdauer t	Reparaturzeit nach der Bestrahlung
900 J/m ²	3 W/m ²	50 Hz	1 ms	2	01:40:00 h	0 h / 24 h
		50 Hz	5 ms	10	20:00 min	
		50 Hz	10 ms	20	10:00 min	
		250 Hz	1 ms	10	20:00 min	
		500 Hz	1 ms	20	10:00 min	

Nach jeder Bestrahlung wurden die Hautbiopsien geteilt, eine Hälfte unmittelbar in Stickstoff eingefroren und die zweite Hälfte der Biopsie nach 24-stündiger Reparaturzeit/Kultivierung in 1 ml Kulturmedium (die Hautoberfläche nicht von Medium bedeckt) bei 37 °C und 5 %-iger CO₂-Konzentration anschließend ebenfalls in Stickstoff tiefgefroren. Die aus den gefrorenen Proben angefertigten 5 µm dicken Hautschnitte wurden bei -20 °C gelagert und schließlich den verschiedenen Endpunkten entsprechend immunhistologisch angefärbt und ausgewertet.

3.3 CPD-Färbung

Der Nachweis der Induktion sowie Reparatur von Cyclobutanpyrimidindimeren erfolgte mit einem monoklonalen anti-CPD-Antikörper. Hierzu wurden 5 µm dicke Hautschnitte zunächst für 10 Minuten in 1,6 % Formaldehyd fixiert, die Membran der Hautzellen 5 Minuten mit 0,5 % Triton X-100 in PBS auf Eis permeabilisiert, anschließend die DNA für 30 Minuten in 2M Salzsäure denaturiert und unspezifische Bindestellen mit 20 % FKS in PBS bei 37 °C für 20 Minuten blockiert. Die Inkubation des Anti-CPD-Antikörpers (TDM-2, Cosmo Bio Co., LTD, 1:500) erfolgte über Nacht bei 4 °C, die des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers (Goat Anti-Mouse Alexa 488, 4 µg/ml, Invitrogen) für eine Stunde bei 37 °C.

Unmittelbar nach der Färbung wurde die Fluoreszenz der Keratinozytenkerne bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm unter dem Mikroskop betrachtet und in Fotos dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mithilfe digitaler Bildverarbeitung (ImageJ, National Institutes of Health USA) mit einem ImageJ-Macro. Hierbei wurde die Basalzellschicht zusammen mit der darüber liegenden Zellschicht abgegrenzt von den restlichen suprabasalen Zellschichten der Epidermis betrachtet und jeweils die middle-

re Fluoreszenz von mindestens 500 Zellkernen für jede Hautprobe bestimmt. Der Fluoreszenzwert der unbestrahlten Kontrolle (Hintergrund) wurde von den Ergebnissen der bestrahlten Proben abgezogen.

3.4 Apoptose-Färbung

Zur Detektion von apoptotischen Zellen nach Bestrahlung diente eine Immunfluoreszenzfärbung des Apoptosemarkers aktive Caspase-3. Hautschnitte mit einer Dicke von 5 µm wurden 15 Minuten in 3 % Formaldehyd fixiert, 10 Minuten in 1 % Triton X-100 in TBS permeabilisiert und 1 Stunde mit 5 % BSA/0,5 % Triton X-100 in TBS abgesättigt. Der Primärantikörper (Anti-cleaved Caspase-3, Cell Signaling Technology, 1:500) inkubierte bei 4 °C über Nacht, der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (Goat Anti-Rabbit Alexa 594, 4 µg/ml, Invitrogen) für eine Stunde bei 37 °C.

In den gefärbten Hautpräparaten wurde unter dem Mikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 594 nm die Anzahl der apoptotischen Zellen pro Sichtfeld in drei Hautschnitten bestimmt. Zudem wurde anhand von aufgenommenen Bildern der jeweiligen Hautprobe mithilfe digitaler Bildverarbeitung (ImageJ, National Institutes of Health USA) die Dicke der Epidermis und der Hornschicht jeweils an drei unterschiedlichen Stellen pro Bild vermessen und die ermittelte Anzahl apoptotischer Zellen pro Sichtfeld auf die mittlere Epidermisdicke in mm (abzüglich der Hornschichtdicke) bezogen, um morphologische Unterschiede zwischen den Hautproben zu berücksichtigen. Der Apoptosewert der unbestrahlten Kontrolle wurde von den Ergebnissen der bestrahlten Proben abgezogen. In den letzten beiden Projektteilen (Bunsen-Roscoe-Gesetz, Impulsbetrieb) erfolgte eine Normierung der Apoptose-Ergebnisse auf den Maximalwert der jeweiligen Spenderhaut, um Unterschiede durch interindividuelle Einflüsse zu minimieren.

3.5 Auswertung

Die Auswertung und Graphenerstellung erfolgte mit dem Softwareprogramm Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA). Die Ergebnisse der Analyse der CPD- und Apoptose-Färbung nach Bestrahlung wurden nach viermaliger Durchführung (jeweils vier Spenderhäute pro Projektabschnitt) als Mittelwerte mit Standardabweichung abzüglich der Kontrolle angegeben. Die gemessenen Epidermis- und Hornschichtdicken der verschiedenen Spenderhäute sind in der Boxplot-Darstellung gezeigt.

4 Ergebnisse

Vor der Untersuchung der Effekte gepulster Bestrahlung auf die Haut, war es zunächst essentiell, deren Dynamikbereich zu bestimmen, um zu wissen, welche Dosen H messbare Effekte induzieren. Für die Analyse des Dynamikbereichs der Haut war die Bestrahlung von 28 Biopsien (inklusive Kontrollen) notwendig. Da alle Biopsien geteilt wurden, um neben der Schadensinduktion auch den Einfluss des Expositionsmusters auf zelluläre Prozesse wie Reparatur und Apoptose bestimmen zu können, mussten von insgesamt 56 Hautstücken Schnittpräparate angefertigt werden. Diese wurden entsprechend der zu untersuchenden Endpunkte (Induktion/Reparatur von CPDs und Apoptose) angefärbt und ausgewertet. Für jedes Hautstück wurde pro Endpunkt ein Objektträger mit drei Schnittpräparaten immunhistochemisch gefärbt, wobei die Hautschnitte aus unterschiedlichen Schnittebenen der Biopsie stammten und nicht direkt aufeinander folgten, um Zellen aus verschiedenen Ebenen der Hautprobe auszuwerten.

Bei der Untersuchung des Bunsen-Roscoe-Gesetzes und dem Projektabschnitt des Impulsbetriebs wurde ebenso verfahren. Hierzu wurden 36 Biopsien bestrahlt und nach Teilung der Biopsien entsprechend 72 Hautstücke geschnitten und ausgewertet (Bunsen-Roscoe-Gesetz) beziehungsweise 22 Biopsien bestrahlt und anschließend 44 Hautstücke geschnitten und ausgewertet (Impulsbetrieb).

4.1 Vorversuch „Dynamikbereich der Haut“

4.1.1 Induktion und Reparatur von DNA-Schäden, Dosis-Wirkungs-Beziehung

Zunächst wurde die Schadensverteilung in der Haut nach UV-Bestrahlung analysiert, um anhand dieser Ergebnisse eine geeignete Dosis für die folgenden Bestrahlungsversuche mit gepulster Strahlung zu ermitteln. Hierfür wurde Haut von vier verschiedenen Spendern bestrahlt und ausgewertet. Interindividuelle Unterschiede und der Einfluss unterschiedlicher Hautdicken konnten somit dargestellt werden. Von jeder der 56 CPD-gefärbten Hautproben wurden, je nach Dicke der Epidermis, jeweils 10-20 Bilder ausgewertet, um die Fluoreszenz von mindestens 500 Basalzellen sowie mindestens 500 suprabasalen Hautzellen pro Probe zu quantifizieren. Insgesamt wurden somit bei der CPD-Färbung im Vorversuch rund 850 Bilder und über 56000 Zellkerne ausgewertet. In Abb. 4.3 sind exemplarisch DAPI- und CPD-gefärbte Hautschnitte null und 24 Stunden nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen aufgeführt.

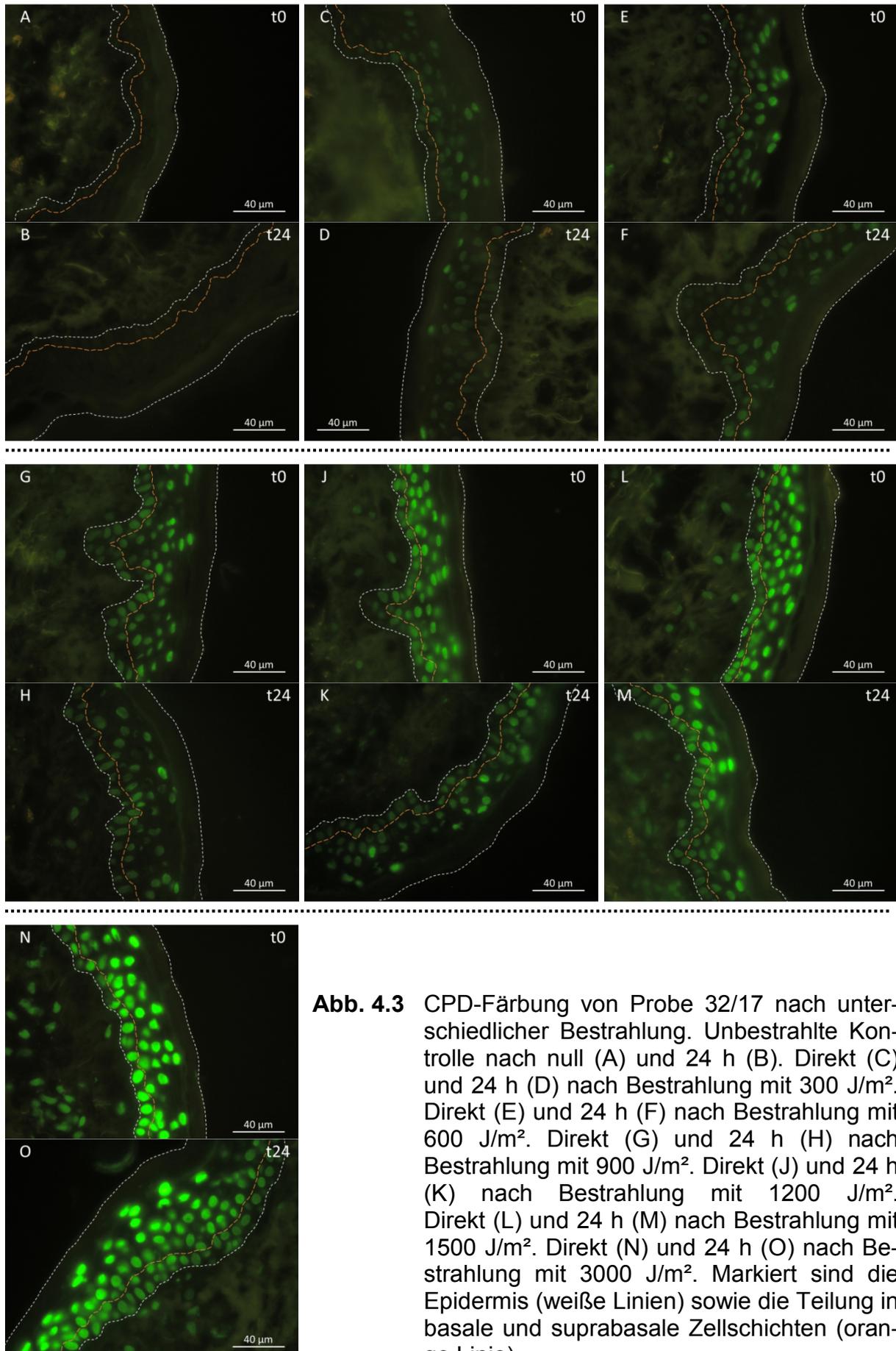


Abb. 4.3 CPD-Färbung von Probe 32/17 nach unterschiedlicher Bestrahlung. Unbestrahlte Kontrolle nach null (A) und 24 h (B). Direkt (C) und 24 h (D) nach Bestrahlung mit 300 J/m². Direkt (E) und 24 h (F) nach Bestrahlung mit 600 J/m². Direkt (G) und 24 h (H) nach Bestrahlung mit 900 J/m². Direkt (J) und 24 h (K) nach Bestrahlung mit 1200 J/m². Direkt (L) und 24 h (M) nach Bestrahlung mit 1500 J/m². Direkt (N) und 24 h (O) nach Bestrahlung mit 3000 J/m². Markiert sind die Epidermis (weiße Linien) sowie die Teilung in basale und suprabasale Zellschichten (orange Linie).

Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Schadensinduktion der oberen im Vergleich zu den unteren epidermalen Zellschichten, weshalb die Auswertung zellschichtspezifisch vorgenommen wurde. Die Basalzellschicht und gegebenenfalls auch die nächste darüber liegende Schicht (im Folgenden als *basal* bezeichnet) wurden abgegrenzt von den suprabasalen Zellschichten betrachtet und jeweils mindestens 500 Zellen pro Schicht anhand ihrer Fluoreszenz quantifiziert. Abb. 4.4 zeigt die Auswertung der CPD-Färbung über die gesamte Epidermis, gemittelt aus den Ergebnissen der vier Spenderhäute 30/17, 31/17, 32/17 und 33/17 abzüglich der unbestrahlten Kontrolle.

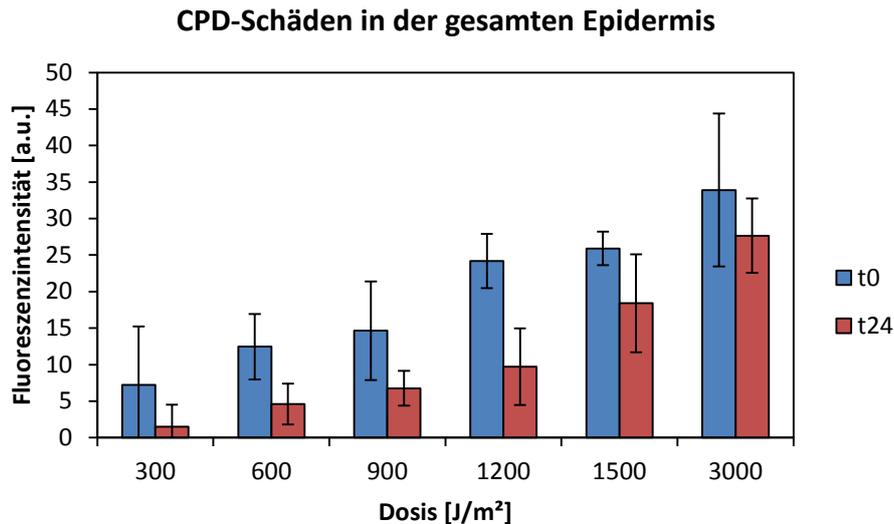


Abb. 4.4 Quantifizierung der CPDs nach Bestrahlung und nach einer Reparaturzeit von 24 h in der gesamten Epidermis.

Die Bilder der CPD-Färbung und auch Abb. 4.4 zeigen anschaulich, dass mit steigender Bestrahlung die Anzahl an DNA-Schäden in der Epidermis zunahm. Nach 24 h wurde ein Reparaturreffekt durch eine verringerte Fluoreszenz im Vergleich zur Färbung zum Zeitpunkt $t = 0$ deutlich. In Abb. 4.5 ist die CPD-Fluoreszenzintensität direkt nach Bestrahlung als Funktion der Dosis dargestellt. Bis zu einer Dosis von 1500 J/m² war ein linearer Dosis-effekt bei der CPD-Induktion eindeutig vorhanden, bei 3000 J/m² schien eine Sättigung einzusetzen, die jedoch auch färbebedingt sein konnte.

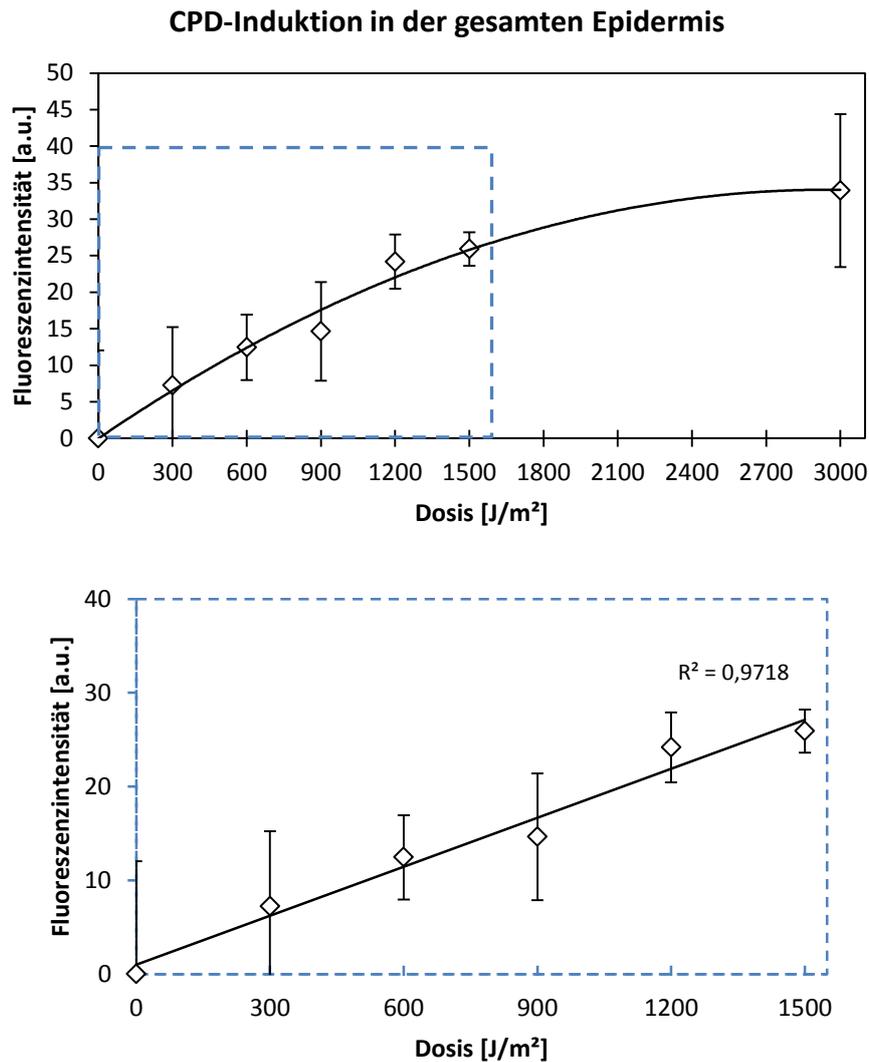


Abb. 4.5 Dosis-Effekt der CPD-Induktion. Lineare Anpassung mit least square fit (b). R^2 = Bestimmtheitsmaß zur Beurteilung der Anpassungsgüte der Regression.

Zellschichtspezifisch ausgewertet ergaben sich die in Abb. 4.6 dargestellten Ergebnisse.

Eine detaillierte Auftragung der basalen (Anh. 1, Abb. 1) und suprabasalen (Anh. 1, Abb. 2) Schadensquantifizierung spezifisch für jede einzelne Spenderhaut ist dem Anhang zu entnehmen.

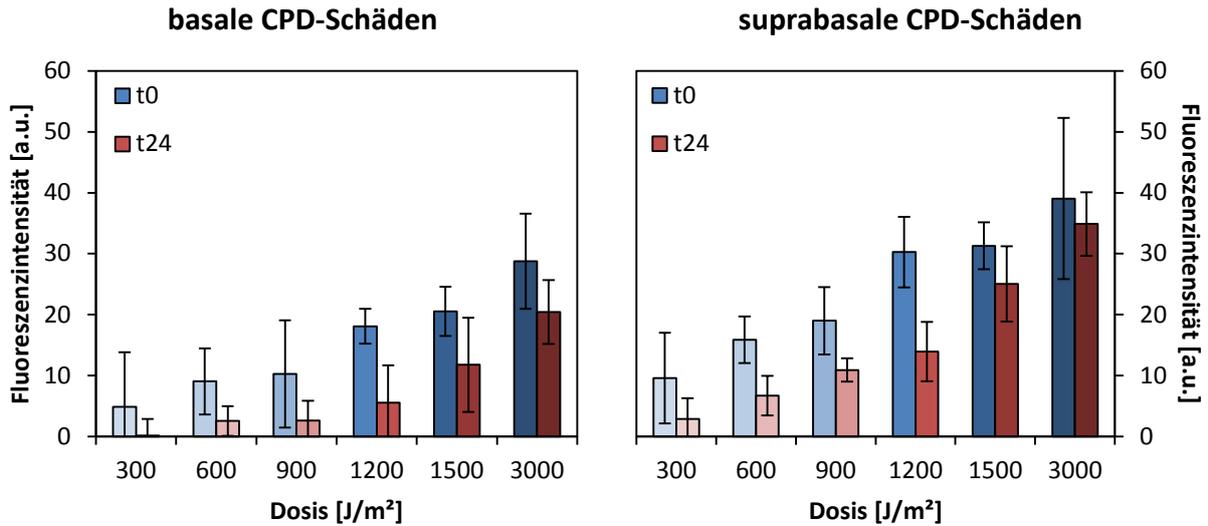


Abb. 4.6 Zellschichtspezifische Quantifizierung der CPDs nach Bestrahlung und nach einer Reparaturzeit von 24 h in der Basalzellschicht (links) und in suprabasalen Schichten (rechts).

Schon bei geringen Dosen H von 300 und 600 J/m² konnte ein Effekt durch das von der Bestrahlungsquelle emittierte UVC beobachtet werden. In den oberen Hautschichten wurden vermehrt DNA-Schäden induziert, während in den unteren Zellschichten die Schadensmenge geringer ausfiel, da UVB- und in noch deutlich stärkerem Maße die UVC-Strahlung größtenteils an der Hornschicht absorbiert oder stark gestreut wurde und nicht tief in die Haut eindringen konnte (Abb. 4.7) (BRULS1984; STRAHLENSCHUTZKOMMISSION2016).

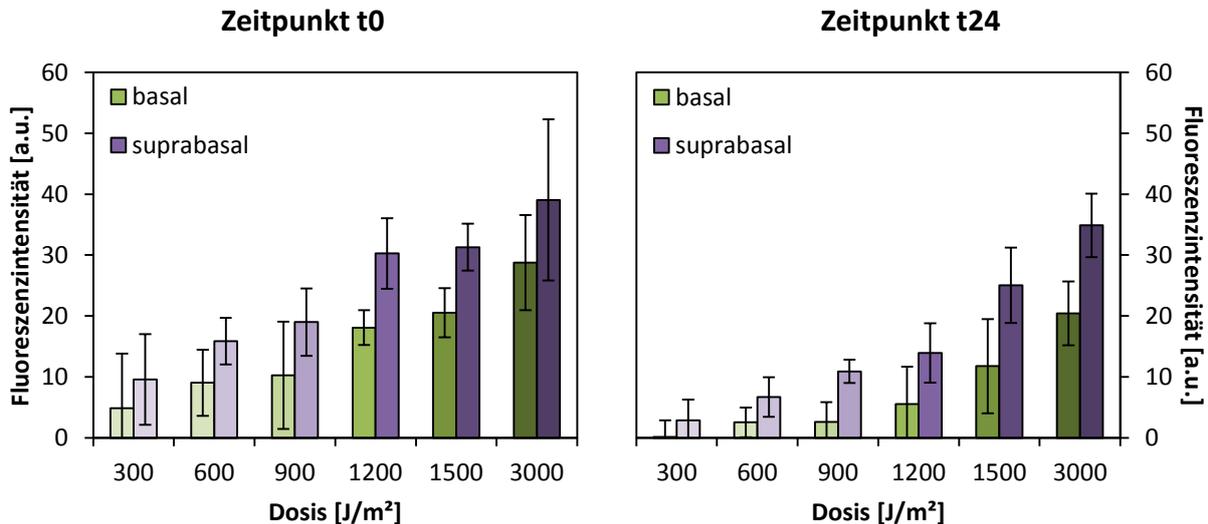


Abb. 4.7 Vergleich der DNA-Schädigung in basalen und suprabasalen Zellschichten direkt nach Bestrahlung (links) und 24 Stunden später (rechts).

4.1.2 Schadensverteilung und CPD-Reparaturkapazität

Bei steigenden Dosen war der Unterschied zwischen der basalen und der suprabasalen CPD-Induktion weniger stark ausgeprägt, da dann auch in die unteren Epidermisschichten genügend UVB eindrang, um dort ebenfalls DNA-Schäden zu induzieren. Die inhomogene Schadensverteilung in der Haut bei 300 J/m^2 mit einem Quotienten von 0,51 näherte sich mit steigenden Dosen einem Wert von 0,74 nach der Bestrahlung mit 3000 J/m^2 an (Abb. 4.8). Somit wurde auch bei sehr hohen Dosen in den oberen Zellschichten immer noch eine größere Anzahl an DNA-Schäden induziert als in den basalen Zellen (VINK1993). Tewari et al. konnten in in-vivo-Versuchen zeigen, dass UVA-Strahlung in humaner Haut eine stärkere CPD-Induktion in der unteren Epidermis bewirkt, während UVB-Strahlung vermehrt DNA-Schäden in den oberen Epidermisschichten induziert. Dies deutet darauf hin, dass die Basalzellschicht insbesondere durch UVA-induzierte Schäden gefährdet ist (TEWARI2012).

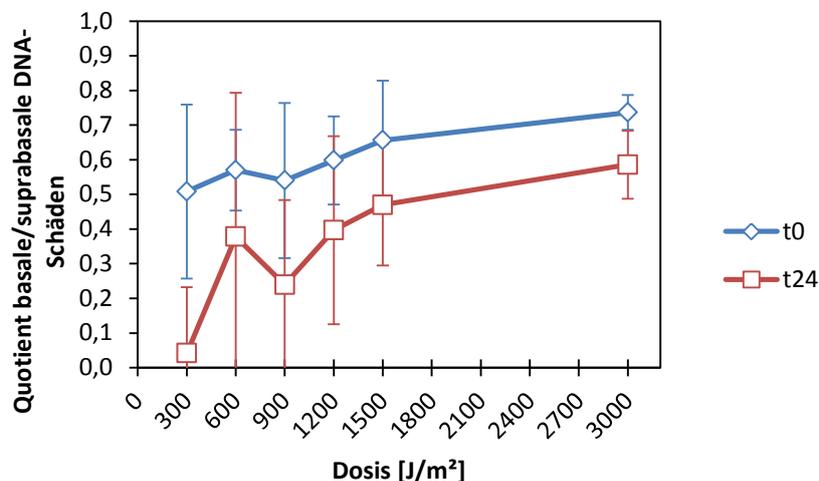


Abb. 4.8 Schadensverteilung in der Haut nach Bestrahlung sowie nach einer Reparaturzeit von 24 h. Quotient aus mittlerer basaler und mittlerer suprabasaler CPD-Fluoreszenz mit Standardabweichung der vier Spenderhäute.

Nach 24 Stunden war eine unterschiedlich starke Reparaturkapazität je nach Lokalisation der Keratinozyten in der Epidermis zu beobachten (Abb. 4.9). In der Basalzellschicht fand eine stärkere Reparatur der CPDs als in suprabasalen Zellen statt. In den oberen Hautschichten war im Vergleich zur Basalschicht meist eine größere Anzahl noch geschädigter Zellen vorhanden, möglicherweise aufgrund dessen, dass diese Zellen in absehbarer Zeit ihren Zellkern abstoßen und zu Hornzellen differenzieren. Die Reparatur ist somit in den oberen Schichten weniger wichtig als in der Basalzellschicht, in der auch die epidermalen Stammzellen lokalisiert sind, bei denen eine persistierende DNA-Schädigung eventuell zur Karzinogenese beitragen kann. Während bei der niedrigsten Dosis von 300 J/m^2 basal nahezu alle Schäden nach 24 h repariert wurden, lag die Reparaturrate suprabasal nur bei 70 %. Unabhängig von der Höhe der Bestrahlung war der prozentuale Anteil an reparierten Schäden in den Basalzellen durchweg um etwa 20 % höher als in den oberen Zellschichten. Diese reparaturbedingte inhomogene Schadensverteilung führte im Vergleich zum Zeit-

punkt direkt nach Bestrahlung zu einem niedrigeren Wert des Quotienten (basale/suprabasale CPD-Fluoreszenz) nach 24 h, wie in Abb. 4.8 dargestellt.

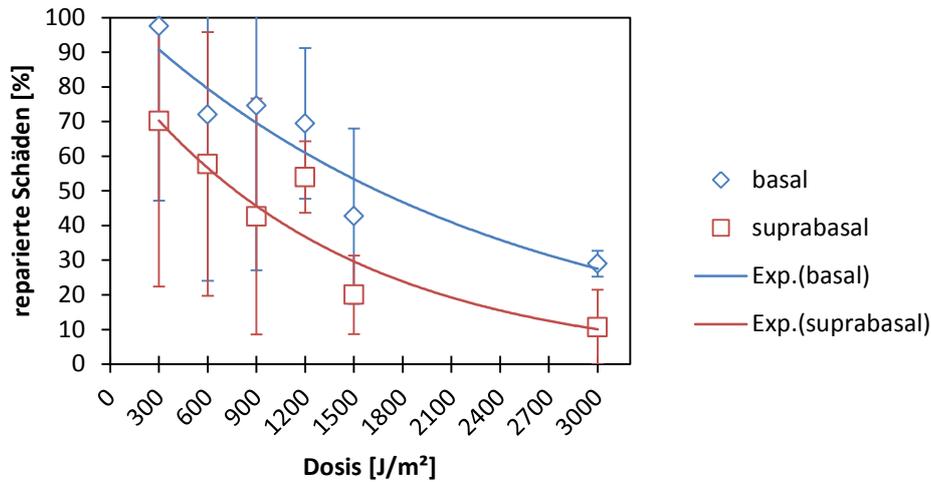


Abb. 4.9 Prozentualer Anteil reparierter Schäden in basalen und suprabasalen Zellen 24 h nach Bestrahlung als Funktion der UV-Dosis mit Anpassung einer (beliebigen) Exponentialfunktion. Prozentuale Differenz der CPD-Fluoreszenz von t_0 zu t_{24} mit Standardabweichung der Spenderhäute.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass im Allgemeinen nicht-teilende, terminal differenzierte Zellen eine signifikant geringere Reparaturkapazität aufweisen als sich schnell teilende, proliferierende Zellen. Als entscheidende Faktoren werden eine differentielle Expression der Reparaturgene und Zugänglichkeit des Chromatins für Reparaturenzyme in unterschiedlichen Stadien der Zellreifung angesehen (MITCHELL1990). Es ist daher nicht unerwartet, dass die Reparaturkapazität in der Epidermis von unten nach oben abnimmt und DNA-Schäden in den suprabasalen Zellen länger persistieren. Zudem stimmen diese Beobachtungen mit früheren Arbeiten überein, die zeigen, dass DNA-Schäden vorwiegend in den oberen Zellschichten der Epidermis verbleiben (LING2001; YOUNG1996). Erste Erkenntnisse lieferten die Untersuchungen von UVB-bestrahlten Mäusen. Die Muster der Induktion und Entfernung von DNA-Schäden waren in beiden Zellschichten ähnlich, jedoch fiel die Reparatur in den basalen Epidermiszellen etwas stärker aus als in den suprabasalen Zellen (VINK1993).

Nach der Bestrahlung mit hohen Dosen ($> 1500 \text{ J/m}^2$) nahm die Reparaturrate in der gesamten Epidermis im Vergleich zu niedrigen Dosen (300 J/m^2) um 50 % ab (Abb. 4.10, rechte Seite). Dies lässt darauf schließen, dass die Schädigung ein Level erreicht hat, welches die normale Zellfunktion (z. B. die Reparatur) beeinträchtigt und vermindert. Mehrere Faktoren können alleine oder in Kombination die Reparaturkapazität der Epidermiszellen bei starker Bestrahlung beeinflussen. Mit ansteigenden Dosen könnten DNA-Schäden zu einem derartigen Ausmaß akkumulieren, dass die Genexpression wichtiger Reparaturgene beeinträchtigt ist, indem entweder die Progression der RNA-Polymerase oder die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren durch CPDs blockiert ist. Die CPD-Reparatur könnte zudem durch UV-induzierten Stress reduziert werden. Da DNA-Protein-Interaktionen die Bildung von Photoprodukten verstärken können (PFEIFER1997), ist es denkbar, dass eine Kondensation des

Chromatins infolge des induzierten Stress (oder Apoptose) zu einer nicht zufälligen CPD-Induktion führt. So treten DNA-Schäden auch in Bereichen des Genoms auf, die für die Reparaturenzyme schwer zugänglich sind und es kommt zu einer Akkumulation schwer oder nicht reparierbarer CPDs in der Epidermis, wodurch in der Folge auch das Mutationsrisiko steigt. Die DNA-Reparaturenzyme könnten zusätzlich durch die Akkumulation freier Radikale beschädigt werden (MITCHELL 1999). Vink et al. vermuten, dass in der Mausepidermis eine Sättigung der Reparatur ab 2000 J/m² UVB eintritt (VINK 1994). Ein ähnlicher Effekt der Sättigung bei hohen Dosen ist auch bei den vorliegenden Ergebnissen in humaner Epidermis zu vermuten. Jedoch ist zu beachten, dass bei der CPD-Induktion der Fluoreszenzwert für 3000 J/m² außerhalb des linearen Dosis-Effekt-Bereichs liegt. Da hier ein Färbeartefakt nicht ausgeschlossen werden kann, ist auch die Reparaturkapazität bei dieser Dosis nur schwer zu beurteilen.

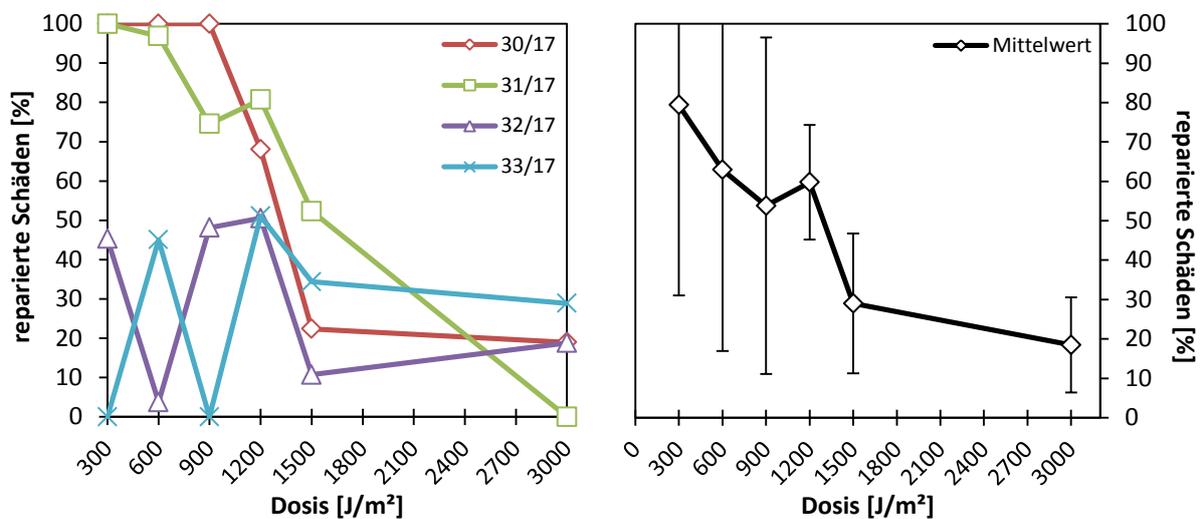


Abb. 4.10 Prozentualer Anteil an reparierten Schäden in der gesamten Epidermis der vier Spenderhäute (links) und Mittelwert der Spenderhäute mit Standardabweichung (rechts) 24 h nach Bestrahlung. Prozentuale Differenz der CPD-Fluoreszenz von t₀ zu t₂₄.

Zwischen den unterschiedlichen Spenderhäuten zeigte sich eine sehr hohe Variabilität bei der Reparaturkapazität, die vor allem bei den Spenderhäuten 32/17 und 33/17 sehr ausgeprägt vorlag (Abb. 4.10, linke Seite). Jede Haut repariert unterschiedlich schnell abhängig von vielen Faktoren, zu denen beispielweise auch das Alter zählt. Verschiedenen Studien konnten diese natürlich bedingten großen interindividuellen Unterschiede der CPD-Reparatur in humaner Haut sowie auch den Zusammenhang verlangsamer Reparatur mit zunehmender Alterung der Haut aufzeigen (BYKOV 1999; YAMADA 2006).

4.1.3 Einfluss der Epidermis- und Hornschichtdicke sowie von Reteleisten

Bei der Auswertung der Endpunkte CPD-Induktion und -Reparatur anhand der CPD-Färbung waren einige Probleme zu beachten. Da es sich bei der Haut um ein biologisches System handelt, traten zwischen den verschiedenen Spendern aber auch innerhalb der Biopsien aus derselben Spenderhaut Unterschiede auf, die einen Einfluss auf die Stärke der Schädigung der Hautzellen, aber auch auf die Reparaturkapazität hatten. Zu diesen Einflussfaktoren zählten beispielsweise das Alter der Spen-

der und genetische Faktoren. Auf morphologischer Ebene spielte die unterschiedliche Dicke der Epidermis eine wichtige Rolle (Abb. 4.11).

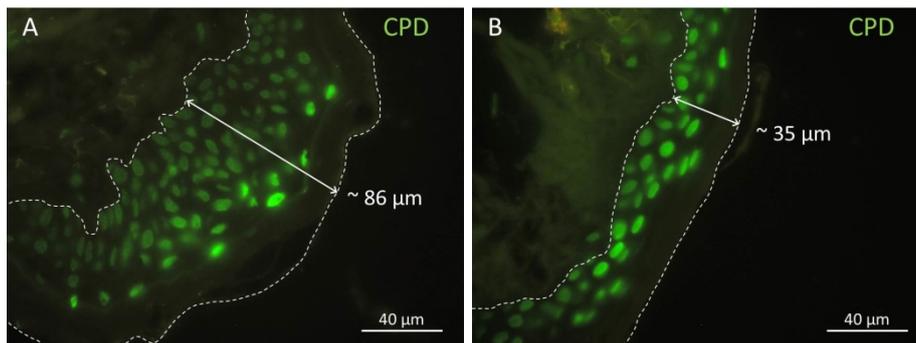


Abb. 4.11 Unterschiedliche Dicke der Epidermis bei zwei verschiedenen Spendern, CPD-Färbung. A: Beispiel einer breiten Epidermis (Probe 30/17, 1500 J/m^2 , 3 W/m^2 , t24). B: Beispiel einer dünnen Epidermis (Probe 32/17, 1200 J/m^2 , 3 W/m^2 , t0).

In den untersuchten Hautproben variierte die Dicke der Epidermis etwa zwischen 30-180 μm (Abb. 4.12). Hierdurch ergaben sich Unterschiede in der Schadensverteilung in der Haut. Bei einer dünnen Epidermis drang die UV-Strahlung auch bei geringeren Dosen schon bis zur Basalzellschicht vor und führte zu einer Schädigung der DNA, die ähnlich der Schädigung in den suprabasalen Zellschichten war. Bei einer dickeren Epidermis hingegen wurden die weiter unten liegenden Zellschichten bei gleicher Bestrahlung weniger stark geschädigt, wodurch sich ein Gefälle in der Anzahl der induzierten CPDs zeigte.

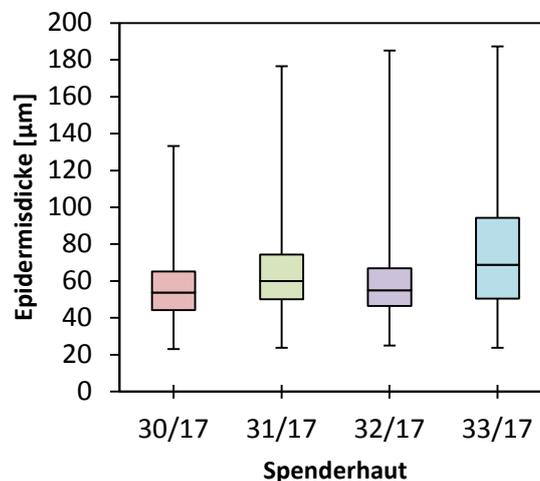


Abb. 4.12 Dicke der Epidermis der vier verschiedenen Spenderhäute. Die Whisker stellen die kleinste und größte Epidermisdicke dar. Ergebnisse aus 840ig-facher Vermessung der Epidermisdicke an unterschiedlichen Positionen.

Auch an Stellen, an denen die Reteleisten der Epidermis ausgeprägt waren, wurden die tiefer liegenden Zellen aufgrund der Entfernung zur Hautoberfläche (bis zu $150 \mu\text{m}$) weniger stark von der UV-Strahlung geschädigt (Abb. 4.13).

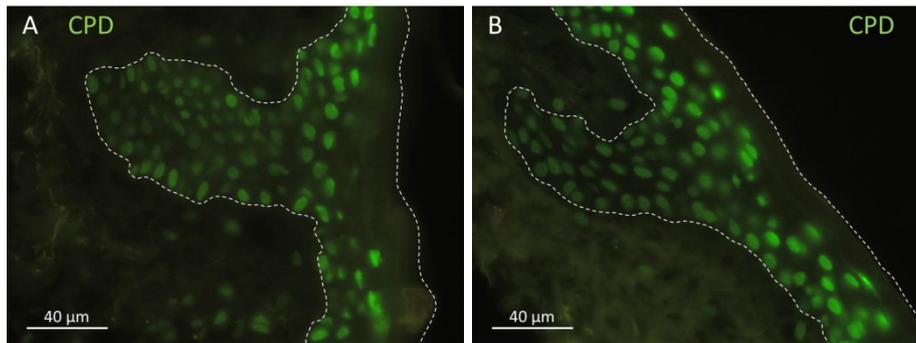


Abb. 4.13 Beispiele ausgeprägter Reteleisten, CPD-Färbung. A: Probe 31/17, 3000 J/m^2 , 3 W/m^2 , t_0 . B: Probe 32/17, 1200 J/m^2 , 3 W/m^2 , t_0 . An Stellen eingestülpter Epidermis nimmt die Anzahl induzierter CPDs ab, da hier die UV-Strahlung weniger stark eindringen kann.

Ebenso hatte auch die Dicke der Hornschicht einen Einfluss auf die Eindringtiefe der UV-Strahlung. Je dünner die Hornschicht, desto geringer der protektive Effekt durch Absorption der UV-Strahlung. Dies zeigte sich in Abb. 4.14, wo in der Hautprobe mit der dickeren Hornschicht (B) vorwiegend die direkt unter den Kerneozyten lokalisierten Keratinozyten geschädigt wurden, während bei der Probe mit der dünneren Hornschicht (A) die Schadensverteilung in der Epidermis homogener ausfiel. Die Hornschicht der im Vorversuch bestrahlten Hautproben variierte zwischen wenigen μm bis zu $40 \mu\text{m}$ (Abb. 4.15).

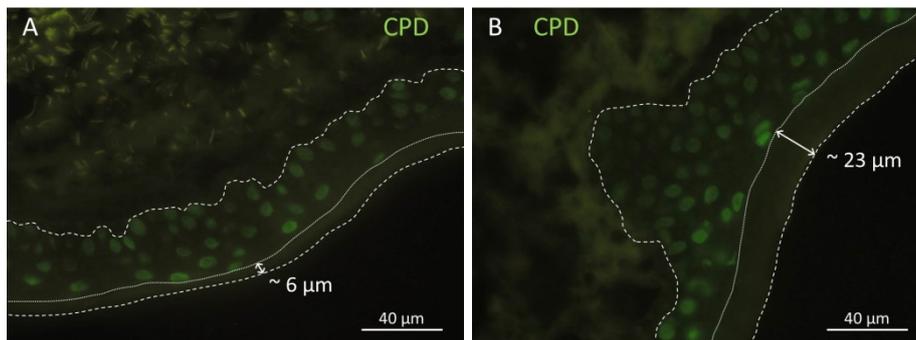


Abb. 4.14 Unterschiedliche Dicke der Hornschicht bei verschiedenen Spendern, CPD-Färbung. A: Beispiel einer dünnen Hornschicht (Probe 30/17, 600 J/m^2 , 3 W/m^2 , t_{24}). B: Beispiel einer dicken Hornschicht (Probe 32/17, 600 J/m^2 , 3 W/m^2 , t_{24}).

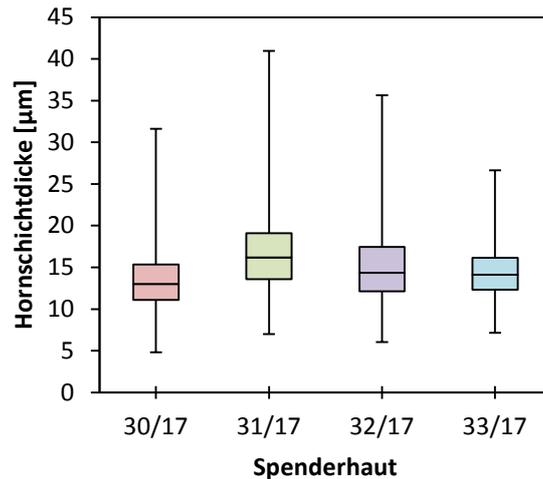


Abb. 4.15 Dicke der Hornschicht der vier verschiedenen Spenderhäute. Die Whisker stellen die kleinste und größte Hornschichtdicke dar. Ergebnisse aus 840ig-facher Vermessung der Hornschichtdicke an unterschiedlichen Positionen.

Des Weiteren traten in der Epidermis Einstülpungen (Abb. 4.16) auf, welche die Schadensinduktion beeinträchtigten. An diesen Stellen drang die Strahlung nur gering ein und es wurden weniger CPDs induziert, als in näher an der Hautoberfläche liegenden Regionen.

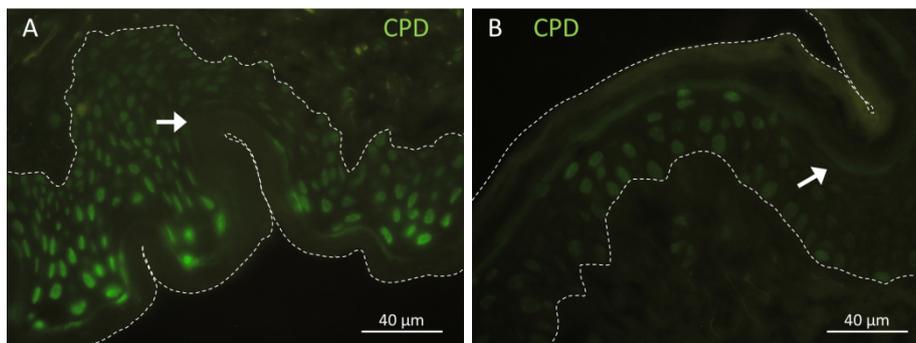


Abb. 4.16 Einstülpungen der Epidermis, CPD-Färbung. A: Probe 30/17, 1500 J/m², 3 W/m², t0. B: Probe 31/17, 600 J/m², 3 W/m², t24. An Stellen eingestülpeter Epidermis (→) nimmt die Anzahl induzierter CPDs ab, da hier die UV-Strahlung weniger stark eindringen kann.

Um die Schwankungen in den Ergebnissen durch die beschriebenen Faktoren gering zu halten, wurden hauptsächlich Hautregionen mit vergleichbarer Dicke und Morphologie ausgewertet und verglichen.

4.1.4 Induktion von Apoptose

Für die Analyse der Apoptose-Induktion in der Epidermis 24 Stunden nach UV-Exposition, wurden die Häute von vier verschiedenen Spendern bestrahlt und durch eine Immunfluoreszenzfärbung der aktiven Caspase-3 apoptotische Zellen detektiert. Von jeder Hautprobe wurden jeweils drei Caspase-3-gefärbte Hautschnitte ausgewertet, indem die Anzahl apoptotischer Zellen pro Sichtfeld in Bezug auf die Dicke

der Epidermis bestimmt wurde. In Abb. 4.17 sind exemplarisch DAPI- und Caspase-3-gefärbte Hautschnitte 24 Stunden nach Bestrahlung mit den unterschiedlichen Dosen gezeigt.

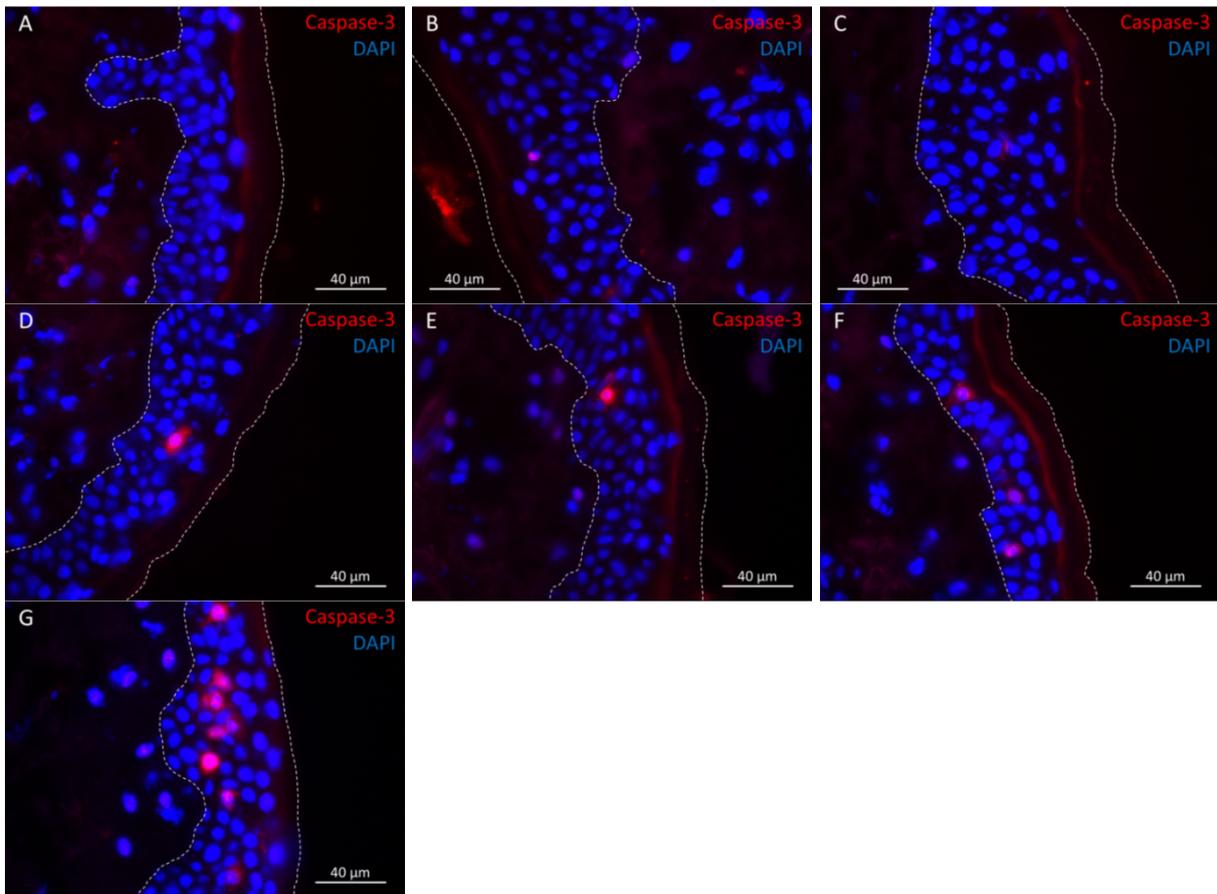


Abb. 4.17 Probe 32/17, Caspase-3-Färbung. A: Unbestrahlte Kontrolle. B: 300 J/m². C: 600 J/m². D: 900 J/m². E: 1200 J/m². F: 1500 J/m². G: 3000 J/m². Overlay von DAPI-Kernfärbung (blau) und aktive Caspase-3-Färbung (rot) 24 h nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen. Markiert ist die Epidermis (weiße Linien).

Die Auszählung der apoptotischen Zellen in den unterschiedlich bestrahlten Hautproben zeigte, dass mit zunehmender Bestrahlung auch die Anzahl der apoptotischen Zellen zunahm, wobei sich ein zweistufiger Verlauf zeigte. Bis zu einer Dosis von 900 J/m² wurde kaum beziehungsweise nur auf einem geringen Niveau Apoptose induziert. Erst bei höheren Bestrahlungen nahm auch die Anzahl apoptotischer Ereignisse deutlich zu. Im untersuchten Dosisbereich stieg die mittlere Apoptose-Induktion mit zunehmenden Dosen um den Faktor 83 an. Unter Berücksichtigung der sinkenden Reparaturkapazität bei zunehmender Bestrahlung (siehe Abb. 4.10) implizieren diese Ergebnisse, dass die Bestrahlung mit Dosen > 900 J/m² zunehmend starke Schädigungen induzierte, die nicht mehr adäquat durch die zelleigenen Reparatursysteme beseitigt werden konnten, weshalb vermehrt der programmierte Zelltod eingeleitet wurde. In Abb. 4.18 ist die Auswertung der Caspase-3-Färbung in der Epidermis für jede einzelne Spenderhaut abzüglich der Kontrolle aufgeführt.

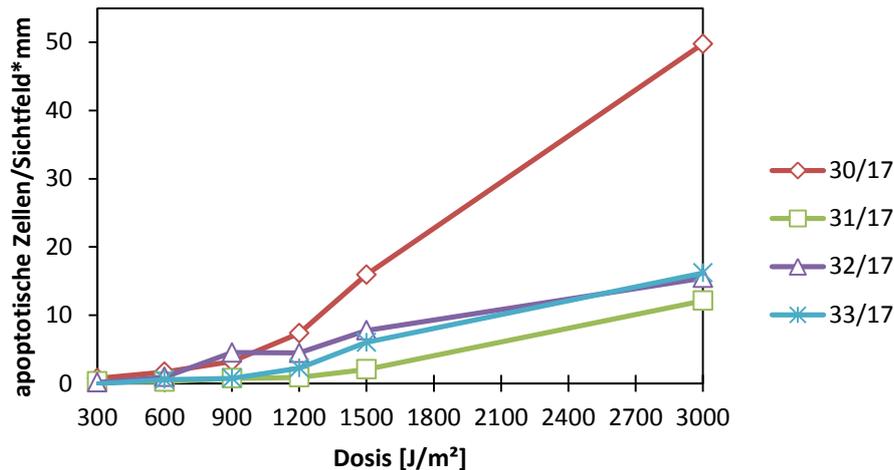


Abb. 4.18 Quantifizierung der Apoptose-Induktion in der gesamten Epidermis 24 Stunden nach Bestrahlung für die einzelnen Spenderhäute. Anzahl apoptotischer Zellen pro Sichtfeld und mm Epidermisdicke.

Bei hohen Dosen $> 1200 \text{ J/m}^2$ zeigten sich auch bei der Analyse der Apoptose interindividuelle Unterschiede zwischen den Spenderhäuten. Auffällig war vor allem die Spenderhaut 30/17, bei der die Anzahl apoptotischer Zellen nach Bestrahlung um ein Vielfaches höher war als bei den übrigen Häuten. Dies könnte auf die Herkunft der Haut aus dem Brustbereich und dadurch bedingte morphologische Unterschiede zurückzuführen sein.

4.2 Überprüfung des Bunsen-Roscoe-Gesetzes

Die Validierung eines sensitiven Dosisbereichs der Haut im Vorversuch bei kontinuierlicher Bestrahlung ergab einen linearen Dosis-Effekt der CPD-Induktion im Bereich von null bis 1500 J/m^2 mit anschließendem Übergang in eine Sättigung bei höheren Bestrahlungen, die jedoch auch färbebedingt sein kann. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für die Überprüfung des Bunsen-Roscoe-Gesetzes eine Dosis gesucht, für welche die Antwort der Haut reproduzierbar ist. Die Dosis sollte hoch genug sein, um einen messbaren Einfluss auf die Haut auszuüben und gleichzeitig niedrig genug, damit nicht das Maximum an induzierten DNA-Schäden erreicht ist. Daher wurde eine noch im linearen Bereich des Dosis-Effektes liegende konstante Bestrahlung H von 900 J/m^2 bei variablen Bestrahlungsstärken E (Kontrolle; 0,125; 0,3; 1; 3 W/m^2) ausgewählt. Die gepulste Bestrahlung wurde mit 10 ms Impulsdauer τ und einer Impulswiederholfrequenz f_P von 50 Hz durchgeführt. Wiederum wurden die Untersuchungen an vier verschiedenen Spenderhäuten durchgeführt.

4.2.1 CPD-Analyse, cw und gepulst

Ab diesem Versuchsteil wurde die Auswertung der induzierten DNA-Schäden mit einem Macro für das digitale Bildverarbeitungsprogramm (siehe 3.3) vorgenommen. Hierzu wurden von jeder der 72 Hautproben nach der CPD-Anfärbung standardmäßig 20 Bilder (= ca. 1300 Zellkerne) hinsichtlich der Fluoreszenz der Zellkerne analysiert. Insgesamt wurden somit in diesem Versuchsteil 1440 Bilder und über 93000 Zellkerne ausgewertet. In Abb. 4.19 ist die Quantifizierung der CPD-Schäden in der

gesamten Epidermis direkt und 24 h nach Bestrahlung als Mittelwert aus den vier Spenderhäuten 50/17, 1/18, 3/18 und 5/18 abzüglich der Kontrolle aufgeführt.

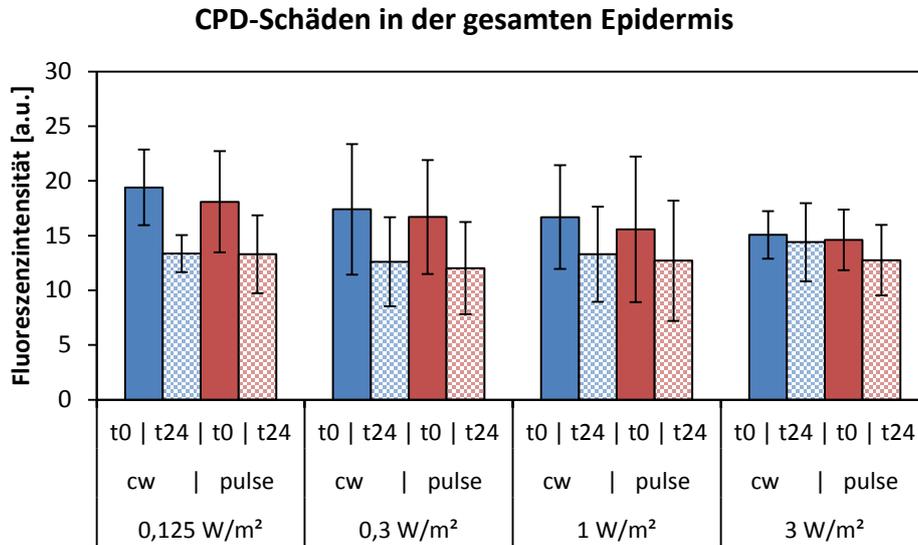


Abb. 4.19 Verifizierung des Bunsen-Roscoe-Gesetzes. Quantifizierung der CPDs nach Bestrahlung in der gesamten Epidermis.

Eine detaillierte Auftragung der basalen (Anh. 2, Abb. 1) und suprabasalen (Anh. 2, Abb. 2) Schadensquantifizierung spezifisch für jede einzelne Spenderhaut ist dem Anhang zu entnehmen.

Die Untersuchung der CPD-Induktion (Abb. 4.20) ergab keinen quantitativen Unterschied zwischen gepulster und kontinuierlicher Bestrahlung. Zudem konnte das Bunsen-Roscoe-Gesetz für $E > 0,3 \text{ W/m}^2$ bestätigt werden: eine konstante Dosis hatte einen gleichbleibenden photochemischen Effekt (Ausmaß der CPD-Induktion) zur Folge, unabhängig von der variierenden Bestrahlungsstärke. Eine Linearität zwischen Schädigung und Bestrahlungsstärke war somit in diesem Bestrahlungsstärkebereich gegeben. Jedoch zeigte sich sowohl für kontinuierliche als auch für gepulste Applikation eine leicht erhöhte CPD-Fluoreszenzintensität bei niedrigen Bestrahlungsstärken unter $0,3 \text{ W/m}^2$. Möglicherweise könnte hier die Experimentierzeit einen Einfluss haben. Aufgrund der konstanten Dosis von 900 J/m^2 bewirkte eine Änderung der Bestrahlungsstärke E auch eine umgekehrt proportionale Änderung der Experimentdauer t . Bei abnehmender Bestrahlungsstärke stieg die Experimentdauer. Für kontinuierliche Bestrahlungen entsprach die Bestrahlungsdauer der Experimentdauer. Bei der gepulsten Bestrahlung hingegen verdoppelte sich die Experimentdauer im Vergleich zur jeweiligen kontinuierlichen Exposition aufgrund der gewählten Impulsdauer (10 ms) und Impulswiederholfrequenz (50 Hz).

Nach der Induktion von CPDs infolge einer Bestrahlung wird die Chromatinstruktur durch die Aktivität der DNA-Reparatursysteme gelockert und daher die DNA für weitere (z. B. chronische) Exposition UV-sensitiver (VINK1993). Neben der reparaturbedingten Lockerung des Chromatins wird die CPD-Bildung auch durch DNA-Protein-Interaktionen in den Prozessen der Signaltransduktion und Genaktivierung erleichtert, da die DNA zur Bindung von Proteinen entwunden und entspannt werden muss. So liegen beispielsweise in Säugerzellen Hot-Spots für UV-Photoprodukte an den

DNA-Bindestellen von Transkriptionsfaktoren (PFEIFER1992). Bei längeren Experimentdauern könnte somit infolge von Signaltransduktion sowie beginnender Reparatur der DNA-Schäden in den Hautzellen eine Lockerung des Chromatins bereits während der UV-Exposition stattgefunden haben. Infolge dessen wäre die DNA empfindlicher für die schädliche Wirkung der UV-Strahlung gewesen und es würde, verglichen mit den kurzen Experimentzeiten bei höheren Bestrahlungsstärken, trotz gleicher applizierter Dosis eine höhere Anzahl an CPDs induziert.

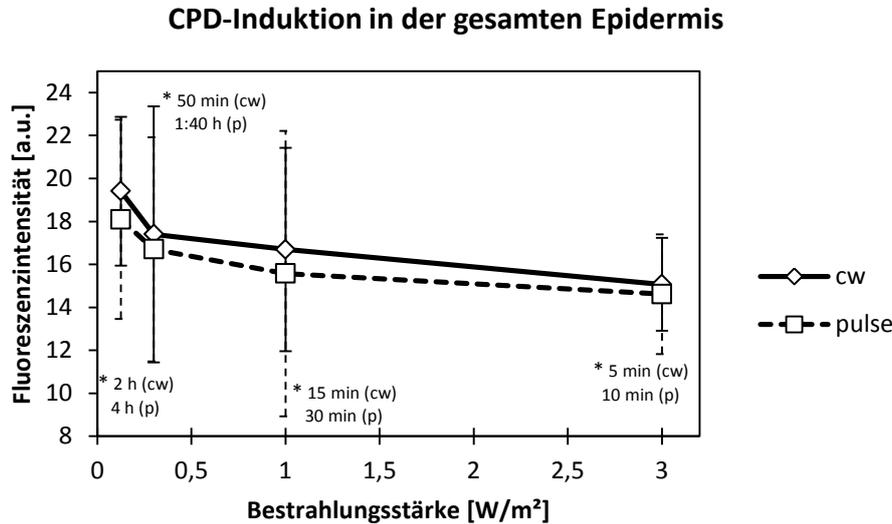


Abb. 4.20 Überprüfung des Bunsen-Roscoe-Gesetzes. CPD-Induktion in der gesamten Epidermis. (*) = Experimentdauer.

Eine weitere Größe, die mit der Experimentdauer korrelierte und möglicherweise die CPD-Induktion bei gepulster Bestrahlung hätte beeinflussen können, war die Anzahl der applizierten Impulse. Niedrige Bestrahlungsstärken bedeuteten eine steigende Experimentdauer und eine zunehmende Anzahl an Impulsen. Je mehr Impulse appliziert wurden, desto höher war die CPD-Induktion. Dieser Effekt fiel jedoch nur sehr gering aus und da auch bei kontinuierlicher Bestrahlung eine leicht erhöhte CPD-Induktion bei niedrigen Bestrahlungsstärken auftrat, wurde ein Einfluss durch die Impulsanzahl als unwahrscheinlich erachtet. Es ergab sich folglich für die CPD-Induktion in Keratinozyten ein geringer Bestrahlungsstärken- und möglicherweise Experimentdauer-abhängiger Effekt, jedoch kein applikationsbedingter Einfluss.

Das Bunsen-Roscoe-Gesetz gilt somit für die CPD-Induktion sowohl bei kontinuierlicher als auch bei gepulster Bestrahlung im Bereich von 0,3 bis 3 W/m². Erst lange Experimentzeiten (ab etwa 2 h) führen zu einer geringfügig erhöhten Induktion durch Überlagerung der photophysikalischen/photochemischen Prozesse durch photobiologische Prozesse wie zum Beispiel die zelluläre Strahlenantwort in Form von DNA-Reparatur und Chromatinveränderungen.

4.2.2 Schadensverteilung und Reparaturkapazität als Funktion der Strahlungsapplikation

Die Schadensverteilung in der Haut stellte sich bei unterschiedlichen Bestrahlungsstärken wie erwartet gleichbleibend dar, da effektiv die gleiche Dosis appliziert wurde (Abb. 4.21). In den oberen Hautschichten wurden vermehrt DNA-Schäden induziert, während in den unteren Zellschichten die Schadensmenge gering blieb. Dies konnte partiell auch auf das von der Bestrahlungsquelle emittierte UVC zurückgeführt werden. UVC-Strahlung wird größtenteils schon an der Hornschicht absorbiert und dringt nicht tief in die Haut ein. Ein Einfluss auf die CPD-Induktion in den oberen Zellschichten ist jedoch durchaus möglich. In die unteren Epidermisschichten und vor allem die Basalzellschicht drang nicht genügend UVB ein, um dort ebenfalls die gleiche Anzahl an DNA-Schäden zu induzieren. Folglich ergab sich eine inhomogene Schadensverteilung in der Haut zum Zeitpunkt t0 mit einer größeren Anzahl an DNA-Schäden in den oberen Zellschichten als in den basalen Zellen. Ein Unterschied in der Schadensverteilung nach kontinuierlicher oder gepulster UV-Exposition bestand nicht.

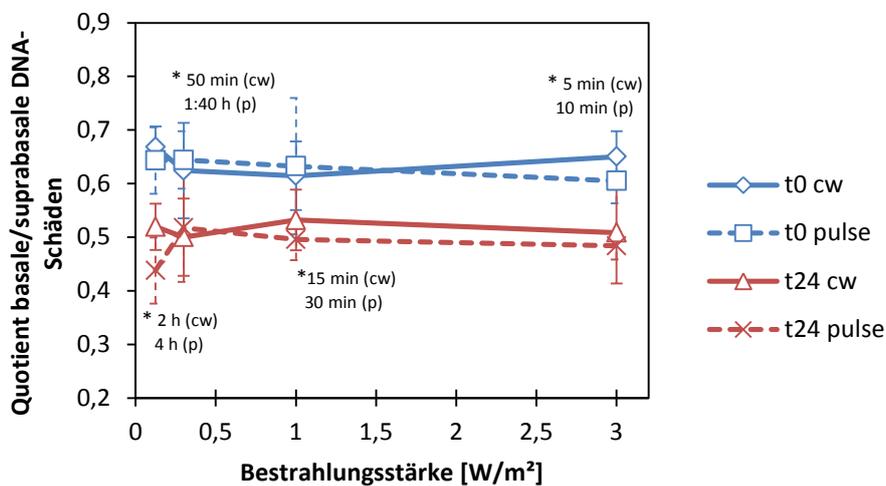


Abb. 4.21 Schadensverteilung in der Haut als Funktion der Bestrahlungsstärke, der Applikationsform (cw und gepulst) und der Zeit nach UV-Exposition. Quotient aus mittlerer basaler und mittlerer suprabasaler CPD-Fluoreszenz mit Standardabweichung der vier Spenderhäute. (*) = Experimentdauer.

Nach 24 h war die ungleiche Verteilung der CPDs in der Haut noch stärker ausgeprägt, da DNA-Schäden in den Basalzellen schneller repariert wurden als in den suprabasalen Zellen und daher vermehrt DNA-Läsionen in den oberen Epidermisschichten verblieben (Vergleich Abb. 4.22 rechts).

In Bezug auf die Reparaturkapazität zeigte sich eine Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke. Mit steigender Bestrahlungsstärke nahm sowohl bei kontinuierlicher (minus 26 %) als auch bei gepulster Bestrahlung (minus 15 %) die Reparaturrate in der Epidermis deutlich ab (Abb. 4.22 links). Das Bunsen-Roscoe-Gesetz gilt demzufolge in humaner Haut nicht für die DNA-Reparatur. Die Reparatur der DNA-Schäden erfolgte erwartungsgemäß in der Basalzellschicht noch stärker als in den suprabasalen Schichten. In den oberen Hautschichten war somit im Vergleich zur Basalschicht nach 24 h meist eine größere Anzahl noch geschädigter Zellen vorhanden. Der prozentuale Anteil an reparierten Schäden in den Basalzellen lag durchweg deutlich höher.

her (im Mittel 15-19 % mehr) als in den oberen Zellschichten (Abb. 4.22 rechts). Suprabasal war nach kontinuierlicher Bestrahlung bei 3 W/m² keine CPD-Reparatur zu ermitteln.

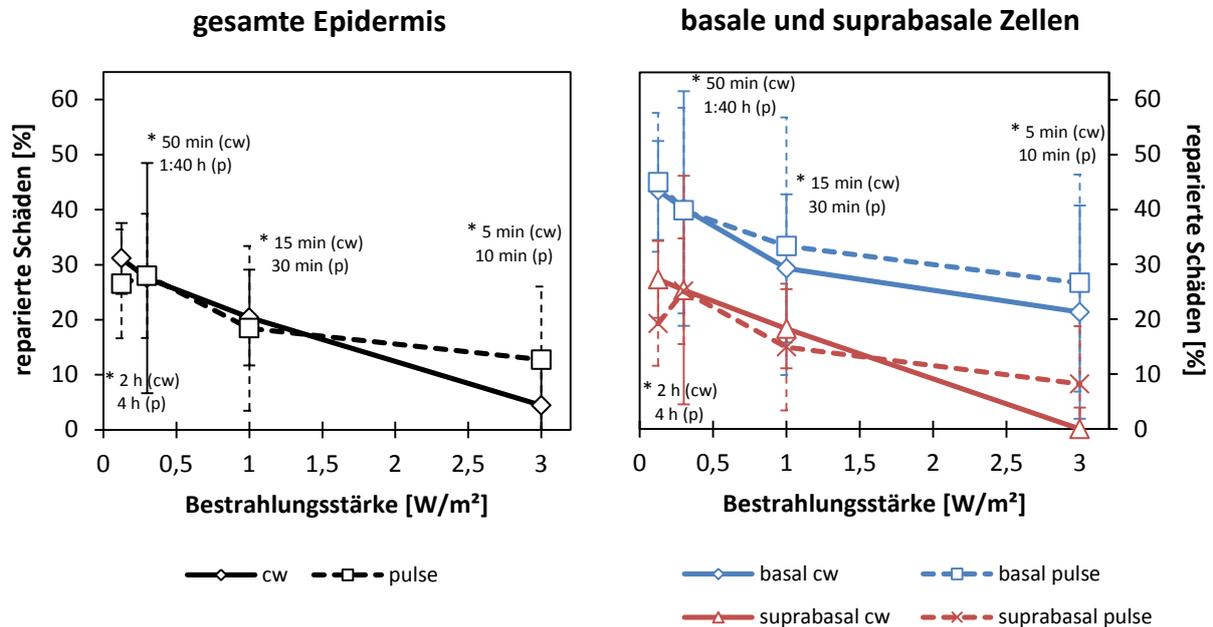


Abb. 4.22 Prozentualer Anteil an reparierten Schäden in der gesamten Epidermis (links) sowie in basalen und suprabasalen Zellen (rechts) 24 h nach Bestrahlung in Abhängigkeit der Bestrahlungsstärke. Prozentuale Differenz der CPD-Fluoreszenz von t₀ zu t₂₄ mit Standardabweichung der vier Spenderhäute. (*) = Experimentdauer.

Auch die Reparaturkapazität zeigte eine mögliche Abhängigkeit von der Experimentdauer. Mit längeren Experimentzeiten stieg die prozentuale Reparatur deutlich an. Bei bereits beginnender DNA-Reparatur aufgrund der langen Verweildauer der Hautprobe unter der Bestrahlungsquelle (bei niedrigen E) könnten schon während der UV-Exposition weitere noch induzierte CPDs eventuell schneller erkannt und somit zügiger aus dem Genom entfernt werden, als wenn die gleiche Strahlendosis in einem kurzen Zeitraum (mit hoher Bestrahlungsstärke) appliziert wird. Die dadurch anfänglich massive Konzentration an DNA-Schäden erfordert eine verlängerte DNA-Reparatur.

Bei der gepulsten Bestrahlung ist eine niedrige Bestrahlungsstärke nicht nur mit einer längeren Experimentdauer, sondern auch mit einer steigenden Anzahl an Impulsen (mit geringer Dosis pro Impuls) einhergehend. Hohe Bestrahlungsstärken bedeuten umgekehrt eine niedrige Impulsanzahl (mit hoher Dosis pro Impuls). Unter diesem Gesichtspunkt zeigte sich eine bessere Reparatur, je mehr Impulse appliziert wurden bzw. je geringer die jeweilige Dosis pro Impuls ausfiel. Ein optischer kW-Laser kann Zellen innerhalb weniger Nanosekunden zerstören, wohingegen dieselbe Dosis der gleichen Strahlung über einen viel längeren Zeitraum appliziert sogar Zellreparaturmechanismen stimulieren kann (KARU1993). Möglicherweise kann dies auch auf die vorliegenden Bestrahlungsexperimente übertragen werden: je höher der Energieeintrag, desto höher der potentielle Schaden. Sehr hohe Bestrahlungsstärken be-

wirken gegebenenfalls andere Zellschäden und eine beeinträchtigte DNA-Reparatur, weshalb das Bunsen-Roscoe-Gesetz nicht anwendbar ist.

Insgesamt erschien die Reparaturkapazität in den Spenderhäuten dieses Projektabschnittes eher gering. Die höchste Reparaturrate nach 24 Stunden lag bei gerade einmal 45 % der basal induzierten CPDs. Vor allem die niedrige bzw. kaum vorhandene Reparatur nach der kontinuierlichen Bestrahlung bei einer Bestrahlungsstärke von 3 W/m^2 war auffällig. Bereits im Vorversuch zur Ermittlung des Dosis-Effektes wurde mit den gleichen Parametern bestrahlt (3 W/m^2 , 900 J/m^2 , cw). Ein Vergleich der Ergebnisse aus dem Vorversuch mit denen aus den Untersuchungen zum Bunsen-Roscoe-Gesetz zeigte ähnliche Fluoreszenzwerte bei der CPD-Induktion (14,6 a.u. im Vorversuch; 15,1 a.u. im Bunsen-Roscoe-Projektteil). Die Reparaturkapazität der Spenderhäute im Vorversuch (53,8 %) war jedoch etwa 12-mal höher als die Reparatur der Spenderhäute im Bunsen-Roscoe-Abschnitt (4,5 %). Möglicherweise ergaben sich die niedrigen Reparaturkapazitäten im Bunsen-Roscoe-Projektteil und somit die großen Diskrepanzen zum Vorversuch durch insgesamt dünnere Spenderhäute mit weniger Zellschichten in der Epidermis. Hierdurch könnte sich zum einen der Effekt durch den UVC-Anteil der Lampe vergleichsweise stärker auswirken, zum anderen würden die suprabasalen Zellschichten einen größeren Anteil an der Epidermis ausmachen und die Gesamtreparaturergebnisse vermindern, da diese Keratinozyten kurz vor dem Stadium der Hornzellen nicht mehr so effizient reparieren wie beispielsweise die Basalzellschicht (MITCHELL 1990).

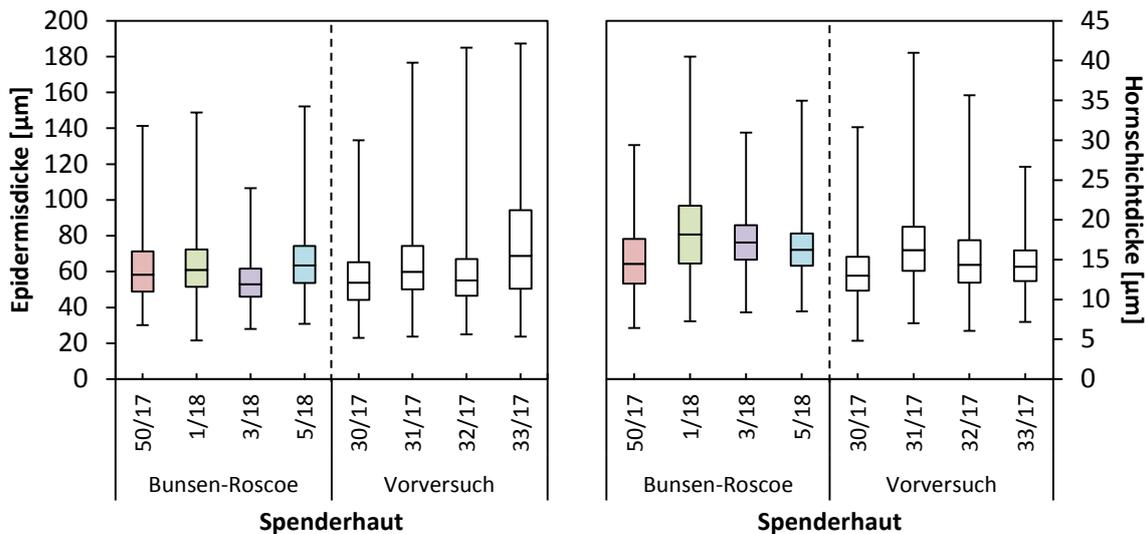


Abb. 4.23 Dicke der Epidermis (links) und der Hornschicht (rechts) der verschiedenen Spenderhäute. Die Whisker stellen die kleinste und größte Epidermis- bzw. Hornschichtdicke dar. Ergebnisse aus 1080ig-facher Vermessung der Epidermis- und Hornschichtdicke an unterschiedlichen Positionen. Für den direkten Vergleich sind auch die im Vorversuch genutzten Spenderhäute dargestellt.

Ein Vergleich der morphologischen Parameter Epidermisdicke und Hornschichtdicke ergab im Mittel keinen Unterschied zwischen den Spenderhäuten aus dem Vorversuch und dem Bunsen-Roscoe-Projektteil (Abb. 4.23). Jedoch zeigte sich, dass bei den Spenderhäuten aus dem Vorversuch eine deutlich größere Spannweite bezüg-

lich der Epidermisdicke vorlag. Ein Einfluss der Morphologie auf die Reparaturergebnisse ist somit nicht auszuschließen. Möglicherweise basieren die Differenzen jedoch lediglich auf interindividuellen Unterschieden der Reparaturkapazität.

4.2.3 Induktion von Apoptose

Die Apoptose-Induktion wurde durch Auswertung der Caspase-3-aktiven Zellen in der Epidermis bestimmt. Für die Apoptose nach 24 h ergab sich kaum ein Unterschied zwischen gepulster und kontinuierlicher Bestrahlung, siehe Abb. 4.24. Lediglich für $E = 0,125 \text{ W/m}^2$ lag die Apoptoserate nach gepulster Bestrahlung höher als nach kontinuierlicher. Einzelnen betrachtet war in drei von vier Spenderhäuten bei niedrigen Bestrahlungsstärken eine gepulste Applikation der UV-Strahlung effizienter in der Induktion von Apoptose als kontinuierliche Bestrahlung, siehe Anh. 2, Abb. 3. Dieser Effekt wurde nach der Mittelwertbildung aufgrund der hohen Standardabweichungen durch interindividuelle Variabilitäten weniger deutlich. In Abb. 4.24 ist die Auswertung der Caspase-3-Färbung in der Epidermis gemittelt aus den Ergebnissen der vier Spenderhäute 50/17, 1/18, 3/18 und 5/18 abzüglich der Kontrolle aufgeführt.

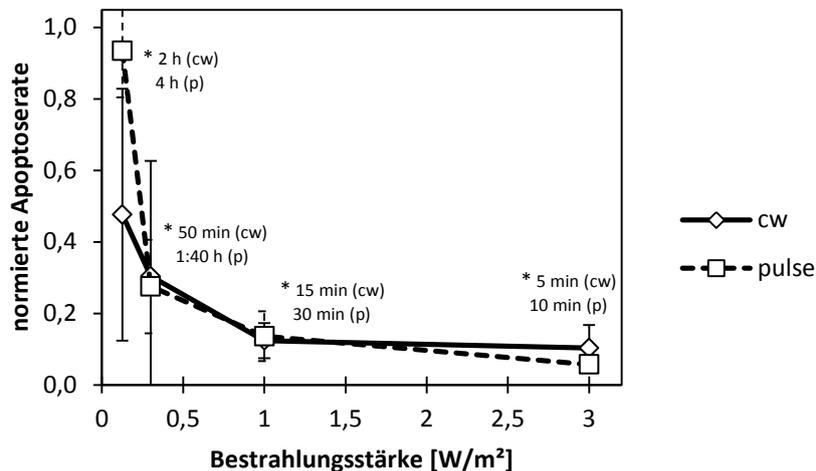


Abb. 4.24 Quantifizierung der Apoptose-Induktion in der gesamten Epidermis 24 Stunden nach Bestrahlung als Funktion der Bestrahlungsstärke. Relative Anzahl apoptotischer Zellen pro Sichtfeld und mm Epidermisdicke als Apoptoserate normiert auf den Maximalwert der jeweiligen Spenderhaut. Mittelwert über die vier Spenderhäute mit Standardabweichung. (*) = Experimentdauer.

Ähnlich wie bei der DNA-Reparatur zeigte sich wiederum ein Bestrahlungsstärkenabhängiger Effekt unabhängig von der Applikationsart. Mit kleineren Bestrahlungsstärken $< 1 \text{ W/m}^2$ stieg die Anzahl der apoptotischen Zellen in der Epidermis deutlich an. Prozentual betrachtet betrug die Abnahme der Apoptose im untersuchten Bereich von niedrigen zu hohen Bestrahlungsstärken bei gepulster Exposition etwa 93 %, bei kontinuierlicher Bestrahlung lag die prozentuale Abnahme bei ungefähr 79 %. Das Bunsen-Roscoe-Gesetz ist daher für die Apoptose-Induktion nach UV-Bestrahlung nur in dem Bereich von 1 bis 3 W/m^2 gültig, in welchem die Apoptoserate sehr niedrig war. Die Apoptoseraten von 3,2 (pulse) bzw. 4,5 (cw) apoptotischen Zellen/Sichtfeld*mm ohne Normierung bei einer Bestrahlungsstärke von 3 W/m^2 sind konsistent mit den Ergebnissen aus dem Vorversuch, bei dem nach kontinuierlicher

Bestrahlung mit 900 J/m^2 bei einer Bestrahlungsstärke von 3 W/m^2 durchschnittlich 2,3 und höchstens 4,5 apoptotische Zellen/Sichtfeld*mm induziert wurden. Mit abnehmender Bestrahlungsstärke wurde die Diskrepanz zu diesen Richtwerten sowohl bei gepulster als auch bei kontinuierlicher UV-Exposition deutlich größer.

Für die Apoptose-Induktion bestehen mögliche Abhängigkeiten von der Experimentdauer und der bei gepulster Bestrahlung damit korrelierenden Impulsanzahl. Mit abnehmenden Bestrahlungsstärken stiegen sowohl die Experimentdauer als auch die Anzahl der applizierten Impulse. Höhere Apoptoseraten ergaben sich bei längeren Experimentdauern ab etwa 50 min. Möglicherweise wurde durch die Umordnung des Chromatins schon während der Bestrahlung nicht nur die DNA-Reparatur verstärkt, sondern auch die Einleitung der Apoptose schneller getriggert, um einer übermäßigen Schadensakkumulation in der gelockerten DNA entgegenzuwirken. Bei gepulster Bestrahlung könnte zusätzlich die steigende Anzahl an Impulsen bei langen Experimentzeiten zu stärkerer Schädigung geführt und die vermehrte Apoptose im Vergleich zu kontinuierlicher Bestrahlung induziert haben. Hier könnte jedoch auch lediglich die lange Experimentdauer bei gepulster Applikation ursächlich für die höhere Apoptoserate sein.

Das Bunsen-Roscoe-Gesetz gilt folglich nicht oder nur in gewissen Grenzen, wenn dem betrachteten Endpunkt zelluläre Prozesse als Strahlenantwort zugrunde liegen, wie es bei der DNA-Reparatur und der Apoptose der Fall ist.

Die bei der Untersuchung des Dynamikbereichs der Haut im Vorversuch gezeigte inverse Korrelation von Reparatur und Apoptose - eine geringe Reparaturkapazität war mit einer starken Apoptose-Induktion einhergehend - konnte in den Versuchen zum Bunsen-Roscoe-Gesetz nicht bestätigt werden. Hier traten trotz einer hohen Reparaturrate vermehrt tote Zellen in der Epidermis auf bzw. bei einer geringen Reparatur wurde kaum Apoptose induziert. Diese Ergebnisse geben starken Anlass zu der Annahme, dass die Bestrahlungsstärke einen Einfluss auf die Regulationsmechanismen der Strahlenantwort in humanen Hautzellen hat.

4.3 Impulsbetrieb

Als nächster Schritt des Projekts sollte die Wirkung von inkohärenter optischer Strahlung in gepulster Form sowohl bei variierender Impulswiederholffrequenz (mit konstanter Impulsdauer) als auch bei variierender Impulsdauer (mit konstanter Impulswiederholffrequenz) analysiert werden. Hierzu wurden drei verschiedene Impulswiederholffrequenzen f_p (50, 250, 500 Hz) bei 1 ms Impulsdauer sowie drei unterschiedliche Impulsdauern τ (1, 5, 10 ms) bei einer Impulswiederholffrequenz f_p von 50 Hz ausgewählt, wobei die Bestrahlung und Auswertung für die Parameter (50 Hz, 1 ms) in jeder Versuchsreihe mit einer Spenderhaut nur einmal erfolgte. Zudem wurden anhand der Ergebnisse aus dem Vorversuch und der Überprüfung des Bunsen-Roscoe-Gesetzes eine konstante Bestrahlung H von 900 J/m^2 bei einer konstanten Bestrahlungsstärke $E = 3 \text{ W/m}^2$ festgelegt, um die Gültigkeit des Bunsen-Roscoe-Gesetzes bei der Schadensinduktion zu gewährleisten und eine maximale Experimentdauer von 4 h nicht zu überschreiten. Auch in diesem Projektteil wurden vier unterschiedliche Spenderhäute untersucht. Die Bestrahlung mit den Parametern (50 Hz, 10 ms) wurde erst ab der dritten Spenderhaut mit in das Bestrahlungsproto-

koll aufgenommen, sodass für diese Impulsparameter lediglich die Ergebnisse aus zwei Spenderhäuten herangezogen werden können.

4.3.1 Induktion und Reparatur von DNA-Schäden

Für die Quantifizierung der DNA-Schäden wurde für jede der 44 Hautproben nach der CPD-Anfärbung standardmäßig die Fluoreszenz der Zellkerne in 20 Bildern bestimmt (= ca. 1300 Zellkerne). Insgesamt wurden somit in diesem Versuchsteil 880 Bilder und über 57000 Zellkerne ausgewertet. Im Folgenden ist die Quantifizierung der CPD-Schäden in der gesamten Epidermis direkt und 24 h nach Bestrahlung als Mittelwert aus den vier Spenderhäuten 13/18, 14/18, 17/18 und 18/18 bei variierender Impulswiederholffrequenz f_p (Abb. 4.25) sowie variierender Impulsdauer τ (Abb. 4.26) abzüglich der Kontrolle aufgeführt. Eine detaillierte Auftragung der basalen Schadensquantifizierung (Anh. 3, Abb. 1 und Anh. 3, Abb. 2) sowie der suprabasalen Schadensquantifizierung (Anh. 3, Abb. 3 und Anh. 3, Abb. 4) spezifisch für jede einzelne Spenderhaut ist dem Anhang zu entnehmen.

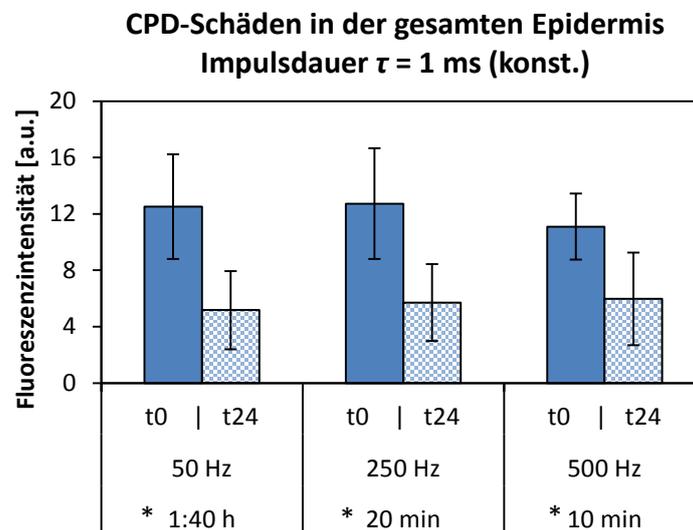


Abb. 4.25 Quantifizierung der CPDs direkt und 24 h nach Bestrahlung in der gesamten Epidermis. Konstante Impulsdauer $\tau = 1$ ms bei variierender Impulswiederholffrequenz. (*) = Experimentdauer.

Trotz unterschiedlicher Impulswiederholffrequenzen wurde in der Epidermis eine ähnliche Anzahl an DNA-Schäden induziert (Zeitpunkt t0). Die minimal geringere Fluoreszenzintensität bei einer Impulswiederholffrequenz von 500 Hz war nicht signifikant. Eine Variation der Impulswiederholffrequenz f_p sowie die damit einhergehende Änderung der Experimentdauer hatten somit keinen Einfluss auf die CPD-Induktion.

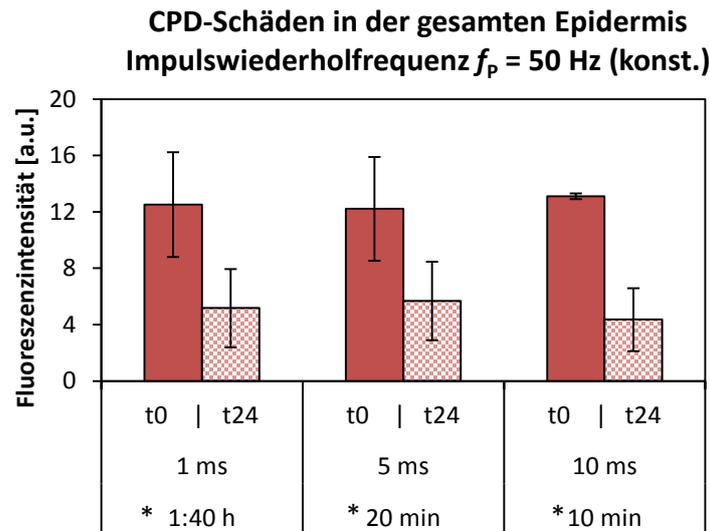


Abb. 4.26 Quantifizierung der CPDs direkt und 24 h nach Bestrahlung in der gesamten Epidermis. Konstante Impulswiederholffrequenz $f_p = 50$ Hz bei variierender Impulsdauer. (*) = Experimentdauer.

Ebenso zeigte die Variation der Impulsdauer τ keinen Effekt auf die CPD-Induktion in der Epidermis zum Zeitpunkt t0. Folglich bestand auch keine Abhängigkeit zu längeren Experimentdauern und höheren Impulsanzahlen bei niedrigen Impulsdauern. Die sehr geringe Standardabweichung bei einer Impulsdauer von 10 ms basierte auf der Mittelwertbildung aus lediglich zwei Spenderhäuten (17/18 und 18/18) mit fast identischen Werten. Zellschichtspezifisch ausgewertet ergaben sich die in Abb. 4.27 und Abb. 4.28 dargestellten Ergebnisse.

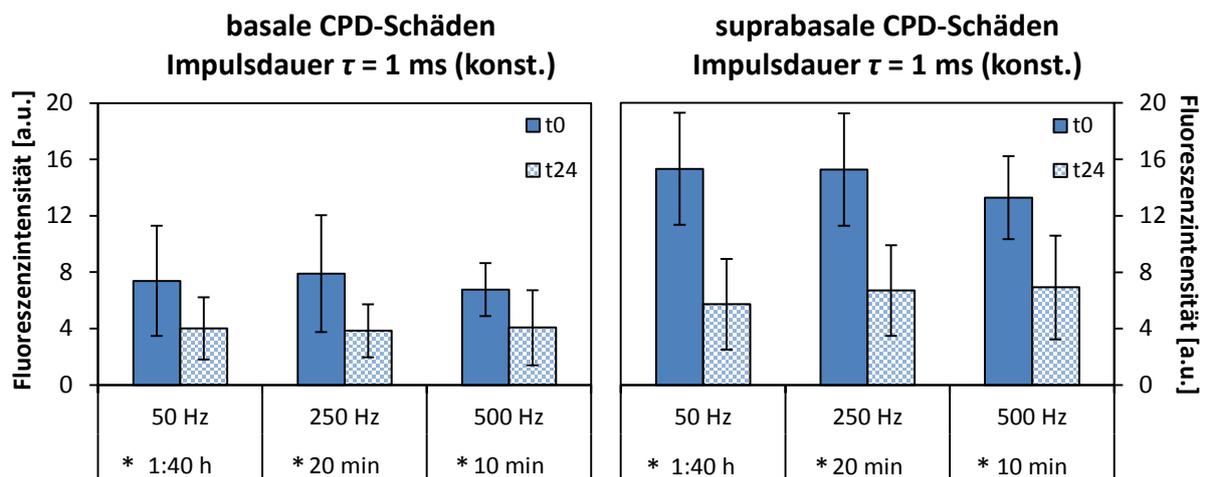


Abb. 4.27 Quantifizierung der CPDs nach Bestrahlung in der Basalzellschicht (links) und in suprabasalen Schichten (rechts). Konstante Impulsdauer $\tau = 1$ ms bei variierender Impulswiederholffrequenz. (*) = Experimentdauer.

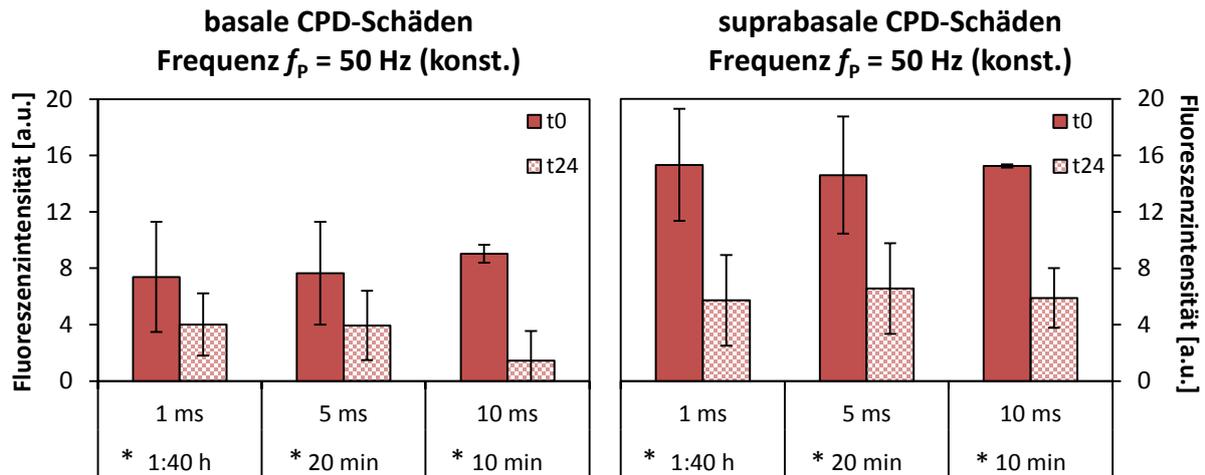


Abb. 4.28 Quantifizierung der CPDs nach Bestrahlung in der Basalzellschicht (links) und in suprabasalen Schichten (rechts). Konstante Impulswiederhol­frequenz $f_p = 50$ Hz bei variierender Impulsdauer. (*) = Experiment­dauer.

Unabhängig davon, ob die Impulswiederhol­frequenz oder die Impulsdauer variiert wurde, ergab sich nach der UV-Bestrahlung eine vergleichbare Anzahl an induzierten DNA-Schäden (getrennt nach basal und suprabasal) in der Haut. Zellschichtspezi­fisch betrachtet wurden in der Basalzellschicht weniger CPDs induziert als in den suprabasalen Zellschichten. Ein Reparat­ureffekt nach 24 h war in beiden Bereichen der Epidermis deutlich vorhanden. Verglichen mit den Fluoreszenzwerten der CPD-Induktion aus dem Vorversuch und den Bunsen-Roscoe-Untersuchungen bei gleicher Dosis und Bestrahlungsstärke wurden in diesem Projektteil deutlich weniger DNA-Schäden induziert. Ein möglicher Zusammenhang mit der Morphologie der Spenderhäute wird in einem späteren Abschnitt diskutiert.

Die Schadensverteilung in der Haut direkt nach Bestrahlung (t0) stellte sich auch bei unterschiedlichen Impulsparametern ungefähr gleichbleibend dar, da effektiv die gleiche Dosis appliziert wurde. In den oberen Hautschichten traten etwa im Verhält­nis 2:1 mehr DNA-Schäden auf als in der Basalzellschicht. Mit steigender Impuls­dauer zeigte sich die leichte Tendenz eines steigenden Quotienten, gleichbedeutend mit einer zunehmenden Schädigung in der Basalzellschicht (Abb. 4.29).

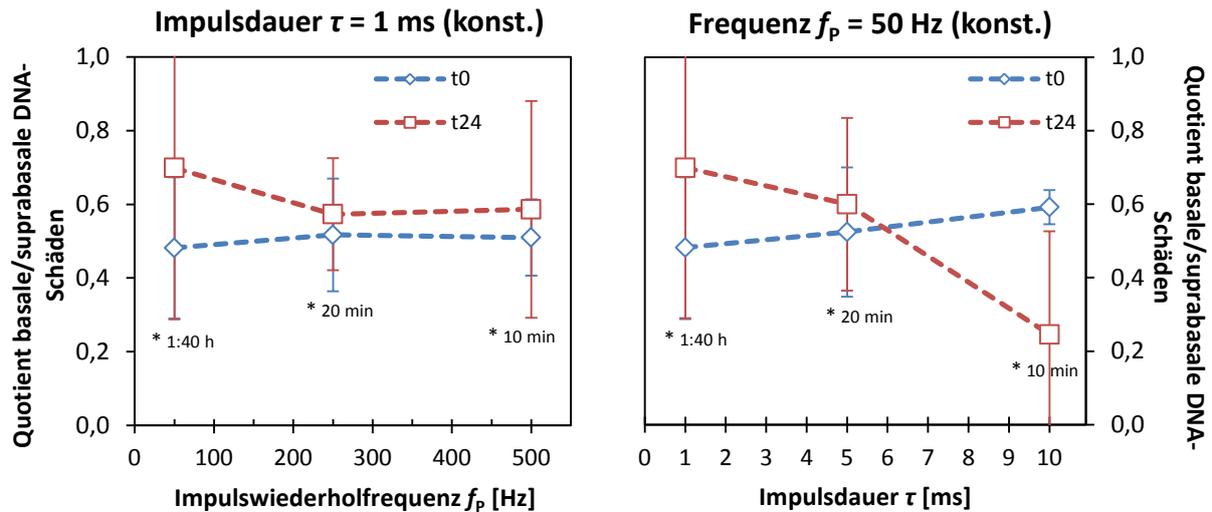


Abb. 4.29 Schadensverteilung in der Haut. Quotient aus mittlerer basaler und mittlerer suprabasaler CPD-Fluoreszenz mit Standardabweichung der vier Spenderhäute, (links) als Funktion der Impulswiederholfrequenz für $\tau = 1$ ms bzw. (rechts) in Abhängigkeit der Impulsdauer bei $f_p = 50$ Hz. (*) = Experimentdauer.

Anders als im Vorversuch und dem Bunsen-Roscoe-Projektteil, in denen die Reparatur der basalen Zellen effektiver ablief als in den suprabasalen Zellen, zeigte sich jedoch 24 h nach der Bestrahlung im Impulsbetrieb eine homogenere Schadensverteilung in Form eines höheren Quotienten. Dies bedeutet, dass entweder die suprabasalen Zellen im Vergleich zu früheren Spenderhäuten nun besser reparieren oder aber stattdessen die Basalzellen eine geringere Reparaturkapazität aufweisen und sich folglich die Schadensmengen in den Hautschichten angleichen. Infolge unterschiedlich starker Reparatur ergaben sich nach 24 h Schwankungen in der Verteilung der verbliebenen DNA-Schäden. Besonders deutlich trat dies bei den Parametern (50 Hz, 10 ms) auf, bei denen das zuvor bereits beschriebene Bild einer inhomogeneren Schadensverteilung durch starke Reparatur in den Basalzellen und vielen noch vorhandenen CPDs in den oberen Hautschichten zu beobachten war (Abb. 4.28 links). Zu berücksichtigen war hierbei wiederum die Tatsache, dass die Werte auf der Untersuchung von lediglich zwei Spenderhäuten unter diesen Bedingungen basierten.

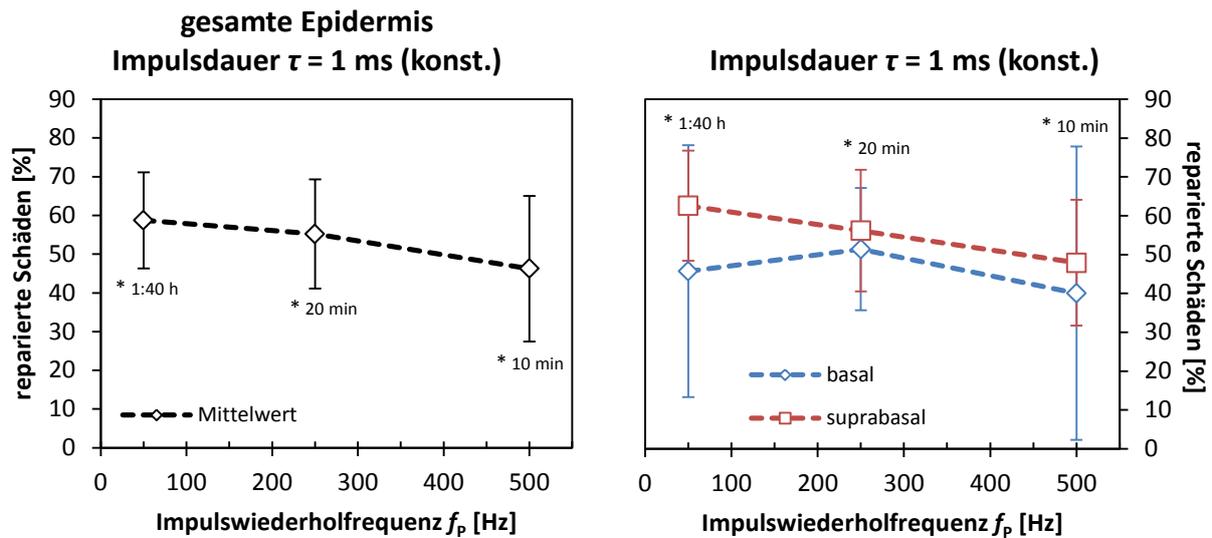


Abb. 4.30 Prozentualer Anteil an reparierten Schäden in der gesamten Epidermis (links) sowie in basalen und suprabasalen Zellen (rechts) 24 h nach Bestrahlung. Prozentuale Differenz der CPD-Fluoreszenz von t_0 zu t_{24} mit Standardabweichung der vier Spenderhäute. Konstante Impulsdauer $\tau = 1$ ms bei variierender Impulswiederholffrequenz. (*) = Experimentdauer.

Nach der Bestrahlung mit unterschiedlichen Impulswiederholffrequenzen lag der Anteil an reparierten Schäden nach 24 h auf ungefähr gleichem Niveau (zwischen ca. 50-60 %). Mit steigender Impulswiederholffrequenz zeigte sich eine leichte Tendenz zu geringeren Reparaturraten. Innerhalb des untersuchten Frequenzbereichs nahm die Reparatur um etwa 12,5 % ab (Abb. 4.30). Der Reparatureffekt in den oberen Zellschichten war ungefähr so groß wie die Reparatur der Basalzellen und verringerte sich ebenfalls mit steigender Impulswiederholffrequenz. Die größte Differenz zwischen basaler und suprabasaler Reparaturrate trat bei (50 Hz, 1 ms) auf.

Die Variation der Impulswiederholffrequenz bewirkte keine Änderung bezüglich der Anzahl der applizierten Impulse, jedoch verlängerte sich die Experimentzeit bei niedrigen Frequenzen. Folglich bestand auch eine Abhängigkeit der Reparaturrate von der Experimentdauer, da die prozentuale Reparatur bei zunehmender Experimentdauer leicht anstieg. Gleiches konnte bereits bei den Untersuchungen zum Bunsen-Roscoe-Gesetz festgestellt werden (Vergleich Abb. 4.22). Insgesamt ergab sich somit ein Einfluss der Impulswiederholffrequenz und der Experimentdauer auf die DNA-Reparatur.

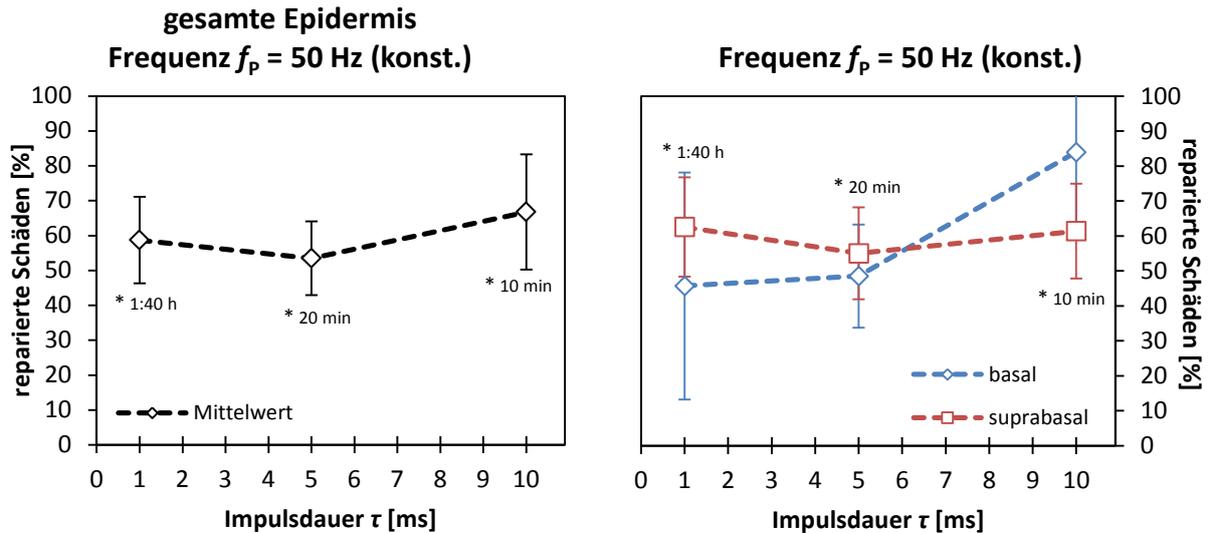


Abb. 4.31 Prozentualer Anteil an reparierten Schäden in der gesamten Epidermis (links) sowie in basalen und suprabasalen Zellen (rechts) 24 h nach Bestrahlung. Prozentuale Differenz der CPD-Fluoreszenz von t_0 zu t_{24} mit Standardabweichung der vier Spenderhäute. Konstante Impulswiederhol­frequenz $f_p = 50$ Hz bei variierender Impulsdauer. (*) = Experimentdauer.

Die prozentuale Reparatur nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Impulsdauern variierte und zeigte bei 10 ms Impulsdauer eine um 8 bzw. 13 % erhöhte Reparatur­rate im Vergleich zu kürzeren Impulsdauern (Abb. 4.31). Die basale Reparatur­kapazität lag bei 10 ms Impulsdauer etwa 23 % über der suprabasalen Reparatur­rate. Dies ist wiederum übereinstimmend mit den Ergebnissen aus dem Bunsen-Roscoe-Projektteil, wo bei 10 ms Impulsdauer und einer Impulswiederhol­frequenz von 50 Hz die Basalzellen ca. 18 % mehr DNA-Läsionen reparierten als die suprabasalen Zellen. Zu berücksichtigen ist, dass bei (50 Hz, 10 ms) nur zwei Spenderhäute unter­sucht wurden und die Ergebnisse daher mit Vorsicht interpretiert werden müssen.

Kurze Impulsdauern bedeuten bei gleichbleibender Impulswiederhol­frequenz nicht nur längere Experimentzeiten, sondern auch eine zunehmende Anzahl an Impulsen zum Erreichen einer identischen Dosis, sodass eine verstärkt „gepulste“ Charakteristik im Vergleich zu langen und daher wenigen Impulsen entstand. Je gepulster die Bestrahlung, desto mehr sank die Reparatur­rate in den basalen Zellen, während wenige, lange Impulse zu einer verbesserten Reparatur führten. Ein vermeintlicher Ein­fluss auf die CPD-Reparatur durch kurze Impulsdauern, lange Experimentzeiten und eine hohe Anzahl an applizierten Impulsen konnte jedoch in den suprabasalen Schichten und bei Betrachtung der gesamten Epidermis nicht eindeutig festgestellt und somit die Abhängigkeit der Reparatur von der Experimentdauer aus den bisherigen Ergebnissen nicht bestätigt werden. Dies deutet eventuell darauf hin, dass die Impulsdauer einen größeren biologischen Effekt als die Impulswiederhol­frequenz hat und den bei gepulster Bestrahlung ansonsten konsistenten Einfluss der Experiment­dauer auf die Reparatur überlagert. Die aus den Daten aufgezeigten Tendenzen be­ruhen vor allem auf den Werten für (50 Hz, 10 ms), die lediglich aus zwei Spender­häuten stammten. Dies muss wiederum bei der Beurteilung der Bedeutung und Aus­sagekraft dieser Ergebnisse berücksichtigt werden.

4.3.2 Einfluss der Spenderhaut-Morphologie

Einige der in diesem Projektteil detektierten Abweichungen zu den Ergebnissen des Vorversuchs und des Bunsen-Roscoe-Teils könnten möglicherweise auch auf die Morphologie der verwendeten Spenderhäute zurückzuführen sein.

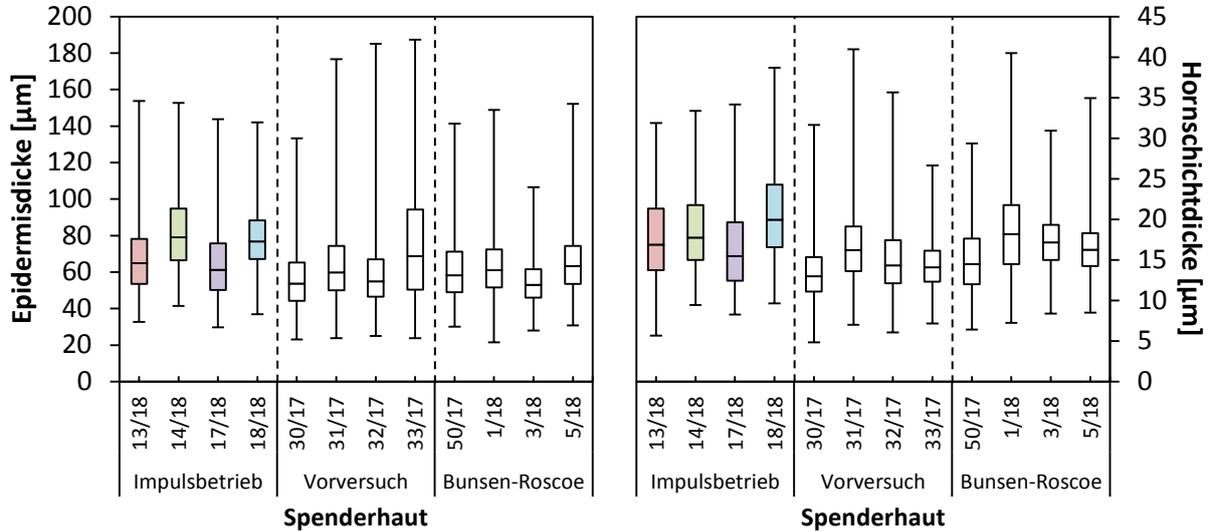


Abb. 4.32 Dicke der Epidermis (links) und der Hornschicht (rechts) der verschiedenen Spenderhäute. Die Whisker stellen die kleinste und größte Epidermis- bzw. Hornschichtdicke dar. Ergebnisse aus 840ig-facher Vermessung der Epidermis- und Hornschichtdicke an unterschiedlichen Positionen. Für den direkten Vergleich sind auch die im Vorversuch sowie die im Bunsen-Roscoe-Projektteil genutzten Spenderhäute dargestellt.

In Abb. 4.32 sind die Epidermis- und die Hornschichtdicken der verwendeten Spenderhäute aus dem Projektteil des Impulsbetriebs dargestellt. Die Morphologie unterschied sich in einigen Gesichtspunkten von den Spenderhäuten aus dem Vorversuch und dem Bunsen-Roscoe-Projektteil. Die Epidermis der im Impulsbetrieb untersuchten Spenderhäute war im Mittel rund 10 µm dicker, die Schwankungsbreite fiel vergleichbar aus. Zudem besaßen sie eine dickere Hornschicht, was die vergleichsweise deutlich geringere Anzahl an induzierten CPDs sowohl in der Basalzellschicht als auch suprabasal durch eine verstärkte Absorption der UV-Strahlung an der Hautoberfläche erklärt (Vergleich Abb. 4.27 und Abb. 4.28). Die merklich dickere Epidermis könnte sich zudem auf die Analyse der Reparaturkapazität ausgewirkt haben. Zu den suprabasalen Zellen wurden nun auch viele Hautzellen aus tieferen Schichten der Epidermis gezählt, die zwar keine Basalzellen darstellen, jedoch durch ihren geringen Differenzierungsgrad und ihr hohes Proliferationspotential im Allgemeinen eine hohe Reparaturkapazität aufweisen (MITCHELL 1990) und daher die Gesamtreparaturreate aller suprabasalen Zellen erhöhen. Dies würde zusätzlich begründen, warum die in den vorherigen Untersuchungen erhaltene durchweg höhere Reparaturkapazität der basalen Zellen im Vergleich zu den suprabasalen Zellen in diesem Projektteil nicht gezeigt werden konnte (Vergleich Abb. 4.30 und Abb. 4.31).

4.3.3 Induktion von Apoptose bei gepulster Exposition

Als weiterer biologischer Endpunkt wurde die Induktion der Apoptose in der Epidermis 24 h nach UV-Bestrahlung bestimmt. In Abb. 4.33 ist die Auswertung der Caspase-3-Färbung in der Epidermis gemittelt aus den Ergebnissen der vier Spenderhäute 13/18, 14/18, 17/18 und 18/18 abzüglich der Kontrolle aufgetragen. Eine detaillierte Auftragung der relativen Apoptose-Induktion nach Bestrahlung spezifisch für jede einzelne Spenderhaut ist dem Anhang zu entnehmen (Anh. 3, Abb. 5 und Anh. 3, Abb. 6).

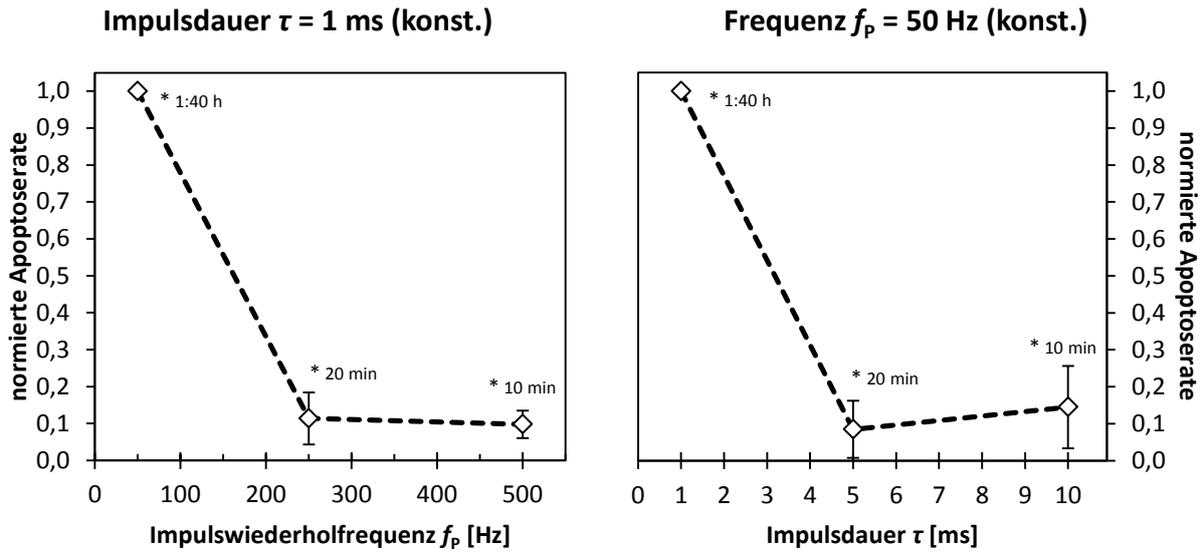


Abb. 4.33 Quantifizierung der Apoptose-Induktion in der gesamten Epidermis 24 Stunden nach Bestrahlung. Relative Anzahl apoptotischer Zellen pro Sichtfeld und mm Epidermisdicke als Apoptoserate normiert auf den Maximalwert der jeweiligen Spenderhaut. Mittelwert über die vier Spenderhäute mit Standardabweichung. (*) = Experimentdauer.

Sowohl bei der Variation der Impulswiederholfrequenz als auch der Impulsdauer zeigte sich der Effekt einer auffällig erhöhten Apoptoserate nach der Bestrahlung mit den Impulsparametern (50 Hz, 1 ms). Mit steigender Impulswiederholfrequenz nahm die Apoptose im untersuchten Frequenzbereich dann um 90 % ab. Ab einer Frequenz > 250 Hz konnte keinen Einfluss durch die Variation detektiert werden und die Apoptoserate lag auf einem gleichbleibend niedrigen Niveau. Bei einer konstanten Impulsdauer war auch die Impulsanzahl konstant. Der Unterschied bei verschiedenen Impulswiederholfrequenzen bestand lediglich darin, welcher Zeitabstand zwischen den applizierten Impulsen lag. Mit niedriger Frequenz nahm daher die Experimentdauer zu. Es zeigte sich, dass mit abnehmender Experimentdauer weniger Zellen in den Zustand der Apoptose traten.

Ähnliches ergab die Analyse der Apoptose bei unterschiedlichen Impulsdauern. Mit zunehmender Impulsdauer zeigte sich im untersuchten Bereich eine ungefähr 89 %ige Abnahme der Apoptose-Induktion. Für Impulsdauern > 5 ms blieb die Apoptoserate ungefähr gleich. Zusätzlich bestand eine Abhängigkeit der Apoptose-Induktion von der Impulsanzahl und der Experimentdauer. Je gepulster die UV-Exposition

(kleine τ , hohe Anzahl an Impulsen) bzw. je länger die Experimentdauer, desto mehr apoptotische Zellen traten auf. Eine Bestrahlung mit hohen Impulsdauern τ und kleiner Anzahl an Impulsen bei kurzen Experimentzeiten bewirkte eine geringere Apoptose-Induktion. Bezogen auf die Apoptose-Induktion scheint UV-Strahlung effektiver, je gepulster sie appliziert wird.

Aus den Ergebnissen in diesem Projektteil ist kein Zusammenhang zwischen der DNA-Reparatur und der Apoptoserate zu vermuten. Bei der Apoptose war ein auffällig starker Effekt zwischen Impulswiederholfräquenzen von 50-250 Hz bzw. zwischen 1-5 ms Impulsdauer zu beobachten. Auf der Reparaturebene konnte in diesen Bereichen jedoch kein deutlicher Effekt gezeigt werden. Das Auftreten der hohen Apoptoseraten, obwohl die DNA-Reparatur kaum Veränderungen zeigte, müsste in weiterführenden Analysen erörtert werden.

Insgesamt war die absolute Anzahl an apoptotischen Zellen ohne Normierung in diesem Projektteil allgemein recht niedrig. Im Vergleich zu den Daten aus der Überprüfung des Bunsen-Roscoe-Gesetzes (3,2 apoptotischen Zellen/Sichtfeld*mm), bei dem gepulste Bestrahlung mit 10 ms Impulsdauer und 50 Hz Impulswiederholfräquenz genutzt wurde, wurde im Projektteil des Impulsbetriebs bei gleichen Parametern nur die Hälfte der Apoptoserate erreicht (1,7 apoptotische Zellen/Sichtfeld*mm).

5 Diskussion

Vorversuch „Dynamikbereich der Haut“

Mit steigender Bestrahlung nahm die Anzahl an DNA-Schäden in der Epidermis zu. Im Dosisbereich von 0-1500 J/m² lag ein linearer Dosisseffekt der CPD-Induktion vor, bei weiter steigender Dosis setzte dann vermutlich eine Sättigung ein, die möglicherweise auch färbebedingt ist. In der Basalzellschicht wurde eine ca. 20 % stärkere Reparatur der CPDs detektiert als in suprabasalen Zellen. Zudem verringerte sich mit steigenden Dosen die Gesamtreparatur in der Epidermis um 60 % und die Anzahl der apoptotischen Zellen nahm deutlich zu.

Es erscheint plausibel, dass bei höherer Bestrahlung der potentielle Schaden im biologischen Material zunimmt, nicht nur in Form der CPDs, sondern auch durch eine gestörte Reparatur, wodurch wiederum vermehrt Apoptose induziert wird. Mit zunehmender Schadensinduktion werden die Hautzellen durch die UV-Strahlung so stark geschädigt, dass die Reparatursysteme beeinträchtigt sind und folglich das Mutationsrisiko steigt. Eine weniger effiziente DNA-Reparatur kann Mutationen in Genen zur Folge haben, die für die Photokarzinogenese entscheidend sind. UV-geschädigte Zellen leiten in der Folge oft die Apoptose ein, vermutlich, um solche Zellen mit potentiell gefährlichen Mutationen am Proliferieren zu hindern und Folgeschäden zu vermeiden.

Auffällig bei den Untersuchungen war eine sehr hohe interindividuelle Variabilität sowohl bei der Reparaturrate als auch bei der Apoptose- und der CPD-Induktion. Die Haut ist ein biologisches System, welches mit seinen Eigenschaften Einfluss auf die Stärke der Schädigung der Hautzellen, aber auch auf sekundäre zelluläre Prozesse wie die Reparaturkapazität hat. Zu den vielen verschiedenen Einflussfaktoren zählen unter anderem das Alter der Spender, genetische Faktoren und die Morphologie der Haut wie die Epidermis- und Hornschichtdicke. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Probandenalter der in diesen Untersuchungen verwendeten Spenderhäute und der Reparaturkapazität konnte nicht festgestellt werden, siehe Anh. 4, Abb. 1.

Bei der Auswertung der Induktion von DNA-Schäden nach Bestrahlung ergaben sich oft starke interindividuelle Schwankungen in den CPD-Leveln der verschiedenen Spenderhäute. Teilweise variierten die Fluoreszenzwerte um den Faktor fünf. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Studien, in denen sich die interindividuellen Photoproduktmengen sogar um das 15-30-fache unterschieden (ZHAO2002). Zu einem gewissen Anteil kann diese Variation durch das Alter und den Hauttyp der Spender erklärt werden. Xu et al. (2000) konnten eine Korrelation des Alters mit der Menge der Photoprodukte nachweisen, wobei mit zunehmendem Alter der Probanden auch die Anzahl der UV-induzierten DNA-Schäden stieg (XU2000). Die verschiedenen Hauttypen unterscheiden sich in ihrem Schutz vor der Induktion von CPDs, wobei ein großer Zusammenhang mit der Pigmentierung der Haut besteht.

UV-Strahlung dringt unterschiedlich weit in die Haut ein, abhängig von der Absorption und Streuung im Gewebe. Je nach Dosis entstehen somit unterschiedlich starke Schädigungen in den verschiedenen Zellschichten. Die Eindringtiefe ist aber auch von der Pigmentierung abhängig. Die Pigmentierung der Haut spielt nicht nur eine wichtige Rolle in Bezug auf UV-induzierte DNA-Schäden, sondern auch für die Einlei-

tion von Apoptose. Die Menge des Melanins korreliert invers mit der Anzahl der durch UV-Exposition entstehenden CPDs. So fällt zum einen die CPD-Induktion in stark pigmentierter Haut insgesamt geringer aus, zum anderen wird vor allem die untere Epidermis mit der Basalzellschicht effektiver vor UV-Schädigungen geschützt, da die Pigmentierung als effizienter UV-Filter fungiert. Zudem werden UV-geschädigte Zellen in pigmentierter Haut effektiver entfernt, da das Vorhandensein von Melanin in den Zellen die Apoptose-Induktion fördert. So fanden Yamaguchi et al. in ihren Untersuchungen nach Bestrahlung mit 1 MED UV nur 1 % apoptotische Zellen in heller Haut, obwohl alle epidermalen Zellen signifikante DNA-Schäden aufwiesen. In dunkler Haut hingegen waren weniger als 50 % der Epidermiszellen geschädigt, die Apoptoserate lag jedoch fünf- bis siebenmal so hoch wie bei heller Haut (YAMAGUCHI2006; YAMAGUCHI2008). Die Pigmentierung der Haut stellt somit einen wichtigen Einflussfaktor bei der Untersuchung UV-induzierter DNA-Schädigung und Apoptose sowie eine weitere mögliche Begründung der interindividuellen Unterschiede zwischen den verschiedenen Spenderhäuten dar.

Neben den individuellen Variabilitäten in der Dimer-Entstehung und der Apoptose-Induktion, die überwiegend auf das Alter, die Hautmorphologie und die Pigmentierung zurückzuführen sind, traten auch große Diskrepanzen bei den DNA-Reparatur-Kinetiken nach UV-Bestrahlung auf, bei denen möglicherweise auch Unterschiede in anderen Faktoren, welche die p53-Antwort regulieren, eine Rolle spielen (LING2001).

Überprüfung des Bunsen-Roscoe-Gesetzes

Das Konzept der Reziprozität von Bestrahlungsstärke und Expositionszeit besagt, dass ein photochemischer oder photobiologischer Effekt lediglich von der verabreichten Dosis abhängig und somit direkt proportional zur Bestrahlung H ist. Diese Regel von Bunsen und Roscoe ist im Allgemeinen für einfache photochemische Reaktionen (in einem gewissen Dosisbereich) gültig. Darüber hinaus ist das Bunsen-Roscoe-Gesetz vielfach auch in komplexeren biologischen Systemen anwendbar, jedoch wurde genauso oft auch die Ungültigkeit beschrieben (KELFKENS1991). Eine lineare Dosisabhängigkeit unabhängig von der Strahlungsstärke ist für lebende Organismen eher unwahrscheinlich, da ihre Reaktionen auf elektromagnetische Strahlung komplex und durch wechselwirkende Effekte geprägt sind. Variationen wie eine Fraktionierung der Bestrahlung bei gleichbleibender Dosis könnten zusätzlich Einfluss auf die Reaktion haben. Nur wenige Studien haben sich der Gültigkeit des Bunsen-Roscoe-Gesetzes in der experimentellen und angewandten Photomedizin/-biologie gewidmet, wobei größtenteils eine Beeinflussung durch die Stärke der Bestrahlung und somit eine sehr eingeschränkte oder keine Anwendbarkeit der Reziprozitätsregel nachgewiesen werden konnte. Hierzu zählen beispielsweise UV-induzierter Zelltod, UV-Karzinogenese (in der Maus), Psoralen-Photochemie und niederenergetische Lasertherapie (SCHINDL2001).

Im Vergleich von kontinuierlicher und gepulster UV-Exposition bei variablen Bestrahlungsstärken ergab sich kein quantitativer Unterschied in Bezug auf den biologischen Endpunkt der CPD-Induktion. Für die Induktion von DNA-Schäden konnte das Bunsen-Roscoe-Gesetz im Bestrahlungsstärkenbereich von 0,3 bis 3 W/m² bestätigt werden. Eine niedrigere Bestrahlungsstärke von 0,125 W/m² bzw. längere Experimentdauer (> 50 min) bewirkte eine leicht erhöhte CPD-Fluoreszenzintensität, die

wohmöglich durch eine Lockerung des Chromatins bereits während der UV-Exposition infolge von Signaltransduktion sowie beginnender Reparatur der DNA-Schäden begründet ist. Hierdurch wäre die DNA empfindlicher gegenüber der UV-Strahlung und es würde eine (geringfügig) höhere Anzahl an DNA-Läsionen in den Hautzellen induziert. Diese Ergebnisse implizieren, dass Arbeitnehmer, die über lange Zeit eher geringen Bestrahlungsstärken ausgesetzt sind, ein erhöhtes Hautkrebsrisiko tragen könnten. Möglicherweise ist der Effekt der erhöhten CPD-Induktion bei noch kleineren Bestrahlungsstärken deutlicher ausgeprägt und wird folglich arbeitsschutzrelevant. Um dies zu überprüfen, bedarf es weiterer Untersuchungen mit entsprechenden Bestrahlungsparametern, die beispielsweise in Zellkultur durchgeführt werden könnten.

Die Reziprozitätsregel besaß für die DNA-Reparatur keine Gültigkeit, da eine Variation der Bestrahlungsstärke die Reparaturkapazität beeinträchtigte. Mit steigender Bestrahlungsstärke nahm die Reparaturrate sowohl bei kontinuierlicher als auch bei gepulster Bestrahlung deutlich ab. Ein minimaler Unterschied zwischen kontinuierlicher und gepulster UV-Exposition konnte lediglich bei einer Bestrahlungsstärke von 3 W/m^2 detektiert werden. Dort lag die Reparaturkapazität nach gepulster Bestrahlung etwas höher. Die Reparatur der DNA-Schäden in der Basalzellschicht fiel wiederum stärker aus als in den suprabasalen Schichten. Mit einer etwa 15-19 % höheren prozentualen Reparaturrate war dies übereinstimmend mit den Ergebnissen aus dem Vorversuch („Dynamikbereich der Haut“), wo die basalen Epidermiszellen nach 24 Stunden durchschnittlich 20 % mehr Läsionen entfernten als suprabasale Zellen. Ebenso wie die Induktion zeigte auch die CPD-Reparatur eine mögliche Abhängigkeit von der Experimentdauer. Mit längeren Experimentzeiten stieg die prozentuale Reparatur deutlich an. Ursächlich war vermutlich eine bereits beginnende DNA-Reparatur schon während der UV-Exposition, wodurch CPDs schon nach und nach in der Zeit der Bestrahlung und somit schlussendlich schneller entfernt werden konnten. Bei der gepulsten Exposition kam als möglicher Einflussparameter zusätzlich zu der langen Experimentdauer auch der Faktor der Anzahl an Impulsen hinzu. Je mehr Impulse appliziert wurden bzw. je geringer die jeweilige Dosis pro Impuls ausfiel, desto besser war die CPD-Reparatur.

Die Auswertung der Apoptose nach 24 h ergab fast keinen Unterschied zwischen gepulster und kontinuierlicher Bestrahlung. Nur bei niedrigen Bestrahlungsstärken ($E = 0,125 \text{ W/m}^2$) war eine gepulste Applikation der UV-Strahlung effizienter in der Induktion von Apoptose als kontinuierliche Bestrahlung, was zum einen mit der steigenden Anzahl an Impulsen oder zum anderen mit der sehr viel längeren Experimentdauer im Vergleich zur kontinuierlichen Bestrahlung zusammenhängen könnte. Ähnliche Effekte stark vermehrten Zelltods nach fraktionierter Bestrahlung (mit UVA) wurden bereits in frühen Experimenten zum Bunsen-Roscoe-Gesetz in Zellkultur gefunden (ROSADO-SCHLOSSER1998). Eine Abhängigkeit der Apoptoserate von der Bestrahlungsstärke bzw. der damit verbundenen Experimentzeit äußerte sich in einem starken Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellen mit kleinen Bestrahlungsstärken bzw. langen Experimentdauern. Lediglich im Bereich von 1 bis 3 W/m^2 war das Bunsen-Roscoe-Gesetz gültig.

Ähnliche Ergebnisse wurden in Studien gefunden, in denen eine Verringerung der Bestrahlungsstärke einhergehend mit einer Verlängerung der Experimentdauer bei gleichbleibender Dosis die karzinogene Wirksamkeit von UVB-Strahlung erhöhte, was sich in Form eines signifikant schnelleren Tumorwachstums auf der Haut be-

strahlter Mäuse äußerte (KELFKENS1991; FORBES1983). Dies deutet auf eine höhere Anzahl an Mutationen hin, die entweder durch eine gesteigerte Anzahl an DNA-Schäden oder eine gestiegene Mutationsrate pro Läsion entstanden sind. Eine höhere Anzahl an DNA-Schäden könnte auf die Lockerung der DNA zur Reparatur während der Bestrahlung zurückzuführen sein, wodurch die DNA anfälliger würde. Eine erhöhte Mutationsrate könnte mit einer verlängerten Reduktion der RNA- und Proteinsynthese durch die lange Bestrahlung und infolge dessen schlechterer DNA-Reparatur zu erklären sein. In den Versuchen des vorliegenden Projektes stieg bei langen Experimentdauern bzw. niedrigen Bestrahlungsstärken die Reparatur- und Apoptoserate an.

Allgemein betrachtet zeigten die Ergebnisse der Überprüfung der Reziprozitätsregel Abhängigkeiten von der Bestrahlungsstärke, der Experimentdauer und (bei gepulster Bestrahlung) der Anzahl an applizierten Impulsen. Je niedrig die Bestrahlungsstärke E , je länger die Experimentdauer t und je höher die Impulsanzahl, desto mehr Reparatur, mehr Apoptose und (wenn auch nur minimal) mehr CPD-Induktion traten auf. Die vermehrte Reparaturrate bei zunehmender Schädigung stand, ebenso wie die geringe Apoptose-Induktion bei geringer Reparaturkapazität, in Widerspruch zu den Ergebnissen aus dem Vorversuch. Insgesamt zeigten die Bestrahlungsstärke und möglicherweise auch die Experimentdauer einen Einfluss auf die Regulationsmechanismen der Strahlenantwort in humanen Hautzellen. Ein applikationsbedingter Effekt konnte nicht beobachtet werden, weshalb die Anwendbarkeit des Akkumulationsprinzips für gepulste inkohärente optische Strahlung angenommen werden kann. Photophysikalische/photochemische Effekte schienen durch die Biologie überlagert zu werden, weshalb das Bunsen-Roscoe-Gesetz für die untersuchten Endpunkte keine oder nur eine eingeschränkte Gültigkeit besaß.

Die Daten geben starken Anlass zu der Annahme, dass die Reziprozitätsregel im humanen System nur bedingt angewendet werden kann und ihre Validität für jede Bestrahlung und für jede Reaktion individuell bestimmt werden muss. Dies wiederum bestätigt, dass die Gültigkeit der Reziprozitätsregel nach Bunsen und Roscoe in den meisten Fällen beschränkt ist (SCHINDL2001).

Impulsbetrieb

Für die Variation der Impulswiederholffrequenz f_p sowie die damit einhergehende Änderung der Experimentdauer konnte keinen Einfluss auf die Induktion von Cyclobutanpyrimidindimeren detektiert werden. Die Verteilung der DNA-Schäden in der Epidermis direkt nach Bestrahlung und nach 24 h Reparaturzeit war bei unterschiedlichen Impulswiederholffrequenzen ungefähr gleichbleibend. In den oberen Hautschichten wurden etwa doppelt so viele DNA-Schäden induziert wie in der Basalzellschicht. Mit steigender Impulswiederholffrequenz nahm die Reparaturrate um ca. 13 % ab. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dem Vorversuch und dem Bunsen-Roscoe-Projektteil bestand kein Unterschied zwischen der basalen und der supraba-salen Reparaturkapazität. Eine Abhängigkeit der Reparaturrate von der Experimentdauer äußerte sich durch eine leicht ansteigende prozentuale Reparatur bei zunehmender Experimentdauer, wie es auch schon bei den Versuchen zum Bunsen-Roscoe-Gesetz beobachtet werden konnte. Mit steigender Impulswiederholffrequenz nahm die Apoptoserate im untersuchten Frequenzbereich um ca. 90 % ab. Je kürzer die Experimentdauer, desto weniger tote Zellen wurden detektiert.

Auch eine Änderung der Impulsdauer τ hatte keinen Effekt auf die CPD-Induktion, sodass folglich auch keine Abhängigkeit zur Experimentdauer und der Impulsanzahl bestand. Das Verhältnis der DNA-Schäden in der Basalzellschicht zu den oberen Hautschichten betrug direkt nach Bestrahlung etwa 0,5-0,6, wobei eine höhere Impulsdauer tendenziell zu einer zunehmenden Schadensinduktion in der Basalzellschicht führte. Aufgrund vermehrter basaler Reparatur fiel der Quotient der Schadensverteilung in der Haut nach 24 h mit zunehmenden Impulsdauern ab. Bei langer Impulsdauer zeigte sich eine um 8-13 % erhöhte Reparaturrate im Vergleich zu kürzeren Impulsdauern. Es konnte keine höhere Reparatur der basalen Zellen detektiert werden, mit einer Ausnahme bei 10 ms Impulsdauer (und 50 Hz), den Parametern, die auch schon bei der gepulsten Bestrahlung im Bunsen-Roscoe-Projektteil verwendet wurden und bei denen die Basalzellen eine deutlich höhere Reparaturkapazität als die suprabasalen Zellen aufwiesen. Insgesamt wurde kein eindeutiger Einfluss der Impulsdauer, der Experimentzeit und der Anzahl an applizierten Impulsen auf die CPD-Reparatur festgestellt. Bei zunehmender Impulsdauer zeigten sich im untersuchten Bereich eine etwa 89 %-ige Abnahme der Apoptose-Induktion und somit auch eine Abhängigkeit der Apoptoserate von der Impulsanzahl und der Experimentdauer.

Auffällig bei den Reparaturergebnissen nach gepulster UV-Bestrahlung war die geringe basale Reparaturkapazität im Vergleich zu den suprabasalen Zellen. Die einzige Ausnahme stellten die Impulsparameter von 10 ms Impulsdauer und 50 Hz Impulswiederholrfrequenz dar. Die Signifikanz dieser Ergebnisse sollte jedoch aufgrund der Auswertung von einer geringeren Anzahl an Spenderhäuten für diese Parameter und großen Standardabweichungen nicht zu hoch angesehen werden. Die Abweichungen zu den vorherigen Reparaturkapazitäten der basalen und suprabasalen Schichten können eventuell auch auf die veränderte Morphologie der Spenderhäute (dickere Epidermis und Hornschicht) zurückzuführen sein. Aufgrund einer auffällig hohen Apoptoserate trotz geringer Änderungen der Gesamt-Reparaturrate kann kein Zusammenhang zwischen der Apoptose-Induktion und der Persistenz von DNA-Schäden infolge schlechter Reparatur vermutet werden.

Insgesamt war bei den beiden variierenden Impulsparametern die Apoptoserate davon abhängig, wie stark gepulst und in welcher Zeitdauer die UV-Exposition durchgeführt wurde. Die längste Experimentdauer im impulsbetrieb war 5-mal bzw. 10-mal so lang wie die beiden anderen Zeiten. Je gepulster die UV-Exposition bzw. je länger die Experimentdauer, desto schädlicher war die UV-Strahlung, wenn als Maß für die Schädigung die Anzahl apoptotischer Zellen herangezogen wurde. Eine verstärkte Apoptose-Induktion mit zunehmender Experimentdauer zeigte sich durchgängig in allen Projektteilen. Möglicherweise wird durch die Veränderung des Chromatins schon während der Bestrahlung nicht nur (teilweise) die DNA-Reparatur verstärkt, sondern auch die Einleitung der Apoptose schneller getriggert, um einer übermäßigen Schadensakkumulation in der gelockerten DNA entgegenzuwirken.

Im Allgemeinen wurde aus den Bestrahlungsexperimenten mit gepulster UV-Strahlung deutlich, dass die Anzahl der applizierten Impulse und die Experimentdauer einen Einfluss auf die DNA-Reparatur, die Apoptose und weniger stark auch auf die CPD-Induktion hatten. Bei den Untersuchungen zum Reziprozitätsgesetz von Bunsen und Roscoe spielte der Faktor der Impulsanzahl bei konstanter Impulsdauer eine Rolle. Im Randbereich der verwendeten Bestrahlungsstärken wurden entweder viele Impulse mit geringer Dosis über eine lange Zeit oder wenige Impulse mit hoher Dosis in kurzer Zeit appliziert. Im Impulsbetrieb variierte neben der Impulsanzahl auch die Impulsdauer bei gleichbleibender Bestrahlungsstärke. Viele kurze Impulse bedeuteten dabei eine verstärkt „gepulste“ Charakteristik. Zusammenfassend ergab sich dabei, dass eine stärker gepulste Applikation und lange Experimentdauern als wohlmöglich schädlicher wahrgenommen wurden, da die Zellen vermehrt durch höhere Reparatur und Apoptose reagierten. Eine stärkere Reparatur mit zunehmender Schädigung steht allerdings im Widerspruch zu den Untersuchungsergebnissen des Vorversuch. Allgemein kann jedoch festgehalten werden, dass eine steigende Impulsanzahl und eine Erhöhung der Experimentdauer eine Verstärkung von biologischer Antworten der Haut auf die UV-Bestrahlung zur Folge haben und dass diese Beobachtungen weiterer Untersuchungen bedürfen. Zudem beinhaltete das Spektrum der genutzten Strahlenquelle trotz Filter noch einen gewissen Anteil Infrarot-Strahlung. Auswirkungen der IR-Strahlung auf zellspezifische Mechanismen gerade bei sehr langen Experimentzeiten sind nicht auszuschließen und müssten weiter untersucht werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieses Projekts wurden in sehr ähnlichen Versuchen von Bauer et al. (2018) zum einen eine stark erhöhte Schädlichkeit gepulster im Vergleich zu kontinuierlicher UV-Strahlung sowie zum anderen sehr deutliche Effekte durch die Variation von Impulsdauer und Impulswiederholffrequenz gezeigt (BAUER2018). Diese Daten können als erste Anhaltspunkte dienen, eine direkte Gegenüberstellung mit den Ergebnissen dieses Projekts ist jedoch nicht möglich, da die Untersuchungen in der Studie an Sporenfilmen durchgeführt und als biologischer Endpunkt die Desinfektionsrate herangezogen wurden. Die menschliche Haut ist im Vergleich zu den Sporen ein viel komplexeres biologisches System, das auf zelluläre Schädigungen von Grund auf unterschiedlich reagiert als die SOS-Antwort in Sporen. Die Größe und Ordnung des Genoms von Säugetierzellen und Bakterien unterscheiden sich stark und Bakterienchromosomen enthalten kein Chromatin. Zudem wurden bei den Sporenfilmen zunächst alle Schäden akkumuliert und erst nach der Bestrahlung die Prozessierung begonnen, wohingegen in der Haut schon während der UV-Exposition zelluläre Antwortprozesse starten können.

Übereinstimmend wurden in den Untersuchungen von Bauer et al. ebenfalls eine begrenzte Anwendbarkeit des Bunsen-Roscoe-Gesetzes sowie eine Korrelation der Ergebnisse mit einer steigenden Anzahl an Impulsen und längeren Experimentdauern ermittelt. Kürzere Impulsdauern, geringere Impulswiederholffrequenzen, höhere Impulsanzahlen und längere Experimentzeiten bewirkten eine stärkere Schädigung in Form einer hohen Desinfektionsrate (BAUER2018). Wird als Maß für die Schädigung in der Haut die Anzahl apoptotischer Zellen herangezogen, sind die Ergebnisse übertragbar.

Die Gründe für die individuellen Antworten der Spenderhäute auf die UV-Exposition bleiben unklar, stehen aber vermutlich in Zusammenhang mit individuellen Empfindlichkeiten gegenüber ultravioletter Strahlung, da jede Haut spezifische Eigenschaften

aufweist. Der Faktor der interindividuellen Unterschiede verschiedener Spenderhäute könnte in weiteren Untersuchungen durch Verwendung von Keratinozyten-Zellkulturen oder organotypischen Hautkulturen umgangen werden. Zudem wurde sich in diesem Projekt als biologischer Endpunkt für das initiale Schadensausmaß auf das am häufigsten induzierte DNA-Photoprodukt konzentriert. Neben dem Cyclobutanpyrimidindimer kann UV-Strahlung jedoch auch eine Vielzahl anderer DNA-Läsionen (Strangbrüche, oxidative Schäden, etc.) hervorrufen, die Einfluss auf die Strahlenantwort der Hautzellen haben.

Die Untersuchungen dieses Projekts tragen zu einem besseren Verständnis des biologischen Schädigungspotentials von gepulster inkohärenter optischer Strahlung als Funktion von Impulsparametern bei und ermöglichen einen besseren Strahlenschutz am Arbeitsplatz. Eine Übertragung der Expositionsgrenzwerte für kontinuierliche inkohärente optische Strahlung auf gepulste IOS ist zumindest für die in diesem Bericht untersuchten Bestrahlungs- und Impulsparameter möglich, da keine fundamentalen Unterschiede zwischen kontinuierlicher und gepulster UV-Bestrahlung gefunden wurden. Auf Grundlage der hier durchgeführten Untersuchungen scheint eine Korrektur der Expositionsgrenzwerte nicht nötig.

6 Zusammenfassung

In der ersten Phase des Projektes wurden Dosiseffektcurven für die Induktion und Reparatur von Cyclobutanpyrimidindimeren (CPDs) nach kontinuierlicher UV-Bestrahlung ($H = 0, 300, 600, 900, 1200, 1500$ und 3000 J/m^2) erstellt. Um den Einfluss interindividueller Unterschiede verschiedener Hautproben zu berücksichtigen, wurden Spenderhäute von vier Spendern untersucht. Es zeigte sich, dass die Beschaffenheit der verschiedenen Spenderhäute (Hautdicke, Hornschicht etc.) einen deutlichen Einfluss auf die Schadensinduktion hat.

Für den Bereich $0-1500 \text{ J/m}^2$ konnte ein linearer Dosiseffekt beschrieben werden, bei weiter steigenden Dosen setzte vermutlich eine Sättigung ein. Die Quantifizierung der Schäden erfolgte getrennt in basalen und suprabasalen Zellschichten. Dabei ergab sich, dass die basalen Zellen aufgrund der geringen Eindringtiefe des kurzwelligen spektralen UV-Anteils, weniger stark geschädigt werden als die suprabasalen Zellen. Darüber hinaus wiesen die basalen Zellen (die auch epidermale Stammzellen mit einschließen) eine um 20 % höhere Reparaturkapazität auf als die suprabasalen Zellen (die im Laufe des Differenzierungsprozesses ihre Zellkerne verlieren und als Hornschuppen abgestoßen werden). Allerdings nahm die Reparatur nach Bestrahlung mit sehr hohen Dosen in der gesamten Epidermis rapide (um 60 %) ab. Dazu konform stieg die Anzahl apoptotischer Zellen mit der Dosis deutlich an. Sowohl bei der CPD-Induktion als auch bei der Reparaturkapazität und der Apoptose-Induktion traten teils starke interindividuelle Unterschiede auf.

Trotz der spenderabhängigen Unterschiede konnte eine solide Datenbasis geschaffen werden, auf deren Grundlage die darauffolgenden Versuche mit gepulster UV-Strahlung geplant werden konnten. Allerdings mussten die interindividuellen Unterschiede auch in den anschließenden Versuchen berücksichtigt werden. Die getrennte Bewertung der basalen und suprabasalen Schichten der Epidermis hat sich als sehr sinnvoll erwiesen, da so umfassende Informationen über schädigende Effekte des eingesetzten UV-Spektrums erfasst und möglicherweise gesundheitliche Risiken abgeleitet werden können.

Im nächsten Projektabschnitt wurde mit variablen Bestrahlungsstärken die Validität des Bunsen-Roscoe-Gesetzes in Bezug auf die gewählten biologischen Endpunkte im Vergleich von kontinuierlicher und gepulster UV-Bestrahlung untersucht. Für die CPD-Induktion, die CPD-Reparatur und die Apoptose konnten keine oder nur minimale Unterschiede zwischen gepulster und kontinuierlicher Bestrahlung gefunden werden. Das Akkumulationsprinzip scheint für gepulste IOS anwendbar. Das Bunsen-Roscoe-Gesetz galt nur in beschränkten Bereichen und verlor seine Anwendbarkeit für $E < 0,3 \text{ W/m}^2$ bzw. bei langen Experimentdauern $t > 50 \text{ min}$ in Bezug auf die CPD-Induktion sowie bei der Apoptose für $E < 1 \text{ W/m}^2$ und ebenfalls langen Experimentzeiten. Bei der CPD-Reparatur war das Reziprozitätsgesetz gar nicht gültig. Die Ergebnisse des Projektteils schienen vor allem mit geringen Bestrahlungsstärken, längeren Experimentdauern oder (bei gepulster Bestrahlung) mit steigender Anzahl an applizierten Impulsen zu korrelieren. Je niedriger die Bestrahlungsstärke E , je länger die Experimentdauer t und je mehr applizierte Impulse, desto mehr Reparatur, mehr Apoptose und (nur minimal) mehr CPD-Induktion wurden detektiert. Zusammenfassend galt die Reziprozitätsregel für die CPD-Induktion, erst lange Experimentzeiten führten zu einer geringfügig erhöhten Induktion vermutlich aufgrund von Überlagerung der photophysikalischen/photochemischen Prozesse durch die zelluläre Strahlenantwort. Das Bunsen-Roscoe-Gesetz galt jedoch nicht, wenn dem be-

trachteten Endpunkt zelluläre Prozesse als Strahlenantwort zugrunde lagen, wie es bei der DNA-Reparatur und dem Apoptose-Mechanismus der Fall war. Das Bunsen-Roscoe-Gesetz kann für die meisten biologischen Systeme nur innerhalb bestimmter Grenzen gültig sein, z. B. nur für einen gewissen Bereich der Bestrahlungsstärken. Die Ergebnisse der Untersuchungen bestätigen diese Aussage in Bezug auf die Strahlenantworten der Haut.

In der letzten und zentralen Phase des Projekts wurde die Auswirkung von inkohärenter optischer Strahlung im Impulsbetrieb bei variierenden Impulsparametern untersucht, wobei zum einen die Impulsdauer und zum anderen die Impulswiederholfrequenz variiert wurden. Sowohl für die Impulswiederholfrequenz als auch für die Impulsdauer ergab sich kein Effekt auf die CPD-Induktion. Eine Variation der Impulsparameter hatte jedoch teils deutlichen Einfluss auf die DNA-Reparatur sowie die Apoptose-Induktion. Zudem stellte erneut die Experimentdauer einen weiteren zu berücksichtigenden Faktor dar.

Je niedriger die Impulswiederholfrequenz f_p und damit einhergehend auch je länger die Experimentdauer t (Impulsanzahl blieb konstant, aber Impulse wurden weniger schnell hintereinander appliziert), desto mehr Reparatur und mehr Apoptose traten auf. Je kürzer die Impulsdauer τ bzw. je länger die Experimentdauer t und je höher die Anzahl applizierter Impulse (je „gepulster“), desto mehr Apoptose wurde detektiert. Ein Einfluss der Impulsdauer auf die Reparatur war nicht eindeutig. Auffällig war, dass - mit lediglich einer Ausnahme bei den Impulsparametern von 10 ms Impulsdauer und 50 Hz Impulswiederholfrequenz - keine höhere basale als suprabasale Reparaturkapazität vorlag. Unterschiedliche Impulsparameter könnten somit die DNA-Reparatur vor allem in der Basalzellschicht beeinflussen. Zusammenfassend zeigten sich Effekte der zellulären Strahlenantwort der Haut auf gepulste UV-Exposition überwiegend mit kürzeren Impulsdauern, geringeren Impulswiederholfrequenzen, höheren Impulsanzahlen und längeren Experimentzeiten.

Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass der Einsatz gepulster UV-Strahlenquellen im Arbeitsbereich verglichen mit kontinuierlicher UV-Bestrahlung nicht zu einer höheren Schadensinduktion oder zu einer Beeinträchtigung der Schadensprozessierung in Hautzellen führt und folglich vermutlich auch nicht mit einem erhöhten Hautkrebsrisiko assoziiert ist. Die Daten sprechen dafür, dass für den Einsatz gepulster UV-Strahlung am Arbeitsplatz kein neues Expositionsgrenzwertekonzept erstellt werden muss. Jedoch haben sowohl die Stärke der gepulsten UV-Bestrahlung als auch eine Variation der Impulsparameter und vermutlich auch die Experimentdauer Einfluss auf die Induktion und Prozessierung von DNA-Schäden in der Haut, wobei berücksichtigt werden muss, dass nur ein kleiner Bereich der Impulsdauer, Impulswiederholfrequenz und Bestrahlungsstärke untersucht wurde. Für eine fundierte Bewertung dieser Tendenzen sind daher weitere Untersuchungen unerlässlich.

7 Ausblick

Da zum einen die Spenderhaut nicht unbegrenzt und regelmäßig zur Verfügung stand und zum anderen insbesondere die Präparation und Auswertung der Hautschnitte bezüglich der drei Endpunkte (Induktion und Reparatur von CPDs, Induktion apoptotischer Zellen) einen großen zeitlichen Aufwand bedeutete, nahm bereits der Vorversuch einen großen Teil des Projektes ein. Jedoch war dieser Vorversuch von hoher Wichtigkeit, da sich hier die Probleme und Schwierigkeiten zeigten, die auch im weiteren Verlauf des Projektes auftraten und beachtet werden mussten. Da es sich bei der Haut um ein biologisches System handelt, ist das Auftreten von teils großen Varianzen – sowohl interindividuell als auch intraindividuell – nicht ungewöhnlich. Die Untersuchung der Effekte in Hautbiopsien erlaubte die Darstellung der individuellen Unterschiede der Probanden, die im Sinne des Arbeitsschutzes wichtig sind.

Es haben sich Hinweise darauf ergeben, dass die Bestrahlungsstärke einen großen Effekt auf DNA-Reparatur und auf Apoptose-Induktion haben kann. Bei gepulster Bestrahlung scheinen zudem Korrelationen mit der Impulsdauer, der Impulswiederholfrequenz, der Impulsanzahl und der Experimentdauer zu bestehen. Diese Effekte sollten genauer untersucht werden.

Dennoch bleiben Fragen offen. Um einen möglichen Einfluss der langen Experimentdauern nachvollziehen zu können, müssten in weiteren Versuchen auch unbestrahlte Kontrollen für bis zu vier Stunden (= längste Experimentdauer) außerhalb des Brutschranks gehalten werden. Hierdurch könnte beurteilt werden, ob bereits das reine Verweilen außerhalb einer temperierten Atmosphäre Einfluss auf die Reparatur und vor allem die Apoptose-Induktion hat. Des Weiteren wären zur Verifizierung der Ergebnisse Experimente mit einer größeren Anzahl an unterschiedlichen Impulsparametern nötig. Im vorliegenden Projekt konnte aufgrund der Limitierung durch den Versuchsaufbau (Erzeugung der Impulse mit Frequenzscheiben) sowie der maximal möglichen Bestrahlungsdauer von vier Stunden nur ein beschränkter Parameterbereich untersucht werden.

Um die individuelle Variabilität von primärem Material zu vermeiden, können solche Untersuchungen in Zellkulturen menschlicher Keratinozyten-Zelllinien (z. B. HaCaT) durchgeführt werden. Zur Simulation der menschlichen Haut können die Untersuchungen abschließend in organotypischen Hautkulturen (3D-Haut), die aus HaCaT-Zellen angezüchtet werden können, vorgenommen werden.

Ferner bleibt noch die Frage nach möglichen Synergieeffekten von UV, VIS und IR. Aufgrund des großen zeitlichen Aufwandes bei der Präparation und Auswertung erfolgte die Fokussierung auf die Versuchsreihen mit kontinuierlicher und gepulster UV-Strahlung. Untersuchungen zum Einfluss von IR-Strahlung und sichtbarem Licht auf UV-induzierte Prozesse wurden in diesem Projekt nicht durchgeführt. Auswirkungen des noch im Spektrum vorhandenen gewissen IR-Anteils auf zellspezifische Mechanismen waren vor allem bei den sehr langen Experimentzeiten jedoch nicht auszuschließen. Im Weiteren könnten daher unter ausgewählten Bedingungen, in Abhängigkeit von den Ergebnissen der vorherigen Versuche, durch Bestrahlung ohne Filter gezielt auch mögliche Synergieeffekte durch zusätzliche sichtbare und infrarote Strahlung neben der ultravioletten Strahlung untersucht werden. Der Einfluss von IR-

und sichtbarer Strahlung in der Krebsentstehung und Alterung wird zurzeit in einem BMBF-geförderten Forschungsprojekt von den Autoren bearbeitet (Förderkennzeichen 02NUK036B).

Literaturverzeichnis

- Armstrong, B.K. & Krickler, A., 2001. The epidemiology of UV induced skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1–3), pp.8–18.
- Aszterbaum, M., Beech, J. & Epstein Jr., E., 1999. Ultraviolet radiation mutagenesis of hedgehog pathway genes in basal cell carcinomas. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 4(1), pp.41–45.
- Bauer, S., Holtschmidt, H. & Ott, G., 2018. Ultraviolet germicidal efficacy as a function of pulsed radiation parameters studied by spore film dosimetry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 178(October 2017), pp.69–75.
- Benjamin, C.L. & Ananthaswamy, H.N., 2007. p53 and the Pathogenesis of Skin Cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 224(3), pp.241–248.
- Blanpain, C., 2013. Tracing the cellular origin of cancer. *Nature Cell Biology*, 15(2), pp.126–134.
- Boehnke, K. et al., 2012. Stem cells of the human epidermis and their niche: Composition and function in epidermal regeneration and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 33(7), pp.1247–1258.
- Brash, D.E., 2015. UV signature mutations. *Photochemistry and Photobiology*, 91(1), pp.15–26.
- Bruls, W.A. et al., 1984. Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photochemistry and Photobiology*, 40(4), pp.485–494.
- Bykov, V.J. et al., 1999. In situ repair of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts in human skin exposed to solar simulating radiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 112(3), pp.326–331.
- Forbes, P., Blum, H. & Davies, R., 1981. Photocarcinogenesis in Hairless Mice: Dose-Response and the Influence of Dose-Delivery. *Photochemistry and Photobiology*, 34(3), pp.361–365.
- Forbes, P. & Davies, R., 1983. *Experimental and Clinical Photoimmunology* Vol. 1. R. Daynes & J. Spikes, eds., Boca Raton, FL: CRC Press.
- El Ghissassi, F. et al., 2009. A review of human carcinogens—Part D: radiation. *The Lancet Oncology*, 10(8), pp.751–752.
- van de Glind, G. et al., 2016. Fractionation of a tumor-initiating UV dose introduces DNA damage-retaining cells in hairless mouse skin and renders subsequent TPA-promoted tumors non-regressing. *Oncotarget*, 7(7), pp.8067–8077.
- de Gruijl, F., van der Meer, J. & van der Leun, J., 1983. Dose-Time Dependency of Tumor Formation By Chronic Uv Exposure. *Photochemistry and Photobiology*, 37(1), pp.53–62.

- de Gruijl, F.R., van Kranen, H.J. & Mullenders, L.H., 2001. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1–3), pp.19–27.
- IARC (International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet (UV) light and skin cancer), 2007. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *International Journal of Cancer*, 120(5), pp.1116–1122.
- Ikehata, H. & Ono, T., 2011. The Mechanisms of UV Mutagenesis. *Journal of Radiation Research*, 52(2), pp.115–125.
- Karu, T., 1993. Can Cellular Responses to Continuous-Wave and Pulsed UV Radiation differ? In A. Young et al., eds. *Environmental UV Photobiology*. New York: Plenum Press, pp. 203–232.
- Kelfkens, G. et al., 1991. The influence of dose rate on ultraviolet tumorigenesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 10(1–2), pp.41–50.
- Ling, G. et al., 2001. Epidermal p53 response and repair of thymine dimers in human skin after a single dose of ultraviolet radiation: Effects of photoprotection. *Acta Dermato-Venereologica*, 81(2), pp.81–86.
- Lucas, R. et al., 2015. The consequences for human health of stratospheric ozone depletion in association with other environmental factors. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 14(1), pp.53–87.
- Lüllmann-Rauch, R., 2006. *Histologie 2*. Auflage., Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Melnikova, V.O. & Ananthaswamy, H.N., 2005. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571(1–2), pp.91–106.
- Mitchell, D.L. et al., 1999. Effects of chronic low-dose ultraviolet B radiation on DNA damage and repair in mouse skin. *Cancer research*, 59(12), pp.2875–2884.
- Mitchell, D.L. & Hartman, P.S., 1990. The regulation of DNA repair during development. *BioEssays*, 12(2), pp.74–79.
- Moll, I., 2010. *Duale Reihe Dermatologie 7*. Auflage., Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Pfeifer, G.P. et al., 1992. Binding of transcription factors creates hot spots for UV photoproducts in vivo. *Molecular and cellular biology*, 12(4), pp.1798–1804.
- Pfeifer, G.P., 1997. Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochemistry and Photobiology*, 65(2), pp.270–283.
- Pleasant, E.D. et al., 2010. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature*, 463(7278), pp.191–196.

- Rosado-Schlosser, B. et al., 1998. Fractionated delivery of UVA is more efficient in inducing cell death in culture than exposure to an identical single dose. in: *Biologic Effects of Light. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 14(5–6), p.206.
- Schindl, A., Rosado-Schlosser, B. & Trautinger, F., 2001. Die Reziprozitätsregel in der Photobiologie. Eine Übersicht. *Der Hautarzt*, 52(9), pp.779–785.
- Strahlenschutzkommission, 2016. Schutz des Menschen vor den Gefahren solarer UV-Strahlung und UV-Strahlung in Solarien. *Empfehlung der Strahlenschutzkommission*.
- Tewari, A., Sarkany, R.P. & Young, A.R., 2012. UVA1 induces cyclobutane pyrimidine dimers but not 6-4 photoproducts in human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(2), pp.394–400.
- Vink, A.A. et al., 1993. Detection of thymine dimers in suprabasal and basal cells of chronically UV-B exposed hairless mice. *Journal of Investigative Dermatology*, 100(6), pp.795–799.
- Vink, A.A. et al., 1994. Removal of UV-induced DNA lesions in mouse epidermis soon after irradiation. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 24(1), pp.25–31.
- Wischermann, K. et al., 2008. UVA radiation causes DNA strand breaks, chromosomal aberrations and tumorigenic transformation in HaCaT skin keratinocytes. *Oncogene*, 27(31), pp.4269–4280.
- Xu, G. et al., 2000. Effect of age on the formation and repair of UV photoproducts in human skin in situ. *Mutation Research - DNA Repair*, 459(3), pp.195–202.
- Yamada, M. et al., 2006. Aged human skin removes UVB-induced pyrimidine dimers from the epidermis more slowly than younger adult skin in vivo. *Archives of Dermatological Research*, 297(7), pp.294–302.
- Yamaguchi, Y. et al., 2006. Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(9), pp.1486–1488.
- Yamaguchi, Y., Beer, J.Z. & Hearing, V.J., 2008. Melanin mediated apoptosis of epidermal cells damaged by ultraviolet radiation: Factors influencing the incidence of skin cancer. *Archives of Dermatological Research*, 300(Suppl. 1), pp.43–50.
- Young, A.R. et al., 1996. The in situ repair kinetics of epidermal thymine dimers and 6-4 photoproducts in human skin types I and II. *Journal of Investigative Dermatology*, 106(6), pp.1307–1313.
- Zhao, C. et al., 2002. Ultraviolet photoproduct levels in melanocytic nevi and surrounding epidermis in human skin in situ. *Journal of Investigative Dermatology*, 118(1), pp.180–184.

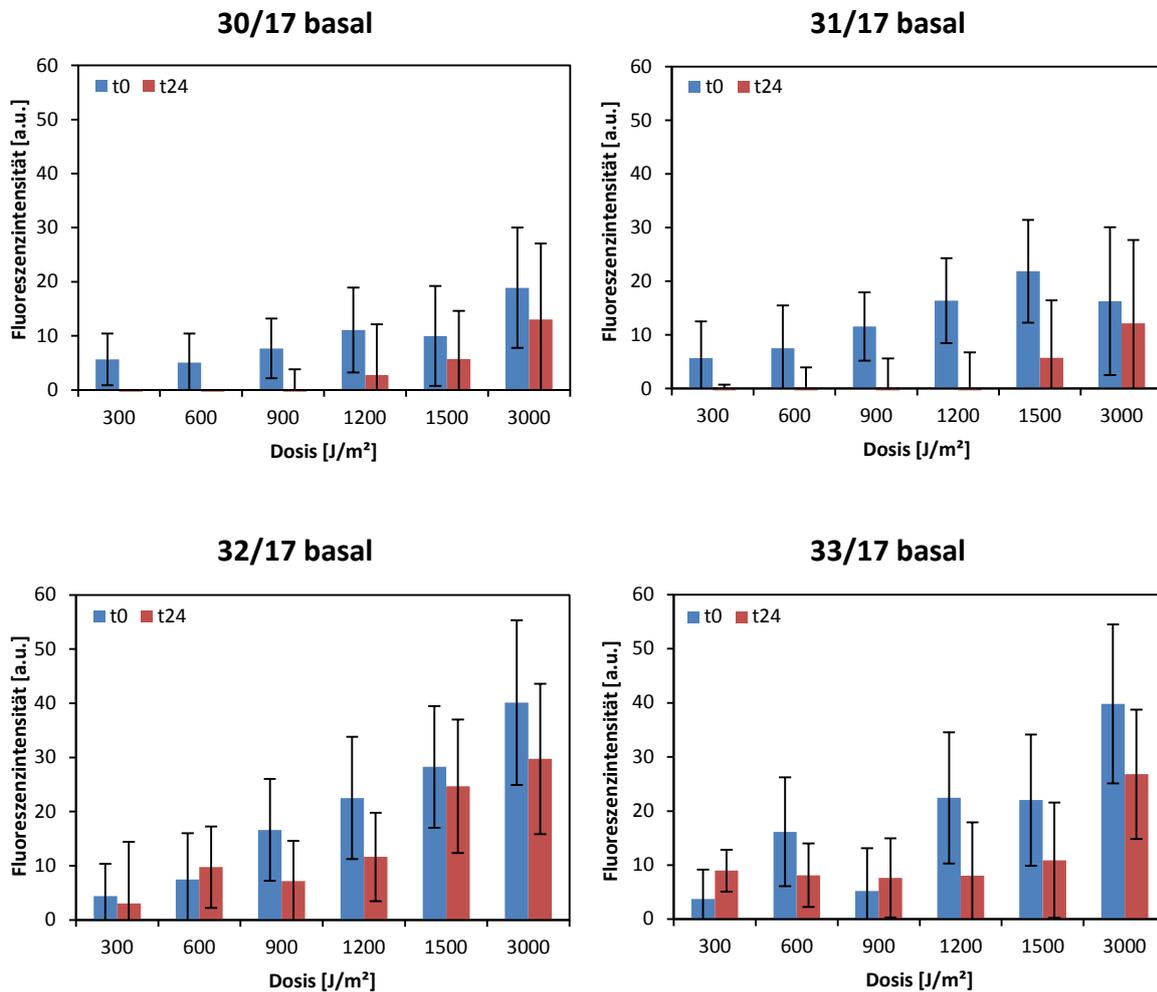
Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
BCC	Basalzellkarzinom (engl.: <i>basal cell carcinoma</i>)
CPD	Cyclobutanpyrimidindimer
cw	continuous wave
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
FKS	Fötale Kälberserum
h	Stunde
IOS	inkohärente optische Strahlung
IR	Infrarotstrahlung (780 nm – 1 mm)
J	Joule
m	Meter
M	Molar
min	Minute
MM	Malignes Melanom
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
s	Sekunde
SCC	Plattenepithelkarzinom (engl.: <i>squamous cell carcinoma</i>)
UV	Ultraviolette Strahlung (100 nm - 400 nm)
UVA	Ultraviolette Strahlung (315 nm - 400 nm)
UVB	Ultraviolette Strahlung (280 nm - 315 nm)
UVC	Ultraviolette Strahlung (100 nm - 280 nm)
VIS	Sichtbare Strahlung (380/400 nm - 780 nm)
W	Watt

Anhang

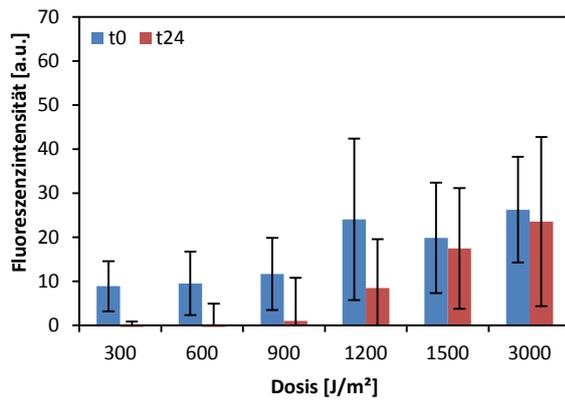
Anhang 1 Dynamikbereich der Haut, Ergebnisse der einzelnen Proben

In den folgenden Abbildungen sind die basale (Anh. 1, Abb. 1) sowie die suprabasale (Anh. 1, Abb. 2) Schadensquantifizierung spezifisch für jede einzelne Spenderhaut in Abhängigkeit von der applizierten UV-Dosis direkt nach Bestrahlung und nach 24 Stunden Reparaturzeit dargestellt. Die CPD-Induktion in den suprabasalen Zellschichten übersteigt die Schadensmenge in der Basalzellschicht und sowohl die Menge induzierter als auch der nach 24 Stunden verbleibenden CPDs variiert je nach Spenderhaut stark.

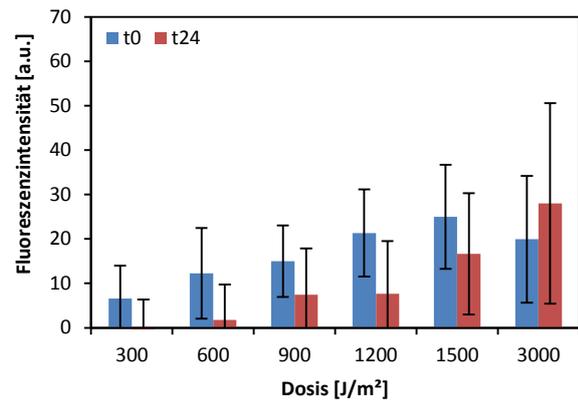


Anh. 1, Abb. 1 Quantifizierung der CPDs nach Bestrahlung und nach 24 h Reparaturzeit in der Basalzellschicht für die einzelnen Spenderhäute. $E = 3 \text{ W/m}^2$.

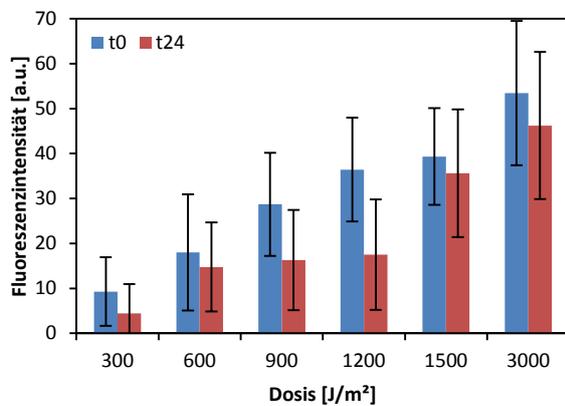
30/17 suprabasal



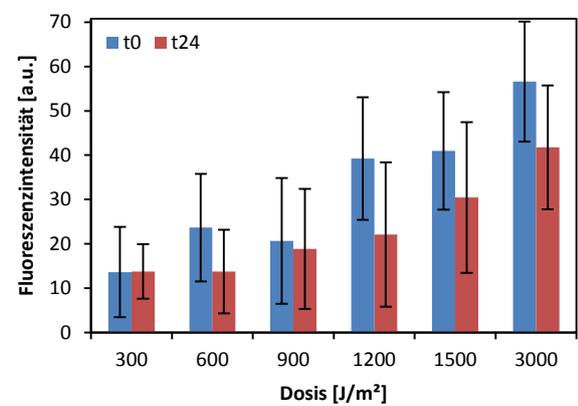
31/17 suprabasal



32/17 suprabasal



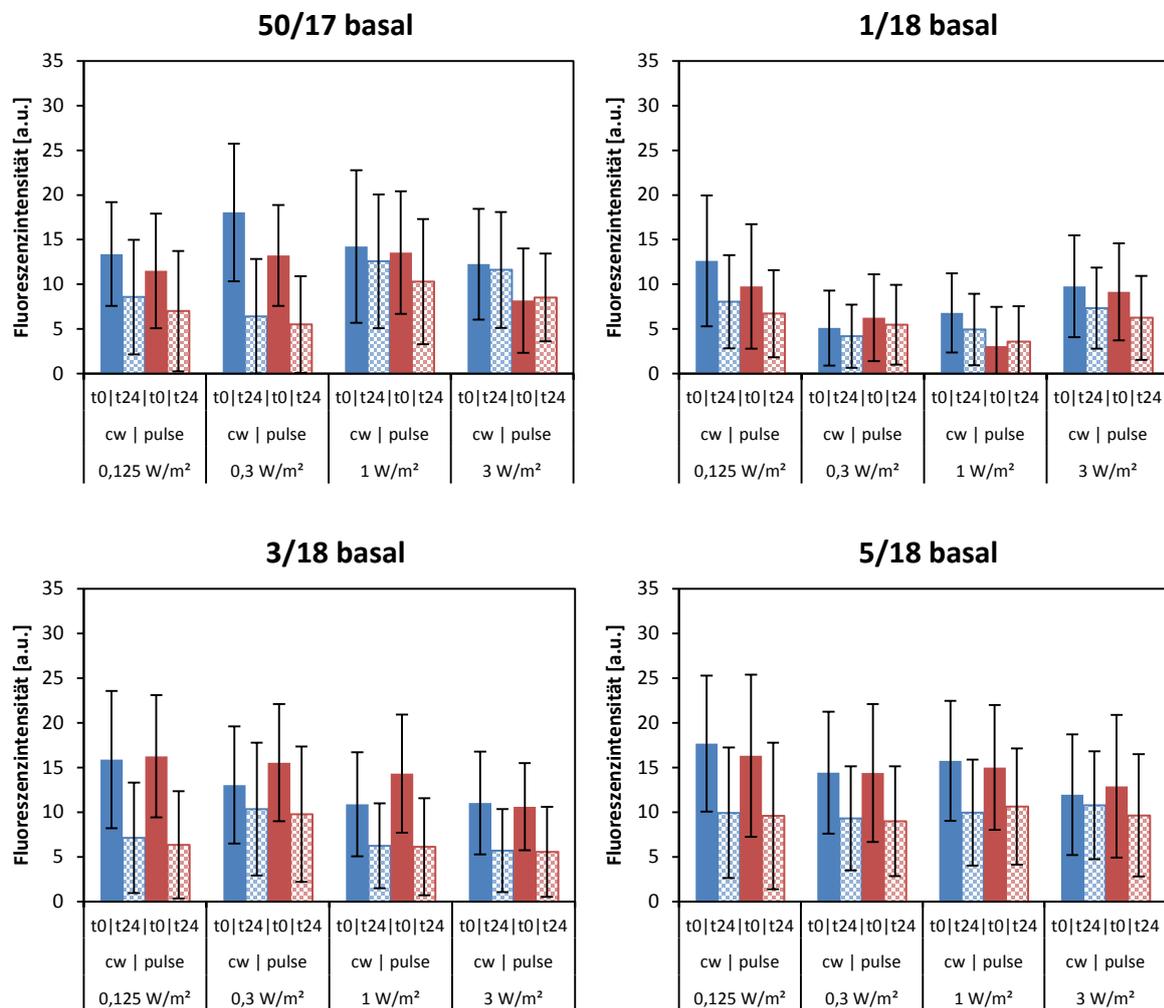
33/17 suprabasal



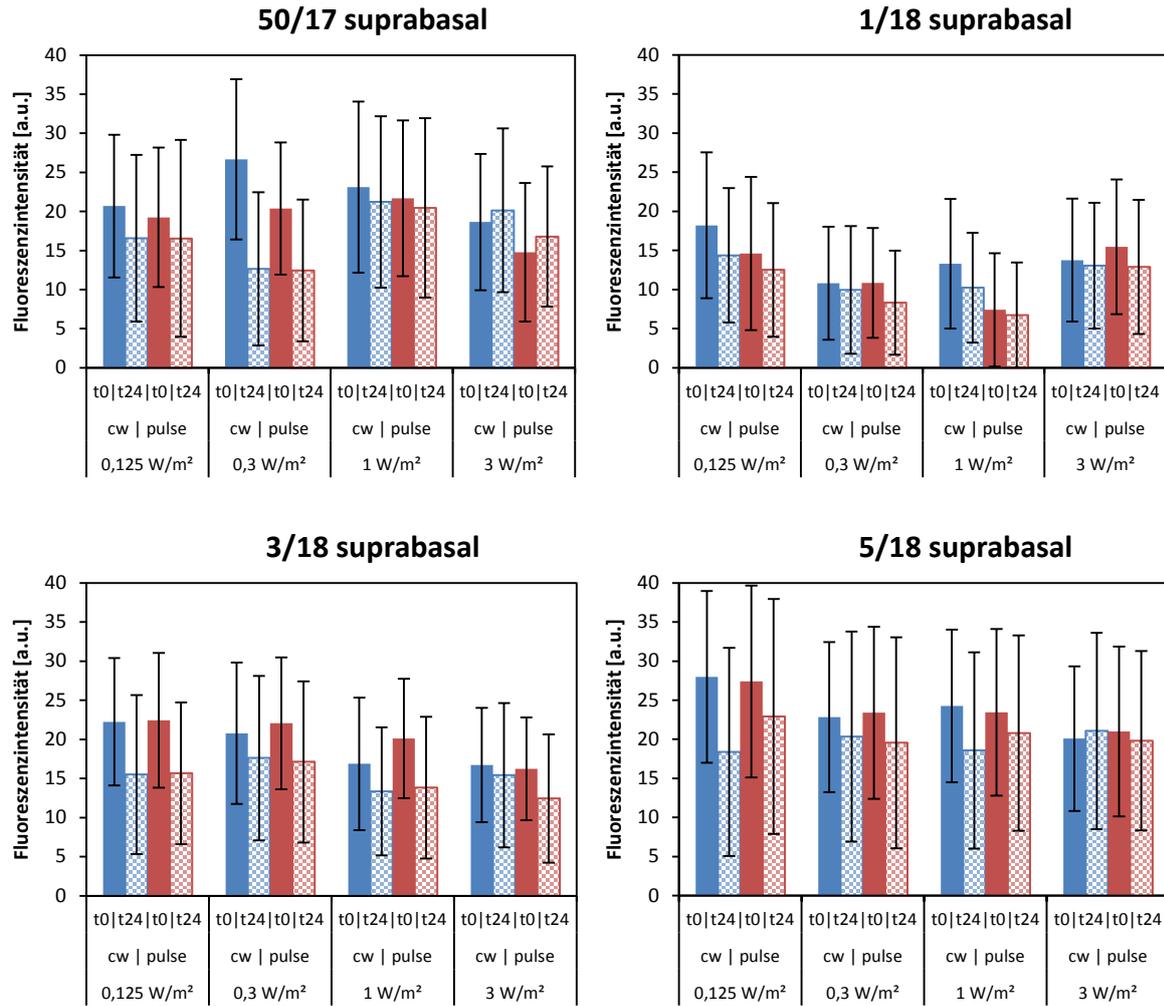
Anh. 1, Abb. 2 Quantifizierung der CPDs nach Bestrahlung und nach 24 h Reparaturzeit in den suprabasalen Zellschichten für die einzelnen Spenderhäute. $E = 3 \text{ W/m}^2$.

Anhang 2 Verifizierung des Bunsen-Roscoe-Gesetzes: Schadenslokalisierung und Apoptose-Induktion, einzelne Proben

Im vorliegenden Projektabschnitt wurde das Bunsen-Roscoe-Gesetz bei variablen Bestrahlungsstärken im Vergleich von kontinuierlicher und gepulster UV-Bestrahlung in Bezug auf unterschiedliche biologische Endpunkte überprüft. Anh. 2, Abb. 1 und Anh. 2, Abb. 2 zeigen die basale bzw. suprabasale Schadensquantifizierung spezifisch für jede einzelne Spenderhaut direkt nach Bestrahlung und nach 24 Stunden Reparaturzeit bei verschiedenen Bestrahlungsstärken. Die CPD-Induktion in der Basalzellschicht fällt wiederum geringer aus als in den suprabasalen Zellschichten. Ein signifikanter Unterschied zwischen kontinuierlicher und gepulster Bestrahlung oder unterschiedlichen Bestrahlungsstärken ist nicht zu detektieren.

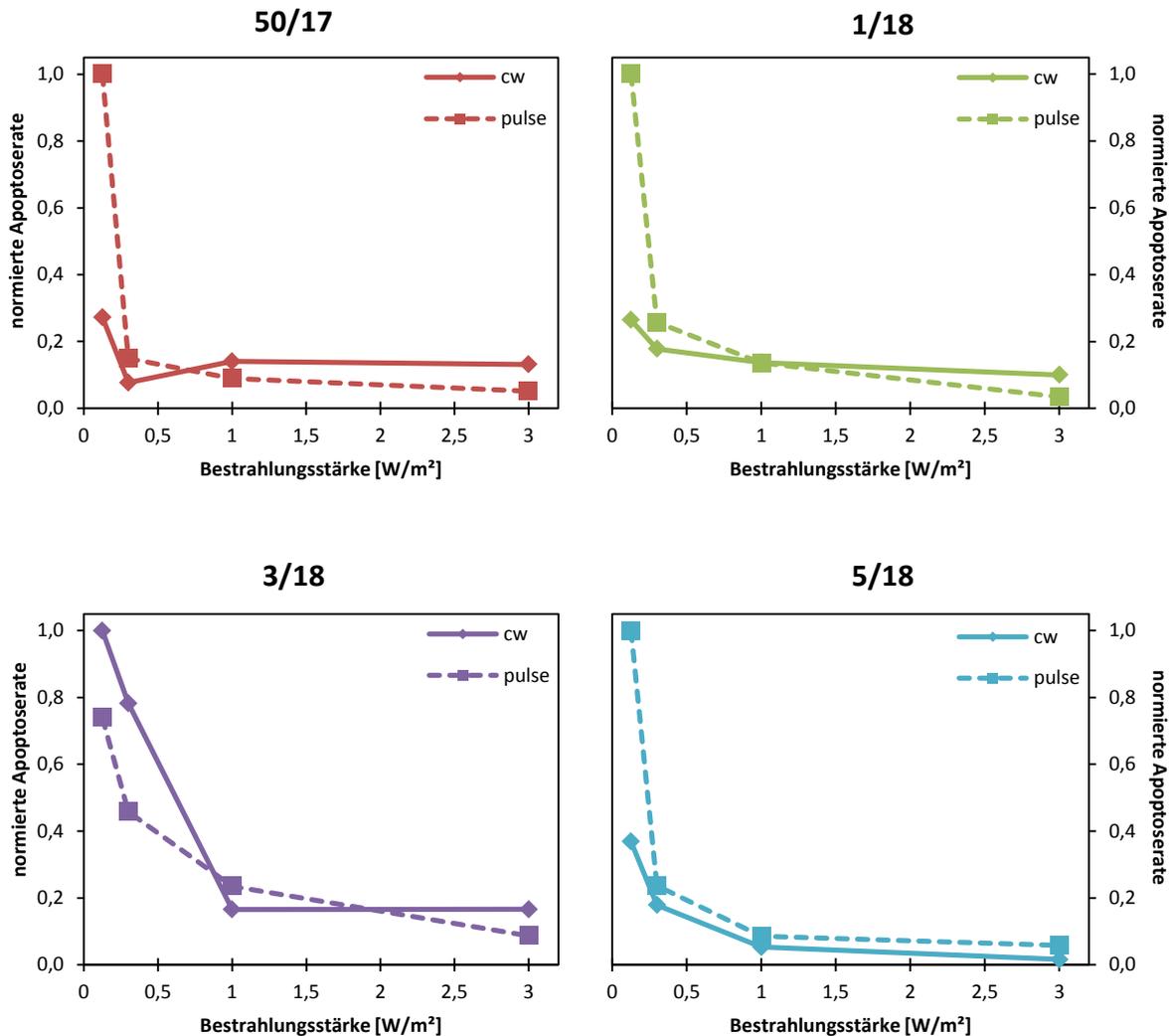


Anh. 2, Abb. 1 Überprüfung des Bunsen-Roscoe-Gesetzes. Quantifizierung der CPDs nach Bestrahlung und nach 24 h Reparaturzeit in der Basalzellschicht für die einzelnen Spenderhäute. $H = 900 \text{ J/m}^2$.



Anh. 2, Abb. 2 Überprüfung des Bunsen-Roscoe-Gesetzes. Quantifizierung der CPDs nach Bestrahlung und nach 24 h Reparaturzeit in den suprabasalen Zellschichten für die einzelnen Spenderhäute. $H = 900 \text{ J/m}^2$.

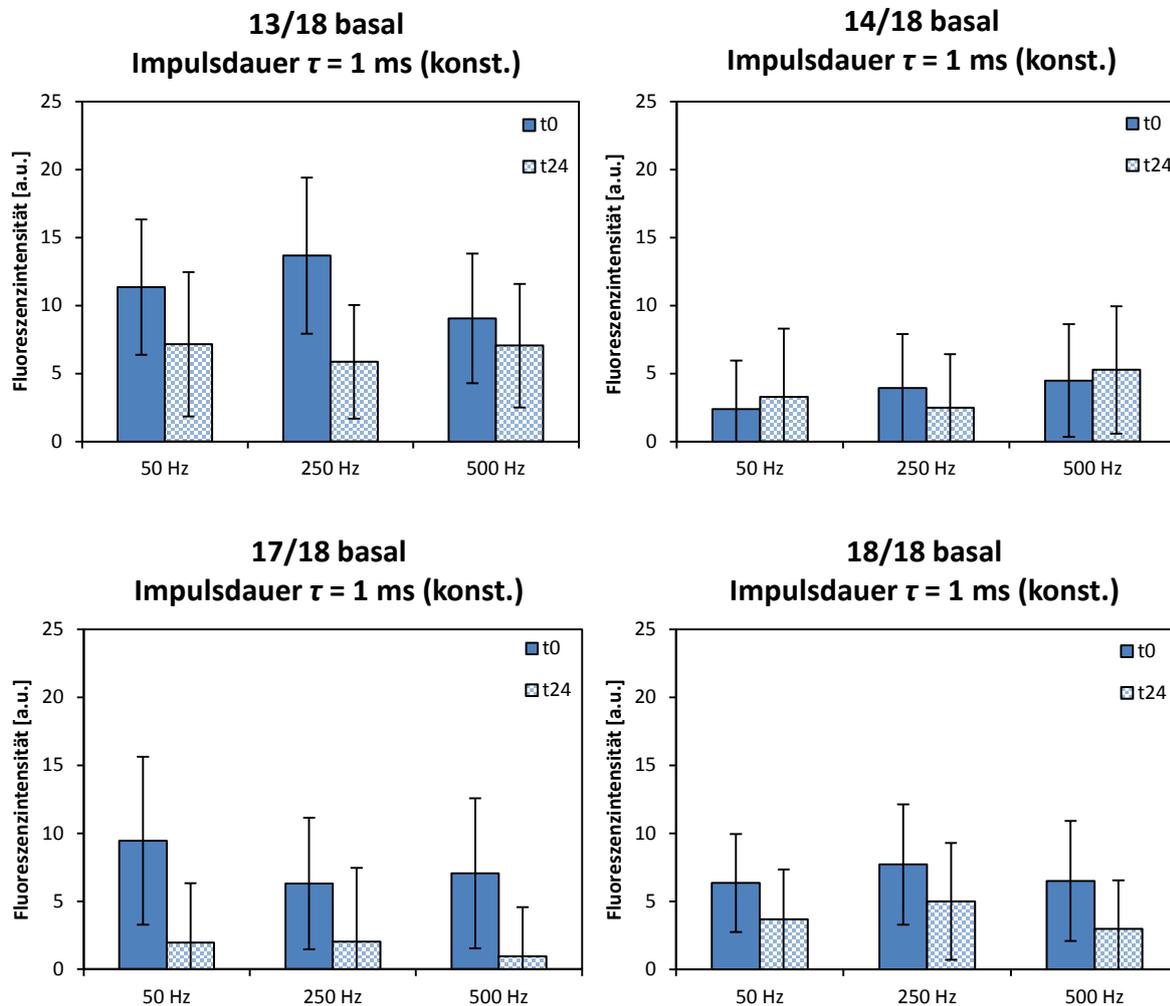
In Anh. 2, Abb. 3 ist die Spenderhaut-spezifische Apoptose-Induktion 24 Stunden nach Bestrahlung als Funktion der Bestrahlungsstärke und der Applikationsform (cw und gepulst) dargestellt. Bis auf $E = 0,125 \text{ W/m}^2$, bei der die Apoptoserate in drei von vier Spenderhäuten nach gepulster Bestrahlung höher als nach kontinuierlicher Bestrahlung liegt, zeigt sich kein Unterschied zwischen den Applikationsformen. Mit abnehmenden Bestrahlungsstärken steigt die Anzahl der apoptotischen Zellen in der Epidermis deutlich an.



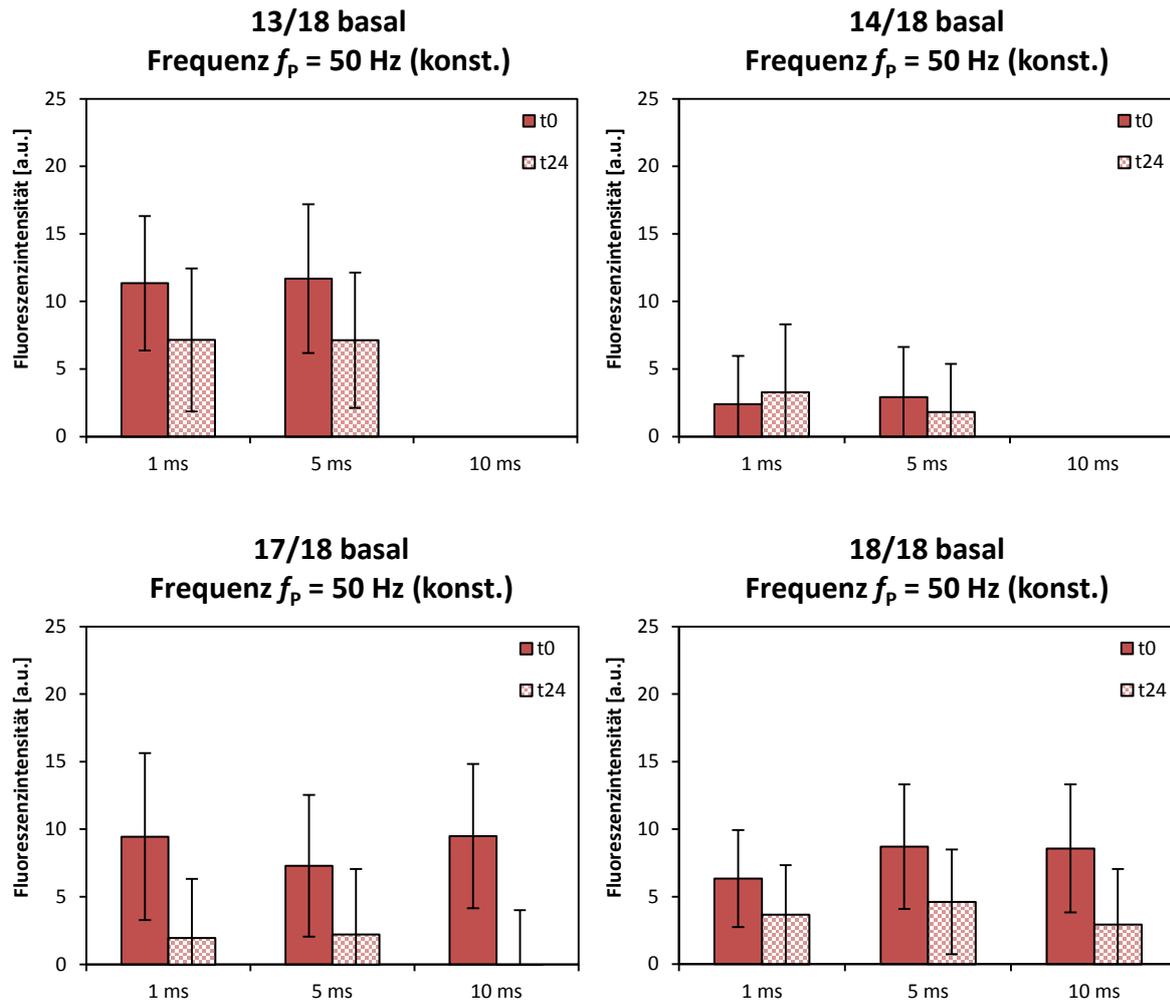
Anh. 2, Abb. 3 Überprüfung des Bunsen-Roscoe-Gesetzes. Quantifizierung der Apoptose-Induktion in der gesamten Epidermis 24 Stunden nach Bestrahlung für die einzelnen Spenderhäute. Relative Anzahl apoptotischer Zellen pro Sichtfeld und mm Epidermisdicke als Apoptoserate normiert auf den Maximalwert der jeweiligen Spenderhaut. $H = 900 \text{ J/m}^2$.

Anhang 3 Spenderhautspezifische Ergebnisse bei gepulster Bestrahlung

In diesem Projektteil sollte die biologische Wirkung von gepulster inkohärenter UV-Strahlung bei variierenden Impulsparametern untersucht werden. In den folgenden Abbildungen ist eine detaillierte Auftragung der basalen Schadensquantifizierung bei variierender Impulswiederholfrequenz (Anh. 3, Abb. 1) sowie bei unterschiedlichen Impulsdauern (Anh. 3, Abb. 2) spezifisch für jede einzelne Spenderhaut aufgeführt. Sowohl die Impulswiederholfrequenz als auch die Impulsdauer haben keinen Einfluss auf die CPD-Induktion. Es treten erneut deutliche spenderabhängige Unterschiede auf. Die Impulsparameter (50 Hz, 1 ms) wurden in jeder Versuchsreihe mit einer Spenderhaut nur einmal gemessen, sodass die Ergebnisse für diese Parameter im Diagramm für variierende Impulswiederholfrequenzen und im Diagramm der unterschiedlichen Impulsdauern jeweils den gleichen Wert darstellen.

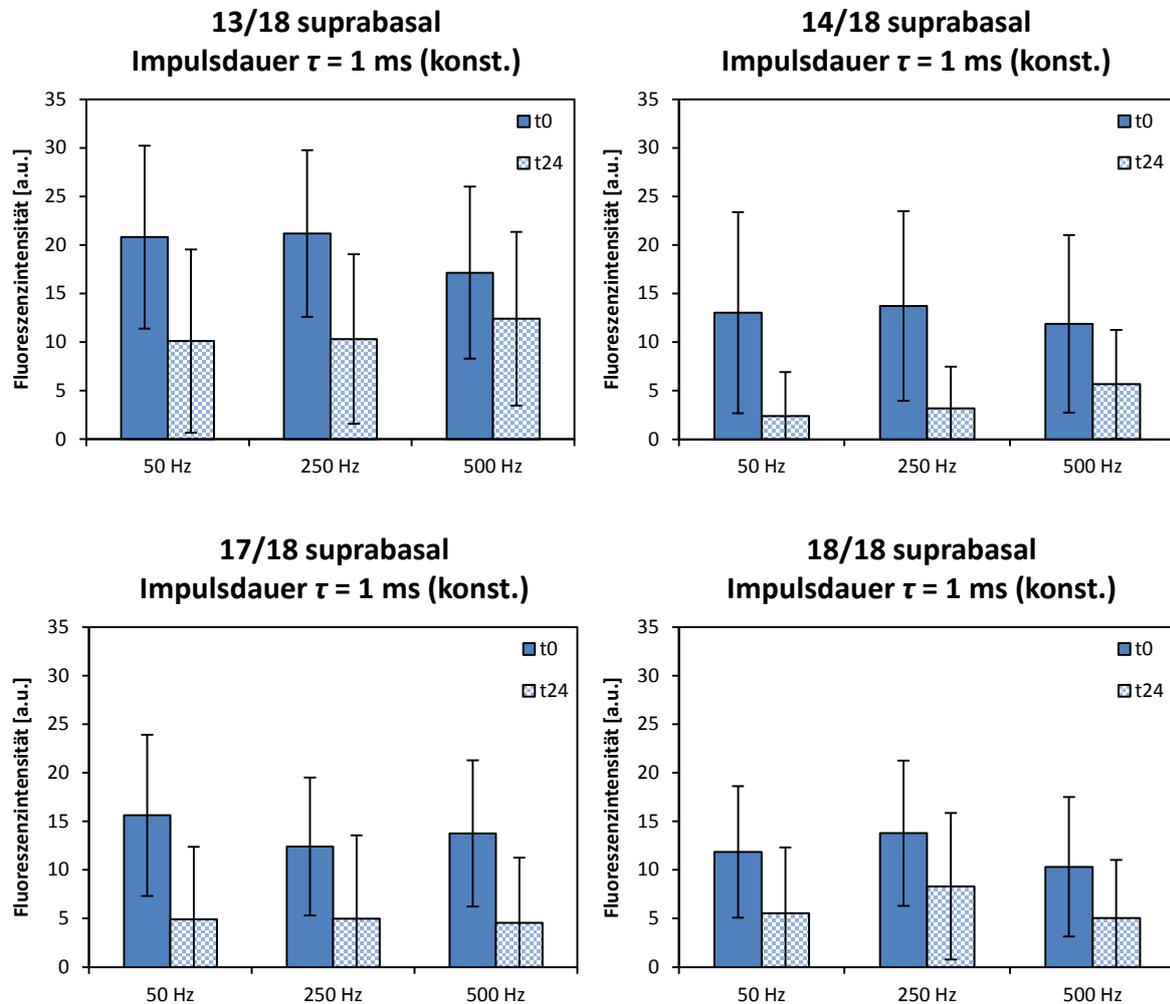


Anh. 3, Abb. 1 Quantifizierung der CPDs nach Bestrahlung und nach 24 h Reparaturzeit in der Basalzellschicht für die einzelnen Spenderhäute. Konstante Impulsdauer $\tau = 1$ ms bei variierender Impulswiederholfrequenz.

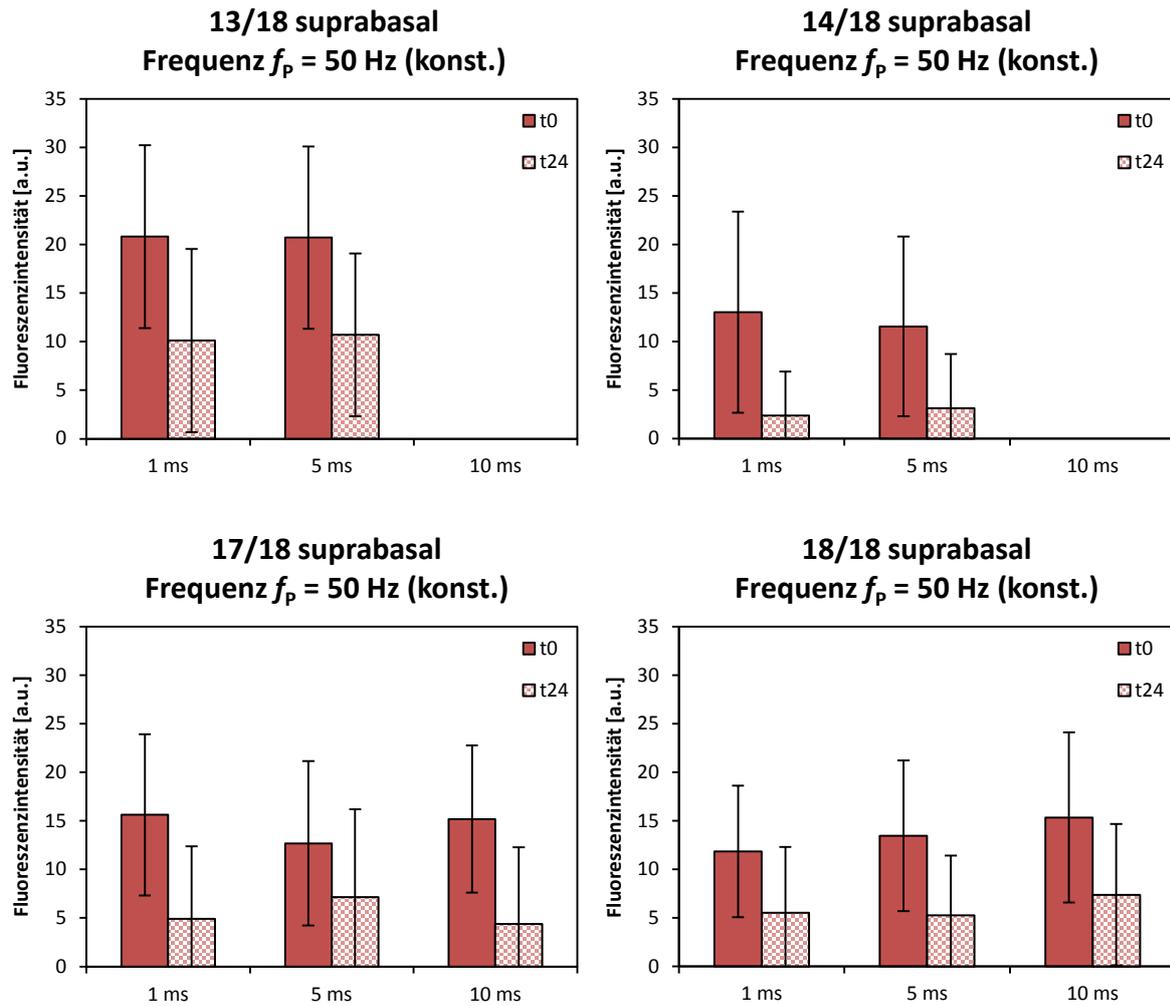


Anh. 3, Abb. 2 Quantifizierung der CPDs nach Bestrahlung und nach 24 h Reparaturzeit in der Basalzellschicht für die einzelnen Spenderhäute. Konstante Impulswiederholfrequenz $f_p = 50$ Hz bei variierender Impulsdauer.

Auch die Ergebnisse der suprabasalen Schadensquantifizierung bei variierender Impulswiederholfrequenz (Anh. 3, Abb. 3) bzw. Impulsdauer (Anh. 3, Abb. 4) spezifisch für jede einzelne Spenderhaut lassen keinen Einfluss auf die CPD-Induktion erkennen. Zellschichtspezifisch betrachtet wurden in der Basalzellschicht weniger CPDs induziert als in den suprabasalen Zellschichten.

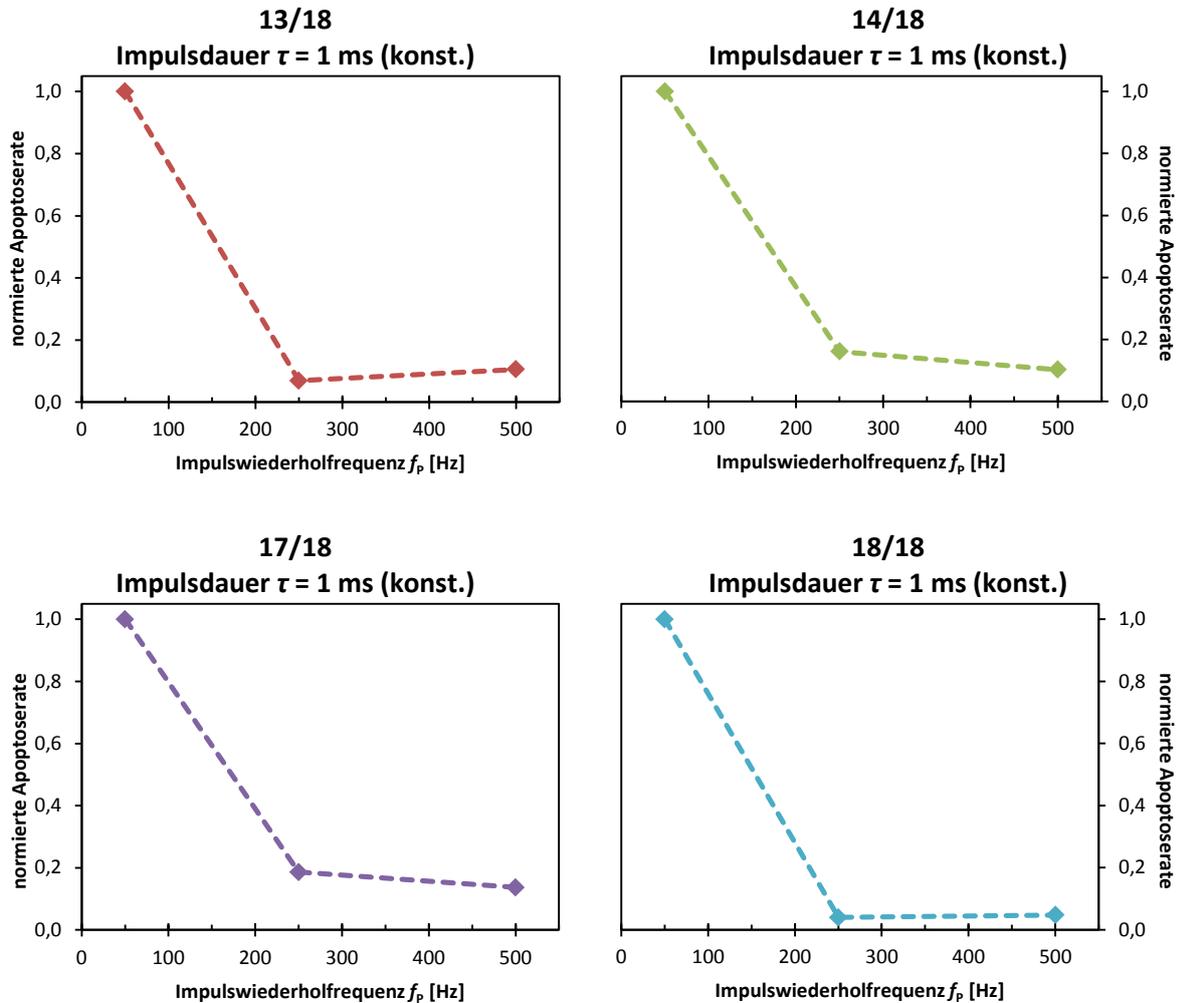


Anh. 3, Abb. 3 Quantifizierung der CPDs nach Bestrahlung und nach 24 h Reparaturzeit in den suprabasalen Zellschichten für die einzelnen Spenderhäute. Konstante Impulsdauer $\tau = 1$ ms bei variierender Impulswiederholfrequenz.

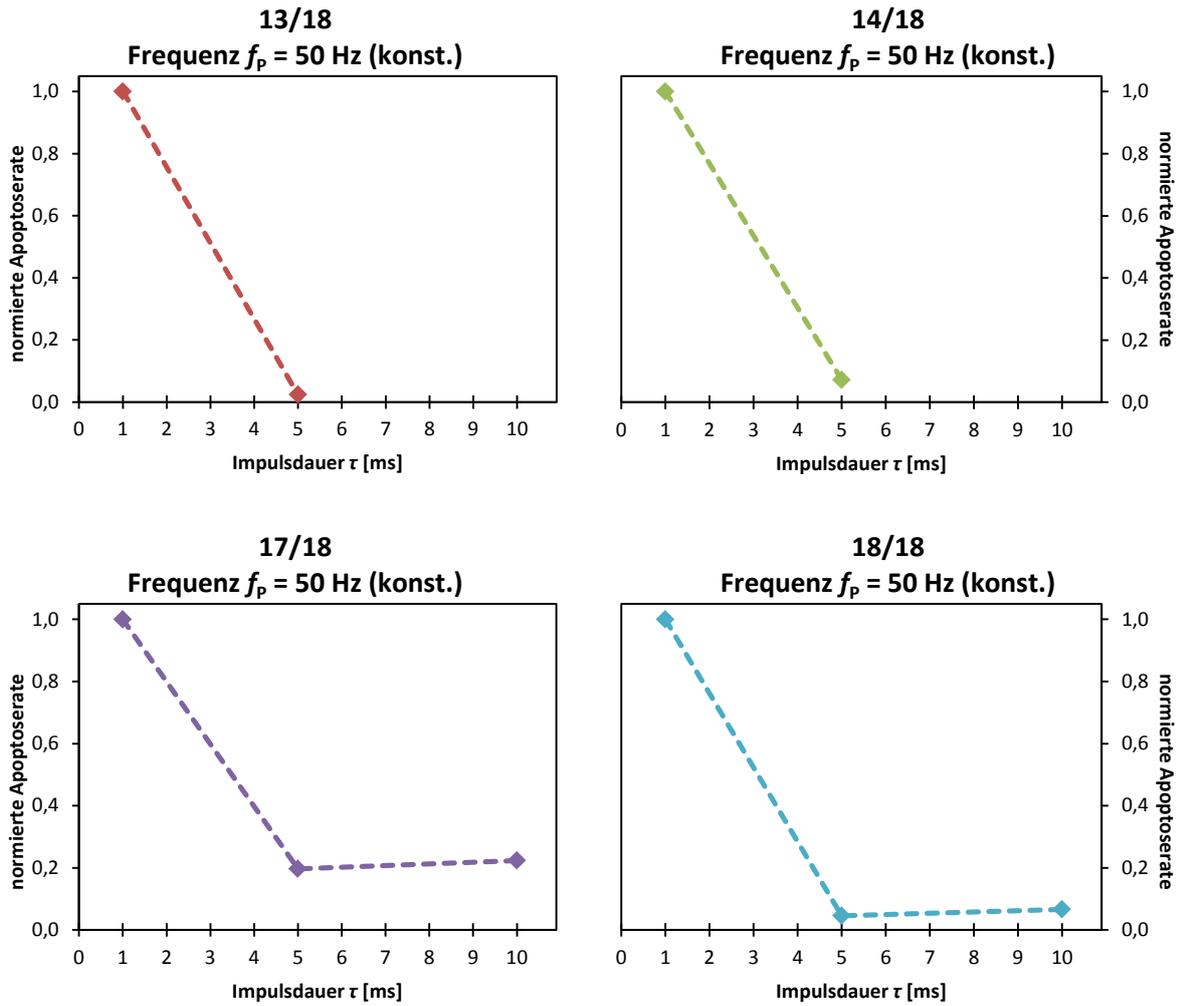


Anh. 3, Abb. 4 Quantifizierung der CPDs nach Bestrahlung und nach 24 h Reparaturzeit in den suprabasalen Zellschichten für die einzelnen Spenderhäute. Konstante Impulswiederholffrequenz $f_p = 50$ Hz bei variierender Impulsdauer.

Anh. 3, Abb. 5 und Anh. 3, Abb. 6 zeigen eine detaillierte Auftragung der Apoptose-Induktion 24 Stunden nach Bestrahlung spezifisch für jede einzelne Spenderhaut bei verschiedenen Impulswiederholffrequenzen bzw. variierender Impulsdauer. Bei niedrigen Impulswiederholffrequenzen und niedrigen Impulsdauern steigt die Apoptose-Induktion stark an. Zu beachten ist, dass die Impulsparameter (50 Hz, 1 ms), welche in beiden Abbildungen einer Spenderhaut aufgetragen sind, in der kompletten Versuchsreihe mit dieser Spenderhaut lediglich einmal gemessen wurden.



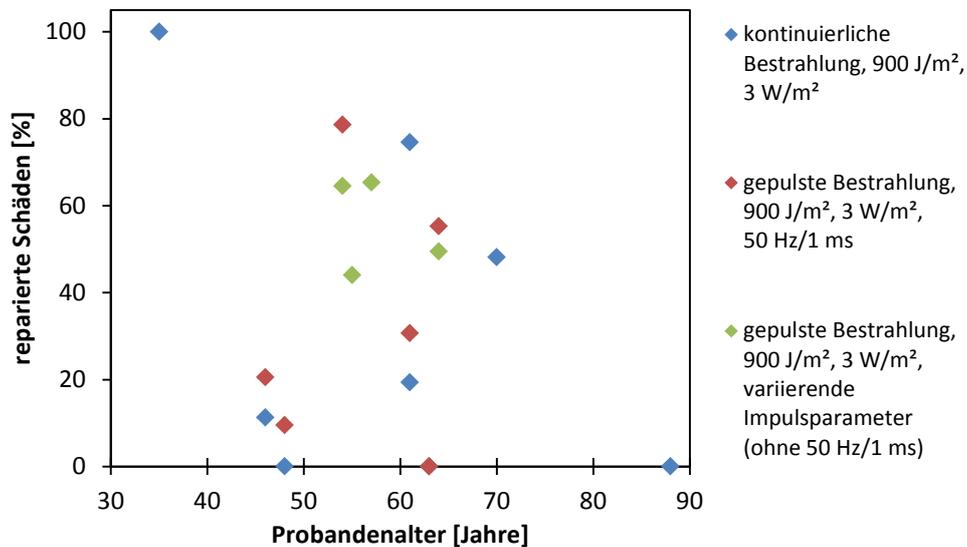
Anh. 3, Abb. 5 Quantifizierung der Apoptose-Induktion in der gesamten Epidermis 24 Stunden nach Bestrahlung für die einzelnen Spenderhäute. Relative Anzahl apoptotischer Zellen pro Sichtfeld und mm Epidermisdicke als Apoptoserate normiert auf den Maximalwert der jeweiligen Spenderhaut. Konstante Impulsdauer $\tau = 1$ ms bei variierender Impulswiederholffrequenz.



Anh. 3, Abb. 6 Quantifizierung der Apoptose-Induktion in der gesamten Epidermis 24 Stunden nach Bestrahlung für die einzelnen Spenderhäute. Relative Anzahl apoptotischer Zellen pro Sichtfeld und mm Epidermisdicke als Apoptoserate normiert auf den Maximalwert der jeweiligen Spenderhaut. Konstante Impulswiederholffrequenz $f_p = 50$ Hz bei variierender Impulsdauer.

Anhang 4 Überprüfung auf eine Korrelation zwischen Probandenalter und Reparaturkapazität der Haut

Das Alter stellt einen möglichen Einflussfaktor auf die Reparaturkapazität der Haut nach UV-Schädigung dar. In Anh. 4, Abb. 1 ist der Anteil an reparierten Schäden in der gesamten Epidermis 24 h nach sowohl kontinuierlicher als auch gepulster UV-Bestrahlung mit 900 J/m^2 bei einer Bestrahlungsstärke von 3 W/m^2 und unterschiedlichen Impulsparametern in Abhängigkeit des Probandenalters der jeweiligen Spenderhäute aus diesem Bericht gezeigt. Es konnte keine Korrelation zwischen der Reparaturkapazität und dem Alter der Probanden ermittelt werden, sodass ein unterschiedliches Alter als zentrale Ursache für die aufgetretenen interindividuellen Variabilitäten der CPD-Reparatur ausgeschlossen wird.



Anh. 4, Abb. 1 Prozentualer Anteil an reparierten Schäden in der gesamten Epidermis 24 h nach Bestrahlung in Abhängigkeit des Probandenalters und der Bestrahlungsparameter für die einzelnen Spenderhäute. Prozentuale Differenz der CPD-Fluoreszenz von t_0 zu t_{24} .