

3. METHODIK

3.1 Versuchsanordnung:

Die Studie besteht aus

- a) Voruntersuchungen, durchgeführt in der Woche vor dem Beginn der Bestrahlung,
- b) der sechswöchigen Bestrahlungsphase, mit 3 Sitzungen pro Woche, und
- c) den Nachuntersuchungen innerhalb einer Woche nach der Bestrahlung.

Das Einverständnis der zuständigen Ethikkommission des Universitätsklinikums Benjamin Franklin, Berlin, wurde erteilt.

3.2 Probanden

Es nahmen 16 erwachsene Probanden an der Studie teil, 7 Frauen, und 9 Männer. Gesucht wurden die Probanden über eine Anzeige in einer Tageszeitung.

Ausschlusskriterien waren alle Krankheiten und Faktoren, die eine Gefährdung der Probanden nicht ausschließen konnten, oder die Aussagekraft der Ergebnisse beeinträchtigen könnten. Dazu gehörten Hautkrankheiten, Lichtallergie, Allergien in der Anamnese, Vorbehandlung mit UV-Licht, deutliche Sonnenexposition innerhalb der letzten drei Monate (z.B. auf Reisen in südlicheren, sonnigeren Gegenden) sowie die Einnahme von Medikamenten. Weitere Ausschlusskriterien waren ein Hauttyp I, für den bei auffallend heller Haut bekannt ist, dass er nach 30 min UV-Exposition immer mit Sonnenbrand reagiert und gar keine Gewöhnung bzw. Bräunung entwickelt, sowie Hauttypen IV und V, welche nie einen Sonnenbrand nach 30 min. UV-Exposition entwickeln. Alle eingeschlossenen Probanden hatten somit Haut vom Typ II und III, welche definiert ist durch meist Sonnenbrand und gelegentlich Bräunung (II) und manchmal Sonnenerthem und immer Gewöhnung bzw. Bräunung nach 30 min UV-Exposition (Orfanos und Garbe 2002). Einschränkung der Nierenfunktion, Diabetes Mellitus, manifeste Herzinsuffizienz (ab NYHA II), Periphere arterielle Verschlusskrankheit (ab Stadium IIb), sekundäre arterielle Hypertonie, und Teilnahme an anderen klinischen Prüfungen innerhalb der letzten drei Monate führten ebenfalls zum Ausschluss aus dem Probandenkollektiv.

Eingeschlossen wurden die Probanden nach schriftlicher und mündlicher Aufklärung sowie schriftlicher Einverständniserklärung von Seiten der Probanden.

Die anthropometrischen Daten der Probanden sind als Mittelwert \pm Standardabweichung in der Tabelle 3 dargestellt. Die Werte der einzelnen Probanden sind im tabellarischen Anhang in Tabelle A 1 aufgeführt.

Ein siebzehnter Proband musste nach Abschluss der Studie aufgrund eines Hämorrhoidal-Leidens ausgeschlossen werden. Eine kurze Besprechung dieser Werte des Probanden Nr. 2 ist dem tabellarischen Anhang unter A 9 beigelegt.

Tabelle 3: Anthropometrische Grundgrößen der Probanden, dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung

	Alter (Jahre)	Geschlecht	Größe (m)	Gewicht (kg)	BMI (kg/m ²)
Gruppe I (n=8)	47,63 \pm 14,98	3f, 5m	1,74 \pm 0,09	83 \pm 10,81	27,27 \pm 2,16
Gruppe II (n=8)	44,38 \pm 11,29	4f,4m	1,73 \pm 0,07	80,88 \pm 11,04	27,22 \pm 5,10

Geschlecht: f=weiblich, m=männlich.

3.3 Studienaufbau

16 Probanden wurden nach abgeschlossenen Voruntersuchungen drei Mal pro Woche bestrahlt. In einfach blindem Studiendesign war den Probanden Ihre Gruppenzugehörigkeit unbekannt. Mit der Gruppenzugehörigkeit verbunden war das verwendete UV-Spektrum. Die eine Gruppe wurde mit 99,5% UVA-Licht bestrahlt, die andere mit 96,5% UVA und 3,5% UVB. Erstere wird im weiteren Verlauf Gruppe I, letztere Gruppe II genannt. Die Aufteilung wurde mittels Randomisierung festgelegt. Daraus resultiert das Design, dass die Gruppe I mit der Gruppe II verglichen wird, und beide Gruppen vor und nach der Intervention verglichen werden.

3.4 Voruntersuchungen

Die Voruntersuchungen beinhalteten die Aufklärung der Probanden, die Unterzeichnung der Einverständniserklärung und eine allgemeine Anamnese mit Erfassung der Ausschlusskriterien. Es wurde eine Blutentnahme durchgeführt für die Ausgangswerte der zu untersuchenden Antioxidantien Glutathion, Glutathiondisulfid, Vitamin E, Glutathionperoxidase, Glutathionreduktase, Glutathion-S-Transferase und Superoxiddismutase. Die Blutvoluminae wurden bestimmt.

3.5 Bestrahlungslampen und Ablauf der UV-Applikation:

Die Gruppe I wurde mit einer Philips (Eindhoven) TL 10 UVA-Lampe bestrahlt, die mit 99,95% UVA-Emission als reine UVA-Lampe gilt.

Die Gruppe II wurde mit einer Helarium-Lampe (Cosmedico, Stuttgart) bestrahlt, die ein sonnenähnliches Spektrum mit 96,5% UVA und 3,5% UVB emittiert.

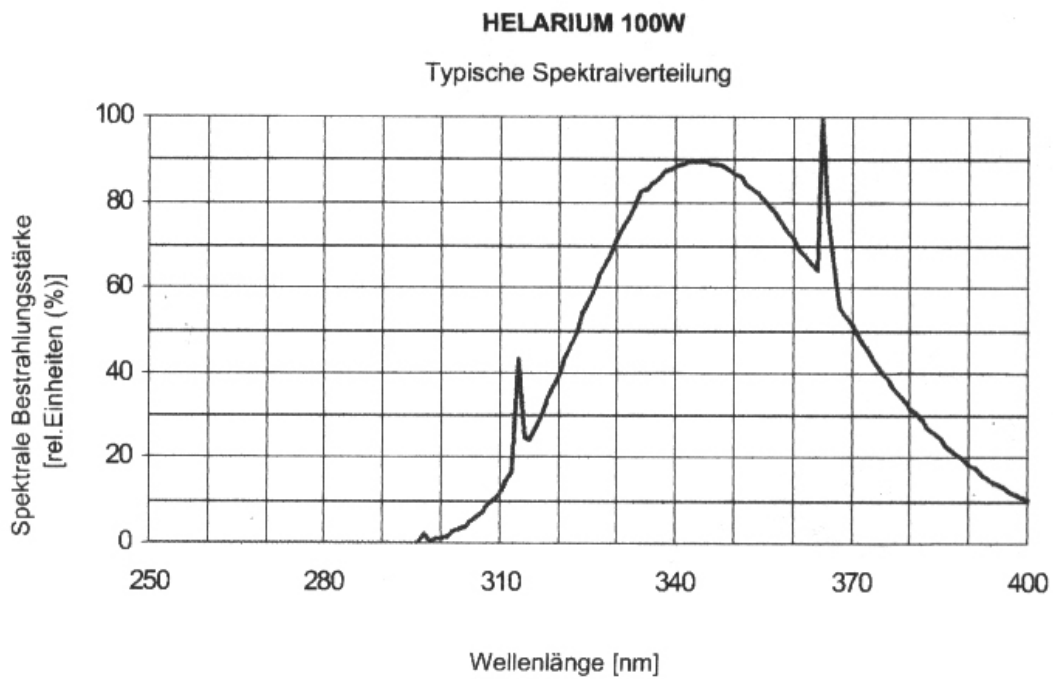
Die Spektren der verwendeten Leuchtstoffröhren wurden vor Beginn des Bestrahlungsregimes vom Institut für Lichttechnik der TU Berlin überprüft und gemessen. Dabei wurde die erythemwirksame Bestrahlungsstärke der TL 10 UVA-Lampe mit 85mW/m², die der Helarium-Lampe mit 526 mW/m² ermittelt (Grothmann 1998).

Die Abbildung 2 zeigt die emittierten Wellenlängen der verwendeten Bestrahlungsquellen. Dabei zeigt sich bei der Helarium-Lampe ein Spektrum, welches den ganzen UVB-Bereich mit einschließt, während die TL 10 UVA-Lampe Wellenlängen erst ab 340 nm emittiert. Tabelle A 2 im Anhang zeigt die jeweiligen Technischen Daten der Bestrahlungsgeräte.

Die Bestrahlung der Probanden wurde mit zwei identischen Sonnenbanken durchgeführt. Diese waren in Ober und Unterteil mit je 10 Leuchtstoffröhren zu 100W bestückt. Die Beschriftung der Röhren wurde unleserlich gemacht, so dass ein einfach blindes Setting möglich war. Die Teilnehmer legten sich auf die Unterseite der Sonnenbank, das klappbare Oberteil wurde bis auf 10 cm zum Körper gebracht. Die Bestrahlung wurde am vollständig entkleideten Körper der Studienteilnehmer durchgeführt, die Augen wurden mit speziellen Schutzschalen abgedeckt.

Alle 18 Bestrahlungssitzungen fanden innerhalb von sechs Wochen drei mal wöchentlich statt. Diese Bestrahlungsperiode lag in der Jahreszeit von Anfang März bis Mitte April. Die Bestrahlungstage waren montags, mittwochs und freitags. Zwischen zwei Bestrahlungen sollte stets mindestens ein bestrahlungsfreier Tag liegen, nur in terminlich begründeten wenigen Einzelfällen wurde eine Ausnahme gestattet, wobei in diesen Fällen mindestens 24 Stunden zur letzten UV-Exposition vergangen sein mussten.

Leuchte vom Typ Helarium der Firma Cosmedico/Stuttgart:



Leuchte vom Typ TL 10 UVA von Philips/Eindhoven:

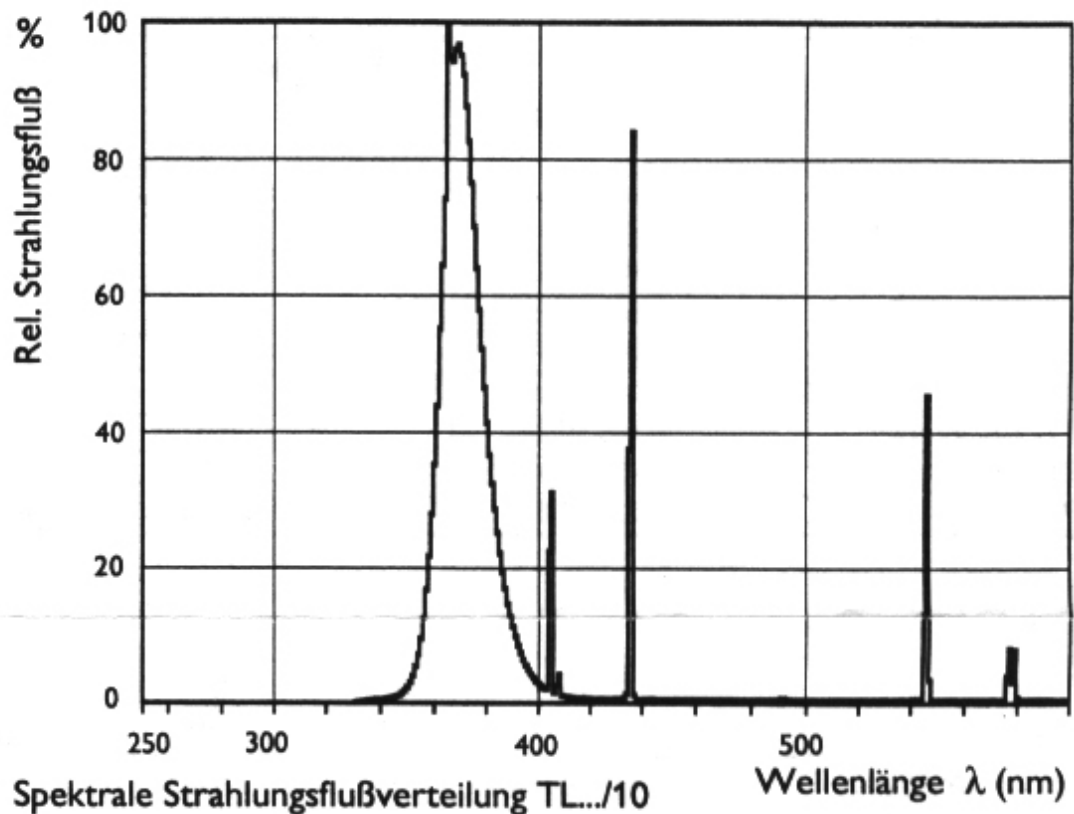


Abbildung 2: Spektrale Strahlungsflußverteilung der verwendeten Bestrahlungsquellen Helarium 100W der Firma Cosmedico und TL 10 UVA von Philips

3.6 Dosierung der Bestrahlung

Die durch das Institut für Lichttechnik ermittelten Bestrahlungsstärken und -dosen waren die Grundlage für unser angewandtes Bestrahlungsregime. 1 MED für Hauttyp II wird entsprechend der DIN bzw. CIE (Grothmann 1998) standardisiert festgelegt auf $25\text{mJ}/\text{cm}^2$. Diese Werte wurden mit den aus vorangegangenen Studien mit diesen Geräten bekannten Daten (Bühning et al. 1996, Knieß 1992) abgeglichen. Die initiale Bestrahlungszeit wurde bei allen Studienteilnehmern entsprechend dem einfach blinden Setting auf fünf Minuten festgesetzt. Damit konnte eine erythemauslösende, bzw. eine potentiell schädigende Wirkung auf die Haut mit hoher Wahrscheinlichkeit vermieden werden.

Für die Gruppe I entspricht die anfängliche Bestrahlungszeit von fünf Minuten etwa 0,1 MED bzw. einer erythemwirksamen Bestrahlungsdosis von $2,55\text{mJ}/\text{cm}^2$. Das errechnet sich auf Basis der erythemwirksamen Bestrahlungsstärke von $85\text{mW}/\text{m}^2$ der TL 10-Röhren. Die MED wäre erst nach einer Bestrahlungszeit von 49 Minuten erreicht.

Bei der Gruppe II entspricht die initiale Bestrahlungszeit von fünf Minuten einer erythemwirksamen Initialdosis von $16\text{mJ}/\text{cm}^2$, bzw. einer suberythematösen Dosis von 0,64 MED für den Hauttyp II. Für die an den Helarium-Röhren gemessene erythemwirksame Bestrahlungsstärke von $0,526\text{W}/\text{m}^2$ wird eine erythemauslösende Bestrahlungszeit (1 MED) erst nach 7,9 Minuten erreicht.

Bei jeder weiteren Sitzung wurde die Bestrahlungszeit um 10% gesteigert, solange keine subjektiven Hautmissempfindungen auftraten. Falls doch in Einzelfällen über Hautsymptome wie Kribbeln, Spannungsgefühl oder gar Hautrötungen berichtet wurde, verzichteten wir vorsichtshalber auf die Dosissteigerung, bis sich keine der Empfindungen bzw. Erscheinungen mehr einstellte. Durch dieses Vorgehen wurde auch im weiteren Verlauf der Bestrahlung eine erythemwirksame Dosis, die einen ernststen Sonnenbrand ausgelöst hätte, vermieden. Die Dosissteigerungen wurden insgesamt von beiden Gruppen gut vertragen.

3.7 Blutabnahme und Probengewinnung

Mit einem Vacutainer-System aus einer mindestens 30 Minuten liegenden Braunüle und ohne vorhergehender Stauung wurden die Blutproben aus einer Vene des Unterarms genommen. Im direkten Anschluss daran bei 3500U/min für 10 Minuten zentrifugiert und so in Plasma und Erythrozyten getrennt. Letztere wurden anschließend drei Mal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Die so gewonnen Plasma- und Erythrozytenkonzentratproben wurden bei -70°C bis zur Analyse gelagert.

3.8 Laborbestimmungsmethoden

3.8.1 Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSG)

Material: Plasma und Erythrozytenkonzentrat

Bestimmungsmethode:

Die GSH-Reduktase-DTNB Recycling Methode für den quantitativen Nachweis von GSH und GSSG bedient sich der Spezifität der GSH-Reduktase und der photometrischen Darstellbarkeit der 2,2-Dinitro-5,5-dithiodibenzoessäure (DTNB). Bei der quantitativen Bestimmung von GSH wird GSH oxidiert durch DTNB, wobei GSSG und 5-Thio-2-nitrobenzoessäure entsteht (TNB). Die entstehende TNB-Menge ist photometrisch bei 412nm messbar und verhält sich proportional zur Menge an vorhandenem GSH. Die GSSG-Bestimmung folgt dem gleichen Prinzip, jedoch wird das GSH im 500µl Überstand vor dem Einfrieren mit 10µl 2-Venylpyridin und 30µl Triethanol-Amin maskiert und steht somit nicht mehr für die beschriebene Reaktion mit DTNB zur Verfügung. Das vorhandene GSSG wird durch die zugesetzte Glutathionreduktase (GR) unter Verbrauch von NADPH reduziert, das dabei entstandene GSH reagiert wie oben beschrieben mit DTNB zu GSSG und TNB, welches photometrisch meßbar ist. Die Menge an GSSG lässt sich über eine Standart-Kurve bestimmen, die den Zusammenhang der Absorptionswerte in proportionalen Zusammenhang mit der GSH- bzw. GSSG-Konzentration setzt. Entwickelt wurde die Methode von Owens 1965, modifiziert nach Griffith 1980 und

Anderson 1985. Eine detaillierte Darstellung der hier verwendeten Methode siehe auch Hütler et al 2000.

3.8.3 Vitamin E

Material: Plasma und Erythrozytenkonzentrat

Bestimmungsmethode:

Mit der HPLC Methode nach Bieri 1979. Dabei werden die 500µl Probenmaterial mit 10µl internem Standard (500mg/ml, Medchrom) und 2000µl gekühltem Ethanol vermengt, 1 Minute gemischt, 10 Minuten bei 1500U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird mit 3ml n-Hexan versetzt, 1 Minute gemischt und anschließend erneut 10 Minuten bei 1500U/min und 4°C zentrifugiert. Von der organischen Phase werden 2,5ml in ein neues Röhrchen gegeben. Das n-Hexan wird unter Verwendung von N₂ verdampft, der Rest mit 500µl Methanol aufgenommen, in zwei Vials gegeben und zur Bestimmung in den Autosampler platziert. Die dabei verwendete Säule ist eine Macherey-Nagel C18-100-5, 250x4mm, das Laufmittel: Methanol, HPLC-grade. Bei einem Flow von 1,3 und einer Laufzeit von 18 Minuten pro Probe erfolgt der Vitamin E Peak nach ca. 8,0 Minuten, der interne Standard Peak nach 10,5 Minuten. Die Menge des Vitamin E in der Ausgangsprobe lässt sich errechnen, wenn die Fläche des Vitamin E Peaks unter Berücksichtigung des internen Standard Peaks in Relation zu einer Standardprobe gesetzt wird.

3.8.4 Superoxiddismutase (SOD)

Material: Plasma und Erythrozytenkonzentrat

Bestimmungsmethode:

Benutzt wurde ein Kit von Ranson, Randox lab. cat. no. SD125, Crumlin, UK. Hierbei wird durch Xanthin und Xanthin-Oxidase das Superoxid-Radikal gebildet, welches sich mit 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-Phenyltetrazolium Chlorid (I.N.T.) verbindet. Dabei entsteht das photometrisch meßbaren Substrat red formazan dye. Diese Reaktion wird durch Anwesenheit von Superoxiddismutase gehemmt, welche das Superoxidradikal zu Wasserstoffperoxid umsetzt. Dadurch entsteht bei

Anwesenheit der Superoxiddismutase eine Extinktions-Abnahme in der photometrischen Bestimmung des red formazan dye bei 505nm. Im selben Messdurchlauf wird über im Kit vorhandene Standardlösungen unterschiedlicher SOD-Konzentrationen eine Kurve erstellt, in welcher der Zusammenhang zwischen Extinktions-Abnahme und SOD Enzymaktivität bestimmbar wird. Durch diese Standardkurve lässt sich die Aktivität der Superoxiddismutase in der vorliegenden Probe zuordnen.

3.8.5 Glutathionperoxidase (GPX)

Material: Plasma und Erythrozytenkonzentrat

Bestimmungsmethode:

Die Glutathionperoxidase setzt Hydroperoxide ROOH unter Oxidation von reduziertem GSH um. Dem Reaktionsansatz wird jeweils in substratsättigender Menge GSH, sowie Glutathionreduktase und NADPH als GSH-regenerierendes System beigefügt. Die Lösung wird für 10 Minuten bei 37 C° inkubiert. Anschließend wird 100µl 80%ige t-butyl-hydroperoxid-Lösung, das eigentliche Substrat der zu messenden Glutathionperoxidase beigefügt. Bei der enzymatischen Umsetzung des Peroxids durch die Glutathionperoxidase wird GSH zu GSSG reduziert, welches durch die beigefügte Glutathionreduktase unter äquimolarem NADPH-Verbrauch wieder zu GSH reduziert wird. Die Abnahme von NADPH, photometrisch messbar bei 340nm, korreliert mit der Glutathionperoxidasen-Aktivität, welche durch eine Standardkurve bestimmbar ist. Verwendet wird die Methode nach Paglia und Valentine 1967.

3.8.6 Glutathionreduktase (GR)

Material: Erythrozytenkonzentrat

Bestimmungsmethode:

Die Glutathionreduktase setzt GSSG unter Verbrauch von NADPH zu GSH um. Der Reaktionslösung werden GSSG und NADPH in ausreichenden Menge hinzugefügt, um eine Substratsättigung für die zu bestimmende Glutathionreduktase zu erreichen.

Als Puffersubstanz wird Kaliumphosphatpuffer mit KCL verwendet, die Temperatur zur Enzymbestimmung beträgt 30 C°. Die Abnahme von NADPH wird photometrisch bei 340nm bestimmt und korreliert mit der Glutathionreduktasen-Aktivität. Eine quantitative Zuordnung erfolgt auch hier über die Erstellung einer Standardkurve. Verwendet wird die Methode nach Carlberg 1985.

3.8.7 Glutathion-S-Transferase (GST)

Material: Erythrozytenkonzentrat

Bestimmungsmethode:

Die Glutathion-S-Transferase konjugiert 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB) mit GSH. Das dabei entstehende Konjugat wird bei 340nm photometrisch bestimmt. GSH und CDNB werden in ausreichender Menge hinzugefügt (50µl 0,02M GSH in H₂O und 50µl 0,045M CDNB in 95% Ethanol), um eine Substratsättigung für die zu messende Glutathion-S-Transferase zu erzielen. Die Reaktionstemperatur beträgt standardisiert 30C°, als Puffer wird ein Kaliumphosphatpuffer verwendet. Die quantitative Zuordnung der vorliegenden enzymatischen Aktivität der Glutathion-S-Transferase erfolgt über die Erstellung einer Standardkurve. Entwickelt wurde die Methode von Warholm 1985.

3.8.8 Blutbild

Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV, MCH, MCHC und Thrombozyten wurden mit einem Coulter Counter ermittelt.

3.8.9 Blutvolumen

Bei einer Blutvolumen-Bestimmung mittels CO Einwaschmethode, geleitet durch und beschrieben von Hütler et al. 2000, wurden folgende Werte gemessen: Hämoglobinmenge, Erythrozytenvolumen, Plasmavolumen, Blutvolumen.

3.8.10 Lipide

Triacylglyceride, Cholesterin, High Density Lipoproteine (HDL), Low Density Lipoprotein (LDL) wurden auf dem klinischen Autoanalyzer (Meßgerät: RA-System) bestimmt.

Bei allen verwendeten Methoden zur Bestimmung der Messgrößen handelte es sich um in der betreuenden Einrichtung bereits etablierte Meßmethoden.

3.9 Statistik

Deskriptive Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Eine univariate mehrfaktorielle ANOVA wurde angewandt zur Analyse der Messwiederholungen (within-subject-factor) und der unterschiedlichen Bestrahlungsregime (between-subject-factor). Signifikanz wurde festgelegt für einen p-Wert $< 0,05$. Mittels dem between-subject-factor wird überprüft, ob die Werteverteilung mit der Gruppeneinteilung korreliert. Mit dem within-subject-factor werden intraindividuell die Werte zu den Messzeitpunkten Vor und Nach Bestrahlung untersucht. Partielle Korrelationen wurden untersucht zwischen applizierter absoluter UV-Dosen und Glutathionkonzentration.