

**Aus der Klinik für Dermatologie der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Bernhard Homey**

**Photoprotektive Effekte von β -Carotin, Melanin,
Vitamin C und Vitamin E auf Protoporphyrin-IX-
induzierte phototoxische Reaktionen im Photo-
Hen's-Egg-Test**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Pascal Robert Bafteh

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Referent: Prof. Dr. med. Roland Kruse
Koreferent: Prof. Dr. med. Roland Fenk

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Bafteh PR, Siegesmund M, Hanneken S, Neumann NJ. Protective effects of β -carotene and melanin against protoporphyrine IX-induced phototoxicity in the photo hen's egg test. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2012;28(1):12-6.

Bafteh PR, Siegesmund M, Kuerten V, Neumann NJ. Phototoxicity of narrowband ultraviolet (UV) B (311 nm) compared with broadband UVB in the photo hen's egg test. *Br J Dermatol*. 2015;172(2):462-6.

Zusammenfassung

Bei der Erythropoetischen Protoporphyrinurie handelt es sich um eine sehr seltene, genetisch bedingte Stoffwechselstörung im blutbildenden System, bei der vermehrt Protoporphyrine in Blut, Erythrozyten und Gewebe abgelagert werden. Dies führt zum ersten klinischen Symptom, der vermehrten Photosensibilität. Ursächlich ist die gestörte Funktion bzw. der Funktionsausfall der Ferrochelatase. Die Prognose hängt in erster Linie vom Grad der Leberbeteiligung ab. Aufgrund der schwerwiegenden Einschränkungen – insbesondere durch die Vermeidung von Lichtexposition – werden Alltag und Lebensqualität der Patienten und ihrer Familien stark beeinflusst.

Ein Therapieansatz besteht in der topischen bzw. systemischen Gabe der Antioxidantien Ascorbinsäure, β -Carotin und Vitamin E. Zusätzlich steht das α -MSH-Analogon Afamelanotid, das unter anderem die körpereigene Melaninbildung erhöhen/anregen soll, im Fokus aktueller Studien.

In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe des PHET zunächst die phototoxische Wirkung von UV-B-Strahlung sowie von Protoporphyrin IX in Kombination mit UV-A-Strahlung evaluiert. Im zweiten Schritt wurden durch die zusätzliche Gabe der oben genannten Antioxidantien und Melanin photoprotektive Potentiale ermittelt. Die Ergebnisse wurden mithilfe der Parameter Letalität, Membraneintrübungen und Hämorrhagien am Dottersack-Gefäßsystem protokolliert.

Die vorliegenden Testergebnisse zeigen für die Substanzen Ascorbinsäure, β -Carotin und Vitamin E eine signifikante Minderung von UV-B-induzierten Schäden am Dottersack-Gefäßsystem. Gegenüber Protoporphyrin-IX-induzierter Phototoxizität konnte jedoch nur ein mäßiger photoprotektiver Effekt registriert werden.

Melanin zeigte gegenüber UV-B- sowie Protoporphyrin-IX-induzierten Schäden einen signifikanten Schutzeffekt. Dies deutet darauf hin, dass ein durch Afamelanotid erhöhter Melanin-Gehalt in der Haut ebenfalls einen vielversprechenden Effekt aufweisen könnte.

Nach unseren Ergebnissen könnte Afamelanotid für lichtempfindliche Patienten eine neue Therapieoption darstellen. Außerdem liegt die Annahme nahe, dass Ascorbinsäure, β -Carotin und Vitamin E unter Heranziehung aktueller Patientenstudien zur Therapie der EPP bestenfalls supportiv geeignet sind.

Abkürzungsverzeichnis

8-MOP	8-Methoxypsoralen
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
AIP	Akute intermittierende Porphyrie
α-MSH	α -Melanozyten-stimulierendes Hormon
βC	β -Carotin
CEP	Kongenitale erythropoetische Porphyrie
DGS	Dottersack-Gefäßsystem
DHI	5,6-Dihydroxyindol
DHICA	5,6-Dihydroxyindol-2-Carboxylsäure
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung
EPP	Erythropoetische Protoporphyrinurie
FECH	Ferrochelatase
GSH	Glutathion
HKP	Hereditäre Koproporphyrinurie
HR	Hämorrhagien
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte
LET	Letalität
LSF	Lichtschutzfaktor
M	Melanin
MC1R	Melanocortin-1-Rezeptor
ME	Membraneintrübungen
MED	Minimale erythemale Dosis
PDT	Photodynamische Therapie
PHET	Photo-Hen's-Egg-Test
POMC	Proopiomelanocortin-Gen
PP	Protoporphyrin
PPIX	Protoporphyrin IX
PUV-A	Psoralen-UV-A
PV	Porphyria variegata
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SOD	Superoxiddismutase
XLDPP	X-chromosomal-dominante Protoporphyrinurie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Problemstellung	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Porphyrine und Porphyrine	1
1.2 Erythropoetische Protoporphyrin (EPP)	3
1.2.1 Vererbung	3
1.2.2 Dermale Phototoxizität von Protoporphyrin IX	3
1.2.3 Klinik und Diagnose	7
1.2.4 Therapieoptionen	7
1.3 X-chromosomal dominante Porphyrie (XLDPP)	8
1.4 Photosensibilisatoren und Phototoxizität	8
1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	9
1.5 Antioxidantien	9
1.5.1 Allgemein	9
1.5.2 Enzymatisch	10
1.5.3 Nichtenzymatisch	11
1.6 Melanin, α -MSH und α -MSH-Analoga	15
1.6.1 Melanine	15
1.6.2 Die Regulation der Pigmentierung	16
1.6.3 α -MSH-Analoga	16
1.7 Der Photo-Hen's-Egg-Test	17
1.8 Fragestellungen	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Bruteier	18
2.1.2 Testsubstanzen	18
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	19
2.1.4 Geräte	20
2.2 Methoden	20
2.2.1 Übersicht des zeitlichen Verlaufes der Experimente	20
2.2.2 Bebrütung, Selektion und Präparation der Bruteier	21
2.2.3 UV-Strahlungsquelle und Bestrahlungsdosis	21

2.2.4	Versuchs- und Kontrollgruppen.....	22
2.2.5	Beobachtungszeitraum und Dokumentationsform	23
2.2.6	Beurteilungskriterien.....	23
2.3	Statistische Auswertungen.....	26
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Kontrollgruppen.....	27
3.2	PPIX/UV-A-Gruppe und UV-B-Gruppe	28
3.2.1	PPIX/UV-A-Gruppe	28
3.2.2	UV-B-Gruppe.....	29
3.3	β -Carotin	30
3.3.1	PPIX/UV-A-Gruppe	30
3.3.2	UV-B-Gruppe.....	33
3.4	Ascorbinsäure	36
3.4.1	PPIX/UV-A-Gruppe	36
3.4.2	UV-B-Gruppe.....	39
3.5	Trolox (Vitamin E)	42
3.5.1	PPIX/UV-A-Gruppe	42
3.5.2	UV-B-Gruppe.....	44
3.6	Melanin	48
3.6.1	PPIX/UV-A-Gruppe	48
3.6.2	UV-B-Gruppe.....	51
3.7	Vergleichsdiagramme	55
3.7.1	PPIX/UV-A-Gruppe	55
3.7.2	UV-B-Gruppe.....	57
4	Diskussion	59
4.1	Phototoxische Reaktionen von PPIX in Kombination mit UV-A-Strahlung	59
4.2	Ascorbinsäure (Vitamin C)	60
4.3	Trolox (Vitamin E)	61
4.4	β -Carotin	62
4.5	Melanin	64
4.6	α -MSH-Analoga	68
5	Literaturverzeichnis	70
Anhang	85

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel von Protoporphyrin IX	3
Abb. 2: Photodynamische Mechanismen der Porphyrin-Phototoxizität	5
Abb. 3: Modell zur Eindringtiefe von UV-C, UV-B, UV-A, sichtbarem Licht und Infrarot-Licht	6
Abb. 4: Schaubild zur Entstehung von oxidativem Stress und der Vorbeugung durch Antioxidantien	11
Abb. 5: Strukturformel von Ascorbinsäure	12
Abb. 6: Strukturformel von α -Tocopherol	13
Abb. 7: Strukturformel von β -Carotin.....	14
Abb. 8: Strukturformeln von Eumelanin und Pheomelanin	15
Abb. 9: Rotfluoreszenz von normalen Eierschalen unter langwelligem ultraviolettem Licht (366 nm)	18
Abb. 10: Präparation der Bruteier	22
Abb. 11: Bruteier vor Ablesung und Beurteilung	25
Abb. 12: Embryonen mit intaktem Dottersack-Gefäßsystem	28
Abb. 13: Embryonen der PPIX/UV-A-Gruppen	29
Abb. 14: Embryonen der UV-B-Gruppe	30
Abb. 15: Morphologische Parameter der PPIX/UV-A-Gruppen	31
Abb. 16: Letalitätsraten der PPIX/UV-A-Gruppen	32
Abb. 17: Embryonen der PPIX/UV-A/ β -Carotin-Gruppen	32
Abb. 18: Morphologische Parameter der UV-B/ β -Carotin-Gruppen.....	34
Abb. 19: Letalitätsraten der UV-B/ β -Carotin-Gruppen	35
Abb. 20: Embryonen der UV-B/ β -Carotin-Gruppen.....	35
Abb. 21: Morphologische Parameter der PPIX/UV-A/Ascorbinsäure-Gruppen	37
Abb. 22: Letalitätsraten der PPIX/UV-A/Ascorbinsäure-Gruppen	38
Abb. 23: Embryonen der PPIX/UV-A/Ascorbinsäure-Gruppen	38
Abb. 24: Morphologische Parameter der UV-B/Ascorbinsäure-Gruppen.....	40
Abb. 25: Letalitätsraten der UV-B/Ascorbinsäure-Gruppen	41
Abb. 26: Embryonen der UV-B/Ascorbinsäure-Gruppen	41
Abb. 27: Morphologische Parameter der PPIX/UV-A/Trolox-Gruppen	43
Abb. 28: Letalitätsraten der PPIX/UV-A-Trolox-Gruppen.....	44
Abb. 29: Embryonen der PPIX/UV-A/Trolox-Gruppen	44
Abb. 30: Morphologische Parameter der UV-B/Trolox-Gruppen.....	46

Abb. 31: Letalitätsraten der UV-B/Trolox-Gruppen	47
Abb. 32: Embryonen der UV-B/Trolox-Gruppen	47
Abb. 33: Morphologische Parameter der PPIX/UV-A/Melanin-Gruppen	49
Abb. 34: Letalitätsraten der PPIX/UV-A/Melanin-Gruppen	50
Abb. 35: Embryonen der PPIX/UV-A/Melanin-Gruppen.....	51
Abb. 36: Morphologische Parameter der UV-B/Melanin-Gruppen	53
Abb. 37: Letalitätsraten der UV-B/Melanin-Gruppen.....	54
Abb. 38: Embryonen der UV-B/Melanin-Gruppen	54
Abb. 39: Morphologische Parameter der PPIX/UV-A-Gruppen	55
Abb. 40: Letalitätsraten der PPIX/UV-A-Gruppen	56
Abb. 41: Morphologische Parameter der UV-B-Gruppen.....	57
Abb. 42: Letalitätsraten der UV-B-Gruppen	58
Abb. 43: Absorptionsspektren von Protoporphyrin IX (PPIX), Melanin und β -Carotin	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Akute und nichtakute Porphyrien	2
Tabelle 2: Kontrollgruppen	22
Tabelle 3: Testversuchsreihe mit der Kombination aus PPIX-Applikation und UV-A-Bestrahlung.....	23
Tabelle 4: Testversuchsreihe mit UV-B-Bestrahlung	23
Tabelle 5: Definitionen der Ausprägungsgrade Membraneintrübungen.....	24
Tabelle 6: Definitionen der Ausprägungsgrade Hämorrhagien	25
Tabelle 7: Ergebnisse der Kontrollgruppen (1–15).	27
Tabelle 8: Ergebnisse: PPIX/UV-A/UV-B/Kontrolle	28
Tabelle 9: Ergebnisse: PPIX/UV-A-Licht und zusätzliche Applikation von β -Carotin	30
Tabelle 10: Ergebnisse: UV-B-Licht und zusätzliche Applikation von β -Carotin	33
Tabelle 11: Ergebnisse: PPIX/UV-A-Licht und zusätzliche Applikation von Ascorbinsäure.....	36
Tabelle 12: Ergebnisse: UV-B-Licht und zusätzliche Applikation von Ascorbinsäure	39
Tabelle 13: Ergebnisse: PPIX/UV-A-Licht und zusätzliche Applikation von Trolox.....	42
Tabelle 14: Ergebnisse: UV-B-Licht und zusätzliche Applikation von Trolox.....	44
Tabelle 15: Ergebnisse: PPIX/UV-A-Licht und Applikation von synthetischem Melanin.....	48
Tabelle 16: Ergebnisse: UV-B-Licht und zusätzliche Applikation von synthetischem Melanin	51

Problemstellung

Die zum Formenkreis der kutanen Porphyrinen gehörende Erythropoetische Protoporphyrinurie (EPP) zeichnet sich durch einen Defekt im Häm-Stoffwechsel aus, der zu einer Akkumulation des Metaboliten Protoporphyrin IX (PPIX) in den Zellen führt (1,2). Krankheitsursache ist ein seltener Gendefekt, der zum Ausfall eines Enzyms führt. Es wird eine autosomal-semidominante und eine autosomal-rezessive Form unterschieden (3).

Da PPIX als Photosensibilisator UV-Licht absorbiert (4,5), entsteht eine extreme Lichtempfindlichkeit und konsekutiv eine phototoxische Schädigung der Haut (6). Der Zeitraum, in dem sich EPP-Patienten außerhalb von Sonnenlicht-undurchlässigen Bereichen aufhalten können, beträgt selbst unter Anwendung von geeignetem Lichtschutz (z.B. *Sunscreens*) nur Minuten (1,6,7). Die EPP stellt eine sehr schmerzhaft und sozial stigmatisierende Photodermatose dar. Darüber hinaus können sich in 5–20% der Fälle lebensbedrohliche Lebermanifestationen akut oder als Spätfolge einstellen, da sich PPIX auch in der Leber ablagern kann (8).

Ein Therapieansatz für die EPP beruht auf der oralen Gabe von Carotinoiden sowie von Vitamin E, Vitamin C und deren Kombination, die als Antioxidantien und *Sauerstoffquencher* die durch Radikale verursachten phototoxischen Hautschäden einschränken sollen (9–12). Diese Behandlungsvarianten erwiesen sich bisher jedoch als nicht besonders erfolgreich und werden daher auch in der Literatur kontrovers diskutiert (13–15). Die Applikation von 8-Methoxypsoralen (8-MOP) oder anderen Photosensibilisatoren in Kombination mit UV-A-Licht (PUVA-Therapie) bzw. die Therapie mit UV-B-Licht ist ebenfalls nur mäßig effektiv (16–18).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob einerseits das phototoxische Potential des Agens PPIX in Kombination mit UV-A-Licht sowie andererseits die Schädigungen von UV-B-Licht alleine in einem etablierten In-vivo-Modell für Phototoxizität, dem PHET (19–21), nachweisbar sind. Anschließend wurden die o.g. Therapieoptionen mit β -Carotin, Vitamin C und Vitamin E überprüft. Zusätzlich wurde, bezogen auf einen neuen Therapieansatz, der auf der Anwendung von synthetischen α -MSH-Analoga beruht (9,22), das photoprotektive Potential von Melanin gegenüber PPIX-induzierten phototoxischen Testreaktionen erfasst.

1 Einleitung

1.1 Porphyrine und Porphyrien

Porphyrine sind essenzielle Bausteine des Lebens; sie bilden nicht nur die Grundstruktur des Häms, sondern auch des Chlorophylls. Sie besitzen z.B. die Fähigkeit, elektromagnetische Strahlung zu absorbieren und die dort gespeicherte Energie für die Zellen zur Verfügung zu stellen. Außerdem tragen die Porphyrine maßgeblich zum Transport von Sauerstoff bei, indem sie dessen reversible Bindung an Häm- bzw. Myoglobin ermöglichen (6). Die Häm- bzw. Porphyrinbiosynthese läuft über acht enzymatische Schritte, ausgehend von Succinyl-CoA und Glycin, partiell im Mitochondrium und partiell im Zytosol ab (23).

Die Porphyrien bilden eine Gruppe von acht metabolischen Erkrankungen, die auf einer vorwiegend monogen vererbten Störung der Häm- bzw. Porphyrinbiosynthese beruhen. Den sowohl klinisch als auch genetisch heterogenen Porphyriefformen liegt ein Defekt einer der acht enzymatischen Schritte zugrunde (siehe Tabelle 1). Der jeweilige Enzymdefekt führt zu einer Akkumulation eines oder mehrerer Intermediärmetaboliten (z.B. PPIX) vor dem jeweiligen Syntheseschritt und konsekutiv letztlich zu einem Mangel an Häm (1,2,7,23).

Klinisch wird zwischen akuten und nicht akuten Porphyrien differenziert.

Akute Porphyrien zeichnen sich durch lebensbedrohliche akute Schübe aus, die typischerweise abdominelle, neurologische, psychiatrische und kardiovaskuläre Symptome hervorrufen. Die mehr als 10-fache Erhöhung von Porphobilinogen oberhalb der Norm im Spontanurin kann für die Diagnosestellung von Bedeutung sein. Dies gilt allerdings nicht für toxisch induzierte Porphyriesyndrome (1,6). Patienten mit kutanen Porphyrien können mit akuter, schmerzhafter Photosensibilität vorstellig werden, die durch akkumulierte Porphyrine in der Haut ausgelöst wird. Die Differenzialdiagnose erfolgt biochemisch durch quantitative Bestimmungen der Porphyrinvorläufer in Urin, Stuhl, Plasma und Erythrozyten (6).

Tabelle 1: Akute und nichtakute Porphyrien

	Genlokus	Betroffenes Enzym	Vererbungsform
<u>Akute Porphyrien</u>			
Akute intermittierende Porphyrie (AIP)	11q24.1-q24.2	Porphobilinogen-Desaminase	autosomal-dominant
Porphyria variegata (PV)	1q22-q23	Protoporphyrinogen-Oxidase	autosomal-dominant
Hereditäre Koproporphyrin (HKP)	3q12	Koproporphyrinogen-Oxidase	autosomal-dominant
Doss-Porphyrie (δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase-Defizienz-Porphyrie)	9q34	δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase	autosomal-rezessiv
<u>Nichtakute Porphyrien</u>			
Porphyria cutanea tarda (PCT)	1p34	Uroporphyrinogen-Decarboxylase	In 25% der Fälle autosomal-dominant, ansonsten erworben
Erythropoetische Protoporphyrin (EPP)	18q21.3	Ferrochelatase	autosomal-semidominant, autosomal-rezessiv
X-chromosomal dominante Protoporphyrin (XLDPP)	Xp11.21	Aminolävulinsäure-Synthase 2	X-chromosomal dominant
Kongenitale erythropoetische Porphyrie (CEP)	10q25.3-q26.3	Uroporphyrinogen-III-Synthase	autosomal-rezessiv

1.2 Erythropoetische Protoporphyrin (EPP)

1.2.1 Vererbung

Die EPP wurde erstmals 1953 von Kosenow und Treibs beschrieben (24). Sie ist die häufigste Porphyrieform bei Kindern (25). Bei der autosomal-semidominanten und der seltenen autosomal-rezessiven Form ist ein genetisch bedingter Defekt des Enzyms Ferrochelatase (FECH) für die Pathogenese der EPP verantwortlich (2,3). Die FECH ist das Terminalenzym der Häm-Biosynthese, das durch den Einbau von Eisen in PPIX das Häm bildet. Durch den Defekt der FECH fällt vermehrt PPIX an (26).

1.2.2 Dermale Phototoxizität von Protoporphyrin IX

Schon 1990 stellte Kennedy die phototoxische Wirkung von PPIX in der photodynamischen Therapie (PDT) vor (27). Zunächst erfolgt eine topische Applikation von 5-Aminolävulinsäure, welches später zum Photosensibilisator PPIX umgebaut wird. In Verbindung mit UV-A-Strahlung kann durch die phototoxischen Eigenschaften von PPIX selektiv Gewebe eliminiert werden (28).

Das durch exzessive Synthese und Akkumulation erhöhte PPIX wird durch reife Erythrozyten, die aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf gelangen, ins Blut befördert (29). Das stark lipophile PPIX (siehe Abb. 1) diffundiert aus den Erythrozyten und bindet an Albumin oder an Zellmembranen (z.B. von Endothelzellen, welche die Gefäße der Dermis auskleiden) (30).

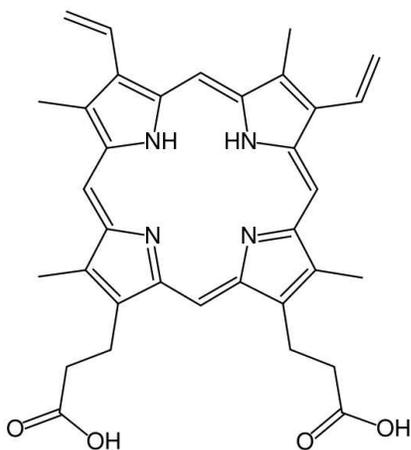


Abb. 1: Strukturformel von PPIX

PPIX absorbiert extensiv UV-Licht im Bereich der sog. Soret-Bande (400–410 nm) und in geringerem Ausmaß in den Q-Banden (500–650 nm) und wirkt so als Photosensibilisator. Es weist aufgrund des durch konjugierte Doppelbindungen heterozyklischen planaren Aufbaus eine Molekülstruktur mit starker Fluoreszenz auf (31,32). Durch die Lichtabsorption wird die Energie der Orbitalelektronen des PPIX vom Grundzustand zunächst in den angeregten Singulett-Zustand und anschließend in den Triplett-Zustand transformiert. Das angeregte PPIX gibt die absorbierte Energie entweder als Photonen einer längeren Wellenlänge wieder ab (Fluoreszenz) oder geht chemische Reaktionen mit den umliegenden zellulären Strukturen ein. So werden Membranlipide entweder direkt oxidiert (Photoreaktion Typ I) oder es wird Singulett-Sauerstoff gebildet, der spontan oder durch enzymatische Aktivität zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) konvertiert (Photoreaktion Typ II; siehe Abb. 3). Bei der Photoreaktion Typ I zerfällt PPIX zu einer weiteren photoaktiven Substanz, die über eine durch Bestrahlung ausgelöste Reaktion abgebaut wird (33–36).

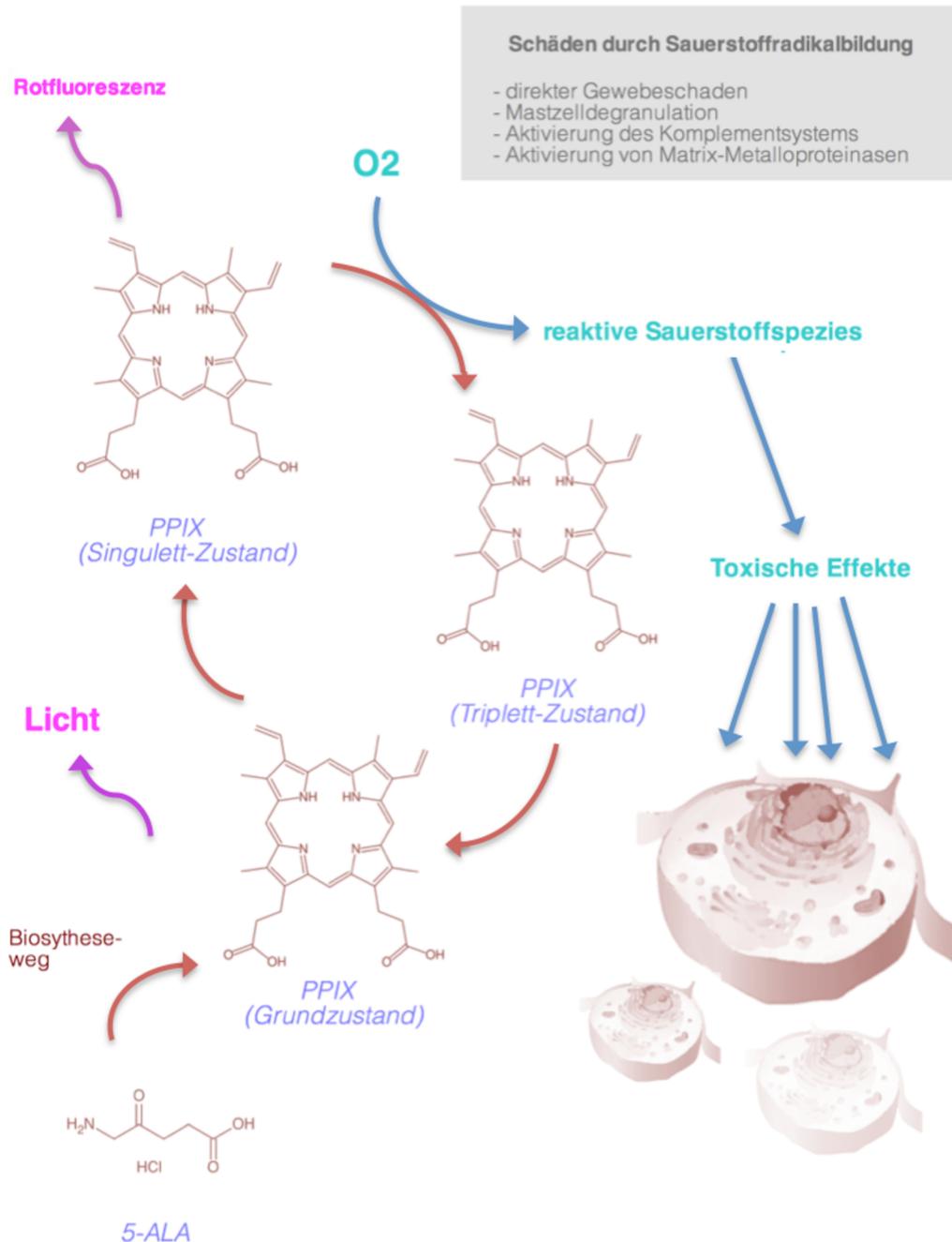


Abb. 2: Photodynamische Mechanismen der Porphyrin-Phototoxizität. Modifiziert nach Yano et al. und Teges et al. (37,38)

Nach der Biosynthese aus 5-Aminolävulinsäure wird PPIX durch Energie in Form von UV-Strahlung (Photonenstrahlung) vom Grundzustand in den Singulett-Zustand befördert. Dabei steigt das Energieniveau des Porphyrins. Außerdem findet ein spontaner Übergang in den Triplett-Zustand statt. Durch die Reaktion mit Sauerstoff (O₂) entstehen reaktive Sauerstoffspezies über Singulett-Sauerstoff, die zu Schädigungen auf verschiedenen Ebenen führen.

Singulett-Sauerstoff, Superoxid-Anionen, Hydroxyl-Radikale und Hydrogenperoxide schädigen Zellmembranen, DNA sowie Zellorganellen u.a. durch Lipid-Peroxidation und andere Prozesse

(39–41). Außerdem kann PPIX durch die Induktion des Komplementsystems zu einer Mastzellaktivierung bzw. der Freisetzung ihrer Mediatoren führen (42).

Die Pathogenese der EPP im Rahmen der Schäden durch PPIX bzw. Singulett-Sauerstoff wurde auch mit dem Elektronenmikroskop eingehend untersucht. Dabei zeigten sich als Hauptbefund schwerwiegende Schäden am Gefäßsystem bestehend aus endothelialer Zelldegeneration und einem Austritt vaskulärer Inhalte. Die Epidermis hingegen zeigte keine pathogenetisch bedeutsamen Auffälligkeiten (43).

Dies hängt vermutlich auch mit der Eindringtiefe der unterschiedlichen Strahlungsqualitäten zusammen. UV-A-Strahlung beispielsweise dringt vor allem in die oberen Anteile der Dermis ein, in der unter anderem eine Vielzahl von Gefäßen liegt. UV-B-Strahlung dringt bis in die Epidermis ein (siehe Abb. 3).

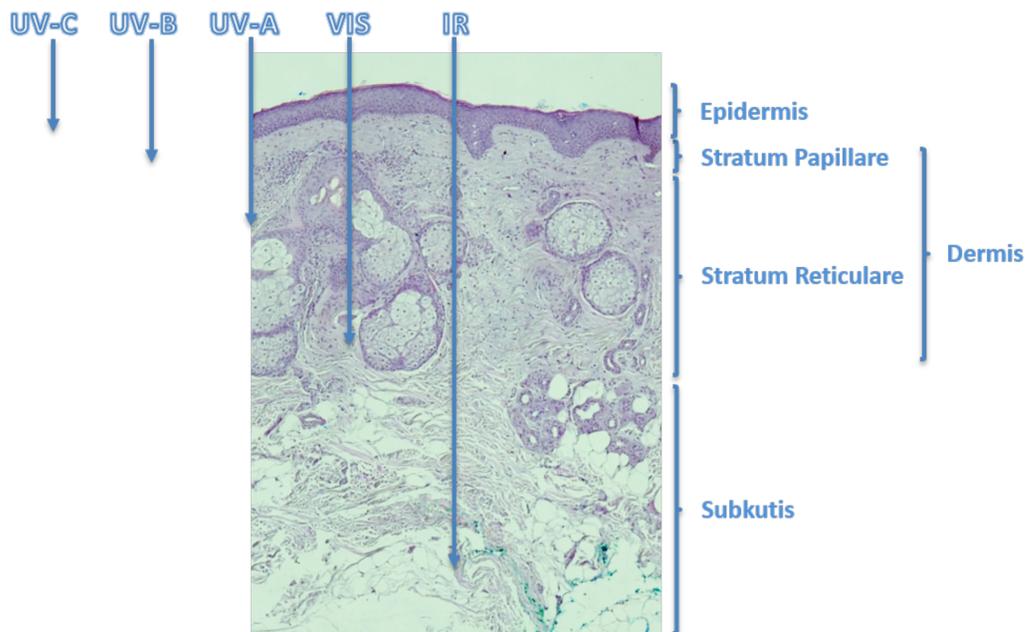


Abb. 3: Modell zur Eindringtiefe von UV-C, UV-B, UV-A, Sichtbarem Licht und Infrarot-Licht. Histologischer Querschnitt von aktinisch geschädigter Haut des Gesichts (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Stephan Braun, Universitätsklinikum Düsseldorf). Modifiziert nach Fuchs (44).

UV-C, UV-C-Strahlung; UV-B, UV-B-Strahlung; UV-A, UV-A-Strahlung; VIS, sichtbares Licht; IR, infrarot-Licht

1.2.3 Klinik und Diagnose

Klinisch zeigt sich eine extreme Lichtempfindlichkeit und konsekutiv eine phototoxische Schädigung der Haut, die an den exponierten Hautarealen meist schon in der Kindheit mit Brennen, Jucken, starken Schmerzen, Erythemen und Ödemen assoziiert ist. Bullöse Manifestationen oder Hauterosionen sind dagegen untypisch für eine EPP (25).

Das lipophile PP wird letztendlich biliär eliminiert und ist in hohen Konzentrationen hepatotoxisch (6). So entwickeln sich in 5–20% der Fälle Lebermanifestationen (8). Allerdings ist die XLDPP mit einem wesentlich höheren Risiko für ein fulminantes Leberversagen vergesellschaftet (45,46).

Eine Sicherung der Diagnose erfolgt über die Bestimmung der Protoporphyrin-Konzentration in den Erythrozyten. Diese kann dabei 5–100-fach erhöht sein. Der Protoporphyrin-Fluoreszenz-Emissions-Scan zeigt einen Peak bei 634 nm an. Im Gegensatz zum Stuhlnachweis wird PPIX im Urin aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften nicht in erhöhtem Maße gemessen. Differenzialdiagnostisch sollte an die CEP, die homozygoten Varianten der autosomal-dominanten vererbten kutanen Porphyrinen (PCT, PV, HKP), sowie an eine Bleivergiftung gedacht werden (1,47).

1.2.4 Therapieoptionen

Der Hauptbestandteil der aktuellen Therapie besteht zurzeit in der Vermeidung von Sonnenlicht sowie in der Verwendung von vor Licht schützender Kleidung. Gelbe Glasfilter absorbieren Licht im Bereich der Soret-Bande und reduzieren so die Lichteinstrahlung z.B. durch Autofenster (48). Auch ein adäquater Sonnenschutz ist essenziell. Da eine Empfindlichkeit hauptsächlich gegenüber sichtbarem (blauem) Licht besteht, sind herkömmliche Sonnenschutzcremes, die vor ultravioletter Strahlung (besonders UV-B) schützen, weniger effektiv. Die Anwendung von reflektierendem Sonnenschutz auf der Basis von Titaniumdioxid oder Zinkoxid schützt gegen UV-A, UV-B und gegen sichtbares Licht und ist deshalb effizienter (16,49,50). Die Lichtempfindlichkeit bzw. das vermeidende Verhalten gegenüber Sonnenlicht impliziert ggf. die Notwendigkeit einer Vitamin-D-Überwachung und -Substitution (51). Die Behandlung mit Gallensäuren (Ursodesoxycholsäure) steigert die hepatische *Clearance* von PP, während Colestyramin den enterohepatischen Kreislauf unterbricht (52).

Ein weiterer Therapieansatz beruht auf der oralen Gabe von β -Carotin (75–200 mg/Tag). Dabei wird angenommen, dass die Lichttoleranz erhöht wird, indem β -Carotin die durch PPIX induzierten reaktiven Sauerstoffspezies löscht (12,15). Durch die Administration von Vitamin E und Vitamin C bzw. deren Kombination soll ebenfalls die zellschädigende Wirkung von PPIX-induzierten freien Radikalen verhindert werden (53–55). Diese und weitere Therapieansätze mit Antioxidantien (u.a. Cystein, Dihydroxyaceton, Canthaxantin) wurden von Minder et al. in einer Meta-Analyse untersucht und als weitestgehend ineffektiv beschrieben (9).

Auch sind Studien zur Schmalband-UV-B- (56) sowie zur PUV-A-Therapie bekannt (17). In der Praxis kann anscheinend durch vorsichtig dosierte UV-B-Applikation am effektivsten eine Verbesserung der Lichttoleranz erreicht werden (57). Es wird angenommen, dass der zugrunde liegende Mechanismus auf der Induktion von Melaninpigmenten in der Epidermis und auf einer epidermalen Verdickung („*skin hardening*“) basiert. Effektiv wird so die Penetration von Licht durch die Haut reduziert (58).

1.3 X-chromosomal dominante Porphyrie (XLDPP)

Bei 7% der Patienten mit der klinischen und biochemischen Verdachtsdiagnose einer EPP liegt keine Defizienz des betroffenen Enzyms FECH vor. Diese vor wenigen Jahren entdeckte, seltene X-chromosomal-dominante Variante der Protoporphyrinurie (XLDPP) wird durch eine gesteigerte δ -Aminolävulinsäure-Synthase-Aktivität charakterisiert, welche zu einem Exzess an δ -Aminolävulinsäure und somit zu einer erhöhten Porphyrin-Biosynthese führt. Da der Anteil an Zink-chelatiertem erythrozytärem PP bei der XLDPP wesentlich höher als bei der klassischen EPP ist, fällt die Unterscheidung zwischen klassischer EPP und der neuen Protoporphyrinurievariante leicht (2).

1.4 Photosensibilisatoren und Phototoxizität

Als Photosensibilisatoren wird eine Gruppe von Substanzen bezeichnet, die in Kombination mit elektromagnetischer Strahlung zu pathologischen Veränderungen der menschlichen Haut führen. Diese werden auch im Rahmen der PDT zur Behandlung des Basalzellkarzinoms, Morbus Bowen sowie der aktinischen Keratose eingesetzt (41,59,60). Die durch Kontakt mit einem Photosensibilisator in Kombination mit UV-Bestrahlung entstehende nichtimmunologische Reaktion wird als Phototoxizität bezeichnet (61,62).

1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Ca. 1–3% des Sauerstoffs, der vom menschlichen Körper verbraucht wird, wird zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) konvertiert (63). Zu den ROS gehören neben Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) die bei der Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser auftretenden Zwischenprodukte Superoxidanionen-Radikale ($\text{O}_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyl-Radikale (OH^{\bullet}). Häufig werden auch Hypochlorid (HOCl), Peroxyl-Radikale (ROO^{\bullet}), Alkoxy-Radikale (RO^{\bullet}) und Stickstoffmonoxid (NO) dazugerechnet. ROS werden endogen über die Atmungskette sowie über Enzyme und Entzündungsreaktionen zur Abwehr von Erregern gebildet. Exogen sind sie in Raum- und Außenluft, in Substanzen wie Stickstoffdioxid und Zigarettenrauch sowie in Industrie- und Autoabgasen vorhanden. Oxidations- und Destruktionsprozesse durch diese ROS können alle biologischen Makromoleküle, wie z.B. Lipide (insbesondere in den Zellmembranen), Proteine und die DNA, betreffen und dabei zu letalen Zellschädigungen führen. Eine besondere Bedeutung für zytotoxische Effekte wird den Hydroxyl-Radikalen beigemessen, da sie als einzige ROS direkt mit biologischen Makromolekülen reagieren können (64–66). ROS zeigen daher insgesamt konträre Effekte: Auf der einen Seite unterstützen sie das menschliche Immunsystem, spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptose und wirken als Mediatoren bei der Zellsignaltransduktion. Auf der anderen Seite begünstigen sie die Karzinogenese und beschädigen zelluläre Makromoleküle. Daran wird deutlich, wie empfindlich das System möglicherweise auf äußere Einflüsse reagiert (67).

1.5 Antioxidantien

1.5.1 Allgemein

Antioxidantien dienen zum Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies, die von Oxidantien gebildet werden. Normalerweise herrscht ein Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien. Liegt z.B. aufgrund von pathophysiologischen Bedingungen (exogene/endogene Einflüsse) ein Ungleichgewicht zugunsten der Oxidantien vor, wird dies als „oxidativer Stress“ bezeichnet (68,69).

Oxidativer Stress spielt bei einer Reihe von Erkrankungen eine wichtige Rolle. Dazu zählen bspw. die Arteriosklerose, Morbus Parkinson und die diabetische Neuropathie (70–72). Generell bedingt oxidativer Stress eine vorzeitige Alterung sowie DNS-Schäden, die zu Karzinogenese führen können (73). Antioxidative Abwehrmechanismen können die schädlichen Wirkungen der

ROS auf die DNS, Lipide und Proteine unterbinden (siehe Abb. 4). Diese Schutzmechanismen beruhen auf enzymatischen sowie nichtenzymatischen Antioxidantien (68).

1.5.2 Enzymatisch

Zu den enzymatischen Antioxidantien zählen die Katalasen, das Glutathion (GSH) sowie die Superoxiddismutasen (SOD) (74,75). Letztere werden bzgl. ihres Metallions (Kuper/Zink, Mangan oder Eisen) in drei Gruppen unterteilt und katalysieren die Konversion von Superoxid-Anionen in Peroxid und molekularen Sauerstoff (76).

Katalasen katalysieren die Spaltung von Wasserstoffperoxid, welches beim Abbau von Purinen und der Oxidation von Fettsäuren entsteht, in Sauerstoff und Wasserstoff (77).

GSH wird aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin gebildet. Reduziertes GSH besitzt eine freie Thiolgruppe und kann somit Elektronen auf ROS übertragen, um sie unschädlich zu machen. Damit schützt es u.a. die Erythrozytenmembran vor oxidierenden Substanzen (78,79).

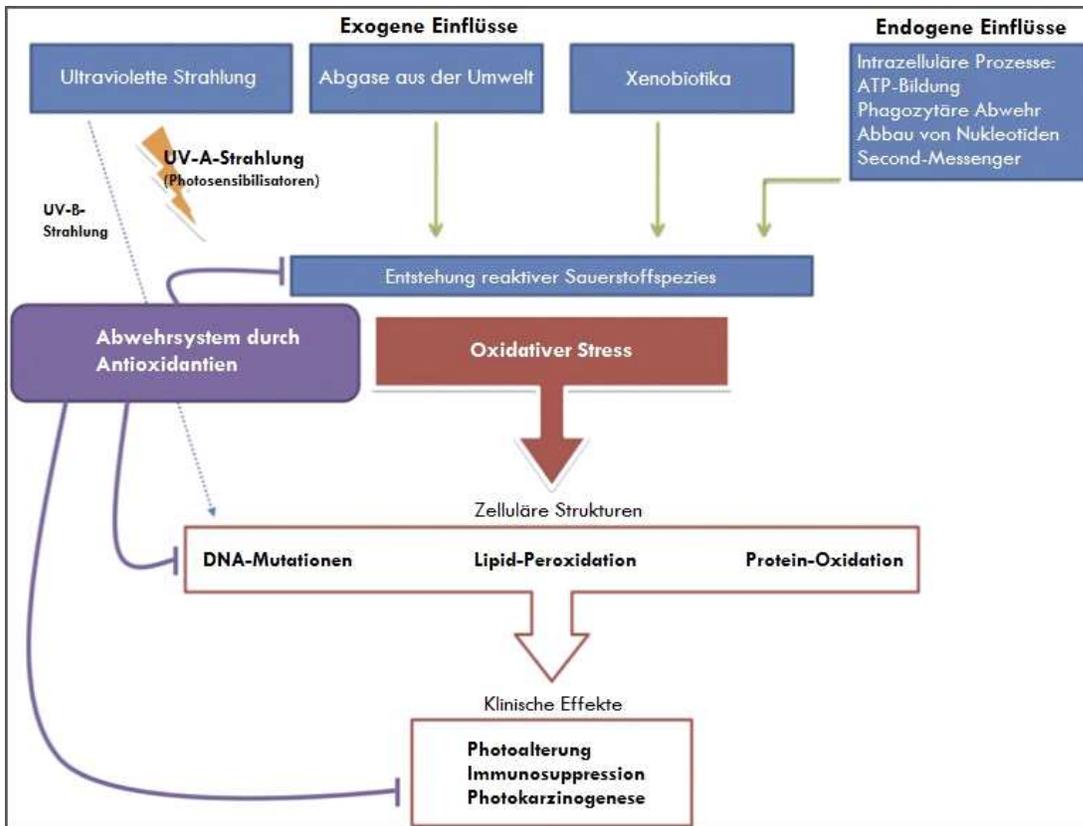


Abb. 4: Schaubild zur Entstehung von oxidativem Stress und der Vorbeugung durch Antioxidantien. Modifiziert nach Chen et al. (80)

Durch exogene Einflüsse (z.B. UV-Strahlung, Umweltabgase, Xenobiotika) und endogene Einflüsse entstehen reaktive Sauerstoffspezies, welche in Form von oxidativem Stress Schäden an zellulären Strukturen hervorrufen können. Dabei werden durch Veränderungen auf zellulärer Ebene (DNA-Mutationen, Lipid-Peroxidation oder Protein-Oxidation) klinische Effekte wie Photoalterung, Immunsuppression oder Photokarzinogenese erzeugt. Antioxidantien sind in der Lage, die durch reaktive Sauerstoffspezies hervorgerufenen Veränderungen auf zellulärer Ebene und die dadurch verursachten klinischen Effekte zu minimieren bzw. zu unterbinden.

1.5.3 Nichtenzymatisch

Zu den nichtenzymatischen Antioxidantien gehören Vitamin C (Ascorbinsäure), Vitamin E (α -Tocopherol), Carotinoide (u.a. β -Carotin), Thiol-Antioxidantien (z.B. Thioredoxin, Liponsäure), Flavonoide, Melatonin und andere (81). Teilweise agieren diese in hydrophiler, teilweise in hydrophober und teilweise auch in beiden Umgebungen. Vitamin C beispielsweise reagiert in der wässrigen Phase, Vitamin E in der lipophilen Phase. Liponsäure ist wasser- und fettlöslich und kann somit in zellulären Membranen sowie im Zytosol aktiv sein (82). Manche Antioxidantien sind imstande, andere Antioxidantien zu regenerieren und somit ihre ursprüngliche Funktion

wiederherzustellen. Dieser Prozess wird als „antioxidatives Netzwerk“ (*antioxidative network*) bezeichnet (83).

Vitamin C (Ascorbinsäure)

Ascorbinsäure (siehe Abb. 5) ist als multifunktionales Vitamin und Antioxidans bekannt, das zur Aufrechterhaltung der physiologischen Bedingungen im menschlichen Organismus essenziell ist (84,85). Es wird zur Biosynthese von Kollagen benötigt, da es als Kofaktor der Prolyl-Hydroxylase fungiert (86). Außerdem vereinfacht es die Aufnahme von Eisen (87) und erhöht die Stabilität von Tetrahydrobiopterin (88).

Die topische Applikation von Vitamin C mildert die unter UV-Licht-Exposition durch ROS hervorgerufenen Schäden (89–91). Außerdem liegen Untersuchungen vor, die zeigen, dass Vitamin C im Vergleich zu Tocopherolen und Thiolen die höchste Wirksamkeit bzgl. des Schutzes gegenüber Lipid-Peroxidation aufweist (92). Es wird oral und topisch als Therapeutikum zur Behandlung von Hautkrankheiten angewandt (84,93). Allerdings ist es notwendig, Ascorbinsäure via Iontophorese topisch zu applizieren, da sie die menschliche Haut relativ schlecht durchdringt (94).

In der Behandlung der EPP wird Vitamin C schon lange als Therapieoption (zusammen mit β -Carotin, N-Acetylcystein oder α -Tocopherol) in Betracht gezogen, allerdings sind die seit den 1970er-Jahren durchgeführten Studien zur Anwendung von Ascorbinsäure weder standardisiert, noch zeigen sie eine signifikante Milderung der durch PPIX hervorgerufenen Photosensitivität der Haut (9,53,54).

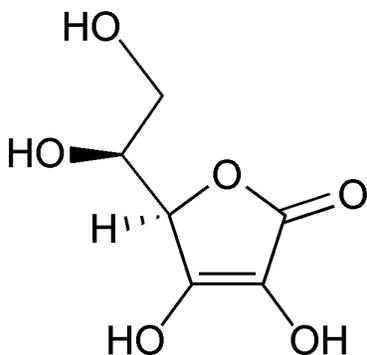


Abb. 5: Strukturformel von Ascorbinsäure

Vitamin E (α -Tocopherol)

Der Begriff Vitamin E fasst die gesamte Familie der fettlöslichen Tocopherole und Tocotrienole zusammen. RRR- α -Tocopherol (siehe Abb. 6) und RRR- γ -Tocopherol sind die am häufigsten vorkommenden Varianten im menschlichen Blutplasma (95). Als ein Radikalfänger und Antioxidans schützt Vitamin E Lipidkompartimente, z.B. Membranen und Lipoproteine, vor oxidativem Stress. Es konnte gezeigt werden, dass eine reichliche Aufnahme von Vitamin E die Inzidenz des Auftretens kardiovaskulärer Erkrankungen senkt (96,97). Dieser Effekt beruht hauptsächlich auf der Tatsache, dass Vitamin E der LDL-Oxidation entgegenwirkt. Allerdings spielen auch andere, nicht antioxidative zelluläre Funktionen von Vitamin E eine Rolle (98,99).

Thiele et al. konnten zeigen, dass eine Bestrahlung der Haut mit UV-B- und UV-A-Licht gleichzeitig in einer minimalen erythemalen Dosis (MED) von 0,75 J/cm² die α -Tocopherol-Gehalte des Stratum corneum, direkt nach Bestrahlung gemessen, um fast 50 % senkte. Unter alleiniger Verwendung von UV-B-Licht zeigte sich allerdings eine stärkere Reduktion des Gehaltes von α -Tocopherol als unter alleiniger Verwendung von UV-A-Licht (100). Diverse andere Studien weisen darauf hin, dass Vitamin E bzw. dessen Analogon Trolox ein effektives photoprotektives Agens sein könnte. Es vermindert möglicherweise Hautreaktionen auf UV-Licht wie z.B. Ödeme und Erytheme (101,102), Immunsuppression (103), Langzeitfolgen wie Faltenbildung (104) und die Inzidenz für Hauttumoren (105). Außerdem konnte eine mögliche Verbesserung der Effekte durch die Kombination der Antioxidantien Vitamin E und Vitamin C (101,106) sowie von Vitamin E und Carotinoiden aufgezeigt werden (107). Demgegenüber liegen doppelblinde, Placebo-kontrollierte Studien vor, die eine photoprotektive Wirkung von Vitamin E wiederum dementieren (108,109).

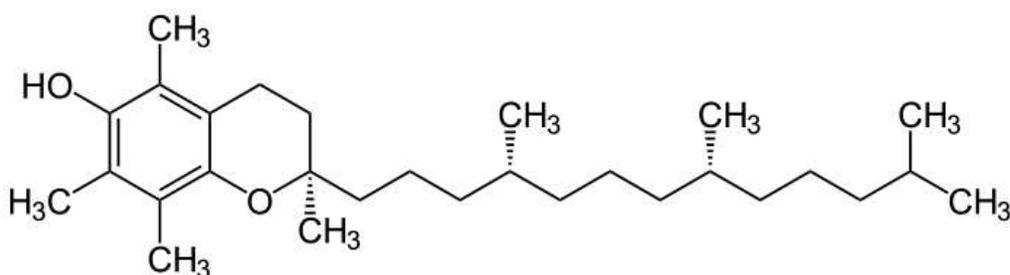


Abb. 6: Strukturformel von α -Tocopherol

β -Carotin

Carotinoide sind organische Pigmente, die natürlicherweise von Pflanzen, Algen sowie einigen Bakterien- und Pilzarten synthetisiert werden. Zu den am häufigsten vorkommenden Carotinoiden im menschlichen Blutplasma zählen β -Carotin (Provitamin A, siehe Abb. 7), α -Carotin, Lutein, Zeaxanthin und Lykopen (110).

Generell dienen sie als photoprotektive Substanzen sowie als akzessorische Photosynthese-Pigmente. Durch ihre Polyen-Struktur sind sie in der Lage, sowohl Licht zu absorbieren als auch Singulett-Sauerstoff und freie Radikale zu deaktivieren bzw. zu *quenchen* (111). Da Carotinoide im menschlichen Körper in Lipoproteinen transportiert werden, sollte ihre Bioverfügbarkeit im Zusammenhang mit dem Lipidprofil untersucht werden (112).

Es gibt diverse Studien, die eine UV-protective Wirkung von β -Carotin unterstreichen (113,114). Köpcke und Krutmann berichten, dass eine orale Einnahme von β -Carotin über mindestens zehn Wochen einen Schutz vor Sonnenbrand bewirkt. Dabei wird höchstens ein Lichtschutzfaktor (LSF) von ca. 4 erreicht (115). Außerdem führten Camera et al. Untersuchungen an Fibroblasten durch, deren Ergebnisse darauf hinweisen, dass β -Carotin der UV-A-induzierten Minderaktivität der Katalase und SOD entgegenwirken könnte (116). Im Gegensatz dazu liegen allerdings auch Studien vor, die pro-oxidative Effekte von β -Carotin aufzeigen (117–119).

Auch in der Behandlung der EPP gilt die Effektivität von β -Carotin als umstritten. So sollen Carotinoide zwar die durch PPIX induzierte Photosensitivität der Haut deutlich mildern (120–122), die Compliance der Patienten ist allerdings gering (9,123).

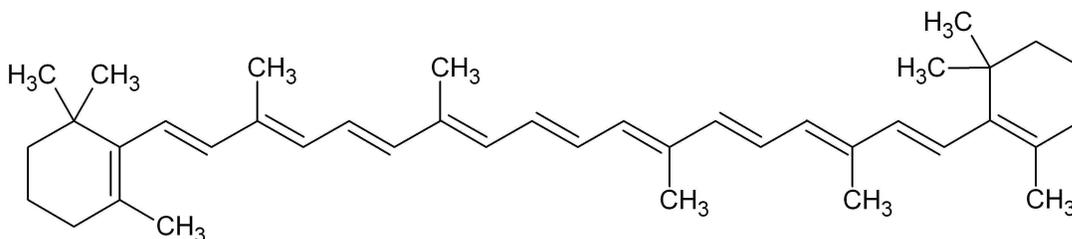


Abb. 7: Strukturformel von β -Carotin

1.6 Melanin, α -MSH und α -MSH-Analoga

1.6.1 Melanine

Melanine bilden eine Gruppe von natürlich vorkommenden Pigmenten, die von Tieren, Pflanzen und im menschlichen Körper gebildet werden (124). Diese polymorphen und multifunktionellen Biopolymere sind Endprodukte einer komplexen mehrschrittigen Transformation von L-Tyrosin und werden in das braun-schwarze Eumelanin, das braun-rote Pheomelanin (siehe Abb. 8), in Neuromelanin und andere gemischte Melaninpigmente unterteilt (125,126). Eumelanin wird in epidermalen Melanozyten durch oxidative Polymerisation von 5,6-Dihydroxyindol (DHI) und 5,6-Dihydroxyindol-2-Carboxylsäure (DHICA) synthetisiert (127); allerdings ist das finale Pigment letztlich signifikant vom Substrat- und Oxidationszustand abhängig (128). Nicht zuletzt durch die äußerst heterogene molekulare Struktur und den amorphen Partikelcharakter ist die genaue Zusammensetzung der Eumelanine nicht hinreichend geklärt (129). Es wird von einem Polymer mit einem relativ hohen Molekulargewicht ausgegangen, das aus verschiedenen Einheiten mit unterschiedlichen Oxidationsstufen zusammengesetzt ist, die auf zufällige Weise miteinander verknüpft sind (130). Den Melaninen wird eine Reihe von chemisch-physikalischen Eigenschaften zugeschrieben, die ihre Rolle als hochgradig photoprotektives Pigment in der Haut von Säugetieren erklären könnte (131,132).

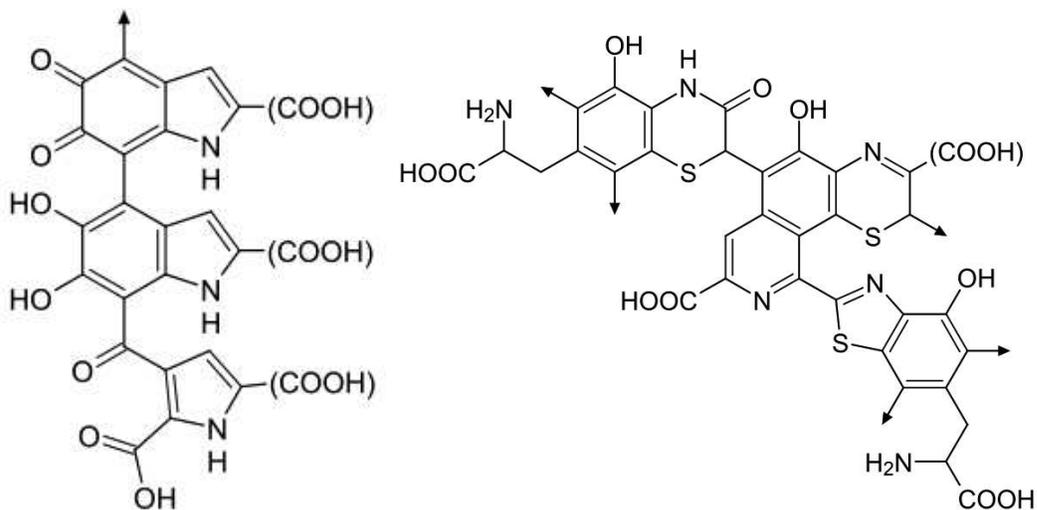


Abb. 8: Strukturformeln von Eumelanin (links) und Pheomelanin (rechts)

1.6.2 Die Regulation der Pigmentierung

Obwohl über 200 verschiedene Gene zur Regulation der Hautpigmentierung bekannt sind, wird diese in der kaukasischen Population überwiegend durch den Rezeptor des α -Melanozyten-stimulierenden Hormons (α -MSH) und den Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R) beeinflusst (133–135). α -MSH ist Bestandteil des Proopiomelanocortin-Gens (POMC), dessen Genprodukt posttranslational in die Peptidhormone α -MSH, β -MSH, γ -MSH, das adrenokortikotrope Hormon (ACTH), β -Lipotropin und β -Endorphin gesplittet wird. ACTH und die verschiedenen MSHs werden ebenfalls als Melanocortine bezeichnet (136).

Einer der Induktionsmechanismen für Melanin läuft folgendermaßen ab: Im Falle einer Exposition der Haut durch UV-Strahlung entstehen unter anderem Schädigungen, die sich als Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) in der DNA der Keratinozyten widerspiegeln (137). Das p53-Gen fungiert als Sensor solcher DNA-Alterationen. In schwer geschädigten Zellen leitet es die Apoptose ein, während in weniger beschädigten Zellen Reparaturmechanismen in Gang gesetzt werden, die unter anderem auf einer erhöhten Expression des POMC-Gens beruhen (138,139). Ein Produkt dieses Gens, α -MSH, agiert lokal als parakrines Hormon, indem es an den MC1R benachbarter Melanozyten bindet. Über eine Signalkaskade wird letztlich nicht nur die De-novo-Melaninsynthese, sondern auch ein Wechsel vom braun-roten Pheomelanin zum wesentlich photoprotektiveren schwarz-braunen Eumelanin induziert (140). MC1R wird in den meisten dermalen Zellen exprimiert. Neben der Melanisierung sind diverse nichtpigmentäre Schutzmechanismen durch MC1R-Zellsignalisierung gegenüber UV-induzierten Hautschäden bekannt (141–145).

1.6.3 α -MSH-Analoga

Im Mittelpunkt aktueller Therapieoptionen in der Behandlung der EPP stehen zurzeit Studien zu sog. α -MSH-Analoga, deren Affinität zum MC1R möglicherweise höher sein könnte als die des natürlichen α -MSH (143,146). Das aus 13 Aminosäuren bestehende, hochpotente α -MSH-Analogon [Nle4-D-Phe7]- α -MSH weist besonders aufgrund seiner Resistenz gegen enzymatischen Abbau eine verlängerte Wirkdauer am MC1R auf. Dadurch wird die Proliferation von Melanozyten stimuliert sowie die Tyrosinaseaktivität erhöht. Folglich entsteht eine erhöhte Melanineinlagerung in der Haut und konsekutiv eine verbesserte Toleranz gegen Sonnenlichtexposition (147,148).

1.7 Der *Photo-Hen's-Egg-Test*

Mit dem *Photo-Hen's-Egg-Test* (PHET) wurde eine Testmethode entwickelt, die es ermöglicht, Phototoxizität *in vivo* zu erfassen und Substanzen zu testen, um deren mögliche photoprotektive Effekte zu evaluieren.

Zur Durchführung des Tests werden fertilisierte, pathogenfreie Hühnereier am vierten Bebrütungstag randomisierten Testgruppen zugeordnet. Zunächst werden bekannte oder vermutete Photosensibilisatoren bzw. -protektoren appliziert. Im Anschluss daran werden die Eier mit der dem Versuchsziel entsprechenden künstlichen Strahlenquelle (UV-A oder UV-B) bestrahlt. Je nach Fragestellung wird eine nichttoxische oder toxische Strahlendosis gewählt, die in entsprechenden Vorversuchen bestimmt wurde.

Anschließend werden alle auftretenden Veränderungen am Dottersack-Gefäßsystem (DGS) registriert. Ausmaß, Morphologie und zeitlicher Ablauf der beobachteten *in-vivo*-Veränderungen lassen Rückschlüsse auf die Wirkungen der Testsubstanz auf die Haut zu und können Hinweise auf pathogenetische Vorgänge bei phototoxischen Reaktionen geben.

Der PHET ist ein sensibles, valides, kostengünstiges und wenig zeitintensives Modell zur Überprüfung von photoprotektiven Eigenschaften verschiedener Substanzen (19–21,149,150).

1.8 Fragestellungen

Die folgenden Fragestellungen sollten mittels PHET untersucht werden:

- Kann die schädigende Wirkung von PPIX in Kombination mit UV-A-Licht auch im PHET nachgewiesen werden?
- Vitamin C, β -Carotin, und Vitamin E sind Substanzen, denen in der aktuellen Literatur photoprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden. Inwiefern weisen die o.g. Substanzen sowohl gegen PPIX/UV-A- als auch gegen UV-B-induzierte Schädigungen photoprotektive Effekte auf?
- Inwiefern lässt sich Melanin als photoprotektives Agens in diese Reihe einordnen?
- Welche möglichen Therapieoptionen ergeben sich aus diesen Ergebnissen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bruteier

Zur Testung wurden embryonierte, pathogenfreie weiße Hühnereier der Rasse „White Leghorn“ (Shaver Starcross 288A, Fa. Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven) verwendet. Braune Eier konnten nicht eingesetzt werden, da diese in ihrer Schale Porphyrine enthalten (siehe Abb. 9) (6), die zu phototoxischen Reaktionen führen könnten. Die Eier wurden weniger als eine Woche bei einer Temperatur von 8 °C im Kühllager gehalten, bevor sie in den Brutschrank gelegt wurden.



Abb. 9: Rotfluoreszenz von braunen Eierschalen unter langwelligem ultraviolettem Licht (366 nm). Stölzel et al. (6).

Die Rotfluoreszenz deutet auf das Vorhandensein von Porphyrinen in der Eierschale hin.

2.1.2 Testsubstanzen

Alle Testsubstanzen wurden in Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) gelöst. Die Testlösungen wurden in abgedunkelten Räumen hergestellt und in ebenfalls verdunkelten Falcon-Röhrchen gelagert. DPBS diente außerdem als Kontrollflüssigkeit in den Kontrollgruppen. Zur besseren Verteilung der Substanzen in der Lösung wurde ein Ultraschall-Desintegrator verwendet. Folgende Substanzen wurden in DPBS gelöst und in einer Dosis von 1.000 µl pro Ei appliziert:

- **Protoporphyrin IX (PPIX)** (Sigma Chemical, St. Louis, USA) in einer Konzentration von 0,1 mM
Schon in Vorversuchen (20) konnte gezeigt werden, dass PPIX in dieser Konzentration in Kombination mit 5 J/cm^2 UV-A-Licht (320–400 nm) zu den erwarteten schweren Schädigungen des DGS führt. In Kontrollversuchen wurde außerdem belegt, dass eine Konzentration von 0,1 mM keine rein toxischen Schädigungen auslöst.
- **β -Carotin** (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) in den Konzentrationen 1 mM, 0,1 mM und 0,01 mM
Bei der Auswahl der Testkonzentrationen wurde die Stoffmengenvergleichbarkeit zu PPIX und zu den anderen Testsubstanzen sowie die Entstehung rein toxischer Schädigungen auf das DGS berücksichtigt.
- **Ascorbinsäure** (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) bzw. Vitamin C in den Konzentrationen 1 mM, 0,1 mM und 0,01 mM
- **Trolox** (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) bzw. Vitamin E in den Konzentrationen 1 mM, 0,1 mM und 0,01 mM
- **Synthetisches Melanin** in den Konzentrationen 1 mM, 0,1 mM und 0,01 mM
- **Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung** (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Kanülen:	Hypodermic Needle-Pro, Smiths Medical ASD Inc., Keene, USA
Spritzen:	Injekt 5 ml, B. Braun, Melsungen
Dentalwachs:	Modellierwachs Spezial Sommer 1,25 mm, GEBDI Dental Products GmbH, Engen
Reaktionsgefäße:	Greiner Bio-One Polypropylene-Tubes 30x115mm, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen:	1000 μl comfortips, Eppendorf, Netheler- Hinz GmbH, Hamburg

2.1.4 Geräte

Schierlampe:	Typ „Blohm“, Beyer & Enders, Hamburg
Brutschrank:	Typ KMB 2, Ehret GmbH, Emmendingen
Fräser:	Dia H Art. Nr. 801/021, 818/042; Meisinger, Neuss
Analysenwaage:	Sartorius AC 210 S, Sartorius, Göttingen
Ultraschall-Desintegrator:	Sonifier 250, Branson Ultrasonics, Danbury, USA
Schüttelgerät:	Vortex-Genie 2, Scietific Industries Inc., Bohemia, USA
Schüttelapparat:	Duomax 2030, Heidolph, Schwabach
Magnetrührer:	RCT basic, IKA Labortechnik, Staufen
Makroskop:	Objektmikrometer M 420, Leitz, Wetzlar
Makro-Ringlicht:	Macrolight Plus MAKL 150, Novoflex, Memmingen
UV-Meter:	Typ 585 100, Herbert Waldmann-GmbH, Villingen-Schwenningen
UV-A-Bestrahlungslampe:	Fluoreszenzstrahler UV-A-TLK 40W/10R, Philips, Hamburg
UV-B-Bestrahlungslampe:	Fluoreszenzstrahler UV-B-TL 20W/12 RS, Philips, Hamburg

2.2 Methoden

2.2.1 Übersicht des zeitlichen Verlaufes der Experimente

Tag X:	Anlieferung der befruchteten Bruteier. Anschließend Lagerung im Kühlschrank bei 8°C.
Tag 1:	Innerhalb von fünf Tagen nach Anlieferung Platzierung und Bebrütung der Bruteier im Brutschrank für 72h.
Tag 4:	Beurteilung der Bruteier auf Verwendbarkeit und Präparation der Eier. Anschließend weitere Bebrütung für 24h.
Tag 5:	Applikation der Substanzen und Exposition mit UV-Licht. Anschließend weitere Bebrütung für 24h.
Tag 6:	Ablesen und Protokollieren der Ergebnisse. Sofort im Anschluss Tötung der Embryonen durch Absenkung der Körpertemperatur im Gefrierschrank (-15°C). Entsorgung 24h später.

2.2.2 Bebrütung, Selektion und Präparation der Bruteier

Die Eier wurden bei einer Temperatur von 37,5 °C sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 75% in horizontaler Lage und unter regelmäßigem Wenden insgesamt sechs Tage lang im Inkubator bebrütet. Um die Eier auf ihre Verwendbarkeit zu prüfen, wurden am vierten Bebrütungstag der Keimling, das DGS und die Lage der Luftblase beurteilt. Letztere Information wurde vor allem benötigt, um bei der Eröffnung des Eies das DGS nicht zu verletzen. Eier mit beschädigten oder minder entwickelten Keimlingen wurden zu diesem Zeitpunkt aussortiert.

Um die Eröffnung des Bruteies mithilfe des Dentalfräsers zu erleichtern, wurde zunächst mit einer Kanüle ein Loch in den flachen Pol des Eies gestochen. Anschließend wurden mit einer Spritze und einer sterilen Einmalkanüle ca. 5 ml Eiklar abgezogen. Durch diese Maßnahme sinkt der Dotterspiegel ab und der Luftraum zwischen Eischale und Dotter vergrößert sich, wodurch sich das Verletzungsrisiko des Dotters beim Auffräsen der Eischale deutlich verringert. In horizontaler Lage wurde ein ca. 1,5 x 1,5 cm großes Fenster vorsichtig in die Eischale gefräst. Dabei wurde darauf geachtet, den Dotter während des Fräsens nicht zu verletzen bzw. das Ei nicht übermäßig zu beschmutzen.

Schließlich wurde ein ca. 2 x 2 cm großes Stück Dentalwachs auf das Fenster und die Einstichstelle der Kanüle gelegt. Das Dentalwachs erweicht im Inkubator und verschließt so das Ei. Der Keimling und das DGS wurden somit vor Austrocknung und äußeren Einflüssen geschützt (siehe Abb. 10).

2.2.3 UV-Strahlungsquelle und Bestrahlungsdosis

Schon in früheren Untersuchungen (20) konnte gezeigt werden, dass eine Bestrahlung des DGS mit 5 J/cm² UV-A-Licht ohne vorherige Applikation von PPIX keine pathologischen Veränderungen am DGS hervorruft. Nach Applikation von PPIX führte das UV-A-Licht allerdings zu den charakteristischen Schädigungen des DGS. Nach Dosismessung mit einem UV-Meter erfolgte eine Bestrahlung in einem abgedunkelten Raum. Die Kontrollgruppen wurden während dieses Zeitraums ebenfalls aus dem Brutkasten genommen und abgedeckt, um sie hinsichtlich Luftfeuchtigkeit und Temperatur den gleichen Bedingungen auszusetzen.

Bei der Bestrahlung mit UV-B-Licht trat in Vorversuchen die charakteristische Schädigung des DGS bei einer Bestrahlung von 80 mJ/cm² auch ohne vorausgegangene Substanzapplikation auf.

Nach vorheriger Dosismessung mit einem UV-Meter und der Applikation von DPBS auf das DGS erfolgte eine Bestrahlung mit 80 mJ/cm^2 in einem abgedunkelten Raum.

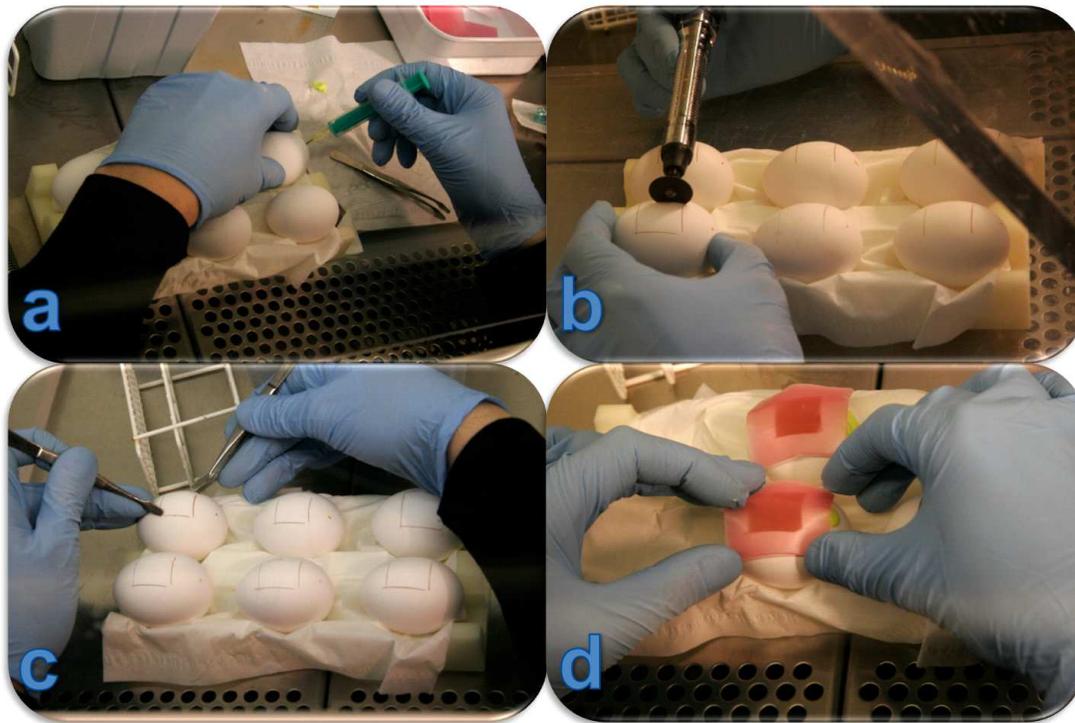


Abb. 10: Präparation der Bruteier.

a) Punktieren der Eierschale; b) Auffräsen; c) Entfernen des Fensters; d) Applikation von Wachs

2.2.4 Versuchs- und Kontrollgruppen

In zwei getrennten Versuchsreihen wurden die Eier jeweils in 13 Versuchsgruppen eingeteilt, denen unterschiedliche Testsubstanzen sowie Strahlungsdosen und -arten appliziert wurden (siehe Tabelle 3 und 4). Des Weiteren wurden zum Ausschluss von rein toxischen Reaktionen 15 Kontrollgruppen gebildet (siehe Tabelle 2.). Eine Versuchs- bzw. Kontrollgruppe bestand aus 12 Eiern.

Tabelle 2: Kontrollgruppen

Gruppe (n)	Lösung/Bestrahlung	Konzentration/Dosis
1	DPBS	Salzlösung
2	UV-A	5 J/cm^2
3	PPIX	0,1 mM
4–6	β -Carotin	10^{-3} M , 10^{-4} M , 10^{-5} M
7–9	Ascorbinsäure	10^{-3} M , 10^{-4} M , 10^{-5} M
10–12	Trolox	10^{-3} M , 10^{-4} M , 10^{-5} M
13–15	Melanin	10^{-3} M , 10^{-4} M , 10^{-5} M

Tabelle 3: Versuchsreihe mit der Kombination aus PPIX-Applikation und UV-A-Bestrahlung

Gruppe (n)	Lösung 1	Lösung 2	Bestrahlung
1	PPIX	-	5 J/cm ² UV-A
2–4	PPIX	β-Carotin	5 J/cm ² UV-A
5–7	PPIX	Ascorbinsäure	5 J/cm ² UV-A
8–10	PPIX	Trolox	5 J/cm ² UV-A
11–13	PPIX	Melanin	5 J/cm ² UV-A

In den Gruppen 2–13 wurden alle Substanzen außer PPIX in den Konzentrationen 10⁻³ M, 10⁻⁴ M und 10⁻⁵ M appliziert. PPIX wurde stets in der Konzentration 10⁻⁴ M auf das DGS geträufelt.

Tabelle 4: Versuchsreihe mit UV-B-Bestrahlung

Gruppe (n)	Lösung 1	Bestrahlung
1	DPBS	80 mJ/cm ² UV-B
2–4	β-Carotin	80 mJ/cm ² UV-B
5–7	Ascorbinsäure	80 mJ/cm ² UV-B
8–10	Trolox	80 mJ/cm ² UV-B
11–13	Melanin	80 mJ/cm ² UV-B

In den Gruppen 2–13 wurden alle Substanzen in den Konzentrationen 10⁻³ M, 10⁻⁴ M und 10⁻⁵ M auf das DGS appliziert.

2.2.5 Beobachtungszeitraum und Dokumentationsform

24 Stunden nach Bestrahlung erfolgte die Untersuchung der DGS auf morphologische Veränderungen via Makroskop unter doppelblinden Bedingungen (siehe Abb. 11). Die Ergebnisse wurden entsprechend den Beurteilungskriterien, die unter 3.2.6 aufgelistet sind, dokumentiert.

2.2.6 Beurteilungskriterien

Zur Untersuchung der Veränderungen am DGS wurden die Parameter Membraneintrübungen (ME), Hämorrhagien (HR) und Letalität (LET) herangezogen. HR und ME wurden semiquantitativ in die Ausprägungsgrade leicht, mittelstark und schwer eingeteilt.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden Durchschnittswerte für ME und HR für die jeweiligen Gruppen berechnet. Dazu wurden Embryonen mit Grad null mit „1“, mit Grad eins mit „2“, mit Grad zwei mit „3“ und mit Grad drei mit „4“ multipliziert, die Ergebnisse addiert und durch 16 dividiert. Die Erklärungen zu den Gradeinteilungen sind Tabelle 5 und 6 zu entnehmen.

2.2.6.1 Membraneintrübungen (ME)

Die ME wurde als eine Trübung der physiologischerweise klaren Dottersackmembran, die dicht über dem DGS liegt, definiert. Eine solche Trübung kann entlang der extraembryonalen Gefäße oder auch diffus auftreten. Dabei handelt es sich um eine Proteindenaturierung, die zu einer weißlichen Verfärbung der Vitellinmembran und des Eiklars führt (205). Als Grundlage der Beurteilung gelten die Definitionen in Tabelle 5, in der die Ausprägungsgrade der ME beschrieben sind.

2.2.6.2 Hämorrhagien (HR)

Die morphologischen Besonderheiten der drei Ausprägungsgrade der HR sind in Tabelle 6 beschrieben.

2.2.6.3 Letalität (LET)

Der Parameter Letalität wurde anhand von makroskopischen Beurteilungskriterien (fehlender Herzschlag, mangelnde Blutzirkulation etc.) registriert und im Versuchsprotokoll mit 0 für „nicht letal“ und 1 für „letal“ notiert

Tabelle 5: Definitionen der Ausprägungsgrade von Membraneintrübungen

Grad	Ausprägung	Morphologie
0	keine Membraneintrübungen	Keine Membraneintrübung ersichtlich
1	leichte Membraneintrübungen	Gerade erkennbare Trübung, alle embryonalen Strukturen sind makroskopisch gut sichtbar und klar von der Umgebung abzugrenzen.
2	mittelstarke Membraneintrübungen	Eintrübung, die zur partiellen oder vollständigen Verdeckung der darunterliegenden Strukturen führt. Einzelne Erythrozyten sind nicht mehr erkennbar. Die Begrenzung der Gefäße erscheint unscharf. Die ME kann zur vollständigen Verdeckung darunterliegender Areale führen. Der Gefäßverlauf ist in diesen Regionen nicht mehr zu verfolgen.
3	schwere Membraneintrübungen	Flächenhafte Ausdehnung der ME, die zur vollständigen Verdeckung von großen Gefäßen und embryonalen Strukturen führt. Der Gefäßverlauf ist kaum bzw. überhaupt nicht sichtbar.

Tabelle 6: Definitionen der Ausprägungsgrade von Hämorrhagien

Grad	Ausprägung	Morphologie
0	keine Hämorrhagien	Keine Hämorrhagien ersichtlich
1	leichte Hämorrhagien	Punktförmige oder ein kurzes Gefäßsegment betreffende Extravasation von Blutbestandteilen. Solitär stehend oder wenige, abgrenzbare Lokalisationen betreffend. Zirkulation ungestört.
2	mittelstarke Hämorrhagien	Auf wenige Gefäße oder Gefäßabschnitte begrenzte punktförmige und segmentale Blutungen, teils perlschnurartig, teils konfluierend. Gleichzeitiges Vorkommen in verschiedenen Arealen. Die Mehrzahl der Gefäße ist frei. In den betroffenen Abschnitten finden sich mitunter Zirkulationsstörungen.
3	schwere Hämorrhagien	Massive Extravasate in allen oder den meisten Gefäßabschnitten. Gefäßwände in betroffenen Abschnitten sind nicht mehr abgrenzbar. Freie Gefäße nur vereinzelt oder nicht mehr vorhanden. Massive Zirkulationsstörungen.

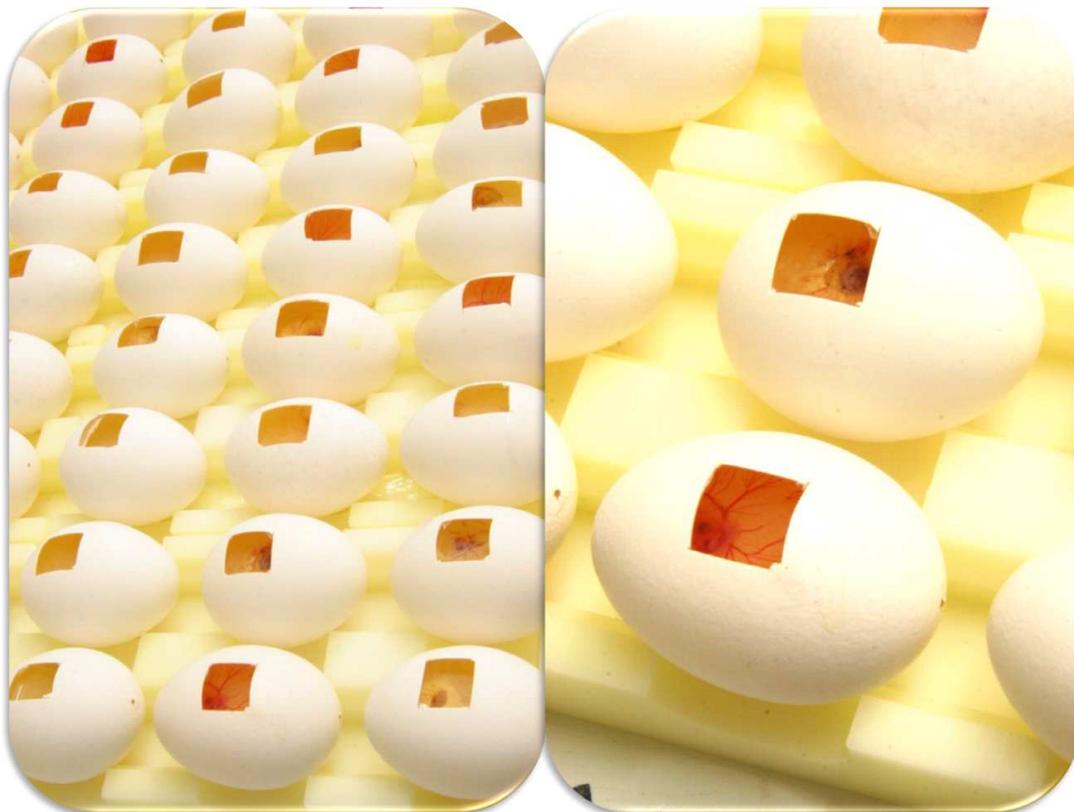


Abb. 11: Bruteier vor Ablesung und Beurteilung

2.3 Statistische Auswertungen

Zur interferenzstatistischen Analyse der Ergebnisse wurden nichtparametrische Tests durchgeführt (siehe Anhang).

Die Vergleiche von Letalitätsraten wurden mit Chi-Quadrat- (X^2 -) Tests berechnet, um die Kontingenz auf Signifikanz zu überprüfen. Dieser Test dient dem Vergleich von beobachteten und erwarteten Häufigkeiten bei nominalskalierten Variablen.

Bei kleinen Stichprobengrößen bzw. wegen erwarteter Zellohäufigkeiten unter fünf wurden Fisher's exact-Tests verwendet.

Fällt ein Chi-Quadrat- bzw. Fisher's exact Test signifikant aus, so bedeutet dies, dass die Kontingenz signifikant ist, dass also z.B. ein Unterschied in der Letalitätsrate zwischen den Gruppen besteht. Der sogenannte Phi-Koeffizient gibt hierbei Aufschluss über die Stärke des Effekts. Dieser kann zwischen -1 und 1 liegen und ist ähnlich zu interpretieren wie ein Korrelationskoeffizient: je stärker er von 0 abweicht, desto stärker ist die Kontingenz.

Für die Vergleiche von Membraneintrübungen und Hämorrhagien wurden Mann-Whitney-U-Tests verwendet; diese ermöglichen Vergleiche von unabhängigen Gruppen bezüglich der Ausprägung von ordinalskalierten Variablen. Fällt ein solcher Test signifikant aus, bedeutet dies, dass sich die Gruppen signifikant unterscheiden.

Die Signifikanzniveaus sind in den Grafiken wie folgt gelistet:

* steht für $p \leq 0,05$ und wird als signifikant bezeichnet.

** steht für $p \leq 0,01$ und wird als hoch signifikant bezeichnet.

*** steht für $p \leq 0,001$. Hier liegt ebenfalls ein höchst signifikanter Unterschied vor.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden nach den unter Kap. 3.2.6 beschriebenen Bedingungen dokumentiert.

3.1 Kontrollgruppen

Die Ergebnisse der jeweiligen Kontrollgruppen sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

In den Kontrollgruppen zeigten sich lediglich leichte morphologische Veränderungen des DGS (siehe Abb. 12). Diese waren gehäuft bei den Gruppen mit der höher dosierten Applikation der jeweiligen Agenzien zu beobachten. In der Gruppe mit der am höchsten dosierten Applikation von β -Carotin zeigte sich ein letaler Embryo. Ansonsten wurden keine letalen Embryonen protokolliert.

Tabelle 7: Ergebnisse der Kontrollgruppen (1–15)

Gr.	Agens	Konz./Dosis	Beobachtete Häufigkeiten (<i>n</i> Eier)								
			LET	Ø ME	ME1	ME 2	ME 3	Ø HR	HR1	HR2	HR3
1	DPBS	-	0%	100% n=12	0%	0%	0%	100% n=12	0%	0%	0%
2	UV-A	5 J/cm ²	0%	100% n=12	0%	0%	0%	100% n=12	0%	0%	0%
3	PPIX	10 ⁻⁴ M	0%	91,7% n=11	8,3% n=1	0%	0%	100% n=12	0%	0%	0%
4	β C	10 ⁻³ M	8,3% n=1	75% n=9	16,7% n=2	8,3% n=1	0%	91,7% n=11	8,3% n=1	0%	0%
5		10 ⁻⁴ M	0%	91,7% n=11	8,3% n=1	0%	0%	100% n=12	0%	0%	0%
6		10 ⁻⁵ M	0%	83,3% n=10	16,7% n=2	0%	0%	100% n=12	0%	0%	0%
7	Vit. C	10 ⁻³ M	0%	83,3% n=10	0%	0%	0%	91,7% n=11	8,3% n=1	0%	0%
8		10 ⁻⁴ M	0%	91,7% n=11	8,3% n=1	0%	0%	100% n=12	0%	0%	0%
9		10 ⁻⁵ M	0%	91,7% n=11	8,3% n=1	0%	0%	100% n=12	0%	0%	0%
10	Vit. E	10 ⁻³ M	0%	91,7% n=11	8,3% n=1	0%	0%	91,7% n=11	8,3% n=1	0%	0%

Gr.	Agens	Konz./Dosis	Beobachtete Häufigkeiten (<i>n</i> Eier)								
			LET	Ø ME	ME1	ME2	ME3	Ø HR	HR1	HR2	HR3
11		10 ⁻⁴ M	0%	91,7% n=11	8,3% n=1	0%	0%	100% n=12	0%	0%	0%
12		10 ⁻⁵ M	0%	100% n=12	0%	0%	0%	100% n=12	0%	0%	0%
13	M	10 ⁻³ M	0%	75% n=9	25% n=3	0%	0%	91,7% n=11	8,3% n=1	0%	0%
14		10 ⁻⁴ M	0%	100% n=12	0%	0%	0%	100% n=12	0%	0%	0%
15		10 ⁻⁵ M	0%	100% n=12	0%	0%	0%	100% n=12	0%	0%	0%



Abb. 12: Embryonen mit intaktem Dottersack-Gefäßsystem.

Es sind keine Membraneintrübungen oder Hämorrhagien erkennbar.

3.2 PPIX/UV-A-Gruppe und UV-B-Gruppe

Tabelle 8: Ergebnisse: PPIX/UV-A/UV-B/Kontrolle

Gr.	Lösungen	UV	Beobachtete Häufigkeiten (<i>n</i> Eier)								
			LET	Ø ME	ME1	ME2	ME3	Ø HR	HR1	HR2	HR3
1	10 ⁻⁴ M PPIX	5 J/cm ² UV-A	9	0	1	2	9	0	0	3	9
2	DPBS	80 mJ/cm ² UV-B	9	0	0	5	7	0	0	3	9

3.2.1 PPIX/UV-A-Gruppe

Die Gruppe, die mit PPIX und UV-A behandelt worden war (Gruppe 1), zeigte 75% Letalität sowie deutliche Membraneintrübungen und Hämorrhagien, die überwiegend im Ausprägungsgrad zwei und drei auftraten (siehe Abb. 13).

Die Gruppe, die mit PPIX und UV-A behandelt worden war (Gruppe 1), zeigte gegenüber der relevanten Kontrollgruppe (DPBS) mit 75% eine signifikant erhöhte Letalität (Fisher's exact test: $p < .001$, $\Phi = .78$; siehe Anhang 1). Analog dazu zeigte diese Gruppe auch für die Parameter Membraneintrübungen und Hämorrhagien gegenüber der Kontrollgruppe (DPBS) signifikante Unterschiede (Membraneintrübungen: U-Test: $U = 0,00$, $z = -4,58$, $p < 0,001$; Hämorrhagien: U-Test: $U = 0,00$, $z = -4,59$, $p < 0,001$; siehe Anhang 1).

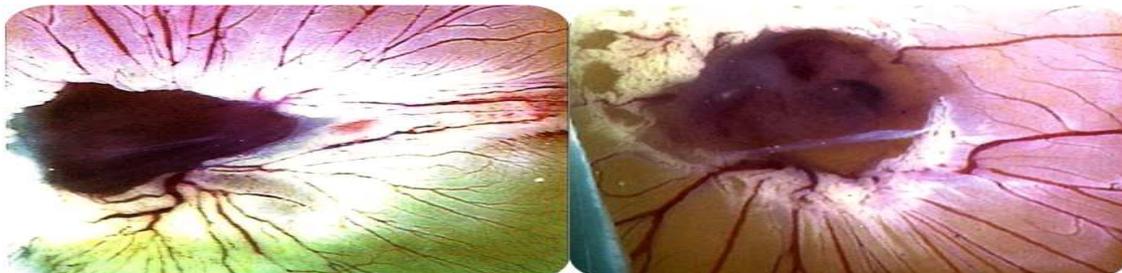


Abb. 13: Embryonen der PPIX/UV-A-Gruppe

Embryonen mit stärksten Membraneintrübungen oder Hämorrhagien bzw. letalen Ereignissen

3.2.2 UV-B-Gruppe

Die Gruppen, die mit UV-B bestrahlt worden waren, zeigten eine Letalität von 75% sowie deutliche Membraneintrübungen und Hämorrhagien, überwiegend im Ausprägungsgrad zwei und drei (siehe Abb. 14).

Die Gruppe, die mit UV-B bestrahlt worden war (Gruppe 2), zeigte gegenüber der relevanten Kontrollgruppe (DPBS) mit 75% eine signifikant erhöhte Letalität (Fisher's exact test: $p < .001$, $\Phi = .78$; siehe Anhang 1). Analog dazu zeigte diese Gruppe auch für die Parameter Membraneintrübungen und Hämorrhagien gegenüber der Kontrollgruppe (DPBS) signifikante Unterschiede (Membraneintrübungen: U-Test: $U = 0,00$, $z = -4,53$, $p < 0,001$; Hämorrhagien: U-Test: $U = 0,00$, $z = -4,59$, $p < 0,001$; siehe Anhang 1).

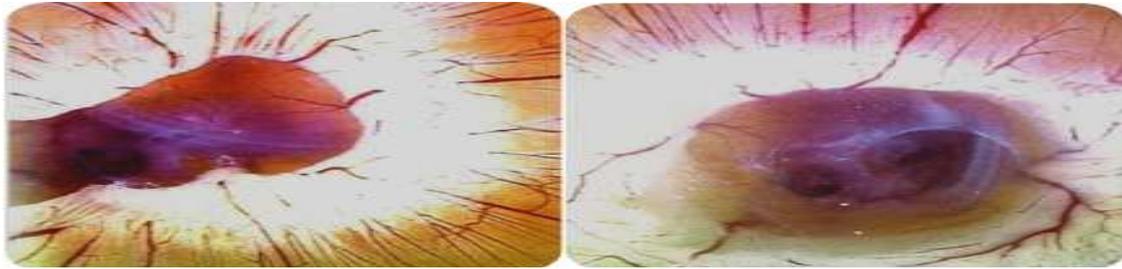


Abb. 14: Embryonen der UV-B-Gruppe

Letaler Embryo bzw. deutliche Membraneintrübungen und Hämorrhagien erkennbar

3.3 β -Carotin

3.3.1 PPIX/UV-A-Gruppe

Tabelle 9: Ergebnisse: PPIX/UV-A-Licht und zusätzliche Applikation von β -Carotin (β C)

Gr.	Lösungen	UV-A	Beobachtete Häufigkeiten (<i>n</i> Eier)								
			LET	Ø ME	ME1	ME2	ME3	Ø HR	HR1	HR2	HR3
1	10 ⁻⁴ M PPIX	5 J/cm ²	9	0	1	2	9	0	0	3	9
2	10 ⁻⁴ M PPIX, 10 ⁻³ M β C	5 J/cm ²	7	1	2	3	6	1	2	1	8
3	10 ⁻⁴ PPIX, 10 ⁻⁴ M β C	5 J/cm ²	7	1	2	3	6	1	0	3	8
4	10 ⁻⁴ M PPIX, 10 ⁻⁵ M β C	5 J/cm ²	8	0	3	2	7	0	1	2	8

Membraneintrübungen und Hämorrhagien

Die PPIX/UV-A-Gruppe, der zusätzlich 10⁻³ M β -Carotin appliziert worden war, zeigte für Membraneintrübungen einen Median von 2,5 und für Hämorrhagien einen Median von 3. Die Verteilung der Ausprägungsgrade der Membraneintrübungen und Hämorrhagien liegen in dieser Gruppe deskriptiv unter dem der PPIX/UV-A-Gruppe ohne Applikation von β -Carotin. Dabei kann allerdings nur der Median des Parameters Membraneintrübungen für alle Gruppen mit der zusätzlichen Applikation von 10⁻³ M bis 10⁻⁵ M β -Carotin unter dem der PPIX/UV-A-Gruppe angesiedelt werden. Für die Gruppen mit der Applikation von niedrigeren β -Carotin-Konzentrationen (10⁻⁴ M und 10⁻⁵ M) zeigen sich beim Parameter Hämorrhagien Werte, die sich der PPIX/UV-A-Gruppe nähern (siehe Abb. 15).

Es zeigten sich für die beiden Parameter keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (siehe Anhang 2A).

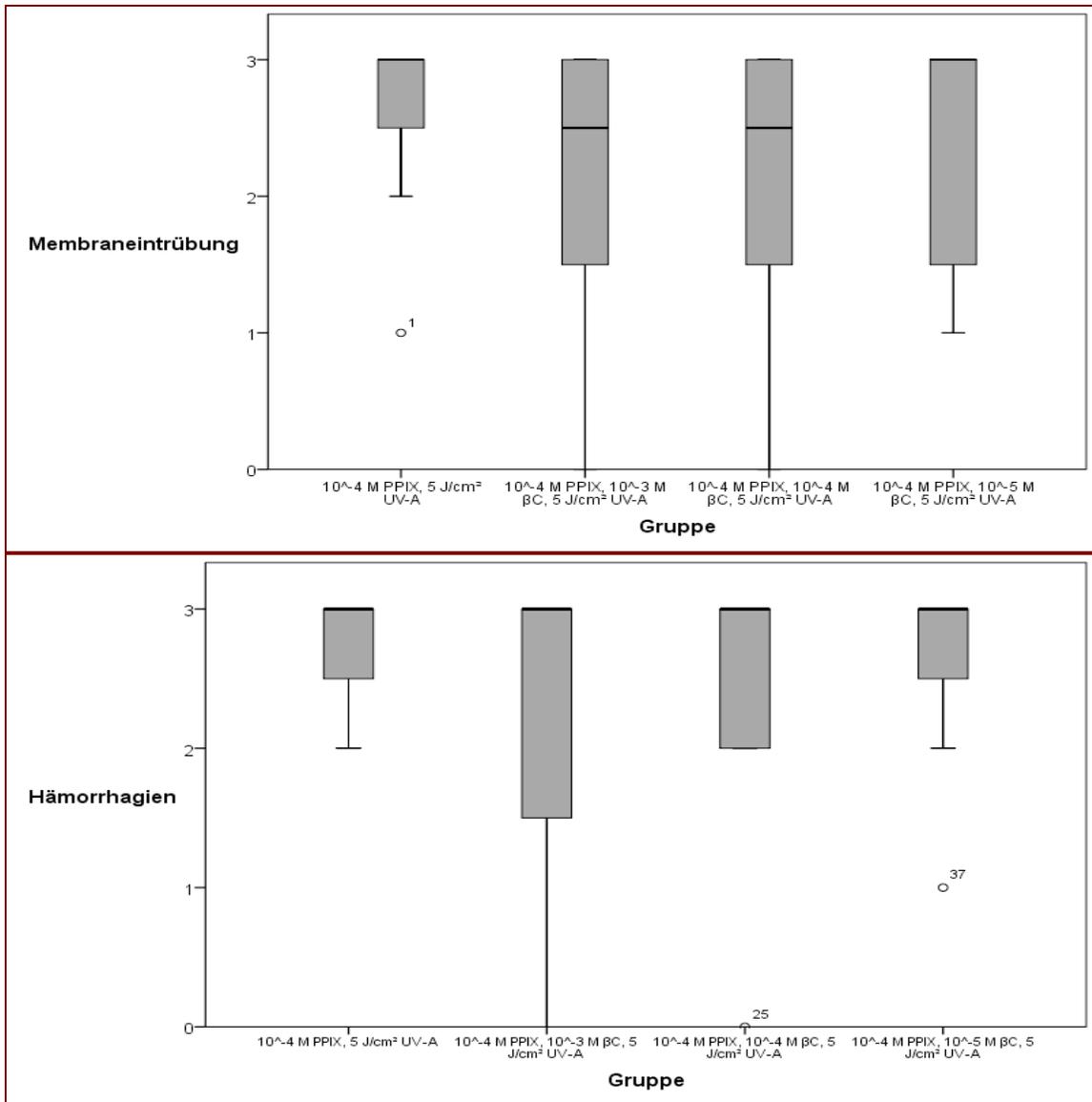


Abb. 15: Morphologische Parameter der PPIX/UV-A-Gruppen.

Die Ergebnisse sind als Boxplots dargestellt. PPIX, Protoporphyrin IX; UV-A, UV-A-Strahlung; βC, β-Carotin.

Letalität

Die Gruppen, denen zusätzlich β-Carotin appliziert worden war, zeigten in den Konzentrationen 10⁻³ M bis 10⁻⁵ M letale Ereignisse, deren Häufigkeit (58,33–66,67%) mit fallender Konzentration insgesamt anstieg. In der Konzentration 10⁻³ M und 10⁻⁴ M blieb die Häufigkeit der Letalität unverändert bei 58,33% (siehe Abb. 16 und 17). Ausserdem konnte kein

signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (PPIX/UV-A) und den Testgruppen festgestellt werden (siehe Anhang 2A).

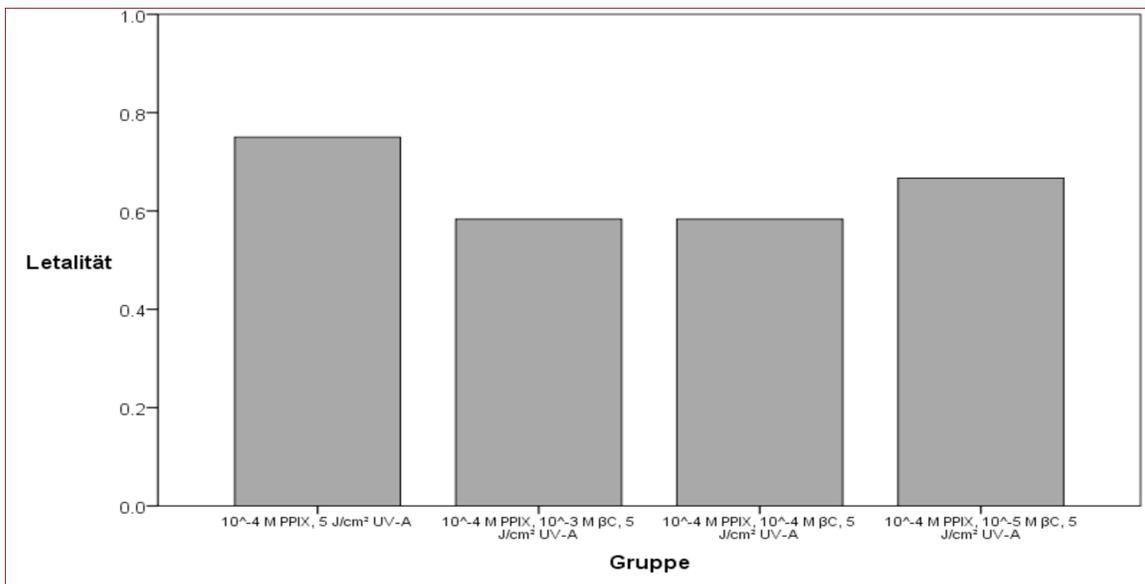


Abb. 16: Letalitätsraten der PPIX/UV-A-Gruppen

PPIX, Protoporphyrin IX; UV-A, UV-A-Strahlung; β C, β -Carotin.

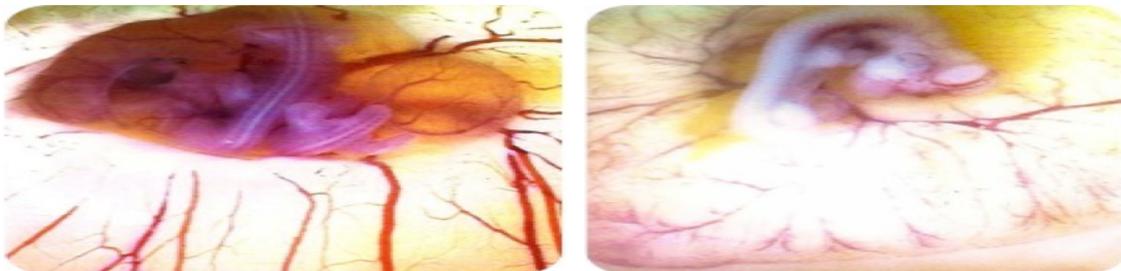


Abb. 17: Embryonen der PPIX/UV-A/ β -Carotin-Gruppen

Es sind deutliche Membraneintrübungen und Hämorrhagien bzw. letale Ereignisse zu erkennen.

3.3.2 UV-B-Gruppe

Tabelle 10: Ergebnisse: UV-B-Licht und zusätzliche Applikation von β -Carotin (β C)

Gr.	Lösungen	UV-B	Beobachtete Häufigkeiten (<i>n</i> Eier)								
			LET	Ø ME	ME1	ME2	ME3	Ø HR	HR1	HR2	HR3
1	DPBS	80 mJ/cm ²	9	0	0	5	7	0	0	3	9
2	10⁻³ M βC	80 mJ/cm ²	4	2	1	5	4	1	3	4	4
3	10⁻⁴ M βC	80 mJ/cm ²	4	1	1	6	4	1	3	5	3
4	10⁻⁵ M βC	80 mJ/cm ²	7	0	1	5	6	2	2	3	5

Membraneintrübungen und Hämorrhagien

Die UV-B-Gruppe, der zusätzlich 10^{-3} M β -Carotin appliziert worden war, zeigte für Membraneintrübungen und Hämorrhagien einen Median von 2. Zudem lag die Streubreite der Schwere der Ausprägungsgrade der beiden Gruppen klar über der der UV-B-Gruppe. Höhere Werte wurden für die Gruppe mit Applikation von niedrigerer β -Carotin-Konzentration (10^{-5} M) dokumentiert. Die Testgruppen, denen zusätzlich β -Carotin appliziert worden war, hatten abhängig von der β -Carotin-Dosis deskriptiv schwächer ausgeprägte Membraneintrübungen und schwächer ausgeprägte Hämorrhagien als die Gruppen ohne zusätzliche β -Carotin-Gabe (siehe Abb. 18).

Zudem konnten für das Merkmal der Hämorrhagien für die Gruppen mit zusätzlicher Applikation von 10^{-3} M und 10^{-4} M β -Carotin signifikante bzw. hochsignifikante Unterschiede zur PPIX/UV-A-Gruppe gesehen werden (U-Test (10^{-3} M): $U = 36.00$, $z = -2.30$, $p < 0.5$; U-Test (10^{-4} M): $U = 30.00$, $z = -2.65$, $p < 0.5$). Für den Parameter Membraneintrübungen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (DPBS/UV-B)(siehe Anhang 2B).

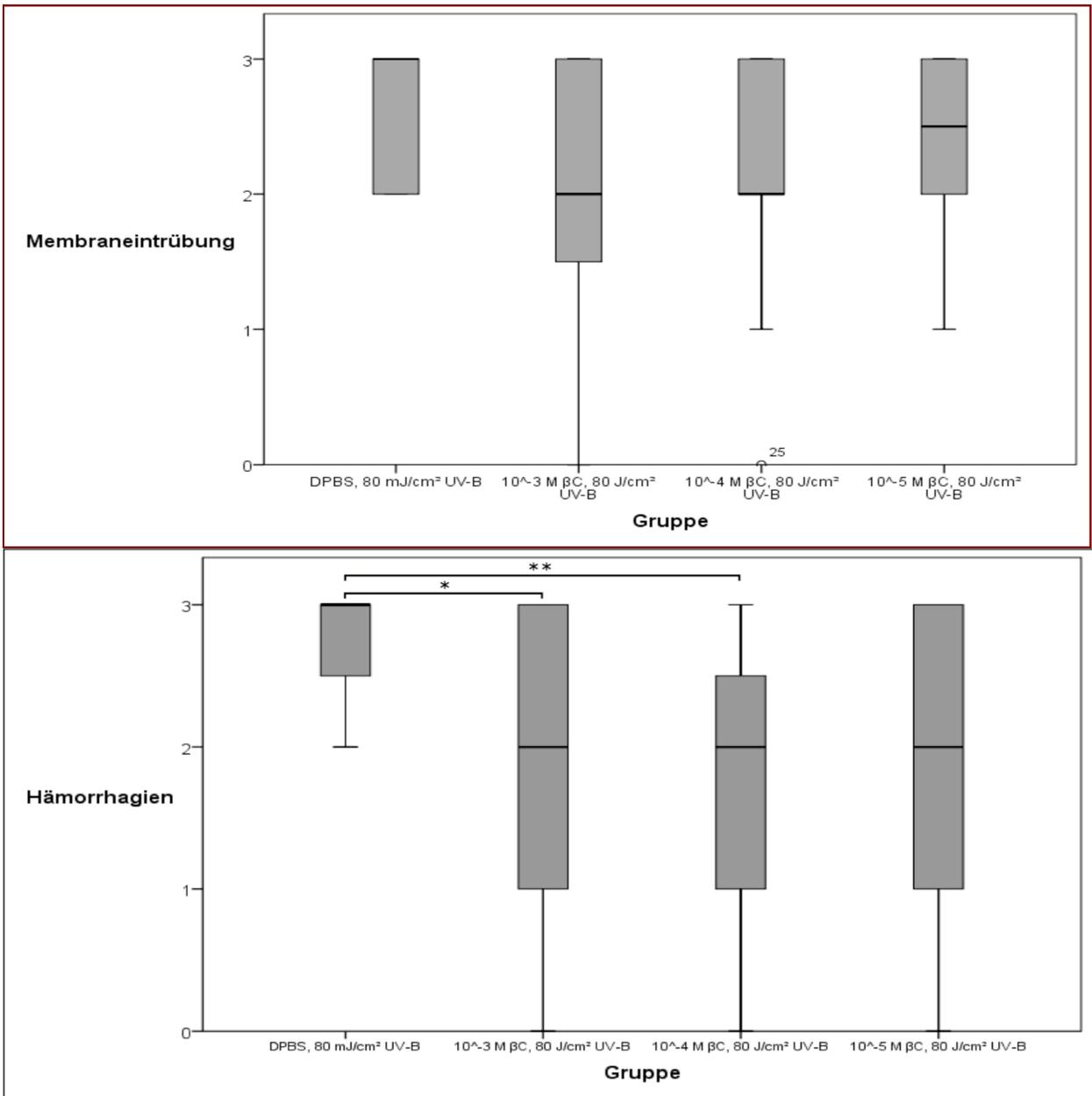


Abb. 18: Morphologische Parameter der UV-B/ β -Carotin-Gruppe. Die Ergebnisse sind als Boxplots dargestellt

DPBS, Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung; UV-B, UV-B-Strahlung; β C, β -Carotin

Letalität

Die UV-B-Testgruppen mit Zugabe von β -Carotin in den Konzentrationen 10^{-3} M bis 10^{-5} M zeigten niedrige bis hohe Letalitätsraten. In der Konzentration 10^{-3} M und 10^{-4} M blieb die Häufigkeit der Letalität unverändert bei 33,33%. Bei weiterhin fallender Konzentration des

Agens stieg die Letalitätsrate auf 58,33%. Die Testgruppen, denen also zusätzlich β -Carotin appliziert worden war, hatten abhängig von der β -Carotin-Dosis seltener letale Ereignisse als die Gruppen ohne zusätzliche β -Carotin-Gabe (siehe Abb. 19 und 20). Es zeigten sich teilweise signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe (DPBS/UV-B) und den Testgruppen (10^{-3} M: $X^2(1) = 4.20, p < .05, \Phi = -0,42$; 10^{-4} M: $X^2(1) = 4.20, p < .05, \Phi = -0,42$; siehe Anhang 2B).

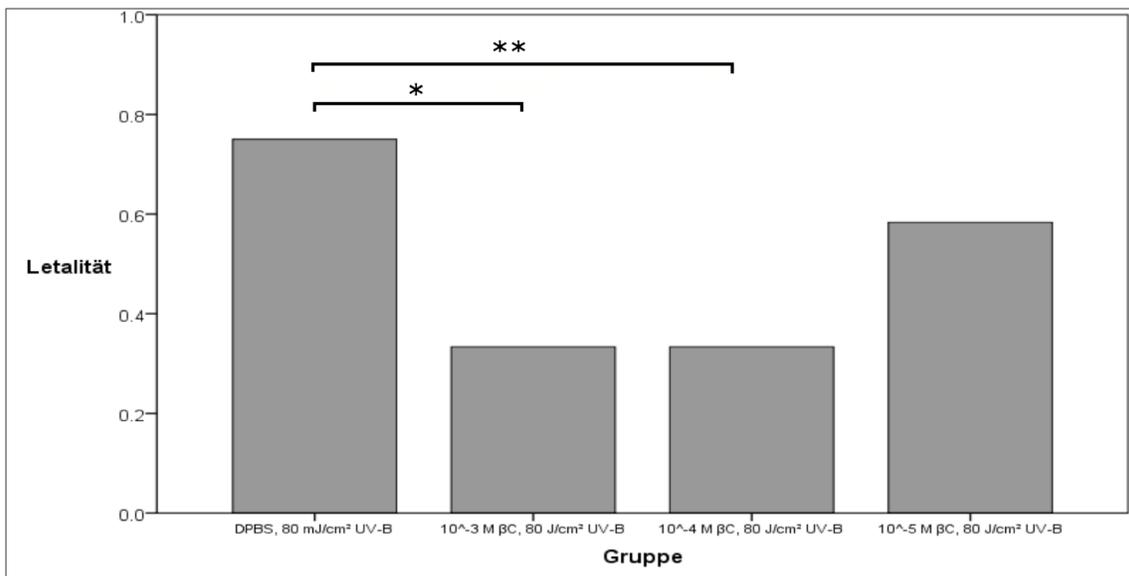


Abb. 19: Letalitätsraten der UV-B/ β -Carotin-Gruppen

DPBS, Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung; UV-B, UV-B-Strahlung; β C, β -Carotin

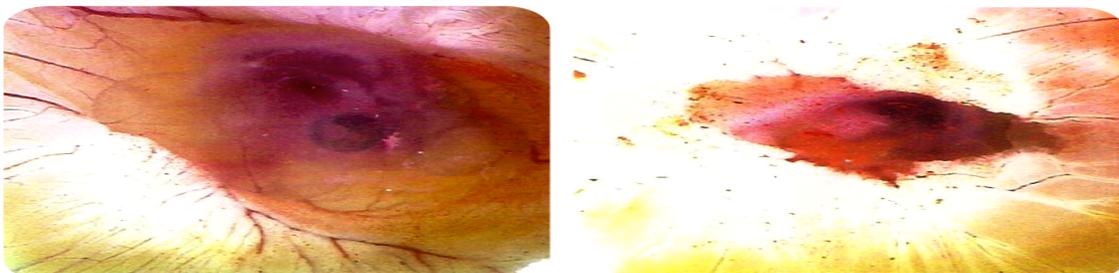


Abb. 20: Embryonen der UV-B/ β -Carotin-Gruppen

Teils lebende, teils verendete Embryonen und beschädigte Dottersack-Gefäßsysteme. Bestandteile von unzureichend gelöstem β -Carotin rötlich-orange erkennbar

3.4 Ascorbinsäure

3.4.1 PPIX/UV-A-Gruppe

Tabelle 11: Ergebnisse: PPIX/UV-A-Licht und zusätzliche Applikation von Ascorbinsäure

Gr.	Lösungen	UV-A	Beobachtete Häufigkeiten (<i>n</i> Eier)								
			LET	Ø ME	ME1	ME2	ME3	Ø HR	HR1	HR2	HR3
1	10 ⁻⁴ M PPIX	5 J/cm ²	9	0	1	2	9	0	0	3	9
5	10 ⁻⁴ M PPIX, 10 ⁻³ M Vit. C	5 J/cm ²	7	1	3	3	4	0	4	4	4
6	10 ⁻⁴ M PPIX, 10 ⁻⁴ M Vit. C	5 J/cm ²	7	0	3	3	5	0	3	4	5
7	10 ⁻⁴ M PPIX, 10 ⁻⁵ M Vit. C	5 J/cm ²	8	1	2	4	5	0	2	5	5

Membraneintrübungen und Hämorrhagien

Die PPIX/UV-A-Gruppe, der zusätzlich 10⁻³ M Ascorbinsäure appliziert worden war, zeigte für Membraneintrübungen und für Hämorrhagien einen Median von 2. Zudem ist ersichtlich, dass alle Gruppen mit zusätzlicher Ascorbinsäure-Applikation mit steigender Konzentration deskriptiv geringere Ausprägungsgrade für die beiden Merkmale zeigen als die PPIX/UV-A-Gruppe ohne Applikation von Ascorbinsäure (siehe Abb. 21). Bis auf den Vergleich des Merkmals der Hämorrhagien zwischen der PPIX/UV-A-Gruppe und der Gruppe, der zusätzlich die höchste Dosis Ascorbinsäure appliziert worden war, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollegruppe (PPIX/UV-A) und den Testgruppen (U-Test (10⁻³ M): $U = 36.00$, $z = -2.31$, $p < 0.5$; siehe Anhang 3A).

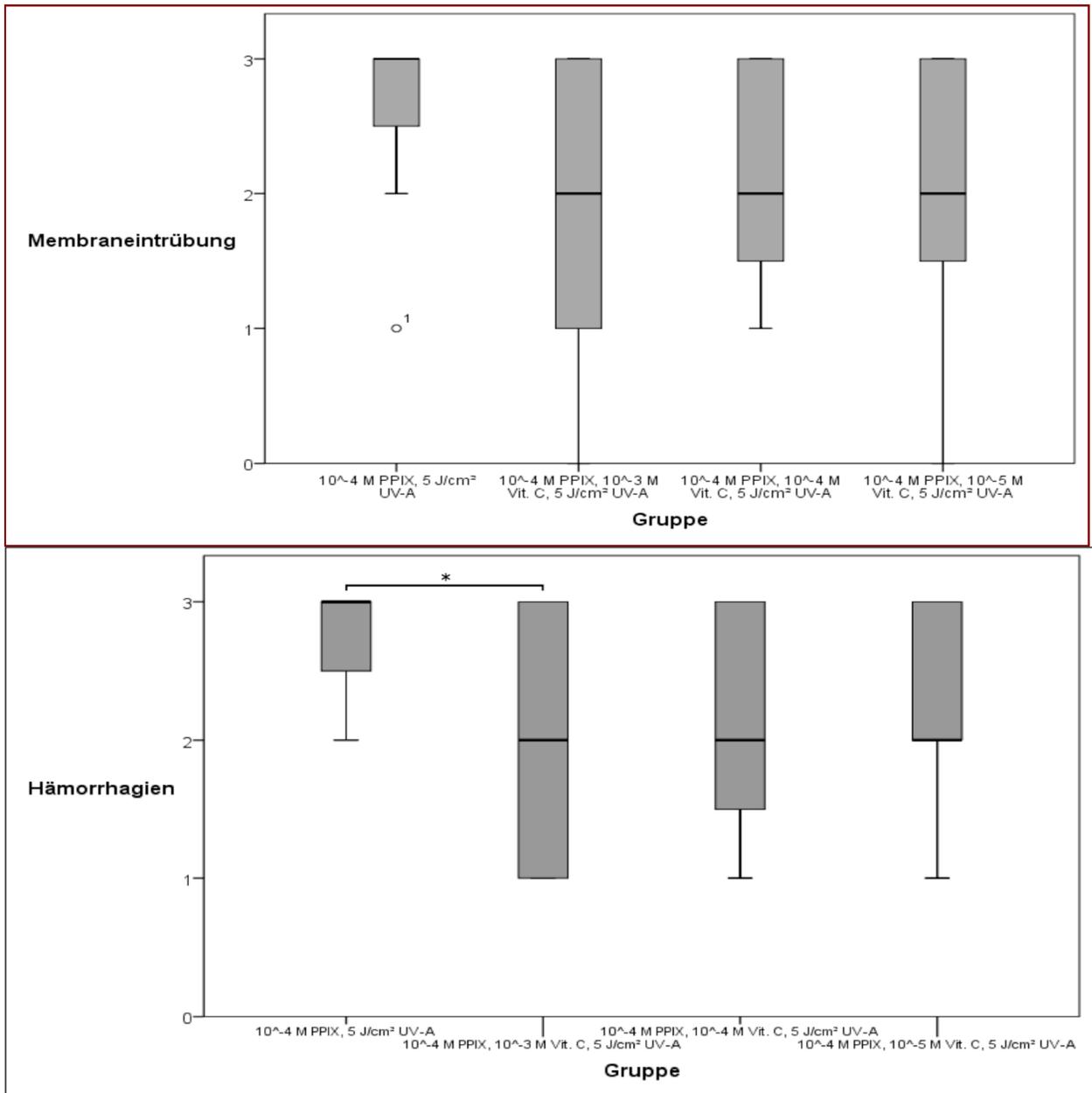


Abb. 21: Morphologische Parameter der PPIX/UV-A/Ascorbinsäure-Gruppen

PPIX, Protoporphyrin IX; UV-A, UV-A-Strahlung; AA, Ascorbinsäure

Letalität

Ascorbinsäure zeigte deskriptiv in den Konzentrationen 10^{-3} M bis 10^{-5} M letale Ereignisse in mit der Konzentration fallender Häufigkeit (58,3–66,67%; siehe Abb. 22 und 23). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (PPIX/UV-A) und den Testgruppen (siehe Anhang 3A).

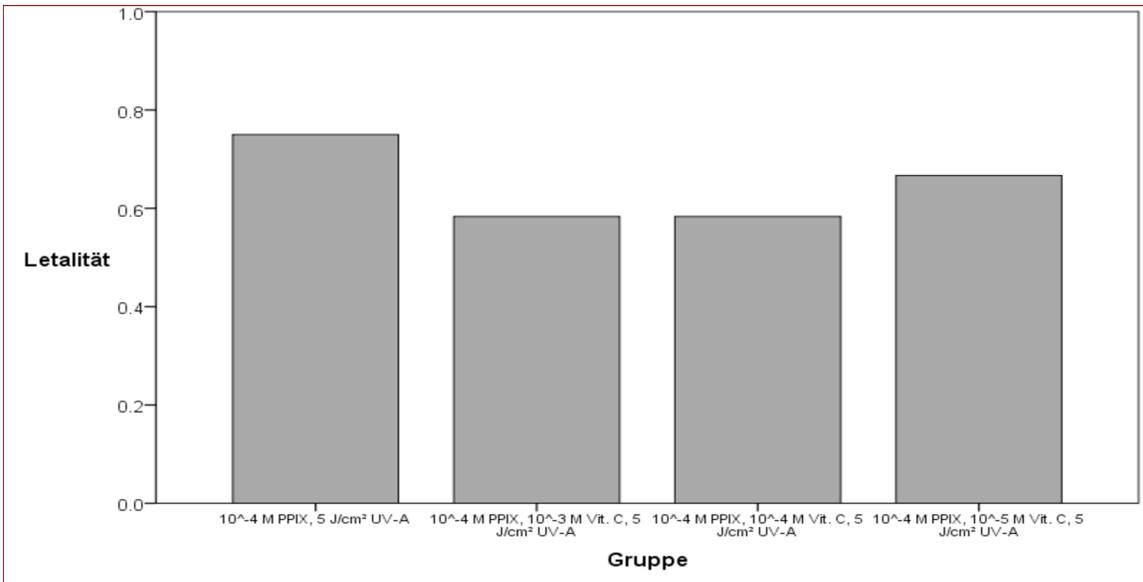


Abb. 22: Letalitätsraten PPIX/UV-A/Ascorbinsäure-Gruppen

PPIX, Protoporphyrin IX; UV-A, UV-A-Strahlung; AA, Ascorbinsäure

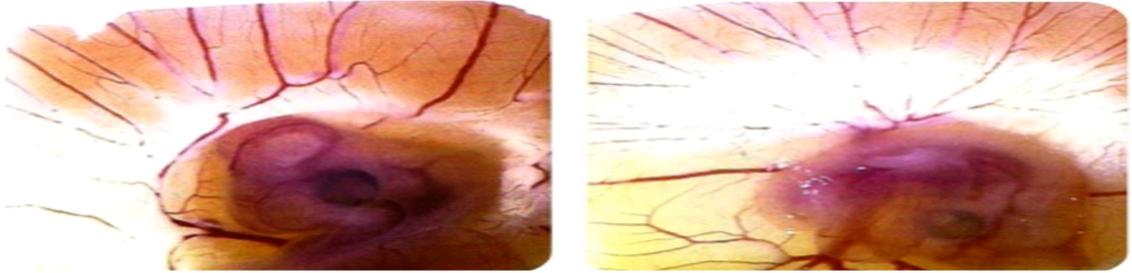


Abb. 23: Embryonen der PPIX/UV-A/Ascorbinsäure-Gruppe

Teils gering, teils stärker beschädigte Dottersack-Gefäßsysteme

3.4.2 UV-B-Gruppe

Tabelle 12: Ergebnisse: UV-B-Licht und zusätzliche Applikation von Ascorbinsäure

Gr.	Lösungen	UV-B	Beobachtete Häufigkeiten (<i>n</i> Eier)								
			LET	Ø ME	ME1	ME2	ME3	Ø HR	HR1	HR2	HR3
1	DPBS	80 mJ/c m ²	9	0	0	5	7	0	0	3	9
5	10 ⁻³ M Vit. C	80 mJ/c m ²	3	2	2	4	4	3	7	1	2
6	10 ⁻⁴ M Vit. C	80 mJ/c m ²	6	2	5	3	2	1	3	5	3
7	10 ⁻⁵ M Vit. C	80 mJ/c m ²	8	1	4	2	5	0	2	2	8

Membraneintrübungen und Hämorrhagien

Die UV-B-Gruppe, der zusätzlich 10⁻³ M Ascorbinsäure appliziert worden war, zeigte für das Merkmal der Membraneintrübungen deskriptiv einen Median von 2. Für das Merkmal der Hämorrhagien konnte in derselben Gruppe zwar ein Median von 1 protokolliert werden, allerdings zeigte sich hier eine grosse Streubreite.

Für das Merkmal Membraneintrübungen zeigte sich in der Gruppe, der zusätzlich 10⁻⁴ M Ascorbinsäure appliziert worden war, ein geringerer Median als in der Gruppe mit höherer Ascorbinsäure-Konzentration. Bei der niedrigsten Konzentration von Ascorbinsäure (10⁻⁵ M) stieg die Ausprägung der Membraneintrübungen deskriptiv allerdings wieder auf einen Median von 2.

Tendenziell konnten für das Merkmal Hämorrhagien in den übrigen Gruppen (10⁻⁴ M und 10⁻⁵ M Ascorbinsäure) bei sinkender Konzentration höhere Ausprägungsgrade gesehen werden. Bei Zwischen welchen Gruppen (Kontrollgruppe: DPBS/UV-B) signifikante Unterschiede in den Zielgrößen bestanden, kann Abb. 24 entnommen werden (Membraneintrübungen: U-Test (10⁻⁴ M): U = 24.50, z = -2.89, p < 0.1; Hämorrhagien: U-Test (10⁻³ M): U = 16.50, z = -3.55, p < .001 und U-Test (10⁻⁴ M): U = 30.00, z = -2.65, p < 0.1; siehe Anhang 3B).

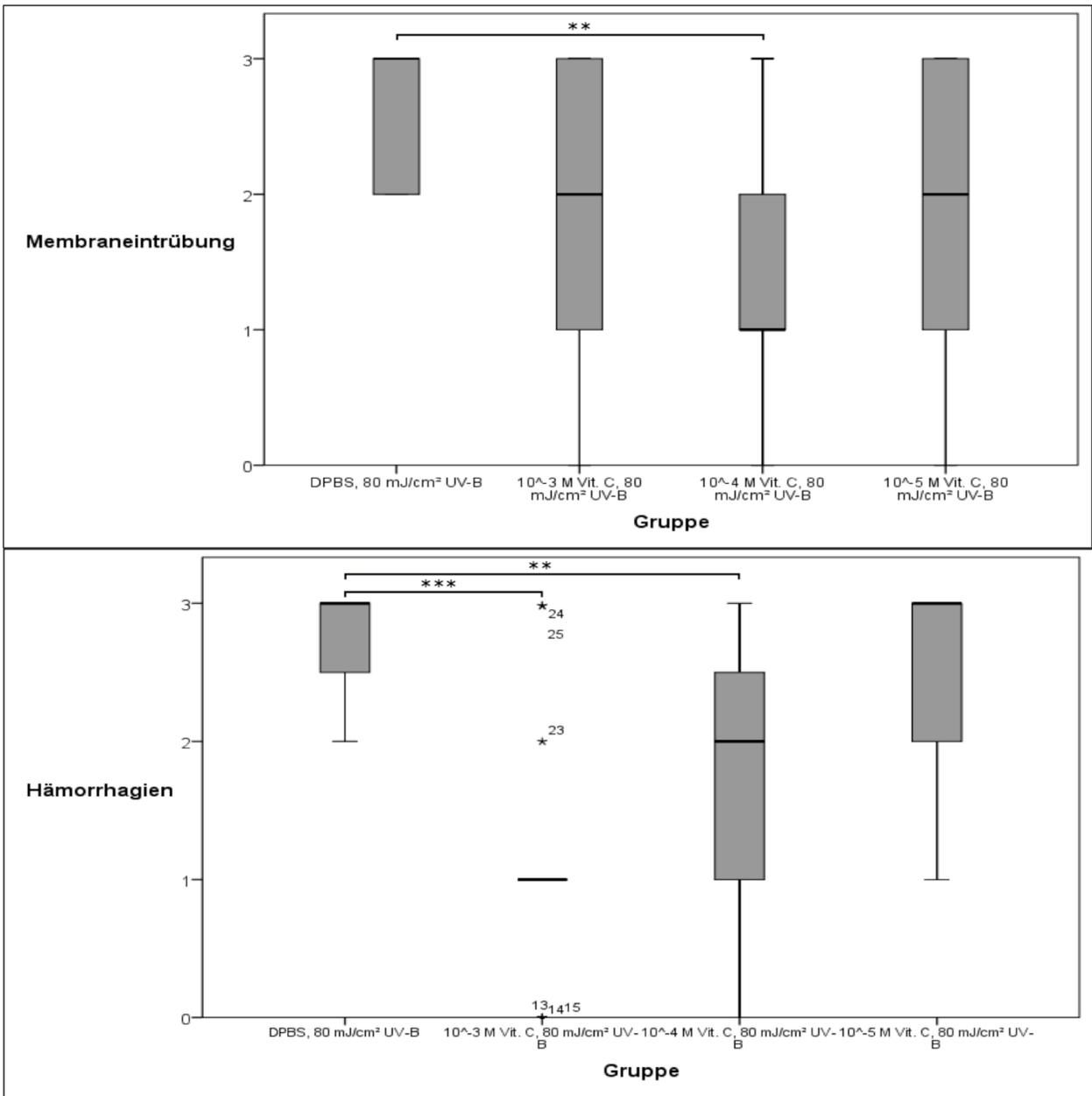


Abb. 24: Morphologische Parameter UV-B/Ascorbinsäure-Gruppe

DPBS, Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung; UV-B, UV-B-Strahlung; AA, Ascorbinsäure

Letalität

Die UV-B-Testgruppen, denen Ascorbinsäure in den Konzentrationen 10^{-3} M bis 10^{-5} M zugesetzt wurde, zeigten niedrige bis hohe Letalitätsraten, deren Häufigkeit (25–66,67%) mit fallender Konzentration teilweise deskriptiv anstieg. Die Testgruppen, denen zusätzlich

Ascorbinsäure appliziert worden war, hatten abhängig von der applizierten Ascorbinsäure-Dosis also seltener letale Ereignisse, als die Kontrollgruppe (DPBS/UV-B) ohne zusätzliche Ascorbinsäuregabe (siehe Abb. 25 und 26). Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe lag allerdings nur in der Testgruppe vor, der zusätzlich die höchste Konzentration an Ascorbinsäure appliziert worden war (10^{-3} M: $X^2(1) = 6.74$, $p < .01$, $\Phi = -0,52$; siehe Anhang 3B).

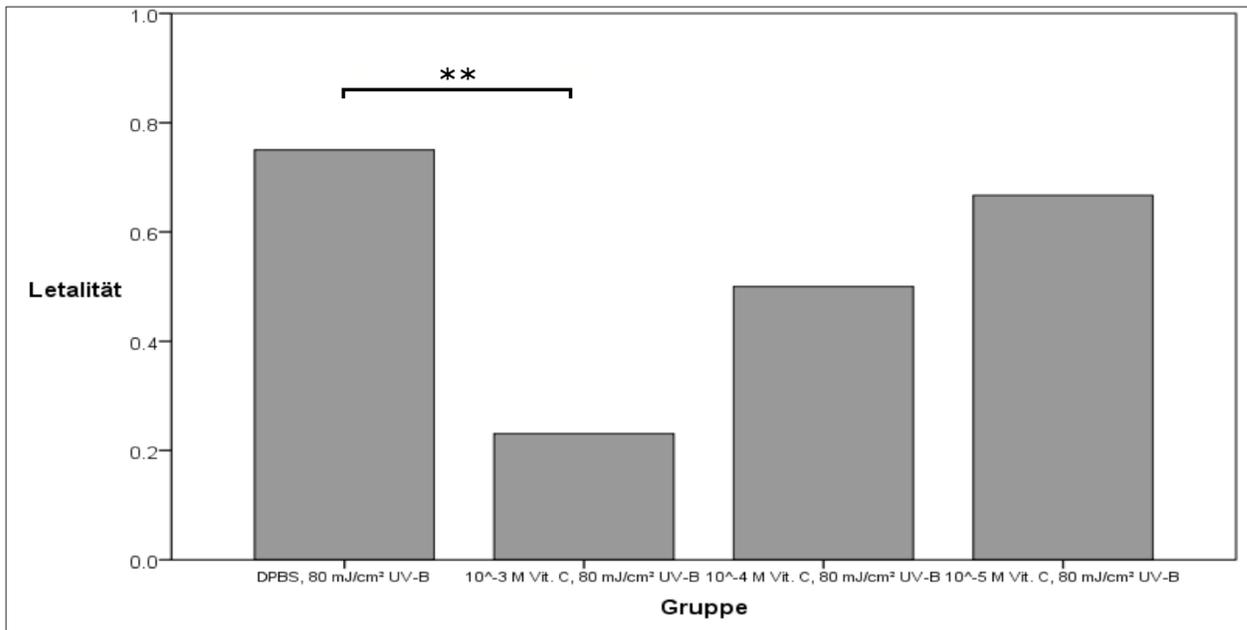


Abb. 25: Letalitätsraten der UV-B/Ascorbinsäure-Gruppen

DPBS, Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung; UV-B, UV-B-Strahlung; AA, Ascorbinsäure

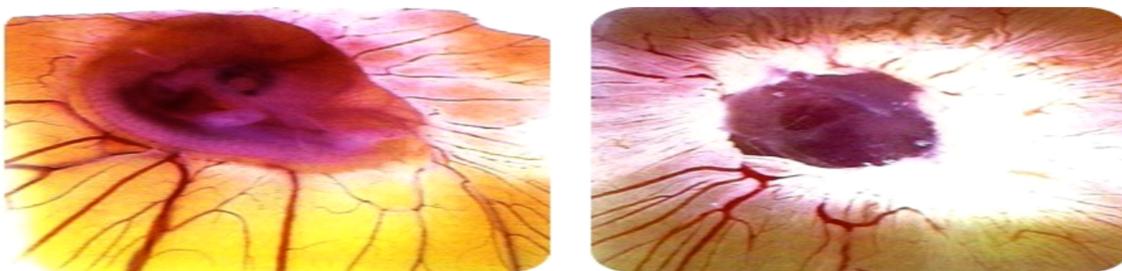


Abb. 26: Embryonen der UV-B/Ascorbinsäure-Gruppe

Teils gering, teils stärker beschädigte Dottersack-Gefäßsysteme

3.5 Trolox (Vitamin E)

3.5.1 PPIX/UV-A-Gruppe

Tabelle 13: Ergebnisse: PPIX/UV-A-Licht und zusätzliche Applikation von Trolox

Gr.	Lösungen	UV-A	Beobachtete Häufigkeiten (<i>n</i> Eier)								
			LET	Ø ME	ME1	ME2	ME3	Ø HR	HR1	HR2	HR3
1	10 ⁻⁴ M PPIX	5 J/cm ₂	9	0	1	2	9	0	0	3	9
8	10 ⁻⁴ M PPIX, 10 ⁻³ M Vit. E	5 J/cm ₂	8	0	2	2	8	0	1	2	9
9	10 ⁻⁴ M PPIX, 10 ⁻⁴ M Vit. E	5 J/cm ₂	8	0	1	3	8	0	0	3	9
10	10 ⁻⁴ M PPIX, 10 ⁻⁵ M Vit. E	5 J/cm ₂	9	0	0	2	10	0	0	3	9

Membraneintrübungen und Hämorrhagien

Den PPIX/UV-A-Gruppen, denen zusätzlich 10⁻³–10⁻⁵ M Trolox appliziert worden war, zeigten für Membraneintrübungen und Hämorrhagien denselben Median, den auch die Gruppe ohne zusätzliche Trolox-Applikation aufwies. Die dargestellten Boxplots zeigen kaum Unterschiede in den Ausprägungsgraden der beiden Merkmale (siehe Abb. 27). Außerdem konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (PPIX/UV-A) und den Testgruppen gesehen werden (siehe Anhang 4A).

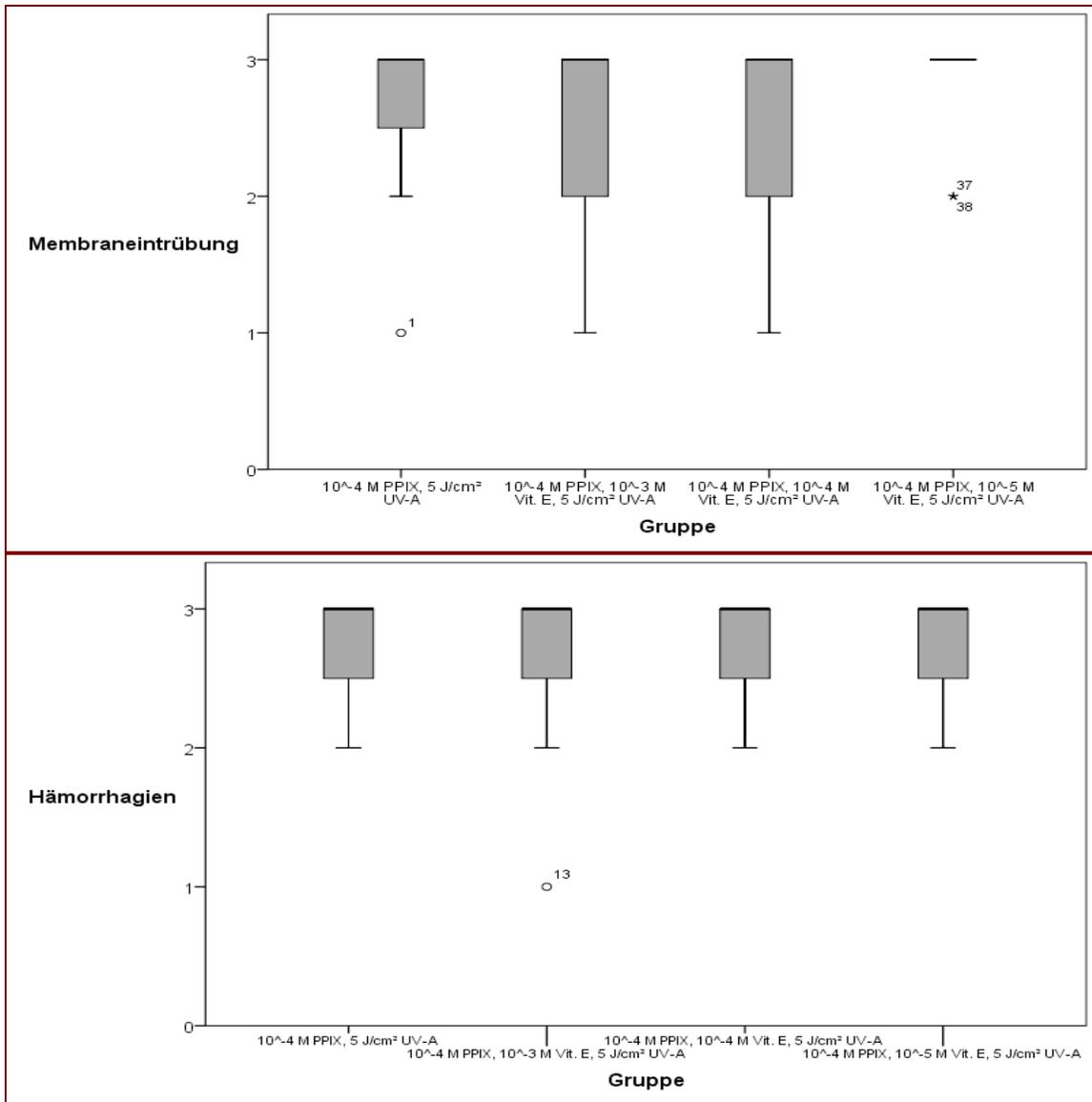


Abb. 27: Morphologische Parameter der PPIX/UV-A/Trolox-Gruppen

PPIX, Protoporphyrin IX; UV-A, UV-A-Strahlung; Vit. E, Trolox (Vitamin E)

Letalität

Die PPIX/UV-A-Gruppen, denen zusätzlich Trolox appliziert worden war, zeigten in den Konzentrationen 10^{-3} M bis 10^{-4} M 66,67% letale Ereignisse. In der Konzentration 10^{-5} M lag die Letalität bei 75% und unterschied sich somit nicht von der der PPIX/UV-A-Gruppe (siehe Abb. 28 und 29). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (PPIX/UV-A) und den Testgruppen gezeigt werden (siehe Anhang 4A).

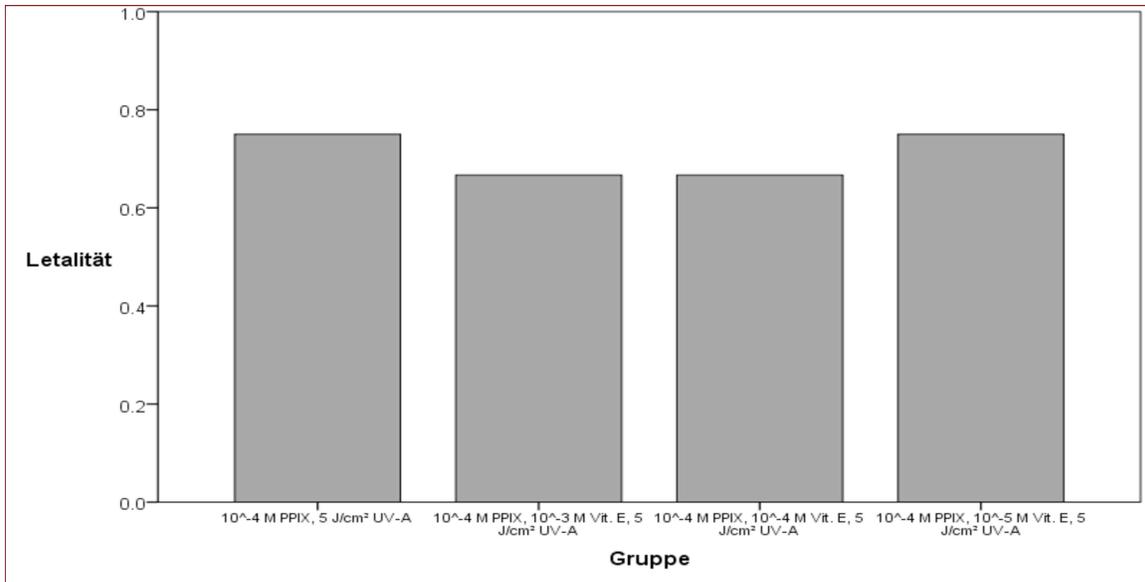


Abb. 28: Letalitätsraten der PPIX/UV-A-Trolox-Gruppen

PPIX, Protoporphyrin IX; UV-A, UV-A-Strahlung; Vit E., Trolox (Vitamin E)

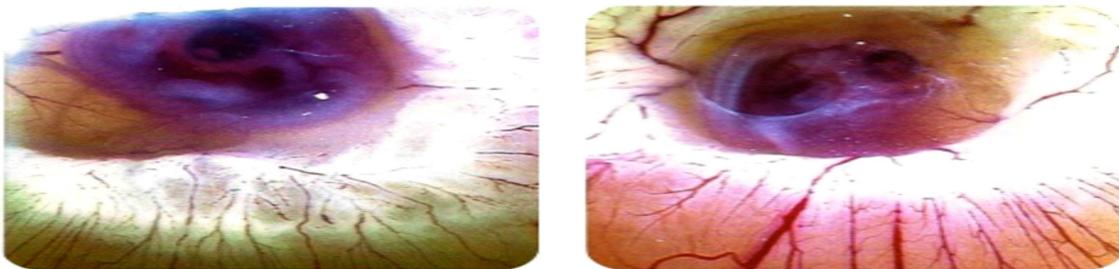


Abb. 29: Embryonen der PPIX/UV-A/Trolox-Gruppen

Teils gering, teils stärker beschädigte Dottersack-Gefäßsysteme

3.5.2 UV-B-Gruppe

Tabelle 14: Ergebnisse: UV-B-Licht und zusätzliche Applikation von Trolox

Gr.	Lösungen	UV-B	Beobachtete Häufigkeiten (<i>n</i> Eier)								
			LET	Ø ME	ME1	ME2	ME3	Ø HR	HR1	HR2	HR3
1	DPBS	80 mJ/c m ²	9	0	0	5	7	0	0	3	9
8	10 ⁻³ M Vit. E	80 mJ/c m ²	4	3	5	2	2	4	4	2	2
9	10 ⁻⁴ M Vit. E	80 mJ/c m ²	4	2	4	4	2	3	4	3	2
10	10 ⁻⁵ M Vit. E	80 mJ/c m ²	5	1	4	5	2	2	3	4	3

Membraneintrübungen und Hämorrhagien

Die UV-B-Gruppen, denen zusätzlich 10^{-3} M und 10^{-4} M Trolox appliziert worden war, zeigten für Membraneintrübungen und Hämorrhagien einen Median von 1 bzw. 1,5. Auch die Gruppen, bei denen niedrigere Troloxkonzentrationen appliziert worden waren, wiesen schwächere Ausprägungsgrade für die beiden Merkmale auf als in der UV-B-Gruppe. Die Testgruppen, denen also zusätzlich Trolox appliziert worden war, hatten abhängig von der Trolox-Dosis schwächer ausgeprägte Membraneintrübungen und Hämorrhagien als die Gruppen ohne zusätzliche Troloxgabe (siehe Abb. 30). Die inferenzstatistische Auswertung zeigte, dass sich alle Gruppen 8 bis 10 in beiden Zielvariablen signifikant von der Kontrollgruppe (DPBS/UV-B) unterschieden (Membraneintrübungen: U-Test (10^{-3} M): $U = 22.00$, $z = -3.02$, $p < .01$; Hämorrhagien: U-Test (10^{-3} M): $U = 18.00$, $z = -3.31$, $p < .001$; siehe Anhang 4B).

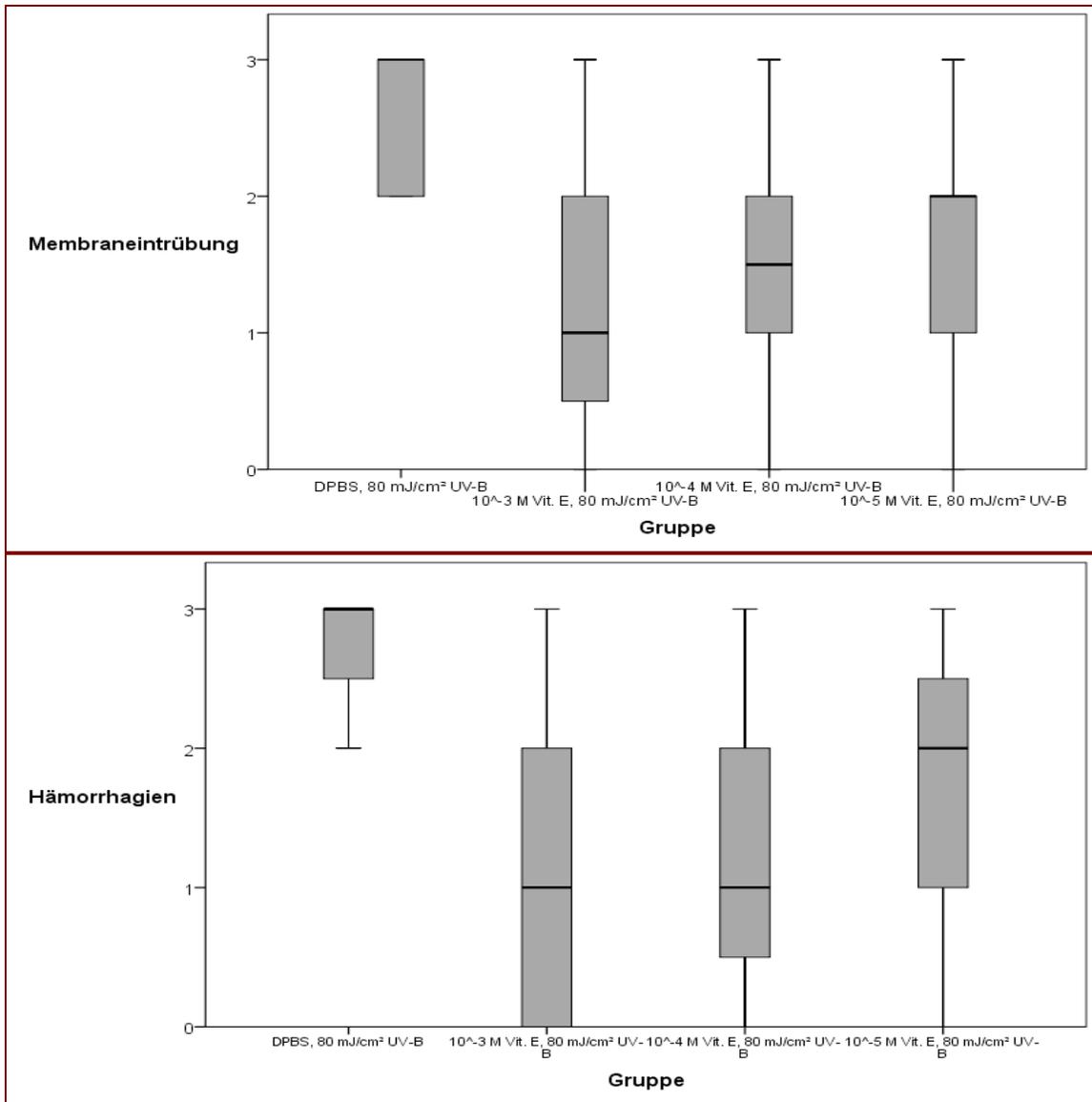


Abb. 30: Morphologische Parameter UV-B/Trolox-Gruppe.

In dieser Versuchsreihe zeigen alle Versuchsgruppen in Bezug auf die Merkmale Hämorrhagien und Membraneintrübungen signifikante Unterschiede zur Vergleichsgruppe (p-Wert mindestens <.01)

DPBS, Dulbecco's phospatgepufferte Salzlösung; UV-B, UV-B-Strahlung; Vit. E, Trolox (Vitamin E)

Letalität

In der Testgruppe, bei der zusätzlich Trolox appliziert worden war, zeigte die UV-B-Strahlung unter dem zusätzlich Einfluss von Trolox (10^{-3} M bis 10^{-5} M) eine verminderte Letalitätsrate. Die Häufigkeit der Letalitätsrate (33,33–41,67%) stieg deskriptiv mit sinkender Trolox-Konzentration wieder an (siehe Abb. 31 und 32). Zwei von drei Gruppen zeigten einen signifikanten

Unterschied zur Kontrollgruppe, die lediglich mit UV-B und DPBS exponiert worden war (10^{-3} M: $X^2(1) = 4.20$, $p < .05$, $\Phi = -0.42$; 10^{-4} M: $X^2(1) = 4.20$, $p < .05$, $\Phi = -0.42$; siehe Anhang 4B).

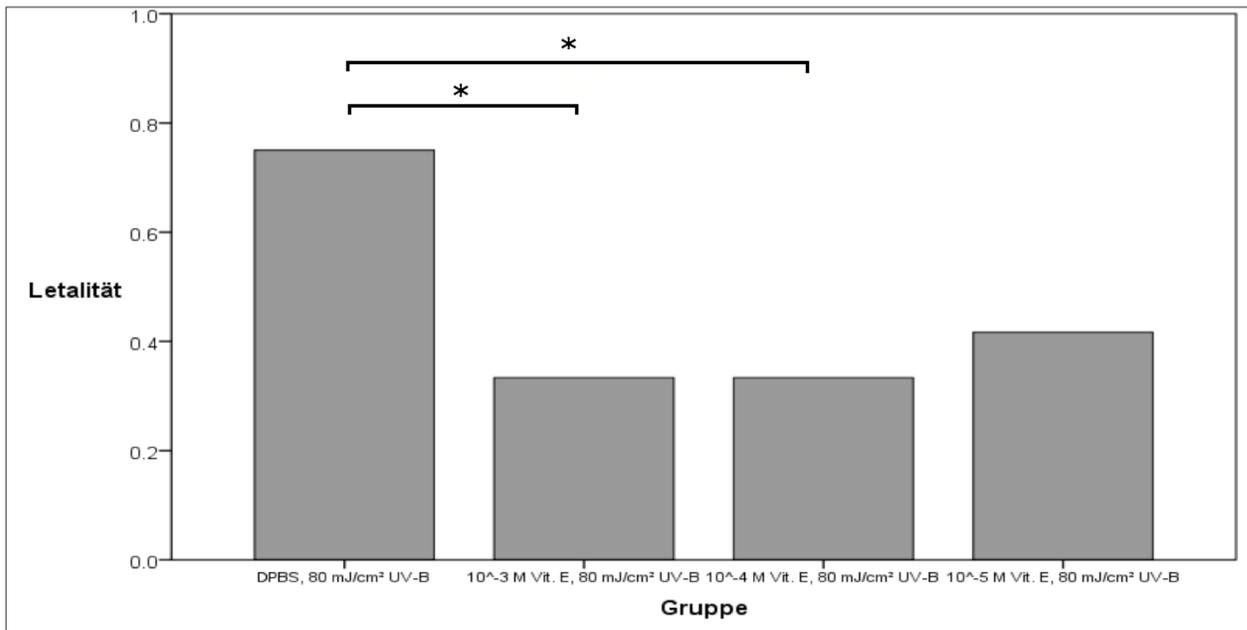


Abb. 31: Letalitätsraten der UV-B/Trolox-Gruppen

DPBS, Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung; UV-B, UV-B-Strahlung; Vit. E, Trolox (Vitamin E)

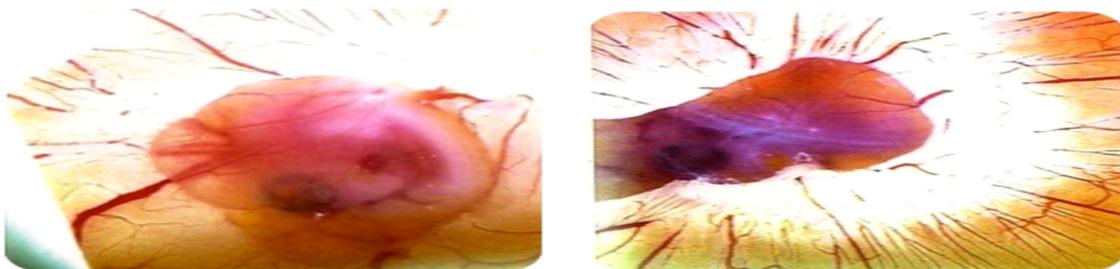


Abb. 32: Embryonen der UV-B/Trolox-Gruppe

Teils gering, teils stärker beschädigte Dottersack-Gefäßsysteme

3.6 Melanin

3.6.1 PPIX/UV-A-Gruppe

Tabelle 15: Ergebnisse: PPIX/UV-A-Licht und Applikation von synthetischem Melanin

Gr.	Lösungen	UV-A	Beobachtete Häufigkeiten (<i>n</i> Eier)								
			LET	Ø ME	ME1	ME2	ME3	Ø HR	HR1	HR2	HR3
1	10 ⁻⁴ M PPIX	5 J/cm ₂	9	0	1	2	9	0	0	3	9
11	10 ⁻⁴ M PPIX, 10⁻³ M Melanin	5 J/cm ₂	2	2	6	2	2	6	3	3	0
12	10 ⁻⁴ M PPIX, 10⁻⁴ M Melanin	5 J/cm ₂	2	3	6	2	1	8	2	1	1
13	10 ⁻⁴ M PPIX, 10⁻⁵ M Melanin	5 J/cm ₂	4	0	5	1	6	1	6	2	3

Membraneintrübungen und Hämorrhagien

Die PPIX/UV-A-Gruppe, der zusätzlich 10⁻³ M Melanin appliziert worden war, zeigte für das Merkmal der Membraneintrübungen deutlich geringere Werte, welche sich auch im niedrigen Median (1) widerspiegelte. Für die Gruppe mit 10⁻⁴ M Melanin konnte zwar ebenfalls ein Median von 1 protokolliert werden, jedoch zeigten sich für das genannte Merkmal deutlich geringere Ausprägungen im Vergleich zur PPIX/UV-A-Gruppe als auch im Vergleich zu der Gruppe, der zusätzlich die höhere Konzentration Melanin (10⁻³ M) appliziert worden war. Auch die Gruppe mit der niedrigsten Melanin-Konzentration (10⁻⁵ M) zeigte deskriptiv geringer ausgeprägte Membraneintrübungen mit einem Median von 2,5 (siehe Abb. 33).

Die PPIX/UV-A-Gruppe, der zusätzlich 10⁻³ M Melanin appliziert worden war, zeigte für das Merkmal der Hämorrhagien einen Median von 0,5 und deutlich geringere Ausprägungsgrade im Vergleich zur PPIX/UV-A Gruppe ohne Melanin-Applikation. Für die Gruppe mit 10⁻⁴ M Melanin konnte ein Median von 0 protokolliert werden. Die Ausprägungsgrade der Hämorrhagien waren deutlich unter denen der Kontrollgruppe (PPIX/UV-A) und auch unter der Gruppe, der zusätzlich die höhere Konzentration Melanin (10⁻³ M) appliziert worden war. Auch die Gruppe mit der niedrigsten Melanin-Konzentration (10⁻⁵ M) zeigte geringer ausgeprägte Hämorrhagien mit einem Median von 1 (siehe Abb. 33). Die interferenzstatistische Auswertung zeigte für das Merkmal Hämorrhagien in allen Gruppen signifikante Werte an (U-Test (10⁻³ M): U = 4.50, z = -4.07, p < .001). Für das Merkmal Membraneintrübungen zeigte sich lediglich kein signifikantes Ergebnis für die Gruppe, bei der die schwächste Dosis an Melanin appliziert worden

war. Für die beiden anderen Gruppen zeigte die interferenzstatistische Auswertung signifikante Ergebnisse an (U-Test (10^{-3} M): $U = 22.00$, $z = -3.09$, $p < .01$; siehe Anhang 5A).

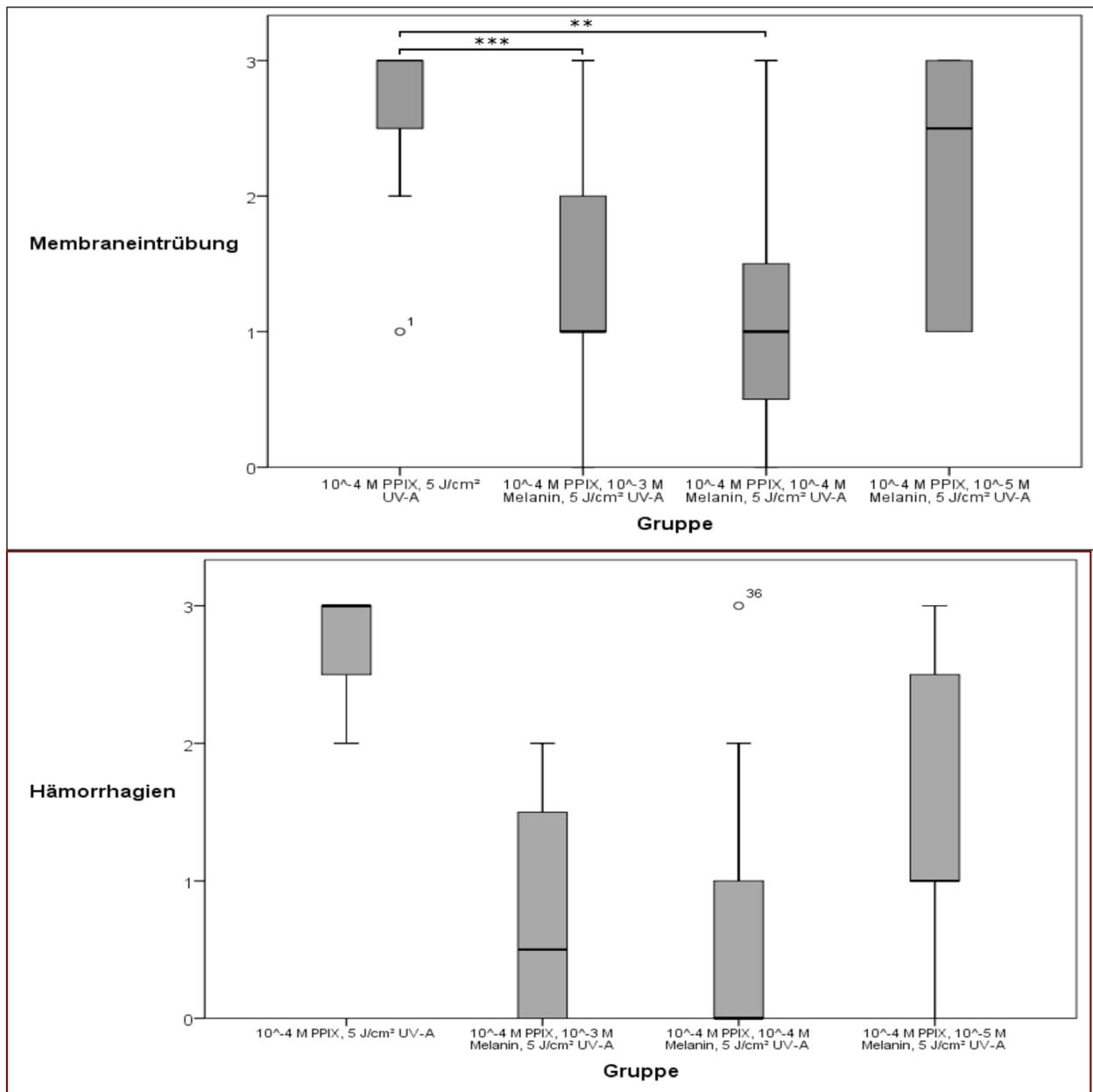


Abb. 33: Morphologische Parameter der PPIX/UV-A/Melanin-Gruppen.

In dieser Versuchsreihe zeigen alle Versuchsgruppen in Bezug auf das Merkmal Hämorrhagien signifikante Unterschiede zur Vergleichsgruppe (p -Wert mindestens $< .001$)

PPIX, Protoporphyrin IX; UV-A, UV-A-Strahlung

Letalität

Die Gruppen, denen zusätzlich Melanin appliziert worden war, zeigten in den Konzentrationen 10^{-3} M und 10^{-4} M letale Ereignisse in einer Häufigkeit von 16,67%. Die Gruppe, der zusätzlich die geringste Melanin-Konzentration appliziert worden war (10^{-5} M), zeigte eine Letalitätsrate von 33,33%. Die Testgruppen, denen zusätzlich Melanin appliziert worden war, hatten abhängig von der Melanin-Dosis seltener letale Ereignisse, als die Gruppe ohne zusätzliche Melaningabe (siehe Abb. 34 und 35). Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (PPIX/UV-A) und den Testgruppen beobachtet werden (10^{-3} M: $X^2(1) = 8.22$, $p < .01$, $\Phi = -0.59$; 10^{-4} M: $X^2(1) = 8.22$, $p < .01$, $\Phi = -0.59$; 10^{-5} M: $X^2(1) = 4.20$, $p < .05$, $\Phi = -0.42$; siehe Anhang 5A).

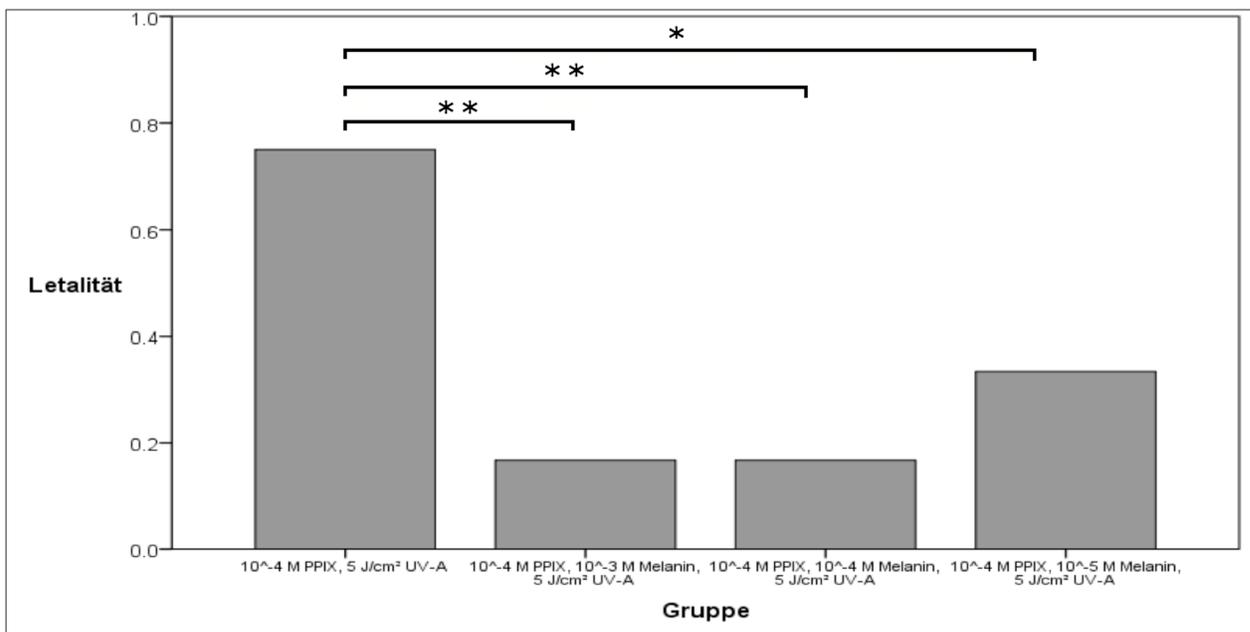


Abb. 34: Letalitätsraten der PPIX/UV-A/Melanin-Gruppen

PPIX, Protoporphyrin IX; UV-A, UV-A-Strahlung

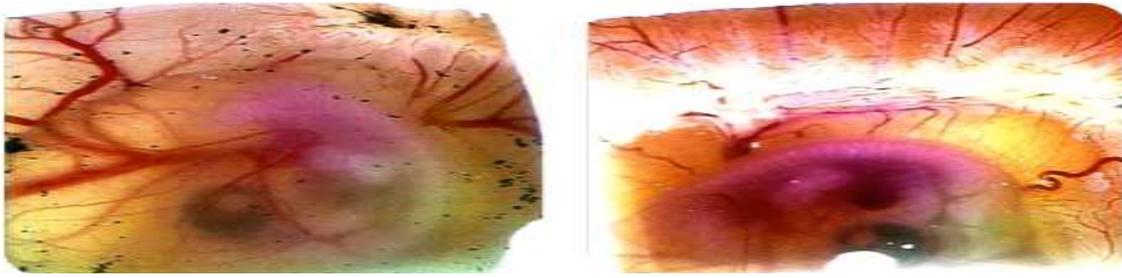


Abb. 35: Embryonen der PPIX/UV-A/Melanin-Gruppen

Leicht bis mäßig lädierte Dottersack-Gefäßsysteme, und Bestandteile von unzureichend gelöstem Melanin sind erkennbar.

3.6.2 UV-B-Gruppe

Tabelle 16: Ergebnisse: UV-B-Licht und zusätzliche Applikation von synthetischem Melanin

Gr.	Lösungen	UV-B	Beobachtete Häufigkeiten (<i>n</i> Eier)								
			LET	Ø ME	ME1	ME2	ME3	Ø HR	HR1	HR2	HR3
1	DPBS	80 mJ/c m ²	9	0	0	5	7	0	0	3	9
11	10⁻³ M Melanin	80 mJ/c m ²	2	6	3	0	1	4	6	2	0
12	10⁻⁴ M Melanin	80 mJ/c m ²	2	7	1	2	2	8	2	1	1
13	10⁻⁵ M Melanin	80 mJ/c m ²	4	2	0	5	5	2	3	4	3

Membraneintrübungen und Hämorrhagien

Die UV-B-Gruppe, der zusätzlich 10⁻³ bzw. 10⁻⁴ Melanin appliziert worden war, zeigte für das Merkmal der Membraneintrübungen einen Median von 0 sowie deutlich geringere Ausprägungsgrade. Die Gruppe, der zusätzlich die geringste Konzentration Melanin appliziert worden war, zeigte einen Median von 2 sowie deskriptiv beinahe unveränderte Ausprägungsgrade im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nur mit DPBS/UV-B exponiert worden war (siehe Abb. 36).

Die UV-B-Gruppe, der zusätzlich 10⁻³ M Melanin appliziert worden war, zeigte für das Merkmal der Hämorrhagien einen Median von 1 und deutlich geringere Ausprägungsgrade im Vergleich zur UV-B-Gruppe ohne Melanin-Applikation. Für die Gruppe mit 10⁻⁴ M Melanin konnte ein Median von 0 protokolliert werden. Die Ausprägungsgrade der Hämorrhagien entsprachen der Gruppe, der zusätzlich die höhere Konzentration Melanin (10⁻³ M) appliziert worden war. Auch

die Gruppe mit der niedrigsten Melanin-Konzentration (10^{-5} M) zeigte geringer ausgeprägte Hämorrhagien mit einem Median von 2 (siehe Abb 36). Die interferenzstatistische Auswertung zeigte für das Merkmal Hämorrhagien in allen Gruppen signifikante Werte an (U-Test (10^{-3} M): $U = 3.00$, $z = -4.15$, $p < .001$). Für das Merkmal Membraneintrübungen zeigte sich lediglich kein signifikantes Ergebnis für die Gruppe, bei der die schwächste Dosis an Melanin appliziert worden war. Für die beiden anderen Gruppen zeigte die interferenzstatistische Auswertung signifikante Ergebnisse an (U-Test (10^{-3} M): $U = 8.50$, $z = -3.54$, $p < .001$; siehe Anhang 5B).

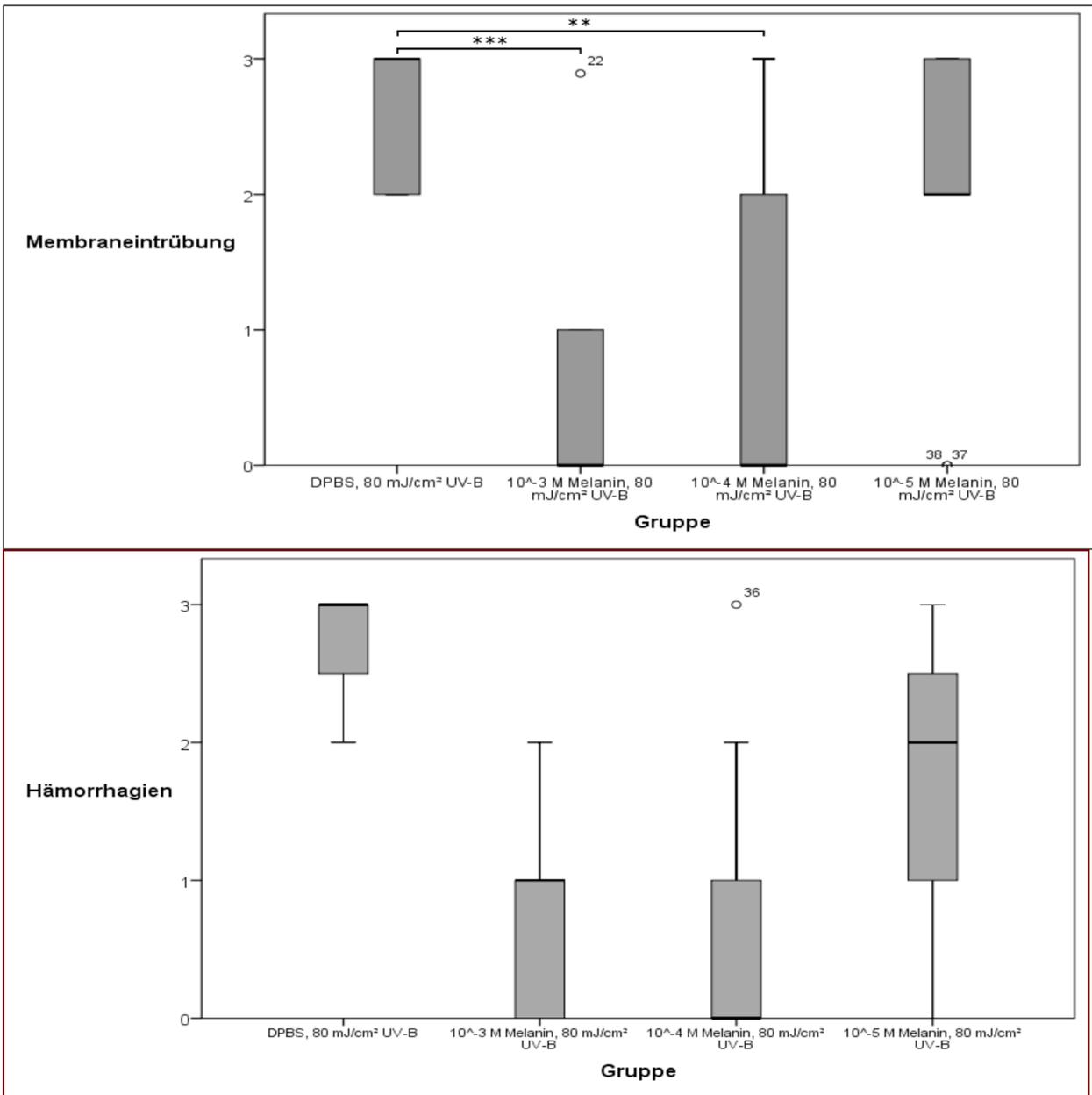


Abb. 36: Morphologische Parameter der UV-B/Melanin-Gruppen.

In dieser Versuchsreihe zeigen alle Versuchsgruppen in Bezug auf das Merkmal Hämorrhagien signifikante Unterschiede zur Vergleichsgruppe (p-Wert mindestens <.01)

DPBS, Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung; UV-B, UV-B-Strahlung

Letalität

Die Gruppen, denen zusätzlich Melanin appliziert worden war, zeigten in den Konzentrationen 10⁻³ M und 10⁻⁴ M letale Ereignisse in einer Häufigkeit von 16,67%. Die Gruppe, der zusätzlich

die geringste Melanin-Konzentration appliziert worden war (10^{-5} M), zeigte eine Letalitätsrate von 33,33%. Es zeigt sich auch hier, dass die Testgruppen, denen zusätzlich Melanin appliziert worden war, dosisabhängig seltener letale Ereignisse als die Kontrollgruppe ohne zusätzliche Melaningabe hatten (siehe Abb. 37 und 38). Alle Gruppen (Kontrollgruppe: DPBS/UV-B) unterschieden sich bezüglich des Parameters Letalität signifikant von der Vergleichsgruppe (10^{-3} M: $X^2(1) = 8.22$, $p < .01$, $\Phi = -0,59$; 10^{-4} M: $X^2(1) = 8.22$, $p < .01$, $\Phi = -0,59$; 10^{-5} M: $X^2(1) = 4.20$, $p < .05$, $\Phi = -0,42$; siehe Anhang 5B).

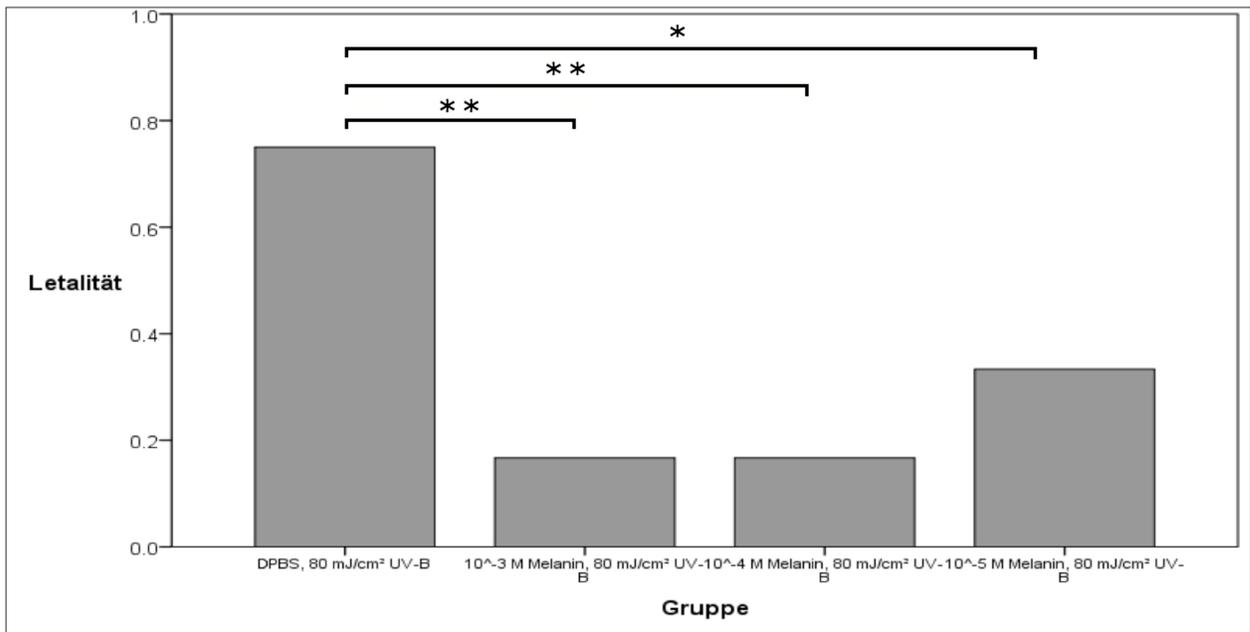


Abb. 37: Letalitätsraten der UV-B/Melanin-Gruppen

DPBS, Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung; UV-B, UV-B-Strahlung

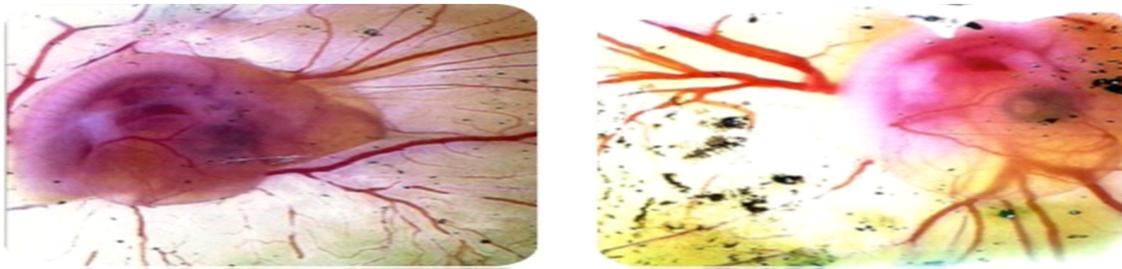


Abb. 38: Embryonen der UV-B/Melanin-Gruppen.

Leicht bis mäßig beschädigte Dottersack-Gefäßsysteme. Bestandteile von unzureichend gelöstem Melanin erkennbar

3.7 Vergleichsdiagramme

3.7.1 PPIX/UV-A-Gruppe

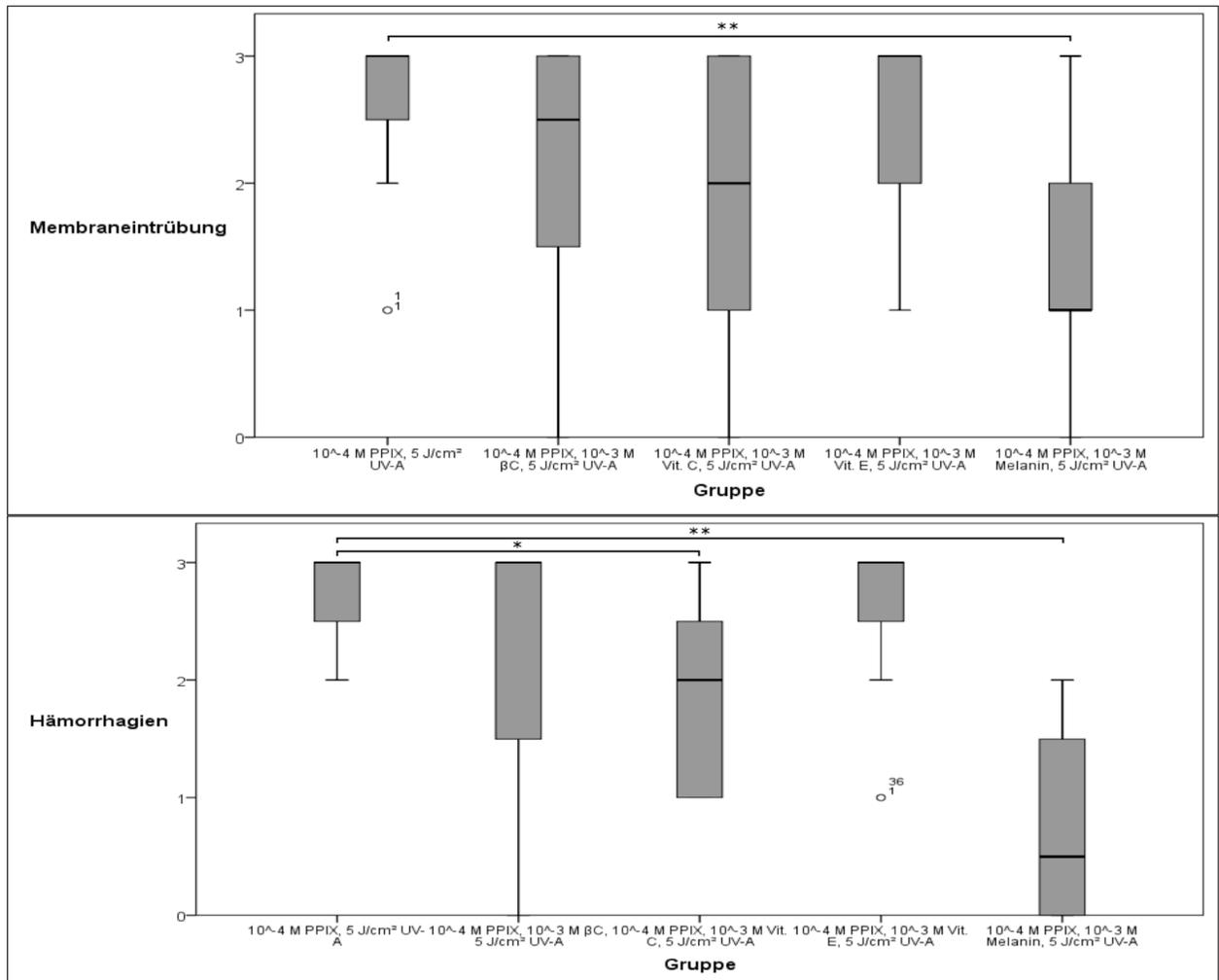


Abb. 39: Morphologische Parameter der PPIX/UV-A-Gruppen

PPIX, Protoporphyrin IX; UV-A, UV-A-Strahlung; βC, β-Carotin; AA, Ascorbinsäure; Vit E., Trolox (Vitamin E); M, Melanin

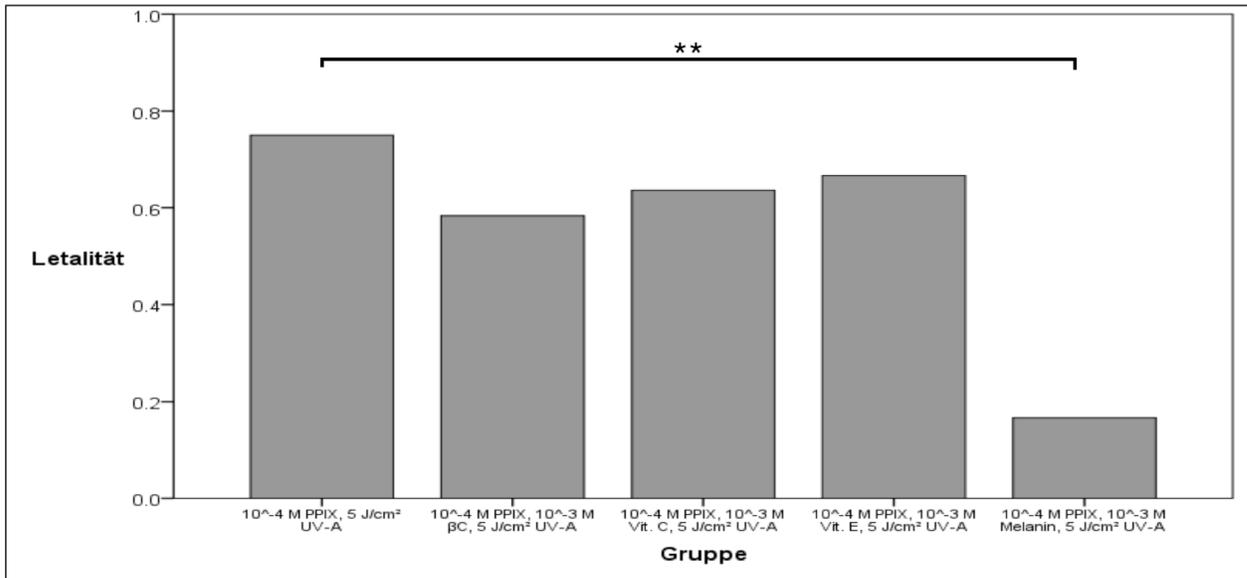


Abb. 40: Letalitätsraten der PPIX/UV-A-Gruppen

PPIX, Protoporphyrin IX; UV-A, UV-A-Strahlung; βC, β-Carotin; AA, Ascorbinsäure; Vit E., Trolox (Vitamin E); M, Melanin

Bei den Vergleichsdiagrammen werden lediglich die Resultate der Gruppen verglichen, bei denen jeweils die höchste Konzentration des vermeintlich protektiven Agens hinzugefügt worden war. Wenn man die PPIX/UV-A-Gruppen in Hinblick auf die Parameter Membraneintrübungen und Hämorrhagien vergleicht, scheint grundsätzlich bei Zusatz eines Agens der Schaden zumindest verringert zu sein. Die Boxplots sind in diesen Gruppen tendenziell weiter im Bereich der geringeren Membraneintrübungen und Hämorrhagien angesiedelt. Bei Zusatz von Melanin ist dieser Trend am stärksten zu erkennen. Trolox schneidet vergleichsweise am schlechtesten ab. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe liegen nur bei den Versuchsgruppen Melanin und Vitamin C vor (siehe Abb. 39)

Ähnliches gilt beim Vergleich der PPIX/UV-A-Gruppen in Hinblick auf den Parameter Letalität. Bei Zusatz eines Agens sinkt die Letalität grundsätzlich ab. Bei Zusatz von Melanin ist die stärkste Reduktion der Letalität zu erkennen. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (PPIX/UV-A) liegen nur in der Melanin-Gruppe vor (siehe Abb. 40).

3.7.2 UV-B-Gruppe

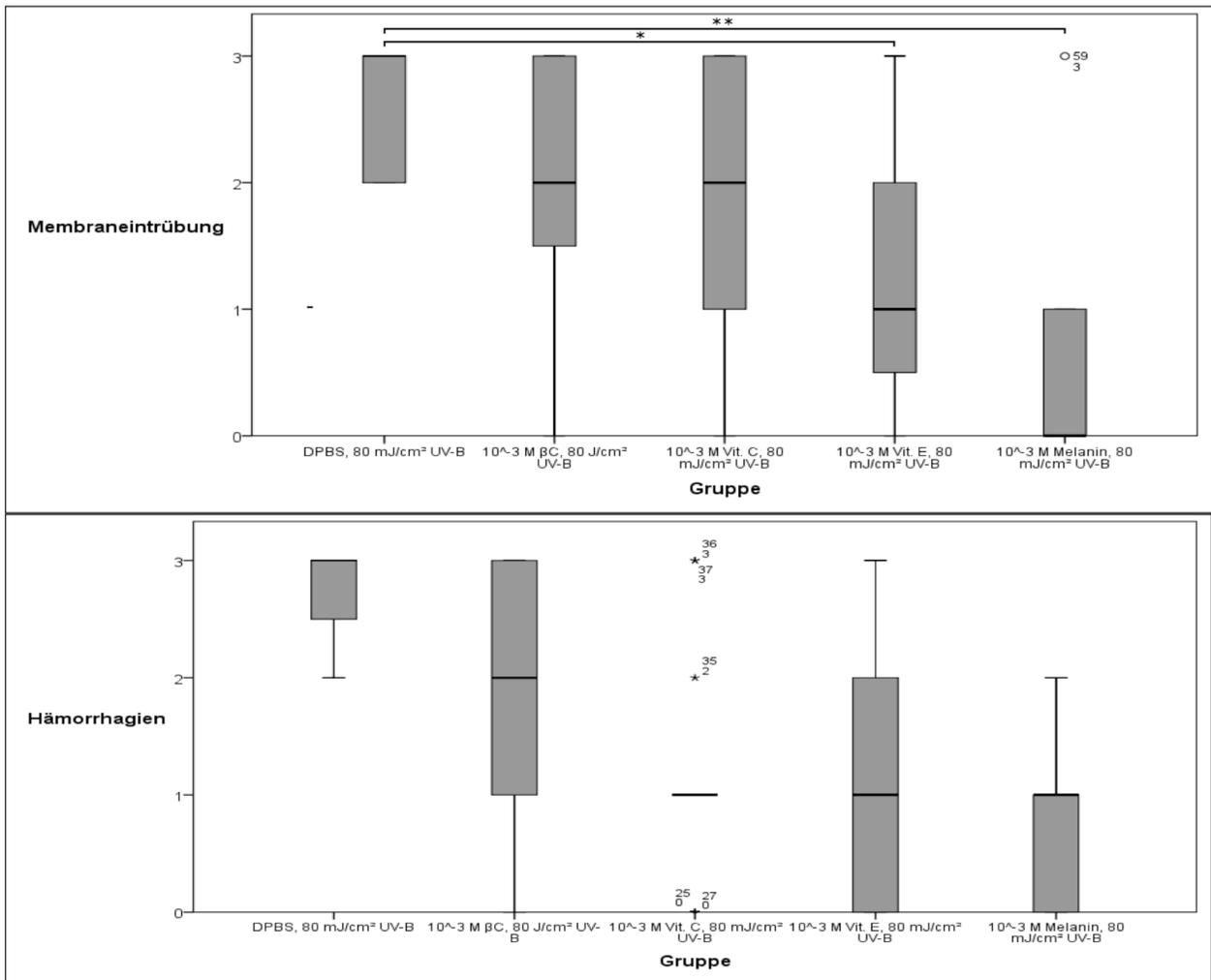


Abb. 41: Morphologische Parameter UV-B-Gruppen.

In allen Versuchsreihen sind die Versuchsgruppen der Stoffkonzentrationen 10^{-3} M in Bezug auf das Merkmal Hämorrhagien signifikant unterschiedlich zur Vergleichsgruppe (p-Wert mindestens $<.05$)

UV-B, UV-B-Strahlung; βC, β-Carotin; AA, Ascorbinsäure; Vit E., Trolox (Vitamin E); M, Melanin

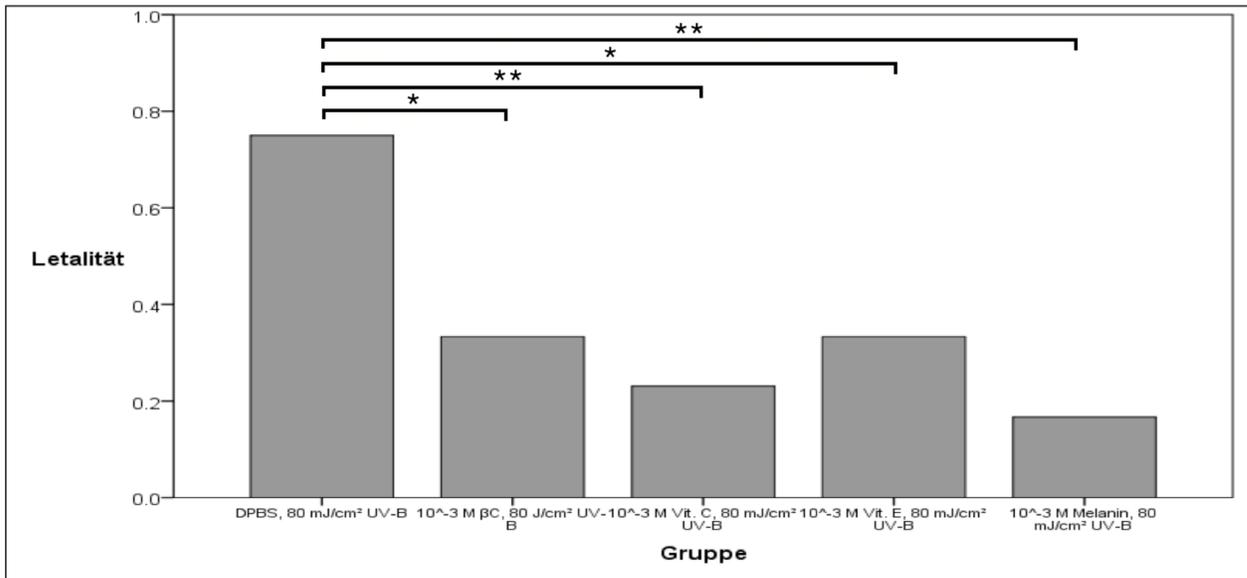


Abb. 42: Letalitätsraten der UV-B-Gruppen

UV-B, UV-B-Strahlung; βC, β-Carotin; AA, Ascorbinsäure; Vit E., Trolox (Vitamin E); M, Melanin

Wenn man die UV-B-Gruppen in Hinblick auf die Parameter Membraneintrübungen und Hämorrhagien vergleicht, scheint ebenfalls grundsätzlich bei Zusatz eines Agens der Schaden zumindest verringert zu sein. Die Boxplots sowie die jeweiligen Mediane sind in diesen Gruppen tendenziell weiter im Bereich der geringeren Membraneintrübungen und Hämorrhagien angesiedelt. Bei Zusatz von Melanin ist dieser Trend am stärksten zu erkennen. β-Carotin schneidet vergleichsweise am schlechtesten ab. Signifikante Ergebnisse liegen für das Merkmal Membraneintrübungen nur bei den Versuchsgruppen Melanin und Trolox vor. Für das Merkmal Hämorrhagien konnte in allen Gruppen mit zusätzlicher Applikation eines Agens ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe beobachtet werden (siehe Abb. 41).

Ähnliches gilt beim Vergleich der UV-B-Gruppen in Hinblick auf den Parameter Letalität. Bei Zusatz eines Agens sinkt die Letalität grundsätzlich ab. Bei Zusatz von Melanin ist die stärkste Reduktion der Letalität zu erkennen. Für das Merkmal Letalität konnte in allen Gruppen mit zusätzlicher Applikation eines Agens ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (DPBS/UV-B) beobachtet werden (siehe Abb. 42).

4 Diskussion

Ein Hautschutz durch topische oder systemisch wirksame Antioxidantien ist nicht nur zur Vorbeugung von Sonnenbrand, sondern auch bei Lichtdermatosen und Photokarzinogenese wünschenswert.

Präklinische und klinische Daten zeigen zwar, dass die natürlichen Antioxidantien Ascorbinsäure, β -Carotin und α -Tocopherol zur Photoprotektion beitragen können, jedoch wird dieser Aspekt in klinischen Studien kontrovers diskutiert (44).

Der PHET ist eine Modifikation des Tests am DGS und wurde entwickelt, um Phototoxizitätsversuche kostengünstig und zeitsparend durchführen zu können. Da das embryonale DGS mit einer Membran überzogen ist, kann es als Modell für die menschliche Haut herangezogen werden. Neumann et al. nutzten dieses Modell, um Rückschlüsse auf phototoxische Wirkungen von Substanzen auf die menschliche Haut zu ziehen (19–21, 150a). So wurde z.B. die Wirkung von PPIX in Kombination mit UV-A-Licht auf die Haut mittels PHET in einer Arbeit evaluiert (19).

Des Weiteren konnten auch photoprotektive Eigenschaften von Substanzen zumindest gegenüber UV-B-induzierten Schäden mittels PHET untersucht werden (21). Der PHET ist demnach sowohl für die Evaluation phototoxischer als auch photoprotektiver Substanzen auf die Haut geeignet.

In der vorliegenden Arbeit sollte erneut untersucht werden, ob die Applikation von PPIX in Kombination mit UV-A-Strahlung zu phototoxischen Reaktionen am DGS im PHET führt. Im zweiten Schritt sollte die zusätzliche Applikation von Ascorbinsäure, β -Carotin, α -Tocopherol oder Melanin auf ihre photoprotektiven Eigenschaften hin überprüft werden.

4.1 Phototoxische Reaktionen von PPIX in Kombination mit UV-A-Strahlung

Zunächst einmal konnte in Vorversuchen eine PPIX- bzw. UV-A-Dosis (10^{-4} mol/l, 5 J/cm^2) evaluiert werden, die höchstens zu geringfügigen Veränderungen des DGS führten. Die hier verwendeten Dosen sind mit Konzentrationen in Studien aus der Literatur vergleichbar (19,151).

Im zweiten Schritt konnten durch die kombinierte Applikation von PPIX und UV-A-Strahlung deutliche Schäden am DGS hervorgerufen werden (siehe Abb. 13 und 16). Diese Reaktionen (75% Letalität, ausgeprägte morphologische Schäden) zeigten, dass die der EPP zugrunde liegende Pathologie mit dem PHET reproduziert werden kann. Die schon in vivo bekannte Phototoxizität von PPIX konnte somit erneut nachgewiesen werden (siehe Abb. 39 und 40).

4.2 Ascorbinsäure (Vitamin C)

In der vorliegenden Arbeit wurde angedeutet, dass Ascorbinsäure im Konzentrationsbereich von 10^{-4} – 10^{-3} mol/l (Gruppe 5 und 6) photoprotektive Effekte gegenüber UV-B-Strahlung sowie gegenüber PPIX in Kombination mit UV-A-Strahlung besitzt. Dies konnte auch durch eine Senkung der Letalität um 50% bzw. 16,67% und durch eine deutlich geringere Ausprägung von Membraneintrübungen und Hämorrhagien gegenüber der PPIX-UV-A-Gruppe (Gruppe 1) angedeutet werden (siehe Abb. 21-26).

In großen klinischen Studien beträgt die Serumkonzentration von Ascorbinsäure ca. $0,5$ – $0,6 \times 10^{-4}$ mol/l (152–154). Diese Konzentrationen können mit denen, die im PHET eingesetzt wurden, durchaus verglichen werden und finden sich auch in ähnlichen Studien (151). Außerdem kann eine Erhöhung des Serumwertes auf das Doppelte nach dreimonatiger oraler Gabe von Vitamin C (zweimal täglich ein Gramm) schon nach einem Monat beobachtet werden (90).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit diversen Studien, die mit Versuchen an unterschiedlichen Zellreihen ebenfalls einen photoprotektiven Effekt von Vitamin C demonstrieren konnten (155,156). Bissett und Darr wiesen diesen Effekt auch an Maus- und Schweinehaut nach (101,104,157).

Der Wirkmechanismus von Vitamin C beruht auf seiner Funktion als Radikalfänger. Yoshikawa et al. zeigten, dass Ascorbinsäure protektive Auswirkungen auf doppelsträngige DNA-Brüche in eukaryontischen Zellen, induziert durch oxidativen Stress, hat (158). Allerdings wird der antioxidative Effekt von Vitamin C in der Literatur kontrovers diskutiert, manche Studien weisen auch pro-oxidative Wirkungen von Ascorbinsäure nach (159–161).

Durch die beschriebenen Eigenschaften lässt sich Ascorbinsäure auch in der Phototherapie sinnvoll einsetzen. Eine orale Einnahme von Vitamin C in Kombination mit Vitamin E führte zu einer Erhöhung der MED von 21% nach einer Woche auf bis zu 41% nach 3 Monaten (90,162).

Darüber hinaus konnte eine Verminderung der UV-B-induzierten Katarakt-Entwicklung durch Vitamin C bei Mäusen festgestellt werden (163).

In Bezug auf Porphyrine wurden ebenfalls diverse Studien durchgeführt. Somit ist Ascorbinsäure zwar in der Lage, die chemische Induktion und damit die Akkumulation von Uroporphyrin zu verhindern, jedoch gilt dies nicht für PPIX (164,165). Böhm et al. wiesen nach, dass Vitamin C in Bezug auf PPIX-induzierte Phototoxizität nur einen geringen Schutzfaktor aufweist (151). Neumann et al. publizierten analog zu den hier dargestellten Versuchen, dass Ascorbinsäure sowie Acetylsalicylsäure (ASS) photoprotektiv gegenüber UV-B-induzierten Schäden wirken (21). Der protektive Effekt war aber deutlich schwächer ausgeprägt gegenüber PPIX/UV-A-induzierten Schäden im Vergleich zu Embryonen, die UV-B-Strahlung ausgesetzt wurden.

Böhm et al. postulierten dazu passend, dass hydrophilere Agenzien wie Ascorbinsäure (und Trolox) gegenüber dem lipophilen PPIX ein anderes Schutzprofil aufweisen als z.B. das ebenfalls relativ lipophile β -Carotin. In der Therapie der EPP konnte keine signifikante Milderung der Symptome nachgewiesen werden (9,53).

Zusammenfassend lassen die o.g. Studien sowie die Ergebnisse des PHET die Annahme zu, dass Ascorbinsäure in der Therapie der EPP bestenfalls supportiv geeignet ist. Studien mit größeren Patientenzahlen wären erforderlich, um eine genauere Aussage machen zu können.

4.3 Trolox (Vitamin E)

Trolox zeigt im Konzentrationsbereich von 10^{-4} – 10^{-3} mol/l ebenfalls photoprotektive Effekte gegenüber UV-B-Strahlung (Senkung der Letalität um bis zu 41,67%). Gegenüber den durch PPIX in Kombination mit UV-A-Strahlung hervorgerufenen Schäden konnte allerdings nur eine minimale Wirkung beobachtet werden (Senkung der Letalität um bis zu 8,33%; siehe Abb. 27-32).

Insbesondere die Ergebnisse bezüglich der photoprotektiven Eigenschaften von Trolox in Verbindung mit UV-B-induzierten Schäden im PHET bestätigen die Untersuchungen mehrerer Autoren. Trevithick et al. beobachteten, dass Vitamin E UV-B-induzierte Erytheme abmildert (166). Dies wurde durch Kondo et al. in einer Studie an menschlichen Fibroblasten bestätigt (167). Außerdem führt Vitamin E zur Verminderung UV-induzierter Folgen wie Lipid-Peroxidation (168), Hautalterung (169), Immunsuppression (170) und Photokarzinogenese (105).

Die zugrunde liegenden Mechanismen beruhen wahrscheinlich hauptsächlich auf der Funktion als Radikalfänger: Der Chromanol-Ring von Vitamin E reagiert mit Lipid-Peroxy-Radikalen, sodass ein oxidiertes Vitamin-E-Radikal entsteht. So wird eine Ausbreitung der schädigenden Radikale verhindert und es werden konsekutiv Fettsäuren in Lipoproteinen und Zellmembranen stabilisiert (171,172).

Die durchschnittliche Serumkonzentration von Vitamin E im menschlichen Körper beträgt ca. $0,3\text{--}0,4 \times 10^{-4}$ mol/l (152,173). Diese Konzentrationen stehen im Einklang mit denen, die in den Versuchen mit dem PHET eingesetzt wurden. Eine dreimonatige orale Einnahme von zweimal täglich 500 IU Vitamin E führte in klinischen Studien zu einer Erhöhung des Serumwertes auf das Doppelte (90).

In Zusammenschau mit den vorliegenden Ergebnissen (insbesondere in Bezug auf PPIX/UV-A) sowie der kritischen Bewertung von Vitamin E in der Literatur (108,109) liegt die Annahme nahe, dass Trolox als protektives Agens im Rahmen einer Therapie von EPP-Patienten nur bedingt geeignet ist. Möglicherweise könnte eine kombinierte Gabe mit Vitamin C zu einem besseren Ergebnis führen, da eine additive Wirkung der beiden Vitamine beschrieben wurde (162).

4.4 β -Carotin

β -Carotin zeigt im Konzentrationsbereich von $10^{-4}\text{--}10^{-3}$ mol/l (Gruppe 2 und 3) mäßige photoprotektive Effekte gegenüber UV-B-Strahlung sowie gegenüber PPIX in Kombination mit UV-A-Strahlung. Eine Verminderung der Letalität um 41,67% bzw. 16,67% sowie schwächer ausgeprägte Membraneintrübungen und Hämorrhagien konnten erzielt werden (siehe Abb. 15-20).

Die durchschnittliche Serumkonzentration von β -Carotin im menschlichen Körper liegt je nach Studie im Bereich von $0,005\text{--}0,006 \times 10^{-4}$ mol/l (152,154,173). Dieser Wert weicht zwar von den Konzentrationen, die in den hier beschriebenen Versuchen mit dem PHET verwendet wurden, ab, allerdings ist auch bekannt, dass ein therapeutischer Effekt bei Photodermatosen erst ab ca. vierfachen Serumwerten für β -Carotin zu beobachten ist (122).

Zusammenfassend wird das photoprotektive Potenzial von β -Carotin von Sies und Stahl auf die folgenden Wirkungsmechanismen zurückgeführt : Barrierefunktion gegen UV-Licht, Funktion

als Antioxidans bzw. Radikalfänger, Induktion von DNA-Reparaturmechanismen und Suppression der zellulären Immunantwort (174). Von den genannten Mechanismen wird die Funktion als Radikalfänger als die Wichtigste beschrieben (175).

Mathews-Roth et al. zeigten einen geringen, jedoch statistisch signifikanten Anstieg der UV-B-MED bei 30 gesunden Probanden (176). Gleichzeitig konnte eine Studie an 23 gesunden Probanden keine statistisch signifikante β -Carotin-assoziierte Photoprotektion gegenüber UV-A-, UV-B- oder PUV-A-induzierten Erythemen aufzeigen (177).

In der Literatur wird β -Carotin in Bezug auf Photoprotektion im Vergleich zu anderen Antioxidantien häufig als potenteres Agens beschrieben: Böhm et al. beispielsweise versuchten dies damit zu begründen, dass Ascorbinsäure und Trolox weniger lipophil sind als β -Carotin (151). Dies müsste insbesondere in Bezug auf PPIX/UV-A-induzierte Schäden von Bedeutung sein, konnte via PHET allerdings nicht belegt werden. Ascorbinsäure und Trolox weisen hier ähnliche oder sogar höhere photoprotektive Effekte auf.

Des Weiteren sind Ascorbinsäure und Trolox deutlich schwächere Sauerstoff-*Quencher* ($0,84\text{--}1,06 \times 10^7 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $2,5 \times 10^8 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) als β -Carotin ($13,5 \times 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

β -Carotin wird häufig als effektives Agens beschrieben, wenn es um die Behandlung der EPP geht. Mathews-Roth et al. empfehlen eine Dosis von 180–300 mg täglich als Anfangsdosis zur Behandlung der EPP (178).

Minder et al. führten aus, dass in der Literatur zwar zahlreiche Studien zur oralen Einnahme von β -Carotin bei EPP-Patienten existieren, diese jedoch meistens nicht unter randomisierten, kontrollierten und doppelblinden Bedingungen durchgeführt worden seien (9). Die einzig kontrollierte Studie zeige hingegen keinen signifikanten Therapieerfolg gegenüber einem Placebo (179).

Ein guter Indikator für eine unzureichende Wirksamkeit von β -Carotin in der Behandlung der EPP kann auch durch die Tatsache gestützt werden, dass in zwei neueren Studien 66–80% der EPP-Patienten die Therapie mit β -Carotin selbstständig beendeten, da die Therapie nicht als hilfreich empfunden wurde (123,180).

4.5 Melanin

Melanin zeigte im Konzentrationsbereich von 10^{-5} – 10^{-3} mol/l signifikante photoprotektive Effekte in Bezug auf UV-B- sowie PPIX/UV-A-induzierte Phototoxizität. Eine Senkung der Letalität um bis zu 58,33% konnte beobachtet werden. Selbst bei Applikation von Melanin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l wurde eine Reduktion der Letalität um 41,67% erreicht (siehe Abb. 34 und 37).

Dass Melanin, als natürliches Pigment des Menschen, photoprotektiv wirkt, ist schon seit Langem bekannt: In Studien konnte belegt werden, dass vermehrte Hautpigmentierung (mit einem Melanometer erfasst) zu einer Erhöhung der MED führt (181). Eine Untersuchung an Dunkelhäutigen zeigte dabei eine bis zu 33-fach erhöhte MED im Vergleich zu Patienten mit hellem Hauttyp (182).

Herrling et al. führten aus, dass Melanin-Biopolymere als Halbleiter wirken und bei zahlreichen biologischen Prozessen eine Rolle spielen. Als natürliche Pigmente wirken sie durch die Absorption von breiten Wellenlängenspektren photoprotektiv, allerdings fungieren sie ebenso als Antioxidantien, freie Radikalfänger und als Mediatoren von Ladungstransporten.

Entsprechend der unterschiedlichen Reaktion der Haut auf UV-Licht, abhängig vom natürlichen Pigmentierungsgrad bzw. der Fähigkeit zur Pigmentierung, werden 6 Hauttypen unterschieden. Für die europäische Bevölkerung spielen nur die Pigmenttypen I-IV eine Rolle. Der Pigmenttyp V bezieht sich auf dunkelhäutige Gruppen wie z.B. Inder, der Pigmenttyp VI auf schwarze Gruppen. Die Funktion des Melanins als Radikalfänger wurde für jeden Hauttyp ermittelt und quantifiziert. Somit wird Hauttyp II ein intrinsischer Schutzfaktor durch Melanin als Radikalfänger (RSF) von 1,0 zugeschrieben. Für Hauttyp IV hingegen konnte ein RSF von 2,5 ermittelt werden. Diese Werte korrelieren also deutlich mit der Hautpigmentierung. Melanin wirkt als Radikalfänger den durch UV-induzierten Hautschädigungen durch ROS entgegen (183). Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass Melanin mit der DNA reagiert und als bekannter Photosensibilisator nach UV-Bestrahlung selbst zur Produktion von ROS neigt (184).

Ein weiterer Mechanismus der Photoprotektion besteht in der Funktion des Melanins als natürlicher UV-Schutz. Die als physikalische Barriere wirkenden schwarzen Hautpigmente (insbesondere Eumelanine) entfalten ihren Effekt durch eine Zerstreuung der UV-Strahlung bzw.

fungieren als absorbierende Filter, welche die Penetration von UV-Strahlung durch die Epidermis hindurch reduzieren.

Im Vergleich mit Ascorbinsäure, Trolox und β -Carotin konnte Melanin im PHET als deutlich wirksameres photoprotektives Agens identifiziert werden. Insbesondere in Bezug auf PPIX/UV-A-induzierte Schäden erwies sich Melanin als wesentlich effektiver.

Ein Erklärungsansatz dafür könnte darin liegen, dass das Hauptabsorptionsspektrum von PPIX im Wellenlängenbereich von 410 nm (Soret-Bande) liegt. Kleinere Absorptionsspektren von PPIX befinden sich zwischen 500 nm und 650 nm (Q-Banden). Diese letztgenannten Banden tragen vermutlich zu einem Großteil zur Exzitation von dermal akkumulierendem PPIX bei, allerdings wird die Strahlung im Wellenlängenbereich der Q-Banden deutlich weniger abgeschwächt als die der Soret-Bande.

Im Gegensatz dazu zeigt β -Carotin keine Absorption von Wellenlängen unter 550 nm und absorbiert selbst die Strahlung im Bereich der Q-Banden nur teilweise. Melanin hingegen zeigt eine Absorption in allen relevanten Wellenlängenbereichen (124). Somit führt es vermutlich zu einer deutlich effektiveren Abschwächung der Exzitation von PPIX (siehe Abb. 43).

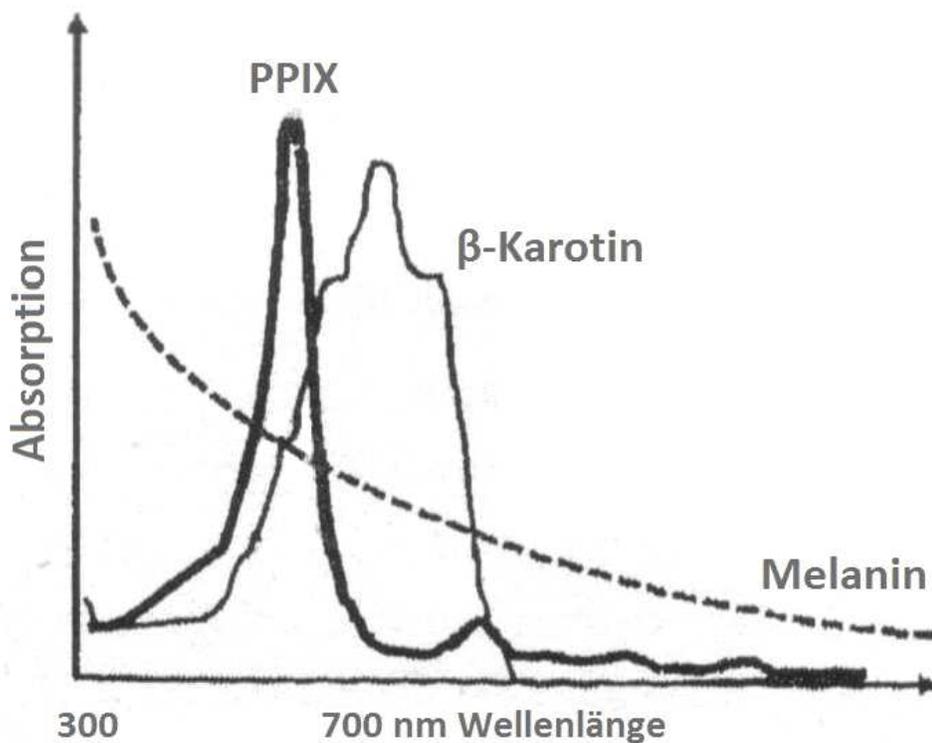


Abb. 43: Absorptionsspektren von PPIX, Melanin und β -Carotin. Modifiziert nach Minder et al. (185)

Ascorbinsäure und Trolox hingegen sind hydrophile Agenzien und interagieren mit dem lipophilen PPIX nicht so effektiv wie Melanin und β -Carotin (s.o.).

Eine weitere Erklärung für ungleiche photoprotektive Kapazitäten der o.g. Agenzien könnte in der unterschiedlich ausgeprägten Fähigkeit zur inneren Umwandlung von Energie liegen. Diese bezeichnet die Fähigkeit eines Moleküls, schädigende UV-Strahlung in thermische Energie umzuwandeln (186).

Melanine sind in der Lage, die absorbierte Photonenenergie in einer extrem kurzen Zeitspanne von ungefähr 100 fs in thermische Energie zu transformieren. Dadurch wird die durch Lichtabsorption entstandene Photonenenergie effektiv in Wärme umgewandelt, wodurch mögliche lichtinduzierte Schäden verhindert werden können. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Studien zur Photoprotektion von Melanin gegenüber UV-induzierten Schäden (187). β -Carotin hingegen konvertiert Photonenenergie in thermische Energie deutlich langsamer (188). Dies könnte ebenfalls eine Ursache für die unterschiedliche Effizienz der beiden Agenzien sein.

Da Ascorbinsäure und Trolox nicht als absorbierende Pigmente gelten, wird hier eine Diskussion über deren Fähigkeit zur inneren Umwandlung von Lichtenergie hinfällig.

Die Art bzw. Intensivität der Hautpigmentierung wird nicht nur durch die Lokalisation der melaninproduzierenden Melanozyten determiniert, sondern auch durch den Typ und durch die Menge der Melanine, die synthetisiert werden. Melanozyten stellen Melanin in membrangebundenen Organellen (Melanosomen) her und geben diese auch an benachbarte Keratinozyten ab, welche sie an die Hautoberfläche tragen. Daher ist das Interaktionsverhältnis zwischen Melanozyten und Keratinozyten von großer Relevanz und bestimmt das Distributionsmuster sowie die photoprotektive Kapazität der jeweiligen Hautbereiche. Tadokoro et al. konnten zeigen, dass nicht nur die absolute Menge von Melanin in der Haut von entscheidender Bedeutung ist, sondern auch das Distributionsmuster. In Untersuchungen, in denen Vergleiche zwischen dunkelhäutigen und hellhäutigen Personen angestellt wurden, konnten beispielsweise bei einem Versuchspaar 20-fache Konzentrationsunterschiede im visuell determinierten Melaningehalt festgestellt werden. Der absolute Melaningehalt unterschied sich jedoch nur um den Faktor sieben (189). Es wird vermutet, dass diese Diskrepanz durch das Verteilungsmuster zustande kommt: In der Haut von Dunkelhäutigen herrscht eine weitaus stärkere Dispersion der Pigmente, bei den Hellhäutigen liegen die Melanosomen hingegen in Clustern vor (190). Darüber hinaus sind Melanosomen in der Haut von Dunkelhäutigen gegenüber der Degradation durch lysosomale Enzyme resistent (191) und setzen sich als supranukleäre Kappen auf Keratinozyten und Melanozyten, wodurch sie ebenfalls zur Photoprotektion beitragen (192).

Das Interaktionsverhältnis zwischen Melanozyten und Keratinozyten wird auch als Melanozyten/Keratinozyten-Komplex bezeichnet. Dieser stellt in Säugetieren ein interaktives Milieu dar, das relativ schnell auf äußere Stimuli in parakriner oder autokriner Weise reagiert (193). UV-Strahlung, α -MSH, Endotheline und diverse Wachstumsfaktoren sowie Zytokine stellen dabei wichtige Einflussfaktoren dar (143,194).

4.6 α -MSH-Analoga

Vor mehr als drei Jahrzehnten wurde ein α -MSH-Analogen mit der Bezeichnung [Nle⁴-D-Phe⁷]- α -MSH erstmals synthetisch hergestellt. Dieses potente Melanocortin besteht aus 13 Aminosäuren und ist durch gezielte Veränderungen seiner chemischen Struktur wesentlich wirksamer als die natürliche Variante. Bedingt wird dies durch eine gegenüber α -MSH verlängerte Halbwertszeit und eine deutlich stärkere Bindung zu MC1R. Letzterer regt hauptsächlich die Eumelanin-Produktion durch eine Induktion der Tyrosinase an (139).

Eine Studie aus dem Jahre 1991 zeigt auf, dass die subkutane Injektion von α -MSH-Analoga die Hautpigmentierung erhöht (195). Eine Expression von photoprotektivem Eumelanin konnte bei gesunden Probanden bestimmt werden. Dieser Effekt wurde trotz einer minimalen Sonnenexposition der Probanden sowie der Applikation von *Sunscreens* beobachtet. Dabei waren sowohl die typischen sonnenexponierten Hautareale als auch die mit Kleidung bedeckten Bereiche betroffen (196). Interessanterweise war dieser Effekt besonders bei Probanden mit einem hellen Hauttyp zu beobachten. Bei diesen traten im Vergleich zur Placebogruppe geringere Schäden durch UV-Strahlung auf (197).

Wie schon von Harms et al. angenommen, lässt sich diese Wirkung vermutlich bei der EPP-Therapie nutzen. Dabei spielt nicht nur eine verminderte Penetration von UV-Licht durch erhöhte Melanin-Werte eine Rolle. α -MSH-Analoga besitzen zusätzlich antioxidative, anti-entzündliche und immunmodulatorische Eigenschaften (198). Für das α -MSH-Analogen Afamelanotid (Scenesse®) wurde die klinische Testphase III in mehreren europäischen Ländern bereits abgeschlossen (9).

EPP-Patienten, besonders Kinder und junge Erwachsene, stehen unter einem erheblichen Leidensdruck (199). Eine kausale Therapie konnte, bis auf einige Gentherapie-Versuche im Tiermodell (200,201), für den Menschen noch nicht evaluiert werden. Knochenmarktransplantationen sind zwar von kurativem Charakter, bergen jedoch hohe Risiken und können bei EPP-Patienten mit Leberversagen oder anderen Begleiterkrankungen wie Leukämien nicht in Betracht gezogen werden (202,203).

Im PHET wurden daher einige in der Literatur beschriebene Therapieoptionen getestet und, soweit möglich, miteinander verglichen. Zusammenfassend kann zunächst festgestellt werden,

dass die Einzelapplikation der Agenzien Ascorbinsäure, Trolox und β -Carotin in der Therapie der EPP zwar als nicht ausreichend erscheint, jedoch eine schon in der Literatur beschriebene Dreifach-Kombination hilfreich sein könnte (151).

Bezüglich der Lichttoleranz in der EPP stellte sich eine vorsichtig angesetzte UV-B-Therapie in der Praxis als effektiv heraus. Dieser Effekt kann einerseits durch eine Induktion von Melanin-Pigmenten in der Haut sowie durch eine Verdickung der Epidermis („*skin hardening*“) erklärt werden. Dadurch wird zwar die Penetration von UV-Strahlung vermindert, allerdings können Erytheme als Nebenwirkung auftreten (57,58).

Ein ähnlicher Effekt wird auch bei der Applikation von synthetischem α -MSH (Afamelanotid) beobachtet und sollte bei der Therapie der EPP unbedingt in Betracht gezogen werden. Nach aktuellen Studienergebnissen hat Afamelanotid signifikante photoprotektive Wirkungen bei zahlreichen Lichtdermatosen (204). Bei der durch das synthetische Hormon induzierten verstärkten Hautbräunung ohne vorherige Insolation kann ein Strahlenschaden durch eine normalerweise notwendige Bestrahlung mit UV-Licht vermieden werden. Ein EPP-Patient ist zudem aufgrund der beträchtlichen Beschwerden gar nicht in der Lage, einer derartigen Bestrahlung für eine therapeutisch ausschlaggebende Zeitspanne ausgesetzt zu sein.

Die durch das synthetische Hormon hervorgerufene Hautbräunung verhindert nicht ganz, dass Krankheitssymptome auftreten, sie verlängert aber die Zeitspanne, die eine von EPP betroffene Person relativ problemlos in der Sonne verbringen kann. Das vergrößerte Zeitfenster bedeutet für die Patienten einen enormen Zuwachs an Lebensqualität.

Unsere Ergebnisse von Melanin im PHET stützen den therapeutischen Effekt von Afamelanotid in seiner Eigenschaft als Melanin-Induktor. Somit kann zusammenfassend postuliert werden, dass Afamelanotid möglicherweise eine sinnvolle Therapieoption bei der EPP und auch bei anderen Photodermatosen darstellen kann.

5 Literaturverzeichnis

1. Puy H, Gouya L, Deybach J-C. Porphyrrias. *Lancet*. 2010;375(9718):924–37.
2. Frank J, Poblete-Gutiérrez P. Hereditary metabolic diseases with cutaneous manifestations : An update. *Hautarzt*. 2011;62(2):98–106.
3. Gouya L, Puy H, Robreau A-M, Bourgeois M, Lamoril J, Da Silva V, u. a. The penetrance of dominant erythropoietic protoporphyria is modulated by expression of wildtype FECH. *Nat Genet*. 2002;30(1):27–8.
4. Frank J, Poblete-Gutiérrez P. Delayed diagnosis and diminished quality of life in erythropoietic protoporphyria: results of a cross-sectional study in Sweden. *J Intern Med*. 2011;269(3):270–4.
5. Nakamura T, Saito M, Shimada Y, Fukaya H, Shida Y, Tokuji Y. Induction of aminolevulinic acid synthase gene expression and enhancement of metabolite, protoporphyrin IX, excretion by organic germanium. *Eur J Pharmacol*. 25. 2011;653(1-3):75–81.
6. Stölzel U, Stauch T, Doss MO. Porphyrrias. *Internist*. 2010;51(12):1525–33.
7. Van Serooskerken A-M van T, Poblete-Gutiérrez P, Frank J. The porphyrias: clinic, diagnostics, novel investigative tools and evolving molecular therapeutic strategies. *Skin Pharmacol Physiol*. 2010;23(1):18–28.
8. Casanova-González MJ, Trapero-Marugán M, Jones EA, Moreno-Otero R. Liver disease and erythropoietic protoporphyria: a concise review. *World J Gastroenterol WJG*. 2010;16(36):4526–31.
9. Minder EI, Schneider-Yin X, Steurer J, Bachmann LM. A systematic review of treatment options for dermal photosensitivity in erythropoietic protoporphyria. *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr*. 2009;55(1):84–97.
10. Mathews-Roth MM, Pathak MA, Fitzpatrick TB, Harber LH, Kass EH. Beta carotene therapy for erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. *Arch Dermatol*. 1977;113(9):1229–32.
11. Stahl W, Sies H. Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2002;15(5):291–6.
12. Bayerl C. Beta-carotene in dermatology: Does it help? *Acta Dermatovenerol Alp Panon Adriat*. 2008;17(4):160–2, 164–6.
13. Kobza A, Ramsay CA, Magnus IA. Oral carotene therapy in actinic reticuloid and solar urticaria. Failure to demonstrate a photoprotective effect against long wave ultraviolet and visible radiation. *Br J Dermatol*. 1973;88(2):157–66.

14. Wennersten G. Carotenoid treatment for light sensitivity: a reappraisal and six years' experience. *Acta Derm Venereol.* 1980;60(3):251–5.
15. Mathews-Roth MM, Pathak UA, Fitzpatrick TB, Harber LC, Kass EH. Beta-carotene as an oral photoprotective agent in erythropoietic protoporphyria. *JAMA J Am Med Assoc.* 1974;228(8):1004–8.
16. Lecluse ALY, Kuck-Koot VCM, van Weelden H, Sigurdsson V, Russel IM, Frank J, u. a. Erythropoietic protoporphyria without skin symptoms-you do not always see what they feel. *Eur J Pediatr.* 2008;167(6):703–6.
17. Roelandts R. Photo(chemo)therapy and general management of erythropoietic protoporphyria. *Dermatol Basel Switz.* 1995;190(4):330–1.
18. Plewig G, Hofmann C, Braun-Falco O, Nath G, Kreitmair A. A new apparatus for the delivery of high intensity UVA and UVA+UVB irradiation, and some dermatological applications. *Br J Dermatol.* 1978;98(1):15–24.
19. Neumann NJ, Hanneken S, Ruzicka T, Lehmann P. Phototoxicity of exogenous protoporphyrin IX and delta-aminolevulinic acid in the photo hen's egg test. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2004;20(5):224–9.
20. Neumann NJ, Hölzle E, Lehmann P, Rosenbruch M, Klauic A, Plewig G. Photo hen's egg test: a model for phototoxicity. *Br J Dermatol.* 1997;136(3):326–30.
21. Neumann NJ, Hölzle E, Wallerand M, Vierbaum S, Ruzicka T, Lehmann P. The photoprotective effect of ascorbic acid, acetylsalicylic acid, and indomethacin evaluated by the photo hen's egg test. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1999;15(5):166–70.
22. Harms J, Lautenschlager S, Minder CE, Minder EI. An alpha-melanocyte-stimulating hormone analogue in erythropoietic protoporphyria. *N Engl J Med.* 2009;360(3):306–7.
23. Layer G, Reichelt J, Jahn D, Heinz DW. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Sci Publ Protein Soc.* 2010;19(6):1137–61.
24. Kosenow W, Treibs A. Light hypersensitivity and porphyrinemia. *Z Für Kinderheilkd.* 1953;73(1):82–92.
25. Michaels BD, Del Rosso JQ, Mobini N, Michaels JR. Erythropoietic protoporphyria: a case report and literature review. *J Clin Aesthetic Dermatol.* 2010;3(7):44–8.
26. Todd DJ. Erythropoietic protoporphyria. *Br J Dermatol.* 1994;131(6):751–66.
27. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin: IX: Basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B.* 1990;6(1–2):143–8.
28. Szeimies R-M, Calzavara-Pinton P, Karrer S, Ortel B, Landthaler M. Topical photodynamic therapy in dermatology. *J Photochem Photobiol B.* 1996;36(2):213–9.

29. Piomelli S, Lamola AA, Poh-Fitzpatrick MF, Seaman C, Harber LC. Erythropoietic protoporphyria and lead intoxication: the molecular basis for difference in cutaneous photosensitivity. I. Different rates of disappearance of protoporphyrin from the erythrocytes, both in vivo and in vitro. *J Clin Invest.* 1975;56(6):1519–27.
30. Brun A, Western A, Malik Z, Sandberg S. Erythropoietic protoporphyria: photodynamic transfer of protoporphyrin from intact erythrocytes to other cells. *Photochem Photobiol.* 1990;51(5):573–7.
31. Afonso SG, Enríquez de Salamanca R, Batlle AM. The photodynamic and non-photodynamic actions of porphyrins. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al.* 1999;32(3):255–66.
32. Ibrahim GW, Watson CJ. Enterohepatic circulation and conversion of protoporphyrin to bile pigment in man. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* 1968;127(3):890–5.
33. Ogilby PR. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chem Soc Rev.* 2010;39(8):3181–209.
34. Liu B, Farrell TJ, Patterson MS. A dynamic model for ALA-PDT of skin: simulation of temporal and spatial distributions of ground-state oxygen, photosensitizer and singlet oxygen. *Phys Med Biol.* 2010;55(19):5913–32.
35. Goldstein BD, Harber LC. Erythropoietic protoporphyria: lipid peroxidation and red cell membrane damage associated with photohemolysis. *J Clin Invest.* 1972;51(4):892–902.
36. Bagdonas S, Ma LW, Iani V, Rotomskis R, Juzenas P, Moan J. Phototransformations of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in vitro: a spectroscopic study. *Photochem Photobiol.* 2000;72(2):186–92.
37. Yano S, Hirohara S, Obata M, Hagiya Y, Ogura S, Ikeda A, u. a. Current states and future views in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev.* 2011;12(1):46–67.
38. Tegos G, Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, u. a. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Fungi Their Interact.* 2012;3:120.
39. Kim CH, Chung C-W, Choi KH, Yoo J-J, Kim DH, Jeong Y-I, u. a. Effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy via reactive oxygen species in human cholangiocarcinoma cells. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:1357–63.
40. Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE, u. a. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer.* 1997;79(12):2282–308.

41. Kennedy JC, Marcus SL, Pottier RH. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results. *J Clin Laser Med Surg.* 1996;14(5):289–304.
42. Lim HW. Mechanisms of phototoxicity in porphyria cutanea tarda and erythropoietic protoporphyria. *Immunol Ser.* 1989;46:671–85.
43. Schnait FG, Wolff K, Konrad K. Erythropoietic protoporphyria--submicroscopic events during the acute photosensitivity flare. *Br J Dermatol.* 1975;92(5):545–57.
44. Fuchs J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and beta-carotene in cutaneous photoprotection. *Free Radic Biol Med.* 1998;25(7):848–73.
45. Frank J, Poblete-Gutiérrez P. Valuable insights from molecular genetic studies in the porphyrias. *Br J Dermatol.* 2010;162(3):470–1.
46. Lecha M. Erythropoietic protoporphyria. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2003;19(3):142–6.
47. Neumann NJ, Lehmann P. *Photodermatosen. Ein Leitfaden zur Diagnostik.* 1. Aufl. Steinkopff-Verlag Darmstadt; 2000.
48. Wahlin S, Srikanthan N, Hamre B, Harper P, Brun A. Protection from phototoxic injury during surgery and endoscopy in erythropoietic protoporphyria. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* 2008;14(9):1340–6.
49. Diffey BL, Farr PM. Sunscreen protection against UVB, UVA and blue light: an in vivo and in vitro comparison. *Br J Dermatol.* 1991;124(3):258–63.
50. Rosen CF. Topical and systemic photoprotection. *Dermatol Ther.* 2003;16(1):8–15.
51. Spelt JMC, de Rooij FWM, Wilson JHP, Zandbergen AAM. Vitamin D deficiency in patients with erythropoietic protoporphyria. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33 Suppl 3:S1–4.
52. Yoo DJ, Lee HC, Yu E, Jin YJ, Shim JH, Kim KM, u. a. Cholestyramine resin for erythropoietic protoporphyria with severe hepatic disease: a case report. *Korean J Hepatol.* 2010;16(1):83–8.
53. Boffa MJ, Ead RD, Reed P, Weinkove C. A double-blind, placebo-controlled, crossover trial of oral vitamin C in erythropoietic protoporphyria. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1996;12(1):27–30.
54. Johnson JA, Fusaro RM. Possible use of vitamins C and-or E in erythropoietic protoporphyria. *JAMA J Am Med Assoc.* 1973;224(6):901–2.
55. Dreher F, Maibach H. Protective effects of topical antioxidants in humans. *Curr Probl Dermatol.* 2001;29:157–64.

56. Warren LJ, George S. Erythropoietic protoporphyria treated with narrow-band (TL-01) UVB phototherapy. *Australas J Dermatol*. 1998;39(3):179–82.
57. Murphy GM, Hawk JLM. Erythropoietic protoporphyria advances today, with a special tribute to the late Professor Ian Magnus. *Br J Dermatol*. 2006;155(3):501–3.
58. Collins P, Ferguson J. Narrow-band UVB (TL-01) phototherapy: an effective preventative treatment for the photodermatoses. *Br J Dermatol*. 1995;132(6):956–63.
59. Nowis D, Makowski M, Stokłosa T, Legat M, Issat T, Gołab J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol*. 2005;52(2):339–52.
60. Tyrrell J, Campbell SM, Curnow A. The effect of air cooling pain relief on protoporphyrin IX photobleaching and clinical efficacy during dermatological photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2011;103(1):1–7.
61. Epstein JH. Phototoxicity and photoallergy. *Semin Cutan Med Surg*. 1999;18(4):274–84.
62. Nigen S, Knowles SR, Shear NH. Drug eruptions: approaching the diagnosis of drug-induced skin diseases. *J Drugs Dermatol JDD*. 2003;2(3):278–99.
63. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. 1996;273(5271):59–63.
64. Darr D, Fridovich I. Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol*. 1994;102(5):671–5.
65. Pospíšil P. Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1817(1):218–31
66. Stahl W, Sies H. Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;691:10–9.
67. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem*. 2007;18(9):567–79.
68. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997;82(2):291–5.
69. Maeda Y, Inoguchi T. [Oxidative stress]. *Nihon Rinsho Jpn J Clin Med*. 2010;68(5):814–8.
70. Müller T, Muhlack S. Cysteinyl-glycine reduction as marker for levodopa-induced oxidative stress in Parkinson's disease patients. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc*. 2011;26(3):543–6.
71. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010;107(9):1058–70.
72. Sawyer DB. Oxidative stress in heart failure: what are we missing? *Am J Med Sci*. 2011;342(2):120–4.

73. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res.* 2011;711(1-2):193–201.
74. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 1999;31(4):261–72.
75. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004;44(4):275–95.
76. Dolashka-Angelova P, Angelova M, Genova L, Stoeva S, Voelter W. A novel Cu,Zn superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 110: isolation and physico-chemical characterization. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 1999;55A(11):2249–60.
77. Zamocky M, Furtmüller PG, Obinger C. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(9):1527–48.
78. Harington CR, Mead TH. Synthesis of glutathione. *Biochem J.* 1935;29(7):1602–11.
79. Aslund F, Berndt KD, Holmgren A. Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *J Biol Chem.* 1997;272(49):30780–6.
80. Chen L, Hu JY, Wang SQ. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. *J Am Acad Dermatol.* 2012;67(5):1013–24.
81. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med.* 1999;26(7-8):1034–53.
82. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1–40.
83. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr.* 2005;135(5):969–72.
84. Ochiai Y, Kaburagi S, Obayashi K, Ujiie N, Hashimoto S, Okano Y, u. a. A new lipophilic pro-vitamin C, tetra-isopalmitoyl ascorbic acid (VC-IP), prevents UV-induced skin pigmentation through its anti-oxidative properties. *J Dermatol Sci.* 2006;44(1):37–44.
85. Mandl J, Szarka A, Bánhegyi G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol.* 2009;157(7):1097–110.
86. Myllylä R, Majamaa K, Günzler V, Hanauske-Abel HM, Kivirikko KI. Ascorbate is consumed stoichiometrically in the uncoupled reactions catalyzed by prolyl 4-hydroxylase and lysyl hydroxylase. *J Biol Chem.* 1984;259(9):5403–5.
87. Hurrell R, Egli I. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(5):1461S – 1467S.

88. Heller R, Unbehaun A, Schellenberg B, Mayer B, Werner-Felmayer G, Werner ER. L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem.* 2001;276(1):40–7.
89. Lutsenko EA, Cárcamo JM, Golde DW. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *J Biol Chem.* 2002;277(19):16895–9.
90. Placzek M, Gaube S, Kerkmann U, Gilbertz K-P, Herzinger T, Haen E, u. a. Ultraviolet B-induced DNA damage in human epidermis is modified by the antioxidants ascorbic acid and D-alpha-tocopherol. *J Invest Dermatol.* 2005;124(2):304–7.
91. Moison RMW, Beijersbergen van Henegouwen GMJ. Topical antioxidant vitamins C and E prevent UVB-radiation-induced peroxidation of eicosapentaenoic acid in pig skin. *Radiat Res.* 2002;157(4):402–9.
92. Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(16):6377–81.
93. Farris PK. Topical vitamin C: a useful agent for treating photoaging and other dermatologic conditions. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al.* 2005;31(7 Pt 2):814–7.
94. Huh C-H, Seo K-I, Park J-Y, Lim J-G, Eun H-C, Park K-C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of vitamin C iontophoresis in melasma. *Dermatol Basel Switz.* 2003;206(4):316–20.
95. Cohn W. Bioavailability of vitamin E. *Eur J Clin Nutr.* 1997;51 Suppl 1:S80–5.
96. Kelly FJ. Use of antioxidants in the prevention and treatment of disease. *J Int Fed Clin Chem IFCC.* 1998;10(1):21–3.
97. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet.* 1996;347(9004):781–6.
98. Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. *Circulation.* 2000;102(1):82–7.
99. De Nigris F, Franconi F, Maida I, Palumbo G, Anania V, Napoli C. Modulation by alpha- and gamma-tocopherol and oxidized low-density lipoprotein of apoptotic signaling in human coronary smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol.* 2000;59(11):1477–87.
100. Thiele JJ, Traber MG, Packer L. Depletion of human stratum corneum vitamin E: an early and sensitive in vivo marker of UV induced photo-oxidation. *J Invest Dermatol.* 1998;110(5):756–61.

101. Darr D, Dunston S, Faust H, Pinnell S. Effectiveness of antioxidants (vitamin C and E) with and without sunscreens as topical photoprotectants. *Acta Derm Venereol.* 1996;76(4):264–8.
102. Lin J-Y, Selim MA, Shea CR, Grichnik JM, Omar MM, Monteiro-Riviere NA, u. a. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48(6):866–74.
103. Yuen KS, Halliday GM. alpha-Tocopherol, an inhibitor of epidermal lipid peroxidation, prevents ultraviolet radiation from suppressing the skin immune system. *Photochem Photobiol.* 1997;65(3):587–92.
104. Bissett DL, Chatterjee R, Hannon DP. Photoprotective effect of topical anti-inflammatory agents against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1990;7(4):153–8.
105. Burke KE, Clive J, Combs GF Jr, Commisso J, Keen CL, Nakamura RM. Effects of topical and oral vitamin E on pigmentation and skin cancer induced by ultraviolet irradiation in Skh:2 hairless mice. *Nutr Cancer.* 2000;38(1):87–97.
106. Murray JC, Burch JA, Streilein RD, Iannacchione MA, Hall RP, Pinnell SR. A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. *J Am Acad Dermatol.* 2008;59(3):418–25.
107. Black HS. Interaction of ascorbic acid and tocopherol on beta-carotene modulated carcinogenesis. *Hemoglobin.* 2010;34(3):284–90.
108. Werninghaus K, Meydani M, Bhawan J, Margolis R, Blumberg JB, Gilchrist BA. Evaluation of the photoprotective effect of oral vitamin E supplementation. *Arch Dermatol.* 1994;130(10):1257–61.
109. McArdle F, Rhodes LE, Parslew RAG, Close GL, Jack CIA, Friedmann PS, u. a. Effects of oral vitamin E and beta-carotene supplementation on ultraviolet radiation-induced oxidative stress in human skin. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(5):1270–5.
110. Sies H, Stahl W. Carotenoids and UV protection. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol.* 2004;3(8):749–52.
111. Mayne ST. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1996;10(7):690–701.
112. Aust O, Sies H, Stahl W, Polidori MC. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. *J Chromatogr A.* 30. 2001;936(1-2):83–93.
113. Sakurai H, Yasui H, Yamada Y, Nishimura H, Shigemoto M. Detection of reactive oxygen species in the skin of live mice and rats exposed to UVA light: a research review on chemiluminescence and trials for UVA protection. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol.* 2005;4(9):715–20.

114. Stahl W, Sies H. Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. *Mol Biotechnol.* 2007;37(1):26–30.
115. Köpcke W, Krutmann J. Protection from sunburn with beta-Carotene--a meta-analysis. *Photochem Photobiol.* 2008;84(2):284–8.
116. Camera E, Mastrofrancesco A, Fabbri C, Daubrawa F, Picardo M, Sies H, u. a. Astaxanthin, canthaxanthin and beta-carotene differently affect UVA-induced oxidative damage and expression of oxidative stress-responsive enzymes. *Exp Dermatol.* 2009;18(3):222–31.
117. Young AJ, Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys.* 2001;385(1):20–7.
118. El-Agamey A, Lowe GM, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG, u. a. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys.* 2004;430(1):37–48.
119. Biesalski HK, Obermueller-Jevic UC. UV light, beta-carotene and human skin--beneficial and potentially harmful effects. *Arch Biochem Biophys.* 2001;389(1):1–6.
120. Blagojevic D, Schenk T, Haas O, Zierhofer B, Konnaris C, Trautinger F. Acquired erythropoietic protoporphyria. *Ann Hematol.* 2010;89(7):743–4.
121. Kanofsky JR, Sima PD. Activity of a cationic carotenoid derivative in a mouse model of protoporphyria. *J Photochem Photobiol B.* 2007;87(2):124–9.
122. Mathews-Roth MM. Carotenoids in erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;691:127–38.
123. Holme SA, Anstey AV, Finlay AY, Elder GH, Badminton MN. Erythropoietic protoporphyria in the U.K.: clinical features and effect on quality of life. *Br J Dermatol.* 2006;155(3):574–81.
124. Kollias N, Sayre RM, Zeise L, Chedekel MR. Photoprotection by melanin. *J Photochem Photobiol B.* 1991;9(2):135–60.
125. Prota G. The chemistry of melanins and melanogenesis. *Fortschritte Chem Org Naturstoffe Prog Chem Org Nat Prod Prog Dans Chim Subst Org Nat.* 1995;64:93–148.
126. Ito S. The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. *Pigment Cell Res Spons Eur Soc Pigment Cell Res Int Pigment Cell Soc.* 2003;16(3):230–6.
127. Ito S. Reexamination of the structure of eumelanin. *Biochim Biophys Acta.* 1986;883(1):155–61.
128. Nofsinger JB, Forest SE, Eibest LM, Gold KA, Simon JD. Probing the building blocks of eumelanins using scanning electron microscopy. *Pigment Cell Res Spons Eur Soc Pigment Cell Res Int Pigment Cell Soc.* 2000;13(3):179–84.

129. Meredith P, Sarna T. The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigment Cell Res Spons Eur Soc Pigment Cell Res Int Pigment Cell Soc.* 2006;19(6):572–94.
130. Swan GA. Structure, chemistry, and biosynthesis of the melanins. *Fortschritte Chem Org Naturstoffe Prog Chem Org Nat Prod Prog Dans Chim Subst Org Nat.* 1974;31(0):521–82.
131. Nofsinger JB, Liu Y, Simon JD. Aggregation of eumelanin mitigates photogeneration of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2002;32(8):720–30.
132. D' Ischia M, Napolitano A, Pezzella A, Meredith P, Sarna T. Chemical and structural diversity in eumelanins: unexplored bio-optoelectronic materials. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(22):3914–21.
133. Rees JL. Genetics of hair and skin color. *Annu Rev Genet.* 2003;37:67–90.
134. Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet.* 1995;11(3):328–30.
135. Rouzaud F, Kadarko AL, Abdel-Malek ZA, Hearing VJ. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. *Mutat Res.* 2005;571(1-2):133–52.
136. Gantz I, Fong TM. The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(3):E468–74.
137. Song X, Mosby N, Yang J, Xu A, Abdel-Malek Z, Kadarko AL. alpha-MSH activates immediate defense responses to UV-induced oxidative stress in human melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22(6):809–18.
138. Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, u. a. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell.* 2007;128(5):853–64.
139. Gilchrist BA, Park HY, Eller MS, Yaar M. Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem Photobiol.* 1996;63(1):1–10.
140. Barsh G, Attardi LD. A healthy tan? *N Engl J Med.* 2007;356(21):2208–10.
141. April CS, Barsh GS. Distinct pigmentary and melanocortin 1 receptor-dependent components of cutaneous defense against ultraviolet radiation. *PLoS Genet.* 2007;3(1):e9.
142. Robinson S, Dixon S, August S, Diffey B, Wakamatsu K, Ito S, u. a. Protection against UVR involves MC1R-mediated non-pigmentary and pigmentary mechanisms in vivo. *J Invest Dermatol.* 2010;130(7):1904–13.
143. Abdel-Malek ZA, Ruwe A, Kavanagh-Starner R, Kadarko AL, Swope V, Haskell-Luevano C, u. a. alpha-MSH tripeptide analogs activate the melanocortin 1 receptor and reduce UV-induced DNA damage in human melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22(5):635–44.

144. Dong L, Wen J, Pier E, Zhang X, Zhang B, Dong F, u. a. Melanocyte-stimulating hormone directly enhances UV-Induced DNA repair in keratinocytes by a xeroderma pigmentosum group A-dependent mechanism. *Cancer Res.* 2010;70(9):3547–56.
145. Kokot A, Metze D, Mouchet N, Galibert M-D, Schiller M, Luger TA, u. a. Alpha-melanocyte-stimulating hormone counteracts the suppressive effect of UVB on Nrf2 and Nrf-dependent gene expression in human skin. *Endocrinology.* 2009;150(7):3197–206.
146. Sawyer TK, Sanfilippo PJ, Hruba VJ, Engel MH, Heward CB, Burnett JB, u. a. 4-Norleucine, 7-D-phenylalanine-alpha-melanocyte-stimulating hormone: a highly potent alpha-melanotropin with ultralong biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(10):5754–8.
147. Fitzgerald LM, Fryer JL, Dwyer T, Humphrey SM. Effect of Melanotan, [Nle(4), D-Phe(7)]-alpha-MSH, on melanin synthesis in humans with MC1R variant alleles. *Peptides.* 2006;27(2):388–94.
148. Schallreuter KU, Kothari S, Chavan B, Spencer JD. Regulation of melanogenesis--controversies and new concepts. *Exp Dermatol.* 2008;17(5):395–404.
149. Rosenbruch M. Toxicity studies of the incubated chicken egg. With special reference to the extra-embryonal vascular systems. *Dermatosen Beruf Umw Occup Environ.* 1990;38(1):5–11.
150. Bafteh PR, Siegesmund M, Hanneken S, Neumann NJ. Protective effects of β -carotene and melanin against protoporphyrin IX-induced phototoxicity in the photo hen's egg test. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2012;28(1):12–6.
- 150a. Bafteh PR, Siegesmund M, Kuerten V, Neumann NJ. Phototoxicity of narrowband ultraviolet (UV) B (311 nm) compared with broadband UVB in the photo hen's egg test. *Br J Dermatol.* 2015;172(2):462-6.
151. Böhm F, Edge R, Foley S, Lange L, Truscott TG. Antioxidant inhibition of porphyrin-induced cellular phototoxicity. *J Photochem Photobiol B.* 2001;65(2-3):177–83.
152. Emri S, Kilickap S, Kadilar C, Halil MG, Akay H, Besler T. Serum levels of alpha-tocopherol, vitamin C, beta-carotene, and retinol in malignant pleural mesothelioma. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2012;13(7):3025–9.
153. Breidenassel C, Valtueña J, González-Gross M, Benser J, Spinneker A, Moreno LA, u. a. Antioxidant Vitamin Status (A, E, C, and Beta-Carotene) in European Adolescents - The HELENA Study. *Int J Vitam Nutr Res.* 2011;81(4):245–55.
154. Dauchet L, Péneau S, Bertrais S, Vergnaud AC, Estaquio C, Kesse-Guyot E, u. a. Relationships between different types of fruit and vegetable consumption and serum concentrations of antioxidant vitamins. *Br J Nutr.* 2008;100(03):633–41.

155. Fischer-Nielsen A, Loft S, Jensen KG. Effect of ascorbate and 5-aminosalicylic acid on light-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation in V79 Chinese hamster cells. *Carcinogenesis*. 1993;14(11):2431–3.
156. Stewart MS, Cameron GS, Pence BC. Antioxidant nutrients protect against UVB-induced oxidative damage to DNA of mouse keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol*. 1996;106(5):1086–9.
157. Darr D, Combs S, Dunston S, Manning T, Pinnell S. Topical vitamin C protects porcine skin from ultraviolet radiation-induced damage. *Br J Dermatol*. 1992;127(3):247–53.
158. Yoshikawa Y, Hizume K, Oda Y, Takeyasu K, Araki S, Yoshikawa K. Protective effect of vitamin C against double-strand breaks in reconstituted chromatin visualized by single-molecule observation. *Biophys J*. 2006;90(3):993–9.
159. Halliwell B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res*. 1996;25(5):439–54.
160. Jayasinghe C, Gotoh N, Wada S. Pro-oxidant/antioxidant behaviours of ascorbic acid, tocopherol, and plant extracts in n-3 highly unsaturated fatty acid rich oil-in-water emulsions. *Food Chem*. 2013;141(3):3077–84.
161. Paolini M, Pozzetti L, Pedulli GF, Marchesi E, Cantelli-Forti G. The nature of prooxidant activity of vitamin C. *Life Sci*. 1999;64(23):PL 273–8.
162. Eberlein-König B, Placzek M, Przybilla B. Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and d-alpha-tocopherol (vitamin E). *J Am Acad Dermatol*. 1998;38(1):45–8.
163. Ishikawa Y, Hashizume K, Kishimoto S, Tezuka Y, Nishigori H, Yamamoto N, et al. Effect of vitamin C depletion on UVR-B induced cataract in SMP30/GNL knockout mice. *Exp Eye Res*. 2012;94(1):85–9.
164. Sinclair PR, Gorman N, Walton HS, Bement WJ, Jacobs JM, Sinclair JF. Ascorbic acid inhibition of cytochrome P450-catalyzed uroporphyrin accumulation. *Arch Biochem Biophys*. 1993;304(2):464–70.
165. Sinclair PR, Gorman N, Sinclair JF, Walton HS, Bement WJ, Lambrecht RW. Ascorbic acid inhibits chemically induced uroporphyrin in ascorbate-requiring rats. *Hepatology*. 1995;22(2):565–72.
166. Trevithick JR, Xiong H, Lee S, Shum DT, Sanford SE, Karlik SJ, Norley C, et al. Topical tocopherol acetate reduces post-UVB, sunburn-associated erythema, edema, and skin sensitivity in hairless mice. *Arch Biochem Biophys*. 1992;296(2):575–82.
167. Kondo S, Mamada A, Yamaguchi J, Fukuro S. Protective effect of dl-alpha-tocopherol on the cytotoxicity of ultraviolet B against human skin fibroblasts in vitro. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1990;7(4):173–7.

168. Lopez-Torres M, Thiele JJ, Shindo Y, Han D, Packer L. Topical application of alpha-tocopherol modulates the antioxidant network and diminishes ultraviolet-induced oxidative damage in murine skin. *Br J Dermatol.* 1998;138(2):207–15.
169. Jurkiewicz BA, Bissett DL, Buettner GR. Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin. *J Invest Dermatol.* 1995;104(4):484–8.
170. Steenvoorden DP, Beijersbergen van Henegouwen G. Protection against UV-induced systemic immunosuppression in mice by a single topical application of the antioxidant vitamins C and E. *Int J Radiat Biol.* 1999;75(6):747–55.
171. Ingold KU, Webb AC, Witter D, Burton GW, Metcalfe TA, Muller DP. Vitamin E remains the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe vitamin E deficiency. *Arch Biochem Biophys.* 1987;259(1):224–5.
172. Traber MG. Vitamin E regulation. *Curr Opin Gastroenterol.* 2005;21(2):223–7.
173. Murr C, Winklhofer-Roob BM, Schroecksnadel K, Maritschnegg M, Mangge H, Böhm BO, u. a. Inverse association between serum concentrations of neopterin and antioxidants in patients with and without angiographic coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2009;202(2):543–9.
174. Sies H, Stahl W. Nutritional protection against skin damage from sunlight. *Annu Rev Nutr.* 2004;24:173–200.
175. Stratton SP, Liebler DC. Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: effect of beta-carotene and alpha-tocopherol. *Biochemistry (Mosc).* 1997;36(42):12911–20.
176. Mathews-Roth MM, Pathak MA, Parrish J, Fitzpatrick TB, Kass EH, Toda K, u. a. A clinical trial of the effects of oral beta-carotene on the responses of human skin to solar radiation. *J Invest Dermatol.* 1972;59(4):349–53.
177. Giles A Jr, Wamer W, Kornhauser A. In vivo protective effect of beta-carotene against psoralen phototoxicity. *Photochem Photobiol.* 1985;41(6):661–6.
178. Mathews-Roth MM. Treatment of erythropoietic protoporphyria with beta-carotene. *Photodermatol.* 1984;1(6):318–21.
179. Corbett MF, Herxheimer A, Magnus IA, Ramsay CA, Kobza-Black A. The long term treatment with beta-carotene in erythropoietic protoporphyria: a controlled trial. *Br J Dermatol.* 1977;97(6):655–62.
180. Wahlin S, Floderus Y, Stål P, Harper P. Erythropoietic protoporphyria in Sweden: demographic, clinical, biochemical and genetic characteristics. *J Intern Med.* 2011;269(3):278–88.

181. Shono S, Imura M, Ota M, Ono S, Toda K. The relationship of skin color, UVB-induced erythema, and melanogenesis. *J Invest Dermatol.* 1985;84(4):265–7.
182. Olson RL, Gaylor J, Everett MA. Skin color, melanin, and erythema. *Arch Dermatol.* 1973;108(4):541–4.
183. Herrling T, Jung K, Fuchs J. The role of melanin as protector against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2008;69(5):1429–35.
184. Korytowski W, Pilas B, Sarna T, Kalyanaraman B. Photoinduced Generation of Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Radicals in Melanins. *Photochem Photobiol.* 1987;45(2):185–90.
185. Minder EI. Afamelanotide, an agonistic analog of α -melanocyte-stimulating hormone, in dermal phototoxicity of erythropoietic protoporphyria. *Expert Opin Investig Drugs.* 2010;19(12):1591–602.
186. Pecourt JM, Peon J, Kohler B. DNA excited-state dynamics: ultrafast internal conversion and vibrational cooling in a series of nucleosides. *J Am Chem Soc.* 2001;123(42):10370–8.
187. Meng S, Kaxiras E. Mechanisms for ultrafast nonradiative relaxation in electronically excited eumelanin constituents. *Biophys J.* 2008;95(9):4396–402.
188. McCamant DW, Kukura P, Mathies RA. Femtosecond Time-Resolved Stimulated Raman Spectroscopy: Application to the Ultrafast Internal Conversion in beta-Carotene. *J Phys Chem A.* 2003;107(40):8208–14.
189. Tadokoro T, Kobayashi N, Zmudzka BZ, Ito S, Wakamatsu K, Yamaguchi Y, u. a. UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2003;17(9):1177–9.
190. Kawamura T, Fitzpatrick TB, Seiji M. The photobiology of melanin pigmentation in human skin. *Biology of Normal and Abnormal Melanocytes.* Baltimore: University Park Press; S. 149–70.
191. Szabó G, Gerald AB, Pathak MA, Fitzpatrick TB. Racial differences in the fate of melanosomes in human epidermis. *Nature.* 1969;222(5198):1081–2.
192. Kobayashi N, Nakagawa A, Muramatsu T, Yamashina Y, Shirai T, Hashimoto MW, u. a. Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. *J Invest Dermatol.* 1998;110(5):806–10.
193. Hearing VJ. The melanosome: the perfect model for cellular responses to the environment. *Pigment Cell Res Spons Eur Soc Pigment Cell Res Int Pigment Cell Soc.* 2000;13 Suppl 8:23–34.
194. Tada A, Suzuki I, Im S, Davis MB, Cornelius J, Babcock G, u. a. Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and

- participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth Differ Mol Biol J Am Assoc Cancer Res.* 1998;9(7):575–84.
195. Levine N, Sheftel SN, Eytan T, Dorr RT, Hadley ME, Weinrach JC, u. a. Induction of skin tanning by subcutaneous administration of a potent synthetic melanotropin. *JAMA J Am Med Assoc.* 1991;266(19):2730–6.
 196. Dorr RT, Dvorakova K, Brooks C, Lines R, Levine N, Schram K, u. a. Increased eumelanin expression and tanning is induced by a superpotent melanotropin [Nle4-D-Phe7]-alpha-MSH in humans. *Photochem Photobiol.* 2000;72(4):526–32.
 197. Barnetson RS, Ooi TKT, Zhuang L, Halliday GM, Reid CM, Walker PC, u. a. [Nle4-D-Phe7]-alpha-melanocyte-stimulating hormone significantly increased pigmentation and decreased UV damage in fair-skinned Caucasian volunteers. *J Invest Dermatol.* 2006;126(8):1869–78.
 198. Loser K, Brzoska T, Oji V, Auriemma M, Voskort M, Kupas V, u. a. The neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone is critically involved in the development of cytotoxic CD8+ T cells in mice and humans. *PloS One.* 2010;5(2):e8958.
 199. Jong CT, Finlay AY, Pearse AD, Kerr AC, Ferguson J, Benton EC, u. a. The quality of life of 790 patients with photodermatoses. *Br J Dermatol.* 2008;159(1):192–7.
 200. Pawliuk R, Bachelot T, Wise RJ, Mathews-Roth MM, Leboulch P. Long-term cure of the photosensitivity of murine erythropoietic protoporphyria by preselective gene therapy. *Nat Med.* 1999;5(7):768–73.
 201. Richard E, Mendez M, Mazurier F, Morel C, Costet P, Xia P, u. a. Gene therapy of a mouse model of protoporphyria with a self-inactivating erythroid-specific lentiviral vector without preselection. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2001;4(4):331–8.
 202. Poh-Fitzpatrick MB, Wang X, Anderson KE, Bloomer JR, Bolwell B, Lichtin AE. Erythropoietic protoporphyria: altered phenotype after bone marrow transplantation for myelogenous leukemia in a patient heteroallelic for ferrochelatase gene mutations. *J Am Acad Dermatol.* 2002;46(6):861–6.
 203. Wahlin S, Aschan J, Björnstedt M, Broomé U, Harper P. Curative bone marrow transplantation in erythropoietic protoporphyria after reversal of severe cholestasis. *J Hepatol.* 2007;46(1):174–9.
 204. Fabrikant J, Touloei K, Brown SM. A review and update on melanocyte stimulating hormone therapy: afamelanotide. *J Drugs Dermatol JDD.* 2013;12(7):775–9.
 205. Holst C, Boix A, Baeten V, Vancutsem J, Berben G. Determination of processed animal proteins in feed: The performance characteristics of classical microscopy and immunoassay methods. *Food Addit Contam.* 2006;23(3):252–64.

Anhang

Statistische Auswertungen:

Anhang 1) PPIX/UV-A/UV-B/Kontrolle (Letalitätsgruppen):

Letalität	Deskriptive Tendenz	Teststatistik X ² -Test	p X ² -Test	p Fisher's exact test	Phi-Koeffizient
Gruppe 1 (Tabelle 7) gegen Gruppe 1 (Tabelle 8)	G1T7 < G1T8	X ² (1) = 14.40	< .001	< .001	0,78
Gruppe 1 (Tabelle 7) gegen Gruppe 2 (Tabelle 8)	G1T7 < G2T8	X ² (1) = 14.40	< .001	< .001	0,78
Gruppe 1 (Tabelle 8) gegen Gruppe 2 (Tabelle 8)	G1T8 = G2T8	X ² (1) = 0.00	> .99	> .99	0,00
Membraneintrübung	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 (Tabelle 7) gegen Gruppe 1 (Tabelle 8)	G1T7 < G1T8	U = 0.00, z = -4.58	< .001	< .001	
Gruppe 1 (Tabelle 7) gegen Gruppe 2 (Tabelle 8)	G1T7 < G2T8	U = 0.00, z = -4.53	< .001	< .001	
Gruppe 1 (Tabelle 8) gegen Gruppe 2 (Tabelle 8)	G1T8 = G2T8	U = 62.50, z = -0.67	= 0.51	= .59	
Hämorrhagien	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 (Tabelle 7) gegen Gruppe 1 (Tabelle 8)	G1T7 < G1T8	U = 0.00, z = -4.59	< .001	< .001	
Gruppe 1 (Tabelle 7) gegen Gruppe 2 (Tabelle 8)	G1T7 < G2T8	U = 0.00, z = -4.59	< .001	< .001	
Gruppe 1 (Tabelle 8) gegen Gruppe 2 (Tabelle 8)	G1T8 = G2T8	U = 72.00, z = 0.00	> .99	> .99	

Anhang 2A) PPIX/UV-A-Licht und zusätzliche Applikation von β -Carotin:

Letalität	Deskriptive Tendenz	Teststatistik X ² -Test	p X ² -Test	p Fisher's exact test	Phi-Koeffizient
Gruppe 1 gegen Gruppe 2	G1 > G2	X ² (1) = 0.75	= .39	= .67	-0,18
Gruppe 1 gegen Gruppe 3	G1 > G3	X ² (1) = 0.75	= .39	= .67	-0,18
Gruppe 1 gegen Gruppe 4	G1 > G4	X ² (1) = 0.20	= .65	> .99	-0,09
Membraneintrübung	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 gegen Gruppe 2	G1 > G2	U = 52.00, z = -1.34	= .18	= .27	
Gruppe 1 gegen Gruppe 3	G1 > G3	U = 52.00, z = -1.34	= .18	= .27	
Gruppe 1 gegen Gruppe 4	G1 > G4	U = 58.00, z = -0.97	= .33	= .44	
Hämorrhagien	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 gegen Gruppe 2	G1 > G2	U = 61.50, z = -0.76	= .45	= .55	
Gruppe 1 gegen Gruppe 3	G1 > G3	U = 64.50, z = -0.55	= .59	= .67	
Gruppe 1 gegen Gruppe 4	G1 > G4	U = 70.50, z = -0.12	= .91	= .93	

Anhang 2B) UV-B-Licht und zusätzliche Applikation von β -Carotin:

Letalität	Deskriptive Tendenz	Teststatistik X²-Test	p X²-Test	p Fisher's exact test	Phi-Koeffizient
Gruppe 1 gegen Gruppe 2	G1 > G2	X ² (1) = 4.20	< .05	= .10	-0,42
Gruppe 1 gegen Gruppe 3	G1 > G3	X ² (1) = 4.20	< .05	= .10	-0,42
Gruppe 1 gegen Gruppe 4	G1 > G4	X ² (1) = 0.75	= .39	= .67	-0,18
Membraneintrübung	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 gegen Gruppe 2	G1 > G2	U = 46.50, z = -1.61	= .11	= .14	
Gruppe 1 gegen Gruppe 3	G1 > G3	U = 49.00, z = -1.48	= .14	= .20	
Gruppe 1 gegen Gruppe 4	G1 > G4	U = 63.50, z = -0.56	= .58	= .63	
Hämorrhagien	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 gegen Gruppe 2	G1 > G2	U = 36.00, z = -2.30	< .05	< .05	
Gruppe 1 gegen Gruppe 3	G1 > G3	U = 30.00, z = -2.65	< .01	< .05	
Gruppe 1 gegen Gruppe 4	G1 > G4	U = 42.00, z = -1.96	= .051	= .09	

Anhang 3A) PPIX/UV-A-Licht und zusätzliche Applikation von Ascorbinsäure:

Letalität	Deskriptive Tendenz	Teststatistik X²-Test	p X²-Test	p Fisher's exact test	Phi-Koeffizient
Gruppe 1 gegen Gruppe 5	G1 > G5	X ² (1) = 0.75	= .39	= .67	-0,18
Gruppe 1 gegen Gruppe 6	G1 > G6	X ² (1) = 0.75	= .39	= .67	-0,18
Gruppe 1 gegen Gruppe 7	G1 > G7	X ² (1) = 0.20	= .65	> .99	-0,09
Membraneintrübung	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 gegen Gruppe 5	G1 > G5	U = 37.50, z = -1.96	= .051	= .08	
Gruppe 1 gegen Gruppe 6	G1 > G6	U = 45.00, z = -1.48	= .14	= .21	
Gruppe 1 gegen Gruppe 7	G1 > G7	U = 46.50, z = -1.66	= .10	= .14	
Hämorrhagien	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 gegen Gruppe 5	G1 > G5	U = 36.00, z = -2.31	< .05	< .05	
Gruppe 1 gegen Gruppe 6	G1 > G6	U = 43.50, z = -1.87	= .06	= .10	
Gruppe 1 gegen Gruppe 7	G1 > G7	U = 45.00, z = -1.78	= .08	= .13	

Anhang 3B) UV-B-Licht und zusätzliche Applikation von Ascorbinsäure:

Letalität	Deskriptive Tendenz	Teststatistik X²-Test	p X²-Test	p Fisher's exact test	Phi-Koeffizient
Gruppe 1 gegen Gruppe 5	G1 > G5	X ² (1) = 6.74	< .01	< .05	-0,52
Gruppe 1 gegen Gruppe 6	G1 > G6	X ² (1) = 1.60	= .21	= .40	-0,26
Gruppe 1 gegen Gruppe 7	G1 > G7	X ² (1) = 0.20	= .65	> .99	-0,09
Membraneintrübung	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 gegen Gruppe 5	G1 > G5	U = 44.00, z = -1.75	= .08	= .11	
Gruppe 1 gegen Gruppe 6	G1 > G6	U = 24.50, z = -2.89	< .01	< .01	
Gruppe 1 gegen Gruppe 7	G1 > G7	U = 47.50, z = -1.54	= .12	= .16	
Hämorrhagien	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 gegen Gruppe 5	G1 > G5	U = 16.50, z = -3.55	< .001	< .001	
Gruppe 1 gegen Gruppe 6	G1 > G6	U = 30.00, z = -2.65	< .01	< .05	
Gruppe 1 gegen Gruppe 7	G1 > G7	U = 63.00, z = -0.65	= .52	= .63	

Anhang 4A) PPIX/UV-A-Licht und zusätzliche Applikation von Trolox:

Letalität	Deskriptive Tendenz	Teststatistik X²-Test	p X²-Test	p Fisher's exact test	Phi-Koeffizient
Gruppe 1 gegen Gruppe 8	G1 > G8	X ² (1) = 0.20	= .65	> .99	-0,09
Gruppe 1 gegen Gruppe 9	G1 > G9	X ² (1) = 0.20	= .65	> .99	-0,09
Gruppe 1 gegen Gruppe 10	G1 = G10	X ² (1) = 0.00	> .99	> .99	0,00
Membraneintrübung	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 gegen Gruppe 8	G1 > G8	U = 65.00, z = -0.51	= .61	= .71	
Gruppe 1 gegen Gruppe 9	G1 > G9	U = 66.50, z = -0.40	= .70	= .76	
Gruppe 1 gegen Gruppe 10	G1 < G10	U = 65, z = -0.57	= .57	= .71	
Hämorrhagien	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 gegen Gruppe 8	G1 > G8	U = 70.50, z = -0.12	= .91	= .93	
Gruppe 1 gegen Gruppe 9	G1 = G9	U = 72.00, z = 0.00	> .99	> .99	
Gruppe 1 gegen Gruppe 10	G1 = G10	U = 72.00, z = 0.00	> .99	> .99	

Anhang 4B) UV-B-Licht und zusätzliche Applikation von Trolox:

Letalität	Deskriptive Tendenz	Teststatistik X²-Test	p X²-Test	p Fisher's exact test	Phi-Koeffizient
Gruppe 1 gegen Gruppe 8	G1 > G8	X ² (1) = 4.20	< .05	= .10	-0,42
Gruppe 1 gegen Gruppe 9	G1 > G9	X ² (1) = 4.20	< .05	= .10	-0,42
Gruppe 1 gegen Gruppe 10	G1 > G10	X ² (1) = 2.74	= .10	= .21	-0,34
Membraneintrübung	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 gegen Gruppe 8	G1 > G8	U = 22.00, z = -3.02	< .01	< .01	
Gruppe 1 gegen Gruppe 9	G1 > G9	U = 27.00, z = -2.75	< .01	< .01	
Gruppe 1 gegen Gruppe 10	G1 > G10	U = 29.50, z = -2.63	< .01	< .05	
Hämorrhagien	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 gegen Gruppe 8	G1 > G8	U = 18.00, z = -3.31	< .001	< .01	
Gruppe 1 gegen Gruppe 9	G1 > G9	U = 19.50, z = -3.23	< .01	< .01	
Gruppe 1 gegen Gruppe 10	G1 > G10	U = 28.50, z = -2.73	< .01	< .05	

Anhang 5A) PPIX/UV-A-Licht und Applikation von synthetischem Melanin:

Letalität	Deskriptive Tendenz	Teststatistik X²-Test	p X²-Test	p Fisher's exact test	Phi-Koeffizient
Gruppe 1 gegen Gruppe 11	G1 > G11	X ² (1) = 8.22	< .01	< .05	-0,59
Gruppe 1 gegen Gruppe 12	G1 > G12	X ² (1) = 8.22	< .01	< .05	-0,59
Gruppe 1 gegen Gruppe 13	G1 > G13	X ² (1) = 4.20	< .05	= .10	-0,42
Membraneintrübung	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 gegen Gruppe 11	G1 > G11	U = 22.00, z = -3.09	< .01	< .01	
Gruppe 1 gegen Gruppe 12	G1 > G12	U = 14.50, z = -3.50	< .001	< .001	
Gruppe 1 gegen Gruppe 13	G1 > G13	U = 49.50, z = -1.51	= .13	= .20	
Hämorrhagien	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 gegen Gruppe 11	G1 > G11	U = 4.50, z = -4.07	< .001	< .001	
Gruppe 1 gegen Gruppe 12	G1 > G12	U = 9.00, z = -3.86	< .001	< .001	
Gruppe 1 gegen Gruppe 13	G1 > G13	U = 25.50, z = -2.91	< .01	< .01	

Anhang 5B) UV-B-Licht und zusätzliche Applikation von synthetischem Melanin:

Letalität	Deskriptive Tendenz	Teststatistik X²-Test	p X²-Test	p Fisher's exact test	Phi-Koeffizient
Gruppe 1 gegen Gruppe 11	G1 > G11	X ² (1) = 8.22	< .01	< .05	-0,59
Gruppe 1 gegen Gruppe 12	G1 > G12	X ² (1) = 8.22	< .01	< .05	-0,59
Gruppe 1 gegen Gruppe 13	G1 > G13	X ² (1) = 4.20	< .05	= .10	-0,42
Membraneintrübung	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 gegen Gruppe 11	G1 > G11	U = 8.50, z = -3.54	< .001	< .001	
Gruppe 1 gegen Gruppe 12	G1 > G12	U = 22.00, z = -3.04	< .01	< .01	
Gruppe 1 gegen Gruppe 13	G1 > G13	U = 55.00, z = -1.10	= .27	= .35	
Hämorrhagien	Deskriptive Tendenz	Teststatistik Mann-Whitney-U-Test	p asympt. (2seitig)	p exakt (2*1-seitig)	
Gruppe 1 gegen Gruppe 11	G1 > G11	U = 3.00, z = -4.15	< .001	< .001	
Gruppe 1 gegen Gruppe 12	G1 > G12	U = 9.00, z = -3.86	< .001	< .001	
Gruppe 1 gegen Gruppe 13	G1 > G13	U = 28.50, z = -2.73	< .01	< .05	

Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Roland Kruse für die Betreuung und die äusserst zuverlässige Unterstützung und Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Norbert J. Neumann für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die engagierte Betreuung meiner Arbeit. Er war nicht nur ein freundlicher und kompetenter Ansprechpartner, er stand mir auch jederzeit bei der Durchführung und Fertigstellung zur Seite. Darüber hinaus ermöglichte er mir die Präsentation und Publikation im In- und Ausland.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Prof. Dr. med. Jorge Frank für die konstruktive Kritik an der Dissertation sowie den Publikationen bedanken. Mein Dank gilt auch Frau Viola Kürten und Herrn Marko Siegesmund für ihre Hilfestellung bei der Umsetzung der Versuche.

Prof. Dr. med. Roland Fenk und Priv.-Doz. Dr. med. Peter-Arne Gerber danke ich für die Tätigkeit als Korreferenten.

Nicht genug danken kann ich meinen Eltern und meinem Bruder, denn ihre Unterstützung hat mir mein Studium, diese Promotion und Vieles mehr ermöglicht. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Vielen Dank an Herrn Dr. med. Sammy Murday, Frau Katrin Ludwid, Herrn Dr. med. Stephan Braun und Herrn Sebastian Schmitz für die Korrektur und die Bereitstellung von Bildmaterial.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die hier vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt habe und sie nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

31.01.2018, Pascal Robert Bafteh

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'P. R. Bafteh', written in a cursive style.

Unterschrift