

Aus dem
IUF - Leibniz Institut für umweltmedizinische Forschung
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. J. Krutmann

**Einfluss eines pflanzlichen
Nahrungsergänzungsmittels aus Tomaten
auf den Schutz der Haut vor UV-induzierten
Schäden**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Katharina Rosa Maria Groten

2019

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Jean Krutman

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Stahl

meinen Eltern
meinem Opa Günter

I Zusammenfassung

Für die menschliche Haut bedeutet eine übermäßige Sonnenlichtexposition die Entstehung von Sonnenbrand, ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Hauttumoren sowie eine vorzeitige Hautalterung. Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Rahmen des ausgelösten photooxidativen Stresses spielt hierbei eine große Rolle. Die ROS sind in der Lage, nahezu alle Biomoleküle funktionell schwer zu beschädigen. Dadurch kommt es zu Inflammation und DNS-Schäden der Haut sowie durch die vermehrte Expression verschiedener Enzyme u.a. zu Kollagenabbau und verminderter Kollagensynthese.

215 Probanden nahmen an dieser randomisierten, placebokontrollierten, doppelblinden Studie teil. Die Studie wurde parallel in zwei Zentren durchgeführt. Es wurden 149 Probanden insgesamt eingeschlossen und 145 vollständig analysiert.

Das primäre Ziel der Studie war es, den Effekt eines Carotinoid-reichen Nahrungsergänzungsmittels aus Tomaten auf den Schutz der Haut vor UV-induzierten photooxidativen Schäden gegenüber Placebo zu untersuchen, wenn dieses über einen Zeitraum von 12 Wochen zweimal täglich eingenommen wurde.

Die Verminderung der UV-induzierten Hautschädigung durch die Supplementierung mit dem Carotinoid-reichen Nahrungsergänzungsmittel sollte primär an Hand der minimalen Erythemdosis (MED) und der Erythemintensität nach UV-Bestrahlung untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Einnahme des genannten Nahrungsergänzungsmittels (NEM) die Haut vor UVB-induzierten Schäden zu schützen vermag. Konkret zeigte sich eine signifikante Reduktion der Bildung des UV-induzierten, chromametrisch bestimmten Erythems sowie eine Reduktion der UVB-induzierten mRNA Expression der proentzündlichen Zytokine TNF- α und IL-6 in der UVB-bestrahlten Haut der Probanden. In dieser Arbeit konnten die bisherigen Beobachtungen zur photoprotektiven Wirkung der systemischen Einnahme von Carotinoiden auch unter Breitspektrum UVB Strahlung bewiesen und bestätigt werden.

Diese Ergebnisse unterstützen das Konzept, dass die regelmäßige orale Einnahme von ausgewählten Nahrungsergänzungsmitteln UVB-protective Wirkungen auf die Haut haben kann.

II Summary

For human skin, an excessive exposure to sun results in sunburn, an increased risk for the development of skin tumours as well as premature skin ageing.

The formation of reactive oxygen species (ROS) as a consequence of this photo-oxidative stress has a central role in these processes. ROS can severely damage the function of nearly all biomolecules resulting in inflammation and DNA damage in the skin as well as collagen reduction and decreased collagen synthesis by the break-up of the natural balance of enzymes.

The here described randomized, placebo controlled, double blind study was conducted in two centres. A total of 215 subjects were screened, of which 149 subjects were enrolled. Of these, 145 completed the study and were analyzed.

The primary objective of this study was to assess the effect in the protection of the skin against UV-induced photo-oxidative damage of a twelve weeks twice daily treatment with a carotenoid containing food supplement compared with placebo.

In the study, we used a carotinoid-rich natural tomato extract containing food supplement. The aim was to examine the reduction of the UV-induced skin damage by the food supplement on the basis of the minimal erythema dose (MED) and the intensity of erythema after UV-irradiation.

The study has shown that the intake of the natural tomato extract containing food supplement was able to protect the skin from UV-induced damage. A significant reduction of the UV-induced formation of erythema as measured chromametrically as well as a reduction of the UV-induced mRNA expression of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in the UV-irradiated skin of the subjects was seen.

This study confirmed the observations to date of the photo-protective effects of systemic intake of carotenoids and detailed the effects by using broad-spectrum UVB radiation.

These results of the study support the concept, that the oral intake of selected nutritional supplements on a regular basis can offer an UV-protective effect for the skin.

III Inhalt

I Zusammenfassung	i
II Summary	ii
III Inhalt	i
1 Einleitung	1
1.1 Die Haut	2
1.1.1 Anatomie der Haut	2
1.1.2 Funktionen der Haut	4
1.2 UV-Strahlung und ihre Wirkung auf die Haut	5
1.2.1 Der Sonnenbrand, das UV-Erythem	8
1.2.2 Die extrinsische Hautalterung, Photoalterung	9
1.3 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), oxidativer Stress und Schutzmechanismen	11
1.4 Carotinoide	13
1.4.1 Carotinoide als physiologische Antioxidantien gegen photooxidativen Stress	15
1.4.2 Lycopin	15
1.4.3 β -Carotin	15
1.4.4 In vivo Studien zum UV-Schutz durch Carotinoide	16
1.5 Immunmodulatorische Zytokine als molekulare Marker für UV-induzierte Hautschäden	18
1.5.1 IL-1, IL-6 und IL-10	19
1.5.2 TNF- α	19
1.6 Ziele der Arbeit	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Studiendesign	22
2.2 Probandenkollektiv	23

2.3	Studienablauf	25
2.4	Induktion des Erythems	29
2.5	Messung der Hautfarbe	29
2.6	Bestimmung der Blutparameter	31
2.7	Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (DTH Test)	32
2.8	Gewebeproben	32
2.8.1	Bestimmung molekularer Marker	33
2.9	Statistik.....	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Analysepopulation	36
3.2	Charakterisierung der Studienpopulation.....	37
3.3	Compliance	40
3.3.1	Messung der Compliance anhand der Kapselmenge.....	40
3.3.2	Messung der Compliance anhand der Blutwerte.....	41
3.4	Wirkung des Carotinoid-reichen Nahrungsergänzungs-mittels aus Tomaten auf UV-induzierte und photooxidative Hautschäden	44
3.4.1	MED.....	44
3.4.2	Erythem.....	45
3.4.3	DTH Analyse	48
3.5	Expression molekularer Marker für UV-induzierte Schäden	49
3.5.1	IL1 α	50
3.5.2	IL10.....	50
3.5.3	IL6.....	50
3.5.4	TNF- α	51
4	Diskussion.....	54
4.1	Compliance	54
4.2	Lichtschutz der Haut	54

4.3	Einfluss auf die Expression molekularer Marker	56
4.4	Verträglichkeit	56
5	Abbildungsverzeichnis	57
6	Tabellenverzeichnis	58
7	Literaturverzeichnis	59

1 Einleitung

Die Haut stellt das größte Organ des Menschen dar und bildet seine natürliche Barriere und Kontaktfläche zur Umwelt.

Endogene und umweltbedingte Faktoren wie chemische und biologische Stoffe, mechanische Einflüsse sowie die akute und chronische Sonnenlichtexposition mit ihren positiven und schädigenden Wirkungen der energiereichen ultravioletten (UV) Strahlung gehören zu den Einflüssen, denen die Haut in dieser Funktion ausgesetzt ist. Speziell die langwellige UV A-Strahlung und die kurzwellige UV B-Strahlung sind nachgewiesenermaßen bei Vorgängen wie Photokanzerogenese [1] und Lichtalterung [2] beteiligt. Weiterhin werden Photodermatosen, Autoimmunkrankheiten sowie phototoxische oder photoallergische Reaktionen [3] durch das Auftreffen des Sonnenlichtes auf die Haut ausgelöst.

Es wurden schon vor vielen Jahrzehnten Sonnenschutzmittel entwickelt, die topisch auf die Haut aufgetragen durch eine Mischung aus chemischen und physikalischen Filtern wirken [4].

Die in langjährigem Gebrauch gemachten Erfahrungen zu den Unzulänglichkeiten solcher topischer Applikation führte nun zu der Frage, ob, zum Beispiel durch oral zugeführte Nahrungsbestandteile, eine systemische Photoprotektion erreicht werden könnte, die kontinuierlich vor bewusster und unbewusster Sonnenlichtexposition schützt.

Auch ist das allgemeine Aussehen der Haut von Interesse, das durch Textur und Farbe sowie physiologischen Eigenschaften wie Feuchtigkeit und Sebumgehalt bestimmt wird. Für ein weiches und glattes Hautbild ist eine ausreichende Hydratation, d.h. der Wassergehalt des *Stratum corneum* wichtig. Die Talgdrüsen der Haut produzieren das Sebum, das, auf der Haut verteilt, die Hydratation der Haut unterstützt, da es eine schützende Fettschicht bildet und die Flüssigkeitsverluste durch die Epidermis verringert. So wird eine semipermeable, epidermale Barriere gebildet. Wird sie durch endogene und umweltbedingte Faktoren beeinträchtigt, ändern sich diese Hauteigenschaften und dies kann zu trockener und entzündeter Haut führen. Um dem entgegen zu wirken, gibt es auf dem Markt bereits eine Vielzahl von exogen aufzutragenden Hautpflegeprodukten. Eine Vielzahl der in der dermatologischen Praxis beobachteten Hautprobleme kann jedoch auf

endogene Einflüsse oder auch auf die Art der Ernährung zurückgeführt werden [5,6]. Es besteht also ein zunehmendes Bestreben und eine Notwendigkeit, das Wissen um die Wechselwirkungen zwischen Ernährung und Hautgesundheit zu erweitern und zu vertiefen.

1.1 Die Haut

1.1.1 Anatomie der Haut

Die Haut bildet das größte und schwerste Organ des menschlichen Körpers. Sie ist in ihrem Aufbau sehr komplex und besteht, wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt, aus mehreren anatomisch und physiologisch unterscheidbaren Komponenten.

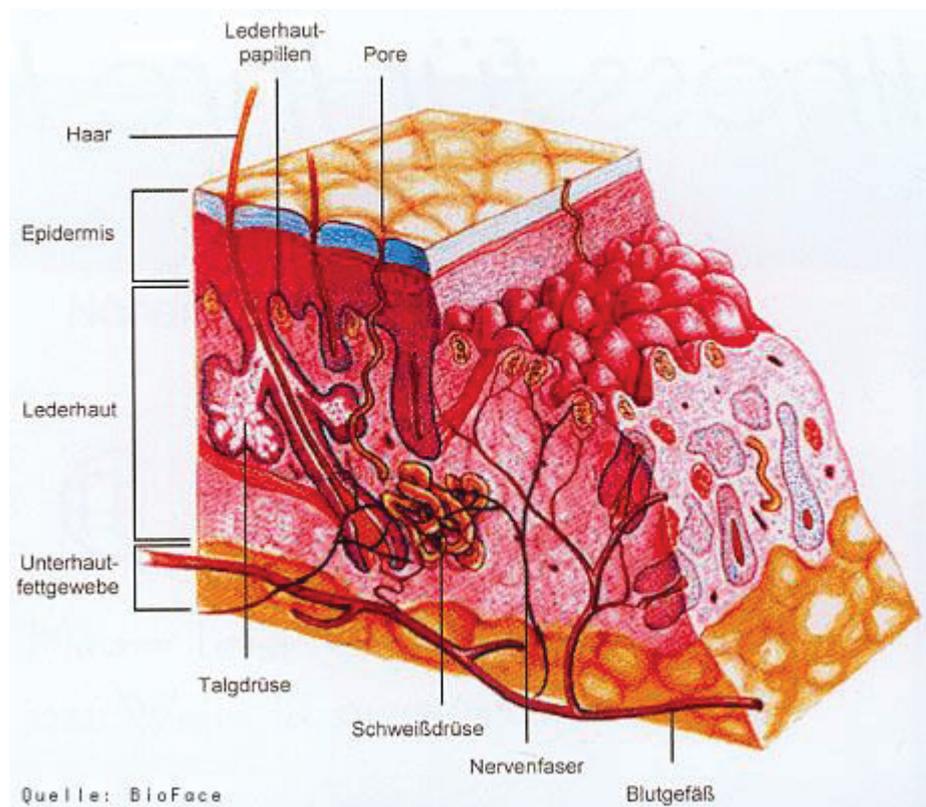


Abbildung 1: Aufbau der menschlichen Haut nach [108]

Zunächst kann die Haut, von außen nach innen, strukturell gegliedert werden in die *Epidermis* (Oberhaut) mit mehrschichtigem, verhorntem Plattenepithel, die *Dermis* (*Korium*, Lederhaut) mit faserreichem Bindegewebe sowie die *Subkutis* (Unterhaut) aus Fettgewebe, das die Verbindung zur allgemeinen Körperfaszie herstellt. *Epidermis* und *Dermis* werden zusammen als *Kutis* bezeichnet und sind fest miteinander verzahnt [7].

Die *Epidermis* ist gefäßlos und besteht zu etwa 90% aus Keratinozyten. Diese wandern unter stetiger Veränderung ihrer Struktur von der Basis zur Hautoberfläche, wo sie als Hornschuppen kontinuierlich abgeschilfert werden [8].

Dieser Differenzierungsprozeß der epidermalen Keratinozyten spiegelt sich in der morphologisch-histologischen Unterteilung der Epidermis wieder, die in Basalzellschicht (*Stratum basale*), Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*), Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*) und Hornschicht (*Stratum corneum*) untergliedert werden kann.

Neben den Keratinozyten befinden sich in der Epidermis die Melanozyten, die Langerhans'schen Zellen und Zellen des peripheren Nervensystems (Merkel-Zellen). Die Melanozyten wandern entwicklungsgeschichtlich aus der Neuralleiste in die Haut ein und sind rasterförmig in der Basalzone der Epidermis angeordnet. Sie dienen durch Bildung und Exkretion von Melaninpigmenten an die Keratinozyten dem Lichtschutz der Haut [7].

Die Dermis besteht aus faserreichem Bindegewebe und bildet eine fibroelastische Schicht. In ihr sind die Fibroblasten, die ortsständigen Bindegewebszellen, in eine extrazelluläre Matrix mit Fasern und Grundsubstanz eingebettet. Die Dermis ist hauptsächlich für die Festigkeit und Elastizität der Haut. In ihr sind das Gefäß- und Nervensystem der Haut enthalten und auch mobile Zellen des Entzündungs- und Immunsystems wie beispielsweise Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen.

Gefäße und Zellen befinden sich vornehmlich im oberen Bereich der Dermis, dem *Stratum papillare*, wohingegen das unten gelegene *Stratum reticulare* vor allem Fasern enthält [7].

Das „Unterhautgewebe“, die Subkutis, schließt an das *Stratum reticulare* der Dermis an und besteht aus dem subkutanen Fettgewebe sowie aus lockerem Bindegewebe [8]. Das Fettgewebe ist läppchenartig aufgebaut aus Fettzellen, den Lipozyten, und durchzogen von bindegewebigen Septen, welche die hier verlaufenden Gefäße und Nerven einbetten. Etwa die Hälfte bis zwei Drittel der Gesamtfettmasse des Organismus befindet sich im Bereich der Subkutis.

Zudem bildet die Haut verschiedene Hautanhangsgebilde, die Hautadnexe. Dies sind die Nägel als horizontale Einstülpungen der Kutis, die Haare als vertikale Einstülpungen der Kutis sowie die Talg- und Schweißdrüsen, ebenfalls als vertikale Einstülpungen der Kutis [7]. Auf den Aufbau dieser Strukturen soll hier, da sie nicht Thema dieser Arbeit sind, nicht weiter eingegangen werden.

1.1.2 Funktionen der Haut

Mit einer Gesamtfläche von 1,5 bis 2 m², einem Gewicht von 3,5 bis 10 kg und einer Dicke von 1,5 bis 4 mm übt die Haut eine wichtige Funktion als Kontaktorgan zur Umwelt aus [9].

Durch ihren oben beschriebenen Aufbau ist die Haut stark elastisch und verformbar, gleichzeitig aber auch sehr zugfest und kann so einen optimalen Schutz vor mechanischen Einwirkungen bieten.

Durch das *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* der oberen Epidermis mit Transformation der Zellen in Schuppen sowie durch die *Tight Junctions*, den sauren pH-Wert von 5,7 (Säureschutzmantel) und den Fettgehalt stellt die Haut zudem eine Penetrationsbarriere für chemische Noxen und mikrobielle Eindringlinge her und kann die Abgabe oder ein Eindringen von Stoffen regulieren [10]. Haben Erreger oder Noxen die Hautbarriere doch durchdrungen, rufen sie (meist) in der Haut verschiedene Immunreaktionen hervor: Zunächst die angeborene, unspezifische Abwehrreaktion mit Aktivierung der Makrophagen und Granulozyten als Entzündungseinleitung und dann die adaptive, spezifische Abwehrreaktion von T- und B-Lymphozyten durch Antigenpräsentation der Langerhans-Zellen [8].

Die Epidermis schützt als Barriere auch gegen Austrocknung. Es wurde errechnet, dass bei einem Menschen ohne Epidermis ein Wasserverlust von 20 Litern pro Tag auftreten würde. Dies ist die Ursache, warum bereits bei relativ kleinflächigen Hautläsionen wie beispielsweise Verbrennungen eine Flüssigkeitssubstitution notwendig werden kann.

Die Haut bietet außerdem Schutz gegenüber Strahleneinwirkungen. Der größte Teil des Sonnenlichtes wird von der Haut reflektiert. Der Rest wird absorbiert und kann photochemische Reaktionen auslösen, die in verschiedener Weise wirken. Um schädigende Strahlenwirkungen zu minimieren, verfügt die Haut über diverse Schutzmechanismen, darunter ihre Möglichkeit zur Melaninsynthese, zur Reparatur lichtbedingter DNS-Schäden sowie zur Akanthose und Hyperkeratose der Epidermis (Lichtschwiele). Die Hautreaktionen auf Sonnenlicht sind interindividuell sehr unterschiedlich und bestimmen den jeweiligen Hauttyp des Menschen nach Fitzpatrick [10].

Die Haut sorgt über ihre Durchblutung auch für eine reaktive Temperaturregulation. So diffundiert aus dilatierten Blutgefäßen Wasser an die Oberfläche und durch Schweißbildung erfolgt eine Kühlung.

Wie oben beschrieben befinden sich in der Epidermis Merkel-Zellen, die als Mechanorezeptoren auf Berührung reagieren. Im Bereich der Dermis liegen außerdem Nerven und Nervenendigungen. Markhaltige und marklose freie Nervenendigungen dienen als Nozizeptoren der Schmerz-, Juckreiz- und durch Kälte und Wärmerezeptoren der Temperatur-Erkennung. Als Mechanorezeptoren der behaarten Körperhaut fungieren die Pinkus-Haarscheiben, die in den Dermispapillen der unbehaarten Leistenhaut in den Meissner Tastkörperchen, mit Nervenfasern assoziierte, birnenförmige Tast- und Druckrezeptoren, ihre Entsprechung finden. Für die Wahrnehmung von Beschleunigung und Vibration sorgen die Vater-Pacini-Lamellenkörperchen tief in der Dermis und im palmo-plantaren tiefen Fettgewebe [8].

1.2 UV-Strahlung und ihre Wirkung auf die Haut

Als primäre Energiequelle der Erde ist die Sonne notwendig für die Photosynthese und das Wachstum von Pflanzen [11].

Die Lichtwirkung auf den Menschen hat neben der weithin bekannten Stimulation der Vitamin D-Synthese und der Erwärmung der Haut weitere positive Wirkungen, darunter eine antimikrobielle Wirkung und eine dosisabhängige Immunstimulation, aber auch eine wichtige psychologisch positive Wirkung [7].

Wie bei allen Dingen hat auch die Sonnenstrahlung ihre negativen Seiten, die jedoch bei Beachtung einer ausgewogenen Sonnenlichtexposition weitestgehend vermieden werden können, ohne die positiven zu verlieren [12].

Das Sonnenspektrum, das die Erde erreicht, wird in die elektromagnetischen Strahlungswellen des UV B und UV A, das sichtbare Licht und die Infrarot-Strahlung aufgeteilt. Pathophysiologisch betrachtet bildet die hochenergetische UV-Strahlung dabei den wirkungsvollsten Anteil des Sonnenlichtes [11].

Die Wirkung der UV-Strahlung hängt insbesondere von der Energie der Strahlung ab, die je kurzwelliger, desto energiereicher ist. Die UV-Strahlung wird unterteilt in

- UV C-Strahlung, ein extrem kurzwelliger und hochenergetischer Anteil mit einer Wellenlänge von 200-280 nm, der vollständig in der Atmosphäre absorbiert wird,

- UV B-Strahlung, eine ebenfalls energiereiche Strahlung mit einer Wellenlänge von 280-320 nm, die etwa 5% der die die Erdoberfläche erreichenden UV-Photonen ausmacht, und
- UV A-Strahlung, mit 320-400 nm ein langwelligerer, relativ energieärmerer Anteil, der nur 1/1000 der Energie des UV B enthält.

Die UV C-Strahlung wird vollständig durch die Ozonschicht der Atmosphäre gefiltert, während die UV B-Strahlung die Erdoberfläche erreicht und in die Haut bis zum *Stratum basale* der Epidermis eindringen kann und dort die Sonnenbrandreaktionen auslöst und durch die Induktion der Melanogenese die Hautbräunung hervorruft [10,13].

Bei ausreichend starker UV-Exposition kann sich innerhalb weniger Stunden eine Hautrötung, das Erythem, entwickeln, die nach etwa 24 Stunden ihr Maximum erreicht [10].

Das UV B-Licht wirkt hauptsächlich direkt auf zelluläre makromolekulare Strukturen wie die DNS und Proteine. Zu den direkten durch UV B-Strahlung ausgelösten DNS-Schäden zählen Oxidation und Strangbrüche. Diese können zu Mutationen in den Zellen der Epidermis führen, die durch Akkumulation Hautkrebs verursachen können [14,15].

Die UV B-Strahlung gilt als wichtigstes Aktionsspektrum für die Bildung von Melanomen und nicht-melanozytären Hauttumoren.

Auch wenn sie nur 5% der die Erdoberfläche erreichenden UV-Photonen ausmacht, erlangt die UV B-Strahlung so unter den Bestandteilen des Sonnenlichtes für den Menschen die größte pathophysiologische Bedeutung [16–18].

UV-Strahlung wirkt neben seiner potenziell kanzerogenen Wirkung zudem als starker Induktor der Immunsuppression, wobei sie auf mehreren, hier nicht weiter diskutierten Ebenen in die Immunantwort eingreifen kann.

Die UV A-Strahlung macht rund 95% der UV-Energie aus, die auf die Erdoberfläche trifft [9]. Sie wird durch übliches Fensterglas nicht abgehalten und nur wenig von DNS und Proteinen absorbiert. So gelangt sie bis in die *Dermis* der Haut [10,13]. Dort verursacht sie hauptsächlich oxidative Veränderungen, die als „oxidativer Stress“ bezeichnet werden und die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS= *Reactive Oxygen Species*) wie z.B. Superoxid-Anionen, Hydroxyl-Radikale oder Peroxid [11] bewirken. Diese können wiederum DNS-Strukturen schädigen, wodurch UV A-Strahlung einen indirekten kanzerogenen und zytotoxischen Effekt hat [19].

Die UVA-Strahlen sind gefährlicher als man noch vor einigen Jahren dachte. In hohen Dosen kann UV A-Strahlung auch Sonnenbrand auslösen [9]. Auch gibt es Anzeichen, dass UV A-Strahlen für die Entstehung von schwarzem Hautkrebs (Melanome) mit verantwortlich sein könnten [9a].

In der Regel ruft aber die UV A-Strahlung eine Hyperpigmentierung ohne vorhergehendes Erythem hervor.

Diese Farbgewinnung wird als direkte Pigmentierung bezeichnet, bei der bereits vorliegende, farblose Vorstufen des Melanins unter UV A Einfluss unmittelbar in Gegenwart von Sauerstoff oxidiert. Die Farbe tritt schon während oder kurz nach der Bestrahlung auf und ist aschgrau oder graubraun. Das Farbstoffmolekül Melanin verändert durch die Oxidation seine Form und wechselt im Zuge dessen von einer farblosen Leukoform in einen braunen Konformationszustand. Parallel dazu wird eine Umverteilung der Melanosomen in der Zelle angestoßen. Die Melanosomen sind die Farbpigmente tragenden Strukturen der Melanozyten und wandern aus ihrer ursprünglichen Position nahe des Zellkerns sehr schnell in die Spitze der Dendriten der Melanozyten. Dies nennt man *immediate pigment darkening* (IPD). Etwa nach zwei Stunden wird der andauernde Zustand der sogenannten persistierenden Pigmentierung (PPD= *persistent pigment darkening*) erreicht. Als chemische Reaktion ist die Oxidation des Farbstoffes Melanin reversibel, weswegen diese Bräune innerhalb von 2 bis 24 Stunden wieder verloren geht. Somit wird das Melanin in den Melanosomen der Melanozyten unter UV A-Einstrahlung lediglich umverteilt und dies auch nur in den unteren Schichten der Oberhaut (Basalzellschicht). Deswegen resultiert aus der direkten Pigmentierung kein Schutz der Zellen gegen UV-Strahlung, da es weder zu einer suffizienten Verteilung der Farbe in der Haut, besonders der gefährdeten oberen Hautschicht, noch zu einer suffizienten Neusynthese von schützender Farbe (Melanin) kommt. Die biologische Funktion dieser direkten Pigmentierung ist bis jetzt nicht bekannt.

Der nach Freibadbesuch oder Strandurlaub bekannte Sonnenbrand wird also, wie die Urlaubsbräune, im Wesentlichen durch UV B-Strahlen ausgelöst [10].

1.2.1 Der Sonnenbrand, das UV-Erythem

Auf das Erythem, eine auch durch den Laien feststellbare klinische Wirkung der UV-Strahlung, soll hier näher eingegangen werden. Das Erythem bildet die Grundlage für die derzeitige Wirksamkeitsmessung von Sonnenschutzmitteln und wird mit der Induktion der Melanogenese assoziiert [20,21].

Die infolge übermäßiger Sonnenexposition auftretende Hautrötung und das Abpellen der Haut zusammen mit den damit verbundenen Schmerzen werden allgemein als Sonnenbrand bezeichnet.

Die Hautrötung ist das Zeichen eines verstärkten Blutflusses zum betroffenen Hautareal. Diese Gefäßreaktion erfolgt auf Grund einer direkten und indirekten Schädigung der Hautzellen durch photochemische Reaktionen und die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [22]. Die so erzeugte Vasodilatation führt zu der beobachteten Ödembildung.

Die durch die UV-Strahlen verursachten ROS-abhängigen Schädigungen sind vorwiegend auf der Ebene der DNS epidermaler Zellen zu finden. Zusätzlich kann die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Histamin, Serotonin, Prostaglandine und IL-1 aus Keratinozyten eine Entzündungsreaktion in der Epidermis und der oberen (bei UV A auch mittleren) Dermis hervorrufen, in deren Verlauf ebenfalls ROS generiert werden. Das massenhafte Auftreten apoptotischer Keratinozyten, treffend als *sunburn cells* bezeichnet, zeigt die Zellschädigung an. Bei höherer Intensität erfolgt eine vakuolisierende Zelldegeneration. Im Gegensatz zum UV B-Erythem ist das UV A-Erythem sauerstoffabhängig. Unter ischämischen Bedingungen tritt es nicht auf und *sunburn cells* fehlen [9].

Wenn sich ein Erythem gebildet hat, bedeutet dies also, dass eine so starke UV-bedingte Schädigung vorliegt, dass es zur Aktivierung der Entzündungswege gekommen ist. Das UV-Erythem ist das Ergebnis eines nicht oder zu gering wirksamen Sonnenschutzes und ein Marker für schwere UV-bedingte Schäden. Dieser Prozess fördert auch die Photoalterung.

1.2.2 Die extrinsische Hautalterung, Photoalterung

Im Gegensatz zur chronologischen oder intrinsischen Alterung, einem Prozess, der durch die individuelle physiologische Prädisposition vorbestimmt ist, hängt die Photoalterung (extrinsische Alterung) primär von dem Grad der lebenslangen Sonnenexposition und dem Melaningehalt der Haut ab [23].

Klinische Zeichen der Photoalterung sind eine fahle Haut, gesprenkelte Pigmentierung, ausgeprägte Falten, tiefe Furchen, Verlust des Hauttonus, spröde Haut, Trockenheit, schwere Atrophie, Teleangiektasien, lockere Haut, ein ledriges Aussehen, solare Elastosen, aktinische Purpura und präkanzeröse Läsionen [24,25].

Zudem wird UV-Licht als Risikofaktor für die Entstehung von Melanomen und nicht-melanozytären-Hautkrebsarten wie dem Basalzellkarzinom und dem Plattenepithelkarzinom angesehen [26].

Vor allem lichtexponierte Hautareale wie das Gesicht, der Nacken, Dekolleté, Hände und Oberarme sind davon betroffen [27].

Die intrinsische Hautalterung dagegen ist charakterisiert durch feine Hautfältchen sowie durch die Entstehung gutartiger Tumoren wie seborrhoischer Keratosen und Angiome. Sie ist aber nie mit den für die Lichtalterung charakteristischen Merkmalen wie verstärkter oder verringerter Pigmentierung oder tiefen Falten assoziiert [28].

Seborrhoische Keratosen werden als beste Biomarker der intrinsischen Hautalterung angesehen, da sie unabhängig von Sonnenlichtexposition auftreten. Während photogeschädigte Haut vaskuläre Schäden zeigt, liegen diese bei intrinsisch gealterter Haut nicht vor. Studien an Menschen und Tieren, besonders an Albinomäusen und haarlosen Mäusen zeigten, dass akute und chronische UV B-Strahlung die Hautvaskularisation und -angiogenese stark erhöht [29–31].

Der Prozess der UV-induzierten Hautalterung ist komplex und wird über verschiedene Wege gesteuert, darunter Rezeptorsignalstoffwechselwege, Schäden der Mitochondrien und Protein-Oxidation [3,32].

Heutzutage wird allgemein davon ausgegangen, dass UV A- und UV B-Strahlung, aber auch Infrarot-A-Strahlung, eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen kollagenabbauenden Matrixmetalloproteinasen wie der MMP1 und ihren gewebespezifischen Inhibitoren (TIMP) verursacht [33].

Die durch das UV-Licht in der menschlichen Haut freigesetzten ROS können zahlreiche Signaltransduktionswege stimulieren und so die Hautalterung beschleunigen (siehe Abbildung 2).

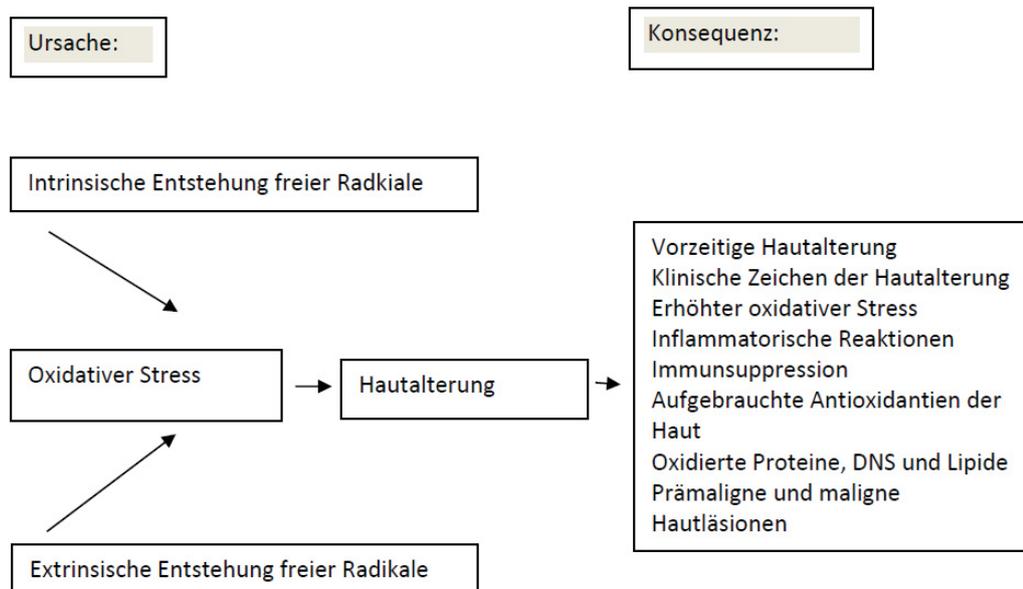


Abbildung 2: Ursachen und Konsequenzen der Hautalterung, nach [34].

UV A- und UV B-Strahlung induzieren unter anderem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Aktivator Protein 1 (AP-1) [35], woraufhin die Produktion der Matrixmetalloproteinasen erhöht wird (siehe Abbildung 3).

Dadurch kommt es zu einem beschleunigten und vermehrten Abbau von Kollagenfasern, was, zusammen mit der gleichzeitig durch UV- und Infrarotstrahlung hervorgerufenen Hemmung der Kollagenneusynthese, zu einer Verarmung an Kollagenfasern in der extrazellulären Matrix führt [33].

Es konnte auch gezeigt werden, dass bei der Lichtalterung der Haut ein vermehrtes Auftreten von Mutationen der mitochondrialen DNS dermalen Fibroblasten eine große Rolle spielt [33]. So konnte nachgewiesen werden, dass Hautfibroblasten mit einem hohen Gehalt an mitochondrialen DNS-Mutationen ein deutlich verändertes Genexpressionsmuster aufzeigen [36]. Diese Zellen zeichnen sich aus durch eine Überexpression von MMPs, eine verminderte TIMP-Expression und eine vermehrte

Expression von Genen, die für die Gefäßneubildung sowie die Ausbildung eines entzündlichen Infiltrates wichtig sind. So kann die mitochondriale DNS-Mutagenese den Abbau von Kollagenfasern und die Entstehung grober Falten, einem Kardinalsymptom der lichtgealterten Haut, bewirken.

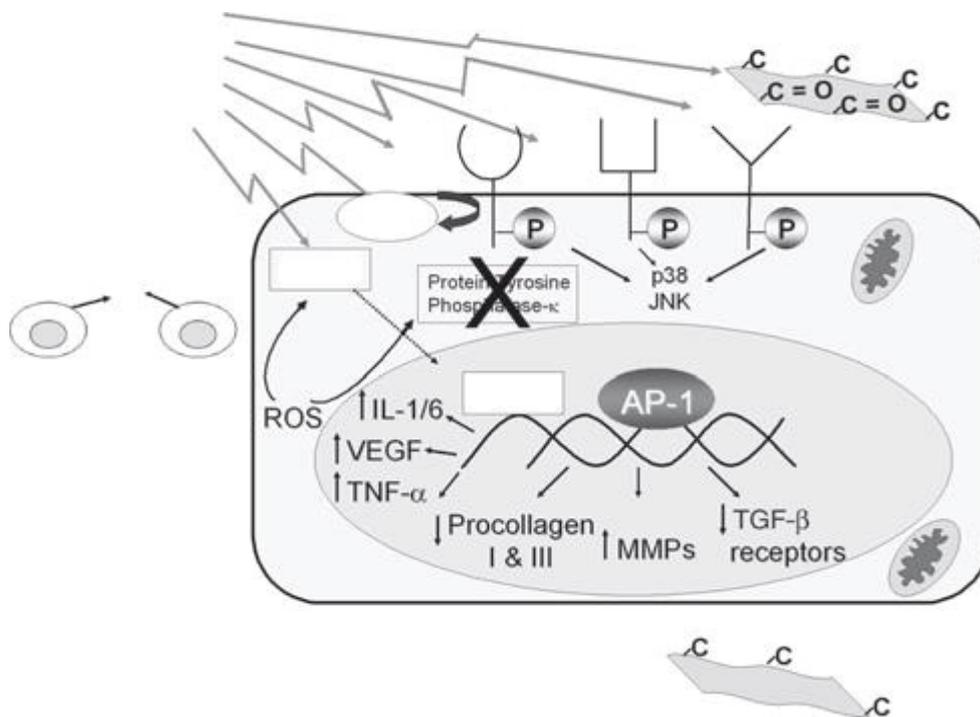


Abbildung 3: Mechanismus der Fotoalterung der Haut, aus [32].

1.3 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), oxidativer Stress und Schutzmechanismen

Unter reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) versteht man Sauerstoffradikale und sehr reaktionsbereite Sauerstoffverbindungen. Zu ihnen zählen u.a. Peroxide, Superoxid-anionen und Singulett-Sauerstoff. Radikale sind Moleküle oder Verbindungen, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen [37].

Dies macht sie zu chemisch instabilen, hochreaktiven Molekülen, die bestrebt sind, ihren instabilen Zustand durch das Entziehen von Elektronen aus anderen Molekülen auszugleichen [38].

Radikale sind daher imstande, nahezu alle Makromoleküle und natürlich auch Biomoleküle anzugreifen und funktionell schwer zu schädigen [39].

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden als Nebenprodukte des normalen Metabolismus innerhalb der Zelle gebildet, beispielsweise im endoplasmatischen Retikulum (ER) und in den Mitochondrien. Unter Einwirkung toxischer Wirkstoffe wie Umweltschadstoffe, aber auch Strahlung [40–42] wird die Bildung von ROS erhöht. Dies kann dann zu einer Überforderung der normalerweise ausreichenden antioxidativen Schutzmechanismen des Körpers führen, einem Zustand, der als oxidativer Stress bezeichnet wird [43,44].

Die Wirkung der ROS an der DNS kann durch Modifikation der Desoxyribose zu Strangbrüchen führen. Außerdem kommt es zur Zerstörung bzw. Veränderung der verschiedenen Basen und damit zu irreparablen Fehlpaarungen und Mutationen.

Auch Proteine können durch ROS modifiziert werden, mit erheblichen Auswirkungen auf deren biologische Aktivität. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindegewebskomponenten Hyaluronsäure und Proteoglykane oxidativ so geschädigt werden können, dass ihre Stabilität und Vernetzung beeinträchtigt sind. Die von ihnen gebildete Matrix wird aufgelöst und die Haut verliert ihre Elastizität und Festigkeit mit der Folge, dass die für das Bild der Lichtalterung der Haut charakteristischen Falten entstehen.

Besonders gut untersucht ist die Auswirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf Membranlipide. Speziell die mehrfach ungesättigten Fettsäuren werden oxidiert und dadurch weniger liquide [39]. Dies führt dazu, dass die von ihnen gebildete Zellmembran rigide wird und ihre Aufgaben nicht mehr ausreichend erfüllen kann.

Freie Radikale bewirken nicht nur die Lichtalterung der Haut, sondern haben auch in der Pathogenese anderer Krankheiten wie Krebs oder bei neurodegenerativen und kardiovaskulären Erkrankungen wichtige auslösende Funktionen [45].

Um dieser Gefahr entgegenzuwirken, verfügen alle aerob lebenden Zellen über ein komplexes antioxidatives Schutzsystem, das aus enzymatischen und nichtenzymatischen

Antioxidantien und Radikalfängern besteht. Die Qualität des antioxidativen Schutzes ist wesentlich für die Geschwindigkeit des Alterns verantwortlich [37].

Zu den enzymatischen Antioxidantien zählen die Glutathionperoxidase, die Superoxiddismutase und die Katalase. Die nicht enzymatischen Antioxidantien beinhalten zum Beispiel Vitamin E (alpha-Tocopherol), Vitamin C (Ascorbinsäure), Glutathion, Harnsäure und Ubiquinol [46]. Aufgrund ihrer hohen Oxidationsfreudigkeit agieren sie als starke Reduktionsmittel, binden freie Elektronen und die mit ihnen verbundene Gefahr wird neutralisiert [38].

Wichtige antioxidative Komponenten der menschlichen Nahrung sind vor allem Vitamin C, Vitamin E, Beta-Carotin und andere Mikronährstoffe wie Carotinoide, Polyphenole und Selen. Diese antioxidativen Nahrungsbestandteile haben eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase der oxidativen Balance.

Oxidative Schäden können also eventuell durch die Gabe antioxidativer Stoffe vermindert oder sogar verhindert werden. Dies könnte für den Menschen von großer Bedeutung sein, da der Nahrungsweg den einfachsten Weg für eine Supplementierung darstellt. Zahlreiche Studien haben sich bereits diesem Thema gewidmet und verschiedene Antioxidantien oder deren Kombinationen und diverse Pflanzenstoffe auf ihre Fähigkeit hin untersucht, ROS-induzierte Schäden abzuwenden [31].

Als sekundärer Schutz, sozusagen als zweite Verteidigungslinie der Zellen, agieren der *Turnover* von Membranen und Proteinen, also deren geregelter Abbau und die Reparatur von DNS. Proteine werden nach einer Lebensdauer von Minuten bis wenigen Tagen in Lysosomen und Proteasomen abgebaut. Interessanterweise werden in der Zelle geschädigte Proteine erkannt und bevorzugt recycelt. Für die Reparatur der verschiedenen DNS-Schäden steht ein ganzes Arsenal von DNS-Reparaturenzymen zur Verfügung [37].

1.4 Carotinoide

Carotinoide sind effektive Antioxidanzien und als solche in der Lage, freie Radikale wie Singulett-Sauerstoff oder Peroxylradikale abzufangen. Carotinoide sind weit verbreitete lipophile natürliche Farbstoffe und geben vor allem gelbem und rotem Obst und Gemüse, zum Beispiel Mais, Tomaten, Karotten und Zitrusfrüchten, ihre Farbpigmente. Charakteristisch für Carotinoide ist die lange Polyenkette aus 40 Kohlenstoffatomen. Die zentrale Kette des Moleküls besitzt ein System konjugierter Kohlenstoffdoppelbindungen

und trägt an den Enden zyklische oder azyklische Substituenten. Dieses Doppelbindungssystem bedingt die charakteristische Farbe der Carotinoide und prägt deren antioxidative Eigenschaften und damit deren photoprotektive Wirkungen [4].

Die Stoffklasse der Carotinoide kann in zwei Gruppen geteilt werden. Reine Moleküle aus Kohlenwasserstoffverbindungen ohne funktionelle Gruppe werden den Carotinen zugeordnet, zu denen beispielsweise α -Carotin, β -Carotin und Lycopin gehören, während die Xanthophylle [47], z.B. Zeaxanthin und Lutein, zusätzlich mindestens ein Sauerstoffatom, z.B. in Form einer Hydroxy-, Oxo-, Epoxy- oder Estergruppe, enthalten [48]. Sie sind somit weniger lipophil als die Carotine. Die unterschiedliche Lipophilie beeinflusst das Löseverhalten der Carotinoide in organischen Lösemitteln [49-51].

Durch das Vorliegen mehrerer Doppelbindungen sind verschiedene *cis/trans*-Konfigurationen der Carotinoide möglich. In der Natur sind allgemein *Trans*-Isomere häufiger zu finden als *cis*-Isomere, im menschlichen Blut jedoch liegen verschiedene *cis*-Isomere [52] vor.

Es wurden bisher ca. 650 verschiedene Carotinoide charakterisiert, von denen jedoch nur etwa 24 in unserer täglichen Nahrung vorkommen. Lutein, β -Cryptoxanthin, Lycopin, β -Carotin, Zeaxanthin und α -Carotin sind die Hauptcarotinoide [53] für den menschlichen Organismus. Bei Phytoen und Phytofluen handelt es sich um Intermediärprodukte der biologischen Synthese von Carotinoiden [73].

Menschen verfügen nicht über die Möglichkeit zur Biosynthese von Carotinoiden und sind deshalb darauf angewiesen, durch Obst- und Gemüseverzehr ihren Bedarf zu decken. Wichtige Quelle sind u.a. Karotten, Tomaten, Paprika, Mais, Broccoli, Pfirsiche, Orangen, Grapefruit, Melonen, Aprikosen und grüner Tee [4]. Die Aufnahme der Carotinoide aus der Nahrung wird durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst, darüber hinaus bestehen beim Menschen starke individuelle Unterschiede in der Aufnahmekapazität. Carotinoide werden im Allgemeinen in Chylomicronen verpackt und über das Lymphsystem in die Blutbahn transportiert. In der Leber werden die Carotinoide in Lipoproteine sehr niedriger Dichte (VLDL) eingebaut und über den Blutkreislauf an die Gewebe verteilt [54,55].

1.4.1 Carotinoide als physiologische Antioxidantien gegen photooxidativen Stress

Aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften sind die Carotinoide in der Lage, angeregte Moleküle, vor allem Singulett-Sauerstoff und Peroxyl-Radikale, abzufangen und zu deaktivieren [52]. Hierbei erfolgt eine rein physikalische, aber hocheffektive Singulett-Sauerstoffinaktivierung, bei der die Anregungsenergie vom Singulett-Sauerstoff auf das energiearme Carotinoid übertragen und von diesem in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben wird. Das Lycopin hat sich als das effektivste Carotinoid zur Inaktivierung von Singulett-Sauerstoff herausgestellt.

Neben dem physikalischen Weg können Carotinoide chemisch in einem Oxidationsvorgang mit ROS reagieren und diese unschädlich machen [56].

1.4.2 Lycopin

Lycopin ist eines der häufigsten Carotinoide im menschlichen Blut. Hauptsächlich kommt es in roten reifen Früchten, darunter vor allem in Tomaten sowie in Obst, zum Beispiel in Grapefruits, vor.

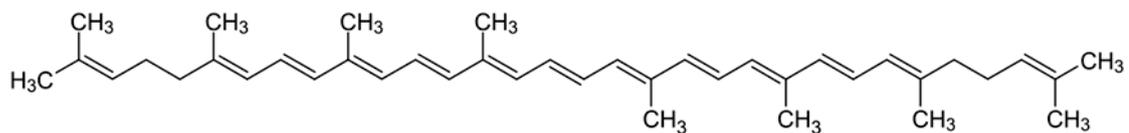


Abbildung 4: Lycopin

Lycopin hat exzellente radikalfangende Eigenschaften [57] und stellt das Carotinoid mit der stärksten antioxidativen Aktivität dar [58]. Seine Fähigkeit als effektiver Singulett-Sauerstoff-Fänger ist doppelt so hoch wie die des β -Carotins [59].

1.4.3 β -Carotin

β -Carotin ist ein zu den Carotinoiden gehörender fettlöslicher Polylenfarbstoff pflanzlicher Herkunft. Seine Summenformel ist C₄₀H₅₆ und es zeichnet sich strukturell durch ein zentrales System von 11 konjugierten Doppelbindungen mit zwei Iononringen aus.

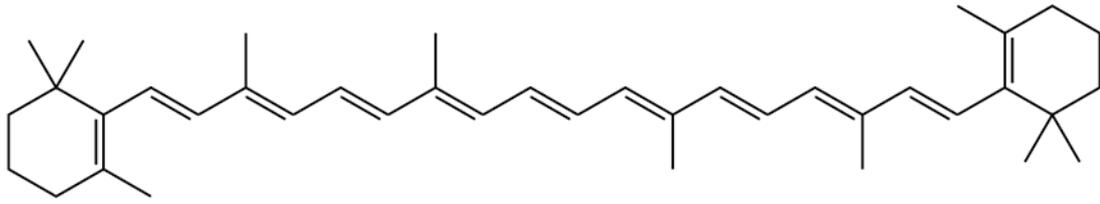


Abbildung 5: β -Carotin

Diese β -Iononringe stehen über eine aus 8 Isopreneinheiten aufgebaute Kette miteinander in Verbindung. β -Carotin kann im Körper durch eine Spaltung im Bereich der zentralen Doppelbindung und Anlagerung von Wasser in Vitamin A umgewandelt werden. Daher rührt die Bezeichnung als „Pro-Vitamin A“ [60].

1.4.4 In vivo Studien zum UV-Schutz durch Carotinoide

Zahlreiche Studien belegen, dass die orale Aufnahme von Carotinoiden einen Lichtschutz-Effekt in der Haut des Menschen hervorrufen kann [4,61]. Die meisten derzeit im Handel erhältlichen Sonnenschutzmittel zur endogenen Anwendung enthalten als wirksamen Bestandteil β -Carotin, oftmals in Kombination mit anderen Antioxidantien wie Vitamin E oder Vitamin C sowie Lycopin.

Die Studien zeigten, dass β -Carotin durch seine antioxidative Wirkung die durch UV-Strahlung induzierte Erzeugung von ROS minimiert und so vor photooxidativen Schäden schützt [62,63].

Mathes-Roth [64] führte 1972 eine der ersten Studien über die Effekte von oral verabreichtem β -Carotin durch. Nach Gabe von 180 mg β -Carotin pro Tag über zehn Wochen stieg die MED (**M**inimale ein **E**rythem hervorrufende **D**osis; die Schwellendosis an UV-Bestrahlung, die zu einem Erythem der Haut führt und für jeden Menschen individuell verschieden ist, siehe 2.4) an. Weitere Studien konnten diese Schutzeffekte bestätigen [65,66].

In einer weiteren Studie wurde nach täglicher Gabe von 30 mg β -Carotin über 10 Wochen die Sensitivität gegenüber UV-Strahlung vermindert [66]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die Einnahme von 24 mg pro Tag über 12 Wochen ebenfalls zu Schutzeffekten führten [67]. Es liegen aber auch einige Studien vor, in denen, insbesondere nach kurzzeitiger Intervention, keine Wirkung erzielt wurde [4]. Zu diesem Ergebnis kam z.B. eine Studie mit einer Einnahme von 90 mg β -Carotin pro Tag über drei Wochen [68].

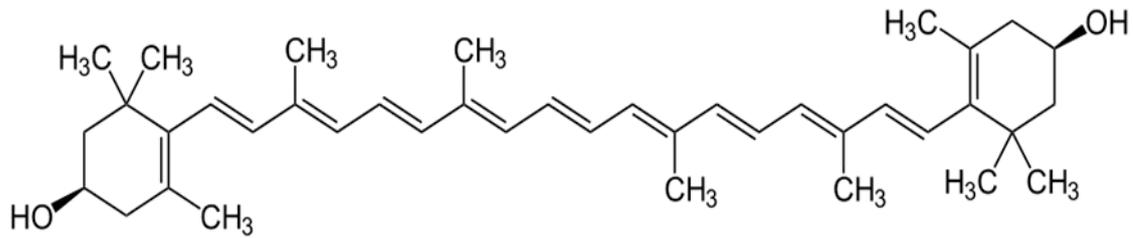


Abbildung 7: Zeaxanthin

Lutein besitzt antioxidative, antiinflammatorische und lichtschützende Eigenschaften und ist neben β -Carotin und Lycopin eines der häufigsten Carotinoide im menschlichen Blut [73]. Auch Lutein muss, wie die übrigen Carotinoide, mit der Nahrung aufgenommen werden, da der Mensch nicht zu einer *de-novo*-Synthese fähig ist. In einer Interventionsstudie, bei der über einen Zeitraum von zwölf Wochen die orale Gabe von Lutein (10 mg) und Zeaxanthin (0,6 mg) mit der topischen Applikation von Lutein und Zeaxanthin verglichen wurde, konnte bei beiden Interventionen ein Anstieg der photoprotektiven Aktivität beobachtet werden [74].

1.5 Immunmodulatorische Zytokine als molekulare Marker für UV-induzierte Hautschäden

UV-Strahlung führt zur Schädigung vorwiegend epidermaler Chromophore, zur Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren und zu einer inflammatorischen Reaktion in der Haut. Im Rahmen der Immunantwort werden die inflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-6 am Ort der Schädigung freigesetzt und gelangen in die Zirkulation.

Sie führen, gemeinsam mit dem Zytokin TNF- α , zu systemischen Effekten wie einem Anstieg der Körpertemperatur. Des Weiteren induzieren sie in der Leber die Produktion von Akute-Phase-Proteinen wie Gerinnungsfaktoren, Komplementkomponenten und Protease-Inhibitoren [75]. UV B (280-320 nm) ruft die meisten Veränderungen der DNS hervor und induziert Reparaturmechanismen. Die Strahlen des UV A (320-400 nm) werden von der DNS viel schwächer absorbiert und können die Haut tiefer penetrieren als UV B Strahlung. Das Wirkspektrum des UV A beruht auf der Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies und toxischer Photoprodukte. Carotinoide zeigen nicht nur spezifische antioxidative Wirkung, sondern können auch die durch UV-Strahlung induzierte

Genexpression beeinflussen und so bestimmte Parameter des Immunsystems regulieren [61].

1.5.1 IL-1, IL-6 und IL-10

Die Zytokine IL-1, IL-6 und IL-10 (Interleukin 1, Interleukin 6 und Interleukin 10) sind Teile des Immunsystems.

Ein zentrales Zytokin für die Auslösung entzündlicher Reaktionen in der Haut ist das Interleukin 1 (IL-1) [76]. IL-1 ist ein proinflammatorischer Botenstoff, der konstitutiv von Keratinozyten sezerniert wird. Die Freisetzung von IL-1 (in erster Linie die Unterform IL-1 α) wird über verschiedene Stimuli bzw. Traumata, wie zum Beispiel UV-Strahlung, ausgelöst. IL-1 bewirkt die kaskadierte Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Zytokine und trägt zur inflammatorischen Reaktion der Haut bei [77]. In Untersuchungen am Menschen wurde nachgewiesen, dass die IL-1-Aktivität im Serum nach Exposition gegenüber UV B-Strahlung erhöht ist [78].

Interleukin 6 (IL-6) wird von ruhenden Keratinozyten in sehr geringen, bei einer akuten Entzündung (z.B. bei einem Sonnenbrand) jedoch in hohen Mengen produziert. IL-6 besitzt sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften. Es scheint bei der Aktivierung von u.a. Hämoxygenase im Rahmen der durch UV A-Strahlung ausgelösten photoprotektiven Reaktion beteiligt zu sein [79]. Ferner induziert IL-6 autokrin und parakrin in Fibroblasten die Bildung von MMP-1 [80].

Auch Interleukin 10 (IL-10) hat zahlreiche Funktionen in der Regulation des Immunsystems. Die Freisetzung nach UV-Strahlung scheint abhängig von der Induktion von DNS-Schäden zu sein [81].

1.5.2 TNF- α

Zu den wichtigsten proinflammatorischen Botenstoffen gehört der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α). Es konnte gezeigt werden, dass eine Carotinoid-reiche Ernährung den Entzündungsstatus beeinflusst und die TNF- α Konzentration gesunder Probanden reduzierte [82]. Durch die Behandlung von Keratinozyten mit einem xanthophyllischen Carotinoid konnte eine verringerte UV-B und UV-C induzierte Freisetzung von TNF- α nachgewiesen werden, was für einen Schutz vor UV-induzierter Apoptose spricht [83].

1.6 Ziele der Arbeit

Carotinoide bieten die Möglichkeit einer Verzögerung oder Prävention der UV-induzierten Hautschädigung. Deren Einsatz setzt jedoch Kenntnisse über das Verhalten und die Menge dieser Substanzen im menschlichen Organismus voraus.

Das primäre Ziel dieser randomisierten, multizentrischen, doppel-blinden, Placebo-kontrollierten Interventionsstudie am Menschen war es, den Effekt eines Carotinoid-haltigen Nahrungsergänzungsmittels auf den Schutz der Haut vor UV-induzierten photo-oxidativen Schäden gegenüber Placebo zu untersuchen, wenn dieses über einen Zeitraum von 12 Wochen zweimal täglich eingenommen wurde. Hierbei wurde ein Nahrungsergänzungsmittel verwendet, bei dem es sich um einen Lycopin-reichen natürlichen Extrakt aus Tomaten handelt.

Die Verminderung der UV-induzierten Hautschädigung durch die Supplementierung mit dem pflanzlichen Nahrungsergänzungsmittel aus Tomaten soll primär an Hand der minimalen Erythemdosis (MED) und der Erythemintensität nach UV-Bestrahlung untersucht werden.

Des Weiteren wurde die Expression verschiedener inflammatorischer Zytokine nach Bestrahlung im Vergleich zu unbestrahlter Haut ermittelt.

Diese Studie war die Fortsetzung einer Studie, die 2010 im Leibnitz Institut für umweltmedizinische Forschung (IUF) durchgeführt wurde. In der 2010 durchgeführten Studie wurde die Wirkung einer 12-wöchigen, zweimal täglichen Supplementierung eines ähnlichen Produkts auf UV A1- und UV A / B-induzierte Hautschäden untersucht. An der Studie nahmen 29 Probanden teil (26 männliche, 4 weibliche) mit einem durchschnittlichen Alter von 41 Jahren mit den Hauttypen II oder III nach Fitzpatrick. Primärer Endpunkt war die Analyse von Hautbiopsien auf molekulare Marker für Hautschäden nach UVA1 oder UVA/B-Exposition. Sekundäre Endpunkte waren die Analyse von Hautbiopsien auf Marker für Hautalterung sowie verschiedene nicht-invasive, physiologische Hautmessungen (Hautfeuchtigkeit, transepidermaler Wasserverlust, Hautelastizität, Erythembildung).

In dieser Vorläuferstudie konnte insgesamt eine schützende Wirkung nachgewiesen werden [84].

Es handelte sich um eine Cross-Over-Studie, wohingegen in der aktuellen Studie mit parallelen Gruppen gearbeitet wird.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Es handelte sich um eine mit einem Nahrungsergänzungsmittel durchgeführte und daher nicht dem deutschen Arzneimittelgesetz (AMG) unterliegende placebokontrollierte, doppelt-verblindete, randomisierte, multizentrische klinische Studie am Menschen. Die Studie dauerte von Januar 2014 bis September 2016 und wurde an mehreren Zentren durchgeführt. Positive Voten der zuständigen Ethik-Kommissionen lagen vor. Dem Studienablauf in Düsseldorf wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter dem Aktenzeichen 4194 (Professor J. Krutmann) zugestimmt. Das Studiendesign wurde in Dundee durch die dortige Kommission der Universität Dundee, Schottland, Großbritannien unter der Referenznummer SC015096, geprüft.

Die Auswahl der Stichprobengröße basierte auf Erfahrungen aus früheren Untersuchungen des Sponsors mit verschiedenen Carotinoid-reichen Formulierungen wie Lyc-O-Mato und Lyc-O-Guard. Hierbei war der Schutz vor UV-induziertem Erythem der primäre Endpunkt [52] [73] [109]. Die Fallzahl korrespondiert mit einem signifikanten Unterschied zwischen Verum und Placebo nach 12 Wochen Behandlungsdauer mit einer Power von 80% und einer Drop-out-Rate von 10%.

215 freiwillige Probanden wurden insgesamt für die Studie gescreent und 149 eingeschlossen. Mit 121 Probanden (81,2%) stellte Düsseldorf die größte Probandengruppe, in Dundee wurden 28 Probanden (18,8%) untersucht.

Die Probanden mussten diverse Kriterien erfüllen (siehe Kapitel 2.2). Die Studienteilnehmer wurden randomisiert zwei Gruppen zugeteilt. Eine Gruppe (96 Probanden) nahm zweimal täglich eine Kapsel des Lycopin-reichen Tomatenextraktes ein. Die zweite Gruppe bekam das Placebo (94 Probanden).

Bei dem zu prüfenden Nahrungsergänzungsmittel handelt es sich um einen Carotinoid-reichen natürlichen Extrakt aus Tomaten. Er enthält neben Lycopin noch andere, ebenfalls gut erforschte, aktive Pflanzeninhaltsstoffe: 7,5 mg Lycopin, 2,9 mg Phytoen und Phytofluen, 0,4 mg Beta-Carotin, 2,8 mg Tocopherole und 2 mg Carnosinsäure aus Rosmarin pro Kapsel. Das Nahrungsergänzungsmittel wurde in Weichgelatine kapseln

zur oralen Einnahme angeboten und bereits zuvor in mehreren Studien erprobt. Als Kontrolle diente ein identisch aussehendes Placebo aus mittelkettigen Triglyceriden in der gleichen Darreichungsform.

Zu Beginn der Studie mussten alle Probanden eine fünfwöchige Auswaschphase durchlaufen, in der auf Vitaminpräparate und Lycopin-haltige Lebensmittel verzichtet werden musste. Die Einhaltung der Diät wurde durch ein Nahrungstagebuch und Kontrolle der Blut-Phytoen-Werte kontrolliert. Anschließend folgte ein dreimonatiger Einnahmezeitraum des jeweiligen Produktes, an den sich eine einmonatige *Follow-up*-Phase anschloss. So betrug die Gesamtdauer der Studie für alle Probanden 17 Wochen. Die Studie wurde parallel in zwei Zentren durchgeführt. Die Gesamtstudiendauer betrug etwa zwei Jahre.

2.2 Probandenkollektiv

An der Studie nahmen 149 gesunde, volljährige Probanden teil. Vier Probanden beendeten aus Testprodukt-unabhängigen Gründen die Studie vorzeitig (*Drop Outs*).

Die Auswertung umfasst nur Probanden ohne schwerwiegende Protokollverletzung, da die Studienergebnisse erheblich von den Probanden mit Protokollverletzungen beeinflusst sind und in ihrer Aussagekraft eingeschränkt werden können. Die Daten von 145 Teilnehmern konnten vollständig analysiert werden.

Die Ausschlußkriterien der Studie lauteten wie folgt: Body Mass Index (BMI) über 30 kg/m²; Schwangerschaft und Stillzeit; Genuss von Alkohol; Vorliegen oder Historie von Photodermatosen; bekannte Hautkrebskrankungen in der Eigen- oder Familienanamnese; Hochrisikogruppen für HIV-Infektionen oder dem Vorliegen anderer Infektionserkrankungen (Hepatitis A, B, C, Tuberkulose usw.); Vorliegen von metabolischen, endokrinen oder kardiovaskulären Erkrankungen; angeborene oder erworbene Blutgerinnungsstörung oder Einnahme von blutgerinnungshemmenden Mitteln; Vorliegen eines Hauttyps III-IV nach Fitzpatrick; Vorliegen von Allergien auf Betäubungsmittel; Vorliegen von Allergien auf Bestandteile des Nahrungsergänzungsmittels; Lycopin Wert 0.2-0.4 nmol/ml nach der Auswaschphase; Nüchternglukosespiegel > 110 mg/dl; Safety Parameter außerhalb akzeptabler Grenzen. Die Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien erfolgte durch eine Anamnesenerhebung. Es wurden 146 Frauen und 44 Männer eingeschlossen. Die Altersverteilung reichte von 20 bis 55 Jahre mit einem Durchschnittsalter von 40.9 ±10.3 Jahren (Frauen) bzw. von 40.9 ±10.1 Jahren (Männer). Es handelte sich durchwegs um gesunde,

hellhäutige Probanden mit den Hauttypen I - II nach Fitzpatrick. (Zur Einteilung der Hauttypen nach Fitzpatrick siehe Tabelle 1).

Die Probandinnen mussten einen regelmäßigen Menstruationszyklus haben. Die Teilnehmer an der Studie hatten einige Ernährungsempfehlungen zu beachten, die von drei Wochen vor der Intervention bis zum Studienende einzuhalten waren, um Ergebnisverzerrungen zu vermeiden. So hatten die Probanden die Auflage, während der Studienteilnahme keine anderen Nahrungsergänzungsmittel oder Vitaminpräparate einzunehmen und auf den regelmäßigen Verzehr von Lebensmittel zu verzichten, die hoch Lycopin-haltig (z.B. Tomaten in jeder Zubereitungsart, Papaya, Grapefruit) sind. Ferner sollten sich die Probanden nicht übermäßig der Sonne aussetzen und auf den Besuch von Solarien oder ähnlichen Einrichtungen während der Zeit der Studienteilnahme verzichten.

Die Probanden durften während der Studienteilnahme und in den drei Monaten vor Studienstart nicht an einer anderen klinischen Studie teilnehmen.

Hauttyp	Hautfarbe	Entwicklung von Sonnenbrand/ Sonnenbräune
I	sehr helle Haut, Sommersprossen, rote Haare, helle Augen (keltischer Typ)	verbrennt praktisch immer/ bräunt praktisch nie
II	helle Haut, blonde Haare, helle Augen (skandinavischer Typ, Kaukasier)	verbrennt leicht/bräunt minimal
III	hellbraune Haut, hellbraune bis dunkelbraune Haare, helle oder braune Augen	verbrennt gelegentlich/ bräunt gut
IV	mittelbraune Haut, dunkle Haare, dunkle Augen (mediterrane Typ)	verbrennt selten/ bräunt sehr gut
V	dunkelbraune Haut (asiatischer Typ, Orientalen, Lateinamerikaner)	verbrennt sehr selten/ bräunt sehr gut
VI	schwarze Haut (Afrikaner/ Afroamerikaner)	verbrennt extrem selten bis gar nicht/ sehr dunkle Pigmentierung

Tabelle 1: Hauttypen I bis VI nach Fitzpatrick, nach [10].

2.3 Studienablauf

Es handelte sich um eine multizentrische klinische Studie. Die Studie wurde in Düsseldorf (Deutschland), und Dundee (Großbritannien) durchgeführt. Düsseldorf war das führende Zentrum.

Die Studiendauer betrug etwa 120 Tage. Die Studie war in elf Untersuchungstage (UT) (Studienzentrum Düsseldorf) bzw. acht Untersuchungstage (Studienzentrum Dundee), verteilt auf ca. 17 Wochen, gegliedert. Einen Überblick über den Ablauf der Studie gibt Tabelle 2.

Der erste Studientag war der *Screening*-Untersuchungstermin [UT 0]. Nachdem die Probanden schriftlich und mündlich über die Studie aufgeklärt worden waren und die Einverständniserklärung eigenhändig unterzeichnet und damit der Teilnahme an der Studie zugestimmt hatten, wurde die Checkliste der Ein- und Ausschlusskriterien

überprüft. Die Probanden wurden in die Studie aufgenommen, wenn alle Einschlusskriterien erfüllt waren und keines der Ausschlusskriterien vorlag. Es erfolgte ein medizinisches *Screening* unter Einbezug persönlicher Daten und der Anamnese, eine körperliche Untersuchung mit Messung von Blutdruck und Herzfrequenz, ein Urin-Schwangerschaftstest, die Bestimmung von Größe und Gewicht sowie eine Basisuntersuchung. Des Weiteren wurde eine Blutprobe zur Testung der Safety Parameter und zur Bestimmung der Lycopin Blutspiegel entnommen (siehe Kapitel 2.6). Zusätzlich wurde - nur im Düsseldorf Studienzentrum - ein DTH-Test (Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ) auf Tbc und Candida durchgeführt. Eine Asynergie führte zum Ausschluss (siehe Kapitel 2.7). Nach Einschluss in die Studie erfolgte für alle Probanden eine fünfwöchige Auswaschphase, während derer sie die Ernährungsempfehlungen - wie während der gesamten Studiendauer - zu befolgen hatten. Diese schlossen insbesondere den Verzicht auf Tomaten oder Tomatenprodukte ein. Nach der Auswaschphase wurde eine Blutprobe zur Bestimmung der Lycopin Blutspiegel entnommen. Ein Lycopin Wert von 0.2-0.4 nmol/ml führte zum Ausschluss. Daraufhin wurde bei jedem Studienteilnehmer die Hautfarbe mittels Chromametrie im Bereich des Gesäßes ermittelt. Anschließend wurde jeder Studienteilnehmer einer UV B- Bestrahlung ausgesetzt zur Bestimmung der individuellen MED (minimale Erythemdosis) mithilfe einer Lichttreppe (siehe Kapitel 2.4). Am darauf folgenden Tag wurde die individuelle minimale Erythemdosis (MED) abgelesen und zwei Areale mit dem 1,25-fachen der ermittelten MED bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde mit dem Chromameter die Hautrötung bestimmt (siehe Kapitel 2.5) und aus einem bestrahlten wie auch aus einem unbestrahlten Referenzareal je eine Hautstanze mit 4 mm Durchmesser entnommen (siehe Kapitel 2.8). Zusätzlich wurde (nur im Düsseldorf Studienzentrum) der DTH-Test im zweiten bestrahlten Areal wiederholt und nach zwei Tagen abgelesen. Im Anschluss wurde die Randomisierung vorgenommen. Diese erfolgte stratifiziert nach Alter und Geschlecht, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Die Probanden wurden in zwei Altersgruppen eingeteilt: 25-38 und 39-50. Die Testprodukte wurden an die Probanden ausgegeben. Vier Wochen nach Beginn der Kapseleinnahme wurde erneut der Lycopinspiegel bestimmt und nach acht Wochen durch einen Telefonkontakt die Compliance überprüft. Nach zwölf Wochen wurde der finale Lycopinspiegel bestimmt. Nun wurde auch in neuen, zuvor nicht bestrahlten, Testarealen erneut im Bereich des Gesäßes die Hautfarbe mittels Chromametrie ermittelt und die individuelle MED bestimmt. Die Probanden

wurden anschließend erneut mit dem 1,25-fachen der zu Beginn der Studie bestimmten MED bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde die Hautrötung gemessen, die MED abgelesen und aus einem bestrahlten wie auch aus einem unbestrahlten Referenzareal je eine Hautstanze von 4 mm Durchmesser entnommen. Schließlich wurde, wieder nur im Düsseldorf Studienzentrum, ein DTH-Test im zweiten bestrahlten Areal durchgeführt und nach zwei Tagen abgelesen.

Regelmäßig wurden unerwünschte Ereignisse abgefragt und es wurde kontrolliert, ob die Probanden sich weiterhin an den geforderten Lebensstil und die geforderte Ernährung hielten. Die Produkteinnahme wurde durch ein Probandentagebuch, in welchem täglich der Verbrauch des Produktes dokumentiert wurde, durch Zählung der zurückgebrachten Testpräparate sowie durch die Bestimmung der Lycopinkonzentration im Blut kontrolliert.

	Screening I		Wash-out-Phase					Baseline	Follow-up Visit 1	Follow-up Visit 2 Phone call	Ende der Studie		
	Tag 1	Tag 3	Tag 21**	Tag 31	Tag 32	Tag 33	Tag 119				Tag 120	Tag 122	
Anamnese/Daten der Probanden	X												
Körperliche Untersuchung. Vital signs	X												
Einverständniserklärung	X												
Labor Safety Parameter	X							X					
Lycopin Blutspiegel	X						X	X					
DTH Test (*)	X					X						X	
Ableitung des DTH Test (**)		X					X						X
Colorimetrie der Testfelder				X							X		
MED-Ermittlung mittels Lichttreppe				X							X		
MED Ablebung					X							X	
Bestrahlung mit 1,25-facher MED					X						X		
Entnahme der Gewebeprobe												X	
Randomisierung								X					
Produkteinnahme													
Einhaltungskontrolle (Lebensstil und Ernährung)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Unerwünschte Ereignisse/schwerwiegende unerwünschte Ereignisse (durch die Studie, Erinnerung bei CNI)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Gleichzeitige Medikation (während der Studie, Erinnerung bei CNI)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Einhaltung (Produkteinnahme)								X	X	X	X	X	X

* = nur Studienzentrum Düsseldorf

Tabelle 2: Studienablauf

2.4 Induktion des Erythems

Die Probanden wurden zu drei Zeitpunkten im Verlauf der Studie an verschiedenen Arealen des unteren Rückens bestrahlt.

Als Bestrahlungsgerät und zur Bestimmung der MED diente der Dermalight® 80 MED-Tester. Wird die Haut der UV-Strahlung ausgesetzt, führt dies ab einer gewissen Schwellendosis zu einem Erythem. Diese Schwellendosis ist für jeden Menschen unterschiedlich und wird als minimale Erythemdosis (MED) bezeichnet. Für jeden Probanden wurde die individuelle MED mithilfe einer sog. Lichttreppe ermittelt. Die Belichtungseinheit ist in 10 Lichttherapie Testfelder eingeteilt. Die Dosierung in den einzelnen Testfeldern ergibt sich durch unterschiedliche Abschattung der austretenden UV-Strahlung. Im Zuge dieses Verfahrens wurden zehn kleine Hautareale im Bereich des unteren Rückens von insgesamt ca. 11x4 cm mit unterschiedlichen Dosierungen UV-B Breitband bestrahlt. Die individuelle MED des Probanden folgt aus der Bestrahlungsdosis, die ein soeben sichtbares Erythem verursacht. Im Verlauf der Studie wurde das Erythem dann durch Bestrahlung eines neuen Feldes von ca. 1x1 cm mit dem 1,25-fachen der individuellen MED hervorgerufen. Als Indikator für das Ausmaß des Erythems wurde der Δa^* -Wert verwendet (siehe Kapitel 2.5).

Dieser bezeichnet die Differenz des chromametrisch festgestellten Rötungswertes aus Messungen 24 Stunden nach der Bestrahlung und unmittelbar vor der Bestrahlung.

2.5 Messung der Hautfarbe

Das Minolta Chromameter ist ein präzises Remissions-Farbmessgerät zur Messung von Körperfarben nach dem Dreibereichs-Verfahren [87].

Das Chromameter CR 300 kam in dieser Studie zur Anwendung, um die Stärke der Erythembildung zu messen.

Es besteht aus einem Messkopf und einem Computer, der die Daten berechnet. Das Chromameter imitiert in der Erkennung der Farben rot, grün und blau das menschliche Auge [85].

In dem Messgerät befindet sich eine polychromatische Xenon-Blitzröhre, die den zu untersuchenden Bereich mit dem kompletten sichtbaren Spektrum beleuchtet [86]. Außerdem enthält das Messgerät sechs Silizium-Photozellen, wobei drei zur Messung des reflektierten Lichtes dienen und drei zur Messung des Senders, also der Lichtquelle. Nur das reflektierte Licht wird so für die Farbanalyse genutzt.

Das empfangene Licht mit Wellenlängen von 450, 560 und 600 nm wird von den Photozellen in Strom umgewandelt, wobei die Stärke des Stroms proportional zur Helligkeit ist. Der Strom wird schließlich in ein digitales Signal konvertiert, das der Computer als bestimmte Spektralwerte gemäß dem im CIELAB-System (Commission Internationale de l'Eclairage) verwendeten Werten L^* , a^* und b^* ausgibt. Bevor das Gerät benutzt werden kann, muss es mit der Referenzfarbe Weiß kalibriert werden [88]. Im CIELAB-System beschreiben die drei Werte L^* , a^* und b^* einen dreidimensionalen Raum. In diesem Farbraum nimmt jede Farbe eine eigene Position ein und wird durch die Werte L^* , a^* und b^* wie in einem kartesischen Koordinatensystem exakt definiert, siehe Abbildung 8. Die Spektralwerte, welche vom Computer berechnet wurden, können über verschiedene Formeln in das CIELAB-System umgerechnet werden [88].

Bei diesem System verhält es sich so, dass der L^* -Wert die Helligkeit (=luminance) der Oberfläche beschreibt, die von totalem Schwarz (Wert = 0) bis hin zu reinem Weiß reichen kann. Der a^* -Wert drückt die Rot-Grün-Achse aus, die sich von +60, rote Oberfläche, bis zu -60, grüne Oberfläche, erstreckt. Schließlich steht der b^* -Wert für die Gelb-Blau-Achse, die von +60, gelbe Oberfläche, bis zu -60, blaue Oberfläche reicht [89].

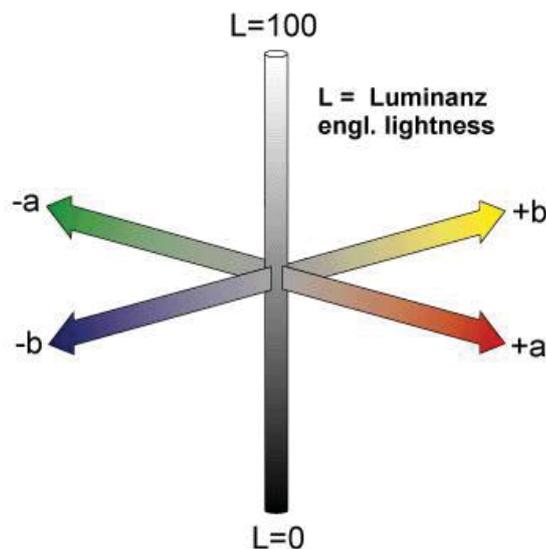


Abbildung 8: Darstellung des L^* , a^* , b^* Farbsystems, Abbildung nach [90]

Das Erythem kann als Versagen der Sonnenprotektion der Haut erachtet werden und ist ein früher Marker für UV-Schäden.

Als Konsequenz wurde für diese Studie der a^* -Wert als primärer Parameter gewählt. Er steht für die nicht invasive Messung des Erythems. Ein positiver Effekt der Testprodukte würde bedeuten, dass der post-irradiale a^* -Wert nach der dreimonatigen Gabe des Testpräparates kleiner wäre als der a^* -Wert, der am Baseline-Termin zu Beginn der Studie nach der Bestrahlung gemessen wurde.

Im konkreten Studienverlauf war es so, dass zunächst für jeden Probanden die minimale Erythemdosis (MED) bestimmt wurde. Danach wurde ein kleines Testareal auf dem unteren Rücken des Probanden einer UV-Dosis ausgesetzt, die der 1,25-fachen persönlichen MED entspricht. Vor, unmittelbar nach und vor der Biopsieentnahme 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde der a^* -Wert bestimmt. Diese Messungen wurden vor Beginn der Einnahme und am Ende der Studie durchgeführt. Die gleiche anzuwendende Dosis (1,25-fache MED), die zu Beginn ermittelt wurde, wurde auch am Ende angewendet, um die Verbesserung hinsichtlich des a^* -wertes untersuchen zu können. Dennoch wurde die minimale Erythemdosis am Ende der Studie erneut bestimmt, um einen Vergleich mit jener zu Beginn der Studie ziehen zu können.

Um die Zunahme des Rotanteils, also die Erythembildung, zu erfassen und einen Vergleich vor und nach Bestrahlung zu ziehen, wird Δa^* verwendet [85,86]. Δa^* beschreibt die Differenz der Rötung nach zur Rötung vor der Bestrahlung. Unter Einnahme des Nahrungsergänzungsmittels sollte Δa^* kleiner werden, wenn eine Verringerung der Stärke der Erythembildung, also im Grunde eine Verringerung des Sonnenbrandes, erzielt werden kann.

2.6 Bestimmung der Blutparameter

Nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung des Probandes erfolgten Blutabnahmen aus einer Vene im Bereich der Armbeuge.

Basal wurde am Anfang und am Ende der Studie bei allen Probanden Blutbild, Nüchternblutzucker und Harnsäure, Kreatinin und Harnstoff, ASAT (Aspartataminotransferase), ALAT (Alaninaminotransferase) und GGT (Gammaglutamyltransferase) bestimmt. Safety Parameter außerhalb akzeptabler Grenzen

fürten zum Ausschluss (Hämatokrit <34%; Hämoglobin <11 g; Erythrozyten (RBC) <3,5 × 10¹²/L, Leukozyten <3500 × 10⁹/L; Thrombozyten <120 × 10⁹/L, Kreatinin >2,0 mg/dl, Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST) und alkalische Phosphatase (ALP) > 1,2 × obere Normgrenze (ULN); Bilirubin >1,2 mg/dl).

Weiterhin erfolgte dreimal eine Blutabnahme für die Bestimmung der Lycopinkonzentration. Es wurden je Blutabnahmetermin zwei Saugröhrchen entnommen. Diese wurden zentrifugiert und das Blutserum bei -80°C eingefroren. Die Analyse wurde in einem Labor des Sponsors in Israel durchgeführt.

2.7 Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (DTH Test)

Bei dem Delayed-Type-Hypersensitivity (DTH) Hauttest handelt sich um einen intradermalen antigenspezifischen Hauttest, um Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ, wie zum Beispiel bei Exposition gegenüber Tuberkulose oder Candida, festzustellen. Es ist beschrieben, dass UV Exposition das Immunsystem beeinflussen und die DTH-Reaktionen supprimieren kann [91,92].

Der Test wurde durch intrakutane Injektion von 0,1 ml der Testantigene (Tuberkulin bzw. Candida) getestet. Isotonische Salzlösung wurde als negative Kontrolle verwendet. Der DTH-Skin-Test wurde als positiv gelesen, wenn die Induration 48 Stunden nach der Inokulation 10 mm oder mehr betrug. Nach 48 Stunden wurde der maximale Durchmesser des indurierten Teils und der Durchmesser im rechten Winkel gemessen. Eine Summe der beiden senkrechten Durchmesser von mindestens 10 mm wurde als positiv angesehen. Zusätzlich wurde die durchschnittliche Größe aller DTH-Tests in jedem Probanden berechnet.

2.8 Gewebeproben

An zwei Terminen wurden jedem Probanden je zwei Hautgewebeproben von 4 mm Durchmesser aus dem Gesäßbereich entnommen. Unter lokaler Betäubung mit

Mevarin^(R) 1% (Wirkstoff: Mepivacainhydrochlorid) wurde je eine Stanze aus einem unbestrahlten und eine aus dem bestrahlten Areale gewonnen. Die erhaltenen Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.8.1 Bestimmung molekularer Marker

Die Analyse der Gewebeproben aus Düsseldorf und Dundee wurde im IUF durchgeführt. Die in Kapitel 1.5 beschriebenen molekularen Marker wurden durch eine real time RT-PCR bestimmt. Die Gewebeproben wurden zuerst in flüssigem Stickstoff bei -80 °C eingefroren. Für die Analyse wurden die Gefriereröhrchen unter Verwendung von einer Schutzbrille und Schutzhandschuhen aus dem Lagertank entnommen. Die Isolierung der RNS erfolgte nach der Methodenvorschrift SOP13_v1 RNA Isolierung aus Hautgewebe. Für die Isolation der RNS wurden die gefrorenen Hautbiopsien in 600 µl Lysepuffer des PeqGold Total RNS Kit (PeqLab, Erlangen, jetzt VWR International GmbH, Darmstadt) für drei Minuten bei 30 Hz in einer MixerMill MM300 (Retsch, Haan) mit einer Edelstahlkugel aufgeschlossen. Die RNS-Konzentration wurde photometrisch bei 260/280 nm (Biophotometer, Eppendorf AG, Hamburg) bestimmt. Für die cDNS-Synthese (nach der Methodenvorschrift SOP07_v2 cDNA Synthese) wurden 50 ng RNS eingesetzt. Die Reverse Transkription erfolgte nach dem Protokoll für M-MLV RT (Invitrogen, Karlsruhe, jetzt Thermo Fisher Scientific, St. Leon):

- Denaturierung der RNS in Gegenwart von Primer und dNTP für fünf Minuten bei 65 °C.
- cDNS-Synthese nach Protokoll (Tabelle 3):

Zeit	Temperatur
10 min.	25 °C
50 min.	37 °C
15 min.	70 °C
∞	4 °C

Tabelle 3: cDNS-Synthese

Die PCR-Reaktionen wurden unter Nutzung des Absolute QPCR SYBR Green Mix (Thermo Fisher Scientific, St. Leon) in einem CFX384 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) anhand der Methodenvorschrift SOP08_v2 Real-Time PCR durchgeführt. Die Beschickung der 384-Well Platten erfolgte mit Hilfe eines automatischen Pipetiersystems epMotion 5070 (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf). Für jedes Gen wurde ein spezifisches Primerpaar mit der Software Primer Express™ 2.0 (Applied Biosystems, Darmstadt) erstellt und bei der Firma Biogio (Nijmegen, Niederlande) synthetisiert, vgl. Tabelle 4.

Gen	Primerpaar	Accession No	Referenz
18S rRNS (Haushaltgen)	5' -GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTG-3' 5' -CATTCTTGCCAAATGCTTTTCG-3'	X03205.1	[93]
IL1 α	5' -TGTATGTGACTGCCCAAGATGAA-3' 5' -ACTACCTGTGATGGTTTTGGGTATC-3'	NM_000575.4	[94]
IL10	5' -AAGACCCAGACATCAAGGCG-3' 5' -AATCGATGACAGCGCCGTAG-3'	NM_000572.3	[95]
IL6	5' -CCTCGAGCCCACCGGGAACG-3' 5' -AACTGGACCGAAGGCGCTTGTG-3'	NM_000594.3	[96]
TNF α	5' -GGAGAAGGGTGACCGACTCA-3' 5' -TGCCAGACTCGGCAAAG-3'	NM_000594.3	[97]

Tabelle 4: Gene und Primer der real time RT-PCR

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: Aktivierung der Taq-Polymerase bei 94 °C für 15 Minuten; Denaturierung bei 95 °C für 20 Sekunden; Primerhybridisierung bei 55 °C für 20 Sekunden; Elongation bei 72 °C für 30 Sekunden. Jede Probe wurde einer doppelten PCR unter Verwendung der geeigneten Primerpaare für 45 bis 50 Zyklen unterzogen. Als interner Standard wurde das Haushaltgen 18S rRNS zur Konzentrationskontrolle der erstellten Proben verwendet, dessen Expression idealerweise keine Veränderungen im Laufe der Studie zeigen sollte.

Die Schwankungsbreite (Standardabweichung) der Doppelbestimmungen lag bei 0,72%, was dem Bereich anderer Studien mit Werten zwischen 0 % und 5 % entspricht [98]. Zum Vergleich der relativen Gen-Expression in den Kontroll- und behandelten Biopsien wurde die Berechnung mit der 2- $\Delta\Delta$ CT-Methode verwendet [99].

2.9 Statistik

Die primäre statistische Auswertung der Studienergebnisse erfolgte durch MediStat, Israel, mit dem Statistikprogramm von SAS® Version 9.3 (SAS Institute, Cary North Carolina). Alle gemessenen Parameter wurden einzeln aufgelistet. Die kategorialen Variablen wurden zusammengefasst und in übersichtlichen absoluten und relativen Häufigkeitstabellen dargestellt. Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (standard deviation - SD), Median, Minimum und Maximum angegeben.

Zur Analyse der Lycopin-, Phytofluen- und Phytoenspiegel innerhalb einer Behandlungsgruppe und zwischen den Gruppen wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test für die Varianzanalyse angewandt. Die Normalverteilung der Stichproben wurde zuvor mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft.

Die Unterschiede zwischen MED, der Hautrötung a^* und Genexpression wurden durch den parametrischen T-Test oder den nichtparametrischen Mann-Whitney-Rangsummentest untersucht.

Die statistische Signifikanz zwischen den Genexpressionsdaten innerhalb der Studiengruppen wurde mit dem Wilcoxon-Signed-Rank-Test für nicht-parametrische Daten getestet. Der Vergleich zwischen der Verum- und der Placebogruppe erfolgte mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney Rangsummentest. Die gesamte statistische Analyse war zweiseitig mit einem akzeptierten Signifikanzniveau von 95% bzw. $p < 0.05$. Für die sekundäre Auswertung der Studie und die Erstellung der Grafiken wurde überwiegend das in Windows-Office integrierte Software-Programm Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corp., Unterschleißheim, Germany) bzw. SigmaPlot 14.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) benutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Analysepopulation

Für die Analysen waren folgende Populationen definiert:

- Die Sicherheitspopulation beinhaltet alle randomisierten Probanden. Alle Sicherheitsanalysen erfolgen auf Basis der Sicherheitspopulation.
- Die ITT-Population beinhaltet alle Probanden, die mindestens eine Dosis des Studienpräparates bzw. Placebo erhielten. Analysen erfolgen nach zugewiesener Behandlung.
- Die Per-Protokoll-Population beinhaltet alle Probanden der ITT-Population, die keine schwerwiegenden Protokollverletzungen aufweisen und die die Studie beendet haben.
- Die Post-hoc Subgruppenanalyse beinhaltet alle Probanden, die das Nahrungsergänzungsmittel aus Tomaten (Verum) erhalten haben, die eine Steigerung der Lycopin Werte >50 ng/mL am Ende der Studie gezeigt haben und Probanden, die Placebo erhalten haben, die keine Steigerung der Lycopin Werte am Ende der Studie gezeigt haben.

Die Analysepopulation ist in

Tabelle 5 dargestellt.

Analysepopulation	Verum	Placebo	Alle
	N	N	N
Sicherheitspopulation	75	74	149
Intention-to-treat-Population (ITT)	75	74	149
Per-Protokoll-Population (PP)	71	74	145
Post-hoc Subgruppenanalyse	31	25	56

Tabelle 5: Analysepopulation

3.2 Charakterisierung der Studienpopulation

215 freiwillige, volljährige Probanden im Alter von 20 bis 55 Jahren wurden insgesamt für die Studie gescreent. Bei 10 Probanden lag eine Anergie gegenüber dem Hauttest vor und bei 33 Probanden war nach der Auswaschphase der Lycopinwert zu hoch, so dass sie nicht randomisiert werden konnten. 17 Probanden erfüllten nicht alle Ein- und Ausschlusskriterien und galten als Screening failure (BMI, MED, Labor außerhalb der zulässigen Grenze); 6 Probanden zogen ihre Zustimmung vor der Randomisierung zurück. 149 Probanden wurden insgesamt in die Studie eingeschlossen.

Mit 121 Probanden (81,2%) stellte Düsseldorf die größte Probandengruppe, und Dundee rekrutierte 28 Probanden (18,8%).

Tabelle 6 zeigt die Aufteilung der Probanden für die einzelnen Zentren.

Studienzentrum	Studienpopulation	Anzahl N
1: Düsseldorf	Gescreente Probanden	169
	Screening failure	7
	Anergie nach Hauttest	10
	Lycopin out of range	28
	Zustimmung zurückgezogen	3
	Randomisierte Probanden	121
	Zustimmung zurückgezogen	2
	Adverse Event	2
	2: Dundee	Gescreente Probanden
Screening failure		10
Anergie nach Hauttest		--
Lycopin out of range		5
Zustimmung zurückgezogen		3
Randomisierte Probanden		28
Zustimmung zurückgezogen		0
Adverse Event	0	

Tabelle 6: Studienpopulation

Die Studienteilnehmer wurden mit einem vom Sponsor zur Verfügung gestellten online Randomisierungsverfahren mit der Blockgröße 2 und dem Allokationsverhältnis 1:1 zwei Gruppen zugeteilt. Eine Gruppe von 75 Probanden, die sogenannte *Treatment Group*, nahm zweimal täglich (morgens und abends) eine Kapsel des Carotinoid-reichen Nahrungsergänzungsmittels aus Tomaten ein. Die zweite Gruppe mit 74 Probanden bekam das Placebo. Die Verteilung der verschiedenen Charakteristika innerhalb der

Gruppen war ausgewogen, so dass eine gute Vergleichbarkeit bestand. Die allgemeinen Charakteristika dieser Gruppen sind in Tabelle 7 und Abbildung 9 dargestellt.

Es gab durch verschiedene, von der Studie unabhängige Gründe, 4 Drop Outs. Zwei Probanden (1,3%) unterbrachen vorzeitig die Studie aufgrund von *adverse events* (AEs), zwei Probanden (1,3%) zogen ihre Zustimmung zurück, ohne Angaben von Gründen.

Allgemeine Angaben	Verum	Placebo	Alle
	N (%)	N (%)	N (%)
Randomisierte Probanden	75 (100)	74 (100)	149 (100)
Studienabbruch:	4 (5,3)	0 (0)	4 (2,7)
Unerwünschte Ereignisse (UE)	2 (2,7)	0 (0)	2 (1,3)
Entzug der Einverständniserklärung	2 (2,7)	0 (0)	2 (1,3)
Entscheidung des Probanden	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tabelle 7: Allgemeine Angaben

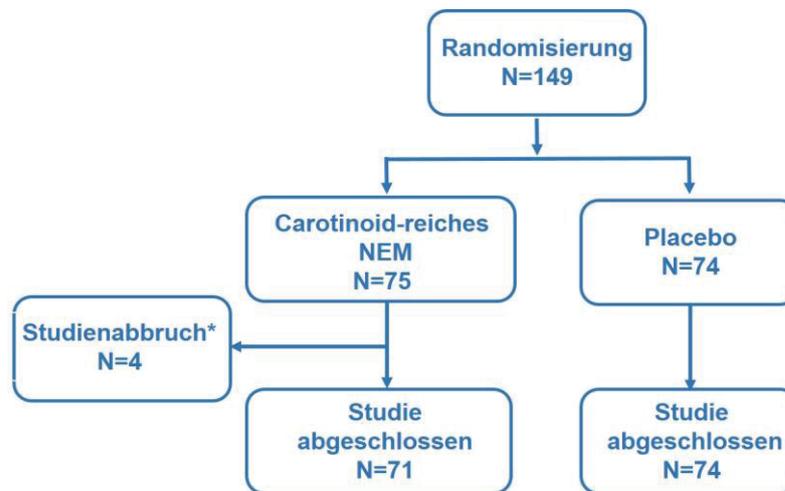


Abbildung 9: Allgemeine Angaben

*Unerwünschte Ereignisse N=2, Entzug der Einverständniserklärung N=2

Es wurden 115 Frauen und 34 Männer eingeschlossen. Alle Probanden waren Kaukasier. Es handelte sich um gesunde, hellhäutige Probanden mit den Hauttypen I-II nach Fitzpatrick. Das Verhältnis zwischen Frauen und Männern war in der Verum-Gruppe (2,95) niedriger als in der Placebo-Gruppe (3,93). Das Durchschnittsalter war in beiden Gruppen gleich: $40,9 \pm 10,3$ Jahren (Verum) bzw. von $40,9 \pm 10,1$ Jahren (Placebo). Größe, Gewicht und BMI waren in beiden Gruppen ähnlich. Der Anteil der aktuellen

Raucher betrug 5,3% in der Verum-Gruppe und 2,7% in der Placebo-Gruppe. Der Rest hatte nie geraucht oder in der Vorgeschichte mit dem Rauchen aufgehört. Keiner der Probanden hatte eine klinisch relevante Anamnese.

Die Aufnahme von Gemüse und Obst pro Tag und die Aufnahme von Lycopin-reichen Lebensmitteln pro Woche war in beiden Gruppen ähnlich.

In Tabelle 8 sind die demographischen und andere Baseline Parameter des untersuchten Probandenkollektivs zusammengefasst.

Variabel	Verum N=75	Placebo N=74
Gender, N (%)		
Männer	19 (25)	15 (20)
Frauen	56 (75)	59 (80)
Kaukasisch, N (%)	75 (100)	74 (100)
Alter, Jahre, Mittelwert (SD)	40,9 (10,3)	40,9 (10,1)
Größe, cm, Mittelwert (SD)	171,1 (7,2)	170,4 (8,4)
Gewicht, kg, Mittelwert (SD)	75,1 (11,0)	72,8 (12,0)
Body mass index, kg/cm², Mittelwert (SD)	25,8 (2,8)	25,3 (3,0)
Raucher, N (%)		
Nie geraucht	58 (77,3)	68 (91,9)
Aktuelle Raucher	4 (5,3)	2 (2,7)
Ex-Raucher	13 (17,3)	4 (5,4)
Allergien	12 (16,0)	15 (16,2)
Ernährungsanamnese, Mittelwert (SD)		
Verzehr von Obst und Gemüse pro Tag	1,7 (1,2)	1,7 (1,3)
Verzehr von Lycopin-reichen Lebensmitteln pro Woche	2,8 (2,6)	2,5 (1,9)

Tabelle 8: Baseline Parameter

In einer größeren klinischen Studie ist es kaum vermeidbar, dass einzelne Probanden die Behandlung abbrechen oder teilweise vergessen oder die Daten fehlen. Diese Protokollverletzungen werden in einer als „Blinded Data Review Meeting“ bezeichneten Arbeitssitzung als geringfügig (minor) oder als schwerwiegend (major) bewertet. 84 Protokollverletzungen (bezüglich des Zeitfensters) wurden im Studienzentrum 1 und 2 dokumentiert (Tabelle 9). Alle Protokollverletzungen wurden als minor bezeichnet.

Die Auswertung umfasst nur Probanden ohne schwerwiegende Protokollverletzung (per-protocol-analysis), da die Studienergebnisse erheblich von den Probanden mit Protokollverletzungen beeinflusst sind und in ihrer Aussagekraft eingeschränkt werden können.

	Verum N=71	Placebo N=74	Alle N=145
Zeitfensterverletzung			
Tag 63	15	16	31
Tag 91	14	9	23
Tag 119	17	13	30

Tabelle 9: Protokollverletzungen

3.3 Compliance

Die Studie war aufgeteilt in zwei Abschnitte. Nach einer beginnenden Auswaschphase (Wash-out) von fünf Wochen nahmen die Probanden über zwölf Wochen ein Carotinoidreiches Nahrungsergänzungsmittel aus Tomaten als Verum oder mittelkettige Triglyceride als Placebopräparat ein.

Die Einhaltung der Diät wurde durch (i) ein Nahrungstagebuch; (ii) den Verbrauch der Kapselmenge und (iii) die Blutwerte von Lycopin, Phytofluen und Phytoen kontrolliert. Die Compliance in Bezug auf die Produkteinnahme war anhand der zurückgebrachten Kapseln und der allgemeinen Lycopin-Werte gut. Die Werte der Compliance waren in den Gruppen gleichmäßig verteilt.

Zudem wurde auch die Compliance in Bezug auf die Einhaltung der Einschlusskriterien der Studie regelmäßig kontrolliert durch Befragungen und ein von den Probanden zu führendes Einnahmetagebuch.

3.3.1 Messung der Compliance anhand der Kapselmenge

Alle Probanden erfüllten die notwendige Compliance zwischen 80% und 120% und wurden in die Analyse eingeschlossen.

3.3.2 Messung der Compliance anhand der Blutwerte

Die Compliance wurde durch den Anstieg der Lycopin-, Phytofluen- und Phytoen-Konzentrationen während der Studie gemessen. Vor Supplementierung unterschieden sich die Lycopin-, Phytofluen- und Phytoen-Konzentrationen der Verum- und Placebo-Gruppe nicht (Kruskal-Wallis ANOVA on ranks, Dunn´s, Abbildungen 10-12).

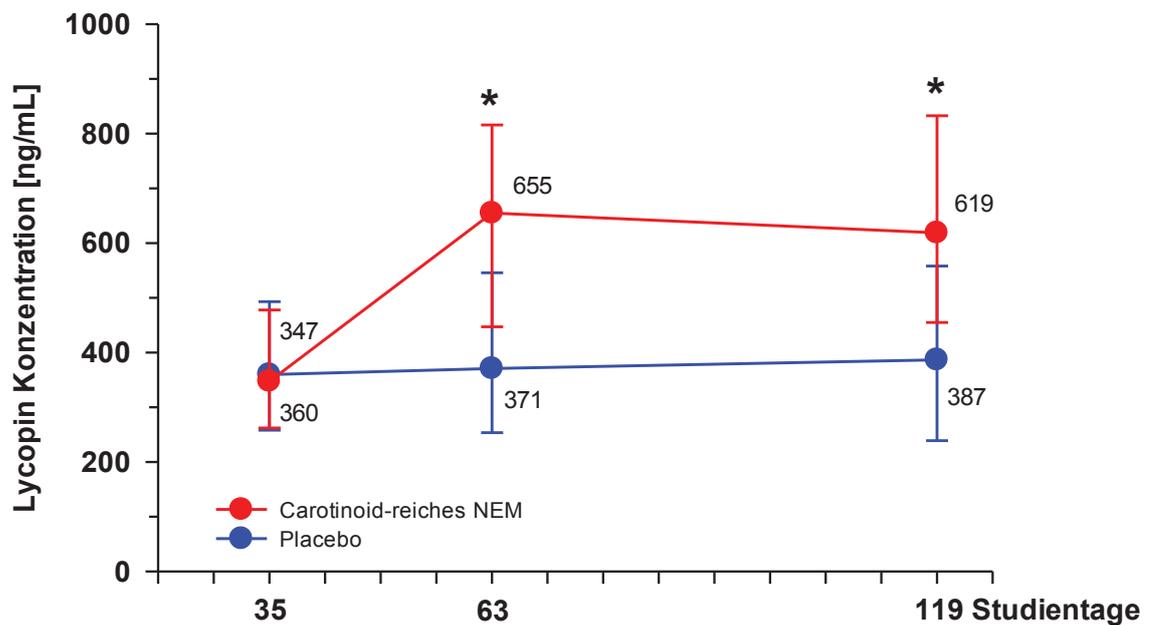


Abbildung 10: Lycopin Konzentration während der Studie als Median mit 25%- und 75%-Perzentilen
Kruskal-Wallis ANOVA on ranks Dunn´s
*p Wert < 0.001 vs Lycopinlevel zu Studienbeginn an Tag 35

Ein statistisch signifikanter Anstieg der Lycopin-, Phytofluen- und Phytoen-Spiegel wurde am Studientag 63 und Studientag 119 (Ende der Studie) in der Verum-Gruppe im Vergleich zum Studienbeginn an Tag 35 verzeichnet.

Die Verum-Gruppe zeigt im Median (25% Perzentil-75% Perzentil) unter Einnahme des Carotinoid-reichen Nahrungsergänzungsmittels eine statistisch signifikante Zunahme des Lycopin Spiegels von 347 (262-478) ng/ml vor Intervention auf 655 (447-816) ng/ml nach 4 Wochen Behandlung und auf 619 (455-833) ng/ml am Ende der Studie. Deutliche statistische Signifikanzen zeigen sich mit $p < 0.001$ zwischen Baseline und Tag 63. Ebenso wird mit $p < 0.001$ zwischen Baseline und Tag 119 die Zunahme des Lycopinspiegels im

Serum deutlich. Keine statistisch signifikante Veränderung ergibt sich zwischen Tag 63 und Tag 119.

Wie erwartet ergibt sich keine statistisch signifikante Veränderung unter Placeboeinnahme und der Lycopin Spiegel bleibt konstant: 360 (258-493) ng/ml vor Intervention, 371 (254-546) ng/ml nach 4 Wochen und 387 (239-558) ng/ml am Ende der Studie. Die Unterschiede der Lycopinkonzentration an Tag 63 und an Tag 119 sind innerhalb der jeweiligen Gruppe nicht signifikant. Sehr wohl unterscheiden sich beide Gruppen an den Tagen 63 und 119 untereinander (p Wert = <0.001).

Die anderen untersuchten Blutparameter Phytofluen und Phytoen zeigen die gleichen Veränderungen im Laufe der Studie.

Für das farblose Carotinoid Phytofluen zeigt sich in der Verum-Gruppe im Median (25% Perzentil-75% Perzentil) unter Einnahme des Carotinoid-reichen Nahrungsergänzungsmittels eine statistisch signifikante Zunahme der Konzentration von 27 (10-51) ng/ml vor Intervention auf 97 (43-179) ng/ml nach 4 Wochen Behandlung und auf 85 (36-212) ng/ml am Ende der Studie (jeweils p Wert <0.001).

Wie erwartet bleibt die Phytofluenkonzentration unter Placeboeinnahme konstant: 30 (10-59) ng/ml vor Intervention, 36 (11-64) ng/ml nach 4 Wochen und 30 (11-59) ng/ml am Ende der Studie. Die Unterschiede der Phytoenkonzentration an Tag 63 und an Tag 119 sind innerhalb der jeweiligen Gruppe nicht signifikant. Sehr wohl unterscheiden sich beide Gruppen an den Tagen 63 und 119 untereinander (p Wert = <0.001).

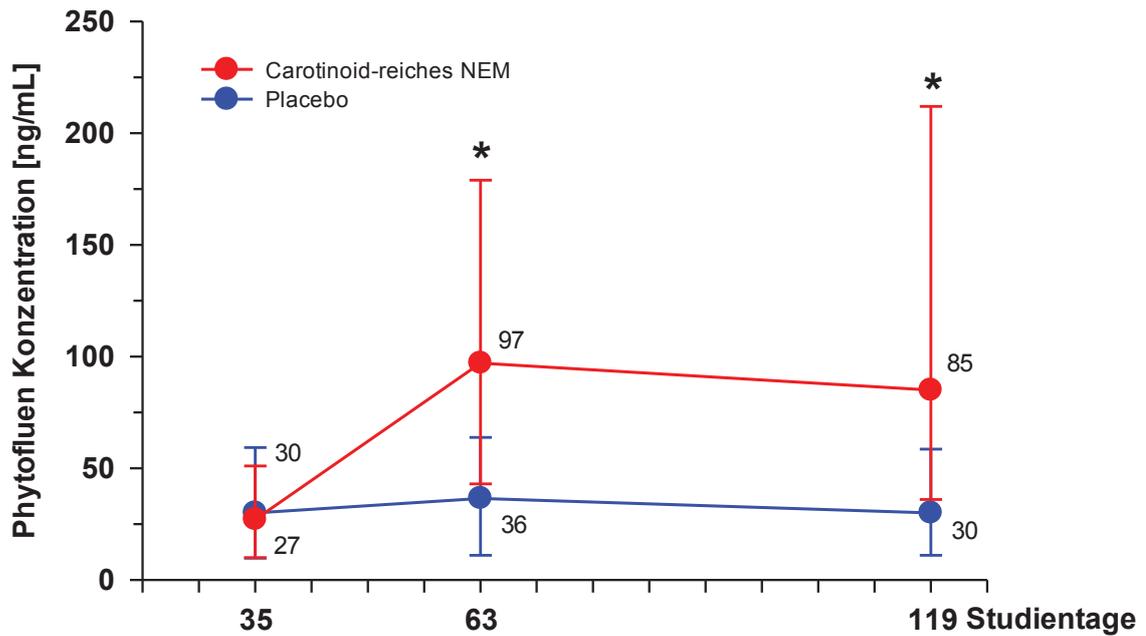


Abbildung 11: Phytofluen Konzentration während der Studie als Median mit 25%- und 75%-Perzentilen
 Kruskal-Wallis ANOVA on ranks Dunn's
 *p Wert < 0.001 vs Phytofluenlevel zu Studienbeginn an Tag 35

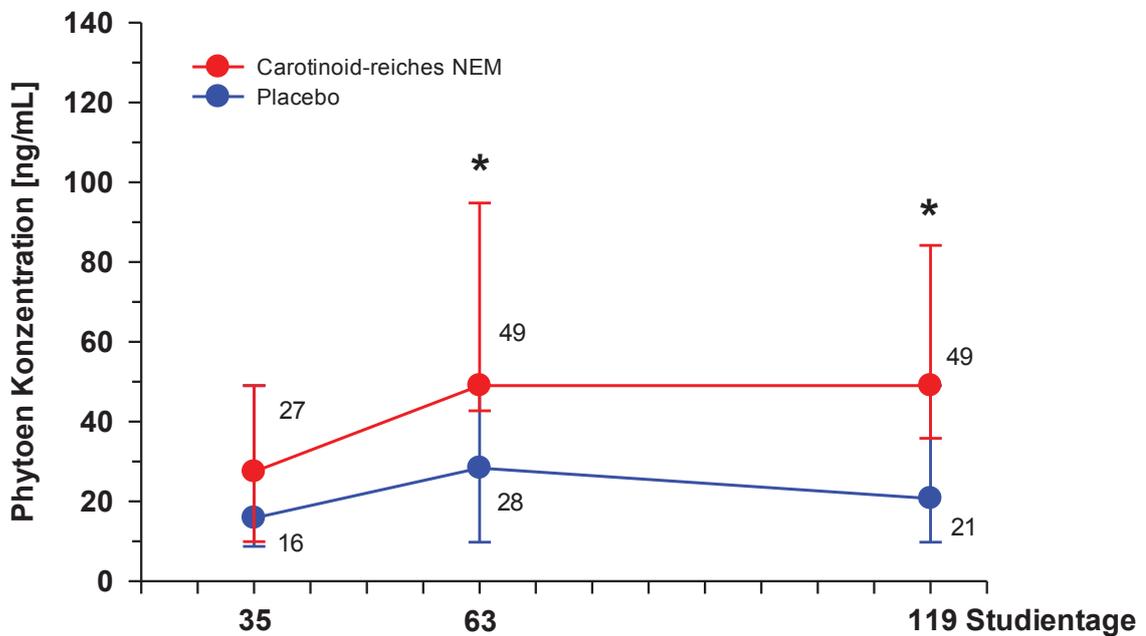


Abbildung 12: Phytoen Konzentration während der Studie als Median mit 25%- und 75%-Perzentilen
 Kruskal-Wallis ANOVA on ranks Dunn's
 *p Wert < 0.001 vs Phytoenlevel zu Studienbeginn an Tag 35

Die Verum- Gruppe zeigt im Median (25% Perzentil-75% Perzentil) unter Einnahme des Carotinoid-reichen Nahrungsergänzungsmittels eine statistisch signifikante Zunahme der Phytoen Konzentration von 27 (10-49) ng/ml vor Intervention auf 49 (43-95) ng/ml nach 4 Wochen Behandlung und auf 49 (36-84) ng/ml am Ende der Studie (jeweils p Wert <0.001).

Wie erwartet bleiben unter Placeboeinnahme die Werte im Median (25% Perzentil-75% Perzentil) konstant: 16 (9-49) ng/ml vor Intervention, 28 (10-49) ng/ml nach 4 Wochen und 21 (10-49) ng/ml am Ende der Studie. Die Unterschiede der Phytoenkonzentration an Tag 63 und an Tag 119 sind innerhalb der jeweiligen Gruppe nicht signifikant. Sehr wohl unterscheiden sich beide Gruppen an den Tagen 63 und 119 untereinander (p Wert = <0.001).

Die Probanden hielten sich demnach an die vorgeschriebene Kapseleinnahme und die empfohlenen Ernährungsgewohnheiten.

3.4 Wirkung des Carotinoid-reichen Nahrungsergänzungsmittels aus Tomaten auf UV-induzierte und photooxidative Hautschäden

Die Wirkung des Carotinoid-reichen Nahrungsergänzungsmittels aus Tomaten auf UV-induzierte und photooxidative Hautschäden wurde mittels minimaler UV-B-Erythemdosis (MED), der Messung des UV-induzierten Erythems und dem Hypersensitivitätstest vom verzögerten Typ (DTH) untersucht.

3.4.1 MED

Die MED (minimale Erythemdosis) wurde zu Beginn und am Ende der Studie bestimmt. Die individuelle MED des Probanden ergibt sich aus der geringsten Bestrahlungsdosis, die ein sichtbares Erythem verursacht.

Der MED Wert 24 Stunden nach Bestrahlung ist in Tabelle 10 zusammengefasst. In der Verum-Behandlungsgruppe wurde keine statistisch signifikante Veränderung des MED-Wertes zwischen Baseline und Ende der Studie beobachtet. Obwohl in der Placebo-Gruppe eine statistisch signifikante Reduktion von $-0,006 \pm 0,02$ beim MED-Wert

3 Ergebnisse

3.4 Wirkung des Carotinoid-reichen Nahrungsergänzungsmittels aus Tomaten auf UV-induzierte und photooxidative Hautschäden

beobachtet wurde ($p = 0,017$), gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

	Verum N=71		Placebo N=74		P Wert (Δ zwischen den zwei Gruppen) **
	Mittelwert \pm SD	Median (min, max)	Mittelwert \pm SD	Median (min, max)	
Baseline	0.079 \pm 0.024	0.080 (0.035, 0.125)	0.082 \pm 0.023	0.080 (0.035, 0.125)	0.055
Ende der Studie	0.078 \pm 0.026	0.080 (0.035, 0.147)	0.077 \pm 0.027	0.078 (0.035, 0.167)	
Δ Baseline / Ende der Studie	0.001 \pm 0.02	0.000 (-0.050, 0.075)	0.006 \pm 0.02	0.000 (-0.065, 0.059)	
P Wert (Δ innerhalb der Gruppe)*		0.673		0.017	

SD=Standard deviation
 *P-Wert durch gepaarten T-Test zeigt die statistische Signifikanz innerhalb der Gruppen zwischen Baseline und Ende der Studie.
 **P-Wert durch nicht-parametrischen Mann Whitney Rangsummentest zeigt die statistische Signifikanz zwischen Verum und Placebo.

Tabelle 10: MED – PP Population

Eine Subgruppenanalyse der Probanden, die das Verum erhielten und einen Blut-Lycopin-Anstieg >50 ng/ml aufwiesen, und Probanden, die Placebo erhielten und keinen Anstieg des Blut-Lycopins während des Behandlungszeitraums zeigten, ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede, weder innerhalb jeder Behandlungsgruppe noch zwischen der Verum- und Placebo Gruppe.

3.4.2 Erythem

Die Colorimetrie dient der Messung der Hautfarbe. Die Rot-Grün-Achse wird durch den a^* -Wert ausgedrückt. Er beschreibt die Rotfärbung der Haut, die nach Bestrahlung bei Erzeugung eines Erythems erreicht wird. Hierbei wird die Differenz des Wertes vor und nach Bestrahlung errechnet (Δa^*) und die Differenzen unter Verum- mit denen unter Placeboeinnahme verglichen.

3 Ergebnisse

3.4 Wirkung des Carotinoid-reichen Nahrungsergänzungsmittels aus Tomaten auf UV-induzierte und photooxidative Hautschäden

Für diese Analyse wurde Δa^* als der Unterschied zwischen den Erythementwicklungsniveaus 24 Stunden nach der UV-Bestrahlung vor der Supplementierung und den Erythementwicklungsniveaus 24 Stunden nach der UV-Bestrahlung nach der Supplementierung definiert.

Eine statistisch signifikante Veränderung der Erythembildung wurde zwischen der Verum- und Placebo-Gruppe beobachtet. Die Daten sind in Tabelle 11 und Abbildung 13 zusammengefasst.

	Verum N=71		Placebo N=74		P Wert (Δ zwischen den zwei Gruppen) **
	Mittelwert \pm SD	Median (min, max)	Mittelwert \pm SD	Median (min, max)	
Baseline	3.92 \pm 3.07	3.57 (-1.40, 11.30)	3.69 \pm 3.16	3.37 (-4.69, 15.11)	
Ende der Studie	3.23 \pm 3.54	2.74 (-3.75, 12.73)	4.54 \pm 3.87	3.66 (-2.20, 12.83)	
Δ Ende der Studie - Baseline	-0.75 \pm 4.31	-0.50 (-11.44; 10.55)	0.85 \pm 3.75	0.33 (-6.64; 9.01)	0.019
P Wert (Δ innerhalb der Gruppe)*	0.153		0.054		

SD=Standard deviation

*P-Wert durch gepaarten T-Test zeigt die statistische Signifikanz innerhalb der Gruppen.

**P-Wert durch parametrischen T-Test zeigt die statistische Signifikanz zwischen Verum und Placebo.

Tabelle 11: Δa^* UV24h PP Population

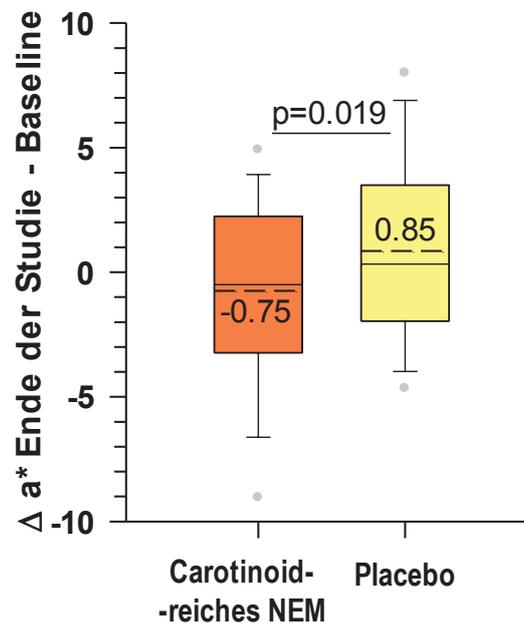


Abbildung 13: Induktion des Erythems während der Studie
Box-Plot mit Median und Mittelwert (gestrichelt), 5%- und 95%-Perzentilen, und Ausreißern
T-Test *p Wert < 0.05 Verum vs Placebo

3.4.2.1 Entwicklung innerhalb der Gruppen:

Innerhalb aller Gruppen kommt es zu signifikanten Unterschieden der a^* Werte jeweils vor und nach Bestrahlung. Dies ist ein gewollter und erwarteter Effekt, der zeigt, dass die Bestrahlung die gewünschten Effekte in der Haut auslöst. Im Folgenden werden diese Unterschiede nicht weiter ausgeführt.

Die Erythemantwort (Δa^* Wert) in der Verum Gruppe unterscheidet sich zwischen Baseline und Tag 119 nicht signifikant. Es kommt allerdings zu einer leichten Reduktion von $3,92 \pm 3,07$ SD auf $3,23 \pm 3,54$ SD. Die Rötungszunahme (Δa^* Wert) durch die Bestrahlung ist im Verlauf der Studie also geringer geworden. Um den Unterschied der Rötungszunahme zu Beginn der Studie mit dem am Ende der Studie genau zu quantifizieren, wurde aus den Δa^* -Werten eine Differenz errechnet ($\Delta \Delta a^*$ -Wert), also die durch UV-Bestrahlung hervorgerufene Erythembildung Differenz in a^* (Δa^*) nach der Intervention minus der Differenz in a^* (Δa^*) vor der Intervention. Dieser Wert zeigt

einen Mittelwert von $-0,75 \pm 4,31$ SD. Also ist die Rötungszunahme am Ende der Studie um den Wert 0,75 Einheiten geringer im Vergleich zum Anfang.

Der Δa^* -Wert innerhalb der Placebo-Gruppe ist mit einem Mittelwert von $3,69 \pm 3,16$ SD zu Beginn der Studie kleiner als der Δa^* -Wert mit einem Mittelwert von $4,54 \pm 3,87$ SE am Ende der Studie. Die Rötungszunahme durch die Bestrahlung ist im Verlauf der Studie um den Wert $0,85 \pm 3,75$ SD größer geworden und die Unterschiede sind signifikant, $p= 0,05$. Vermutlich liegt dieser Beobachtung ein Jahreszeiteffekt zu Grunde.

3.4.2.2 Vergleich zwischen den Gruppen:

Verglichen werden die Δa^* Werte zwischen den jeweiligen Gruppen. Es kommt zu signifikanten Unterschieden der Δa^* Werte zwischen der Verum- und der Placebo-Gruppe, $p=0,019$. Die Rötungszunahme am Ende der Studie ist in der Verum Gruppe signifikant geringer als in der Placebogruppe.

3.4.3 DTH Analyse

Ultraviolette Strahlung hat viele Auswirkungen auf die Haut, vor allem das Auslösen von Hautirritationen und Sonnenbrand [100]. Durch UV-Strahlung kann zudem das Immunsystem geschwächt werden. Geringe und chronische UV-Dosen können lokale immunsuppressive Reaktionen induzieren [101]. Dieser immunsupprimierende Effekt von UV-B-Strahlung wurde umfassend untersucht [102-105]. Die UV-induzierte Immunsuppression wurde in einem DTH-Modell untersucht. Die DTH Testung wurde nur an einem Studienzentrum evaluiert. Wie in Tabelle 12 gezeigt, war der Anteil der Probanden, die positive Reaktionen (schwach, mäßig oder stark) vor und nach der Behandlung gezeigt haben im Studienverlauf, sowohl innerhalb jeder Behandlungsgruppe als auch zwischen den Behandlungsgruppen, ähnlich. Es konnte kein Einfluss der UV-Bestrahlung auf die DTH Antwort festgestellt werden.

	Verum		Placebo	
	N= 22		N= 26	
	N	(%)	N	(%)
Baseline				
(+) Schwache Reaktion	2	(9.1)	5	(19.2)
(++) Mäßig Reaktion	13	(59.1)	14	(53.8)
(+++) Starke Reaktion	7	(31.8)	7	(26.9)
Ende der Studie				
(+) Schwache Reaktion	2	(9.1)	4	(15.4)
(++) Mäßig Reaktion	12	(54.5)	13	(50.0)
(+++) Starke Reaktion	8	(36.4)	9	(34.6)

Tabelle 12: DTH Test

Die DTH-Antwort wurde durch Zuführen des Nahrungsergänzungsmittels ebenfalls nicht verändert, so dass in dieser Studie keine immunmodulierenden Aktivitäten des Verums festgestellt werden konnten.

3.5 Expression molekularer Marker für UV-induzierte Schäden

Mehrere molekulare Marker für UV-induzierte Schäden wurden in Biopsien der Haut durch PCR bestimmt.

UV-Strahlung löst nach bisherigen Erkenntnissen (siehe oben) eine Entzündungsreaktion in der Haut aus. TNF- α wird nach Bestrahlung freigesetzt sowie IL6, was zu erhöhten Plasmaspiegeln führt. Die IL1 α und IL10 Expressionen werden aktiviert.

Eine unbestrahlte Kontrollbiopsie wurde zeitgleich zu der bestrahlten Biopsie entnommen und analysiert. Die Expression der mRNS der Marker wird als x-fache Induktion im Verhältnis zur Kontrollbiopsie angegeben, deren Expressionslevel gleich 1 gesetzt wurde. Dadurch wird die Anschauung der Ergebnisse vereinfacht und gleichzeitig verdeutlicht, dass die Zellen tatsächlich auf die UV-Bestrahlung mit einer erhöhten Expression der untersuchten molekularen Marker reagieren.

Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon Signed Rank Test und der Mann Whitney Rank Test verwendet.

Die Daten sind in Tabelle 13 und Abbildung 14 zusammengefasst.

3.5.1 IL1 α

Unter der Einnahme des Carotinoid-reichen Nahrungsergänzungsmittels kommt es zwischen Baseline und Tag 120 zu einer signifikanten Verminderung der UV-Antwort von Median (25% Perzentil-75% Perzentil) 1,81 (1,46-2,36) auf 1,30 (0,90-2,16) ($p=0,019$). Die Expression ist am Ende der Studie um den Wert 0,52 geringer geworden im Vergleich zum Anfang.

Unter Placebo kommt es zwischen Baseline und Tag 120 zu keiner signifikanten Reduktion ($p=0,739$). Zwischen den beiden Gruppen war die Expression der IL1 α mRNS nicht signifikant verändert.

3.5.2 IL10

Unter der Einnahme des Carotinoid-reichen Nahrungsergänzungsmittels kommt es zwischen Baseline und Tag 120 zu einer Abnahme der UV-Antwort von Median (25% Perzentil-75% Perzentil) 1,85 (1,31-2,68) auf 1,53 (1,04-2,14). Die Expression ist am Ende der Studie um den Wert 0,11 geringer geworden im Vergleich zum Anfang. Diese Reduktion war aber statistisch nicht signifikant.

Unter Placebo kommt es zwischen Baseline und Tag 120 zu einer Zunahme der IL-10 Expression von Median (25% Perzentil-75% Perzentil) 1,61 (1,16-2,67) auf 1,85 (1,24-3,15). Zwischen den zwei Gruppen war die Expression der IL10 mRNS nicht signifikant verändert.

3.5.3 IL6

Unter der Einnahme des Carotinoid-reichen Nahrungsergänzungsmittels kommt es zwischen Baseline und Tag 120 zu einer Reduktion der UV-Antwort von Median (25% Perzentil-75% Perzentil) 1,81 (1,43-3,03) auf 1,24 (0,73-2,17). Die Expression ist am Ende der Studie um den Wert 0,56 geringer geworden im Vergleich zum Anfang. Diese Reduktion war aber statistisch nicht signifikant.

Unter Placebo kommt es zwischen Baseline und Tag 120 zu einer Zunahme der IL-6 Expression von Median (25% Perzentil-75% Perzentil) 1,88 (1,07-3,01) auf 2,39 (1,16-3,85). Dieser Unterschied zwischen der UV-Antwort vor und nach der Intervention mit dem Placebo ist nicht signifikant.

Vergleicht man die UV-Antworten für den Marker IL6 nach der Intervention von Verum und Placebo miteinander, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied (Mann Whithney Rangtest $p=0.011$).

Bildet man den Quotienten aus der UV-Antwort nach der Intervention, dividiert durch die UV-Antwort vor der Intervention, so kann man die Ergebnisse ohne Mehrfachvergleiche zwischen den beiden Gruppen analysieren. Für das Verum ergibt sich ein Median (25% Perzentil-75% Perzentil) von 0,67 (0,29-1,38) und für das Placebo von 1,18 (0,68-2,35). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist signifikant (Mann Whithney Rangtest $p=0.012$).

3.5.4 TNF- α

Unter der Einnahme des Carotinoid-reichen Nahrungsergänzungsmittels kommt es zwischen Baseline und Tag 120 zu einer Reduktion der UV-Antwort von Median (25% Perzentil-75% Perzentil) 1,60 (1,19-2,37) auf 1,38 (0,96-1,95). Der Median der TNF- α Expression hat sich am Ende der Studie unter der Intervention mit dem Verum um den Wert 0,33 verringert. Diese Reduktion war statistisch signifikant (Wilcoxon-Signed-Rank-Test $p=0,047$).

Im Gegensatz dazu kommt es unter Placebo zwischen Baseline und Tag 120 zu einer Zunahme der Expression von Median (25% Perzentil-75% Perzentil) 1,40 (1,07-2,14) auf 1,68 (1,13-2,46). Dieser Unterschied zwischen der UV-Antwort vor und nach der Intervention mit dem Placebo ist nicht signifikant.

Bildet man den Quotienten aus der UV-Antwort nach der Intervention, dividiert durch die UV-Antwort vor der Intervention, so kann man die Ergebnisse ohne Mehrfachvergleiche zwischen den beiden Gruppen analysieren. Für das Verum ergibt sich ein Median (25% Perzentil-75% Perzentil) von 0,82 (0,46-1,11) und für das Placebo von 1,15 (0,71-1,68). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist signifikant (Mann Whithney Rangtest $p=0.033$).

	Verum N=46		Placebo N=48		P Wert (zwischen den Gruppen)**
	Mittelwert ± SD	Median (min, max)	Mittelwert ± SD	Median (min, max)	
Interleukin 1α					
Baseline	2.11 ± 1.06	1.81 (0.72, 5.34)	2.03 ± 1.53	1.70 (0.39, 10.69)	0.278
Ende der Studie (Tag 120)	1.86 ± 2.09	1.30 (0.27, 13.68)	1.92 ± 1.56	1.60 (0.22, 8.84)	0.382
Δ (Tag 120-Baseline)	-0.25 ± 2.09	-0.52 (-4.25, 9.58)	-0.12 ± 2.18	-0.14 (-10.04, 5.48)	0.143
P Wert (Δ innerhalb der Gruppe)*		0.019		0.739	
Ratio: Tag 120/Baseline	0.99 ± 0.98	0.70 (0.14, 5.51)	1.14 ± 0.86	0.90 (0.06, 3.57)	0.167
Interleukin 10					
Baseline	2.43 ± 2.23	1.85 (0.06, 12.28)	2.37 ± 2.23	1.61 (0.38, 11.01)	0.339
Ende der Studie (Tag 120)	1.91 ± 1.56	1.53 (0.11, 7.28)	2.73 ± 3.45	1.85 (0.43, 23.86)	0.089
Δ (Tag 120-Baseline)	-0.52 ± 2.79	-0.11 (-11.10, 5.54)	0.36 ± 4.29	0.02 (-9.86, 22.45)	0.346
P Wert (Δ innerhalb der Gruppe)*		0.432		0.612	
Ratio: Tag 120/Baseline	2.67 ± 10.66	0.94 (0.04, 73.17)	1.88 ± 2.64	1.02 (0.10, 16.92)	0.225
Interleukin 6					
Baseline	2.85 ± 3.18	1.81 (0.18, 17.82)	2.84 ± 3.61	1.88 (0.38, 20.90)	0.581
Ende der Studie (Tag 120)	2.20 ± 2.97	1.24 (0.19, 17.89)	3.58 ± 5.46	2.39 (0.35, 30.07)	0.011
Δ (Tag120-Baseline)	-0.65 ± 4.46	-0.56 (-16.93, 13.73)	0.74 ± 6.45	0.35 (-19.24, 28.36)	0.024
P Wert (Δ innerhalb der Gruppe)*		0.063		0.194	
Ratio: Tag 120/Baseline	1.85 ± 5.19	0.67 (0.05, 35.17)	2.05 ± 2.89	1.18 (0.08, 17.58)	0.012
TNFα					
Baseline	2.02 ± 1.36	1.60 (0.15, 6.38)	1.83 ± 1.27	1.40 (0.59, 7.12)	0.374
Ende der Studie (Tag 120)	1.57 ± 1.02	1.38 (0.14, 5.90)	2.02 ± 1.73	1.68 (0.49, 11.91)	0.076
Δ (Tag120-Baseline)	-0.45 ± 1.71	-0.33 (-4.48, 4.67)	0.20 ± 2.21	0.20 (-6.38, 10.61)	0.026
P Wert (Δ innerhalb der Gruppe)*		0.047		0.270	
Ratio: Tag 120/Baseline	1.38 ± 2.25	0.82 (0.10, 14.87)	1.43 ± 1.37	1.15 (0.10, 9.16)	0.033

Tabelle 13: Expression molekularer Marker

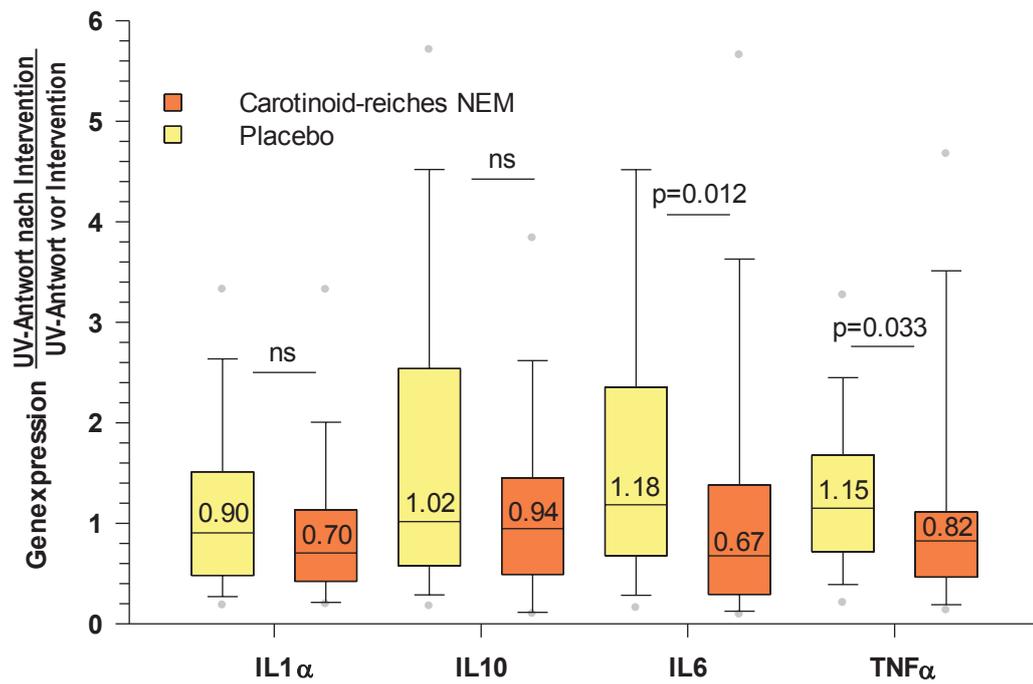


Abbildung 14: Expression molekularer Marker
Box-Plot mit Median, 5%- und 95%-Perzentilen, und Ausreißern
Mann Whitney Rangsummentest *p Wert < 0.05 Verum vs Placebo, ns, nicht signifikant

4 Diskussion

Ziel dieser placebokontrollierten, doppelt verblindeten, randomisierten, klinischen Interventionsstudie am Menschen war es, den Effekt eines Carotinoid-reichen Nahrungsergänzungsmittels für den Schutz der Haut vor UV-induzierten, photooxidativen Schäden gegenüber Placebo zu untersuchen, wenn diese über einen Zeitraum von 12 Wochen zweimal täglich eingenommen wurden.

Primäres Ziel war dabei die Untersuchung eines möglichen Einflusses auf den Lichtschutz der Haut an Hand der MED sowie der Erythemintensität der Haut.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass ein Einfluss auf den Lichtschutz der Haut besteht.

4.1 Compliance

Die in der Arbeit erhobene Auswertung der Kapselmenge und Blutparameter deutete auf eine gute Compliance der Probanden hin.

4.2 Lichtschutz der Haut

Innerhalb aller Gruppen besteht ein signifikanter Unterschied des Rötungsparameters a^* jeweils im Vergleich vor und nach Bestrahlung, sowohl vor als auch nach der Intervention. Dies ist sowohl am Anfang als auch am Ende der Studie zu beobachten. Diese Ergebnisse sind erwartet und gewollt und zeigen, dass die UV-Bestrahlung der Haut effektiv war und die gewünschten Effekte in der Haut der Probanden ausgelöst hat. Daher werden diese Unterschiede nicht weiterführend diskutiert. Interessant ist vielmehr der Vergleich der Werte nach Bestrahlung am Anfang und am Ende der Studie und die Beobachtung der Entwicklung.

Die Werte für die Hautrötung a^* innerhalb der Verum Gruppe ebenso wie in der Placebogruppe unterscheiden sich nicht signifikant. Bildet man nun die Differenz zwischen der Hautrötung nach der Intervention und der Hautrötung vor der Intervention und vergleicht diese zwischen den beiden Behandlungsgruppen, so findet man einen signifikanten Unterschied in der Erythemintensität von $p=0,019$. Es kommt allerdings zu

einer Reduktion der Rötungszunahme, das heißt die Zunahme des Erythems durch die Bestrahlung ist im Studienverlauf in der Verum-Gruppe geringer geworden. Die Bildung der Differenz zeigt eine Verringerung der Rötungszunahme um den Wert 0,75. Somit kann das Erythem als Zeichen der direkten und indirekten Schädigung der Hautzellen durch photochemische Reaktionen und durch die Erzeugung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [23] verringert werden. In der Placebo-Gruppe ist die Rötungszunahme durch die Bestrahlung um den Wert 0,85 größer geworden. Die Entwicklung in der Placebo-Gruppe spricht eher für eine Verschlechterung des Hautschutzes.

Die MED (minimale Erythemdosis) ändert sich in der Verum-Gruppe nicht signifikant. Es ist jedoch möglich, dass subtile Änderungen der Photosensitivität der Haut stattfanden, ohne eine messbare Auswirkung auf die MED zu haben. Möglicherweise war auch die Bestrahlung mit einer UV Dosis von 1,25-facher MED zu stark, um von den Schutzeffekten der Supplementierung ausgeglichen werden zu können.

Zudem wurde die MED mit bloßem Auge abgelesen, was eine gewisse Ungenauigkeit sowie Untersucherabhängigkeit birgt. Hierbei könnten geringgradige Veränderung nicht messbar gewesen sein. Im Gegensatz dazu wird die Hautrötung a^* chromametrisch bestimmt, wobei eine signifikante Änderung festgestellt wurde.

In der Placebo-Gruppe wird der Mittelwert der MED signifikant geringer. Das bedeutet, dass die Haut bereits bei einer geringeren Strahlungs-dosis mit einem Erythem reagiert. Die Haut ist also empfindlicher gegenüber UV-Licht geworden, was gegen einen Lichtschutz durch das Produkt spricht.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass ein Lichtschutz in der Verum-Gruppe deutlich wird, gestützt durch signifikante Unterschiede. In der Gruppe Placebo lassen sich Hinweise für eine Verschlechterung des Lichtschutzes erkennen.

Interventionsstudien am Menschen mit Carotinoid-reicher Nahrung zeigten ebenfalls eine Verminderung des UV-induzierten Erythems [67, 70, 72, 106, 107].

4.3 Einfluss auf die Expression molekularer Marker

Nach UVB-Bestrahlung kann es zu Entzündungsreaktionen kommen. TNF- α wird nach Bestrahlung freigesetzt sowie IL6, was zu erhöhten Plasmaspiegeln führt. Die IL1 α und IL10 Expressionen werden hochreguliert.

Vergleicht man die UV-Antwort für die molekularen Marker nach der Intervention mit Verum (N=46) oder Placebo (N=48), so beobachtet man nur für IL6 einen signifikanten Unterschied ($p=0,011$).

Durch Bildung von Quotienten der UV-Antwort nach Intervention / UV-Antwort vor Intervention, kann man für alle 4 untersuchten Marker einen geringeren Median in der Verum-Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe sehen: Für IL1 α erhält man Median (25% Perzentil-75% Perzentil) **0,70** (0,42-1,13) / **0,90** (0,48-1,15), für IL10 **0,94** (0,49-1,45) / **1,02** (0,58-2,54), für IL6 **0,67** (0,29-1,38) / **1,18** (0,68-2,35) und für TNF- α **0,82** (0,46-1,11) / **1,15** (0,71-1,68). Für die beiden proinflammatorischen Zytokine IL6 und TNF- α waren diese Unterschiede signifikant ($p=0.012$, bzw. $p=0,033$).

Es kann festgehalten werden, dass die Expression einiger UV-induzierter molekularer Marker durch Einnahme des Carotinoid-reichen Nahrungsergänzungsmittels unterdrückt wird. Dies ist Hinweis auf einen photoprotektiven Effekt der Supplementierung.

4.4 Verträglichkeit

Die Testprodukte wurden von den Probanden gut vertragen und es traten keinerlei Komplikationen auf.

5 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: AUFBAU DER MENSCHLICHEN HAUT NACH [108].....	2
ABBILDUNG 2: URSACHEN UND KONSEQUENZEN DER HAUTALTERUNG, NACH [34].	10
ABBILDUNG 3: MECHANISMUS DER FOTOALTERUNG DER HAUT, AUS [32].	11
ABBILDUNG 4: LYCOPIN	15
ABBILDUNG 5: β -CAROTIN.....	16
ABBILDUNG 6: LUTEIN	17
ABBILDUNG 7: ZEAXANTHIN.....	18
ABBILDUNG 8: DARSTELLUNG DES L*, A*, B* FARBSYSTEMS, ABBILDUNG NACH [90]	30
ABBILDUNG 9: ALLGEMEINE ANGABEN	38
ABBILDUNG 10: LYCOPIN KONZENTRATION WÄHREND DER STUDIE.....	41
ABBILDUNG 11: PHYTOFLUEN KONZENTRATION WÄHREND DER STUDIE.....	43
ABBILDUNG 12: PHYTOEN KONZENTRATION WÄHREND DER STUDIE	43
ABBILDUNG 13: INDUKTION DES ERYTHEMS WÄHREND DER STUDIE.....	47
ABBILDUNG 14: EXPRESSION MOLEKULARER MARKER	53

6 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: HAUTTYPEN I BIS VI NACH FITZPATRICK, NACH [10].....	25
TABELLE 2: STUDIENABLAUF	28
TABELLE 3: CDNS-SYNTHESE	33
TABELLE 4: GENE UND PRIMER DER REAL TIME RT-PCR.....	34
TABELLE 5: ANALYSEPOPULATION.....	36
TABELLE 6: STUDIENPOPULATION	37
TABELLE 7: ALLGEMEINE ANGABEN	38
TABELLE 8: BASELINE PARAMETER	39
TABELLE 9: PROTOKOLLVERLETZUNGEN	40
TABELLE 10: MED – PP POPULATION	45
TABELLE 11: ΔA^* UV24H PP POPULATION	46
TABELLE 12: DTH TEST	49
TABELLE 13: EXPRESSION MOLEKULARER MARKER	52

7 Literaturverzeichnis

1. Mancebo SE, Wang SQ. Skin cancer: role of ultraviolet radiation in carcinogenesis. *Rev Environ Health*, 29:265-273, 2014.
2. Gilchrest BA, Krutmann J. *Skin aging*. Berlin: Springer; 2006.
3. Krutmann J, Morita A, Chung JH. Sun exposure: what molecular photodermatology tells us about its good and bad sides. *J Invest Dermatol*, 132:976-984, 2012.
4. Stahl W, Krutmann J. Systemische Photoprotektion durch Karotinoide. *Hautarzt*, 281-285, 2006.
5. Boelsma E, Hendriks HF, Roza L. Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids. *Am J Clin Nutr*, 73:853-864, 2001.
6. Purba MB, Kouris-Blazos A, Wattanapenpaiboon N, et al. Skin wrinkling: can food make a difference? *J Am Coll Nutr*, 20:71-80, 2001.
7. Rassner G. *Dermatologie: Lehrbuch und Atlas*. 9th edition. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2009.
8. Terhorst D. *BASICS Dermatologie*. 3rd edition: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2013.
9. Fritsch P. *Dermatologie Venerologie: Grundlagen. Klinik. Atlas. (Springer-Lehrbuch)*. 2nd edition: Springer; 2003.
- 9a. Wang SQ1, Setlow R, Berwick M, Polsky D, Marghoob AA, Kopf AW, Bart RS. Ultraviolet A and melanoma: a review. *J Am Acad Dermatol*. 44(5):837-46, 2001.
10. Moll I. *Dermatologie*. 7th edition. Stuttgart: Thieme; 2010 [*Duale Reihe*].
11. Röcken M. *Taschenatlas Dermatologie: Grundlagen, Diagnostik, Klinik*. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2010.
12. Zastrow L, Groth N, Klein F, et al. The missing link--light-induced (280-1,600 nm) free radical formation in human skin. *Skin Pharmacol Physiol*, 22:31-44, 2009.
13. Krutmann J. Inhibitory effects of sunscreens on the development of skin cancer. *Hautarzt*, 62-63, 2001.
14. Berneburg M, Krutman J. Photoimmunology, DNA repair and photocarcinogenesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 87-93, 2000.
15. Chang N, Feng R, Gao Z, Gao W. Skin cancer incidence is highly associated with ultraviolet-B radiation history. *Int J Hyg Environ Health*, 213:359-368, 2010.

7 Literaturverzeichnis

16. Robinson ES, VandeBerg JL, Hubbard GB, Dooley TP. Malignant melanoma in ultraviolet irradiated laboratory opossums: initiation in suckling young, metastasis in adults, and xenograft behavior in nude mice. *Cancer Res*, 54:5986-5991, 1994.
17. Maenpaa J, Dooley T, Wurz G, et al. Topical toremifene: a new approach for cutaneous melanoma? *Cancer Chemother Pharmacol*, 32:392-395, 1993.
18. Kusewitt DF, Applegate LA, Bucana CD, Ley RD. Naturally occurring malignant melanoma in the South American opossum (*Monodelphis domestica*). *Vet Pathol*, 27:66-68, 1990.
19. Auletta M, Gange RW, Tan OT, Matzinger E. Effect of cutaneous hypoxia upon erythema and pigment responses to UVA, UVB, and PUVA (8-MOP + UVA) in human skin. *J Invest Dermatol*, 86:649-652, 1986.
20. Hall HI, Saraiya M, Thompson T, et al. Correlates of sunburn experiences among U.S. adults: results of the 2000 National Health Interview Survey. *Public Health Reports*, 118:540-549, 2003.
21. Park SL, Le Marchand L, Wilkens LR, et al. Risk factors for malignant melanoma in white and non-white/non-African American populations: the multiethnic cohort. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 5:423-434, 2012.
22. Hruza LL, Pentland AP. Mechanisms of UV-induced inflammation. *J Invest Dermatol*, 100:35S-41S, 1993.
23. Fisher GJ, Kang S, Varani J, et al. Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. *Arch Dermatol*, 138, 2002.
24. Yaar M, Eller MS, Gilchrest BA. Fifty years of skin aging. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 7:51-58, 2002.
25. Gilchrest BA. Skin aging and photoaging. *Dermatol Nurs*, 2:79-82, 1990.
26. Godic A, Poljšak B, Adamic M, Dahmane R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxid Med Cell Longev*, 2014:860479, 2014.
27. Helfrich YR, Sachs DL, Voorhees JJ. Overview of skin aging and photoaging. *Dermatol Nurs*, 20:177-83; quiz 184, 2008.
28. Yaar M, Lee MS, Runger TM, et al. Telomere mimetic oligonucleotides protect skin cells from oxidative damage. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 1-18, 2002.
29. Bielenberg DR, Bucana CD, Sanchez R, et al. Molecular regulation of UVB-induced cutaneous angiogenesis. *J Invest Dermatol*, 111:864-872, 1998.

7 Literaturverzeichnis

30. Yano K, Oura H, Detmar M. Targeted overexpression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 in the epidermis of transgenic mice prevents ultraviolet-B-induced angiogenesis and cutaneous photo-damage. *J. Invest. Dermatol*, 118:800-805, 2002.
31. Pandel R, Poljšak B, Godic A, Dahmane R. Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. *ISRN Dermatol*, 2013:930164, 2013.
32. Yaar M, Gilchrist BA. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br. J. Dermatol.*, 157:874-887, 2007.
33. Krutmann J. Wie die Sonne unsere Haut altern lässt. Die Dermis als treibende Kraft. *Hautarzt*, 62:588-590, 2011.
34. Poljsak B, Dahmane R, Godic A. Skin and antioxidants. *Journal of cosmetic and laser therapy: official publication of the European Society for Laser Dermatology*, 15:107-113, 2013.
35. Halliwell B, Gutteridge, John M. C. *Free radicals in biology and medicine*. 4th edition. Oxford, New York: Oxford University Press; 2007.
36. Majora M, Schuermann BA, Franke S et al. The inside-out of photoaging: UV-induced mitochondrial DNA deletions in dermal fibroblasts drive epidermal aging. *J Invest Dermatol*, 116, 2011.
37. Schmidt RF, Lang F: *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie*. 30th edition. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2007 [*Springer-Lehrbuch*].
38. Zeeck A (Ed): *Chemie für Mediziner*. München. 7th edition: Elsevier, Urban & Fischer; 2010.
39. Löffler G: *Biochemie und Pathobiochemie*. 8th edition. Heidelberg: Springer; 2007 [*Springer-Lehrbuch*].
40. Santos Celio XC, Nabeebaccus AA, Shah AM, et al. Endoplasmic reticulum stress and Nox-mediated reactive oxygen species signaling in the peripheral vasculature: potential role in hypertension. *Antioxid Redox Signal*, 20:121-134, 2014.
41. Finkel T. Reactive oxygen species and signal transduction. *IUBMB Life*, 52:3-6, 2001.
42. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 87:840-844, 2000.

7 Literaturverzeichnis

43. Yamamoto Y. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *J Dermatol Sci*, 27 Suppl 1:S1-4, 2001.
44. Vayalil PK, Mittal A, Hara Y, et al. Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. *J. Invest. Dermatol*, 122:1480-1487, 2004.
45. Gröber U. *Orthomolekulare Medizin: Ein Leitfaden für Apotheker und Ärzte*. 2nd edition. Stuttgart: WVG, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2002.
46. Shindo Y, Witt E, Packer L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J Invest Dermatol*, 100:260-265, 1993.
47. Isler O. Carotenoids (Isler O, ed) Birkhäuser, Basel, 1971.
48. Gross J. Pigments in vegetables Van Nostrand Reinhold 1991, New York.
49. Britton G: Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J*, 1551-1558, 1995.
50. Gabrielska J, Gruszecki WI. Zeaxanthin (dihydroxy-beta-carotene) but not beta-carotene rigidifies lipid membranes: a ¹H-NMR study of carotenoid-egg phosphatidylcholine liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1285:167-174, 1996.
51. Subczynski WK, Markowska E, Gruszecki WI, Siewiewiesiuk J. Effects of polar carotenoids on dimyristoylphosphatidylcholine membranes: a spin-label study. *Biochim Biophys Acta*, 1105:97-108, 1992.
52. Stahl W, Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta*, 1740:101-107, 2005.
53. Krinsky NJ, Russett MD, Handelman GJ, Snodderly DM. Structural and geometrical isomers of carotenoids in human plasma. *J Nutr*, 120:1654-1662, 1990.
54. Parker RS. Absorption, metabolism and transport of carotenoids. *FASEB J*, 542-551, 1995.
55. Wingerath T, Stahl W, Sies H. beta-Cryptoxanthin selectively increases in human chylomicrons upon ingestion of tangerine concentrate rich in beta-cryptoxanthin esters. *Arch Biochem Biophys*, 324:385-390, 1995.
56. Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24:345-351, 2003.

7 Literaturverzeichnis

57. Offord EA, Gautier J-C, Avanti O, et al. Photoprotective potential of Lycopene, β -Carotene, Vitamin E, Vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radical Biology & Medicine*, 32:1293-1303, 2002.
58. Rice-Evans CA, Sampson J, Bramley PM, Holloway DE. Why Do We Expect Carotenoids to be Antioxidants in vivo? *Free Radic Res*, 26:381–398, 1997.
59. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher. *Arch Biochem Biophys*, 274:532–538, 1989.
60. Goodwin TW. Metabolism, Nutrition and function of carotenoids. *Ann. Rev*, 6:97-273, 1986.
61. Stahl W. Systemic photoprotection by carotenoids. In: Krutmann J, Humbert P (Hrsg) Nutrition for healthy skin. Springer, Berlin, Heidelberg, S 65–70, 2001.
62. Krutmann J. Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. *J Dermatol Sci*, 23:22, 2000.
63. Marini, A. Schönheit in innen – Funktioniert das wirklich? *Hautarzt*, 62:614-617, 2011.
64. Mathews-Roth MM, Pathak MA, Parrish JA, et al: A clinical trial of the effects of oral beta-carotene on the responses of human skin to solar radiation. *J Invest Dermatol*, 59:349–353, 1972.
65. Lee J, Jiang S, Levine N, Watson RR. Carotenoid supplementation reduces erythema in human skin after simulated solar radiation exposure: *Proc Soc Exp Biol Med*, 223:170–174, 2000.
66. Gollnick HPM, Hopfenmueller W, Hemmes C, et al: Systemic beta carotene plus topical UV-sunscreen are an optimal protection against harmful effects of natural UV-sunlight: results of the Berlin-Eilath study. *Eur J Dermatol*, 6:200–205, 1996.
67. Stahl W1, Heinrich U, Jungmann H, et al. Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am J Clin Nutr*, 71:795-798, 2000.
68. Garmyn M, Ribaya-Mercado JD, Russell RM et al. Effect of beta-carotene supplementation on the human sunburn reaction. *Exp Dermatol*, 4:104–111, 1995.
69. Koepcke W, Krutmann J. Protection from Sunburn with b-Carotene. A Meta-analysis. *Photochem Photobiol*, 84:284-288, 2008.

7 Literaturverzeichnis

70. Heinrich U, Gartner C, Wiebusch M et al. Supplementation with beta-carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. *J Nutr*, 133:98–101, 2003.
71. Cesarini JP, Michel L, Maurette JM et al. Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 19:182–189, 2003.
72. Stahl W, Heinrich U, Wiseman S, et al. Dietary tomato paste protects against ultraviolet light-induced erythema in humans. *J Nutr*, 131:1449-1451, 2001.
73. Aust O, Stahl W, Sies H et al. Supplementation with Tomato-Based Products Increases Lycopene, Phytofluene, and Phytoene Levels in Human Serum and Protects Against UV-light-induced Erythema. *Int J Vitam Nutr Res*, 75:54–60, 2005.
74. Palombo P, Fabrizi G, Ruocco V et al. Beneficial Long-Term Effects of Combined Oral/Topical Antioxidant Treatment with the Carotenoids Lutein and Zeaxanthin on Human Skin: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Skin Pharmacol Physiol*, 20:199–210, 2007.
75. Horn F, Moc I, Schneider N et al. Biochemie des Menschen-3. Auflage. Thieme, 2005.
76. Krutmann J, Hönigsmann H: Handbuch der dermatologischen Phototherapie und Photodiagnostik,. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997.
77. Hirao T, Aoki H, Yoshida T et al. Elevation of Interleukin 1 Receptor Antagonist in Stratum Corneum of Sun-exposed and Ultraviolet B-irradiated Human Skin. *J Invest Dermatol*, 106:1102–1107, 1996.
78. Rivas JM, Ullrich SE. Systemic suppression of delayed-type hypersensitivity by supernatants from UV-irradiated keratinocytes: an essential role for keratinocyte-derived interleukin-10. *J Immunol*, 149:3865-3871, 1992.
79. Reeve VE, Tyrrell RM, Allanson M et al. The Role of Interleukin-6 in UVA Protection against UVB-Induced Immunosuppression. *J Invest Dermatol*, 129: 1539–1546, 2009.
80. Brenneisen P, Wlaschek K, Wenk J et al. Ultraviolet-B induction of interstitial collagenase and stromelysin-1 occurs in human dermal fibroblasts via an autocrine interleukin-6 dependent loop. *FEBS Lett*, 449:36–40,1999.

7 Literaturverzeichnis

81. Nishigori C, Yarosh DB, Ullrich SE, et al. Evidence that DNA damage triggers interleukin 10 cytokine production in UV-irradiated murine keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:10354-10359,1996.
82. Jahns L, Conrad Z, Johnson LK, Whigham LD. A diet high in carotenoid-rich vegetables and fruits favorably impacts inflammation status by increasing plasma concentrations of IFN- α 2 and decreasing MIP-1 β and TNF- α in healthy individuals during a controlled feeding trial. *Nutr Res*, 52:98-104, 2018.
83. Yoshihisa Y, Rehman MU, Shimizu T. Astaxanthin, a xanthophyll carotenoid, inhibits ultraviolet-induced apoptosis in keratinocytes. *Exp Dermatol*, 23(3):178-83, 2014.
84. Grether-Beck S, Marini A, Jaenicke T, et al. Molecular evidence that oral supplementation with lycopene or lutein protects human skin against ultraviolet radiation: Results from a double-blinded, placebo-controlled, cross-over study. *Br J Dermatol*, 176:1231-1240, 2017.
85. Taylor S, Westerhof W, Im S, Lim J. Noninvasive techniques for the evaluation of skin color. *J. Am. Acad. Dermatol*, 54:282-290, 2006.
86. Fullerton A, Fischer T, Lahti A, et al. Guidelines for measurement skin colour and erythema. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis*, 35:1-10, 1996.
87. *Firmeninformation der Firma Minolta, Osaka, Japan.*
88. Andreassi L, Flori L. Practical applications of cutaneous colorimetry. *Clinics in Dermatology*, 13:369-373, 1995.
89. Clarys P, Alewaeters K, Lambrecht R, Barel AO. Skin color measurements: comparison between three instruments: the ChromameterR, the DermaSpectrometerR and the MexameterR. *Skin Res Technol*, 6:230-238, 2000.
90. Seilnacht T. Cielab-System [<http://www.seilnacht.com/Lexikon/cielab.html>].
91. Hersey P, Hasic E, Edwards A, et al. Immunological effects of solarium exposure. *Lancet*, 1:545-548, 1983.
92. Moyal D, Courbière C, Le Corre Y, et al. Immunosuppression induced by chronic solar-simulated irradiation in humans and its prevention by sunscreens. *Europ J Dermatol*, 7: 223-225,1997.

7 Literaturverzeichnis

93. McCallum FS, Maden BE. Human 18 s ribosomal RNA sequence inferred from DNA sequence. Variations in 18 S sequences and secondary modification patterns between vertebrates. *Biochem J*, 232:725–733, 1985.
94. Nishida T, Nishino N, Takano M, et al. cDNA cloning of the IL-1 alpha and IL-1 beta from mRNA of U937 cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 143:345-352, 1987.
95. Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang MN, Johnson KE, Kastelein R, Fiorentino DF, deVries JE, Roncarolo MG, Mosmann TR, Moore KW: Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: Homology to epstein-barr virus open reading frame bcrfi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:1172-1176, 1991.
96. May LT, Helfgott DC, Sehgal PB. Anti-beta-interferon antibodies inhibit the increased expression of hla-b7 mRNA in tumor necrosis factor-treated human fibroblasts: Structural studies of the beta 2 interferon involved. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:8957–8961, 1986.
97. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. Human tumour necrosis factor: Precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, 312:724-729, 1984.
98. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25:169-193, 2000.
99. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25:402–408, 2001.
100. Cooper KD, Baron ED, Matsui MS. Implications of UV-induced inflammation and immunomodulation. *Cutis*, 72:11-15, 2003.
101. Halliday GM, Lyons JG. Inflammatory doses of UV may not be necessary for skin carcinogenesis. *Photochem Photobiol*, 84:272-283, 2008.
102. Kripke ML. Ultraviolet radiation and immunology: Something new under the sun-presidential address. *Cancer Res*, 54:6102-6105, 1994.
103. Duthie MS, Kimber I, Norval M. The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. *Br J Dermatol*, 140:995-1009, 1999.
104. Meunier L. Ultraviolet light und dendritic cells. *Eur J Dermatol*, 9:269-275, 1999.

7 Literaturverzeichnis

105. Nghiem DX, Kazimi N, Mitchell DL, et al. Mechanisms underlying the suppression of established immune responses by ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol*, 119:600-60, 2002.
106. Sies H, Stahl W. Carotenoids and UV protection. Photochemical & photobiological sciences: *Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 3:749-752, 2004.
107. Fernández-García E. Skin protection against UV light by dietary antioxidants. *Food & Function*, 5:1994-2003, 2014.
108. Aust O. Untersuchungen zu UV-protectiven Effekten von Nahrungs-carotinoiden in vivo und in vitro. univ. Diss., Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2003.
109. Stahl W, Heinrich U, Aust O, Tronnier H, Sies H. Lycopene-rich products and dietary photoprotection. *Photochem Photobiol Sci*, 5:238-242, 2006.

