

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. Gerd Plewig

IN-VIVO- UND IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUR  
PHOTOTOXIZITÄT VON NATRIUMDISULFIT  
UND PHOTOPROTEKTION DURCH  
ASCORBINSÄURE UND D-ALPHA-TOCOPHEROL

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

vorgelegt von  
Sabine Neff  
aus Weiler i. Allgäu  
2004

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. Gerd Plewig

IN-VIVO- UND IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUR  
PHOTOTOXIZITÄT VON NATRIUMDISULFIT  
UND PHOTOPROTEKTION DURCH  
ASCORBINSÄURE UND D-ALPHA-TOCOPHEROL

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

vorgelegt von  
Sabine Neff  
aus Weiler i. Allgäu  
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: **Prof. Dr. med. Bernhard Przybilla**

Mitberichterstatter: Prof. Dr. O. Adam

Betreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Sabine Werfel

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c.K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2004

Meinen Eltern und Großeltern gewidmet

/

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Die Sonne als Lebenselixier	1
1.2. Gefahren der UV-Belastung	2
1.3. Photobiologische Effekte	2
1.3.1. Das UV-Spektrum	2
1.3.2. Wechselwirkungen	3
1.3.3. Photooxidative Reaktionen	4
1.3.3.1. Photooxidative Reaktion Typ I	5
1.3.3.2. Photooxidative Reaktion Typ II	5
1.4. Photosensibilisierung, Phototoxizität, Photoallergie	5
1.5. Sulfite	7
1.5.1. Vorkommen	8
1.5.2. Toxikologie und klinische Reaktionen	9
1.6. Das antioxidative System des Organismus	10
1.6.1. d-alpha-Tocopherol (Vitamin E)	13
1.6.1.1. Vorkommen und Bedarf	13
1.6.1.2. Wirkung	14
1.6.2. Ascorbinsäure (Vitamin C)	15
1.6.2.1. Vorkommen und Bedarf	15
1.6.2.2. Wirkung	16
1.7. Ziel der Arbeit	18
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1. Geräte und Materialien	19
2.1.1. Bestrahlungsquellen	19
2.1.2. Sonstige Geräte und Materialien	19
2.1.3. Reagentien	20
2.2. Probanden	21
2.2.1. Ein- und Ausschlußkriterien	21
2.2.2. Diät	22
2.2.3. Gruppeneinteilung	22
2.3. Densitometrische Bestimmung der Antioxidantienkonzentration im Serum	24
2.3.1. Bestimmung der d-alpha-Tocopherolkonzentration	24
2.3.2. Bestimmung der Ascorbinsäurekonzentration	24
2.4. Fenofibrat-abhängiger Photohämolysetest	25
2.4.1. Herstellung der Erythrozytensuspension	26
2.4.2. Herstellung der Test- und Kontrollansätze	27
2.4.3. Bestrahlungen	27
2.4.4. Photometrische Bestimmung der Hämolyse	28
2.4.5. Berechnung der Hämolysewerte	28
2.5. Minimale Erythemdosis	29
2.6. Ermittlung der Blutflußeinheiten	30
2.7. Statistische Auswertung	30

<b>3. Ergebnisse</b>	32
3.1. d-alpha-Tocopherolkonzentrationen	32
3.2. Ascorbinsäurekonzentrationen	32
3.3. Fenofibrat-abhängiger Photohämolysetest	35
3.4. Minimale Erythemdosis	43
3.5. Blutflußmessung	48
<b>4. Diskussion</b>	52
4.1. Antioxidantienkonzentration im Serum	52
4.2. Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol als Antioxidantien	53
4.2.1. d-alpha-Tocopherol	53
4.2.2. Ascorbinsäure	55
4.2.3. UV-Strahlung und Antioxidantien	57
4.3. Photohämolysetest als In-vitro-Testmethode	60
4.3.1. Fenofibrat als phototoxische Substanz	62
4.3.2. Einflüsse auf den Reaktionsverlauf	63
4.4. Fenofibrat-abhängige Photohämololyse bei Sulfiteinnahme	64
4.5. Fenofibrat-abhängige Photohämololyse bei Sulfit-, Ascorbinsäure- und d-alpha-Tocopheroleinnahme	67
4.6. Fenofibrat-abhängige Photohämololyse bei Ascorbinsäure- und d-alpha-Tocopheroleinnahme	68
4.7. Fenofibrat-abhängige Photohämololyse bei Placeboeinnahme	69
4.8. Stellenwert des Photohämolysetestes zum Nachweis photosensibilisierender Substanzen	69
4.9. Minimale Erythemdosis und UV induzierte Steigerung des Blutflusses	70
4.10. Sulfite	72
<b>5. Zusammenfassung</b>	74
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	77
<b>7. Danksagung</b>	91
<b>8. Lebenslauf</b>	92

**Die ganze Mannigfaltigkeit, der ganze Reiz  
und die ganze Schönheit des Lebens  
setzen sich aus Licht und Schatten  
zusammen.**

**Leo Tolstoi**

## **1. Einleitung**

### **1.1. Die Sonne als Lebenselixier**

Die Sonne gilt seit jeher als Inbegriff von Glück, Wohlbefinden und Lebenskraft. Zu Beginn des Frühlings ziehen die Menschen in Scharen aus ihren Häusern, um neue Energie zu sammeln. Schon die alten Kulturen Asiens ehrten und achteten ihre Sonnengötter und dankten ihnen für die Spende von Glück, Wärme und Lebenskraft. So stand beispielsweise in der vedischen Kultur des alten Indien Atharvan als Sinnbild der Sonnengottheit. Auch die Ägypter verehrten die Sonne als Gott Ra, die Perser des 6. Jahrhunderts v. Chr. lebten nach den Lehren des Zoroaster: erstmals wurde hier die Tradition begonnen, einen Tag der Ruhe und der Andacht für die Sonne zu verbringen. Als Sonntag hat er noch heute Bestand. Die Griechen verehrten Helios, der der Sage nach jeden Tag seinen Sohn von Osten nach Westen durch den Himmel und so das tägliche Licht zur Erde brachte. Der Sonnengott Apollo als spiritueller Gott der Gesundheit und sein sterblicher Sohn Aesculapius, der erste große Naturwissenschaftler und Arzt, belegen die Bedeutung der Sonne für die Gesundheit der Menschen. Der römische Kaiser Aurelian nannte sich im 3. Jahrhundert nach Christus „Sol Invictus“. Als die unbesiegbare Sonne wollte er gegenüber seinem Volk Kraft und Macht demonstrieren. Nicht zuletzt sei auch Ludwig XIV (1643-1715) erwähnt, der sich selbst als „le roi soleil“ bezeichnete, die Sonne war für ihn Sinnbild von Autorität und Schönheit.

## **1.2. Gefahren der UV-Belastung**

Die Sonne birgt jedoch keinesfalls nur positive Effekte. Urlaubsreisen in stark UV-belastete Regionen, die heutzutage als normales Freizeitverhalten gelten, und körperliche Bräune als Sinnbild für Gesundheit und Schönheit überlasten die natürlichen Schutzmechanismen und es zeichnet sich eine zunehmende Inzidenz von lichtinduzierten Hauterkrankungen ab. Eine durch UVB-Strahlung hervorgerufene gesteigerte Melaninsynthese und die Oxidation farbloser Pigmentvorstufen durch UVA-Licht führt zur Bräunung der Haut. Bei übermäßiger UV-Exposition kommt es zur Dermatitis solaris und als chronische Auswirkung zur Hyperkeratose und Akanthose (Lichtschwiele) als Ausdruck des individuellen Lichtschutzes [156]. Eine lebenslange, kumulativ wirkende UV-Exposition führt, nach Überlastung der zellulären Reparatursysteme, zu verstärkter Hautalterung (Photoalterung), aktinischer Elastose, aktinischen Keratosen, epithelialen Tumoren (Basaliomen und spinozellulären Karzinomen) und malignen Melanomen [151].

## **1.3. Photobiologische Effekte**

### **1.3.1. Das UV-Spektrum**

Die Sonnenstrahlung auf der Erdoberfläche enthält UVB (290-320 nm), UVA (320-400 nm), sichtbare Strahlung und Infrarotlicht. Strahlung kürzerer Wellenlängenbereiche wird von der Atmosphäre absorbiert. Der Energieanteil der UV-Strahlung macht nur einen Anteil von etwa 5% der Energie der gesamten Strahlung aus [156].

Die kürzeste Wellenlänge der UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von 10-200 nm ist das sogenannte Vakuum-UV, diese Photonen werden von der Luft absorbiert und werden nur experimentell im Vakuum genutzt.

Tab. 1: Das elektromagnetische Spektrum

---

• Gamma-Strahlen	0,0001-0,1 nm
• Röntgen-Strahlen	0,01-10 nm
• Vakuum-UV	10-200 nm
• UV-C	200-280 nm
• UV-B	280-320 nm
• UV-A	320-400 nm
• Sichtbares Licht	400-800 nm
• Infrarot	800-0,1 mm
• Radiowellen	0,1 mm-10 <sup>8</sup> m

---

Auch UVC-Strahlung, definiert als der Wellenlängenbereich zwischen 200 und 280 nm, ist kein Bestandteil des Sonnenlichtes auf der Landoberfläche, weil es vom Wasserdampf und Ozon in der Atmosphäre ausgefiltert wird [196].

### 1.3.2. Wechselwirkungen

Zum Verständnis photobiologischer Phänomene, wie z.B. der Absorption von Strahlung durch Moleküle, ist es wichtig, die Grundlagen der Strahlungstheorie zu verstehen. Photobiologische Effekte, die durch nichtionisierende Strahlung induziert werden, müssen zuallererst durch eine Absorption der Photonen durch Moleküle, sogenannte Chromophore in Gang gesetzt werden. Auf diesem Wege gelangt das Molekül in einen energetisch angeregten Zustand und die absorbierte Energie wird für photochemische Prozesse genutzt. In der Haut stellt dabei das Melanin das Hauptchromophor (Absorptionsspektrum: 350-1200 nm) dar. Daneben wird UV-Strahlung aber auch durch Keratinproteine, Porphyrine, Karotene, Nucleinsäuren, Lipoproteine, Peptidbindungen und aromatische Aminosäureverbindungen absorbiert [112]. Entweder reagiert das Molekül wieder mit einem anderen Molekül oder die Energie wird auf

ein neues Molekül transferiert, welches wiederum mit einem dritten Molekül interagiert, wie es bei der Entstehung der reaktiven Sauerstoffspezies der Fall ist, die dann im folgenden mit Membranproteinen reagieren können [196].

### 1.3.3. Photooxidative Reaktionen

Die absorbierten Photonen werden in chemische Energie konvertiert und der energetisch höhere Zustand wird für chemische Reaktionen genutzt. Dies kann zu einer Transformation in einen Metaboliten (Photoprodukt), Übertragung der Energie auf ein biologisches Molekül oder Abgabe der Energie als Licht oder Hitze führen [178]. Die meisten photosensibilisierenden Reaktionen sind sauerstoffabhängig und stellen photodynamische Reaktionen dar, bei denen der Photosensibilisator in einen kurzlebigen, hochenergetischen Singulettzustand konvertiert und dann in eine längerlebige, weniger energetische Form übergeht. Dies geschieht hauptsächlich über 2 Reaktionswege.

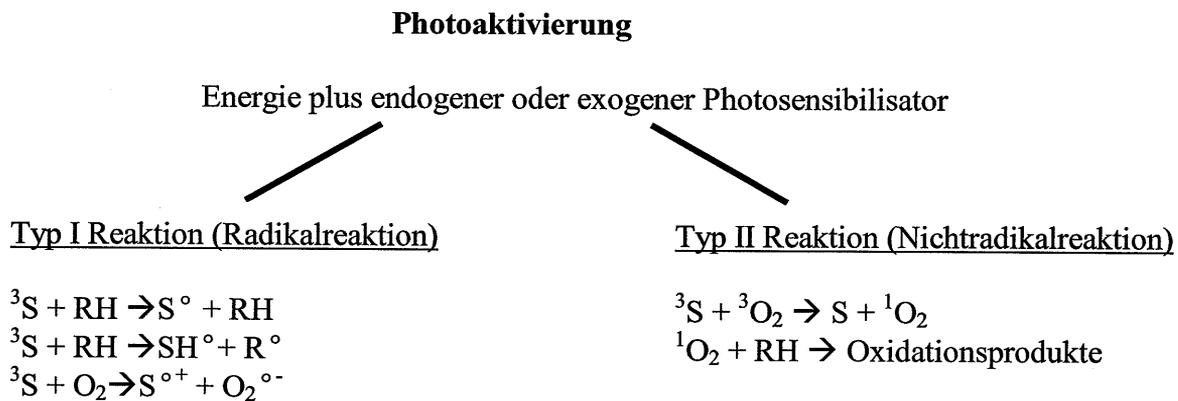


Abb. 1: Photooxidative Typ I- oder Typ II-Reaktion [26].

### **1.3.3.1. Photooxidative Reaktion Typ I**

Bei direktem Wasserstoff- oder Elektronentransfer vom Triplettzustand des Photosensibilisators auf ein Substrat spricht man von einer photooxidativen Reaktion Typ I mit Entstehung von Radikalen des Substrats, die wiederum direkt mit molekularem Sauerstoff reagieren und Peroxide, Hydroxylradikale und/oder Superoxidanionen bilden. Bei dieser stark konzentrationsabhängigen Reaktion ist, insbesondere wenn der Photosensibilisator an leicht oxidierbare Moleküle gebunden ist, eine direkte Zellschädigung möglich [80, 178].

### **1.3.3.2. Photooxidative Reaktion Typ II**

Hier werden Elektronen oder Energie direkt auf molekularen Sauerstoff im Grundzustand (Triplett) übertragen, und es kommt zur Bildung von Singulett-Sauerstoff. Dieser hochreaktive Zustand führt zu einer äußerst effektiven Oxidation von biologischen Substraten. Da Substrat und molekularer Sauerstoff um den jeweiligen Photosensibilisator im Triplettzustand konkurrieren, können beide Reaktionen gleichzeitig ablaufen [17, 81].

## **1.4. Photosensibilisierung, Phototoxizität und Photoallergie**

Photosensibilisierung ist ein Prozeß, bei dem eine Überempfindlichkeit der Haut gegenüber Licht oder UV-Strahlung induziert wird, indem eine spezifische, Strahlen-absorbierende Substanz (Photosensibilisator) eine Reaktion auslöst, die ihrerseits eine andere Komponente (Substrat) chemisch oder physikalisch verändert. Diese Photosensibilisatoren können sowohl exogener als auch endogener Natur sein und erfahren bei diesem Prozess selbst keine Alteration [177]. Einer gesteigerten Strahlungsempfindlichkeit kann sowohl ein toxischer, als auch ein allergischer pathogenetischer Mechanismus zugrunde liegen.

Phototoxizität ist ein Vorgang, der schon beim ersten Kontakt mit einem Photosensibilisator und Strahlung auftreten kann. Dieser Vorgang zeigt sich bei jedem Menschen, entsprechend

dem Hauttyp und der jeweiligen Konzentration des Substrats und Dosis der Strahlung. Phototoxizität äußert sich in Form einer sofort oder verzögert eintretenden entzündlichen Reaktion, welche eine direkte Zellschädigung darstellt. Diese entsteht durch eine photochemische Reaktion zwischen einem chemischen Photosensibilisator und der jeweiligen Strahlung [82, 95].

Die phototoxischen Reaktionen werden hauptsächlich durch langwelliges UVA-Licht hervorgerufen und können durch den Photohämolysetest als Screeninguntersuchung erfaßt werden. Seit Oskar Raab durch Zufall in den Labors von Prof. Tappeiner die photosensibilisierende Wirkung des Farbstoffes Acridin an *Paramecium caudatum* (Pantoffeltierchen) entdeckte und Meyer-Betz 1913 in einem Selbstversuch nach Selbstinjektion für Hämatoporphyrin (extrahiert aus dem Blut mittels Schwefelsäure und Alkohol) das photosensibilisierende Potential auch beim Menschen beweisen konnte, erwiesen sich eine große Anzahl von Substanzen als ausgesprochen phototoxisch. Manche Pflanzeninhaltsstoffe, Duftstoffe, Farbstoffe, Lichtfiltersubstanzen oder Medikamente beispielsweise erhöhen aufgrund ihrer Phototoxizität nach systemischer Zufuhr oder externer Applikation die Empfindlichkeit der Haut gegenüber elektromagnetischer Strahlung. Im medizinischen Bereich gilt dies beispielsweise für Chinolone, Sulfonamide, Tetracycline, Phenothiazine, nichtsteroidale Antiphlogistika, Thiazid-Diuretika oder Amiodaron [9, 10, 12, 16, 19, 20, 30, 128, 154, 155]. Mit der zunehmenden Entwicklung von neuen Substanzen und Medikamenten wird die Anzahl der Berichte über neu entdeckte Photosensibilisatoren sicherlich nicht abbrechen.

Davon abzugrenzen ist die wesentlich seltenere Photoallergie als Spezialform der Allergie, die nur in Kombination mit Licht auftritt. Im Unterschied zu phototoxischen Reaktionen tritt sie nur bei bestimmten Personen unter Beteiligung des Immunsystems auf und ist weniger abhängig von der Konzentration des Substrats bzw. der Dosis der UV-Exposition. Das

Aktionsspektrum liegt nach allgemeiner Auffassung hauptsächlich im UVA-Bereich, die Bildung eines Vollantigens läuft über eine photochemische Reaktion ab [83].

Es kann dabei selten zu Reaktionen vom Frühtyp (z.B. Photourtikaria), die durch humorale Antikörper vermittelt sind, und Reaktionen vom Spättyp (z.B. Photokontaktekzem), welche durch immunkompetente Zellen hervorgerufen werden, kommen [95]. Die pathophysiologischen Grundlagen sind noch nicht vollständig bekannt. Es gibt Hinweise, daß die absorbierte Strahlung das Substrat in eine immunologisch aktive Komponente konvertiert, oder das Substrat selbst Photonen absorbiert, photochemisch mit einem Carrierprotein interagiert und so zum vollständigen Antigen wird [87, 88]. Wird ein Photoantigen gebildet, wird es durch Langerhanszellen den Lymphozyten präsentiert und damit die Sensibilisierungsphase der Reaktion vom Spättyp initiiert. Bei erneutem Kontakt wird dann eine Kaskade von Reaktionsschritten, mediiert durch Zytokine, in Gang gesetzt [82]. Eine photoallergische Dermatitis kann in eine persistierende Lichtreaktion übergehen, aus der dann auch ein aktinisches Retikulum entstehen kann [117]. Auch bei der polymorphen Lichtdermatose, der Lichturtikaria und der Hydroa vacciniformia wird pathogenetisch eine Photosensibilisierung durch noch nicht bekannte Photosensibilisatoren vermutet [151].

### **1.5. Sulfite**

Im Rahmen der Untersuchung von einigen Nahrungsmitteladditiven entdeckten Eberlein-König et al., daß Sulfite, die weit verbreitet als Konservierungsstoffe eingesetzt werden, ausgesprochen phototoxisch wirken [54]. Dieser Effekt zeigte sich in vitro interessanterweise am stärksten ausgeprägt bei Natriumdisulfit und vornehmlich im UVB-Bereich. Nach Exposition mit UVA-Licht zeigte sich keine Phototoxizität. Weitergehende Überlegungen stellen sich folglich dahingehend, ob eine möglicherweise durch Sulfite oft nur unterschwellig verstärkte UV-Empfindlichkeit der Haut zu einem erhöhten Photokarzinogenese-Risiko

führen könnte, wie es beispielsweise für die auf einen phototoxischen Wirkmechanismus beruhende Photochemotherapie in der Behandlung von Psoriasis der Fall ist.

### 1.5.1. Vorkommen

Sulfit ist chemisch gesehen ein farbloses, nicht brennbares Gas mit stechendem Geruch. Es verflüssigt sich bei  $-10^{\circ}\text{C}$ , verfestigt sich bei  $-72^{\circ}\text{C}$ , und löst sich unter Bildung von schwefliger Säure ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ) in Wasser (85% bei  $25^{\circ}\text{C}$ ). Bei pH-Abfall steigt die Sulfit-Konzentration proportional unter Verbrauch von Bisulfit-Ionen ( $\text{HSO}_3^-$ ) an.

Schwefeldioxid, dessen wäßrige Lösung schweflige Säure, sowie einige sich davon ableitende Salze - im folgenden zusammenfassend als Sulfite bezeichnet - sind nach deutschem Lebensmittelrecht zugelassene Nahrungsmitteladditiva.

Tab. 2: Sulfite als Nahrungsmittelzusatzstoffe [153]

<b>Deklaration</b>	<b>Bezeichnung</b>
<b>E 220</b>	Schwefeldioxid, schweflige Säure
<b>E 221</b>	Natriumsulfit
<b>E 222</b>	Natriumbisulfit (Hydrogensulfit)
<b>E 223</b>	Natriumdisulfit (Metabisulfit)
<b>E 224</b>	Kaliumdisulfit (Metabisulfit)
<b>E 226</b>	Calciumsulfit
<b>E 227</b>	Calciumbisulfit (Hydrogensulfit)

Sie wirken bakterizid, enzymhemmend und bleichend und werden in Nahrungs- und Arzneimitteln als Konservierungsstoffe und Antioxidationsmittel eingesetzt. Hier inhibieren sie mikrobielles Wachstum und schützen vor enzymatischen und nicht enzymatischen Entfärbungen [153]. Jeder Bürger der USA konsumiert schätzungsweise 2-3 mg Sulfit pro

Tag, bei Wein- und Biertrinkern sind es sogar 5-10 mg [173]. Nach deutschem Recht sind Schwefeldioxidmengen bis zu 10 mg/kg mit wenigen Ausnahmen allgemein zulässig, 24 Lebensmittelgruppen dürfen wesentlich höhere Schwefeldioxidkonzentrationen enthalten (Tab. 3). Eine Deklarationspflicht besteht ab einem Sulfid-Gehalt von 50 mg/kg, betrifft allerdings nicht z. B. Wein oder Arzneimittel. Restaurantmahlzeiten sind besonders sulfidreich und können bis zu 500 mg Sulfid enthalten [182, 183]. Weiterhin finden sich Sulfite in einer Reihe von Arzneizubereitungen zur äußerlichen aber auch zur parenteralen Anwendung, wie Infusionslösungen, Lokalanästhetika, Antirheumatika, Antibiotika, Glucokortikosteroide u.a. [147]. Neben dieser gezielten Anwendung als Additivum findet sich Sulfid als natürliches Gärungsprodukt in Wein und Bier. Weiterhin sind Industrieabgase und Smog sulfidhaltig [153].

### **1.5.2. Toxikologie und klinische Reaktionen**

Die orale LD 50 bei Ratten liegt bei 1000-2000 mg Sulfid/kg/KG, wohingegen der toxische Effekt bei Hunden und Menschen variabel ist. Während einige Personen bis zu 50 mg/kg/KG tolerieren können, verspüren andere schon Kopfschmerzen, Erbrechen und Durchfall [24]. Die Food and Drug Administration der USA hat sechs Sulfite zur Verwendung als Antioxidantien als registriert und sicher aufgeführt (Schwefeldioxid, Natriumsulfid, Natrium- und Kaliumhydrogensulfid und Natrium- und Kaliumdisulfid). Klinische Reaktionen auf Sulfite können mannigfaltig sein. Hervorzuheben ist die Sulfid-Überempfindlichkeit, die in den USA große Beachtung findet [153, 169] und dort von März 1983 bis Dezember 1984 zu sechs Todesfällen geführt hat [3]. Besonders gefährdet sind dabei Asthmakranke, bei denen sich in etwa 10% durch Dosen zwischen 1 mg und 200 mg eine Bronchokonstriktion provozieren läßt [173, 176, 182]. Ein weiterer Symptomenkomplex umfaßt gastrointestinale Beschwerden, Blutdruckabfall, Schwindel und Schwächegefühl, weiterhin beschrieben sind Rhinitis, Flush,

Urticaria, Quincke-Ödem, Vasculitis allergica und die Exazerbation eines atopischen Ekzems [107, 150, 159, 170, 171, 173, 190, 200].

### **1.6. Das antioxidative System des Organismus**

Das Risiko einer Schädigung des Organismus, die durch unkontrollierte Oxidationsprozesse hervorgerufen wird (durch aktivierte Formen von Sauerstoff, atmosphärische Noxen, UV- oder ionisierende Strahlung), ist ständig präsent. Während der Evolution haben sich eine Anzahl von Schutzmechanismen entwickelt, die vornehmlich in vier Kategorien eingeteilt werden können: Kompartimentierung, Detoxifikation, Reparatur und Utilisierung.

Der menschliche Organismus hat hauptsächlich zwei Wege, freie Radikale zu bekämpfen: zum einen durch enzymatische Intervention (Superoxid-Dismutase, Katalase etc.), zum anderen mit Radikalfängern wie Vitaminen, Cystein, Methionin, Gluthation u.a. [115].

Reaktive Sauerstoffspezies werden in vivo v.a. beim aeroben Zellstoffwechsel, Medikamentenkatabolismus und Katabolismus anderer xenobiotischer Agentien [45, 99, 139, 106] sowie nach Einwirken von Röntgen- oder UV- Strahlung auf den Organismus [48] und von phagozytierenden Zellen als Antwort auf eindringende Bakterien gebildet [94, 98, 99]. Die letztlich resultierende Zerstörung der Zelle geht meist mit der Freisetzung von Eisen einher [98], welches wiederum die Entstehung von Lipidperoxiden, Hydroxyl-Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies induzieren kann [85].

Wird eine mehrfach ungesättigte Fettsäure der Membranlipide (LH) von einem Radikal X angegriffen, wird von der Methylengruppe zwischen zwei Doppelbindungen ein Wasserstoffatom abstrahiert und es entsteht ein hochreaktives Lipidradikal ( $L^\circ$ ). Ohne Antioxidantien würde nun eine autokatalytische Kettenreaktion einsetzen, sich in kürzester Zeit über die Membran fortpflanzen und die Membranlipide zu Hydroperoxiden oxidieren.

Tab. 3: Auswahl einiger Lebensmittel, denen nach deutschem Recht Sulfid zugesetzt werden darf [201]

Lebensmittel	Höchstmenge an Sulfid (mg/kg, Berechnet als Schwefeldioxid)
Trockenfrüchte	
a) Aprikosen, Birnen, Pfirsiche	2000
b) Ananas, Äpfel, Quitten	1500
c) Weinbeeren, ausgenommen Korinthen	1000
Glasierte Früchte, halbfleuchte Trockenfrüchte	1000
Kandierte Früchte u.a. kand. Pflanzenteile und Belegfrüchte	100
Zitronat und Orangeat	30
Ingwer in Sirup	50
Zerkleinerte Zitruschalen (gewerblich)	125
Rohe geschälte Apfelstücke (gewerblich)	80
Obstgeleesaft, fl. Pektin	800
Zerkleinerter Meerrettich	1000
Spargel, Sellerie, Zwiebel, Blumenkohl, weiße Rüben, Pastinaken (getrocknet)	500
Zerkleinerte Zwiebeln, Zwiebeln in Essig, zerkleinerter Knoblauch	300
Gemüse in Essig	20
Kartoffelerzeugnisse	100
Trockenstärke, Maltodextrine	50
Luftgetrocknete Speisegelantine	100
Zucker	15
Glukosesirup	50
Hart- und Weichkaramellen, Fondanterzeugnisse	50
Aus Fruchtpülpe und Fruchtmarm hergestellt Erzeugnisse für Süßwaren und Backwaren	50
Konfitüre und Gelee einfach, Marmelade	50
Gärungsessig	50 mg/l
Zitrusfrüchte und konzentrierte Zitrusfrüchte	300 mg/l
Fruchtsäfte (gewerblich)	300 mg/l
Alkoholfreier Wein	120 mg/l

d-alpha-Tocopherol (Vitamin E) hat eine sehr hohe Affinität zu Lipidperoxidradikalen ( $LO_2^\circ$ ) und fängt diese daher ab, bevor sie in der Propagation neue Fettsäuren angreifen können. Die Kettenabbruchreaktion besteht in der Übertragung des Wasserstoffatoms der phenolischen Hydroxygruppe des d-alpha-Tocopherols auf  $LO_2^\circ$ , wobei nun ein d-alpha-Tocopherol-Radikal entsteht (Tocopherylradikal, Vitamin E-M $^\circ$ ). Dieses Radikal ist aber durch Resonanzstabilisierung sehr reaktionsträge und kann die Kettenreaktion nicht fortsetzen [132]. Die Abfolge von Initiation, Sauerstoffaddition und Propagation dieses Lipidperoxidationsprozesses beschreiben die folgenden Gleichungen:

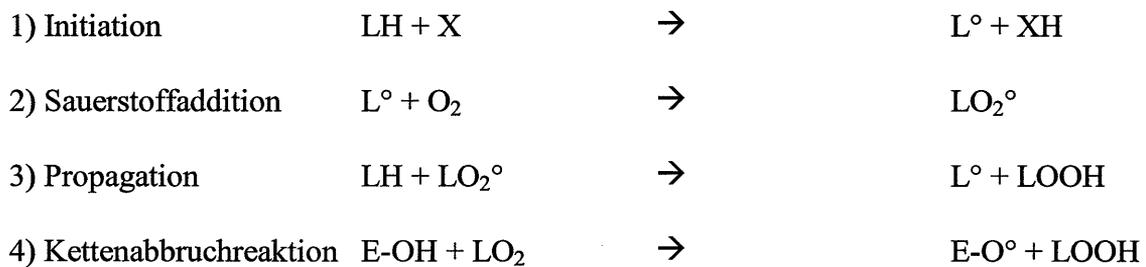


Abb. 2: Lipidperoxidation

In der Zelle wird das in der Membran verankerte Tocopherylradikal vermutlich durch Ascorbinsäure (Vitamin C), die im wässrigen Medium des Zytosols vorhanden ist, wieder in d-alpha-Tocopherol umgewandelt. Es gibt darüber hinaus viele In-vitro-Untersuchungen, die dafür sprechen, daß auch Ascorbinsäure über das Glutathionsystem mit Hilfe von NADH oder NADPH regeneriert wird. Antioxidantien, die bei diesen Prozessen inaktiviert werden können, stellen die Hauptabwehrmechanismen gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies dar. Neben d-alpha-Tocopherol und Ascorbinsäure zählen dazu Pyruvat,  $\beta$ -Karotin, Selen, N-Acetylcystein, Superoxid-Dismutase, Katalase, Glutathion-Peroxidase und die Enzyme des Pentosephosphatweges, die NADPH regenerieren [18, 48, 85, 94, 98, 129, 133, 146, 161, 179].

### **1.6.1. d-alpha-Tocopherol (Vitamin E)**

Anfang 1920 berichteten Evans und Bishop erstmals über einen lebensnotwendigen Faktor, der sich bei Ratten für die Aufrechterhaltung der Trächtigkeit verantwortlich zeigte. Ohne diesen wurden die Ratten zwar trächtig, gebären aber keine lebenden Jungen [63]. Der Begriff Vitamin E gilt als Sammelbezeichnung für alle natürlichen und synthetischen Tocol- und Tocotrienderivate, die qualitativ die biologische Aktivität von alpha-Tocopherol zeigen. Tocopherol leitet sich von den griechischen Wörtern tocos (=Geburt) und pherein (=hervorbringen) ab [62]. Vitamin E konnte 1936 erstmals aus Weizenkeimen isoliert werden. Wenige Zeit später publizierte Fernholz die chemische Struktur des Vitamins [66].

#### **1.6.1.1. Vorkommen und Bedarf**

Allgemein gilt, daß junge, rasch wachsende Pflanzen wenig Tocopherol, während langsam wachsende bzw. ausgewachsene dunkelgrüne Pflanzenteile hohe Tocopherolgehalte haben. In Weizenkeim-, Sonnenblumen- und Olivenöl stellt RRR-alpha-Tocopherol mit 49 bis 100% den Hauptanteil des Vitamin E, während in Soja-, Maiskeim- und Palmöl gamma-Tocopherol der Hauptanteil ist [70]. Die deutsche Gesellschaft für Ernährung geht davon aus, daß sich der Bedarf an d-alpha-Tocopherol an der Polyenfettsäurezufuhr zu orientieren hat und je Gramm Dienfettsäure 0,5 mg RRR-d-alpha-Tocopherol aufgenommen werden soll. In der Annahme, daß ein Erwachsener in Mitteleuropa 18 g Linolsäure und 3 g Linolensäure aufnimmt, ergibt sich eine Zufuhr von 24 Dienäquivalenten und damit ein Mindestbedarf von 12 mg Tocopherol-d-alpha-Äquivalent. Da Vitamin E mit der Konzentration der Gesamtserumlipide korreliert, wird empfohlen, lipidstandardisierte Vitamin-E-Werte anzugeben [100]. Bei einem Cholesterin von 220 mg/dl und Triglyceriden von 110 mg/dl sollte die Vitamin-E-Plasmakonzentration mindestens 30 µMol/l betragen [15]. Kappus und Mitarbeiter postulieren, daß 100-300 mg d-alpha-Tocopherol täglich keinerlei Nebenwirkungen

hervorrufen. Selbst nach Höchstdosen von 3200 IE/Tag waren keine Schäden feststellbar. Die antithrombotische Wirkung von Vitamin E kann in dieser hohen Dosierung allerdings während einer Antikoagulationstherapie zu einer Störung der Antikoagulationseinstellung mit Vitamin-K-Antagonisten führen [102]. Als untere Normgrenze gelten 0,5 mg d-alpha-Tocopherol pro 100 ml Plasma (Deutsche Gesellschaft für Ernährung, 1991). Bei Erwachsenen mit einer d-alpha-Tocopherolunterversorgung (2-3 mg statt 10-12 mg) dauert es 1-2 Jahre, bis der Tocopherolplasmaspiegel unter 11 µmol sinkt und klinische Symptome, wie Verringerung der Anzahl der Erythrozyten und deren Überlebenszeit, Ablagerung von Lipofuszin (Alterspigmente, die durch Lipidperoxidation entstehen) in Muskelzellen und Intestinum sowie neurologische Störungen entstehen. Eine d-alpha-Tocopherolunterversorgung führt bei Tieren zu einem Anstieg der Lipidperoxidation im Blut und Gewebe [70], d-alpha-Tocopherolmangel beeinflusst aber auch die Aktivität zahlreicher Enzyme, vor allem der Membranenzyme [62].

#### **1.6.1.2. Wirkung**

In tierischen Zellen sind Tocopherole Bestandteil aller biologischen Membranen. Man nimmt heute an, daß ihre wichtigste biologische Funktion darin besteht, Membranlipide, Lipoproteine und Depotfette vor dem Abbau durch Lipidperoxidation zu schützen. Die Auffassung, daß d-alpha-Tocopherol primär als Antioxidans wirkt, wird durch zahlreiche in-vitro-Versuche gestützt, die zeigen, daß d-alpha-Tocopherol im Gewebe, in Zellen, Zellorganellen und artifiziellen Systemen ein hervorragendes und essentielles Antioxidans ist, das verhindert, daß mehrfach ungesättigte Fettsäuren durch Lipidperoxidationsprozesse zerstört werden [28, 61, 123, 125, 132]. Als membranstabilisierendes Antioxidans kann d-alpha-Tocopherol die Freisetzung von Histamin und hydrolytischen Enzymen aus Mastzellen und Lysosomen und die Synthese von Prostaglandin E2 hemmen und somit antientzündlich

wirken [127]. Des Weiteren konnte eine juckreizstillende [131] und wundheilungsfördernde Wirkung nachgewiesen werden [8, 122, 197]. Daneben existieren einige Studien, die darauf hinweisen, daß antioxidansreiche Nahrung für die Primärprävention von Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen von großer Bedeutung ist [21, 75].

### **1.6.2. Ascorbinsäure (Vitamin C)**

Vitamin C ist das vielleicht schon am längsten bekannte Vitamin. Bei ausgedehnten Seereisen wurde schon früher das klassische Mangelsyndrom Skorbut beschrieben und bald schon eine bestimmte Substanz, die u.a. Inhaltsstoff des Sauerkrauts war und die auf diesen Reisen den Mangelerscheinungen, die zur Erkrankung der Seeleute geführt hat, entgegenwirken konnte, vermutet.

Ein Ascorbinsäuremangel äußert sich in Form eines erniedrigten Ascorbinsäuregehaltes in Plasma und den Leukozyten, Zahnfleischbluten, Gingivitis, Petechien, Hämatomen, folliculärer Hyperkeratose, verschlechterter Wundheilung, erhöhter Infektanfälligkeit und verminderter Reaktionsfähigkeit des Immunsystems auf Stress.

Die erste Isolierung von Ascorbinsäure gelang Szenti-Györgyi im Jahre 1926. Vitamin C ist der Gattungsname für L-Threo-hex-2-enono-lacton (L-Xylo-ascorbinsäure bzw. L-(+)-Ascorbinsäure) und deren Derivate, die qualitativ die biologische Wirkung von L-Ascorbinsäure entfalten können [86].

#### **1.6.2.1. Vorkommen und Bedarf**

Ascorbinsäure ist weit verbreitet, viele pflanzliche und tierische Organismen sind zur Biosynthese dieses Vitamins fähig. Bei den einheimischen Gemüsen ist die Kartoffel, wenn es auch lagerungsabhängig zu recht hohen Verlusten kommt, eine der wichtigsten Ascorbinsäurelieferanten. Neben Zitrusfrüchten enthalten auch Tomaten, Kohl, Chilischoten,

Broccoli und Hagebutten relativ hohe Vitamin-C-Konzentrationen. Eine internationale Einheit (IE) Vitamin C entspricht 50 µg L-(+)-Ascorbinsäure. Mengenangaben erfolgen aber gewöhnlich in mg Ascorbinsäure [86]. Steady-state-Plasmakonzentrationen werden durch eine tägliche Ascorbinsäurezufuhr von 200 mg/Tag erzielt [116]. Unter anhaltender Streßsituation kann der Bedarf sogar über 200 mg/Tag betragen. [78]. Bei Rauchern kann der tägliche Ascorbinsäurebedarf auf mehr als das Doppelte ansteigen, sie brauchen mindestens 200 mg/Tag, um dieselben Serumspiegel zu erlangen wie Nichtraucher [166]. Zur Förderung der Wundheilung bei Resorptionsstörungen sowie zur Verbesserung der Eisenresorption werden Tagesdosen von 0,5-1,0 g berichtet [86]. Eine Hypervitaminose mit Ascorbinsäure ist nicht bekannt, ebensowenig sichere toxische Wirkungen. Auch Dosen von 10-20 g/Tag zeigten keinerlei unerwünschten Effekte [74]. Bei der Einnahme von sehr hohen Einzeldosen im Bereich von 5-10 g und mehr kann vorübergehend eine Diarrhö auftreten, bei parenteraler Gabe tritt diese Nebenwirkung nicht auf. Skorbut, das klassische Vitamin-C-Mangel-Syndrom, läßt sich durch eine tägliche Einnahme von 10 mg Vitamin C pro Tag verhindern [86].

#### **1.6.2.2. Wirkung**

Ascorbinsäure ist ein hochpotentes Reduktionsmittel und hat im Körper zahlreiche Angriffspunkte. Am bekanntesten ist die Beteiligung von Ascorbinsäure am Elektronentransfer bei Hydroxylierungsreaktionen. Eine der wichtigsten biochemischen Funktionen von Ascorbinsäure ist die Mitwirkung bei der Kollagenbiosynthese [6]. Ascorbinsäure begünstigt die Entwicklung und Reifung des Knorpels [174], spielt eine Rolle bei der Carnitinbiosynthese [157], bei der Biosynthese von Neurotransmittern wie z.B. Dopamin [46], bei der Amidierung neuroendokriner Hormone wie Gastrin, Bombesin, CRH und TRH [164], sowie im Tyrosin-, Folsäure- und Serotoninstoffwechsel. Bei der Entgiftung

toxischer Metabolite und Medikamente durch die in der Leber lokalisierten mischfunktionellen Oxidasen und den dabei notwendigen zahlreichen Hydroxilierungsreaktionen ist Ascorbinsäure ebenfalls ein wichtiger Cofaktor. Es wird vermutet, daß L-Ascorbinsäure sowohl die Synthese von Cytochrom P450 stimuliert [142] als auch dieses vor der Inaktivierung durch Sauerstoffradikale schützt [145]. L-Ascorbinsäure inhibiert die Umwandlung von Nitrit in Nitrosamine, schwächt die Wirkung von Phytaten und anderen Liganden auf die Eisenresorption ab und bewirkt dadurch eine Steigerung der enteralen Eisenresorption [84]. Es scheint Einfluß auf die Glykosilierung von Proteinen zu haben [38], außerdem vermindert die Ascorbinsäure-Einnahme von 300-600 mg/Tag das Risiko einer Kataraktentstehung um den Faktor 4 [162] und stimuliert durch Schutz der Phagozytenmembran vor oxidativer Selbstzerstörung die körpereigene Abwehr [2]. Rund  $\frac{3}{4}$  der epidemiologischen Studien zur Frage Ascorbinsäure und Korrelation mit der Inzidenz von Tumoren kommen zu dem Resultat, daß Ascorbinsäure ein protektiver Faktor ist [21]. Neben einer Hemmung der Vermehrung tumorinduzierender Viren wird über einen direkt wachstumshemmenden Effekt bei manchen Neoplasien berichtet [143]. Darüber hinaus scheint es möglich, durch Ascorbinsäure-Supplementation die Nebenwirkungen einiger aggressiver Therapieprotokolle zu reduzieren [175]. Auch die Strahlendermatitis und die Knochenmarkstoxizität einer Radiatio sollen durch Ascorbinsäure abgeschwächt werden [141].

## **1.7. Ziel der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe des Photohämolysetests an Erythrozyten von 40 gesunden Probanden *in vitro* untersucht, inwieweit oral zugeführte Sulfite phototoxische Reaktionen auslösen und diese Phototoxizität durch die kombinierte, systemische Einnahme von Ascorbinsäure und d-alpha Tocopherol beeinflusst werden kann. Vor und nach einer speziellen Diät sowie der Einnahme von Natriumdisulfit, Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol oder Placebo wurde den Probanden Blut entnommen, die Vitaminkonzentrationen der o.g. Vitamine bestimmt und der Fenofibrat-abhängige Photohämolysetest durchgeführt. Die Bestrahlungen der Blutproben erfolgte mit UVB- oder UVA-reicher Strahlung und die Hämolyse wurde anschließend mit einem Photometer gemessen. So konnten das Ausmaß der phototoxischen Hämolyse mit Erythrozyten unterschiedlicher Probanden vor und nach Bestrahlung miteinander verglichen werden.

Ferner wurde *in vivo* an den selben 40 Probanden durch Bestimmung der UV-Empfindlichkeit untersucht, ob die *in vitro* gefundenen Ergebnisse mit den klinischen Befunden korrelieren. Dazu wurde der untere, ungebräunte Rücken am Tag vor Einnahme der oben genannten Substanzen und acht Tage nach Beginn der Einnahme mit 10 ansteigenden Dosen UVB-reicher Strahlung bestrahlt und am nächsten Tag jeweils die minimale Erythemdosis (MED) visuell und die Blutflußeinheiten mittels eines Laser-Doppler-Flowmeters ermittelt.

Ziel der Arbeit war es zu bestimmen ob durch systemische Gabe von Sulfiten bzw. Sulfiten, d-alpha-Tocopherol und Ascorbinsäure bzw. d-alpha-Tocopherol und Ascorbinsäure beim Menschen die phototoxische Lyse der Erythrozyten und die Lichtempfindlichkeit des jeweiligen Individuums modifiziert werden kann.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Geräte und Materialien**

#### **2.1.1. Bestrahlungsquellen**

Als UVA-Quelle wurde das UVA-Bestrahlungsgerät UVASUN 5000 (Mutzhas, München) mit einem Spektrum von 320 bis 460 nm verwendet. Das Gerät hat ein Emissionsmaximum bei etwa 375 nm. Bei einem Abstand von 40 cm zwischen Lampenunterseite und Erythrozytensuspension ergibt sich eine UVA-Strahlungsintensität von 42 mW/cm<sup>2</sup>.

Als UVB-Quelle diente das Gerät TL 20 W/12 (Philips, Hamburg) mit einem Hauptemissionsbereich von 280 bis 350 nm. Das Emissionsmaximum lag bei 315 nm. Auch hier wurde ein Abstand von 40 cm eingehalten, wobei die UVB-Strahlungsintensität 1,0 mW/cm<sup>2</sup> und die UVA-Intensität 0,4 mW/cm<sup>2</sup> betrug.

#### **2.1.2. Sonstige Geräte und Materialien**

- Centra UV-Meter (Osram, München): Photozelle zur Messung der UVA- oder UVB-Strahlendosis von Bestrahlungsquellen.
- Dynatech Photometer MR 700, Microplate Reader, Meßwellenlänge 340 - 700 nm, Testfilter: 550 nm (Dynatech, Denkendorf).
- DU-50 Series Spektrometer (Dynatech, Denkendorf)
- Laser-Doppler-Flowmeter (Periflux 2, Perimed AB, Stockholm, Schweden)
- Zentrifuge Rotixa KS (Hettich, Tuttlingen).
- Magnetrührer Ikamag RCT (Janke und Kaukel, Staufen i. Br).
- Temperatur-, pH- und mV-Meßgerät Orion S 1520 (Orion, Küsnacht, Schweiz).
- Waage Sartorius portable PT 1200 (Sartorius, Göttingen): Wägebereich 1200 g,

Ablesbarkeit 0,1 g.

- Analysenwaage Sartorius analytic A 120 S (Sartorius, Göttingen: Wägebereich 121 g,

Ablesbarkeit 0,0001 g).

- Mikrotiterplatten für Gewebekulturen (Greiner, Solingen): 96 Vertiefungen; Abmessungen:

82 x 127 mm; Volumen je Vertiefung: 0,380 ml; Fläche je Vertiefung: 0,32 cm<sup>2</sup>.

- Gewebekulturplatten (Greiner, Solingen): 24 Vertiefungen und Abdeckplatte; Abmessungen:

82 x 127 mm; Volumen je Vertiefung: 2,9 ml; Kulturfläche je Vertiefung: 1,75 cm<sup>2</sup>.

- Schüttler IKA MTS 4 (Janke und Kunkel, Staufen in Br.).

- Schüttelwasserbad (Köttermann, Uetze-Hänigsen).

- Bioanalytik-Test (Farbtest von Boeringer Mannheim)

### 2.1.3. Reagentien

TCM-Puffer:

- TRIS, Ultrarein (Paesel & Lorei, Hanau)
- NaCl, purissimum (Fluka Chemika, Buchs)
- Übrige Reagentien (Merck, Darmstadt)

Der TCM-Puffer wurde wie folgt hergestellt:

3,0 g Tris, 7,0 g NaCl, 0,3 g KCl,  
0,2 g MgCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O,  
0,147g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O,  
Aqua dest. ad 1000 ml;  
pH 7,40 bei Zimmertemperatur

Heparin Na, 25 000 IE/ 5 ml (Braun, Melsungen)

Albumin, bovines (Sigma, St.Louis, USA , Frakt. V 96-99%)

Drabkin's Reagenz (Sigma, St. Louis, USA), zusammengesetzt aus:

0,05 g KCN, 0,2 g K<sub>3</sub>Fe (Cn)<sub>6</sub>  
Aqua dest ad 1000 ml

Fenofibrat (Sigma, St. Louis, USA F-60 20)

## 2.2. Probanden

Es wurden 40 gesunde, freiwillige Probanden (16 Männer, 24 Frauen) im Alter zwischen 20 und 57 Jahren ausgewählt, die anhand eines Merkblattes und im persönlichen Gespräch detailliert über den Versuchsablauf aufgeklärt wurden und schriftlich ihr Einverständnis gaben. Dieser Studie wurde durch Voten der Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer und der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zugestimmt.

### 2.2.1. Ein- und Ausschlußkriterien

Zur Testung wurden nur Probanden zugelassen, die dem Hauttyp II oder III nach Fitzpatrick zugeordnet wurden (siehe Tabelle 4).

Tab. 4: Einteilung der Hauttypen [67]

Hautfarbe	Hauttyp	Sonnenbrand*	Bräunung*
<b>Weiß</b>	I	Ja	Nein
	II	Ja	Gering
	III	Ja	Ja
	IV	Nein	Ja
<b>Braun</b>	V	Nein	Ja
<b>Schwarz</b>	VI	Nein	Ja

\* Nach 30 Minuten Sonnenexposition

Ferner wurden nur Probanden inkludiert, die keine inneren Erkrankungen aufwiesen, keine Medikamente einnahmen und schriftlich erklärten, während und eine Woche vor Beginn der Untersuchungen eine spezielle Diät einzuhalten. Bei weiblichen Probanden wurde eine Schwangerschaft anamnestisch ausgeschlossen. Die Probanden durften weder durch Solarium noch durch die Sonne ganzkörpergebräunt sein.

### 2.2.2. Diät

Die Testpersonen erklärten schriftlich eine Woche vor Beginn und während der Untersuchungen eine sulfitararme Diät einzuhalten und bekamen dazu folgenden Handzettel mit den wichtigsten zu meidenden Produkten:

Tab. 5: Handzettel zur Sulfite-armen Diät

<b>Lebensmittel</b>	<b>Höchstmenge an SO<sub>2</sub> (mg/kg)</b>
Trockenfrüchte	2000
Aprikosen, Birnen, Rosinen	1000
Getrocknetes Gemüse	500
Gemüse in Essig	20
Kartoffelerzeugnisse Fertigteig, Kartoffelchips	100
Zuckerarten	14-400
Fruchtsäfte	300
Zudem Verzicht auf den Genuß von Bier, Wein, Meerrettich und Silberzwiebeln.	

Ferner verpflichteten sich die Probanden eine Woche vor und während der Studie keine Vitaminpräparate einzunehmen und auf Obst und Gemüse weitgehend zu verzichten.

Welche Nahrungsmittel während der Untersuchung gemieden werden mußten, wurde ausführlich im persönlichen Gespräch erklärt.

### 2.2.3. Gruppeneinteilung

Für die placebokontrollierte Studie wurden 40 freiwillige Probanden rekrutiert und vier Gruppen mit jeweils 10 Probanden gebildet.

Die Randomisierung wurde doppelblind von einem studienunabhängigen Untersucher

durchgeführt. Bei allen vier Gruppen erfolgte am ersten Tag (Tag 0: Bestrahlung, Tag 1: Ablesung) die Bestimmung der Minimalen Erythemdosis (MED) und des Hautblutflusses im Bestrahlungsfeld mittels eines Laserdopplerflowmeters.

Die vier Gruppen erhielten Medikamentenbehälter, in denen sich Natriumdisulfit-, Ascorbinsäure-, bzw. d-alpha-Tocopherol-haltige Kapseln oder gleich aussehende Placebokapseln befanden. Die Tagesdosis für Natriumdisulfit war 400 mg und wurde in zwei Einzeldosen von 200 mg morgens und abends verabreicht. Die Tagesdosis von Ascorbinsäure war 2000 mg und für d-alpha-Tocopherol 666 mg (entsprechend 1000 IE), beide Substanzen wurden ebenfalls täglich in zwei Einzeldosen verabreicht.

Tab.6: Gruppeneinteilung

<b>Gruppe 1 (G1)</b>	<b>Gruppe 2 (G2)</b>	<b>Gruppe 3 (G3)</b>	<b>Gruppe 4 (G4)</b>
Natriumdisulfit (2x200 mg)	Natriumdisulfit (2x200 mg)	Placebokapseln	Placebokapseln
Placebokapseln	Ascorbinsäure (2x1000 mg)	Ascorbinsäure (2x1000 mg)	Placebokapseln
Placebokapseln	d-alpha-Tocopherol (2x500 IE/d)	d-alpha-Tocopherol (2x500 IE/d)	Placebokapseln

Die Kapseleinnahmen begannen am Abend (Tag 1) nach der ersten Ablesung, d.h. 1 Tag nach der ersten Bestrahlung, und wurden über acht Tage fortgeführt. Während weiterer Kapseleinnahme erfolgte eine erneute Bestimmung der UV-Empfindlichkeit auf gleiche Weise (Tag 8: Bestrahlung, Tag 9: Ablesung). An den Tagen 0 und 8 wurde den Probanden Blut entnommen und mit den jeweiligen Erythrozyten ein Photohämolysetest mit der phototoxischen Substanz Fenofibrat durchgeführt. Weiter wurden die Serumkonzentrationen für Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol gemessen.

## **2.3. Densitometrische Bestimmung der Antioxidantienkonzentrationen im Serum**

### **2.3.1. Bestimmung der d-alpha-Tocopherolkonzentration**

Die d-alpha-Tocopherolkonzentration wurde mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) in Zusammenarbeit mit dem Klinikum Großhadern der LMU im anästhesiologischen Forschungslabor von Herrn Dr. Uwe Senfleben bestimmt. Die Serumproben wurden vor Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Bei dieser Temperatur ist eine Lagerung von Plasma- oder Serumproben über mehrere Jahre ohne Verlust möglich [62]. Das Prinzip der HPLC-Methode beruht auf einer Extraktion mit einem Lipidlösungsmittel bei Zugabe von Antioxidantien zum Oxidationsschutz mit anschließender Trennung der Extrakte auf Silikasäulen (Normalphase) [14, 41, 98, 167, 172, 191]. Die Quantifizierung der Chromogramme erfolgte durch eine Trennung von Proben mit bekanntem Gehalt an Tocopherolen. Bei zu analysierendem Material mit nur sehr geringen Fettmengen, wie Blut oder Plasma [40, 58, 89], genügt als Probenvorbereitung eine einfache Extraktion mit einem Lipidlösungsmittel. Der Zusatz von Antioxidantien bei der Aufarbeitung ist nötig wegen der Oxidationsempfindlichkeit von d-alpha-Tocopherol. Die Bestimmung wurde mit einem Fluoreszenzdetektor durchgeführt [167].

### **2.3.2. Bestimmung der Ascorbinsäurekonzentration**

Die Bestimmung der Ascorbinsäurewerte der Probanden erfolgte in unseren Labors mittels eines etablierten Bioanalytik-Testes (Farbtest von Boeringer Mannheim) [13]. Die Anwendung von Farbtests ist ein valides und reproduzierbares Verfahren zur enzymatischen Konzentrationsbestimmung. Die Ascorbinsäurekonzentrationen können mittels Teststreifen über das Intermediärprodukt Dehydroascorbat, welches durch das Enzym Ascorbat-Oxidase entsteht, und Messung der Extinktionskoeffizienten bei 578 nm mittels eines

Spektralphotometers (DU-50 Series) bestimmt werden. Die Serumproben wurden vor der Aufarbeitung im Dunkeln gelagert.

L-Ascorbinsäure ist ein starkes Reduktionsmittel und damit in der Lage, das Tetrazoliumsalz MTT [3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] in Gegenwart des Elektronenüberträgers PMS (5-Methylphenazinummethosulfat) bei pH 3,5 zu einem Formazan zu reduzieren. Im Probenansatz wurde die Summe der reduzierenden Substanzen bestimmt. Zur spezifischen Bestimmung wird in einem Probenleerwertansatz von diesen reduzierenden Substanzen nur der L-Ascorbat-Anteil in der Probe durch Ascorbat-Oxidase (AO) in Gegenwart von Sauerstoff oxidativ entfernt. Das entstehende Dehydroascorbat reagiert nicht mit MTT/PMB. Die Extinktionsdifferenz des Probenleerwertes ist der L-Ascorbat-Menge in der Probe äquivalent. Das MTT-Formazan ist damit die Meßgröße und aufgrund seiner Absorption im sichtbaren Bereich bei 578 nm photometrisch bestimmbar. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von MTT-Formazan [13, 39, 86] nach der allgemeinen Berechnungsformel:

$$c = \frac{V \cdot MG}{e \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E [g/l]$$

#### 2.4. Fenofibrat-abhängiger Photohämolysetest

Der auf Kahn und Fleischaker [101] zurückgehende Photohämolysetest basiert auf der phototoxisch induzierten Lyse menschlicher Erythrozyten und ist ein Verfahren, das den Nachweis des phototoxischen Potentials von Substanzen in vitro ermöglicht. In dieser Untersuchung wurde Fenofibrat als phototoxische Substanz ausgewählt, da sich gezeigt hatte, daß diese Substanz sowohl im UVA- als auch im UVB-Bereich phototoxisch wirkt und durch Koinkubation mit Antioxidantien dieser Effekt reduziert werden kann [193]. Jetzt wurde der Frage nachgegangen, ob durch systemische Gabe von Sulfiten bzw. Sulfiten, d-alpha-

Tocopherol und Ascorbinsäure bzw. d-alpha-Tocopherol und Ascorbinsäure beim Menschen die phototoxische Lyse der Erythrozyten des jeweiligen Individuums modifiziert werden kann.

#### **2.4.1. Herstellung der Erythrozytensuspension**

Den Probanden wurde pro Versuch 20 ml Blut aus der Kubitalvene entnommen, zuvor wurden die verwendeten Spritzen innen mit 2 Tropfen Heparin benetzt. Das so gewonnene Heparinblut wurde unter nur mäßigem Druck in ein 50-ml-Kunststoffröhrchen gespritzt, mit TCM-Puffer aufgefüllt und anschließend bei 20°C für 10 Minuten mit 2000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand und die oberste Erythrozytenschicht wurden mit einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt. Unter jeweiliger Zugabe von TCM-Puffer wurde dieser Waschvorgang zweimal wiederholt, so daß ein gewaschenes Erythrozytsediment resultierte. 400 µl des gewonnenen Erythrozytsedimentes wurden in 80 ml 0,03 % iger Humanalbuminlösung gegeben, aus der zuvor 400 µl abgenommen und verworfen wurden. Alle Schritte erfolgten unter strengem Lichtschutz. 5 ml der Zellsuspension wurden für die Bestimmung des Totalhämolysewertes entnommen, in ein Polystyrolröhrchen abpipettiert und sofort für 10 Minuten bei 2000 U/min. und 20 °C zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde dekantiert und die Röhrchen wurden mit Aqua dest. auf jeweils 5 ml aufgefüllt. Durch den so herbeigeführten hypotonen Schock kam es zur Lyse der Zellen. Die Totalhämolyseprobe wurde mit Aluminiumfolie umgeben.

Die Einwaage der phototoxischen Substanz Fenofibrat erfolgte nach der Formel:

$$m = c \cdot V \cdot M$$

(m = einzuwiegende Menge in g, c = benötigte Konzentration der Lösung in mol/l, V = Volumen der Lösung in l, M = Molmasse der Substanz in g/mol).

Fenofibrat wurde mit TCM-Puffer in einen Meßkolben überführt und zur Verbesserung der Substanzlöslichkeit jeweils 5 x 10 min. im Ultraschallbad inkubiert. Die Stammlösung wurde nun mit 5 l TCM-Puffer verdünnt. Die Endkonzentration betrug  $10^{-3}$  mol/l Fenofibrat.

### **2.4.2. Herstellung der Test- und Kontrollansätze**

Für die Ermittlung des Blindwertes (Blank) enthielten 4 Vertiefungen 400 µl TCM-Puffer ohne Zugabe von Erythrozytensuspension. Als Leerwert dienten die Vertiefungen der 96-Well-Platte mit 400 µl der Erythrozytensuspension und 100 µl TCM-Puffer.

In weitere 4 Vertiefungen wurden 400 µl totalhämolytierte Erythrozytenlösung gefüllt, um die 100% Hämolyse zu ermitteln, da der Extinktionswert für Aqua dest. bei Abgleich gegen TCM-Puffer gleich 0,00 beträgt, konnten bei der späteren photometrischen Messung die Totalhämolysewerte im gleichen Meßvorgang wie die übrigen Proben bestimmt werden. In 12 weitere Vertiefungen wurde jeweils 400 µl Erythrozytensuspension pipettiert.

Für jede Bestrahlungsdosis wurde so ein Leer- und Blindwert ermittelt, um Änderungen durch die Bestrahlung zu registrieren. Der erythrozytenfreie Blindwert diente dabei der Berücksichtigung einer eventuellen Eigenabsorption der bestrahlten Substanz bei der folgenden photometrischen Bestimmung der Hämolyse bei 550 nm. Eine Hämolyse der Erythrozytensuspension allein durch UV-Bestrahlung ohne Gegenwart der Testsubstanz wurde durch die Bestimmung des Leerwerts berücksichtigt.

Mit Ausnahme der Leerwerte wurden in jede Vertiefung dann zügig 100 µl der phototoxischen Fenofibratlösung pipettiert.

Nach Beendigung des Pipettierens wurden die Gewebekulturplatten verschlossen, mit Aluminiumfolie lichtdicht geschützt und in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C 1 h lang inkubiert.

### **2.4.3. Bestrahlungen**

Bis auf die nicht zu bestrahlende Kontrollplatte wurden im weiteren alle Gewebekulturplatten wieder ausgewickelt und nach Entfernung des Deckels in einem zweiten Schüttelwasserbad steigenden Dosen UV-Strahlung ausgesetzt. Der Abstand zwischen Lampenunterseite und

Oberfläche der Testansätze betrug 40 cm. Die Proben wurden mit 0, 10, 20 oder 40 J/cm<sup>2</sup> UVA oder mit 0, 400, 800, 1200 oder 1600 mJ/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt, die Bestrahlungszeiten wurden zuvor anhand der mit dem Centra-UV-Meter gemessenen UVA- bzw. UVB-Intensität berechnet. Nach Beendigung der Bestrahlung wurden die Proben wieder mit ihren Deckeln versehen, die jeweiligen Bestrahlungsdosen darauf notiert und dann die Kulturplatten lichtdicht mit Aluminiumfolie eingewickelt und für weitere 30 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert.

#### **2.4.4. Photometrische Bestimmung der Hämolyse**

Zur Trennung von Hämolysat und verbleibenden Erythrozyten wurden alle Platten erneut für 10 Minuten bei 2000 U/min. und 4 °C zentrifugiert und vom Überstand 150 µl mit einer Mikropipette in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert. Daraufhin erfolgte eine erneute 15 Minuten dauernde Inkubation auf dem IKA-Schüttler bei Raumtemperatur. In jede Vertiefung wurde dann 50 µl Drabkin's Reagens hinzugefügt; dadurch wird das nach Bestrahlung aus den Erythrozyten freigesetzte Hämoglobin und Met-Hämoglobin in das stabile Cyan-Hämoglobin übergeführt, das bei 550 nm photometrisch bestimmt werden kann. Als Referenzleerwert für das Photometer enthielt die erste Vertiefung jeder Mikrotiterplatte 150 µl TCM-Puffer und 50 µl Drabkin's Reagens. Die Messung der Extinktionen der Testansätze erfolgte mit dem Photometer MR 700 gegen den Referenzleerwert, die Wellenlänge des Testfilters betrug 550 nm, die eines Referenzfilters 660 nm.

#### **2.4.5. Berechnung der Hämolysewerte**

Aus den gemessenen optischen Dichten (OD) errechnen sich die Hämolysegrade.

Vom Extinktionswert der Testansätze wurde zunächst jeweils der korrespondierende Blindwert abgezogen. Danach erfolgte die Subtraktion der Leerwerte. Als Referenz bzw.

Kontrolle diente der Extinktionswert der Totalhämolysen.

Jeder Meßwert der Hämolysen wurde jeweils durch Doppelbestimmungen ermittelt, das heißt jeder Meßwert war der Mittelwert aus den Versuchsergebnissen zweier identischer Proben.

$$\% \text{ Hämolysen}_{(\text{Probe})} = \frac{\text{OD}_{(\text{Probe})} - [\text{OD}_{(\text{LW})} + \text{OD}_{(\text{BW})}]}{\text{OD}_{(100\% \text{-Wert})} - \text{OD}_{(\text{LW})}}$$

## 2.5. Minimale Erythemdosis

Die minimale Erythemdosis MED ist die niedrigste Dosis einer definiert eingestrahlten Dosisreihe, die ein scharf begrenztes, homogenes Erythem 24 Stunden nach Exposition auslöst [151]. Für die Bestimmung der MED wurde bei jedem Probanden eine Bestrahlung mit polychromatischer UVB-reicher Strahlung (Leuchtstoffröhren TL 20 W/12, Philips, Hamburg) am Tag 0 durchgeführt. Dazu wurden zehn, 1,8 cm<sup>2</sup> große, kreisrunde Hautareale am unteren, nicht gebräunten Rücken der Probanden ansteigenden UVB-Dosen ausgesetzt. Dies geschah mit Hilfe einer Hartgummischablone, die den Probanden aufgeklebt wurde, während das restliche Integument mit Tüchern vor Bestrahlung geschützt war. Der Abstand zwischen Lampe und unterem Rücken des Probanden wurde auf 40 cm eingestellt. Mit Hilfe einer Stoppuhr wurden die Hautareale nach definierten Zeiten durch Entfernung der Gummiformen eröffnet, um die erwünschten Bestrahlungsdosen zu erhalten. Die UVB-Dosen waren 20 mJ/cm<sup>2</sup>, 28 mJ/cm<sup>2</sup>, 40 mJ/cm<sup>2</sup>, 57 mJ/cm<sup>2</sup>, 80mJ/cm<sup>2</sup>, 113 mJ/cm<sup>2</sup>, 125 mJ/cm<sup>2</sup>, 160 mJ/cm<sup>2</sup>, 175 mJ/cm<sup>2</sup> und 200 mJ/cm<sup>2</sup>.

Die MED wurde visuell 24h +/- 2h nach erfolgter Bestrahlung abgelesen (Tag 1). Das erste Areal, auf dem sich ein das gesamte Bestrahlungsfeld ausfüllendes Erythem fand, wurde der eingestrahlten Dosis zugeordnet und diese als MED definiert.

## 2.6. Ermittlung der Blutflußeinheiten

Der Erythrozytenfluß wurde mit Hilfe eines Laser-Doppler-Flowmeters (Periflux 2, Perimed AB) in jedem Bestrahlungsfeld als Mehrfaches des Blutflusses (MBF) im Vergleich zu nicht bestrahlter Haut gemessen.

$$\frac{\text{Blutflußeinheiten in bestrahlter Haut}}{\text{Blutflußeinheiten in nicht bestrahlter Haut}} = \text{MBF}$$

Die Laser-Doppler-Technik ermöglicht die Aufzeichnung von relativen Veränderungen des Erythrozytenflusses in einem definierten Gewebsvolumen [186, 189]. Diese Methode wurde 1972 erstmals von Riva et al. zur Messung der Blutströmung in der Retina des Kaninchens eingesetzt [160]. Drei Jahre später wurde dieses Verfahren durch Stern erstmals zur Bestimmung der Hautdurchblutung genutzt [181]. 1980 konnten einige technische Unzulänglichkeiten durch Einführen des Doppelkanal-Detektor-Systems bewältigt werden [138]. Die Meßwerte des Systems werden in Volt-Einheiten ausgedrückt und stehen in linearer Beziehung zum Flux der Blutkörperchen, meistens Erythrozyten, innerhalb der Mikrozirkulation der Haut [186]. Laser-Doppler-Technik mißt die Strömung überwiegend in den tieferen, thermoregulatorisch wirkenden Gefäßkompartimenten der Haut durch Lichtreflektion [64].

## 2.7. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Universität München (Direktor: Prof. Dr. K. Überla) zu Rate gezogen.

Aus Einzelwerten wurden für die untersuchten Parameter (MBF, MED, Photohämolyse und Vitaminkonzentrationen im Serum) Mediane gebildet, und bei Vergleich der Gruppen kam

der nicht parametrische Wilcoxon-signed-rank-Test für nicht normal verteilte Daten zur Anwendung.

Es wurde der Einfluß von Sulfit- und Placeboeinnahme, Antioxidantien- (Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol) und Placeboeinnahme sowie Sulfit- und Antioxidantieneinnahme (Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol) auf die fenofibratabhängige Photohämolyse, die MED und den Hautblutfluß untersucht. Dabei wurden die jeweiligen Werte vor Einnahme der o.g. Substanzen und am letzten Tag während der Einnahme der Substanzen gemessen und die vier Gruppen miteinander verglichen. Die minimal geforderte Signifikanz lag bei  $p < 0,05$  (\*), ein weiteres Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,005$  (\*\*).

Die Ausgangswerte und damit Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bezüglich der Vitaminkonzentrationen von Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol und der MED an Tag 0 sowie der Werte an Tag 8 wurden durch den t-Test für nicht verbundene Stichproben ermittelt. Signifikant waren Werte bei  $p < 0,05$  (\*).

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. d-alpha-Tocopherolkonzentrationen**

In der Sulfitgruppe (G1) zeigte sich keine signifikante Änderung der Serum d-alpha-Tocopherolkonzentrationen. Nach Sulfiteinnahme sank die Konzentration von im Mittel 9,7 mg/ml an Tag 1 auf 9,0 mg/ml an Tag 8. In der Gruppe mit Antioxidantien- und Sulfiteinnahme (G2) stieg sie von 14,1 mg/ml an Tag 1 auf 20,7 mg/ml an Tag 8. Dieser Anstieg war statistisch signifikant. In der Gruppe mit Ascorbinsäure- und d-alpha-Tocopheroleinnahme (G3) stieg die d-alpha-Tocopherolkonzentration von 11,8 mg/ml an Tag 1 auf 20,1 mg/ml an Tag 8 (Abb.3). Nach Placeboeinnahme (G4) stieg sie nur leicht von 11,2 mg/ml auf 12,4 mg/ml an.

In Vergleich der Ausgangswerte der Gruppen untereinander zeigten sich leicht erhöhte d-alpha-Tocopherolkonzentrationen in der Ascorbinsäure- und d-alpha-Tocopherolgruppe (G3) und der Placebogruppe (G4). Statistisch signifikant war der Konzentrationsunterschied nur im Vergleich zwischen der Gruppe mit Sulfiteinnahme (G1) und der Ascorbinsäure- und d-alpha-Tocopherolgruppe (G3).

Nach Einnahme von 2 x 500 IE d-alpha Tocopherol zeigte sich an Tag 8 für alle Gruppen mit Antioxidantieneinnahme ein signifikanter Anstieg der d-alpha Tocopherolkonzentration ohne wesentlichen Unterschied zwischen diesen Gruppen (Abb.3). In der Sulfitgruppe und in der Placebogruppe zeigte sich kein Anstieg der Werte.

#### **3.2. Ascorbinsäurekonzentrationen**

In der Gruppe der Probanden mit Sulfiteinnahme (G1) zeigte sich keine signifikante Änderung der Ascorbinsäurekonzentrationen über den Zeitraum der achttägigen Untersuchung (Abb.4). An Tag 1 lag die Ascorbinsäurekonzentration nach Sulfiteinnahme im Mittel bei 4,9

mg/ml und an Tag 8 bei 4,4 mg/ml. In der Gruppe der Probanden mit Sulfite- und Antioxidantienaufnahme (G2) stiegen sie von 4,8 mg/ml auf 7,9 mg/ml.

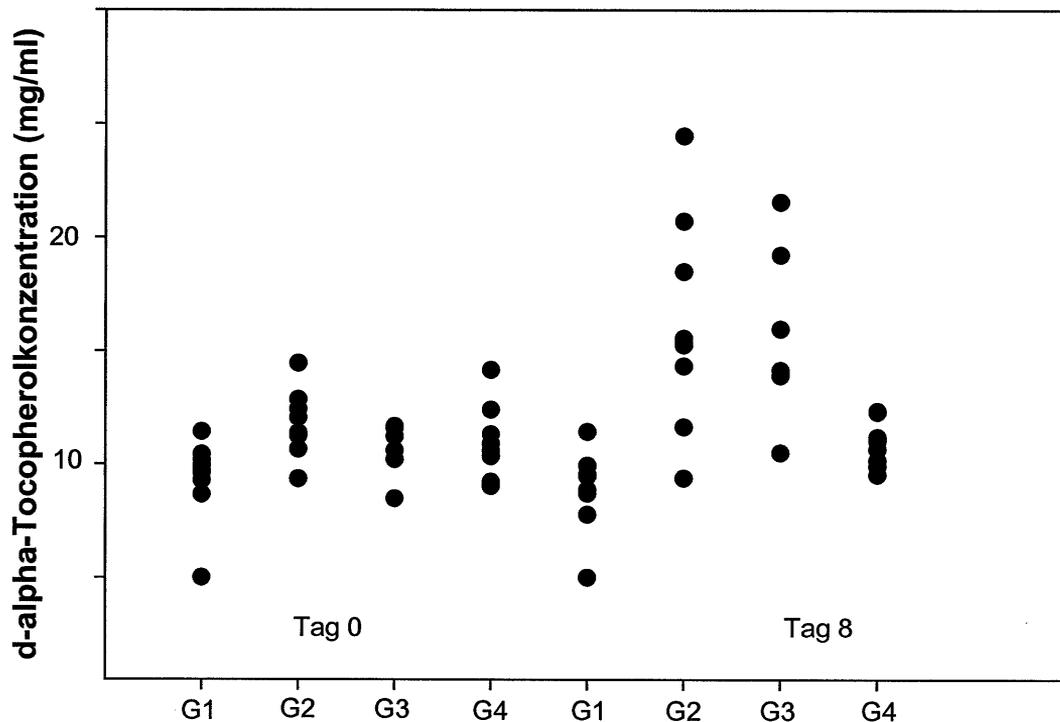


Abb.3: d-alpha-Tocopherolkonzentration vor und nach systemischer Einnahme von Sulfite und Placebo (G1), Ascorbinsäure, d-alpha-Tocopherol und Sulfite (G2), Ascorbinsäure, d-alpha-Tocopherol und Placebo (G3) oder Placebo (G4)

In der Gruppe der Probanden mit Ascorbinsäure- und d-alpha-Tocopheroleinnahme (G3) kam es zum signifikanten Anstieg der Ascorbinsäurekonzentration von 4,2 mg/ml auf 8,3 mg/ml. In der Placebogruppe (G4) waren die Werte bei 3,8 mg/ml an Tag 1 und 4,5 mg/ml an Tag 8 (Abb. 4).

Im Vergleich der Ausgangswerte der Gruppen untereinander zeigte sich vor Einnahme der Kapseln kein signifikanter Unterschied der Ascorbinsäurekonzentration zwischen den Gruppen.

An Tag 8 zeigte sich wie erwartet ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen

mit Ascorbinsäureeinnahme im Vergleich zur Placebo- bzw. Sulfitgruppe. Die Ascorbinsäurekonzentrationen in den Gruppen mit Antioxidantieneinnahme zeigten im Vergleich an Tag 8 keine wesentlichen Unterschiede (Abb.4).

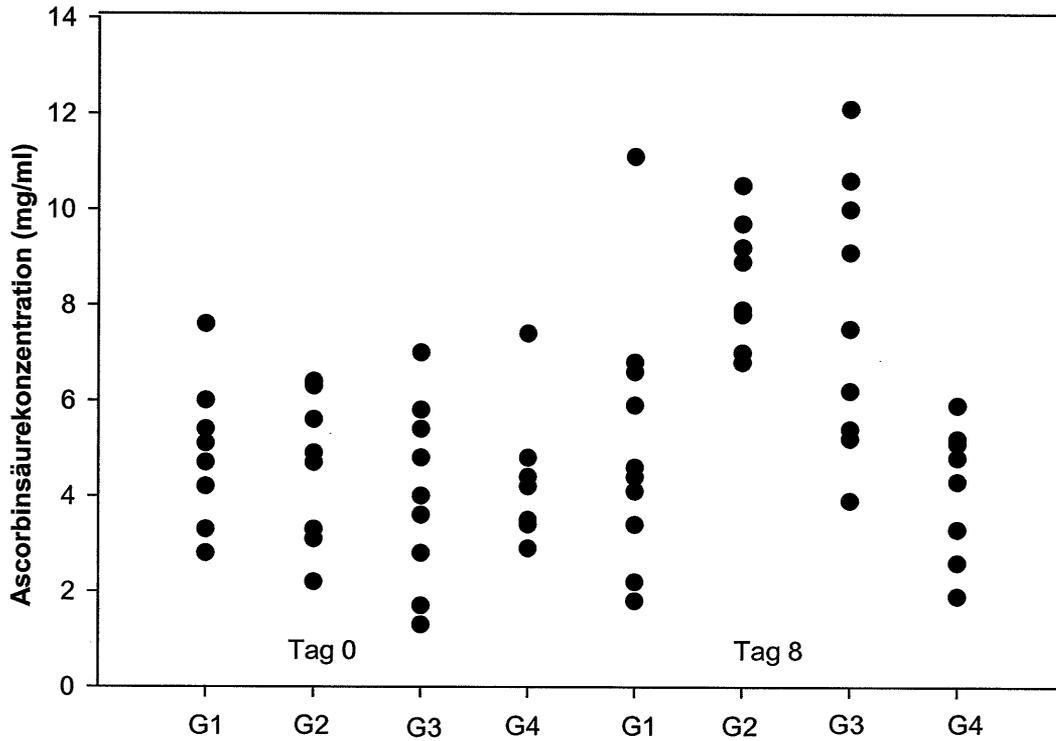


Abb.4: Ascorbinsäurekonzentrationen vor und nach systemischer Einnahme von Sulfit und Placebo (G1), Ascorbinsäure, d-alpha-Tocopherol und Sulfit (G2), Ascorbinsäure, d-alpha-Tocopherol und Placebo (G3) oder Placebo (G4)

### 3.3. Fenofibrat-abhängiger Photohämolysetest

Die Gabe von Sulfid und Placebo ergab keine signifikante Beeinflussung der Fenofibrat-abhängigen Photohämolysen. Der Median der Photohämolysen reduzierte sich nach Bestrahlung mit  $10 \text{ J/cm}^2$  UVA zwar von 20,8% auf 12,1%, diese Differenz erreichte aber keine statistische Signifikanz. Bei Bestrahlung mit  $20 \text{ J/cm}^2$  und  $40 \text{ J/cm}^2$  zeigte sich nur ein minimaler Unterschied zwischen den Medianen an Tag 0 und Tag 8 (Abb.5, Tab. 7).

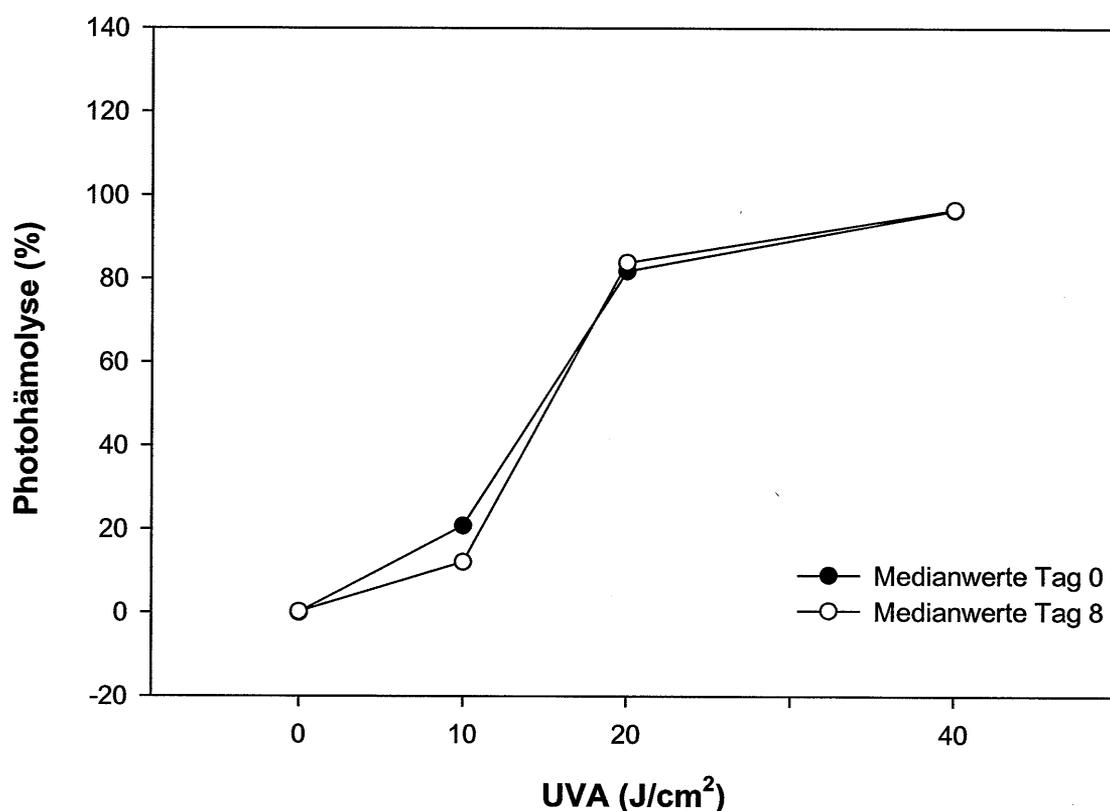


Abb. 5: Einfluß der oralen Einnahme von Sulfid und Placebo auf die Fenofibrat-abhängige Photohämolysen im UVA-Bereich bei 10 Personen

Interessanterweise wurde allerdings die UVB-induzierte Fenofibrat-abhängige Photohämolysen bei alleiniger Sulfideinnahme über einen weiten Dosisbereich vermindert, ohne daß der Unterschied statistische Signifikanz erreichte. Am deutlichsten zeigte sich dies bei einer

Bestrahlung mit  $800 \text{ mJ/cm}^2$ , wo sich der Median von 24,7% auf 13,9% verminderte und nach Bestrahlung mit  $1200 \text{ mJ/cm}^2$ , wo die Werte von 67,6% am Tag 0 auf 58,5% am Tag 8 abfielen (Abb. 6, Tab. 7).

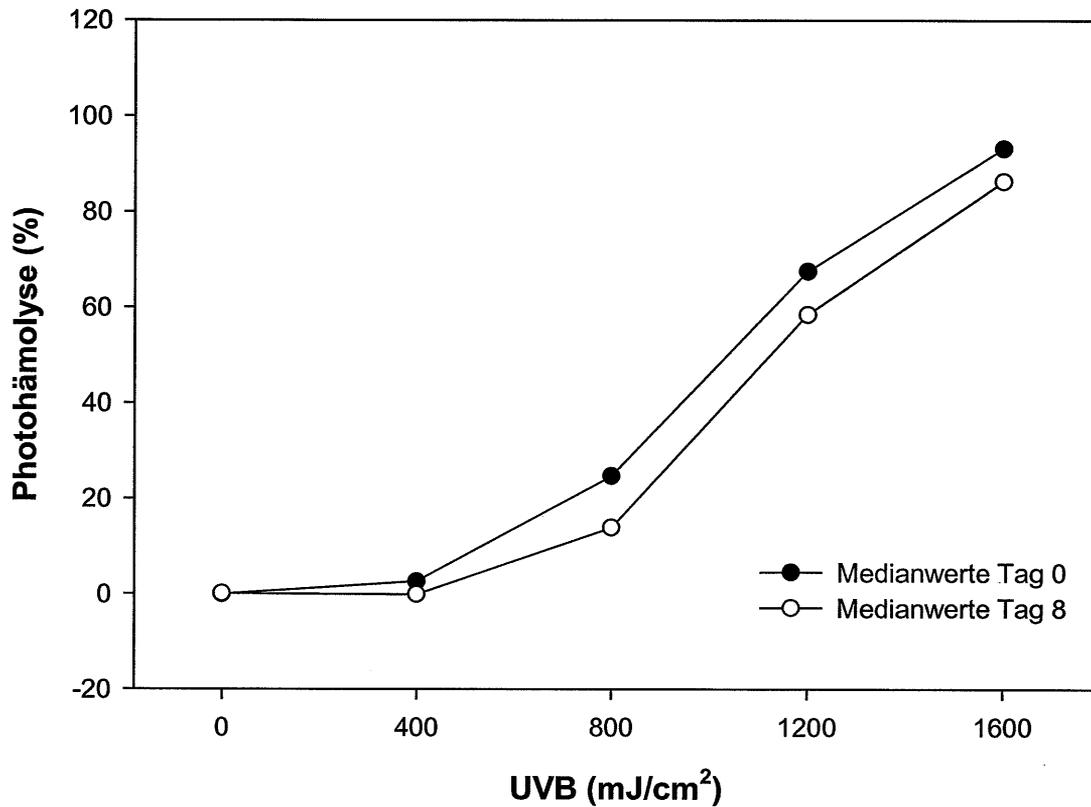


Abb. 6: Einfluß der oralen Einnahme von Sulfid und Placebo auf die Fenofibrat-abhängige Photohämolysen im UVB-Bereich bei 10 Personen

Tab. 7: Fenofibrat-abhängige Photohämolysen (in %) vor und bei achttägiger Einnahme von Sulfid

UVA (J/cm²)	0	10	20	40
Median Tag 0	-0,1	20,8	81,8	96,4
Median Tag 8	0,2	12,1	83,1	96,6

UVB (mJ/cm²)	0	400	800	1200	1600
Median Tag.0	-0,1	2,6	24,7	67,6	93,2
Median Tag 8	0,1	-0,2	13,9	58,5	86,4

Die kombinierte Einnahme von Sulfid und Antioxidantien führte bei einzelnen Bestrahlungsdosen (UVA 10 J/cm<sup>2</sup>, p < 0,05; UVA 20 J/cm<sup>2</sup>, p < 0,005) zur signifikanten Abnahme der Fenofibrat-abhängigen Photohämolyse bei UVA-reicher, jedoch nicht bei UVB-reicher Strahlung (Abb. 7, Tab. 8). Am eindrücklichsten zeigte sich dies nach Bestrahlung mit 20 J/cm<sup>2</sup>, hier fiel der Median von 70,1% auf 26,3%. Bei 40 J/cm<sup>2</sup> und ohne Bestrahlung zeigte sich dieser Effekt nicht (Abb. 8, Tab. 8).

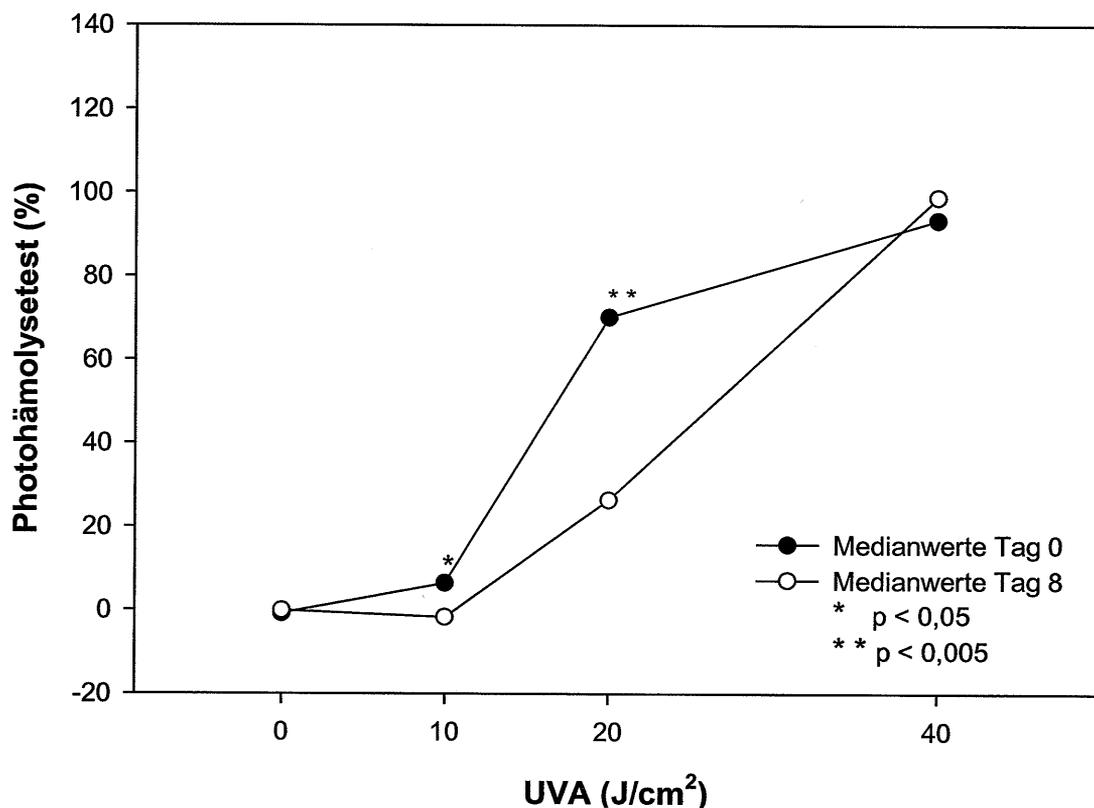


Abb. 7: Einfluß der oralen Einnahme von Sulfid, Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol auf die Fenofibrat-abhängige Photohämolyse im UVA-Bereich bei 10 Personen

Im UVB-Bereich zeigte sich insgesamt in allen Dosisbereichen ein nur geringer Abfall des Medians der Fenofibrat-abhängigen Photohämolyse. Am stärksten fiel er nach Bestrahlung mit 800 mJ/cm<sup>2</sup> von 13,8% an Tag 0 auf 7,0% an Tag 8 ab. Bei Bestrahlung mit 1200 mJ/cm<sup>2</sup> zeigte sich nur ein Abfall des Medians von 59,1% auf 51,5%. Ähnliche geringe

Veränderungen zeigten sich nach Bestrahlung mit 40 mJ/cm<sup>2</sup> und ohne Bestrahlung (Abb. 8, Tab. 8).

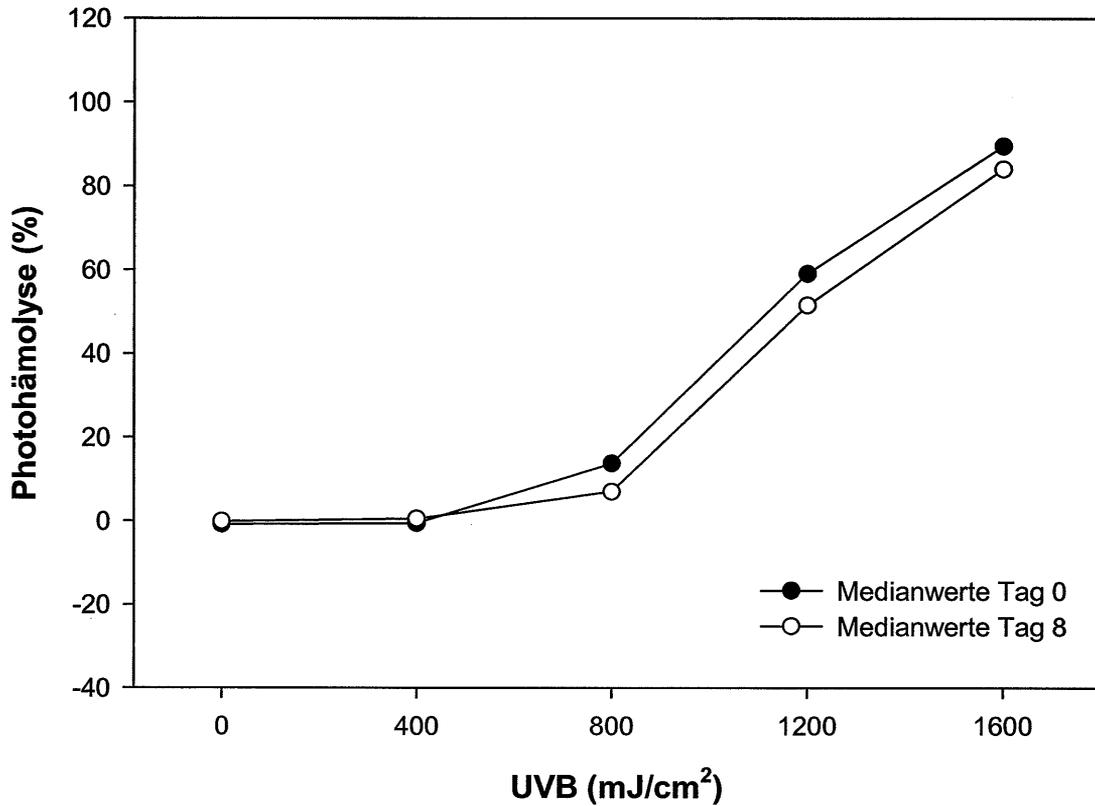


Abb. 8: Einfluß der oralen Einnahme von Sulfid, Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol auf die Fenofibrat-abhängige Photohämolysse im UVB-Bereich bei 10 Personen

Tab. 8: Fenofibrat-abhängige Photohämolysse vor und bei achttägiger Einnahme von Sulfid und Antioxidantien

UVA (J/cm <sup>2</sup> )	0	10	20	40
Median Tag 0	-0,9	6,4	70,1	93,4
Median Tag 8	-0,2	-1,9	26,3	98,8

UVB (mJ/m <sup>2</sup> )	0	400	800	1200	1600
Median Tag 0	-0,9	-0,6	13,8	59,1	89,6
Median Tag 8	-0,2	0,5	7,0	51,5	84,1

Bei alleiniger Gabe von Antioxidantien (d-alpha-Tocopherol und Ascorbinsäure) kam es zu einer signifikanten Abnahme der Fenofibrat-abhängigen Phototoxizität (p<0,05). Diese

protektive Wirkung war sowohl bei Anwendung von UVA-reicher als auch bei UVB-reicher Strahlung im mittleren Dosisbereich festzustellen (Abb. 9, Abb. 10). Der Median war an Tag 0 nach Bestrahlung mit 20 J/cm<sup>2</sup> UVA 74,7% und an Tag 8 bei 31,8% (Abb.9, Tab.9).

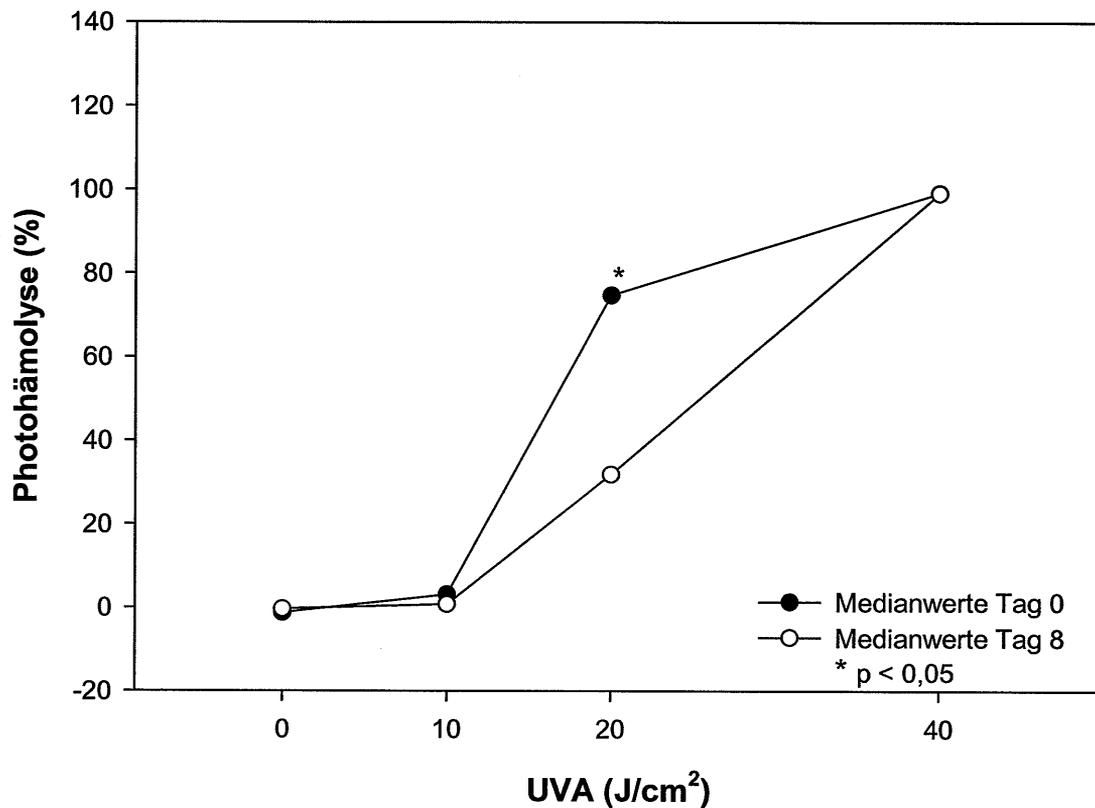


Abb. 9: Einfluß der oralen Einnahme von Ascorbinsäure, d-alpha-Tocopherol und Placebo auf die Fenofibrat-abhängige Photohämololyse im UVA-Bereich bei 10 Personen

Nach UVB-Bestrahlung mit 1200 mJ/cm<sup>2</sup> zeigte sich eine signifikante Verminderung des Medians der Photohämololyse von 70,8% auf 36,3%. In den höheren Dosisbereichen und ohne Bestrahlung blieb er annähernd gleich (Abb. 10, Tab. 9).

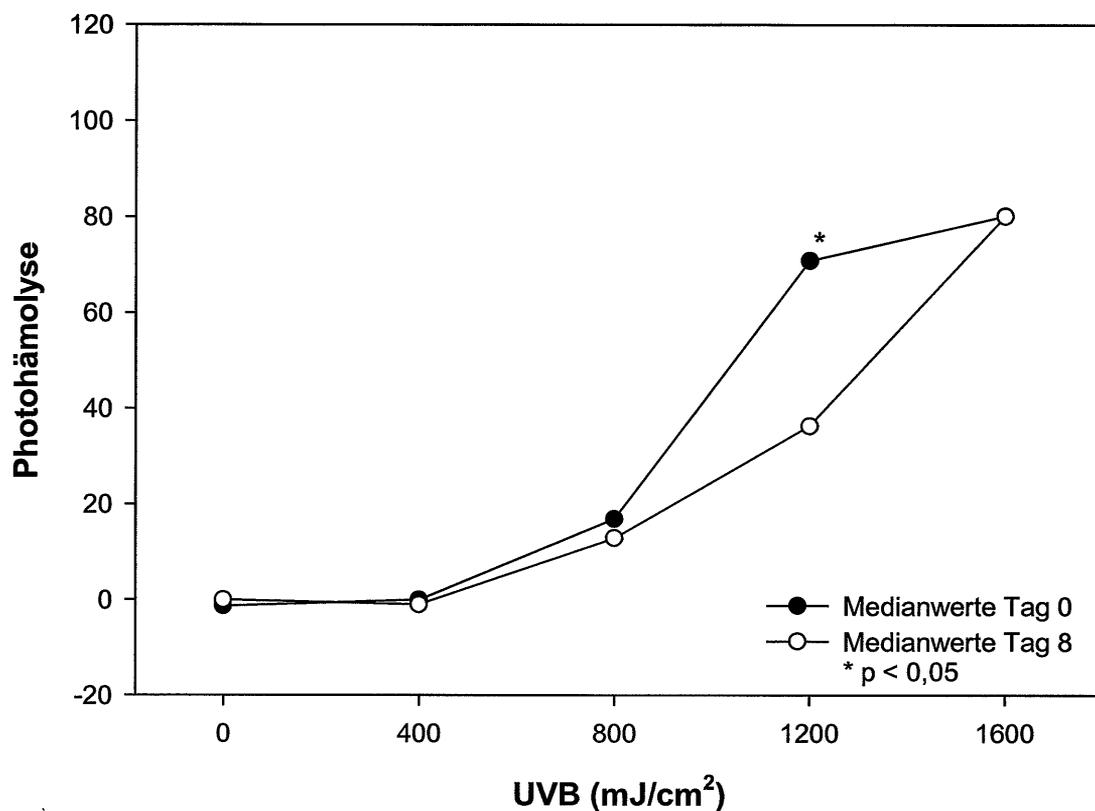


Abb. 10: Einfluß der oralen Einnahme von Ascorbinsäure, d-alpha-Tocopherol und Placebo auf die Fenofibrat-abhängige Photohämolysse im UVB-Bereich bei 10 Personen

Tab. 9: Fenofibrat-abhängige Photohämolysse vor und bei achttägiger Einnahme von Antioxidantien

UVA (J/cm²)	0	10	20	40
Median Tag 0	-1,3	3,1	74,7	99,2
Median Tag 8	-0,4	0,8	31,8	99,1

UVB (mJ/cm²)	0	400	800	1200	1600
Median Tag 0	-1,3	-0,1	16,9	70,8	80,2
Median Tag 8	-0,1	-1,0	12,9	36,3	80,1

Placeboeinnahme führte in vitro zu keiner signifikanten Modifikation der Photohämolysse. Bei einem Median von 56,3% an Tag 0 zeigte sich beispielsweise nach Bestrahlung mit 20 J/cm² UVA die größte Schwankung mit einem Median von 75,3% an Tag 8 (Abb. 11, Tab. 10).

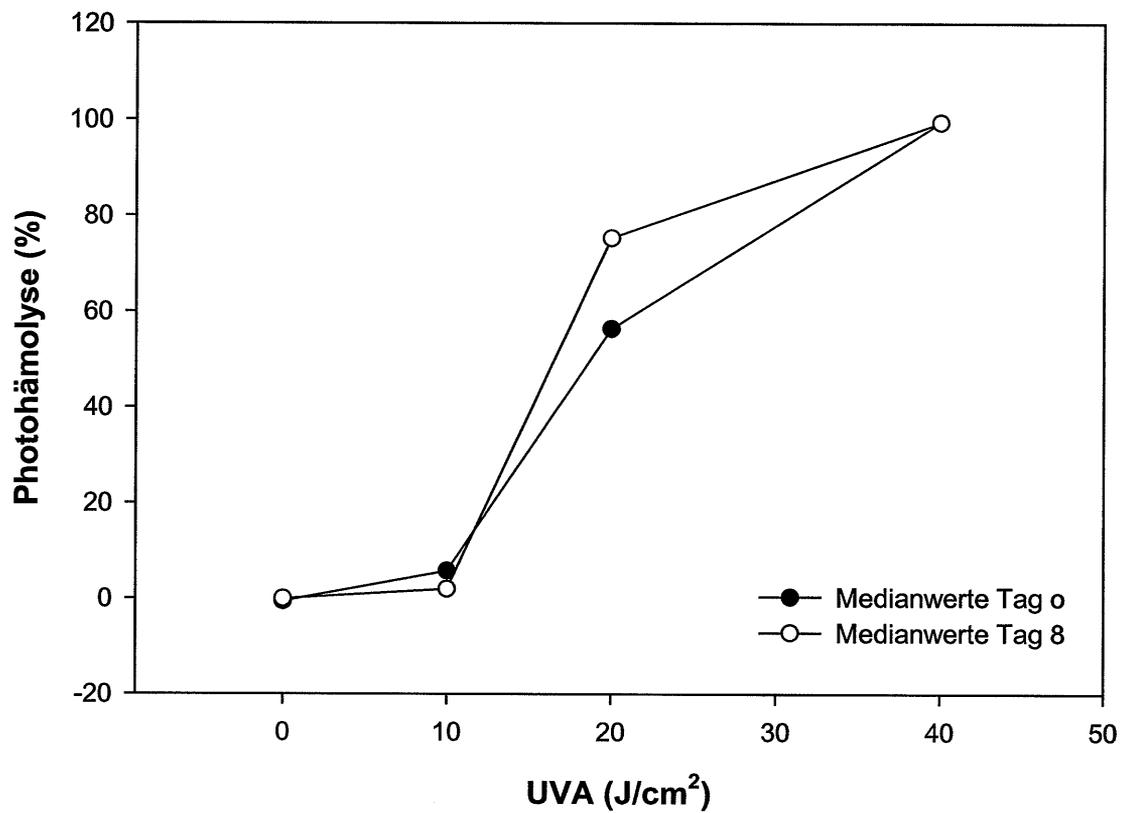


Abb. 11: Einfluß oraler Einnahme von Placebo auf die Fenofibrat-abhängige Photohämolyse im UVA-Bereich bei 10 Personen

Bei der Bestrahlung mit UVB zeigten sich annähernd identische Werte für die Fenofibrat-abhängige Photohämolyse. Der größte Abfall des Medians von 61,3% auf 55,9% zeigte sich nach Bestrahlung mit 1200 J/cm<sup>2</sup> (Abb. 12, Tab. 10).

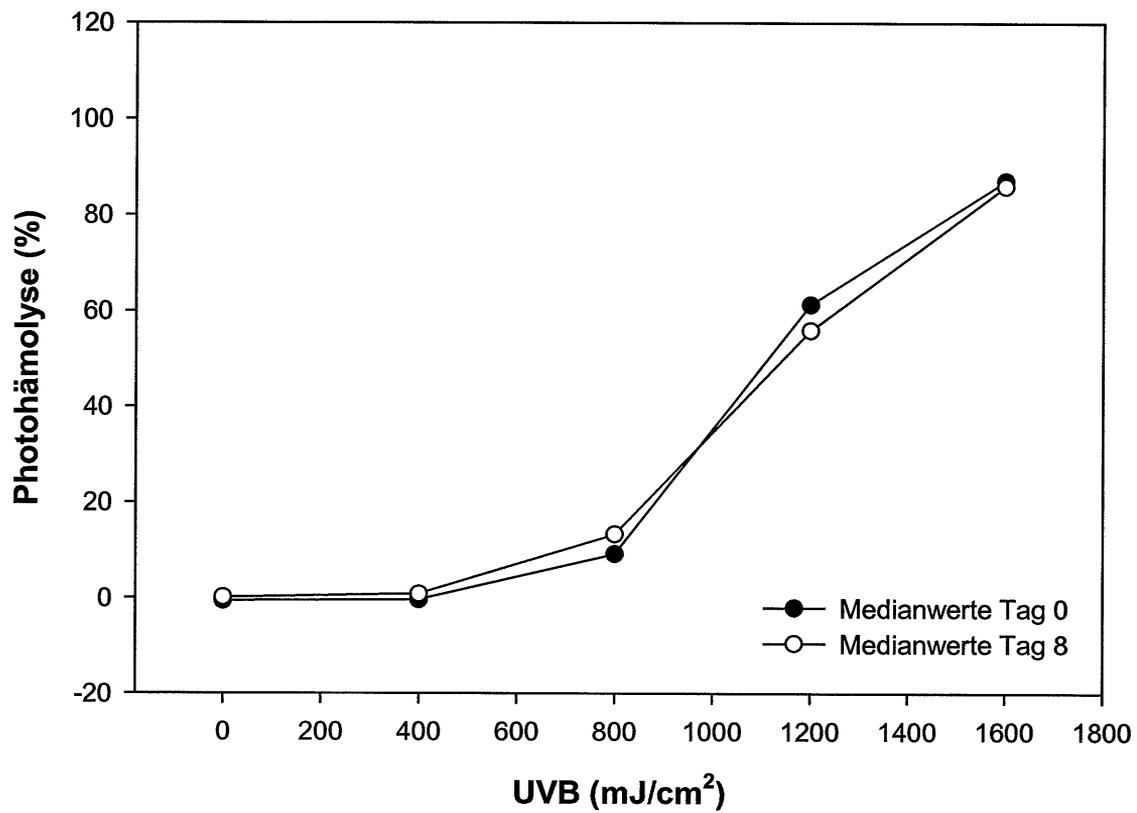


Abb. 12: Einfluß oraler Einnahme von Placebo auf die Fenofibrat-abhängige Photohämolysse im UVB-Bereich bei 10 Personen

Tab. 10: Fenofibrat-abhängige Photohämolysse vor und bei achttägiger Einnahme von Placebo

UVA (J/cm²)	0	10	20	40
Median Tag 0	-0,6	5,7	56,3	99,4
Median Tag 8	-0,1	1,9	75,25	99,4

UVB (mJ/cm²)	0	400	800	1200	1600
Median Tag 0	-0,6	-0,4	9,15	61,3	87,1
Median Tag 8	0,1	0,8	13,25	55,85	86,0

### 3.4. Minimale Erythemdosis

In der Gruppe der Probanden mit Sulfite- und Placeboeinnahme blieb die MED in fünf Fällen unverändert, stieg in drei Fällen an und fiel bei einem Probanden ab; der Median der MED blieb unverändert bei 80 mJ/cm<sup>2</sup> (p=0,5807). Bei einem Probanden konnte aus meßtechnischen Gründen die MED nicht ermittelt werden.

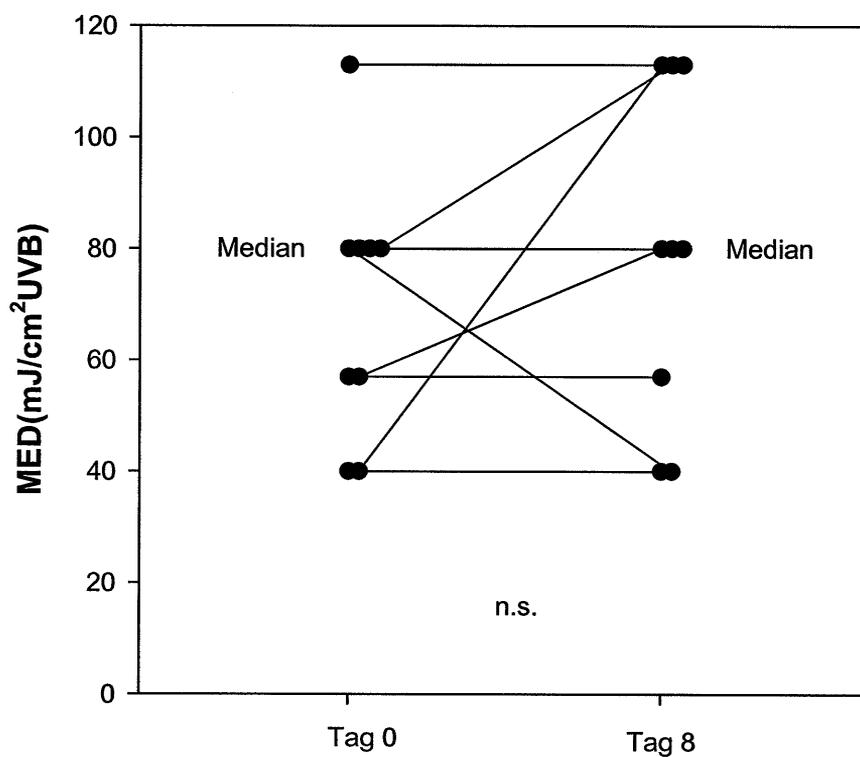


Abb. 13: Einfluß der oralen Einnahme von Sulfite auf die minimale Erythemdosis (MED) bei 9 Personen (n.s., nicht signifikant)

Während der Einnahme von Sulfid, Ascorbinsäure- und d-alpha Tocopherol war die MED bei sechs Probanden unverändert, bei zwei stieg sie an, bei einem fiel sie ab; der Median der MED stieg von 40 mJ/cm<sup>2</sup> auf 57 mJ/cm<sup>2</sup> (p=0,58). Bei einem Probanden konnte aus meßtechnischen Gründen die MED nicht ermittelt werden.

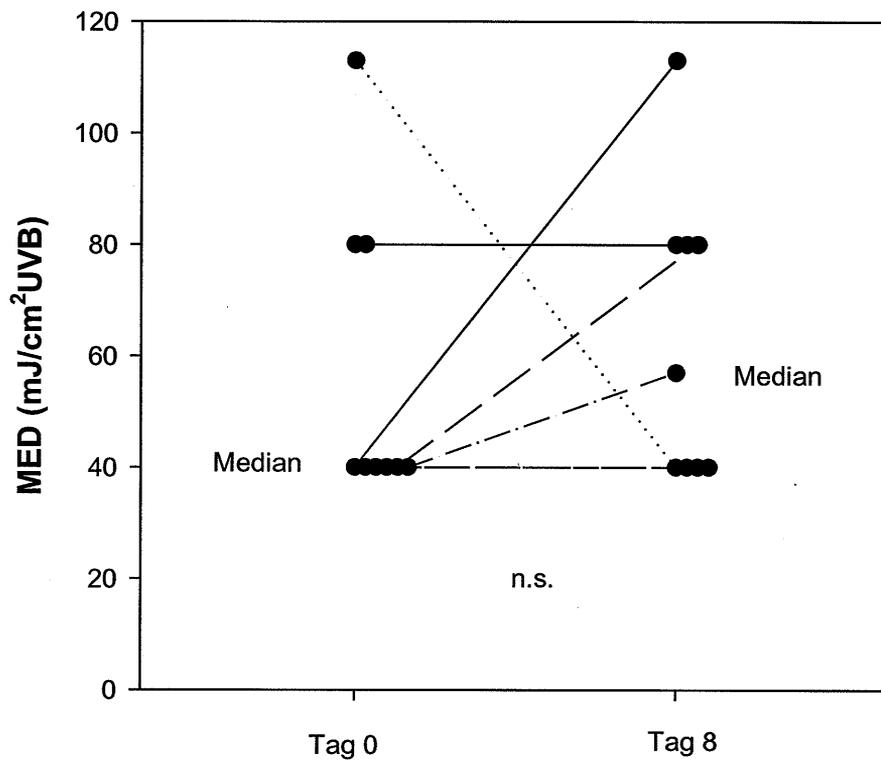


Abb. 14: Einfluß der oralen Einnahme von Sulfid, Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol auf die minimale Erythemdosis (MED) bei 9 Personen (n.s., nicht signifikant)

Während der Einnahme von Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol war die MED in der dritten Gruppe bei sieben von zehn Probanden unverändert, bei drei stieg sie an; der Median der MED stieg von 68,5 mJ/cm<sup>2</sup> auf 80 mJ/cm<sup>2</sup> an (p=0,0833).

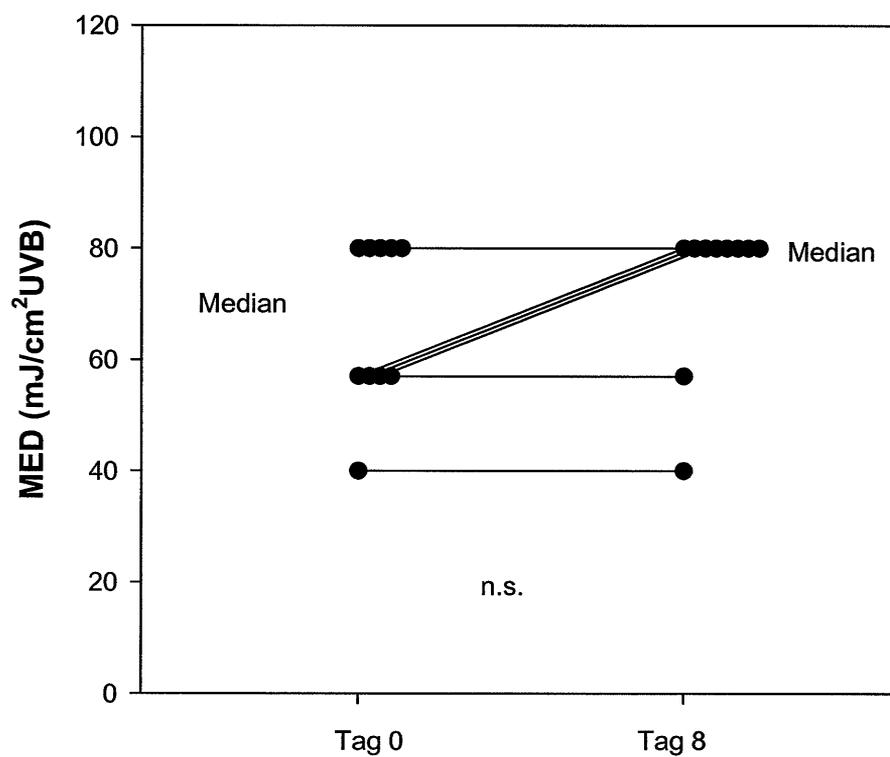


Abb. 15: Einfluß der oralen Einnahme von Ascorbinsäure, d-alpha-Tocopherol und Placebo auf die minimale Erythemdosis (MED) bei 10 Personen (n.s., nicht signifikant)

Während der Einnahme von Placebokapseln blieb die MED in der vierten Untersuchungsgruppe bei sechs Probanden unverändert und erhöhte sich in vier Fällen. Der Median der MED stieg von 68,5 mJ/cm<sup>2</sup> auf 80 mJ/cm<sup>2</sup> an (p= 0,0656).

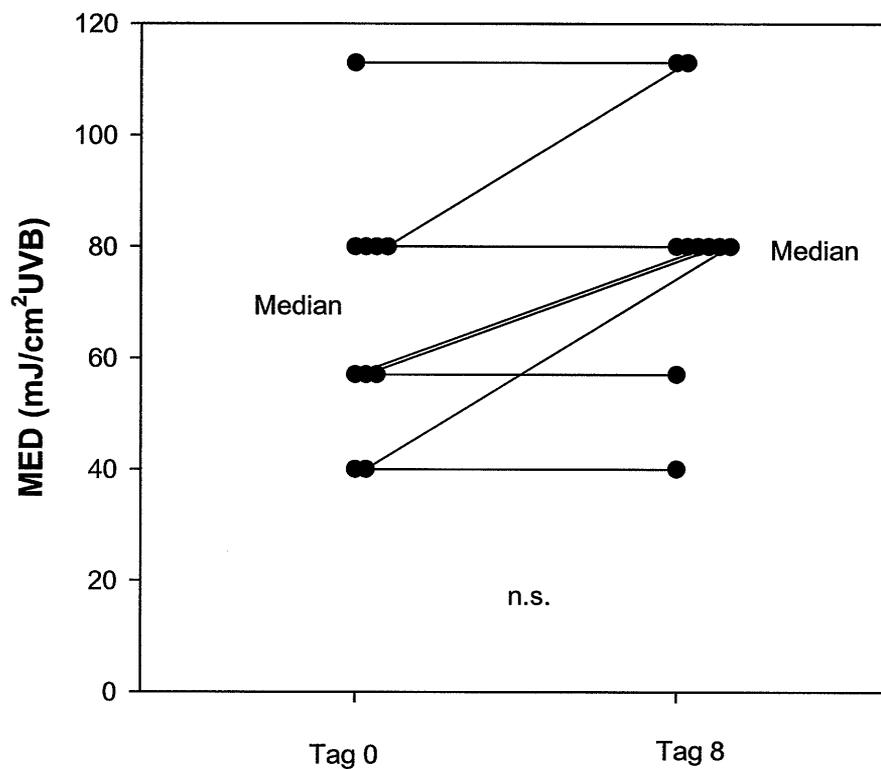


Abb. 16: Einfluß der oralen Einnahme von Placebo auf die minimale Erythemdosis (MED) bei 10 Personen (n.s., nicht signifikant)

Im Vergleich der Gruppen untereinander zeigte sich am Tag vor Kapsleinnahme kein signifikanter Unterschied der MED. Nach oraler Einnahme von Sulfit, Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol bzw. Placebo ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied der MED zwischen den vier Gruppen (Abb.17).

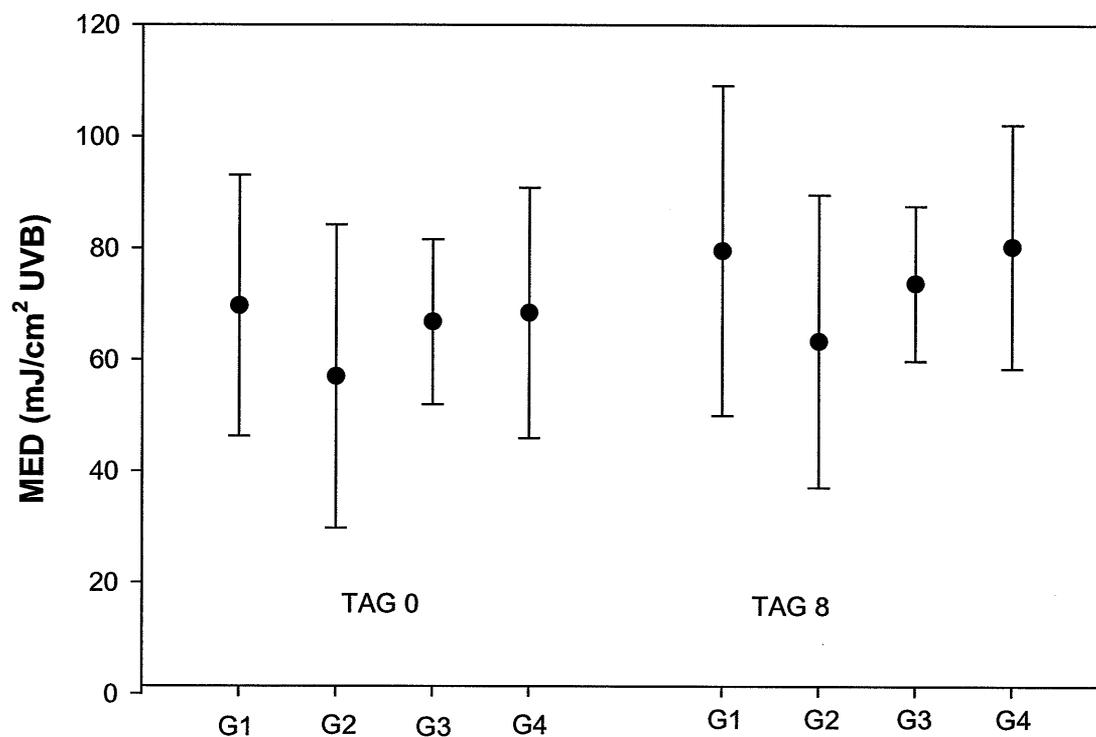


Abb. 17: Einfluß der oralen Einnahme von Sulfit und Placebo (G1), Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol und Sulfit (G2), Ascorbinsäure, d-alpha-Tocopherol und Placebo (G3) und Placebo (G4) auf die minimale Erythemdosis (MED)

### 3.5. Blutflußmessung

Der Hautblutfluß der Probanden vor und während der Kapseleinnahme änderte sich in den meisten bestrahlten Hautarealen, wobei es interessanterweise bei allen Gruppen mit Ausnahme der ausschließlich mit Placebo behandelten Probanden bei einzelnen UV-Dosen zu signifikanten Abfällen des Hautblutflusses kam. Der photoprotektive Effekt durch die Gabe von Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol bzw. Sulfid und Antioxidantien war insbesondere bei UV-Dosen nachweisbar, die über der ermittelten MED lagen.

In der Gruppe mit Einnahme von Sulfid und Placebo zeigte sich ein signifikanter Abfall des Medians der Blutflußeinheiten nach Bestrahlung mit  $115 \text{ mJ/cm}^2$  von 11,0 auf 7,7 ( $p < 0,046$ ) und mit  $160 \text{ mJ/cm}^2$  von 13,4 auf 6,4 ( $p = 0,028$ ).

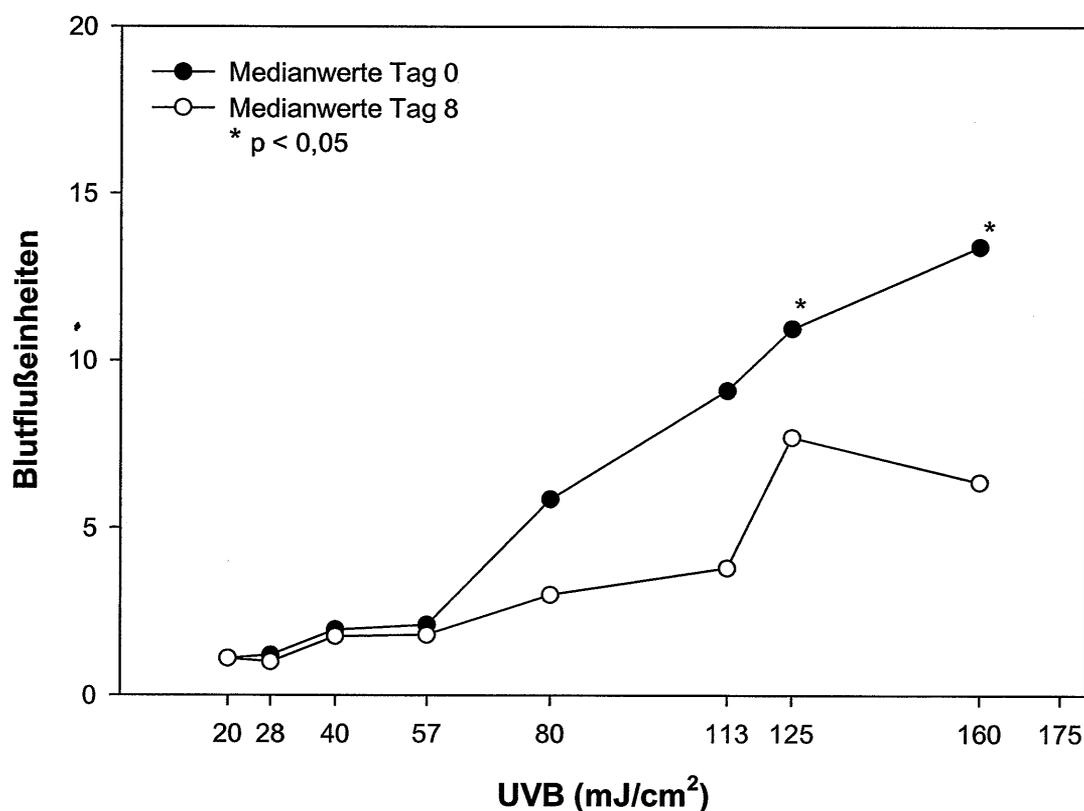


Abb. 18: Einfluß der oralen Einnahme von Sulfid und Placebo auf die UV-induzierte Hautdurchblutung bei 10 Personen

Nach systemischer Zufuhr von Sulfit, Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol zeigte sich ein signifikanter Abfall des Medians der Blutflußeinheiten nach Bestrahlung mit 40 mJ/ cm<sup>2</sup> von 3,2 auf 1,8 (p < 0,036) und mit 160 mJ/cm<sup>2</sup> UVB von 17,3 auf 11,4 (p < 0,028).

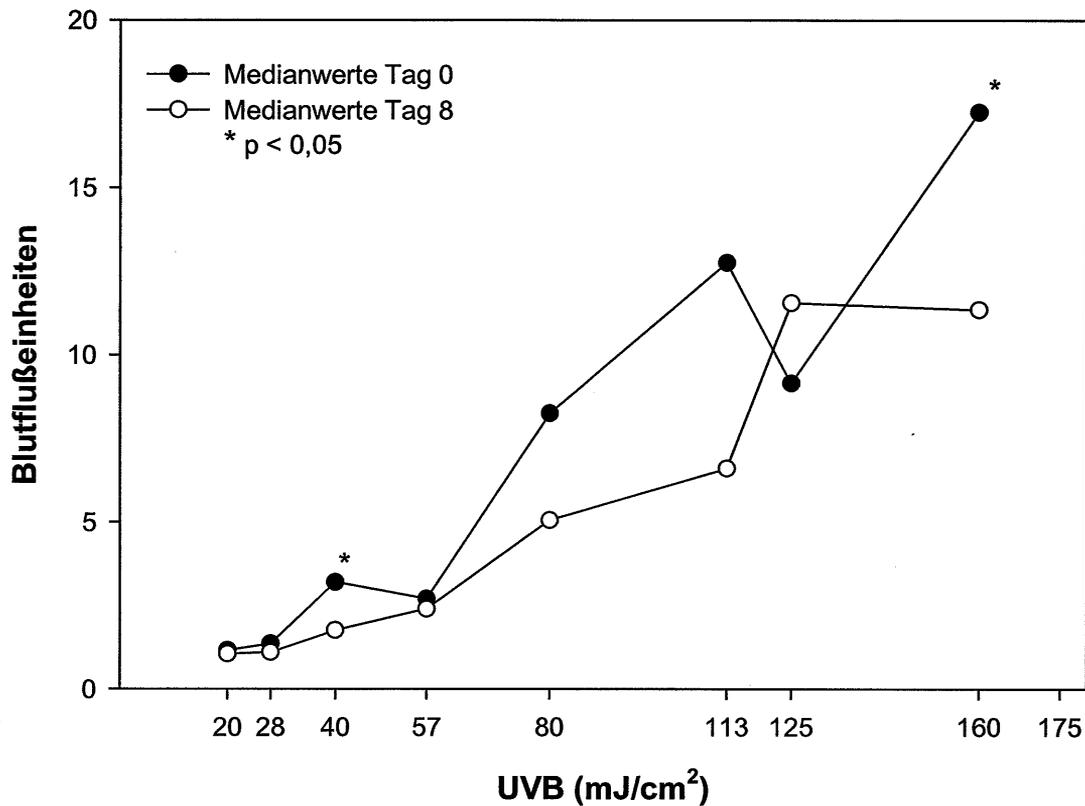


Abb. 19: Einfluß der oralen Einnahme von Sulfit, Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol auf die UV-induzierte Hautdurchblutung bei 10 Personen

Nach systemischer Zufuhr von Ascorbinsäure, d-alpha-Tocopherol und Placebo zeigte sich ein signifikanter Abfall des Medians nach Bestrahlung mit 80 mJ/cm<sup>2</sup> von 15,4 auf 7,7 (p=0,047).

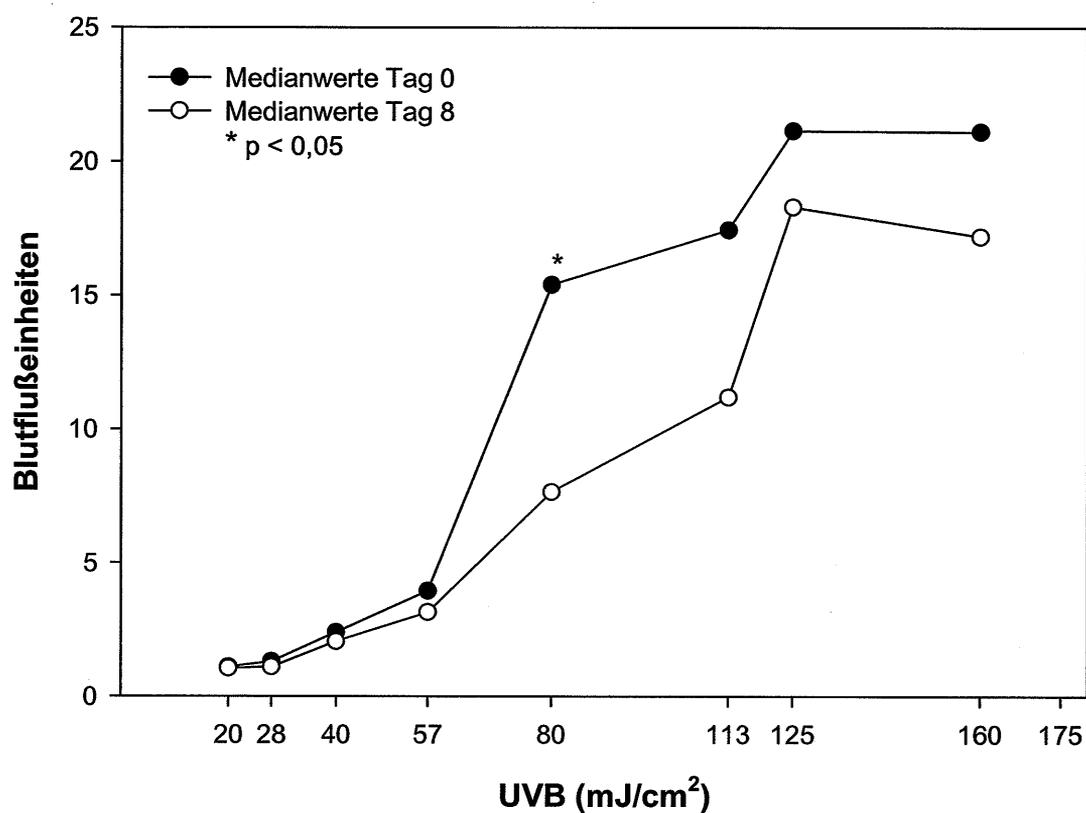


Abb. 20: Einfluß der oralen Einnahme von Ascorbinsäure, d-alpha-Tocopherol und Placebo auf die UV-induzierte Hautdurchblutung bei 10 Personen

Nach alleiniger Zufuhr von Placebokapseln zeigte sich ein signifikanter Abfall des Medians der Blutflußeinheiten nach Bestrahlung mit  $40 \text{ mJ/cm}^2$  von 2,0 auf 1,3.

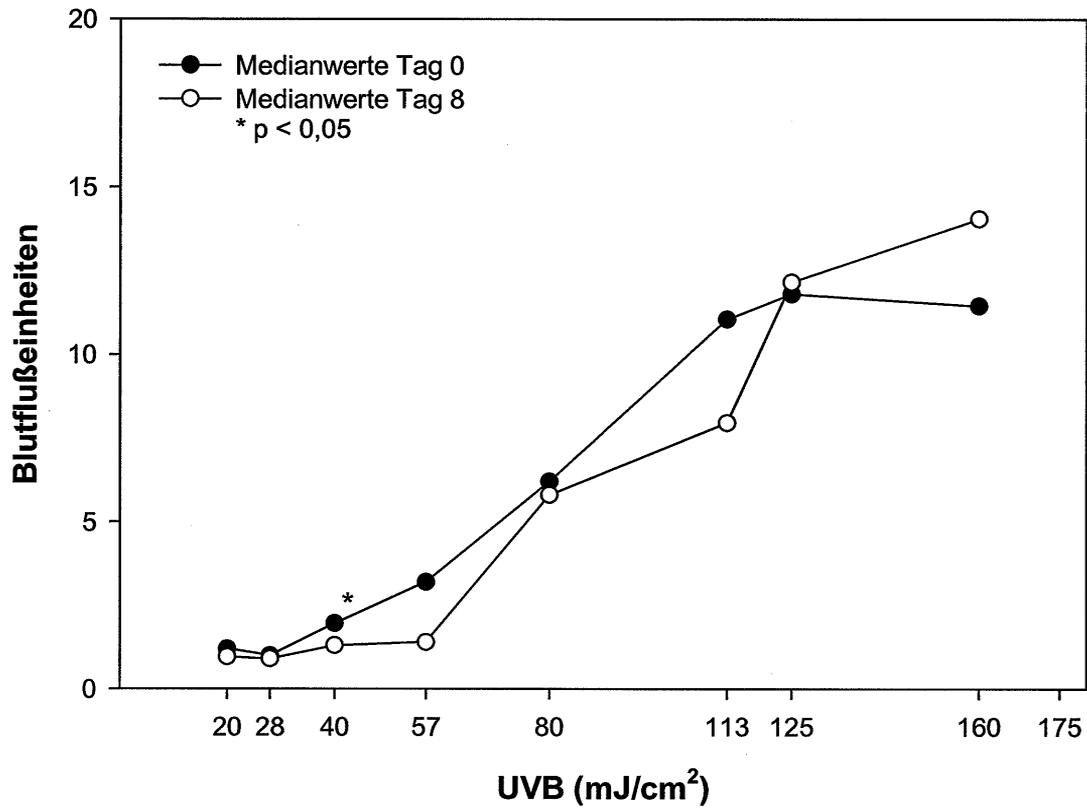


Abb. 21: Einfluß systemischer Placeboeinnahme auf die UV-induzierte Hautdurchblutung bei 10 Personen

## **4. Diskussion**

### **4.1. Antioxidantienkonzentration im Serum**

Durch die Bestimmung der Antioxidantienkonzentration im Serum der Probanden vor und nach Einnahme von Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol war es möglich, die Compliance der Testpersonen bezüglich Diät und bezüglich Vitamineinnahme zu kontrollieren. Bei allen Personen in den Testgruppen mit Vitamineinnahme stiegen die Ascorbinsäure- bzw. d-alpha-Tocopherolkonzentrationen signifikant an. Die Sulfiteinnahme hatte keinen Einfluß auf die Vitaminkonzentrationen. Zu Beginn der Untersuchung zeigte sich ein signifikanter Konzentrationsunterschied der d-alpha-Tocopherolkonzentration zwischen den Probanden, die Sulfite einnahmen und denen, die Ascorbinsäure- und d-alpha-Tocopherol einnahmen. Diese Divergenz lässt sich am ehesten auf unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten und Nikotinkonsum der Probanden vor Beginn der Untersuchung zurückführen. Die Vitaminkonzentrationen im Serum der Probanden aus allen anderen Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied.

Energiereiche UV-Strahlung kann zusammen mit Sauerstoff in den Hautzellen Freie-Radikal-Reaktionen auslösen. Trifft ein freies Radikal auf ein Molekül, so kann wiederum ein freies Radikal entstehen. Eine Kettenreaktion wird ausgelöst, die einige tausend Male ablaufen kann, bevor sie durch ein Antioxidans wie beispielsweise d-alpha-Tocopherol abgebrochen wird. Dabei wird das stabilere, weniger reaktionsfreudige d-alpha-Tocopherol-Radikal gebildet, das selbst nicht mehr als Initiator einer Radikalkette wirken kann. Membranständiges d-alpha-Tocopherol reagiert mit Peroxylradikalen, die von mehrfach ungesättigten Fettsäuren gebildet werden. Dabei entsteht aus d-alpha-Tocopherol das Chromanoxylradikal, aus dem Peroxylradikal ein Hydroperoxid. Die Rückführung des Chromanoxylradikals erfolgt im wässrigen Medium über Ascorbat und das Gluthathionsystem. L-Ascorbinsäure hat als

Elektronendonator und -akzeptor eine starke antioxidative Wirkung. Sie vermag die Lipidperoxidation durch wasserlösliche Peroxidradikale nahezu komplett zu verhindern [69]. Bei In-vitro-Untersuchungen ließ sich zeigen, daß L-Ascorbinsäure die Oxidation isolierter humaner LDL durch wasserlösliche Radikale verhindert [4]. Membranständige Radikale werden von der wasserlöslichen L-Ascorbinsäure nicht beeinflusst. Interessanterweise ist L-Ascorbinsäure aber an der Regeneration von Tocopherolradikalen beteiligt, die bei der Reaktion von Tocopherol mit membranständigen Sauerstoffradikalen entstehen [136, 148]. In der Zelle wird also das in der Membran verankerte Tocopheryloxyradikal vermutlich durch Ascorbinsäure, die im wäßrigen Medium des Zytosols vorhanden ist, wieder in Tocopherol umgewandelt. Es gibt darüber hinaus viele In-vitro-Untersuchungen, die dafür sprechen, daß auch Ascorbinsäure über das Gluthathionsystem mit Hilfe von NADH oder NADPH ständig regeneriert wird. d-alpha-Tocopherol in der Lipidphase biologischer Systeme und die Antioxidantien in der wässrigen Phase wirken auf diese Weise synergistisch beim Schutz der Membranen gegen Lipidperoxidation [62].

## **4.2. Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol als Antioxidantien**

### **4.2.1. d-alpha-Tocopherol**

Vitamin E kommt in der Natur in einigen pflanzlichen Ölen (Weizenkeim-, Sonnenblumen-, Sojabohnenöl) vor und ist in den Zellen des menschlichen Körpers in den Membranen lokalisiert. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren in diesen Membranen sind neben Proteinen und der DNA die Hauptangriffspunkte von Radikalschädigungen [194]. Die bedeutendste in der Natur vorkommende Verbindung mit Vitamin E-Aktivität ist das d-alpha-Tocopherol.

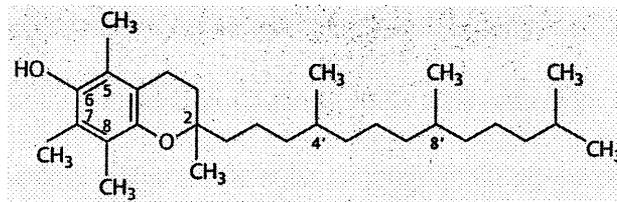


Abb. 21: Strukturformel von d-alpha-Tocopherol

Es handelt sich um ein Derivat des 6-Chromanols mit einer gesättigten Phytolseitenkette und dem systematischen chemischen Namen 2,5,7,8,-Tetramethyl-2-(4',8',12'-trimethyl)-6-chromanol. Alpha-Tocopherol hat an den 3 Chiralitätszentren die R-Konfiguration. Das Chromanringsystem verleiht dem Vitamin E seine hervorragenden Antioxidans-Eigenschaften und eine gewisse Polarität, während die Seitenketten für die lipophilen Eigenschaften des Moleküls verantwortlich sind und die Koppelung an biologische Membranen ermöglichen [194]. Das in der Natur vorkommende RRR-alpha-Tocopherol ist meist begleitet von geringen Mengen RRR-beta-Tocopherol, RRR-gamma-Tocopherol und RRR-delta-Tocopherol.

Tab. 12: Physikalisch chemische Eigenschaften von d-alpha-Tocopherol [62]

Summenformel	$C_{29} H_{50} O_2$
Molekulargewicht	430,6
Konsistenz	Visköses hellgelbes Öl
Schmelzpunkt	+2,5 °C bis +3,5 °C
Löslichkeit	Praktisch unlöslich in Wasser Leicht löslich in Ölen, Fetten, Aceton, Alkohol, Chloroform, Äther

Das mit der Nahrung aufgenommene d-alpha-Tocopherol wird im Dünndarm resorbiert und nach Hydrolyse durch Pankreaslipasen und Amylasen inkorporiert und in Chylomikronen und intestinalem VLDL über das Lymphsystem abgeleitet. Im Blut selbst besteht ein dynamisches

Gleichgewicht, gekennzeichnet durch einen raschen Austausch von d-alpha-Tocopherol zwischen allen Lipoproteinfraktionen und den Blutzellen. Die Aufnahme von Vitamin E durch Zellen des peripheren Gewebes ist eng mit dem Lipoproteinkatabolismus gekoppelt. Lipoproteinlipasen an der Oberfläche von Kapillarendothel-, Fett- und Muskelzellen katalysieren die Spaltung der in VLDL und Chylomikronen enthaltenen Triglyceride. Das Tocopherol gelangt dabei zusammen mit Fettsäuren und Monoglyceriden in die Zelle [33]. Bezogen auf das Feuchtgewicht enthalten Nebennierenrinde und das Fettgewebe mit 132 µg/g die höchsten Tocopherolgehalte [123]. Im Durchschnitt enthält der Körper eines Erwachsenen mit 70 kg etwa 5 g alpha-Tocopherol [195]. Eine Metabolisierung des Tocopherols im engeren Sinn gibt es nicht. Die bedeutendste Abbaureaktion ist wahrscheinlich die Oxidation zum Tocopherolchinon, das zum entsprechenden Hydrochinon reduziert werden kann. Weniger als 1% des oral aufgenommenen Tocopherols wird im Harn ausgeschieden [123].

#### 4.2.2. Ascorbinsäure

Von allen bislang bekannten Analoga der Ascorbinsäure hat L-Ascorbinsäure die höchste biologische Wirkung. Beim Meerschweinchen besitzt 6-Desoxy-L-Ascorbinsäure etwa 30%, 6-Desoxy-6-Chlor-Ascorbinsäure 70-98% und D- Isoascorbinsäure nur 5% der Bioaktivität von L-Ascorbinsäure. Synthetische Ascorbinsäureanaloga werden als Antioxidantien im Rahmen der Konservierung von Lebensmitteln verwendet.

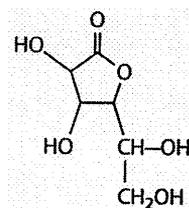


Abb. 22: Strukturformel von Ascorbinsäure

Ascorbinsäure ist ein 2,3-Endiol-L-Gulonsäurelacton, das im tierischen Organismus aus D-Glucuronsäure über die Zwischenstufen D-Glucuronsäure, L-Gulonsäure und L-Gulonolacton gebildet wird. Die weitere Biosynthese erfolgt durch Oxidation von L-Gulonolacton durch das Enzym L-Gulonolacton-Oxidase. Primaten fehlt dieses Enzym, sie können L-Ascorbinsäure nicht selbst herstellen [86]. L-Ascorbinsäure ist ein starkes Reduktionsmittel. Die Oxidation von L-Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure verläuft über die intermediär entstehende radikale Semidehydroascorbinsäure. Diese drei chemischen Formen von Ascorbinsäure stellen ein reversibles Redoxsystem dar. Die Oxidation von L-Ascorbinsäure geschieht in alkalischer Lösung wesentlich schneller als in saurer und wird durch katalytische Mengen Schwermetallionen, z.B. Fe (III), beschleunigt [86].

Tab. 13: Physikalisch chemische Eigenschaften von Ascorbinsäure

Summenformel	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>
Molekulargewicht	176,13
Kristallform	monoklin, meist Plättchen, manchmal Nadeln
Schmelzpunkt	190-192 °C, Zersetzung
Löslichkeit	in Wasser : 0,33 g/ml in Ethanol (absolut): 0,02 g/ml Unlöslich in Ether, Chloroform, Benzol

Bei oraler Einnahme von Ascorbinsäure beginnt die Resorption bereits in der Mundschleimhaut. Die Hauptresorption der Ascorbinsäure erfolgt im Jejunum und im Ileum. Dort wird sie mittels eines aktiven Transports resorbiert. Bei höheren Konzentrationen erfolgt die Aufnahme durch Diffusion. Bei einer oralen Aufnahme von 180 mg resorbieren Nichtraucher 78-88 % und Raucher 63-80 %. Mit steigender Dosis sinkt die Resorptionsrate von etwa 50 % bei 1g auf etwa 15 % bei 12 g ab.

Im Plasma ist Ascorbinsäure zu ca. 24 % an Eiweiß gebunden. Die optimale Plasmakonzentration von Ascorbinsäure ist nicht bekannt. Bei Einnahme von weniger als 1-3 g Ascorbinsäure pro Tag erfolgt die Hauptausscheidung über den Urin. Bei Dosen über 3 g werden zunehmend größere Anteile unmetabolisiert in den Fäces ausgeschieden. Bis zu einer Schwellenkonzentration von 8-9 mg/l wird Ascorbinsäure hauptsächlich von einem Natrium-abhängigen Transport in den Nierentubuli rückresorbiert. Die renale Ausscheidung steigt bei Überschreitung der Resorptionskapazität rasch an. Die Eliminationshalbwertszeit von Ascorbinsäure hängt von der Applikationsart, der zugeführten Menge und der Resorptionsgeschwindigkeit ab. Bei einer oralen Aufnahme von ca. 50 mg beträgt die Halbwertszeit ca. 14 Tage und bei Zufuhr von 1g ca. 13 Stunden. Bei Zufuhr der gleichen Menge einer Retardzubereitung wurde eine Eliminationshalbwertszeit von 15 Stunden gefunden, während bei intravenöser Applikation von 500 mg Natriumascorbat die Halbwertszeit bei etwa 6 Stunden liegt [86].

#### **4.2.3. UV-Strahlung und Antioxidantien**

Die Interaktion von UV-Strahlen und enzymatischen und nicht enzymatischen Antioxidantien wurde in zahlreichen Studien untersucht [72, 73]. Martin et al. zeigten in einer Untersuchung an Zellkulturen (Keratinocyten und Monozyten), daß Antioxidantien deutlich den oxidativen Schaden, der nach UV-Exposition in Kombination mit toxischen Substanzen entsteht, und die durch Doxorubicin induzierte Zytotoxizität an Monozyten reduzieren. Effekte zeigten sich auch im Sinne einer verbesserten Wundheilung und Narbenbildung von Mäusen und Ratten und einer Reduktion der Größe, Dauer und Schwere einer Herpesvirusinfektion bei Mäusen und Meerschweinchen [124]. Vergleichbare Ergebnisse erhielten Stewart et al. an UVB-bestrahlten BALB/c MK-2 Mäusekeratinocyten nach Antioxidantieninkubation [184]. Intraperitoneale Injektionen von u.a. L-Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol und

nachfolgende Bestrahlung von zinnprotoporphyrinbehandelten Ratten zeigte ebenfalls einen photoprotektiven Effekt mit verlängerter Überlebenszeit der Tiere. Am effektivsten erwies sich L-Ascorbinsäure [104]. Chan et al. postulieren einen Schutz vor einer Caspase-induzierten Apoptose durch diese Antioxidantien [31].

In den vergangenen Jahren wurden Antioxidantien vermehrt als photoprotektive Substanzen den Sonnenschutzmitteln zugesetzt. Die topische Applikation von fünfprozentiger Ascorbinsäurelösung auf die Rückenhaut haarloser Mäuse führte zu einer signifikanten Verminderung chronischer Hautschäden durch UVB-Bestrahlung. Neben Ascorbinsäure erwiesen sich in dieser Untersuchung auch andere Radikalfänger wie Propylgallat und 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure (Trolox®) als protektiv gegenüber UVB-bedingten chronischen Hautschäden. Am effektivsten war d-alpha-Tocopherol. Im selben Modell wurde demonstriert, daß Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol keinen protektiven Effekt gegenüber chronischen Hautveränderungen durch UVA-Strahlung aufwiesen [17]. Eine ähnliche, placebokontrollierte Untersuchung am ventralen, menschlichen Unterarm ergab nach 16 Wochen bei zweimaliger Applikation einer antioxidantienhaltigen Zubereitung pro Tag (0,5% Tocopherylacetat, 0,1% Magnesiumascorbylphosphat, 2,0% Grünteextrakt) einen effektiven Schutz der Lipide im menschlichen Stratum corneum gegen endogene Oxidation und gegen oxidative Schäden, die nach Provokation mit 500 mJ/cm<sup>2</sup> UVB-Strahlung auftraten [144]. Topisch angewendet kann d-alpha-Tocopherol direkt durch die Epidermis und durch den Haarfollikelapparat, nicht aber durch die Schweißdrüsenausführungsgänge die Haut penetrieren. Die Dermis dient dabei als Barriere oder Reservoir dieser hoch lipophilen Verbindung. Bei täglicher Anwendung von Tocopherolacetat über 10 Tage kann die UVB-Einwirkung die Penetration um 60% steigern. Akute Hautschädigung durch UV-Strahlung führt zu erhöhter Ornithindecaboxylaseaktivität, die sich durch topisches Tocopherol erheblich senken läßt [194]. Topische Applikation von

Antioxidantien nach UV-Exposition zeigten hingegen keinerlei protektiven Effekt, ein Hinweis also, daß die UV-induzierte Hautschädigung ein schneller Prozess ist. Antioxidantien scheinen nur schützend intervenieren zu können, wenn sie während der oxidativen Schädigung schon in ausreichender Menge vorhanden sind [50]. Topische Applikation von Ascorbinsäure auf die Haut von Yorkshire-Schweinen und nachfolgende UVB-Bestrahlung führte zur deutlichen Verminderung akuter Strahlenschäden. In derselben Versuchsreihe wurde gezeigt, daß auch akute histologische Veränderungen, die durch eine phototoxische Reaktion infolge UVA-Bestrahlung und 8-Methoxypsoralen (PUVA) entstehen, durch vorhergehende topische Applikation von Ascorbinsäure deutlich vermindert werden konnten [36]. Als Hinweis auf die Bedeutung von Ascorbinsäure für die Reparatur von UV-bedingten Strahlenschäden wurde die Tatsache gewertet, daß die kutane Konzentration von Ascorbinsäure in Hautarealen, die mit UVB bestrahlt wurden, gegenüber unbestrahlten Arealen deutlich vermindert war [36]. Auch bei topischer Applikation scheint die Kombination von Ascorbinsäure mit d-alpha-Tocopherol einen deutlich synergistischen Effekt zu haben [37].

Auch hinsichtlich der oralen Einnahme von Antioxidantien und deren Wirkung in Bezug auf UV-Strahlen gibt es einige Untersuchungen. Dunham et al. zeigten an haarlosen Mäusen, die über 15 Wochen intermittierend einer UV-Strahlenquelle exponiert wurden, daß durch orale Zufuhr von Ascorbinsäure dosisabhängig die Häufigkeit von Hauttumoren verringert und der Krankheitsbeginn verzögert wurde [52]. Selen, Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol zeigten auch bei Ratten, die Zigarettenrauch ausgesetzt waren, eine Schutzwirkung gegenüber oxidativem Stress [47]. Weitere Untersuchungen ergaben einen deutlich protektiven Effekt bei der oralen Gabe von Selen, kombiniert mit d-alpha-Tocopherol und Retinol, wo nach einer dreiwöchigen Behandlung eine Schutzwirkung gegen UV-induzierte Zellschädigung im suberythemalen Bereich festgestellt werden konnte [111]. Die Einnahme von 2 g

Ascorbinsäure, kombiniert mit 1000 IU d-alpha-Tocopherol täglich, resultierte bei 10 gesunden Probanden in einer deutlich verminderten Sonnenbrandreaktion im Vergleich zur Placebogruppe [56]. Diesen synergistischen Effekt beschreibt auch Steenvoorden im Rahmen einer Untersuchung von nicht enzymatischen Antioxidantien in Zusammenhang mit UV-Schädigung [180]. Die Einnahme von 400 IU d-alpha-Tocopherol allein über sechs Monate zeigte demgegenüber sowohl histologisch als auch klinisch keinerlei Einfluß auf die Reaktion nach UVB-Bestrahlung [198]. In vitro und in vivo ergaben sich Hinweise, daß Ascorbinsäure dabei eine Substanz in einer regenerativen biochemischen Kaskade mit antioxidativer Eigenschaft ist. Diesem antioxidativen, nicht enzymatischen Mechanismus gehört daneben auch d-alpha-Tocopherol an, der Synergismus zwischen Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol bei der Inhibition der durch freie Radikale vermittelten Oxidation von Lipiden wurde in vitro und in vivo bereits früher demonstriert [5, 134]. Der Einsatz von Antioxidantien im Sinne eines täglich angewendeten systemischen Lichtschutzes, zusätzlich zu einem lokal applizierten Sonnenschutz, könnte angesichts dieser Untersuchungsergebnisse klinisch sinnvoll sein. Körperareale, auf denen selten Lichtschutz aufgetragen wird (z.B. behaarter Kopf, Ohrmuscheln), wären somit zumindest teilweise vor Sonne geschützt. Lichtempfindliche Menschen (Hauttyp I und II nach Fitzpatrick) könnten - zusätzlich zum korrekten Lichtschutzverhalten - möglicherweise durch die Einnahme von Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol ihr Risiko, lichtinduzierte Tumoren zu entwickeln, reduzieren. Zur Frage, inwieweit durch die Gabe von Antioxidantien auch die Photokarzinogenese beeinflusst wird, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

#### **4.3. Photohämolysetest als In-vitro-Testmethode**

Der Photohämolysetest wurde 1971 erstmals von Kahn und Fleischaker beschrieben und in der Folgezeit mehrfach modifiziert [101, 19, 91, 152]. Gemeinsam ist den Modifikationen die

Überführung des teils als Met-Hämoglobin freigesetzten Hämoglobins in das stabile Cyano-Hämoglobin [91], um das gesamte Ausmaß der Hämolyse bei der photometrischen Hämoglobin-Messung zu erfassen. Met-Hämoglobin besitzt ein vom nicht oxidierten Hämoglobin abweichendes Absorptionsmaximum, so daß der bei steigender Bestrahlungsdauer zunehmende Anteil von Met-Hämoglobin zu falsch niedrigen gemessenen Hämolyseraten führen würde. Bereits Kahn und Fleischaker erkannten dieses Phänomen, das sie als „fading“ bezeichneten [101]. Der Photohämolysetest misst substanzabhängige, UV-induzierte Hämoglobinfreisetzung aus Erythrozyten; die zugehörigen Hämolyseraten werden als Prozentsatz des Gesamthämoglobins der Proben berechnet [91]. Als Hinweis auf eine relevante phototoxische Wirkung wurde in dieser Arbeit, wie auch in Vorarbeiten, eine Photohämolyse von mindestens fünf Prozent angesehen. Der Photohämolysetest stellt eine etablierte und reproduzierbare Methode zur Testung von Substanzen auf ihre phototoxische Potenz [199] und deren quantitative Erfassung dar. Rote Blutzellen sind dabei besonders geeignet um Vorgänge an der Zellmembran, wie Interaktionen mit der Lipoproteinschicht, v.a. bei der Beteiligung von sauerstoffabhängigen Membranschäden zu untersuchen, da sie selbst keine Zellorganellen besitzen [34]. Substanzen, die ihre phototoxischen Eigenschaften über Zellorganellen entfalten oder beispielsweise Psoralene, die mit DNA und RNA photoreagieren [199], können über den Photohämolysetest nicht immer gemessen werden. Dennoch ist der Photohämolysetest den meisten anderen Verfahren auch heute noch überlegen. Der Candida albicans-Wachstums-Inhibitionstest nach Daniels schlug bei mehreren sicher phototoxisch wirkenden Substanzen fehl [35, 103, 108, 77, 92]. Des weiteren gibt es noch den Photo-Basophilen-Histamin-Freisetzungstest, wo die phototoxische Schädigung peripherer Leukozyten über Histaminliberation erfaßt werden kann. Maß der Phototoxizität stellt das UV-abhängig freigesetzte Histamin prozentual zum Gesamthistamin dar [153]. Die Verwendung von Zellkulturen durch Freeman, Allison u.a. ergab in einigen Untersuchungen

unstimmige Resultate [32, 1, 68, 109]. Andere photodiagnostische In-vitro-Tests an Zellkulturen wurden immer wieder vorgeschlagen.

Die nächste Stufe zur Testung einer potentiell photosensibilisierenden Substanz ist die Prüfung am Tiermodell, wo vornehmlich Meerschweinchen [165, 110, 27, 137] und Mäuse [119, 76] eingesetzt werden. Der Photopatch-Test [59, 187, 113, 114) und die systemische Photoprovokation [44, 11] sind klinische Testmethoden am Menschen.

#### 4.3.1. Fenofibrat als phototoxische Substanz

Als phototoxische Substanz wurde Fenofibrat (FF) verwendet. Fenofibrat ist ein Benzophenonabkömmling [23], der sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen in vitro photolabil ist und dessen Zerfallsprodukte isoliert und identifiziert werden können [43, 192, 193].

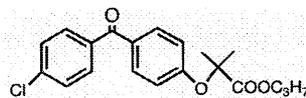


Abb. 19: Strukturformel von Fenofibrat

Im Photohämolysetest ist Fenofibrat in der Lage, über die Generation von Singulett-Sauerstoff und die Formation von stabilen Photoprodukten sowie Interaktion mit freien Radikalen [193] die Lyse der Erythrozytenmembran zu induzieren, indem es, wie Bestrahlungen von Linolensäure in Anwesenheit von Fenofibrat gezeigt haben, zur Lipidperoxidation kommt. Das angeregte Benzophenon-Chromophor scheint dabei verantwortlich für die Entstehung von Radikalzwischenprodukten zu sein [130]. Das Benzophenon-Chromophor ist in der Lage, Photonen in der UVA-UVB-Region zu absorbieren [49]. Die Inhibition der Photohämolyse durch Antioxidantien und das Singulett-Sauerstoff-Trapping weisen dabei auf eine Induktion der Erythrozytenlyse durch reaktive Sauerstoffspezies hin. Auf der anderen Seite konnte aber

gezeigt werden, daß die Photoprodukte FF1 und FF3 in der Lage sind, Dunkelhämolyse zu induzieren. Unter physiologischen Bedingungen kann FF1 aber nicht gebildet werden und die Dunkelhämolyse durch FF3 ist im Vergleich zur Photohämolyse durch Fenofibrat weitaus geringer, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Hauptmechanismen der photohämolytischen und photoperoxidierenden Aktivität von Fenofibrat und seinen Photoprodukten durch freie Radikale, die durch das Benzophenon-Chromophor generiert werden, bedingt sind [130]. Die Kontrollergebnisse des Photohämolysetests zeigten, daß Fenofibrat keine nennenswerte Eigenabsorption bei 550 nm aufweist und die testsubstanzfreien Zellsuspensionen weder unbelichtet noch bei Bestrahlungsdosen bis 100 J/cm<sup>2</sup> UVA-reicher bzw. 2000 mJ/cm<sup>2</sup> UVB-reicher Strahlung eine wesentliche Hämoglobinfreisetzung aufweisen.

In unseren eigenen Kontrollversuchen zeigten sich gleiche Ergebnisse bei Bestrahlung des erythrozytenfreien Blindwertes mit Dosen bis 40 J/cm<sup>2</sup> UVA- und 1600 mJ/cm<sup>2</sup> UVB-reicher Strahlung und keine nennenswerte Hämolyse der Erythrozyten nach Messung des Leerwerts ohne Zugabe von Fenofibrat. Bei allen Gruppen wurde außerdem die Photohämolyse einer nicht bestrahlten Kontrollplatte mitgemessen, wo sich ebenfalls keine Photohämolyse einstellte.

#### **4.3.2. Einflüsse auf den Reaktionsverlauf**

In Vorversuchen wurde der Einfluß der Temperatur und des pH-Wertes auf die Hämoglobinfreisetzung bereits hinreichend untersucht [16]. Die Verarbeitung der Proben geschah in diesen Versuchsreihen bei Zimmertemperatur, unterbrochen durch das Zentrifugieren bei 21°C und 4°C. Unter Verwendung des Schüttelwasserbades bei 37°C mit Thermostat konnte die in früheren Versuchsdurchführungen beschriebene Temperaturerhöhung bei der Bestrahlung, die für manche an der Erythrozytenmembran

ablaufenden Reaktionen eine Beeinflussung bedeuten kann [51], nahezu vermieden werden. Die in diesen Versuchsreihen registrierten Temperaturmeßwerte lagen in allen Fällen zwischen 36,6 und 38,0°C. Ab einem pH-Wert von 5 stellt sich an den Erythrozyten auch ohne Photosensibilisator eine Hämolyse ein [101]. In früheren Arbeiten wurde jedoch festgestellt, daß bei UVA- bzw. UVB-Bestrahlung nach Belichtung mit bis zu 100 J/cm<sup>2</sup> UVA sowie bis zu 2000 mJ/cm<sup>2</sup> UVB in Verbindung mit phototoxisch wirkenden Substanzen keine pH-Wert Änderung eintritt [16, 71]. Wesentliche pH-Wert-Änderungen stellten sich während der gesamten Versuchsdurchführung unter Anwendung von TCM-Puffer nicht ein, daher kann die Photohämolyse nicht dadurch verursacht worden sein. Um Lichteinflüsse auf den Reaktionsverlauf auszuschließen, waren die Testproben außer bei der Strahlungsexposition mit Tüchern oder Aluminiumfolie bedeckt. Während der Verarbeitung der Proben wurde zudem auf künstliche Raumbelichtung verzichtet. Die jeweils nach den Bestrahlungen folgenden Nachinkubationszeiten im Dunkeln stellten sicher, daß auch die noch nach der Bestrahlung ablaufenden photoreaktiven Prozesse miterfaßt wurden. Dreimaliges Waschen der roten Blutzellen verhinderten ein Quenchen der Photohämolyse. Da sich das Absorptionsspektrum für Hämoglobin nach Oxidation in Abhängigkeit von der Exposition mit UV-Licht und Licht allein und dem Vorhandensein eines Photosensibilisators ändert [101], wurden mittels Drabkin's Reagens Oxy-Hämoglobin und Met-Hämoglobin in das stabile Cyano-Met-Hämoglobin überführt und dieses spektroskopisch gemessen.

#### **4.4. Fenofibrat-abhängige Photohämolyse bei Sulfiteinnahme**

In der Probandengruppe mit alleiniger Einnahme von Sulfid zeigte sich zwar keine signifikante Beeinflussung der Fenofibrat-abhängigen Photohämolyse *in vitro*, interessanterweise verminderte sich aber die Photohämolyse um 10% über einen weiten Dosis-Bereich mit UVB-reicher Strahlung. Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu früher durchgeführten

Untersuchungen. Die Arbeitsgruppe von Przybilla et al. stellte im Rahmen einer Untersuchung von 13 Nahrungsmittelzusatzstoffen auf mögliche phototoxische Eigenschaften in vitro eine Photohämolyse von fast 100% bei Inkubation der Erythrozyten mit Natriumsulfit und Natriumdisulfit fest [54]. Dabei zeigte sich eine Abhängigkeit von der Konzentration der Sulfite und der UV-Dosis. Nach UVB-Exposition (TL20 W/12; Philips, Hamburg) kam es sowohl mit Natriumsulfit als auch mit Natriumdisulfit zu einer UV-dosisabhängigen Photohämolyse von 64,1% bis 99,7%. Nach Bestrahlung mit einer Lampe mit einer Emission zwischen 290-800 nm (SOL 3 Sunlight-Stimulating Lamp; Hönle, Martinsried) ergab sich eine Photohämolyse. Keine Hämolyse der roten Blutzellen konnte bei Bestrahlung mit UVA-reicher Strahlung (UVASUN 5000) erzielt werden. Die übrigen 11 getesteten Substanzen induzierten ebenfalls keine Photohämolyse. Natriumdisulfit war dabei im Vergleich zu Natriumsulfit stärker phototoxisch. Dies könnte möglicherweise konzentrationsabhängig bedingt sein, weil das Disulfit Ion sich in wässriger Lösung fast vollständig in die beiden Sulfiteinheiten separiert. Dies geschieht nach folgender Formel:



Das Aktionsspektrum scheint dabei im UVB-Bereich zu liegen, denn obwohl die UVB-Dosis, die mit der SOL 3-Lampe verabreicht wurde bei 4,5 J/cm<sup>2</sup> lag, ergab sich eine geringere Hämolyse als bei Bestrahlung mit 1,6 J/cm<sup>2</sup> UVB (TL 20 W/12). Das könnte in einer Photoinhibition durch andere Wellenlängen begründet liegen. Die UV-induzierte Autooxidation von SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> zu SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> beinhaltet die Entstehung der Radikale SO<sub>3</sub><sup>·-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>·-</sup> und SO<sub>5</sub><sup>·-</sup>, die durch eine Radikal-Kettenreaktion entstehen [79, 90]. Es hat sich gezeigt, daß das Sulfit-Radikal mit freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) reagiert [118, 60], es scheint aber gegenüber PUFA-Micellen (mehrfach ungesättigte Fettsäuren in wässriger Lösung) und deswegen eventuell auch gegenüber Zellmembranen nicht reaktiv zu sein [60]. Wahrscheinlich sind also SO<sup>4·-</sup> oder SO<sup>5·-</sup> -Ionen für Membranschädigungen verantwortlich.

Hinsichtlich des photoprotektiven Potentials, das sich in unserer Versuchsreihe bei alleiniger Sulfiteinnahme im UVB-Bereich nach Bestrahlung mit  $800 \text{ mJ/cm}^2$  oder  $1200 \text{ mJ/cm}^2$  in vitro gezeigt hat, beschreibt Islam ebenfalls einen photoprotektiven Effekt nach Zusatz von Natriumsulfit zu Daunorubicin-Hydrochloridlösungen [96]. Diese photoprotektive Kapazität zeigte eine deutliche Zunahme bei steigenden pH-Werten. Diese Erkenntnisse passen gut zu der Tatsache, daß Sulfite weitverbreitet als Antioxidantien in Nahrungsmitteln (Nahrungsmittelzusatzstoffe) verwendet werden. Die Diskrepanz zwischen den beiden dargestellten Untersuchungsergebnissen könnte zudem darin begründet sein, daß bei den früheren In-vitro-Untersuchungen bezüglich der Phototoxizität die Sulfite direkt dem Testansatz zugegeben wurden mit entsprechend resultierenden Zwischenprodukten, während in diesem Versuchsansatz Sulfite systemisch verabreicht wurden. Im Organismus entstehen dadurch andere Metabolite, indem die Sulfite mit SH-Gruppen, Strukturproteinen, Enzymen, Cofaktoren, Vitaminen, Nucleinsäuren und Lipiden interagieren. Sulfit reagiert auch mit Endprodukten oder Intermediärprodukten und inhibiert Enzym-Ketten Reaktionen. Es spaltet Disulfid-Bindungen in Proteinen und induziert Änderungen in der molekularen Konfirmation von Enzymen. Es schädigt außerdem den Zellmetabolismus und die Membranfunktionen [118]. In dieser Untersuchung kann keine Aussage über die tatsächliche Menge von Sulfit, die auch in der Haut „ankommt“ oder die Konzentration, die sich im Blut befindet, gemacht werden. Die jetzigen Ergebnisse beziehen sich nur auf einen kurzen Zeitraum von acht Tagen und es wäre von großem Interesse, die Langzeitwirkung von systemisch gegebenen Sulfiten in einer größeren Probandengruppe zu erfassen und hierbei eventuell mit variablen Sulfitkonzentrationen zu arbeiten, entstehende Intermediärprodukte zu untersuchen und die Sulfitkonzentrationen, die letztlich über dem Blutweg in die Haut gelangen, zu bestimmen. Diese In-vitro-Ergebnisse waren der Anlaß zur Frage, ob die Sulfit-Phototoxizität, die sich bei direkter Sulfitzugabe im In-vitro-Test zeigt, auch in vivo die UVB-Empfindlichkeit steigert

und so möglicherweise das Risiko phototoxischer Hautreaktionen bis hin zur Photokarzinogenese.

#### **4.5. Fenofibrat-abhängige Photohämolysen bei Sulfid-, Ascorbinsäure- und d-alpha-Tocopheroleinnahme**

Die gleichzeitige Gabe von Antioxidantien und Sulfid führte im UVA-Bereich zur Verminderung der Photohämolysen in vitro aber nicht im UVB-Bereich, was als Hinweis für potentiell phototoxische Eigenschaften von Sulfiden interpretiert werden könnte.

Differenzen bezüglich der Reagibilität hinsichtlich zusätzlicher UVB-Strahlung konnten auch in vitro an isolierten Erythrozyten gefunden werden. Nach Zugabe von Ketoprofen, einem phototoxischen, nicht-steroidalen Antirheumatikum, zeigte sich eine konzentrationsabhängige phototoxische Wirkung bei Bestrahlung der Erythrozyten mit UVA, während die Ketoprofen-abhängige, UVA-induzierte phototoxische Wirkung an den roten Blutkörperchen bei einem Teil anderer Spender durch eine UVB-Vorbestrahlung mit 20 oder 40 mJ/cm<sup>2</sup> reduziert wurde [53]. In einer In-vivo-Untersuchung war bei einem Teil der Probanden die Entwicklung von lichtinduzierten Hautveränderungen durch 100 J/cm<sup>2</sup> UVA im Sinne einer polymorphen Lichtdermatose nach Vorbestrahlung mit 150 mJ/cm<sup>2</sup> UVB inhibiert [11, 12].

In unserer Versuchsreihe wurden die Bestrahlungen mit einer UVB-reichen Lichtquelle durchgeführt, die aber auch UVA emittiert (128 mJ/cm<sup>2</sup> UVA bei der Maximaldosis von 320 mJ/cm<sup>2</sup>). Diese UVA-Dosen induzierten jedoch keine Photohämolysen, sodaß eine Beeinflussung der Ergebnisse hierdurch unwahrscheinlich ist. Da der Effekt einer Substanz, die in ein System oxidativer Reaktionen eingebracht wird, vom Redoxpotential der Einzelkomponenten abhängt, könnte die Diskrepanz zwischen den früheren In-vitro-Ergebnissen und den jetzigen Befunden eine Erklärung darstellen. Durch die zusätzliche Einnahme von Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol scheint es zu einer Änderung der

antioxidativen Kapazität im Spenderorganismus und damit einer Veränderung der Wirkweise der Sulfite gekommen zu sein. Um den exakten Mechanismus einer potentiellen Sulfid-abhängigen Phototoxizität zu erklären, müssen in weiteren Untersuchungen die UVB-induzierten Photoprodukte identifiziert und ihre Reaktion mit Membrankomponenten untersucht werden.

#### **4.6. Fenofibrat-abhängige Photohämolysen bei Ascorbinsäure- und d-alpha-Tocopheroleinnahme**

Die alleinige Gabe von Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol ergab eine signifikante Abnahme der Fenofibrat-abhängigen Photohämolysen, die sich sowohl im UVA- als auch im UVB-Bereich zeigte. Auch frühere Arbeiten weisen auf diesen photoprotektiven Effekt von Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol hin. Entsprechende Vorversuche ergaben identische Ergebnisse in nahezu allen UV-Bereichen und zeigten damit eine Beeinflussung des Photohämolysetestes durch den antioxidativen Status des Blutspenders [55]. Kimura wies 1981 photoprotektive Effekte von L-Ascorbinsäure bei durch Pheophorbid- $\alpha$  oder Hämatoporphyrine induzierter Photohämolysen in vitro und in vivo nach [105]. Erforderliche Konzentrationen für Ascorbinsäure waren  $10^{-3}$  mol/l in Gegenwart von Pheophorbid- $\alpha$ ,  $10^{-2}$  mol/l in Anwesenheit von Hämatoporphyrinen. Durch Zugabe von Pantothensäure ließ sich eine Potenzierung der Wirkung der Ascorbinsäure erzielen. Untersuchungen zur Photohämolysen an Kaninchen-Erythrozyten zeigten ebenfalls einen deutlich protektiven Effekt von Antioxidantien gegenüber der durch freie Radikale induzierten Photohämolysen [135]. Die Phospholipide in den liposomalen Membranen werden durch eine Kettenreaktion freier Radikale oxidiert. Das kettenbrechende wasserlösliche Antioxidans Ascorbinsäure und das lipidlösliche kettenbrechende Antioxidans d-alpha-Tocopherol fangen dabei vornehmlich Radikale in der Lipidregion der Membranen ab [135]. Diese Theorie untermauert Postaire,

der nach Supplementierung mit  $\beta$ -Karotin (30 mg/d), d-alpha-Tocopherol (15 mg/d) und Ascorbinsäure (30 mg/d) eine deutliche Protektion der Erythrozyten vor zunehmend entstehendem Singulett-Sauerstoff erzielte [149].

Im Rahmen einer Untersuchung der Interaktion von UVB-reicher und UVA-reicher Bestrahlung auf die Ketoprofen-induzierte Photohämolysen konnten Eberlein-König et al. zeigen, daß Ascorbinsäure als Reduktionsmittel sowohl die UVA- als auch die kombinierte UVA und UVB- induzierte Photohämolysen inhibieren kann. Dieser Effekt zeigte sich jedoch nur bei Probanden, die keine reduzierte UVA-abhängige Photohämolysen nach Vorbestrahlung mit UVB-Strahlung aufwiesen (Photoaugmentation). Somit ergibt sich eventuell eine Korrelation mit dem antioxidativen Potential der Zellen. Dies würde bedeuten, daß niedrige UVB-Dosen im Rahmen einer Vorbestrahlung die antioxidative Kapazität aktivieren können [57].

#### **4.7. Fenofibrat-abhängige Photohämolysen bei Placeboeinnahme**

Probanden, die lediglich Placebokapseln eingenommen hatten und als Kontrollgruppe dienten, zeigten erwartungsgemäß keine Modifikation bezüglich der Fenofibrat-abhängigen Photohämolysen.

#### **4.8. Stellenwert des Photohämolysetestes zum Nachweis photosensibilisierender Substanzen**

Die Erythrozytenmembran dient beim Photohämolysetest als Modell zur Darstellung der oxidativen Schädigung von Biomembranen. Die Peroxidation von Membranen ist einer der ersten Vorgänge im Rahmen einer zellulären Schädigung [135]. Dennoch kann der Photohämolysetest als In-vitro-Modell kein genaues Abbild der Vorgänge liefern, die sich in dem komplexen Organ „Haut“ bei einer phototoxischen Reaktion abspielen. Als Screening-

Test ermöglichen er und andere In-vitro-Methoden jedoch unter reproduzierbaren Bedingungen Substanzen auf ihr phototoxisches Potential zu untersuchen. Eine vollständige Evaluierung des phototoxischen Potentials einer Substanz kann jedoch durch eine einzelne Methode nicht erreicht werden [121]. Photoaktive Metabolite beispielsweise, die als Intermediärprodukte im Rahmen von Stoffwechselprozessen entstehen, bleiben in den In-vitro-Modellen unberücksichtigt [188]. Der alleinige Nachweis der Phototoxizität einer Substanz in vitro, oder umgekehrt der fehlende Nachweis eines phototoxischen Potentials, läßt keineswegs Rückschlüsse auf die tatsächlichen klinischen Wirkungen zu. Um eine genauere Aussage zu erhalten sind allenfalls mehrere kombinierte In-vitro-Modelle [93], oder wie in dieser Versuchsanordnung, eine Ergänzung durch einen In-vivo-Test durchzuführen [120]. Zur Identifizierung von Photoallergenen kann der Photohämolysetest ebenfalls dienlich sein, weil photoallergisch aktive Substanzen großteils auch ein phototoxisches Potential besitzen [25]. Trotz dieser Einschränkungen ist der In-vitro-Nachweis phototoxischer Eigenschaften einer Substanz sinnvoll, um einen Hinweis auf mögliche Wirkungen in vivo zu erlangen. Frühere Untersuchungen bestätigen den engen Zusammenhang zwischen klinischer Beobachtung, Tierexperiment und In-vitro-Experiment [168]. Bei einer in vitro beobachteten Phototoxizität sollte aber nicht ohne weiteres eine klinische Relevanz gefolgert werden, es ist jedoch erhöhte Aufmerksamkeit gegenüber der Gefahr einer Photosensibilisierung der Haut angebracht.

#### **4.9. Minimale Erythemdosis und UV induzierte Steigerung des Blutflusses**

Die visuell bestimmte MED für UVB ergab in unserer Versuchsdurchführung keine signifikante Veränderung in den unterschiedlichen Probandengruppen. In der Gruppe mit Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopheroleinnahme stieg die MED von 68,5 mJ/cm<sup>2</sup> auf 80 mJ/cm<sup>2</sup>. Nach Supplementierung mit entsprechender Menge an Antioxidantien erreichte

Eberlein-König einen Anstieg der MED von  $80 \text{ mJ/cm}^2$  auf  $96.5 \text{ mJ/cm}^2$  [56]. Diese Diskrepanz könnte durch einen unterschiedlichen oxidativen Status der Probanden, z.B. durch unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten bedingt sein. Auch Abweichungen im Hauttyp oder unterschiedliches Sonnenverhalten können hier beeinflussen. In unserer Untersuchung unterschied sich die MED der Probanden vor Kapsleinnahme nicht signifikant.

Sowohl die Gabe von Antioxidantien als auch die Gabe von Antioxidantien und Sulfiten reduzierte in einigen Dosisbereichen signifikant die Hautdurchblutung bevorzugt in Bereichen von UVB-Dosen, die über der ermittelten MED lagen. Interessanterweise hatte die alleinige Gabe von Sulfiten in unserer Versuchsreihe aber eine signifikante Abnahme der Hautdurchblutung und somit eine photoprotektive Wirkung an der Haut zur Folge. Bei gesunden Probanden variiert die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten in Ruhe ganz erheblich, und zwar sowohl zwischen den einzelnen Versuchspersonen als auch bei ein und derselben Person. Dies konnte durch die Messung der Fließgeschwindigkeit an den Nagelfalzkapillaren festgestellt werden [22, 29, 65, 158, 140]. Tenland hat zudem beträchtliche Unterschiede der mit der Laser-Doppler-Sonde gemessenen Blutströmung in nur 2,5 mm auseinanderliegenden Hautregionen beschrieben [185]. Diese Schwankungen hängen von verschiedenen Faktoren, wie z.B. der Weite der Kapillaren [65] oder der Hauttemperatur [140], ab. Die zweite Bestrahlung in diesem Versuchsaufbau erfolgte an der unbestrahlten Gegenseite der Probanden (unterer Rücken), so daß sich ein direkter Vergleich der Werte vor und nach acht Tagen als problematisch darstellt. Daneben gibt es deutlich rhythmische Schwankungen der kutanen Blutströmung, die auch mit der Laser-Doppler-Technik beobachtet worden sind. Dabei fanden sich Unterschiede sowohl in der Amplitude als auch in der Frequenz dieser spontan-motorischen Aktivität [163, 186]. Unter Einhaltung einer ca. 10 minütigen Ruhepause vor der Messung mit dem Laser-Doppler-Gerät sollten Einflußgrößen wie der Grad des vor der Messung bestehenden Aktivitätszustandes und unterschiedliche

Außentemperaturen weitgehend gering gehalten werden. Dennoch können solche Störgrößen nicht vollständig ausgeschaltet werden. Um Schwankungen so gering wie möglich zu halten, wurde bei jeder Messung zuerst ein Referenzwert auf unbestrahlter Haut erfaßt.

#### **4.10. Sulfite**

Die Behandlung von Nahrungsmitteln mit Sulfit und dessen Salzen hat eine lange Geschichte. Schon in der Antike wurden sie bevorzugt eingesetzt um enzymatische und nicht enzymatische Entfärbungsprozesse in einer Vielzahl von Nahrungsmitteln zu verhindern. Die frühest dokumentierte Anwendung von Sulfit war der Zusatz in Wein und Bier im alten Rom. Über Sulfit als Lebensmittelkonservierungsstoff wird von Evelyn (1664) in der Literatur des 17. Jahrhunderts berichtet, der darauf hinwies, daß Fuhrwerke mit Apfelwein gefüllt werden sollen, der Sulfit enthält (aus brennendem Schwefel hergestellt) um ihn vor Verderb zu schützen.

Es gibt nur sehr wenige Untersuchungen über mögliche phototoxische Effekte von Nahrungsmittelzusatzstoffen. Einige Farbstoffe inaktivieren Hefezellen durch einen photodynamischen Wirkmechanismus [97]. Merville berichtet, daß photoaktiviertes Tartrazin Hämolyse induziert [126]. Auch bezüglich einer potentiell phototoxischen Wirkung von Sulfiten gibt es bisher nur wenige Untersuchungen.

In vitro bilden Sulfit und seine Salze, wenn sie in Wasser gelöst werden, ein pH-abhängiges Gemisch. Als Bisulfite reagieren sie mit Pyrimidinbasen, Nucleosiden, RNA und DNA. Diese Reaktionen finden sich bei physiologischen Temperaturen und pH-Werten, wenn hohe Sulfit-Konzentrationen vorliegen. Oxidationen als Reaktionen von Komponenten mit Sauerstoff sind meist mit einem Übergang von Protonen verbunden. Sulfite haben in wäßrigen Systemen ein deutlich niedrigeres Oxidationspotential als die zu schützenden Stoffe. Bei Zutritt von Sauerstoff werden sie dann leichter oxidiert als der zu schützende Stoff

(Normaloxidationpotential von Sulfiten: + 0,12 V) [7]. Der pH-Wert, die Konzentration, der Typ des Mikroorganismus, die Dauer des Kontaktes und die Bindung von Sulfit nehmen Einfluß auf die schützende Wirkung vor Zersetzung. Schweflige Säure inhibiert Hefen, Schimmelpilze und Bakterien [24], gegen einige Bakterien wirken geringe Dosen Sulfit (1-2 ppm) bakteriostatisch, hohe Dosen hingegen bakterizid. Die antimikrobielle Aktivität entsteht durch die Interaktion von SH-Gruppen mit einer Reihe von Zellkomponenten, Enzymen, Strukturproteinen, Vitaminen, Cofaktoren, Nukleinsäuren und Lipiden.

Hinsichtlich der oxidativen/antioxidativen Kapazität von Sulfiten nach systemischer Zufuhr und deren Wechselwirkungen mit dem oxidativen Potential des Organismus müssen weitergehende Untersuchungen angestellt werden. Diesbezüglich ist, obwohl wir in dieser Arbeit keine UVB-Photosensibilisierung nachweisen konnten, auch weiterhin deren phototoxisches Potential und eine damit in Zusammenhang stehende mögliche erhöhte UVB-Empfindlichkeit von Interesse.

## 5. Zusammenfassung

Die Photosensibilisierung im Sinne einer gesteigerten, oft zu Sonnenbrand-ähnlichen Reaktionen führenden Strahlungsempfindlichkeit der Haut, die durch Interaktion von normalerweise verträglicher Strahlung und einem endogenen oder exogenen Photosensibilisator entsteht, ist ein nicht seltenes Problem. Der Mechanismus einer Photosensibilisierung kann phototoxisch oder photoallergisch sein. Vor allem manche Duftstoffe, Farbstoffe, Lichtfiltersubstanzen und einige für betroffene Patienten oft wichtige Medikamente können bei genügend hoher Dosis von UV-Strahlung klinische Symptome einer Photosensibilisierung auslösen.

Sulfite sind als Nahrungsmitteladditiva weit verbreitet und In-vitro-Tests deuten auf ein phototoxisches Potential dieser Verbindungen, vor allem im UVB-Bereich, hin. Diese Tatsache gab Anlaß zur Frage, inwieweit sich eine phototoxische Wirkung von Sulfiten auch in vivo nachweisen läßt und ob dieser eventuell durch Antioxidantien entgegengewirkt werden kann. Dies wurde an Probanden untersucht, denen Sulfite sowie Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol als Antioxidantien über acht Tage oral verabreicht wurden.

Je zehn Probanden nahmen über 8 Tage täglich 2x200 mg Natriumdisulfit und Placebokapseln bzw. 2x200 mg Natriumdisulfit, 2x1000 mg Ascorbinsäure und 2x500 IE d-alpha Tocopherol bzw. 2x1000 mg Ascorbinsäure, 2x500 IE d-alpha Tocopherol und Placebokapseln oder nur Placebokapseln ein. Vor (Tag 0) und an Tag 8 dieser Einnahme wurde den Probanden Blut für die Bestimmung der Antioxidantienkonzentrationen und einen Photohämolysetest entnommen. Der Photohämolysetest, bei dem Fenofibrat als photoxische Substanz verwendet wurde, basiert auf der photoxisch induzierten Lyse von Erythrozyten durch die Bestrahlung. Diese erfolgte bei dieser Untersuchung mit UVA- und UVB-reicher Strahlung. Weiter wurde die minimale Erythemdosis (MED) für UVB-reiche Strahlung sowie die UVB-induzierte Steigerung des Blutflusses laserdopplerflowmetrisch an Tag 0 und Tag 8 bestimmt.

Bei alleiniger Placeboeinnahme zeigte sich im Vergleich zu den Ausgangswerten keine signifikante Änderung der Vitaminkonzentrationen im Serum, der Fenofibrat-abhängigen Photohämolysen, der MED oder des Hautblutflusses nach Bestrahlung.

Nach alleiniger Einnahme von Sulfid zeigte sich im Vergleich zu den Ausgangswerten am Tag 8 die Antioxidantienkonzentration im Serum weitgehend unverändert. Es zeigte sich keine signifikante Änderung der Photohämolysen im UVA-Bereich. Die UVB-induzierte Photohämolysen verringerte sich über einen weiten Dosis-Bereich. Diese photoprotektive Wirkung zeigte sich beispielsweise in einem Abfall des Medians der Photohämolysen von 24 % auf 13,9 % nach Bestrahlung mit  $800 \text{ mJ/cm}^2$  UVB. Die MED zeigte keine deutliche Veränderung. Die Bestrahlungs-induzierte Steigerung des Hautblutflusses war in einigen bestrahlten Arealen nach Sulfideinnahme signifikant abgefallen.

Nach gleichzeitiger Gabe von Antioxidantien und Sulfid stiegen die Serumkonzentrationen von Ascorbinsäure und d-alpha-Tocopherol signifikant an. Im Vergleich zu den Ausgangswerten kam es zur Verminderung der Photohämolysen im UVA-Bereich. So fiel nach Bestrahlung mit  $20 \text{ J/cm}^2$  der Median signifikant von 70,1 % auf 26,3 %. Im UVB-Bereich zeigte sich nur eine geringe Verminderung der Photohämolysen. Die MED blieb weitgehend unverändert. Die UV-induzierte Steigerung des Hautblutflusses verminderte sich in dem mit  $160 \text{ mJ/cm}^2$  UVB bestrahlten Areal signifikant von 17,3 % auf 11,4 %.

Die ausschließliche Einnahme von Antioxidantien führte zu einem signifikanten Anstieg der Ascorbinsäure- und d-alpha-Tocopherolkonzentrationen im Serum. Im Fenofibrat-abhängigen Photohämolysetest zeigte sich ein protektiver Effekt sowohl gegenüber UVA- als auch gegenüber UVB Bestrahlung mit einem signifikanten Abfall des Medians der Photohämolysen (beispielsweise von 74,7 % auf 31,8 % nach Bestrahlung mit  $20 \text{ J/cm}^2$  UVA-reicher Strahlung). Die MED stieg nur gering an. Die UV-induzierte Steigerung des Hautblutflusses war signifikant reduziert.

Eine phototoxische Wirkung von Sulfiten nach systemischer Gabe konnte in unseren Untersuchungen nicht sicher verifiziert werden. Einer lediglich unterschwelligen Phototoxizität im UVB-Bereich müsste durch weitere Untersuchungen nachgegangen werden, ebenso einer möglicherweise photoprotektiven Wirkung, die sich beim Photohämolysetest im UVA-Bereich und in einer Verminderung des Medians der UV-induzierten Steigerung des Hautblutflusses nach Sulfiteinnahme zeigte.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Allison AC, Magnus IA, Young MR (1966) Role of Lysosomes and of cell membranes in photosensitization. *Nature* 209(26):874-878
2. Anderson R, Lukey PT (1987) A biological role for ascorbate in the selective neutralisation of extracellular phagocyte-derived oxidant. *Ann NY Acad Sci* 498:229-248
3. Anonymous (1995) Sulfite update. *J Am Acc Derm* 12:881-882
4. Bals F, Ames BN (1991) Ascorbic acid protects plasma lipids against oxidative damage. *Nutr Cancer* 15:250
5. Barklay LRC, Locke SJ, Mc Neil JM (1983) The autooxidation of unsaturated lipids in micelles. Synergism of inhibitors vitamins C and E. *Can J Chem* 61:1288-1290
6. Barnes MJ., Kodiek JE (1972) Biological hydroxylations and ascorbic acid with special regard to collagen metabolism. *Vitam u. Horm* 30:1-43
7. Bauer KH, Frömming K, Führer C (1993) *Pharmazeutische Technologie*, 4. Aufl. Georg Thieme Verlag; New York; 425
8. Baumann LS, Spencer J (1999) The effect of topical vitamin E on the cosmetic appearance of scars. *Dermatol Surg* 25:311-315
9. Beani JC, Gautron R, Amblard P, Bastrenta F, Harrpuch L, Jardon P, Raymond JL (1985) Screening for drug photosensitization activity by measuring the variations in oxygen consumption of *Bacillus subtilis*. *Photodermatol* 2:101-106
10. Becker FL (1994) Phototoxizität von Nichtsteroidalen Antirheumatika und Chinolonen: In Vitro Untersuchungen mit sichtbarem Licht. Dissertation, Dermatologische Klinik und Poliklinik München, S.36-38
11. Bergner T, Przybilla B (1992) Photosensitization caused by ibuprofen. *J Am Acad Dermatol* 26:114-116
12. Bergner T, Przybilla B (1993) Phototoxizität. In: Macher E, Kolde G, Bröcker EB (Hrsg). *Jahrbuch der Dermatologie 1992/93*. Biermann, Zülpich S.101-133
13. Beutler HO, Beinstingl G (1980) Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Lebensmitteln. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. 76:69-75
14. Bieri JG, Tolliver TJ, Catignani GL (1979) Simultaneous determination of  $\alpha$ -tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. *Amer J Clin Nutr* 32:2143-2149

15. Biesalsky HK (1995) Antioxidative Vitamine in der Prävention. Dt. Ärzteblatt 92 A1316-A1321
16. Bindl A, Bergner T, Eberlein B, Przybilla B (1992) Photosensitizing properties of neuroleptic drugs (ND). *J Allergy Clin Immunol* 89:345
17. Bissett DL, Chatterjee R, Hannon DP (1990) Photoprotective effect of superoxide-scavenging antioxidants against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 7:56-62
18. Bisset DL, Chatterjee R, Hannon DP (1992) Protective effect of a topical applied antioxidant plus an anti-inflammatory agent against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse. *J Soc Cosmet Chem* 43:85-93
19. Bjellerup M, Ljunggren B (1984) Studies on photohemolysis with special reference to Dimethylchlortetracycline. *Acta Derm Venerol (Stockh)* 64:378-383
20. Bjellerup M, Ljunggren B (1985) Photohemolytic potency of Tetracyclines. *J Invest Dermatol* 84: 262-264
21. Block G, Patterson B, Subar A (1992) Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 18:1-29
22. Bollinger A, Butti P, Barras JP, Trachsler H, Siegenthaler W (1974) Red blood cell velocity in nailfold capillaris of man measured by a television microscopy technique. *Microvasc Res* 7:61-7774
23. Bosca F, Miranda MA (1998) Photosensitizing drugs containing the benzophenone chromophore. *J Photochem Photobiol B* 43:1-26
24. Branen LA, Davidson MP, Salminen S (1990) In: Food additives. IV. Series: Food science and technology. Marcel Dekker Inc 35:102-107
25. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH (1984) *Dermatologie und Venerologie*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York Tokyo, S.344-363
26. Brivida K, Klotz LO, Sies H (1997) Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Biol Chem* 378:1259-1265
27. Buehler EV, Newman EA, Parker RD (1985) Use of the occlusive patch to evaluate the photosensitive properties of chemicals in guinea pigs. *Food Chem Toxicol* 23:689-694
28. Burton GW, Traber MG (1990) Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr* 10:357-382
29. Butti P, Intaglietta M, Reimann H, Hollinger Ch, Bollinger A, Anliker M (1975) Capillary red blood cell velocity measurements in human nailfold. *Microvasc Res* 10:220-227
30. Chalmers RJ, Muston HL, Srinivas V et al (1982) High incidence of amiodarone-induced photosensitivity in northwest england. *Br Med J* 285:341-342

31. Chan WH, Yu JS, Yang SD (1999) PAK2 is cleaved and activated during hyperosmotic shock-induced apoptosis via a caspase-dependent mechanism: evidence for the involvement of oxidative stress. *J Cell Physiol* 178 (3):397-408
32. Chang TW, Weinstein L (1964) Photosensitization of human cell cultures by demethylchlor-teracycline. *Proc Soc Exp Biol Med* 119:509
33. Cohn W, Gross P, Grun H, Loechleiter F, Müller DP, Zulauf M (1992) Tocopherol transport and adsorption. *Proc Nutr Soc* 52:179-188
34. Cook JS, Blum HF (1959) Dose relationships and oxygen dependence in ultraviolet and photodynamic hemolysis. *J Cell Comp Physiol* 53(1):41
35. Daniels F (1965) A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds. *J Invest Derm* 44:259
36. Darr D, Combs S, Dunston S, Manning T, Pinnel S (1992) Topical vitamin C protects porcine skin from ultraviolet radiation-induced damage. *Brit J Dermatol* 127:247-253
37. Darr D, Dunston S, Faust H, Pinnel S (1996) Effectiveness of antioxidants (vitamin C and E) with and without sunscreens as topical photoprotectants. *Acta Derm Venereol* 76(4):264-268
38. Davie SJ, Gould BJ, Yudkin JS (1992) Effect of vitamin C on glycosylation of proteins. *Diabetes* 41:167-173
39. Deneke U, Michal G, Beutler HO (1978) Neue Methoden zur Bestimmung von Vitamin C in Lebensmitteln. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 74:400-403
40. Desai ID (1980) Assay methods. In: Machlin LJ (eds): *Vitamin E. A comprehensive Treatise*. Marcel Dekker, New York
41. Desai ID, Machlin LJ (1985) In: Augustin JB, Klein BP (eds): *Methods of Vitamin Assay* 4/Wiley EJ and sons, New York
42. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) (1991) *Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr*. 5. Aufl. Umschau, Frankfurt
43. Diemer S, Eberlein-König B, Przybilla B (1996) Evaluation of the phototoxic properties of some hypolipidemics in vitro: fenofibrate exhibits a prominent phototoxic potential in the UVA and UVB region. *J Dermatol Sci* 13(2):172-177
44. Diffey BL, Brown S (1983) A method for predicting the phototoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Br J Pharmacol* 16:633-638
45. DiGiuseppi J, Fridovich I (1984) The toxicology of molecular oxygen. *Crit Rev Toxicol* 12:315-342
46. Diliberto EJ Jr, Daniels AJ, Viveros OH (1991) Multicompartmental secretion of ascorbic acid and its dual role in dopamine beta-hydroxylation. *Nutr and Cancer* 15:254

47. Dilsiz N, Olcucu A, Cay M, Naziroglu M, Cobanoglu D (1999) Protective effects of selenium, vitamin C and vitamin E against oxidative stress of cigarette smoke in rats. *Cell Biochem Funct* 17(1):1-7
48. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H (1991) Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr* 53:194S-200S
49. Dorman G, Prestwich GD (1994) Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry* 33:5661-5673
50. Dreher F, Denig N, Gabard B, Schwindt DA, Maibach HI (1999) Effect of topical antioxidants on UV-induced erythema formation when administered after exposure. *Dermatology* 198:52-55
51. Dubbelman TM, Haasnoot C, van Steveninck J (1980) Temperature dependence of photodynamic red cell membrane damage. *Biochem Biophys Acta* 601:220-227
52. Dunham WB, Zuckerkandl E, Reynolds R, Willoughby R, Marcuson R, Barth R, Pauling L (1982) Effects of intake of L-ascorbic acid on the incidence of dermal neoplasms induced in mice by ultraviolet light. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7532-7536
53. Eberlein B, Ruëff F, Bergner T, Przybilla B (1992) Dual effekt of ultraviolet B on UVA-induced phototoxicity. *J Invest Dermatol* 98:543
54. Eberlein-König B, Bergner T, Diemer S, Przybilla B (1993) Evaluation of phototoxic properties of some food additives: sulfites exhibit prominent phototoxicity. *Acta Derm Venerol* 73: 362-364
55. Eberlein-König B, Placzek M, Przybilla B (1997) Phototoxic lysis of erythrocytes from humans is reduced after oral intake of ascorbic acid and d-alpha-Tocopherol. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 13(5-6):173-177
56. Eberlein-König B, Placzek M, Przybilla B (1998) Protective effect against sunburn of combined ascorbic acid (Vitamin C) and d-alpha-tocopherol (vitamin E) *J Am Acad Dermatol* 38(1):45-48
57. Eberlein-König B, Ruëff F, Przybilla B (1996) Interaction of ultraviolet-B-rich and ultraviolet-A-rich radiation in ketoprofen-induced photohemolysis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 12:109-133
58. Emmerie A, Engel C (1938) Colorimetric determination of  $\alpha$ -Tocopherol (vitamin E). *Rec Trav Chim Pays-Bas* 57:1351-1355
59. Epstein S (1964) The photopatch test. Its technique, manifestations and significance. *Ann Allergy* 22:1-11
60. Erben-Russ M (1991) Pulsradiologische Untersuchungen radikalischer Reaktionen mehrfach ungesättigter Fettsäuren in wässriger Lösung. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München

61. Esterbauer H, Gey FK, Fuchs J, Clemens MR, Sies H (1990) Antioxidative Vitamine und degenerative Erkrankungen. Dt Ärztebl - ärztliche Mitteilungen. 87:A3735-A3741
62. Esterbauer H, Hayn M (1997) Vitamin E In: Vitamine, Physiologie, Pathophysiologie, Therapie. Hrsg. Biesalki HK, Schrezenmeir J, Weber P, Weiß HE, Thieme Verlag, Stuttgart S.41-58
63. Evans HM, Bishop KS (1922) On the existance of a hithero unrecognized dietary factor essential for reproduction. Science 56:650-651
64. Fagrell B, Fronek A, Intaglietta M (1977) A microscope-television system for studying flow velocity in human skin capillaries. Am J Phys 233:H318-H321
65. Fagrell B, Intaglietta M (1977) The dynamics of skin microcirculation as a tool for the study of systemic diseases. Bibl anat 6:231-234
66. Fernholz E (1938) On the constitution of alpha-Tocopherol. J Am Chem Soc 40:700-705
67. Fitzpatrick T. B. (1975) Soleil et peau. J Med Esthet 2:33-34
68. Freeman RG, Murtishaw W, Knox JM (1970) Tissue culture techniques in the study of cell photobiology and phototoxicity. J Invest Derm 54:164-169
69. Frei B, Ames N (1991) Ascorbic acid protects plasma lipids against oxidative damage. Nutr and Cancer 15:250-251
70. Friedrich W (1987) Handbuch der Vitamine. Urban & Schwarzenberg, München
71. Frömmel W (1995) In Vitro-Untersuchungen der Phototoxizität von Duftstoffen. Dissertation, Dermatologische Klinik und Poliklinik München. S. 50-52
72. Fuchs J, Huflejt ME, Rothfuss LM, Wilson DS, Carcamo G, Packer L (1989) Impairment of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in skin by UVB-irradiation. J Invest Dermatol 93:769-773
73. Fuchs J Packer L (1990) Ultraviolet irradiation and the skin antioxidant system. Photodermatol Photoimmunol Photomed 7:90-92
74. Gaby SK, Singh VN (1991) Vitamin C. In: Gaby SK, Bendich A, Singh VN, Machlin LJ (eds): Vitamin intake and health. A scientific review. New York: Marcel Dekker. S.103-161
75. Gaziano JM, Manson JE, Hennekens CH (1994) Natural antioxidants and cardiovascular disease: Observational epidemiologic studies and randomized trials. In: Frei B: Natural antioxidants in human health and disease. Academic Press, San Diego
76. Gerberick GF, Ryan CA (1989) A predictive mouse ear-swelling model for investigation topical phototoxicity. Food Chem Toxicol 27: 813-819
77. Gibbs NK (1987) An adaption of the Candida albicans phototoxicity test to demonstrate photosensitizer action spectra. Photodermatol 4:312-316

78. Ginter E (1989) Ascorbic acid in cholesterol metabolism and in detoxification of xenobiotic substances: problem of optimum vitamin C intake. *Nutrition* 6:369-374
79. Gmelins Handbuch der Anorganischen Chemie (1960) 8th edn. Vol. 9. part B2 Weinheim: Verlag Chemie 397-613
80. Goldstein BD, Harber LC (1972) Erythropoetic porphyria: lipid peroxidation and red cell membrane damage associated with photohemolysis. *J Invest Dermatol* 51:892-902
81. Gollnick K (1968) Typ II photooxygenation reaktionen in solution. *Adv Photochem* 6:1-122
82. González E, González S (1996) Drug photosensitivity, idiopathic photodermatoses, and sunscreens. *J Am Acad Dermatol* 35:871-885
83. Granstein RD, González E (1988) Photoallergic contact dermatitis. In: Provost TT, Farner ER ed. *Current therapy in dermatology: 2*. Toronto: BC Decker. S.168-171
84. Halberg L. (1981) Effect of vitamin C on the bioavailability of iron from food. In: Counsell JN, Hornig DH: *Vitamin C (Ascorbic Acid)*. Applied Science, London
85. Halliwell B, Gutteridge JM (1986) Iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection. *Trends Biochem Sci* 11:11-13
86. Hanck A, Weber P (1997) Vitamin C. In Esterbauer H: *Vitamine, Physiologie, Pathophysiologie, Therapie*. Hrsg. Biesalki HK, Schrezenmeir J, Weber P, Weiß HE, Thieme Verlag, Stuttgart S.132-138
87. Harber LC, Harris H, Baer RL (1966) Photoallergic contact dermatitis. Due to halogenated salicylanilides and related compounds. *Arch Dermatol* 94:255-262
88. Harber LC, Targovnic SE, Baer RL (1967) Contact photosensitivity patterns to halogenated salicylanilides in man and guinea pigs. *Arch Dermatol* 96:646-656
89. Hatam LJ, Kayden HJ (1979) A high performance liquid chromatographic method for the determination of tocopherol in plasma and cellular elements of the blood. *J Lipid Res* 20:639-645
90. Hayon E, Treinin A, Wilf J (1972) Electronic spectra, photochemistry and autooxidation mechanisms of the sulfite-bisulfite-pyrosulfite systems: the  $\text{SO}_2^{\cdot\cdot}$ ,  $\text{SO}_3^{\cdot\cdot}$ ,  $\text{SO}_4^{\cdot\cdot}$ ,  $\text{SO}_5^{\cdot\cdot}$  radicals. *J Am Chem Soc* 94:47-57
91. Hetherington AM, Johnson BE (1984) Photohemolysis. *Photodermatol* 1:255-260
92. Horikawa E, Miura T (1988) Phototoxic index of drug determined by *Candida* growth inhibition. *J Dermatol* 15:523-526
93. Horio T (1981) Evaluation of drug phototoxicity by photosensitization of *Trichophyton mentagrophytes*. *Brit J Dermatol* 105:365-370

94. Imlay JA, Linn S (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240:1302-1309
95. Ippen H (1977) Photoallergie. *Therapiewoche* 27:4307-4313
96. Islam MS, Asker AF (1995) Photoprotection of daunorubicin hydrochlorid with sodium sulfite. *PDA J Pharm Sci Technol* 49(3):122-126
97. Iwamoto Y, Tominaga C, Yanagihara Y (1989) Photodynamic activities of food additive dyes on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem Pharm Bull Tokyo* 37:1632-1634
98. Jamieson D (1989) Oxygen toxicity and reaktive oxygen metabolites in mammals. *Free Radic Biol Med* 7:87-108
99. Janoff A, Carp H (1982) Protease, antiprotease and oxidants: pathways of tissue injury during inflammation. In: Cotran RS, Kaufman N, Majno G, ed. *Current Topics in Inflammation and Infection*. Baltimore: Williams & Wilkins Company 62
100. Jordan P, Brubacher D, Moser U, Stähelin HB, Gey KF (1995) Vitamin E and Vitamin A concentrations in plasma adjusted for cholesterol and triglycerides by multiple regression. *Clin Chem* 41:924-927
101. Kahn G, Fleischaker B (1971) Red blood cell hemolysis by photosensitizing compounds. *J Invest Dermatol* 56(2):85-90
102. Kappus H, Diplock AT (1992) Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. *Free Rad Biol Med* 13:55-74
103. Kavli G, Volden G (1984) The Candida test for phototoxicity. *Photodermatol* 1:204-207
104. Keino H, Mimura S, Nagae H, Banno T, Kashiwamata S (1993) Protection by L-ascorbic acid against phototoxicity in tin-protoporphyrin-treated suckling rats. *Biol Neonate* 63(3):183-190
105. Kimura S, Takahashi Y (1981) Preventive effects of L-ascorbic acid and calcium pantothenate against photosensitive actions induced by pheophorbide- $\alpha$  and hematoporphyrin. *J Nutr Sci Vitaminol Tokyo* 27:521-527
106. Kirnbauer R, Köck A, Neuner P, Förster E, Krutmann J, Urbanski A, Schauer E, Ansel JC, Schwarz T, Luger TA (1991) Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids. *J Invest Dermatol* 96:484-489
107. Kleinhans D, Galinky T (1982) Zur möglichen Provokation eines Bronchialasthmas und einer Urtikaria durch Natriumdisulfit. *Zwei Fallbeobachtungen*. *Allerologie* 5:120-121
108. Knudsen EA (1985) The Candida phototoxicity test. The sensitivity of different strains of *Candida*, standardization attempts and analysis of the dose-response curves for 5- and 8-methoxypsoralen. *Photodermatol* 2:80-85

109. Kobayashi F, Wada Y, Mizuno N (1974) Comparative studies on phototoxicity of chemicals. *J Dermatol* 1:93-98
110. Kornhauser A, Wamer WG, Giles AL jr. (1982) Psoralen phototoxicity: correlation with serum and epidermal 8-methoxypsoralen and 5-methoxypsoralen in the guinea pig. *Science* 217:733-735
111. La Ruche G, Césarini JP (1991) Protective effect of oral selenium plus copper associated with vitamin complex on sunburn cell formation in human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 8:232-235
112. Ledo E (1993) Photodermatosis. Part I: Photobiology, photoimmunology and idiopathic photodermatoses. *Int J Dermatol* 12:387-396
113. Lehmann P (1991) Die Deutschsprachige Arbeitsgemeinschaft Photopatch-Test (DAPT). *Hautarzt* 41:295-297
114. Lehman P, Neumann N (1993) Photodiagnostische Testverfahren bei Patienten mit Verdacht auf Lichtdermatosen. In: Macher E, Kolde G, Bröcker EB (Hrsg.) *Jahrbuch der Dermatologie - Licht und Haut - Biermann Zülrich*: 81-100
115. Lewin G, Popov I (1994) The antioxidant system of the organism. Theoretical basis and practical consequence. *Medical Hypotheses* 42:269-275
116. Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washko PW, Dhariwal KR, Park JB, Lazarev A, Graumilch JF, King J, Cantilena LR (1996) Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci. USA* 93:3704-3709
117. Lim HW, Buchness MR, Ashinoff R, Soter NA (1990) Chronic actinic dermatitis. *Arch Dermatol* 126: 317-323
118. Lizada MC, Yang SF (1981) Sulfite-induced lipid peroxidation. *Lipids* 16:189-194
119. Ljunggren B (1984) The mouse tail phototoxicity test. *Photodermatol* 1:96-100
120. Ljunggren B (1985) Propionic acid-derived non-steroidal antiinflammatory drugs are phototoxic in vitro. *Photodermatol* 2:3-9
121. Lock SO, Friend JV (1986) Phototoxicity testing in vitro: evaluation of mammalian cell culture techniques. *Food Chem Toxicol* 24:789-793
122. Lovas RM (1984) Erfahrungen mit Vitamin E-Langzeitapplikation in der ästhetisch-plastischen Chirurgie. In: *Vitamin E in der Rehabilitation und ärztlichen Praxis*: Hrsg. V. Böhlau. Notamed. Melsungen S154-158
123. Machlin LJ (1991) Vitamin E. In: Machlin LJ (ed) *Handbook of Vitamins*. Marcel Dekker, New York.

124. Martin A (1996) The use of antioxidants in healing. *Dermatol Surg* 22(2):156-160
125. McCay PB (1985) Vitamin E: Interactions with free radicals and ascorbate. *Annu Rev Nutr* 5:323-340
126. Merville MP, Decuyper J, Lopez M, Piette J, Van de Vorst A (1984) Phototoxic potentialities of tartrazine: screening test. *Photochem Photobiol* 40:221-226
127. Meycani SN, Meydani M, Verdon CP, Shapiro AA, Blumberg JB, Hayes KC (1986) Vitamin E supplementation suppresses prostaglandin E1(2) synthesis and enhances the immune response of aged mice. *Mech Ageing Dev* 34:191-201
128. Meyer-Betz F (1913) Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivate des Blut-und-Gallenfarbstoffs. *Dtsch Arch Klin Med* 112:476-503
129. Mickley DA, Li RK, Weisel RD, Tumiati LC, Wu TW (1990) Water-soluble antioxidant specificity against free radical injury using cultured human ventricular myocytes and fibroblasts and saphenous vein endothelial cells. *J Mol Coll Cardiol* 22:1297-1304
130. Miranda MA, Boscà F, Vargas F, Canudas N (1994) Photosensitization by fenofibrat. II. In vitro phototoxicity of the major metabolites. *Photochem Photobiol* 59:171-174
131. Moller H, Ansmann A, Wallat S (1989) Wirkungen von Vitamin E auf die Haut bei topischer Anwendung. *Fat Sci Technol* 91:295-305
132. Niki E (1987) Antioxidans in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 44:227-253
133. Niki E (1991) Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Nutr and Cancer* 15:251-252
134. Niki E, Kawakami A, Yamamoto Y, Kamiya Y (1985) Oxidation of lipids. VIII. Synergistic inhibition of oxidation of phosphatidylcholine liposome in aqueous dispersion by vitamin E and vitamin C. *Bull Chem Soc Jpn* 58:1971-1975
135. Niki E, Komuro E, Takahashi M, Urano S, Ito E, Terao K (1988) Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. *J Biol Chem* 236(36):19809-19814
136. Niki E, Yamamoto Y, Komuro E, Sato K (1991) Membrane damage due to lipid oxidation. *Am J Clin Nutr* 53:201S-205S
137. Nilsson R, Maurer T, Redmond N (1993) A standard protocol for phototoxicity testing. Results from an interlaboratory study. *Contact Dermatitis* 28:285-290
138. Nilsson GE, Tenland T, Öberg PÅ (1980) A new instrument for continuous measurement of tissue blood flow by light beating spectroscopy. *IEEE Trans Biomed Eng* 27:12-19
139. O'Donnell-Tormey J, Nathan CF, Lanks K, DeBoer CJ, de la Harpe J (1987): Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells. *J Exp Med* 165:500-514

140. Östergren J (1984) Studies on skin capillary blood cell velocity by video-photometric capillaroskopie (Thesis, Reprint, Stockholm 1984)
141. Okunieff P (1991) Interactions between ascorbic acid, radiation therapy, and Misonidazole. *Nutr and Cancer* 15:269-270
142. Omaye ST, Turnbull JD (1980) Effect of ascorbic acid on heme metabolism in hepatic microsomes. *Life Sci* 27:441-449
143. Park HC, Kimler BF (1991) Growth modulation of human leukemic and preleukemic progenitor cells by L-ascorbic acid. *Nutr and Cancer* 15:264-26
144. Pelle E, Muizzuddin N, Mammone T, Marenus K, Maes D (1999) Protection against endogenous and UVB-induced oxidative damage in stratum corneum lipids by antioxidant-containing cosmetic formulation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 15:115-119
145. Peterson FJ, Holloway DE, Duquette PH, Rivers JM (1983) Dietary ascorbic acid and hepatic mixed funktion oxidase activity in the guinea pig. *Biochem. Pharmacol* 32:91-96
146. Perchellet JP, Perchellet EM (1989) Antioxidants and multistage carcinogenesis in mouse skin. *Free Radic Biol Med* 7:377-408
147. Pharmazeutische Stoffliste, Arzneibüro der Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände (Hrsg.), 6 Aufl. Werbe- und Vertriebsgesellschaft Deutscher Apotheker, Frankfurt
148. Ponc M, Weerheim A, Kempenaar J, Mulder A, Gooris GS, Bouwstra J, Mommaas AM (1997) The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C. *J Invest Dermatol* 109(3):348-355
149. Postaire E, Regnault C, Simonet L, Rousset G, Bejot M (1995) Increase of singlet oxygen protection of erythrocytes by vitamin E, vitamin C and  $\beta$ -carotene intakes. *Biochem Mol Biol Int* 35:371-374
150. Prenner BM, Stevens JJ (1976) Anaphylaxis after ingestion of sodium bisulfite. *Ann Allergy* 37:180-182
151. Przybilla B, Eberlein-König B, Bergner T (1994) Risiken erhöhter UV-B-Strahlung für den Menschen. Aus: Rundgespräche der Kommission für Ökologie, Bd.8 „Klimaforschung in Bayern“. Verlag Dr. Friedrich Pfeil S197-206
152. Przybilla B, Georgii A, Bergner T, Ring J (1990) Demonstration of quinolone phototoxicity in vitro. *Dermatologica* 181: 98-103
153. Przybilla B, Ring J (1987) Sulfite-Überempfindlichkeit. *Der Hautarzt* 38:445-448
154. Przybilla B, Schwab-Przybilla U, Ruzicka T, Ring J (1987) Phototoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs demonstrated in vitro by a photo-basophil-histamine-release test. *Photodermatol* 4:73-78

155. Raab O (1900) Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusoria. *Z Biol* 39:524
156. Rautenberg A, Jung EG (1993) UV-Belastung, Hautkrebs und Ozonabnahme. *Therapeutische Umschau* 12:804-807
157. Rebouche CJ (1991) Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. *Am J Clin Nutr* 54:1147S-1152S
158. Richardson D (1982) Relationship between digital artery and nailfold capillary flow velocities in human skin. *Mikrocirculation* 2:283-296
159. Ring J, Przybilla B, Schwab U, Steger O (1987) Klinisches Spektrum der Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Sulfite: Fallberichte und Übersicht. *Allergologie* 10:100-106
160. Riva C, Ross B, Benedek GB (1972) Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. *Invest Ophthalmol* 11:936-944
161. Robertson FM, Beavis AJ, Oberyzyzn TM, O'Connell SM, Dokidos A, Laskin DL, Laskin JD, Reiners JJ Jr. (1990) Production of hydrogen peroxide by murine epidermal keratinocytes following treatment with the tumor promotor 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 50:6062-6067
162. Robertson JM, Donner AP, Trevithick JR (1989) Vitamin C intake and risk of cataract in humans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 570:372-382
163. Salerud EG, Tenland T, Nilson GE, Öberg PÅ (1983) Rhythmical variations in human skin blood flow. *Int J Microcirc Clin Exp* 2:91-102
164. Salpeter MM, Liu E, Wootton JAM, Minor RR (1991) Ascorbic acid and acetylcholin receptor expression. *Nutr and Cancer* 15:258
165. Sams WM Jr, Epstein JH (1967) The experimental production of drug phototoxicity in guinea pigs. I. Using sunlight. *J Invest Dermatol* 48:89-94
166. Schectman G, Byrd JC, Hoffmann R (1991) Ascorbic acid requirements for smokers: analysis of a population survey. *Am J Clin Nutr* 53:1466-1470
167. Schüep W, Rettenmaier R (1994) Analysis of Vitamin E homologs in plasma and tissue: high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* 234: 294-302
168. Schulz KH, Wiskemann A, Wulf K (1956) Klinische und experimentelle Untersuchungen über die photodynamische Wirksamkeit von Phenothiazinderivaten, insbesondere von Megaphen. *Arch Klin Exp Dermatol* 202:285-298
169. Schwab U, Przybilla B, Ring J (1985) Überempfindlichkeitsreaktionen auf Sulfit. *Zentralbl Haut Geschlechtskr* 150:637

170. Schwartz HJ (1983) Sensitivity to ingested metabisulfite: variations and clinical presentation. *J Allergy Clin Immunol* 71:487-489
171. Schwartz HJ, Sher TH (1985) Bisulfite sensitivity manifesting as allergy to local dental anesthesia. *J Allergy Clin Immunol* 75:525-527
172. Scott CG, Cohen N, Riggio PP, Weber G (1982) Gaschromatographic assay of the diastereomeric composition of all-rac-alpha-tocopheryl acetat. *Lipids* 17:97-101
173. Settipane GA (1984) Adverse reactions to sulfites in drugs and foods. *J Am Acad Dermatol* 10:1077-1080
174. Shapiro IM, Leboy PS, Tokuoka T, Forbes E, DeBolt K, Adams SL, Pacifici M (1991) Ascorbic acid regulates multiple metabolic activities of cartilage cells. *Am J Clin Nutr* 54:1209S-1213S
175. Shimpo KT, Nagatsu T, Yamada K, Sato T, Niimi M, Shamoto M, Takeuchi T, Umezawa H, Fujita K (1991) Ascorbic acid and adriamycin toxicity. *Am J Clin Nutr* 54:1298S-1301S
176. Simon RA (1984) Adverse reactions to drug additives. *J Allergy Clin Immunol* 74:623-630
177. Spikes JD (1977) Photosensitization. In: *The science of photobiology*. New York: Plenum Press. S. 87-110
178. Spikes JD (1982) Photodynamic reaktionen in photomedicine. In: Reagan J. Parrish JA. Editors. *The science of photomedicine*. New York: Plenum Press.S.113-144
179. Stadtman ER (1992) Protein oxidation and aging. *Science* 257:1220-1224
180. Steenvoorden DP, van Henegouwen GM (1997) The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J Photochem Photobiol* 41(1-2):1-10
181. Stern MD (1975) In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature* 254:56-58
182. Stevenson DD, Simon RA (1981) Sensitivity to ingested metabisulfites in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 68:26-32
183. Stevenson DD, Simon RA (1984) Sulfites and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 74:469-472
184. Stewart MS, Cameron GS, Pence BC (1996) Antioxidant nutrients protect against UVB-induced oxidative damage to DNA of mouse keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* 106(5):1086-1089
185. Tenland T (1982) On Laser Doppler flowmetrie. Dissertation, Linköping University

186. Tenland T, Salerud EG, Nilsson GE, Öberg PÅ (1983) Spatial and temporal variations in human skin blood flow. *Int J Microcirc Clin Exp* 2:81-90
187. Thune A, Jansen C, Wennersten G, Rysted I, Brodthagen H, Mc Fadden N (1988) The Scandinavian multicenter photopatch study 1980-1985: final report. *Photodermatol* 5:261-269
188. Toback AC, Anders JE (1986) Phototoxicity from systemic agents. *Dermatol Clinics* 4:223-230
189. Tooke JE, Östergren J, Fagrell B (1983) Synchronous assesment of human skin microcirculation by Laser-Doppler flowmetry and dynamic capillaroscopy. *Int J Microcirc Clin Exp* 2:277-284
190. Twarog FJ, Leung DYM (1982) Anaphylaxis to a component of isoetharine (sodium bisulfite). *JAMA* 248:2030-2031
191. Ulberth F, Reich H, Kneifel W (1992) Zur Analytik von Tocopherolen - Ein Methodenvergleich zwischen HPCL und GC. *Fat Sci Technol* 94:51-54
192. Vargas F, Rivas C, Canudas N (1993) Formation of a perbenzoic acid derivative in the photodegradation of fenofibrate: phototoxity studies on erythrocytes. *J Pharm Sci.* 82(6):590-591
193. Vargas F. Canudas N, Miranda MA, Bosca F (1993) Photodegradation and in vitro phototoxicity of fenofibrate, a photosensitizing anti-hyperlipoproteinemic drug. *Photochem Photobiol* 58:471-476
194. Veris (1992) Vitamin E Übersichtsartikel: Vitamin E: Biologische Wirkungen auf die Haut. *Jahrgang* 2, 4:1-8
195. Wallat S (1986) Zur biologischen Wirksamkeit von Vitamin E. *Fette, Seifen, Anstrichmittel.* 88:485-490
196. Warwick L, Morison; with a foreword by Thomas B. Fitzpatrick (1991) *Phototherapy and Photochemotherapy of Skin Disease/ 2<sup>nd</sup> ed.* by Raven Press Ltd.S11
197. Weiser H, Erlemann GA (1982) Beschleunigte Heilung oberflächlicher Wunden durch Panthenol und Zinkoxid: *Parfüm. Kosmet.* 58:425-428
198. Werninghaus K, Meydani M, Bhawan J, Margolis R, Blumberg JB, Gilchrest BA (1994) Evaluation of the photoprotective effect of oral vitamin E supplementation. *Arch Dermatol* 130(10):1257-1261
199. Willis I, Kligman AM (1968) The mechanism of photoallergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 51:378-384
200. Yang WH, Purchase EC, Rivington RN (1986) Positive skin tests and Prausnitz-Küstner reactions in metabisulfite-sensitive subjects. *J Allergy Clin Immunol* 78:443-449

201. Zipfel W (1983) Lebensmittelrecht. Beck, München

## **7. Danksagung**

Herrn Professor Dr. Dr. h. c. G. Plewig danke ich für die Möglichkeit, an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München die Promotionsarbeit durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. B. Przybilla für die Überlassung des Themas sowie für das immerwährende Interesse am Fortschritt der Arbeit, für die anregenden Diskussionen und sein tatkräftiges Engagement.

Frau Dr. med. S. Werfel danke ich für ihre freundliche Unterstützung und die interessanten Anregungen.

Bei Frau C. Kraus möchte ich mich für die freundliche und hilfsbereite Unterstützung im Rahmen der Labortätigkeiten bedanken.

Abschließend danke ich auch meinem Großvater Georg Lanz, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit an meinem eigenen Computer fertigzustellen.

## 8. Lebenslauf

Name:	Neff
Vorname:	Sabine Maria
Geburtsdatum:	25.01.1971
Geburtsort:	Weiler im Allgäu
1977-1981	Grundschule Simmerberg im Allgäu
1981-1987	Gymnasium Lindenberg im Allgäu
1987-1990	Bodenseegymnasium Lindau
1991-1992	Ludwig-Maximilians-Universität München, Studiengang Zahnmedizin
1992-1998	Ludwig-Maximilians-Universität München, Studiengang Humanmedizin
März 1995	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 1997	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 1998	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 1998-Januar 1999	Ärztin im Praktikum an der Asklepios Nordseeklinik/Westerland/Sylt-Abteilung Dermatologie
Februar 1999-April 2000	Ärztin im Praktikum in der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universitätsklinik Regensburg
Mai 2000-Dezember 2000	Assistenzärztin an der Asklepios Nordseeklinik/Westerland/Sylt-Abteilung Dermatologie
Januar 2001-Juli 2002	Assistenzärztin in der hautfachärztlichen Gemeinschaftspraxis Dr. med. Th. Hebel, Dr. med G. Opel, Dr. med. G. Schuhmachers Hautärzte am Stachus/Karlsplatz 4/München
Seit August 2002	Assistenzärztin in der hautfachärztlichen Praxis Dr. med. U. Speer/Georgstraße 15/Ravensburg