

Aus der Klinik für Kardiologie, Angiologie und Internistische Intensivmedizin

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg / Saar

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Böhm

**Untersuchungen zur in vivo und in vitro Fototoxizität
von Hydrochlorothiazid**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von

Felix Götzinger

geboren am 16.09.1996

in Saarlouis

Tag des Kolloquiums:	26.08.2024
Dekan:	Prof. Dr. Michael Menger
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Felix Mahfoud
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Vogt
3. Berichterstatter	Prof. Dr. Markus Hoth

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung und Summary	6
1.1 Zusammenfassung.....	6
1.2 Summary.....	8
2. Einleitung	11
2.1 Bluthochdruck.....	11
2.2 Hautkrebs	18
2.3 Hydrochlorothiazid.....	22
2.4 Fotosensibilität und Fototoxizität.....	24
2.5 Fragestellung der Arbeit	29
3. Material und Methoden	31
3.1 Klinischer Teil – Die HCTOX-Studie	31
3.2 Präklinischer Teil – Untersuchungen zum Einfluss von HCT und UVB-Strahlung auf HaCaT-Zellen	41
4. Ergebnisse	59
4.1 In vivo Ergebnisse	59
4.2 In vitro Ergebnisse.....	65
5. Diskussion	70
6. Literaturverzeichnis.....	80
7. Danksagung.....	108
8. Publikationen und Kongressbeiträge	109
9. Abbildungsverzeichnis	112
10. Tabellenverzeichnis.....	113
11. Lebenslauf.....	115
12. Eidesstattliche Erklärung.....	117

Abkürzungsverzeichnis

25(OH)D.....	25-Hydroxyvitamin D
ACE.....	Angiotensin-Converting-Enzym
ALT.....	Alanin-Transferase
ANOVA.....	One Way Analysis Of Variance
AST.....	Aspartat-Transferase
AT ₁	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp 1
BfArM.....	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
cDNA.....	Copy Desoxyribonukleinsäure
CKD.....	Chronische Niereninsuffizienz
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT-Wert.....	Cycle Threshold Wert
CV.....	Cardiovascular
DBP.....	Diastolischer Blutdruck
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
DTT.....	Dithiothreitol
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFR.....	Geschätzte Glomeruläre Filtrationsrate
EMA.....	Europäische Arzneimittel-Agentur
ESC.....	European Society of Cardiology
ESH.....	European Society of Hypertension
EZV.....	Extrazellulärvolumen
FBS.....	Fetales Kälberserum
GAPDH.....	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HCT.....	Hydrochlorothiazid
HFrEF.....	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
IQR.....	Interquartilsabstand
LDL.....	Low Density Lipoprotein
MED.....	Minimale Erythemdosis
mRNA.....	Messenger Ribonukleinsäure
NCC.....	Na ⁺ -Cl ⁻ -Kotransporters
NSAID.....	Non Steroidal Antiinflammatory Drugs
OBP.....	Office Blood Pressure
PMSF.....	Phenylmethylsulfonylfluorid

RAAS	<i>Renin-Angiotensin-Aldosteron-System</i>
RRR.....	<i>Relative Risikoreduktion</i>
rt-PCR.....	<i>Realtime Polymerasekettenreaktion</i>
SBP	<i>Systolischer Blutdruck</i>
SD	<i>Standardabweichung</i>
SDS.....	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
UHPLC-HRMS/MS	<i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry</i>
UV	<i>Ultraviolett</i>
UVA	<i>Ultraviolettes Licht Typ A</i>
UVB	<i>Ultraviolettes Licht Typ B</i>

1. ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY

1.1 ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung

Pharmakoepidemiologische Studien assoziierten die langjährige Einnahme von Hydrochlorothiazid (HCT) mit einer erhöhten Auftretenswahrscheinlichkeit von Hautkrebs (vor allem nicht-melanotischem Hautkrebs). Dies hatte zur Folge, dass die Anzahl an Verschreibungen von HCT signifikant zurückgingen, ohne, dass es einen ausreichenden Ersatz durch andere, ähnlich wirksame Substanzen gegeben hatte. Da HCT eines der am häufigsten verordneten Antihypertensiva ist und das häufigste in Fixkombinationen vorkommende Diuretikum ist, hat der Rückgang mutmaßlich zu einer vorübergehenden Verschlechterung der Blutdruckkontrolle vieler Patienten mit arterieller Hypertonie und Herzinsuffizienz geführt. Jedoch beruhen die Assoziationen auf epidemiologischen Analysen und randomisierte, kontrollierte Studien fehlen bisher. Ob HCT möglicherweise über fotosensibilisierende und fototoxische Effekte Hautkrebs verursacht, ist gegenwärtig unzureichend verstanden. Daher untersuchten wir erstmalig in einem randomisierten und kontrollierten Design die fotosensibilisierenden und fototoxischen Eigenschaften von HCT bei gesunden Probanden. Um die möglichen pathophysiologischen Prozesse genauer zu untersuchen, wurden zudem eine Reihe von Experimenten durchgeführt, in denen humane Keratinozyten mit HCT und ultraviolettem Licht (UV-Licht) behandelt wurden.

Material und Methoden

Insgesamt 30 freiwillige gesunde Probanden wurden in die HCTox Studie eingeschlossen und in einem Verhältnis von 2:1 entweder in die HCT- oder die Placebogruppe randomisiert. Probanden nahmen entweder 25 mg HCT täglich für 15 Tage (375 mg kumulativ) oder ein Placebo ein. Die Lichtempfindlichkeit wurde mittels Lichttreppe bestimmt, der Blutdruck seriell gemessen, Serum Vitamin D-Spiegel und andere Laborparameter erhoben und mittels toxikologischer Analysen die Adhärenz der Probanden gemessen. Ferner wurde die Ausscheidung von Pyrimidindimeren, Abbauprodukten der Nukleotidexzisionsreparatur, im Urin der Probanden als Folge von Ganzkörperbestrahlungen bestimmt. Zusätzlich wurden in präklinischen Experimenten humane Keratinozyten mit HCT behandelt und mit ultraviolettem Licht Typ B (UVB) bestrahlt. Die Zellen wurden dann auf die Expression von proinflammatorischen Markern (IL-6, TNF α), apoptotischen Markern (Bax, Bak), Mediatoren reaktiver Sauerstoffspezies (SOD-1, Catalase) und onkogener Proteine (p53, phospho-p53) mittels Western Blot oder *real-time* Polymerasekettenreaktion (rt-PCR) untersucht.

Ergebnisse

Alle Teilnehmer waren adhärenz zur Studienmedikation, was mittels toxikologischer Analysen von Blut, Urin und Speichel nachgewiesen werden konnte. Es kam nicht zu Änderungen der Fotosensibilität (minimale Erythemdosis - MED) der Haut der Probanden im Wellenlängenbereich von ultraviolettem Licht Typ A (UVA) oder UVB (MED-UVA: HCT $\Delta=0,0$ J/cm² vs. Placebo $\Delta=0,0$ J/cm²; Intergruppenvergleich $p=0,99$; MED-UVB: HCT $\Delta=0,0$ J/cm² vs. Placebo $\Delta=0,2$ J/cm²; Intergruppenvergleich $p=0,06$). Es konnten keine Pyrimidindimere im Urin der Probanden beider Gruppen nachgewiesen werden. Der systolische Blutdruck (SBP) nahm in der HCT und der Placebo-Gruppe signifikant ab (HCT $\Delta=-5,2$ mmHg vs. Placebo $\Delta=-5,4$ mmHg), allerdings war der Unterschied zwischen den Gruppen nicht signifikant (Intergruppenvergleich $p=0,94$). Der diastolische Blutdruck (DBP) nahm ebenfalls in beiden Gruppen ab. In der HCT-Gruppe kam es zu einer signifikanten Senkung des DBP, in der Placebo-Gruppe nicht (HCT $\Delta=-4,3$ mmHg vs. Placebo $\Delta=-1,9$ mmHg). Der Unterschied zwischen den Gruppen war ebenfalls nicht signifikant (Intergruppenvergleich $p=0,34$). Die Serum Vitamin D-Spiegel stiegen in beiden Gruppen an (HCT $\Delta=3,1$ ng/ml vs. Placebo $\Delta=1,2$ ng/ml; Intergruppenvergleich $p=0,52$).

Die *in vitro* Behandlung der humanen Keratinozyten mit HCT führte nicht zu einer Änderung der Expression von p53, phospho-p53 (pp53), Bax, Bak, SOD-1 und Catalase. Vorversuche zeigten, dass eine alleinige UVB-Bestrahlung in HaCaT-Zellen zur vermehrten mRNA Expression von inflammatorischen Markergenen (IL-6, TNF α) führte. Eine Kombination aus einer HCT-Therapie und einer UVB-Bestrahlung resultierte nicht in einer potenzierten Proteinexpression antioxidativer (SOD-1, SOD-2, Catalase) und onkogener Marker-Proteine (p53, pp53, SOD-1, Catalase, Bax, Bak).

Fazit

In dieser klinischen Studie und den präklinischen Experimenten war eine Kombination aus HCT und UVB-Bestrahlung nicht mit fototoxischen oder fotosensibilisierenden Effekten in gesunden Probanden assoziiert. Es konnten keine Änderungen der Fotosensibilität im UVA- oder UVB-Bereich und keine DNA-Schäden nachgewiesen werden. Weitere Studien mit größeren Fallzahlen und längerer Nachbeobachtung sind notwendig, um die kutane Sicherheit von HCT zu evaluieren.

1.2 SUMMARY

Introduction

Pharmacoepidemiologic studies associated the use of the diuretic hydrochlorothiazide (HCT) with an increased incidence of skin cancer, especially non-melanoma skin cancer, resulting in a decrease of HCT prescriptions, which in turn possibly lead to worsening of blood pressure control in a relevant proportion of patients. Whether HCT causes skin cancer remains elusive. Hence, we aimed to examine the photosensitive and phototoxic potential of HCT *in vivo* in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. To further explore the pathophysiologic mechanisms of carcinogenesis and phototoxicity caused by HCT *in vitro*, we conducted a series of laboratory experiments.

Methods

Thirty healthy, normotensive, adult volunteers were randomized in a 2:1 ratio to either HCT 25 mg daily or placebo once daily for 15 days. The skin photosensitivity by phototesting, office blood pressure, serum 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) status and urinary excretion of pyrimidine dimers by ultra-high-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) following whole-body irradiation were assessed.

To further assess the pathophysiologic mechanisms of possibly HCT induced photosensitivity, human keratinocytes (HaCaT) were incubated with HCT for 1 hour, and then irradiated with UVB. RT-PCR and western blots were performed to analyze proteins reducing reactive oxygen species (SOD-1, Catalase), apoptosis (Bax, Bak), inflammation (Il-6, TNF α), and carcinogenesis (p53, pp53).

Results

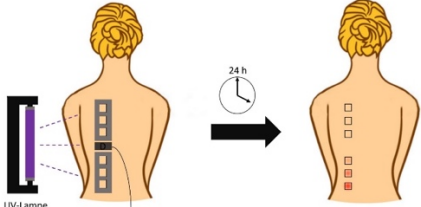
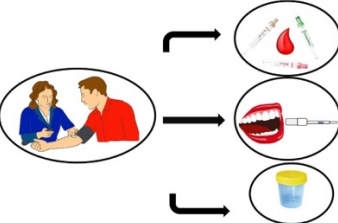
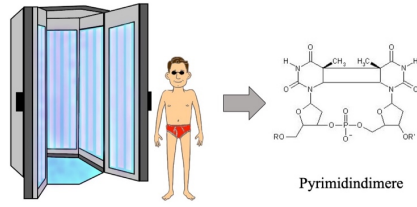
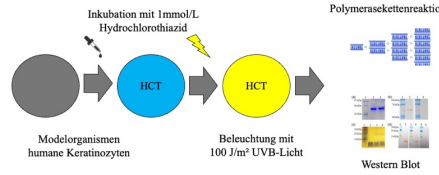
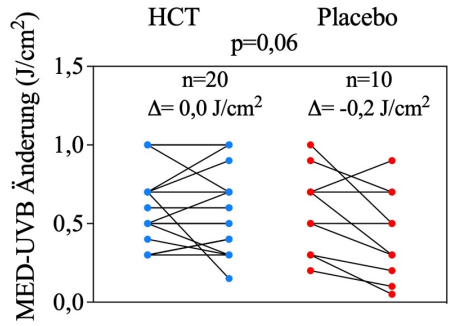
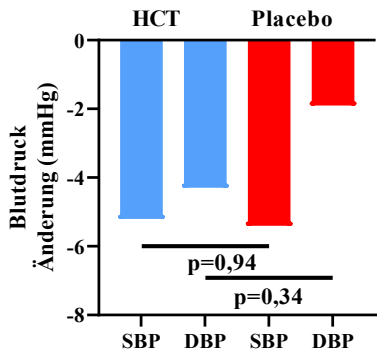
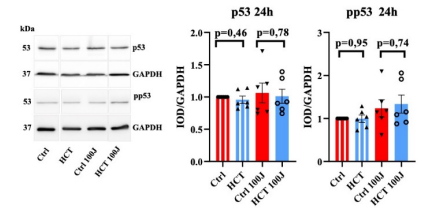
All 30 participants were adherent to the protocol, as confirmed by UHPLC-HRMS/MS analysis of oral fluid, urine, serum, and plasma. Skin photosensitivity (minimal erythema dose - MED) to exposure to UVA did not change in both groups. MED-UVB did not change in the HCT-group, however MED-UVB decreased numerically in the placebo group, albeit intergroup differences showed no statistical significance (MED-UVB: HCT $\Delta=0,0$ J/cm² vs. placebo $\Delta=0,2$ J/cm²; p=0,06). No pyrimidine dimers were detected in either group. SBP decreased in both groups (HCT $\Delta=-5,2$ mmHg vs. placebo $\Delta=-5,4$ mmHg; intergroup difference p=0.94), as did DBP (HCT $\Delta=-4,3$ mmHg vs. placebo $\Delta=-1,9$ mmHg; intergroup difference p=0,34). Serum

25(OH)D increased in both groups (HCT $\Delta=3,1$ ng/ml vs. placebo $\Delta=1,2$ ng/ml; intergroup difference $p=0,52$). No adverse events related to the study medication were reported.

In vitro, HCT and DMSO alone did not increase the expression of inflammatory proteins (IL-6, TNF α) or tumor suppressor proteins (p53, pp53). Moreover, HCT in combination with a high intensity burst of UVB irradiation did not cause increased expression of inflammatory proteins and reactive oxygen species.

Conclusions

HCT did not appear to be associated with increased photosensitivity for UVA or UVB irradiation in this small study of healthy volunteers compared with placebo. No relevant DNA-damages as measured by UHPLC-HRMS/MS could be detected in either group. HCT alone was not associated with increased inflammation, formation of proteins mediating reactive oxygen species, or proteins mediating carcinogenesis in human keratinocytes. The combination of a UVB burst and HCT, was not associated with an increase in inflammatory markers. Future studies with larger sample size and longer follow-up duration are required to finally assess the cutaneous safety of HCT.

Die HCTox-Studie (NCT04654312)			
Lichttreppe	Blutdruckmessung	Pyrimidindimere im Urin	In vitro Experimente
 <p>UV-Lampe</p> <p>24 h</p>		 <p>Pyrimidindimere</p>	 <p>Inkubation mit 1mmol/L Hydrochlorothiazid</p> <p>Modelorganismen humane Keratinozyten</p> <p>HCT</p> <p>Beleuchtung mit 100 J/m² UVB-Licht</p> <p>Polymeraskettenreaktion</p> <p>Western Blot</p>
 <p>HCT n=20 $\Delta=0,0 \text{ J/cm}^2$</p> <p>Placebo n=10 $\Delta=-0,2 \text{ J/cm}^2$</p> <p>$p=0,06$</p> <p>MED-UVB Änderung (J/cm²)</p>	 <p>HCT Placebo</p> <p>Blutdruck Änderung (mmHg)</p> <p>SBP DBP SBP DBP</p> <p>$p=0,94$</p> <p>$p=0,34$</p>	<div style="border: 2px solid black; padding: 10px; text-align: center;"> <p>Keine Pyrimidindimere nachweisbar</p> </div>	 <p>p53 24h</p> <p>pp53 24h</p> <p>IOD:GAPDH</p> <p>Ctrl HCT Ctrl 100 HCT 100</p> <p>$p=0,46$ $p=0,78$</p> <p>$p=0,95$ $p=0,74$</p>
Keine Änderungen der Fotosensibilität	Blutdrucksenkung	Keine Fototoxizität in vivo	Keine Fototoxizität in vitro

Grafisches Abstract: Die HCTox-Studie testete die fototoxischen und fotosensibilisierenden Eigenschaften von Hydrochlorothiazid in vivo (mittels Lichttreppeuntersuchung und Pyrimidindimeren im Urin) und in vitro (Expression von Onkoproteinen, inflammatorischen Markergenen und anderen). HCT war in vivo (bei gesunden Probanden) und in vitro nicht mit fotosensibilisierenden oder fototoxischen Prozessen assoziiert. (Ctrl – Kontrollgruppe, DBP – diastolischer Blutdruck, HCT – Hydrochlorothiazid, SBP – systolischer Blutdruck)

2. EINLEITUNG

2.1 BLUTHOCHDRUCK

Allgemeines

Der menschliche Blutdruck wird definiert durch den systolischen Blutdruck (Blutdruck während der Auswurfphase des Herzens – englisch *systolic blood pressure* - SBP) und den diastolischen Blutdruck (Blutdruck während der Entspannungsphase des Herzens – englisch *diastolic blood pressure* - DBP). In Analogie zum Ohm'schen Gesetz der Physik beschreibt der Blutdruck die treibende Kraft, die notwendig ist, um das Herzzeitvolumen gegen den systemvaskulären Widerstand zu bewegen und kann annäherungsweise über folgende Formel beschrieben werden [86]:

$$\text{Blutdruck} = \text{systemvaskulärer Widerstand} \times \text{Herzzeitvolumen}$$

Epidemiologie und Ätiologie

Ausgehend von Praxismessungen wird angenommen, dass derzeit etwa 1,2 Milliarden Menschen weltweit an Bluthochdruck erkrankt sind [5,123]. In der erwachsenen Bevölkerung liegt die Prävalenz des Bluthochdrucks global betrachtet bei circa 30-40% (die globale altersadjustierte Prävalenz liegt bei 24% bei Männern und 20% bei Frauen) [122]. Dabei steigt die Prävalenz mit zunehmendem Alter an und liegt in der Altersgruppe >60 Jahren bei >60% [16]. In Zusammenhang mit einer alternden Bevölkerung, einer Abnahme der körperlichen Aktivität und einer Zunahme des Körpergewichts in der Bevölkerung, wird angenommen, dass die Prävalenz des Bluthochdrucks weiter ansteigen wird und im Jahr 2025 nahezu 1,5 Milliarden Menschen weltweit an Bluthochdruck erkrankt sein werden [52].

Bluthochdruck ist damit der häufigste kardiovaskuläre Risikofaktor und zudem die weltweit führende Ursache für einen vorzeitigen Tod [79]. Nahezu 10 Millionen Tode und etwa 200 Millionen *disability-adjusted life-years* (behinderungskorrigierte Lebensjahre) wurden durch Bluthochdruck im Jahre 2015 verursacht. Die drei häufigsten fatalen Konsequenzen eines zu hohen Blutdrucks sind ischämische Herzerkrankungen (4,9 Millionen Fälle jährlich), hämorrhagische Schlaganfälle (2,0 Millionen Fälle jährlich) und ischämische Schlaganfälle (1,5 Millionen Fälle jährlich) [33,83]. Zusätzlich bestehen enge Zusammenhänge zwischen der Höhe des Blutdrucks und der Auftretenswahrscheinlichkeit vieler kardiovaskulärer Erkrankungen, wie Vorhofflimmern, Herzinfarkten, peripheren arteriellen

Verschlusslerkrankungen, plötzlichen Herztoden, sowie renovaskulärer Erkrankungen wie der renalen Dysfunktion und zerebrovaskulärer Erkrankungen wie kognitive Einschränkungen und Demenzen [36,65,66,100].

Ätiologisch wird die essenzielle oder primäre Hypertonie, die den Großteil der Hypertoniefälle ausmacht, von der sekundären Hypertonie, die in 5-15% der Fälle auftritt, unterschieden [99]. Die essenzielle Hypertonie ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung und somit nicht auf eine einzelne organische Störung zurückzuführen [42]. Die sekundäre Hypertonie dagegen ist Ausdruck einer organischen Primärerkrankung [99]. Neben der Nierenarterienstenose und dem obstruktiven Schlafapnoesyndrom sind insbesondere endokrinologische Erkrankungen Ursachen für eine sekundäre Hypertonie, so zum Beispiel das Phäochromozytom, der Hyperaldosteronismus oder der Hypercortisolismus [118].

Diagnostik

Ausgehend von den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie und der Europäischen Gesellschaft für Hypertonie (*European Society of Cardiology – ESC* und *European Society of Hypertension - ESH*) liegt ab einem Praxisblutdruck (englisch *office blood pressure - OBP*) von 140 mmHg systolisch und/oder 90 mmHg diastolisch, gemessen nach einer ausreichenden Ruhephase zu mindestens zwei unterschiedlichen Messzeitpunkten, ein Bluthochdruck vor [118]. Die genauen Grenzwerte, die zur Diagnose einer arteriellen Hypertonie führen, sind abhängig von der verwendeten Messmethode und unterscheiden sich leicht (Tabelle 1). Dabei ist zu beachten, dass kontinuierliche Zusammenhänge zwischen der Blutdruckhöhe und kardialen, renalen und zerebralen Erkrankungen bestehen. Die Grenzwerte markieren Punkte, an denen eine Therapieeinleitung empfohlen wird [30,65].

Tabelle 1: Diagnostische Grenzwerte der arteriellen Hypertonie in Abhängigkeit der Messmethode [118]

Messmethode	SBP (mmHg)		DBP (mmHg)
Praxisblutdruckmessung	>140	und/oder	>90
Ambulante Blutdruckmessung			
- 24 Stunden	>130	und/oder	>80
- Tagesintervall	>135	und/oder	>85
- Nachtintervall	>130	und/oder	>70
Häusliche Blutdruckmessung	>135	und/oder	>85

(DBP - diastolischer Blutdruck, SBP - systolischer Blutdruck)

In Abhängigkeit der Höhe des Praxisblutdrucks, kann die arterielle Hypertonie weiter eingestuft werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Graduierung der arteriellen Hypertonie in Abhängigkeit des Praxisblutdrucks [118]

	SBP (mmHg)		DBP (mmHg)
Optimal	<120	und/oder	<80
Normal	120–129	und/oder	80-84
Hochnormal	130-139	und/oder	85-90
Hypertonie Grad I	140-159	und/oder	90-99
Hypertonie Grad II	160-179	und/oder	100-109
Hypertonie Grad III	>180	und/oder	>110
Isoliert Systolische Hypertonie	>140	und	<90

(DBP – diastolischer Blutdruck, SBP – systolischer Blutdruck)

Mehrfache Praxisblutdruckmessungen sind dabei ausreichend zur Diagnosestellung [118]. Der Blutdruck sollte an beiden Oberarmen mit einer Manschette, deren Breite an den Oberarmumfang angepasst ist, gemessen werden. Dies sollte nach einer ausreichenden Ruhephase von 5-10 Minuten im Sitzen erfolgen [118]. Der jeweils am höchsten gemessene SBP und DBP wird zur Diagnosestellung verwendet. Der Arm, an dem der höchste Blutdruck gemessen wurde, dient in der Folge als Referenz. Große Seitendifferenzen >20 mmHg sind abklärungsbedürftig und können auf strukturelle Erkrankungen, wie eine Aortendissektion oder ein *subclavian-steal-syndrome* (Subclaviaanzapfsyndrom) hinweisen [17]. Hinsichtlich der Manschettenart können automatisierte von halb-automatisierten und nicht-automatisierten

Manschetten unterschieden werden [105]. Die Reproduzierbarkeit der Blutdruckmessung lässt sich durch Verwendung automatisierter Blutdruckmanschetten steigern [118].

Auch durch eine mehrfache häusliche Blutdruckmessung oder eine ambulante 24 Stunden Langzeitblutdruckmessung kann eine arterielle Hypertonie festgestellt werden [18,34].

Es ist ratsam, eine Praxisblutdruckmessung mit einer der anderen Modalitäten zu kombinieren, um Rückschlüsse auf die zirkadiane Rhythmik des Blutdrucks treffen zu können und um besondere Phänotypen, wie einen Weißkittelhypertonus (Bluthochdruck nur bei Praxismessungen), oder eine maskierte Hypertonie (Bluthochdruck nur bei häuslichen Messungen) ausschließen zu können [48].

Therapie

Die optimale Einstellung des Blutdrucks führt zur Reduktion des kardiovaskulären (CV) Risikos [79]. Es wird angenommen, dass eine Senkung des SBP um 10 mmHg oder eine Senkung des DBP um 5 mmHg die Sterblichkeit um 10-15% (relative Risikoreduktion RRR) und die Auftretenswahrscheinlichkeit von ischämischen Schlaganfällen um 35% (RRR), koronaren Events um 20% (RRR) und Herzversagen um 40% (RRR) senkt [30,110].

In Abhängigkeit der Höhe des Blutdrucks und des kardiovaskulären Risikos wird die Therapie der arteriellen Hypertonie den Europäischen Leitlinienempfehlungen folgend unterschiedlich eingeleitet (Tabelle 3) [118].

Tabelle 3: Therapiestrategien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie in Abhängigkeit des CV-Risikos und der Schwere der arteriellen Hypertonie [118]

Patientenpopulation	Therapiestrategie
Hypertonie Grad I mit niedrigem CV-Risiko	Lebensstilmodifikation (+ medikamentöse Therapie, falls Lebensstilmodifikation innerhalb von 3 Monaten nicht zu einer ausreichenden Senkung des Blutdrucks führt)
Hypertonie Grad I mit hohem CV-Risiko	Lebensstilmodifikation + medikamentöse Therapie
Hypertonie Grad II oder III unabhängig vom CV-Risiko	Lebensstilmodifikation + medikamentöse Therapie

(CV-Risiko – Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen)

Jedem Patienten sollte bei der Diagnosestellung einer arteriellen Hypertonie zu einer Lebensstiländerung hin zu mehr Bewegung, einer gesünderen Ernährung und dem Verzicht auf Alkohol und Inhalationsrauchen jeder Art geraten werden [118]. Zur Lebensstilmodifikation gehören dabei eine Reduktion des Salz- und insbesondere Natriumkonsums, ebenso eine Reduktion der Alkoholfuhr und die Aufnahme von mehr Obst und Gemüse. Das Körpergewicht sollte optimiert und regelmäßige körperliche Aktivität angestrebt werden. Durch diese Maßnahmen kann in der Regel eine Senkung des Blutdrucks erreicht werden (Tabelle 4) [105].

Tabelle 4: Maßnahmen der Lebensstiländerung und dadurch hervorgerufene potenzielle Senkungen des Blutdrucks

Lebensstilmodifikation	Potenzielle Senkung des SBP/DBP in mmHg
- Salzrestriktion <5 g/Tag	- 4,2/2,1 [44]
- Alkoholrestriktion	- 1,2/0,7 [22]
- Reduktion des Körpergewichts	- 4,4/3,6 [82]
- Ausdauertraining	- 8,3/5,2 [20]

(DBP – diastolischer Blutdruck, SBP – systolischer Blutdruck)

Bei jungen Patienten mit niedrigem CV-Risiko wird, den Leitlinien der ESC folgend bei Diagnosestellung einer arteriellen Hypertonie Grad I, zunächst eine Lebensstilmodifikation eingeleitet [27,69,118]. Nach drei Monaten der Lebensstiländerung wird eine erneute Evaluation des Blutdrucks und CV-Risikos durchgeführt und bei ausbleibender Besserung eine medikamentöse Therapie eingeleitet.

Bei Patienten, bei denen eine arterielle Hypertonie Grad II oder höher diagnostiziert wird, erfolgt unabhängig vom CV-Risiko eine medikamentöse Therapie in Kombination mit einer Lebensstiländerung [118]. Die medikamentöse Therapie erfolgt leitliniengerecht zunächst durch eine Kombination aus einem Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer (ACE-Hemmer) oder einem Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp 1-Antagonisten (AT₁-Antagonist) mit einem Diuretikum oder einem Calciumantagonisten. Diese Kombinationstherapie sollte dabei idealerweise in einem Single-Pill-Konzept durchgeführt werden, also mit nur einer Tablette, die beide Wirkstoffe enthält. Dies erleichtert die Therapieadhärenz und trägt so zu einer besseren Blutdruckkontrolle bei. Gelingt auch in dieser Doppel-Kombination keine ausreichende Blutdruckkontrolle, wird die Therapie zunächst um einen weiteren Wirkstoff erweitert und somit in einer Tripel-Kombination aus ACE-Hemmer oder AT₁-Blocker zusammen mit einem Diuretikum und einem Calciumantagonisten fortgeführt. Weiterhin

besteht die Möglichkeit die einzelnen Substanzen in ihrer Dosis zu erhöhen. Der letzte Schritt der medikamentösen Blutdrucksenkung besteht in der Hinzunahme eines weiteren Wirkstoffes in die Therapie, so zum Beispiel einen Mineralokortikoid-Antagonisten, einen Betablocker oder einen Alphablocker [118].

Je nach Alter und biologischer Fitness der Patienten werden verschiedene Zielwerte als Therapieziele angegeben. In Abhängigkeit der bestehenden Begleiterkrankungen, sollte die antihypertensive Therapie unterschiedlich eingeleitet und eskaliert werden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Antihypertensiv wirksame Substanzen und deren Vor- bzw. Nachteile in der Dauertherapie [118]

Substanzgruppe	Vorteile	Nachteile
ACE-Hemmer	<ul style="list-style-type: none"> - Signifikant niedrigere Therapieabbruchraten infolge unerwünschter Nebenwirkungen als andere Antihypertensiva [21] - Reduzieren Proteinurie [114] - Verzögern den Progress einer CKD [114] - Positive Effekte bei HFrEF [73] 	<ul style="list-style-type: none"> - Teratogen - Reizhusten als häufige Nebenwirkung
AT ₁ -Antagonisten	<ul style="list-style-type: none"> - Reduzieren Proteinurie [114] - Verzögern den Progress einer CKD [114] 	<ul style="list-style-type: none"> - Teratogen
Diuretika	<ul style="list-style-type: none"> - Vorteile in Herzinsuffizienzprophylaxe und -therapie [73,111] 	<ul style="list-style-type: none"> - Schlechtere Verträglichkeit als RAAS-Blocker [21] - Diabetogen [124]

Kalziumkanalblocker	<ul style="list-style-type: none"> - Vorteile in Schlaganfallprävention [111] 	<ul style="list-style-type: none"> - Schlechter in der Prävention von HFrEF [73,111]
Beta-Blocker	<ul style="list-style-type: none"> - Gut geeignet für Patienten mit Angina pectoris, Tachykardien, nach Myokardinfarkt, mit HFrEF [73,112] - Geeignet während Schwangerschaft und für junge Frauen im gebärfähigen Alter 	<ul style="list-style-type: none"> - Nachteile in der Prävention von Schlaganfällen - Erhöhtes Risiko für Neuerkrankungen an Diabetes Mellitus
Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten	<ul style="list-style-type: none"> - Geeignet als 4. Substanzklasse in therapieresistenter Hypertonie [84,119] 	<ul style="list-style-type: none"> - Gefahr der Hyperkaliämie

(ACE – Angiotensin-Converting-Enzym, AT₁ – Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp 1, CKD – chronische Niereninsuffizienz, HFrEF – Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion, RAAS – Renin-Angiotensin-Aldosteron-System)

2.2 HAUTKREBS

Epidemiologie

Hautkrebs ist in seiner Gesamtheit der häufigste Krebs des Menschen und die Inzidenz von Hautkrebs steigt jährlich [68]. Für das Jahr 2020 wurden vom Robert Koch Institut in Deutschland mehr als 260.000 Fälle von nicht-melanotischem Hautkrebs vorausgesagt, sowie etwa 25.000 Fälle von malignen Melanomen. Im Vergleich dazu treten jährlich etwa 65.000 Fälle von Lungenkrebs, einer weiteren sehr häufigen Krebserkrankung auf. Hautkrebs betrifft Menschen jeder Ethnie, jedes sozioökonomischen Status, jeder geografischen Region und kann während der gesamten Lebensspanne eines Menschen auftreten. Damit hat Hautkrebs viele ähnliche Charakteristika wie Bluthochdruck [32,49]. In Europa, Kanada, den USA und Australien wächst die Inzidenz an nicht-melanotischem Hautkrebs jährlich mit einer Rate von 3–8 % [70,80].

Pathogenese

Hautkrebs ist nicht eine einzelne Entität, sondern mehrere verschiedene. Die unterschiedlichen Arten Hautkrebs unterscheiden sich hinsichtlich der Zellen, aus denen sie entstehen und ihrer Malignität. Man kann unter anderem das maligne Melanom von nicht-melanotischen Hautkrebsarten unterscheiden. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die verschiedenen Formen von Hautkrebs, sowie deren Malignität und Ursprungsgewebe [35,74,90,92].

Tabelle 6: Ursprungsgewebe der häufigsten Hautkrebsentitäten

Ursprungsgewebe	Dysplasie/Neoplasie	Malignität
Melanozyten	Malignes Melanom	Maligne
Merkel'sche Zellen	Merkelzellkarzinom	Maligne
Stammzellen an Haarfollikeln der Epidermis (Basalzellen)	Basalzellkarzinom	Semimaligne
Plattenepithelzellen	Spinozelluläres Karzinom	Maligne
Oberflächliche Keratinozyten	Aktinische Keratose	Präkanzerose

Gemeinsam ist diesen Entitäten, dass sie in ihrer Entstehung durch ultraviolette Licht (UV-Licht) beeinflusst werden [80]. Basalzellkarzinome werden vor allem durch den kontinuierlichen Einfluss von UVA-Licht hervorgerufen. Spinozelluläre Karzinome, die von den oberflächlichen Plattenepithelien der Haut ausgehen, werden dagegen durch UVB-Licht,

welches energiereicher ist, ausgelöst. UV-Licht führt zu DNA-Schäden, Immunsuppression, oxidativem Stress und Entzündungsreaktionen [58,80].

Neben den kanzerogenen Einflüssen von UV-Licht spielen vor allem genetische Änderungen eine entscheidende Rolle in der Entstehung der Hautkrebsarten [109]. Diese genetischen Mutationen können entweder angeboren oder erworben sein. Als wichtige Syndrome, die Aufschluss über entscheidende Mutationen in der Entstehung von Hautkrebs bieten, gelten unter anderem das Gorlin-Goltz-Syndrom (auch als Basalzell Nävus Syndrom bekannt), dem eine *loss-of-function* Mutation in dem Tumorsuppressorgen PTCH1 zugrunde liegt und die Erkrankung Xeroderma pigmentosum, welche sich durch eine fehlerhafte Nukleotidexzisionsreparatur auszeichnet, die unterschiedliche Ursachen haben kann (häufig Mutationen in Genen, die für Endonukleasen kodieren) [74,90,92].

Zu den Risikofaktoren, die die Auftretenswahrscheinlichkeit eines Basalzellkarzinoms erhöhen, gehören ein heller Hauttyp, ein hohes Alter, männliches Geschlecht, Sonnenexposition, sowie eine Exposition gegenüber Schadstoffen wie beispielsweise Arsen [35,74,90,92]. Zu den Risikofaktoren, die die Auftretenswahrscheinlichkeit eines Spinalinoms erhöhen, gehören eine vorbestehende aktinische Keratose, chemische Noxen, chronisch entzündliche oder degenerative Hautveränderungen sowie Narben mit einem komplizierten oder atypischen Heilungsverlauf [35,74,90,92]. Häufige Sonnenbrände hervorgerufen durch kürzere intensive Bestrahlungen spielen dagegen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des malignen Melanoms [35,74]. Im Gegensatz zu malignen Melanomen sind Basalzellkarzinome und spinozelluläre Karzinome nicht als maligne, sondern als semimaligne zu bezeichnen. Dies bedeutet, dass sie nur eine sehr geringe Metastasierungstendenz von 3-10% aufweisen und sich eher durch lokale Destruktion als durch systemische Verbreitung auszeichnen [35,74,90,92].

Therapie

Das therapeutische Vorgehen basiert bei allen Hautkrebsarten auf ähnlichen Prinzipien (Tabelle 7). Zunächst muss das Ausbreitungsstadium des Tumors festgelegt werden. In Abhängigkeit des Ausbreitungsstadiums wird dann die Therapie eingeleitet. Der erste Schritt ist in der Regel eine operative Exzision des Tumors mit anschließender pathologischer Untersuchung [35,74,90,92].

Tabelle 7: Zusammenstellung wichtiger Aspekte zur Inzidenz, klinischer Erscheinung und Therapie der wichtigsten Hautkrebsentitäten [35,74,90,92]

	Spinaliom	Basaliom	Malignes Melanom
Relative Auftretenshäufigkeit	16 %	80%	4 %
Risikofaktoren	<ul style="list-style-type: none"> • Aktinische Keratosen • Chemische Noxen • Chronische entzündliche oder degenerative Hautveränderungen • Atypische und komplizierte Vernarbungen • Immunsuppression • UV-Exposition 	<ul style="list-style-type: none"> • Höheres Lebensalter • Heller Hauttyp • Männliches Geschlecht • Genetische Syndrome: z.B. Gorlitz-Golz-Syndrom • UV-Exposition • Arsen 	<ul style="list-style-type: none"> • Immunsuppression • Heller Hauttyp • Schwere Sonnenbrände in der Kindheit • Positive Familienanamnese • Vielzahl an Nävi
Klinik	<ul style="list-style-type: none"> • Leicht verletzliche Tumoren mit exophytischem oder endophytischem Wachstum 	<ul style="list-style-type: none"> • An behaarter Haut, v.a Lid und Nase • Nodus mit perlschnurartigem Randsaum und peripherer 	<ul style="list-style-type: none"> • ABCDE – Regel <ul style="list-style-type: none"> ➔ Asymmetrisch ➔ Unscharf begrenzt ➔ Farbveränderungen ➔ Durchmesser >5 mm ➔ Größenzunahme

	<ul style="list-style-type: none"> • An Sonnenexponierten Hautarealen 	<p>Gefäßinjektion (Teleangiektasie)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Im Verlauf zentrale Atrophie mit Ulzeration 	<ul style="list-style-type: none"> ➔ Erhabenheit ➔ Evolution • B-Symptomatik
Pathologie	<ul style="list-style-type: none"> • Epithelialer Tumor mit Verhornungsneigung • Hornperlen aus ringförmig geschichteten Spinaliomzellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Epitheliale Zellen mit Ähnlichkeit zum stratum basale, die in die Dermis wachsen • Palisadenartige Anordnung der äußeren Zellschichten, unregelmäßige Zellanordnung in der Mitte 	<ul style="list-style-type: none"> • Loslösen von Melanozyten aus unteren Schichten der Dermis • Polymorphe, pigmentierte Zellen in den oberen Schichten der Dermis • Tumordicke nach Breslow als wichtigster prognostischer Parameter
Metastasierungstendenz	<ul style="list-style-type: none"> • Selten und spät lymphogen und hämatogen 	<ul style="list-style-type: none"> • Langsames Wachstum über Jahre • Fast nie Metastasierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Relativ frühe lymphogene Metastasierung
Therapie	<ul style="list-style-type: none"> • Exzision • Radiatio • Radiochemotherapie 	<ul style="list-style-type: none"> • Exzision • Radiatio • Radiochemotherapie 	<ul style="list-style-type: none"> • Exzision • Radiatio • Chemotherapie • <i>Targeted Therapies</i>

2.3 HYDROCHLOROTHIAZID

Indikationen

Thiaziddiuretika und thiazid-ähnliche Diuretika gehören zu einer der fünf Klassen antihypertensiver Medikamente, die von den Leitlinien der ESC/ESH als Erstlinienmedikamente zur Behandlung der arteriellen Hypertonie empfohlen werden [113,115,118]. In verschiedenen randomisierten und kontrollierten klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Thiaziddiuretika und thiazid-ähnliche Diuretika die kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität senken. Neben der Behandlung der arteriellen Hypertonie werden Thiaziddiuretika und thiazid-ähnliche Diuretika auch zur Therapie von kardialen, renalen und hepatischen Ödemen eingesetzt. Hydrochlorothiazid (HCT) ist eines dieser Thiaziddiuretika. Ferner ist HCT das am häufigsten in Kombinationspräparaten eingesetzte Diuretikum [23].

Wirkung

Wodurch der antihypertensive Effekt von HCT zustande kommt, ist unklar. Mit Beginn einer HCT-Einnahme wird das extrazelluläre Volumen reduziert [28]. Dies erfolgt durch eine Hemmung des luminalen $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ -Kotransporters (NCC) des distalen Tubulus der Nieren. Dadurch wird Natrium vermindert rückresorbiert und vermehrt über den Harn ausgeschieden. Infolge osmotischer Kräfte folgt Wasser Natrium und es kommt zu einer vermehrten Diurese, der sogenannten Salurese. Durch diese Reduktion des Extrazellulärvolumens (EZV) wird das Auswurfvolumen des Herzens reduziert und der Blutdruck sinkt. Hohe Natriumkonzentrationen im Harn führen außerdem zu einem Austausch von Natrium mit Kalium im Urin, wodurch auch vermehrt Kalium ausgeschieden wird. Wird das Medikament jedoch chronisch eingenommen, wird das EZV kompensatorisch gesteigert, der blutdrucksenkende Effekt hält jedoch an. In diesem Gleichgewichtszustand ist am ehesten eine Vasodilatation verantwortlich für die Blutdrucksenkung [28]. Welche Mechanismen einer HCT induzierten Vasodilatation zugrunde liegen, ist nicht geklärt. Eine Hypothese besagt, dass HCT zu Veränderungen im vaskulären Ionentransport führt, wodurch die Zellen der vaskulären glatten Muskulatur relaxieren [28].

Nebenwirkungen

Die Ausscheidung von Natrium und Kalium kann zu Elektrolytstörungen in Form von Hyponatriämien und Hypokaliämien führen. Außerdem wird Magnesium vermehrt ausgeschieden, wodurch es zu Hypomagnesiämien kommen kann. Calcium wird dagegen vermehrt in den distalen Tubuli der Niere rückresorbiert, wodurch es zu Hypercalcämien

kommen kann, welche insbesondere in osteopenen und osteoporotischen Patienten teilweise gewünscht sind [28].

HCT wirkt sich auch auf den Stoffwechsel aus. Es hemmt die Ausscheidung von Harnsäure, indem es den Anionentransporter in den Nieren kompetitiv hemmt, der auch Harnsäuren ausscheidet. Dadurch kann eine Hyperurikämie ausgelöst oder aggraviert werden [28]. Da Thiazide Sulfonylharnstoffe sind, existieren Effekte auf den Glukosestoffwechsel, sodass die Blutzuckereinstellung bei diabetischen Patienten beeinflusst werden kann [124]. Mutmaßlich kommt es über eine Senkung der Insulinsekretion zu einem Anstieg des Blutzuckerspiegels. Ebenfalls beachtet werden sollte, dass HCT zu einem Anstieg des Serum *low density lipoprotein* (LDL) Cholesterin führen kann [28].

HCT und thiazid-ähnliche Diuretika gelten als fotosensibilisierende Substanzen. Es wird angenommen, dass die chemische Struktur (Sulfonamid, halogener aromatischer Kohlenwasserstoff) dieser Medikamente zur Absorption von UV-Licht führt und dass die absorbierten Photonen auf die umgebenden Gewebe abgegeben werden, wodurch chronische Schädigungsprozesse in den entsprechenden Geweben hervorgerufen werden [56]. Es gibt dokumentierte Fälle von *in vitro* und *in vivo* Fotosensibilität, die auf Thiazide und thiazid-ähnliche Diuretika zurückgeführt werden [56]. Seit seiner Einführung in die klinische Praxis vor mehr als 60 Jahren stand HCT aus diesem Grund immer wieder unter dem Verdacht, die Fotosensibilität der Haut zu erhöhen und möglicherweise zu fototoxischen Reaktionen führen zu können [2]. In den letzten Jahren hat insbesondere die Veröffentlichung mehrerer pharmakoepidemiologischer Studien, die feststellen konnten, dass es eine Korrelation zwischen einer langjährigen HCT-Einnahme und einer erhöhten Auftretenswahrscheinlichkeit insbesondere von nicht-melanotischen Hautkrebs gab, dazu geführt, dass die Indikationsstellung für HCT kritisch betrachtet wurde [88,93,94,96].

2.4 FOTOSENSIBILITÄT UND FOTOTOXIZITÄT

Epidemiologie

Medikamenten-induzierte Fotosensibilität ist eine unerwünschte Arzneimittelreaktion, die durch die Kombination aus einer Medikamenteneinnahme und nachfolgender Exposition gegenüber sichtbarem Licht oder UV-Licht zustande kommt. Mit dem Begriff wird beschrieben, dass die Empfindlichkeit der Haut für sichtbares Licht ebenso wie für UV-Licht zunimmt. Dadurch werden Lichtschäden bereits bei weniger starker Lichtintensität hervorgerufen. Es wird davon ausgegangen, dass etwa 8% aller unerwünschten Hautreaktionen infolge einer Medikamenteneinnahme auf lichtinduzierte Reaktionen zurückgehen [102]. Medikamenten-induzierte Fotosensibilität ist abhängig von den strukturellen Eigenschaften des Medikaments, der Dosis und Wellenlänge des entsprechenden sichtbaren oder UV-Lichtes sowie der Medikamentenkonzentration am Ort des Lichteinfalls [10,75,76]. Die Medikamentenkonzentration am Ort des Lichteinfalls wird dabei bestimmt durch die Plasmakonzentration des Medikaments, die Gewebsdurchblutung, die Medikamentenverteilung in interstitielle und intrazelluläre Kompartimente sowie die Akkumulationstendenz des Medikaments im entsprechenden Kompartiment und dessen Tendenz zur Bindung an Gewebe. Aus diesem Grund neigen Medikamente mit längerer Plasma-Halbwertszeit und höheren Gewebskonzentrationen zu einer höheren fotosensibilisierenden Potenz.

UVA-Licht (320-400 nm), ist energieärmer, und häufiger mit fotosensibilisierenden Reaktionen verbunden als UVB-Licht (280-320 nm), welches energiereicher ist [29,80]. Viele verschiedene Faktoren (Tabelle 8) bestimmen die Ausprägung einer fotosensibilisierenden Reaktion (beispielsweise der Hauttyp, die Immunfunktion, weitere Grund- und Begleiterkrankungen sowie das Sonnenverhalten) [37].

Tabelle 8: Faktoren, die die fotosensibilisierenden Reaktionen eines Individuums beeinflussen [37]

Endogene Faktoren	Exogene Faktoren
<ul style="list-style-type: none">• Hauttyp• Immunfunktion• Grund- und Begleiterkrankungen• Sonnenverhalten• Genetische Prädisposition	<ul style="list-style-type: none">• Strukturchemie des Medikaments• Medikamentendosis• Pharmakokinetik des Medikaments• Intensität und Wellenlänge des Lichts

Pathophysiologie

Lichtinduzierte Hautreaktionen werden in zwei große Gruppen eingeteilt, fototoxische und fotoallergische Reaktionen (Tabelle 9) [10,75,76]. Fototoxische Reaktionen treten dabei weit häufiger auf als fotoallergische Reaktionen [10,75,76]. Fototoxizität präsentiert sich klinisch als starker Sonnenbrand mit Rötung, Juckreiz und Hyperalgesie an der betroffenen Stelle [10]. Fototoxische Reaktionen sind in der Regel nur auf lichtexponierte Areale der Haut begrenzt und treten innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden nach der Lichtexposition auf [10]. Fototoxische Reaktionen sind eine direkte Konsequenz aus Gewebeschäden und zellulären Verletzungen und präsentieren sich histologisch durch Nekrosen von epidermal gelegenen Keratinozyten und dermalen Infiltrationen mit Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten [10,75,76]. Durch Absetzen der Medikamente und/oder Verzicht auf Lichtexposition bessert sich das klinische Bild der fototoxischen Reaktionen in der Regel innerhalb weniger Tage. Hautrötungen können außerdem mit antihistaminergen Cremes, kühlenden und antientzündlichen Umschlägen sowie topischen Kortikosteroiden behandelt werden [37].

Die weniger häufigen fotoallergischen Reaktionen benötigen im Gegensatz dazu eine vorherige Sensibilisierung gegen das Medikament oder eine biochemisch ähnliche Substanz [120]. Bei Fotoallergie handelt es sich um einen immunologischen Prozess, bei dem die durch Licht angeregten Medikamente in den Geweben als Haptene wirken und so eine Typ IV Hypersensitivitätsreaktion hervorrufen [120]. Dementsprechend tritt die Fotoallergie auch erst mit einer Verzögerung auf (circa 24 Stunden nach Lichtexposition) [120]. Klinisch zeigt sich ein dermatitisches Bild oder ein Ekzem, das über die lichtexponierten Areale hinausreichen kann. Mittels Fotopatch-Test lässt sich die Diagnose bestätigen. Histologisch kann darüber hinaus eine epidermale Spongiose mit Bläschenbildung und Exozytose von Leukozyten festgestellt werden, sowie perivaskuläre Entzündungsinfiltrate [120]. Das klinische Bild bessert sich durch Absetzen der Medikation. Etwaige Hautveränderungen können mit topischen Steroiden behandelt werden [37].

Tabelle 9: Unterscheidungsmerkmale zwischen Fototoxizität und Fotoallergie [29]

Fototoxizität	Fotoallergie
<ul style="list-style-type: none"> - Häufiger - Resultat einer direkten Schädigung des Gewebes und einer zellulären Verletzung durch ein Fotoprodukt - Dosisabhängigkeit von Licht und Medikament - Benötigt keine vorherige Sensibilisierung - Tritt Minuten bis wenige Stunden nach Lichteinfall auf - An lichtexponierten Hautstellen - Gleich einem Sonnenbrand mit klinischer Rötung und Juckreiz, sowie Hyperalgesie - Histologie: Nekrose epidermaler Keratinozyten, Infiltration der Dermis mit Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten 	<ul style="list-style-type: none"> - Weniger häufig - Benötigt Sensibilisierung durch das Medikament oder ein strukturchemisch ähnliches Medikament - Immunvermittelte Hypersensitivitätsreaktion (Mischtyp II + IV) - Tritt ≥ 24 Stunden nach Lichteinfall auf - Auch an nicht lichtexponierten Stellen - Bessert sich schnell nach Auslassen des Medikamentes - Histologie: Epidermale Spongiose, Bläschenbildung, Exozytose von Lymphozyten in die Epidermis, perivaskuläre Entzündungsinfiltrate

Diagnostik

Es gibt unter anderem zwei wichtige diagnostische Verfahren, um Fototoxizität oder Fotoallergie zu detektieren, Fototests und Fotopatch- bzw. Fotoscratch-Tests.

Ein Fototest ist ein Verfahren zur Feststellung der Fotosensitivität sprich der Lichtempfindlichkeitsschwelle eines Individuums. Diese Lichtempfindlichkeitsschwelle wird als „Minimale Erythem Dosis“ (MED) bezeichnet [37]. Die Bestimmung der MED dient zum einen zur Feststellung einer sicheren Bestrahlungsintensität für Patienten in einer Lichttherapie. Zum anderen um mögliche Änderungen in der Lichtempfindlichkeit eines Individuums festzustellen, zum Beispiel infolge einer Medikamenteninnahme. Zur Durchführung werden artifizielle Lichtquellen verwendet, mit denen kontrollierbare Intensitäten von UVA- und UVB-Licht generiert werden können. Hierfür wird eine Körperstelle, die normalerweise nicht

regelmäßig dem Sonnenlicht ausgesetzt ist, wie zum Beispiel der untere Rücken oder die Glutealregion, mit aufsteigenden Dosen UVA- und UVB-Licht beleuchtet. Zum Schutz der Haut und um die Testung möglichst genau durchführen zu können, werden genau begrenzte Areale beleuchtet, die mithilfe eines Dosimeters überwacht werden. Das Ergebnis dieser Bestrahlung wird nach 24 und 48 Stunden abgelesen, da die Haut eine verzögerte Reaktion auf Licht zeigt. Die geringste Strahlungsintensität, die zu einer Hautreaktion in Form einer leichten Rötung führt, wird als MED bezeichnet [37].

Fotopatch- und Fotoscratchtests beschreiben dagegen Verfahren, um fotoallergische Reaktionen nachzuweisen. Hierfür werden diejenigen Substanzen, für die eine allergische oder fotoallergische Reaktion vermutet wird, auf die Haut aufgetragen. Der Fotopatchtest unterscheidet sich leicht vom Fotoscratchtest, denn beim Fotopatchtest wird das Medikament auf die Haut aufgetragen und beim Fotoscratchtest wird die Haut nach dem Auftragen der Substanz zusätzlich eingeritzt, um ein Eindringen in die Haut zu ermöglichen [37].

Die Auftragung erfolgt doppelt, sodass in der Folge eine Untergruppe der aufgetragenen Substanzen abgedeckt und die andere Gruppe beleuchtet werden kann.

Therapie

Bei jedem Verdacht auf lichtinduzierte Hautreaktionen sollte eine ausführliche Anamnese erfolgen. Von Interesse sind, seit wann die Symptome aufgetreten sind, ob es eine Exposition gegenüber Sonnenlicht, oder artifiziell Licht gab, ob die beschriebenen Symptome schon einmal in der Vorgeschichte des Patienten aufgetreten waren, ob dermatologische Erkrankungen bestehen und ob es andere Nebenwirkungen auf das Medikament, das verdächtigt wird, gab.

Als nächstes sollte die gesamte Haut des Patienten inspiziert werden, um herauszufinden, ob nur lichtexponierte Hautareale betroffen (dies spricht eher für Fototoxizität) sind oder auch nicht lichtexponierte Areale (dies spricht eher für Fotoallergie). Die Hautreaktionen sollten beschrieben werden und idealerweise per Foto dokumentiert werden. Falls Fototoxizität vermutet wird, sollte man den Patienten anweisen, sich vor dem Licht zu schützen, indem schützende Kleidung getragen wird und Sonnenschutzmittel verwandt werden. Falls hingegen der Verdacht auf eine Fotoallergie aufkommt, kann in der Folge ein Fotoscratchtest durchgeführt werden. Auch diese Patienten sollten angewiesen werden, sich vor dem Licht zu schützen. Ein Substanzwechsel sollte erwogen werden.

Einige dermatologische Erkrankungen, wie der systemische Lupus Erythematoses können ähnliche Symptome und Hauterscheinungen provozieren wie fototoxische oder fotoallergische Reaktionen und sollten bei persistierender Symptomatik trotz Anwendung von Schutzmechanismen differenzialdiagnostisch in Betracht gezogen werden [54,60,85].

2.5 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

HCT ist in Deutschland eines der am häufigsten verschriebenen Arzneimittel. 2017 wurden in Deutschland 22,0 Millionen Packungen HCT verordnet. Im Oktober 2018 äußerten die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) und das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) in einem Rote-Hand-Brief Sicherheitsbedenken gegenüber HCT-haltigen Arzneimitteln. Diese bezogen sich auf ein dosisabhängig erhöhtes Risiko für Basalzell- und Plattenepithelkarzinome der Haut. Dieser rote Hand Brief stützte sich insbesondere auf zwei Fallkontrollstudien, die auf dänischen Gesundheitsdaten basierten. In diesen Studien war eine langjährige Therapie mit HCT, definiert als eine kumulative Dosis >50.000 mg (dies entspricht 12,5 mg HCT über einen Zeitraum von etwa 11 Jahren) mit einem erhöhten Risiko an Basalzellkarzinomen von 1,29 (95% Konfidenzintervall: 1,23-1,35) bzw. 3,98 (95% Konfidenzintervall: 3,68-4,31) für spinözelluläre Karzinome verbunden. Hierbei wurde eine Dosis-Wirkungsbeziehung beobachtet [88]. Besonders deutlich wurde dies bei der Auftretenswahrscheinlichkeit für Lippenkarzinome, die um das 2,1-fache gesteigert war (95% Konfidenzintervall: 1,7-2,6) bei längerer Anwendung und sich auf das 3,9-fache (95% Konfidenzintervall: 3,0-4,9) bei hohem Gebrauch (>25.000 mg) erhöhte und sogar auf das 7,7-fache (95% Konfidenzintervall: 5,7-10,5) bei besonders langer Anwendung (>100.000 mg) [93]. Diese potenziellen kanzerogenen Effekte werden pathophysiologisch mit den fotosensibilisierenden Wirkungen der speziellen chemischen Struktur (Sulfonamid-Struktur, halogenerter, aromatisierter Kohlenwasserstoff) begründet [56]. Obgleich diese Sicherheitsbedenken auf Fallkontrollstudien [41,88,89,93,94] beruhen und einige wesentliche Limitationen aufweisen, hatte die Veröffentlichung des Rote-Hand-Briefes zu einer großen Verunsicherung bei Patienten und verschreibenden Ärzten geführt. So haben im ersten Halbjahr 2019 schätzungsweise 840.000 Patienten weniger ein Thiazid-Diuretikum erhalten als noch vor Oktober 2018 [71]. Der starke Absatzrückgang an HCT insgesamt legt die Vermutung nahe, dass bei vielen Patienten HCT abgesetzt und kein alternatives Diuretikum verordnet wurde [71]. Dies könnte mit einer erhöhten Rate an Hypertonie- oder Herzinsuffizienz-assoziierten Komplikationen assoziiert gewesen sein [71]. Aktuell gibt es jedoch keine pathophysiologischen und mechanistischen Studien, die die potenziellen direkten fototoxischen und fotosensibilisierenden Effekte von HCT im Menschen testeten.

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist es daher, in einer doppelblinden, randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie, den Einfluss von HCT auf die Lichtempfindlichkeit der Haut im Menschen (*in vivo*) zu untersuchen. Zusätzlich werden in einer Reihe von präklinischen

Experimenten (*in vitro*), die pathophysiologischen Grundlagen einer HCT-vermittelten Fototoxizität untersucht.

Wir gehen von der Hypothese aus, dass HCT zu einer gesteigerten Fotosensibilität der Haut führt und dass eine Kombination aus einer HCT-Einnahme und einer artifiziellen Bestrahlung mit UVA- und UVB-Licht zu einer vermehrten Bildung und Ausscheidung von Pyrimidindimeren führt, welche als Indikatoren für DNA-Schäden dienen könnten. Ebenso wird hypothetisiert, dass eine Behandlung von humanen Keratinozyten mit HCT zu einer nachfolgenden Potenzierung UV-induzierter Schäden führt.

Die Ergebnisse sollen hypothesengenerierend über die Arzneimittelsicherheit von HCT sein, einem der in Deutschland am häufigsten verschriebenen Medikamente.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 KLINISCHER TEIL – DIE HCTOX-STUDIE

Zur besseren Lesbarkeit wird in der Folge das generische Maskulinum verwendet. Die Personenbezeichnungen beziehen sich auf alle Geschlechter.

Studiendesign und Genehmigung der Studie

Die vorliegende Studie ist eine randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Studie. Die Studie wurde gemäß dem Arzneimittelgesetz durchgeführt und wurde vom BfArM genehmigt (Eudra CT Nummer: 2020–000862-40). Ein Ethikvotum der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes liegt vor (Kenn-Nr.: 301/20). Es erfolgte eine Registrierung auf clinicaltrials.gov (NCT04654312). Die Studie wurde durchgeführt in Einklang mit der Deklaration von Helsinki sowie den Regeln der „*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use – Good Clinical Practice*“. An erster Stelle stand in der vorliegenden Studie die Sicherheit der Probanden. Aus diesem Grund wurde besonders hoher Wert auf alle Mechanismen gelegt, die Probanden schützen und mögliche unerwünschte Nebenwirkungen vermeiden. Ein „Notfall-Entblindungsverfahren“, ebenso wie ein „*Data Monitoring Board*“ wurden installiert, um die Risiken für alle Teilnehmer zu reduzieren.

Fallzahlplanung und Randomisierung

Eine exakte statistische Power-Analyse war aufgrund fehlender Informationen nicht durchführbar. Aus diesem Grund wurde gemäß Überlegungen zur Fallzahlplanung sogenannter „*Feasibility*“-Studien die Studienpopulation auf 30 Probanden festgelegt [12]. Es wurden 15 Probanden mit einem Hauttyp I oder II nach Fitzpatrick, sowie 15 Probanden mit einem Hauttyp III oder IV nach Fitzpatrick rekrutiert. Innerhalb dieser beiden Gruppen erfolgt eine 2:1 Randomisierung zugunsten der „Verum-Gruppe“ (Abbildung 1).

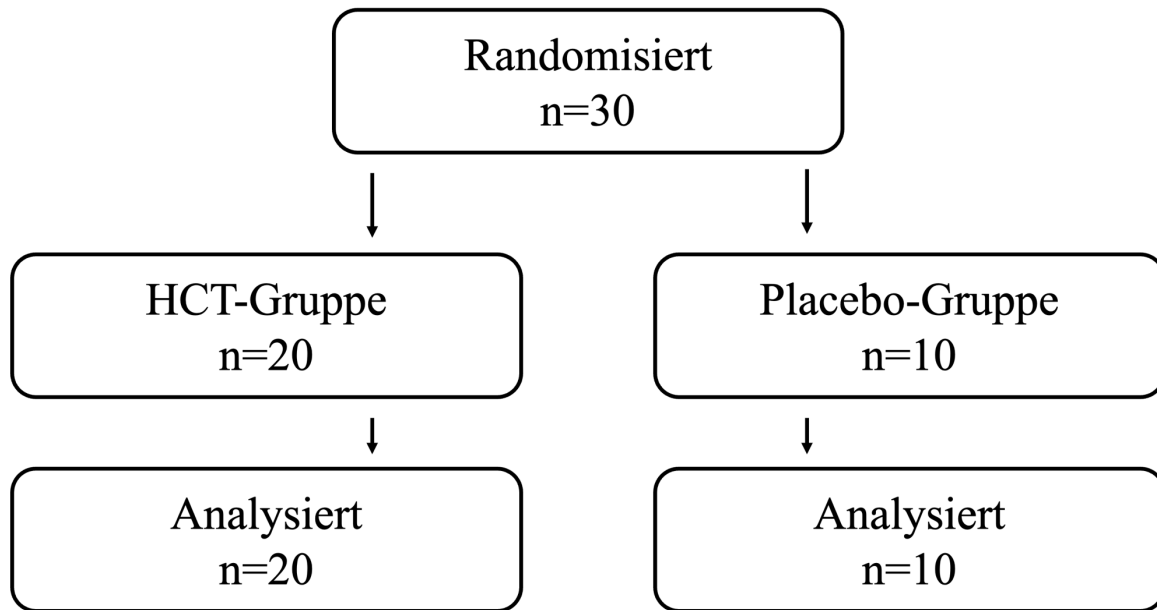


Abbildung 1: Flow-chart der Probandenrekrutierung

Probandenrekrutierung

Über einen Zeitraum von Januar 2021 bis Juli 2021 wurden 30 freiwillige, gesunde Probanden eingeschlossen. Die Probandenrekrutierung fand durch das Ansprechen Interessierter und durch die Etablierung eines Empfehlungsmarketings statt. Alle Probanden wurden in einem persönlichen Gespräch über den Studienverlauf sowie mögliche Risiken und Nebenwirkungen der Untersuchungen und Medikamenteneinnahmen aufgeklärt. Nach ausreichender Bedenkzeit (>24 Stunden) wurde jeder Proband gebeten, eine Einverständniserklärung zu unterzeichnen.

Einschlusskriterien

In die HCTOX-Studie eingeschlossen wurden diejenigen Probanden, die alle der folgenden Kriterien erfüllten:

Der Proband:

- ist dazu in der Lage und einverstanden damit an der Studie teilzunehmen und unterzeichnet eine entsprechende Aufklärung und Einverständniserklärung
- ist gesund und ohne eine schwere zugrundeliegende Erkrankung
- ist älter als 18 Jahre
- erklärt sich dazu bereit, 25 mg HCT einzunehmen, ohne dass dies klinisch indiziert ist

- erklärt sich dazu bereit, sich artifiziell UV-Licht auszusetzen, ohne dass dies klinisch indiziert ist
- hat den Hauttyp I, II, III oder IV nach Fitzpatrick

Ausschlusskriterien

Von der Studie ausgeschlossen waren hingegen Probanden, die eines der folgenden Kriterien aufwiesen:

- Vorbekannte kardiologische Erkrankung
- Vorbekannte dermatologische Erkrankung
- Niereninsuffizienz (glomeruläre Filtrationsrate <60 ml/min/1,73 m²)
- Einnahme bekannt fotosensibilisierender Substanzen, insbesondere HCT
- Häufige überdurchschnittliche UV-Exposition in der Vorgeschichte
- Bekannter Hypertonus
- Bekannte Elektrolytstörungen
- Systolischer Blutdruck <90 mmHg beim Basis-Assessment
- Hauttyp V oder VI nach Fitzpatrick
- Bekannte schwere Grunderkrankung
- Bekannte Alkoholabhängigkeit oder Missbrauch oder andere substanzgebundene Abhängigkeiten
- Einnahme einer der folgenden Substanzen: ACE-Inhibitoren; Allopurinol; Amantadin; Barbiturate; Betablocker; Carbamazepin; Chinidin; Cholecalciferol; Cholestyramin; Colestipol; Cyclosporin; Diuretika; Glykoside; harnsäuresenkende Substanzen; Insulin; Kaliumsalze; Lithium; Methyldopa; Nitrate; NSAIDs; orale Antidiabetika; Phenothiazine; Phenytoin; Salicylate; Substanzen, die ein Long-QT-Syndrom verursachen könnten; Trizyklische Antidepressiva; vasodilatierende Medikamente; vasokonstriktorische Medikamente; Zytostatika
- Frauen im gebärfähigen Alter, die keine ausreichende und hocheffektive (Pearl Index $<0,01$) Kontrazeption durchführen
- Schwangere Frauen oder stillende Mütter
- Überempfindlichkeit, oder bekannte Allergie gegen HCT, oder seine Inhalts- und Zusatzstoffe

Untersuchungsablauf

Studienmedikation

Probanden nahmen entweder HCT oder Placebo ein. Die Einnahme der Studienmedikation begann für alle Probanden an Tag 7. Die Studienmedikation wurde von der Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg umverpackt und dann in verblindeten Blistern an die kardiologische Studienambulanz ausgegeben. In der Studienambulanz wurden die Medikamente dann täglich an die entsprechenden Probanden verteilt.

Die Studienmedikation wurde von Tag 7-21 eingenommen. Insgesamt nahm jeder Proband also 15 Tabletten ein. Entweder 25 mg HCT oder ein entsprechendes Placebo. Im Zuge der Medikamentenausgabe wurden die Probanden täglich nach möglichen Nebenwirkungen befragt und untersucht (Abbildung 2).

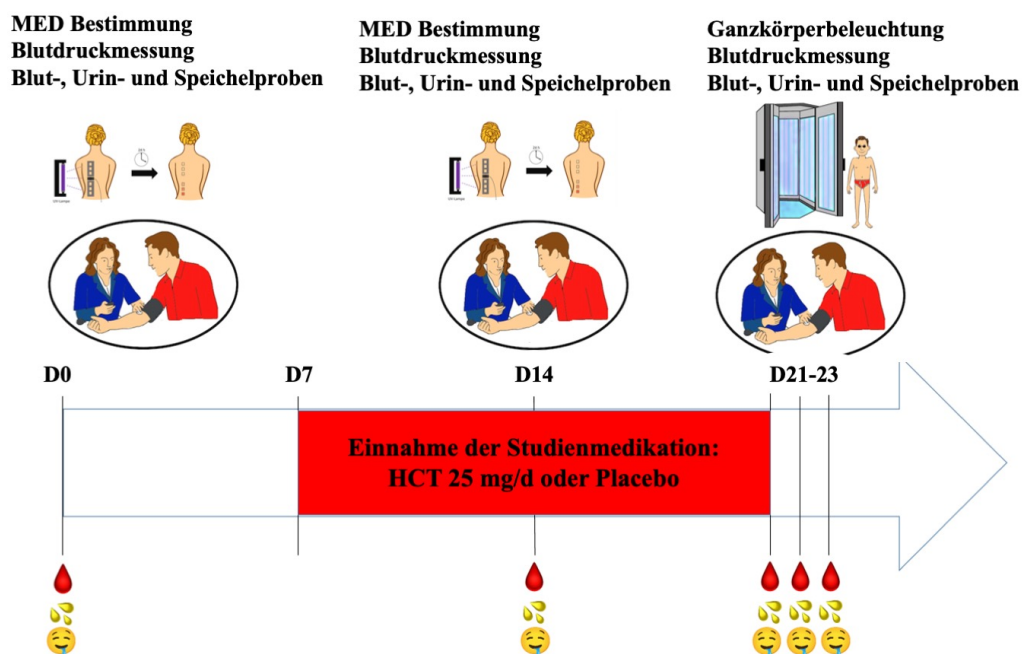


Abbildung 2: Ablaufplan der klinischen Studie

(D – Tag, HCT – Hydrochlorothiazid, MED – minimale Erythem Dosis)

Blut-, Speichel- und Urinproben

An den Tagen 0, 14, 21-23 wurden Blutentnahmen durchgeführt. Hierbei wurde Probanden je ein Blutröhrchen Serum-Blut (4,7 ml), ein Blutröhrchen Lithium-Heparin-Blut (4,7 ml) und zwei Blutröhrchen EDTA-Blut (je 2,7 ml) entnommen. Das Serum-Blut wurde zusammen mit dem Lithium-Heparin-Blut und einem der beiden EDTA-Blutröhrchen zur weiteren Analyse

und Bestimmung der folgenden Werte ins Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes geschickt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Venöse Blutentnahmen und Laborwerte, die bestimmt wurden

Blutröhrchen	Laborwerte
Serum-Monovette 4,7 ml	Serum-Vitamin D
Lithium-Heparin-Monovette 4,7 ml	Plasma-Kreatinin, Plasma-AST, Plasma-ALT, Plasma-Natrium, Plasma-Kalium,
EDTA-Monovette 2,7 ml	Kleines Blutbild

(ALT – Alanin-Transferase, AST – Aspartat-Transferase, EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure)

Das verbleibende EDTA-Blutröhrchen wurde beschriftet und zur weiteren Analyse in das Institut für Klinische und Experimentelle Toxikologie der Universität des Saarlandes auf dem Campus des Universitätsklinikums des Saarlandes verbracht.

An den Tagen 0, 14, und 21-23 wurden Speichelproben mittels „*Quantisal-Oral-Fluid-Collectoren*“ asserviert. Diese Kollektoren wurden beschriftet und ebenfalls zur weiteren Analyse in das Institut für Klinische und Experimentelle Toxikologie der Universität des Saarlandes auf dem Campus des Universitätsklinikums des Saarlandes verbracht.

An den Tagen 0 und 14 wurden Probanden gebeten, Mittelstrahlurin abzugeben, und an den Tagen 21-24 sollten die Probanden Morgenurin sammeln. Der Urin wurde beschriftet und umgehend zur weiteren Analyse in das Institut für Klinische und Experimentelle Toxikologie der Universität des Saarlandes auf dem Campus des Universitätsklinikums des Saarlandes verbracht.

Blutdruckmessung

An den Tagen 0, 14 und 21-23 erfolgten Blutdruckmessungen gemäß aktuellen Leitlinienempfehlungen mithilfe einer automatisierten Blutdruckmanschette (Omron Medical) an beiden Oberarmen [118]. Derjenige Oberarm, der die höheren Messwerte zeigte, wurde im Verlauf der Studie als Messarm verwendet. Es erfolgten jeweils drei Messungen, aus denen das arithmetische Mittel gebildet wurde.

Bestimmung des Hauttyps

Zur Bestimmung des Hauttyps füllten alle Teilnehmer an Tag 0 einen Fragebogen aus, der anhand von 10 Multiple-Choice-Fragen, die direkten und indirekten Folgen von Sonneneinstrahlung auf die Haut erfragte. Jede Frage konnte mit einer von vier Antworten beantwortet werden, die mit einem bis vier Punkten bewertet wurden, sodass am Ende ein Punktwert zwischen mindestens 10 und maximal 40 Punkten erreicht werden konnte. Von einem Facharzt für Dermatologie wurde dieser Fragebogen im Anschluss validiert und der Hauttyp bestimmt. Hierbei erfolgte zur Vereinfachung eine Einteilung in die Hauttypklassen I/II (hellerer Hauttyp) sowie III/IV (dunklerer Hauttyp) nach Fitzpatrick. Die dermatologische Supervision war in diesem Fall wichtig, da in den Punktwert auch die Haar- und Augenfarbe miteinflussen. Da es möglich war, dass ein Proband eine dunkle Haut aufwies aber helle Haare/Augen haben konnte, wäre der Fragebogen in diesem Fall möglicherweise falsch niedrig ausgefallen. Dasselbe galt für Probanden mit heller Haut und dunklen Haaren/Augen.

Bestimmung der Lichtempfindlichkeitsschwelle [Minimalen Erythem Dosis (MED)]

An den Tagen 0 und 14 wurde bei alle Probanden eine Lichttreppenuntersuchung zur Bestimmung der Lichtempfindlichkeitsschwelle (MED) durchgeführt. Dazu wurden auf dem Rücken der Probanden jeweils sechs runde Felder, die einen Durchmesser von 5 cm aufwiesen mit aufsteigenden Dosen von UVA- und UVB-Licht beleuchtet (Abbildung 3). Die Dosis, die dabei verwendet wurde, richtete sich nach dem Hauttyp und folgte den Empfehlungen der Leitlinien für Foto- und Fotochemotherapie der Deutschen Gesellschaft für Dermatologie (Tabelle 11 und 12) [47]. Die zweite Lichttreppe wurde nach dem gleichen Prinzip durchgeführt, allerdings unter dem Einfluss der Studienmedikation. Zur Ermittlung der MED nahmen die Probanden auf dem Bauch liegend auf einer Untersuchungsfläche Platz. Die gesamte Haut wurde anschließend mit dunklen Stofftüchern bedeckt und nur derjenige Bereich, der getestet werden sollte, blieb unbedeckt. Hier wurde die Lichttreppe aufgelegt, die mithilfe eines Dosimeters gesteuert wurde. Als Quelle der Bestrahlung dienten spezielle UV-Lampen, die in einer vorgegebenen Dosis UVA- oder UVB-Licht emittierten. Diejenige geringste Dosis an UVA- oder UVB-Licht, die zu einer geringen Rötung (Minimale Erythem Dosis) oder Verfärbung/Pigmentierung (Minimale Pigmentations Dosis) der Haut führte, wurde als jeweilige Lichtempfindlichkeitsschwelle festgelegt. Das Ablesen und die Analyse der Lichttreppe erfolgte durch einen erfahrenen Dermatologen (Prof. Reichrath) 24 und 48 Stunden nach der Bestrahlung.

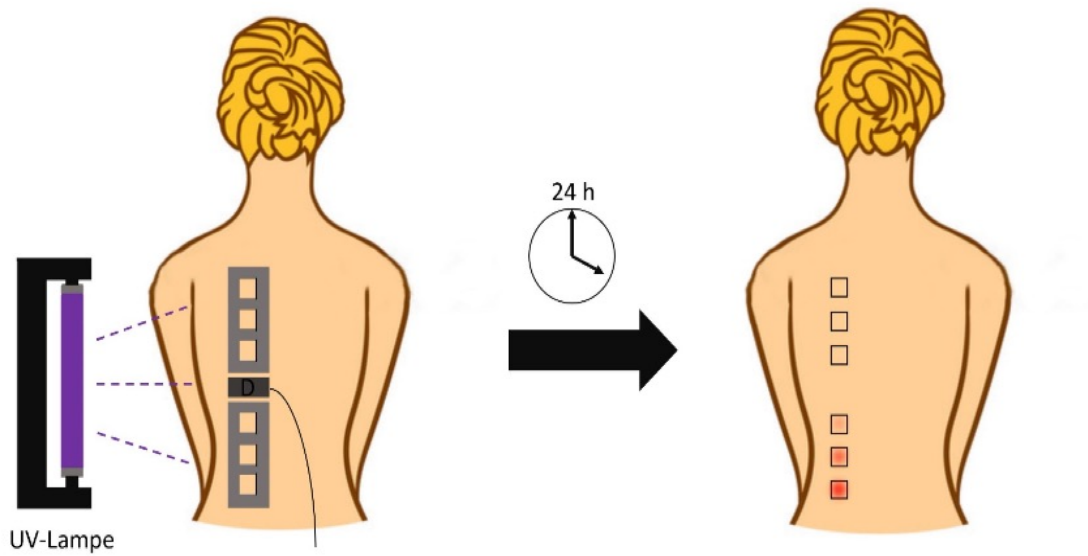


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Lichttreppenuntersuchung und deren Auswertung nach 24 Stunden

(UV – Ultraviolettes Licht)

Tabelle 11: Bestrahlungsdosen für Probanden des Hauttyps I und II während der Lichttreppe

Test-Feld	UVA-Dosis	UVB-Dosis
1	0,5 J/cm ²	0,05 J/cm ²
2	1,0 J/cm ²	0,1 J/cm ²
3	2,0 J/cm ²	0,2 J/cm ²
4	3,0 J/cm ²	0,3 J/cm ²
5	4,0 J/cm ²	0,4 J/cm ²
6	5,0 J/cm ²	0,5 J/cm ²

(UVA – Ultraviolettes Licht Typ A, UVB – Ultraviolettes Licht Typ B)

Tabelle 12: Bestrahlungsdosen für Probanden des Hauttyps III und IV während der Lichttreppe

Test-Feld	UVA-Dosis	UVB-Dosis
1	1,5 J/cm ²	0,15 J/cm ²
2	2,0 J/cm ²	0,2 J/cm ²
3	3,0 J/cm ²	0,3 J/cm ²
4	5,0 J/cm ²	0,5 J/cm ²
5	7,0 J/cm ²	0,7 J/cm ²
6	9,0 J/cm ²	0,9 J/cm ²

(UVA – Ultraviolettes Licht Typ A, UVB – Ultraviolettes Licht Typ B)

Folgende UV-Geräte wurden für die dermatologischen Untersuchungen verwendet: UV-Therapiesystem 7002, UVA 700 L, UVB 802 L (alle Herbert Waldmann GmbH & Co.KG)

Ganzkörperbestrahlung

An den Tagen 21-23 wurden die Probanden einer Ganzkörper-UV-Bestrahlung unterzogen (Abbildung 4). Diese begann mit einer vorgegebenen möglichst niedrigen Dosis (Tabelle 13 und 14). Hierfür traten die Probanden in Lichtkabinen, die mit speziellen UV-Röhren für UVA- und UVB-Licht ausgestattet waren. Um sich zu schützen, trugen die Probanden Schutzbrillen und dunklen Stoff im Intimbereich. Die Bestrahlungsdosis orientierte sich an den Leitlinien der Foto- und Fotochemotherapie in der Dermatologie und wurde im Verlauf der drei Bestrahlungstage leicht gesteigert, angepasst an die individuelle Reaktion des Probanden und supervisiert durch einen Facharzt für Dermatologie [47].

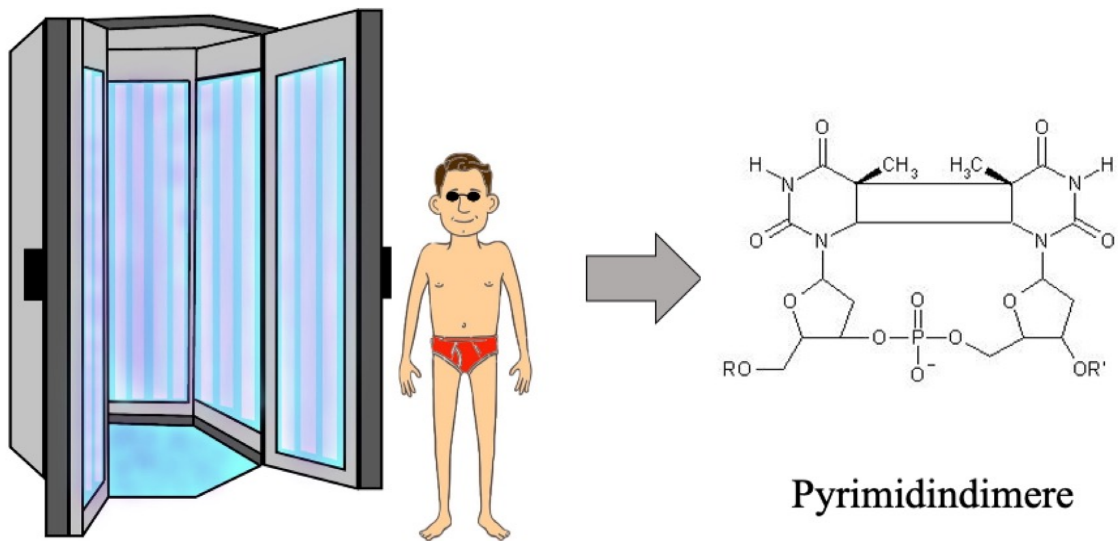


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Ganzkörperbestrahlung und nachfolgender Bestimmung der Pyrimidindimere im Urin

Tabelle 13: Bestrahlungsdosen für Probanden des Hauttyp I und II während der Ganzkörperbestrahlungen

Tag	UVA-Dosis	UVB-Dosis
1	0,5 J/cm ²	0,1 J/cm ²
2	0,7 J/cm ²	0,2 J/cm ²
3	1,0 J/cm ²	0,25 J/cm ²

(UVA – Ultraviolettes Licht Typ A, UVB – Ultraviolettes Licht Typ B)

Tabelle 14: Bestrahlungsdosen für Probanden des Hauttyp III und IV während der Ganzkörperbestrahlungen

Tag	UVA-Dosis	UVB-Dosis
1	1,0 J/cm ²	0,2 J/cm ²
2	1,5 J/cm ²	0,3 J/cm ²
3	2,0 J/cm ²	0,5 J/cm ²

(UVA – Ultraviolettes Licht Typ A, UVB – Ultraviolettes Licht Typ B)

Toxikologische Untersuchungen

Adhärenzmessung

Die Adhärenz zur Studienmedikation wurde direkt mittels *ultra-high-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry* (UHPLC-HRMS/MS) und Nachweis der Testsubstanz (HCT) sowie deren Metaboliten im Urin, Serum und Speichel zum Zeitpunkt der Baselinevisite sowie den entsprechenden Follow-Up-Terminen gemessen [39,45,46,98].

Bestimmung von Pyrimidindimeren

Zur Bestimmung der Pyrimidindimere wurden die Urinproben zunächst mit Acetonitril im Verhältnis 1:2 Volumen/Volumen verdünnt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Dionex UltiMate 3000 LC, verbunden mit einer ThermoFisher Q-Exactive, injiziert. Chromatographische Separation wurde auf einer ThermoFisher Accucore Phenyl-Hexyl Säule (100 mm x 2,1 mm, 2,6 µm Partikelgröße) mit einer Laufzeit von 5 Minuten sichergestellt. Das Massenspektrometer arbeitete in den "full MS"- und "PRM"-Modus, nachdem eine negative Elektrospray Ionisation durchgeführt wurde. Die Einschlussliste des "PRM" Modus enthielt den m/z 545.12817, welcher die Dinukleotidmonophosphat Thymidindimere repräsentierte. Um für Variationen in der Urinkonzentration zu korrigieren, wurden die nachgewiesenen Dimere auf das Kreatinin im Urin normalisiert [51,101].

3.2 PRÄKLINISCHER TEIL – UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON HCT UND UVB-STRAHLUNG AUF HACAT-ZELLEN

Materialien und Geräte

Tabelle 15: Verwendete Geräte für die präklinischen Experimente

Produkt	Hersteller
Abzug	ARGE Labor- und Objekteinrichtungen GmbH, Wathlingen, Deutschland
Eismaschine	Ziegra Eismaschine, Ziegra Eismaschinen, Isernhagen, Deutschland
Chemilumineszenz-Imaging-System	peqlab Fusion SL, VILBER LOURMAT GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Inkubator	Hera Cell 150 CO ₂ -Inkubator, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Kühlzentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop	Nikon Eclipse TS 100, Nikon, Tokio, Japan
Vakuumpumpe	KNF K17 Vakuumpumpe, KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Nano-Drop	NanoDrop™ 2000/2000c Spektralphotometer, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
PCR Gerät	StepOne realtime PCR, Applied Biosystems Inc., Waltham, Massachusetts, USA
PCR Workstation	Paqlab Workingstation, VWR Inc. Radnor, Pennsylvania, USA
Photometer	DU 730 UV/Vis-Spektrophotometer, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Mechanische Pipetten	Ergonomic High Performance Pipetten, VWR Inc. Radnor, Pennsylvania, USA
Elektrische Pipette	Pipetus, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, Deutschland
Rüttelplatten	Polymax 1040, Heidolph Instrumens GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Spannungsquelle	PowerPac HC, Biorad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA

Spectrophotometer	NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Sterile Bank	SAFE 2020, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Thermozykler	peqStar Universal 96, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Tischzentrifuge, klein	Heraeus Biofuge Pico, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge, groß	GT4R Centrifuge, Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Ultraschallgerät	Branson Ultrasonics Sonier, Emerson Electric Co., Missouri, USA
UV-Gerät	UVP-Crosslinker CL-1000, Endress+Hauser, Reinach, Schweiz
Vortex Mixer	SN 41119030, Labnet International, Edison, New Jersey, USA
Waage	CS, Ohaus GmbH, Gießen, Detschland
Zentrifuge, gekühlt	Fresco 17 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

Verbrauchsmaterialien

Tabelle 16: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die präklinischen Experimente

Produkt	Hersteller
Pipetierplatte rt-PCR	MicroAmp 96 Wells plates, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham Massachusetts, USA
Abdeckfolie rt-PCR	MicroAmp optical adhesive film, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt Serological Pipette, Sarstedt AG & Ko.KG, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, 50 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zellkulturschalen Ø 10 cm	Sarstedt AG & Ko.KG, Nümbrecht, Deutschland

Cellscraper	Cell Scraper, Sarstedt AG & Ko.KG, Nümbrecht, Deutschland
Pasteurpipetten	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Nitrozellulose-Membranen	Biorad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Filtermembranen	Whatman, GE Healthcare, Birminghamshire, UK
Halterung für Gele	Western Blot Chamber, Biorad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Gelelektrophorese-Zubehör	Mini PROTEAN Tetra Cell, Biorad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Tank Blot-System	Mini Trans-Blot Cell, Biorad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark, Irving, Texas, USA

Software

Tabelle 17: Verwendete Softwareprogramme

Western Blot	FusionCapt Advance peqlab, VWR, Darmstadt, Deutschland
RNA-Messung	NanoDrop, Isogen Life Science, Utrecht, Holland
Statistik	STATA 16.1, StataCorp, College Station, Texas, USA GraphPad Prism 9, Insight Partners, New York, USA
Auswertungen	Microsoft EXCEL 2016, Microsoft, Washington, USA
Abbildungen	GraphPad Prism 9, Insight Partners, New York, USA Microsoft PowerPoint 2016, Microsoft, Washington, USA

Versuchsabläufe

Da die pathophysiologischen Prozesse, die hinter den fotosensibilisierenden Eigenschaften von HCT vermutet werden, nicht vollständig geklärt sind, wurden Experimente durchgeführt, die den Einfluss von HCT in Kombination mit UVB-Strahlung *in vitro* testen. Die präklinischen Experimente konzentrierten sich auf UVB-Strahlung, da zuvor in den klinischen Versuchsteilen keine Reaktionen nach UVA-Bestrahlung dokumentiert werden konnten.

Als Modellsystem wurden hierzu humane Keratinozyten (HaCaT) herangezogen. Diese Keratinozyten erreichen in calciumreichen Medien bei niedrigen Temperaturen bis zu 140 Teilungsgenerationen. Als theoretische Grundlage dienten wenige experimentelle Arbeiten, die insbesondere den Einfluss von HCT und UVA-Strahlung auf HaCaT Zellen untersuchten. In diesen Arbeiten wurde HCT in einer Konzentration von 1 mmol/L in DMSO (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) gelöst und in die Zellkultur eingebracht [103,104].

Abbildung 5 zeigt den Aufbau der *in vitro* Experimente. Um alle Einflussgrößen zu kontrollieren, wurden sechs separate Versuchsteile initiiert. Es wurden zwei Gruppen mit jeweils drei unterschiedlichen Versuchsobjekten gebildet. Innerhalb der Gruppen erfolgte eine Unterscheidung zwischen Zellen, die mit UVB-Strahlung beleuchtet wurden und welchen, die nicht beleuchtet wurden. Innerhalb jeder Gruppe gab es dann die Unterscheidung zwischen einer Negativkontrolle, einer Kontrolle mit dem Lösungsmittel DMSO und einer Zellkultur mit HCT (1 mmol/L gelöst in DMSO). Die Zellen wurden immer 1 Stunde vor der eigentlichen Bestrahlung entweder mit 1 mmol/L HCT oder DMSO inkubiert und dann beleuchtet. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die weder mit HCT noch mit DMSO behandelt wurden. Um die Reproduzierbarkeit der erhobenen Experimente sicherstellen zu können wurden alle Versuchsreihen sechsfach wiederholt. Die Zellen wurden dann mit einer einmaligen Dosis von 100 J/m² beleuchtet. Tabelle 15 und 16 geben einen Überblick über die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien. Tabelle 17 fasst die eingesetzten Softwareprogramme zusammen.

Die Effekte der Bestrahlung wurden auf genomischer und Proteinebene analysiert. Da wir vermuteten, dass insbesondere die inflammatorischen Prozesse vor allem in den ersten Stunden nach der UV-Bestrahlung auftreten würden, wurde eine Zeitreihe initiiert, bei der die Zellen einmalig mit 100 J/m² beleuchtet wurden und dann nach 6 und 24 Stunden hinsichtlich inflammatorischer und kanzerogener Veränderungen mittels *real-time* PCR (rt-PCR) untersucht wurden.

Da die Proteinbiosynthese der Transkription der Gene nachgeschaltet ist, wurden auch zu den Zeitpunkten 6 und 24 Stunden nach Bestrahlung die Protein-Expression mittels Western Blot untersucht. Beobachtet wurden in diesem Zusammenhang vor allem Änderungen in der Expression von Tumormarkern, inflammatorischen Markern, sowie apoptotische Proteine und Proteine zur Entgiftung des oxidativen Stresses.

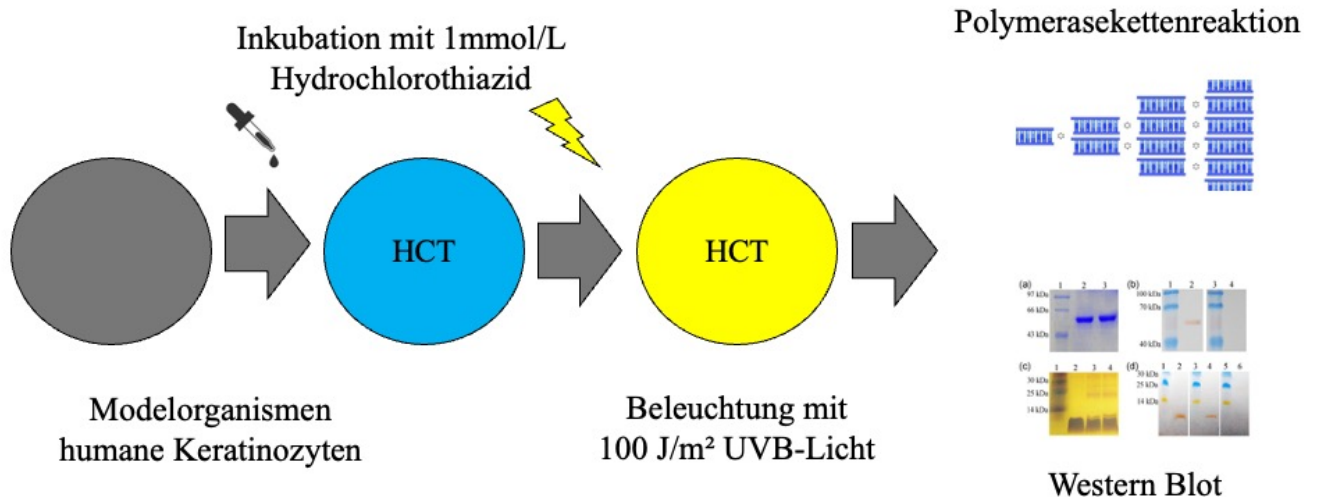


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Laborexperimente

(HCT – Hydrochlorothiazid, UVB – Ultraviolette Strahlung Typ B)

HaCaT-Zellkultur

Die humanen Keratinozyten, sogenannte HaCaT-Zellen der Teilungsgeneration p37, wurden uns von der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Jörg Reichrath aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff in das Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin III, des Universitätsklinikums des Saarlandes transportiert. Das anschließende schonende Auftauen erfolgte in Isopropanol (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland). Die aufgetauten Zellen wurden auf Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser aufgetragen und die Zellkulturschalen wurden anschließend mit DMEM-Medium, welches mit 10% FBS und 1% L-Glutamin (alle drei Gibco, ThermoFisher, Bleiswijk, Holland) angereichert war, auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Die angereicherten Zellen wurden bei +37 °C, 100% Luftfeuchte und 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert. Lichtmikroskopisch wurde die Dichte des Zellewachstums auf den Kulturschalen überwacht und bei dichtem Wachstum wurden die Zellen auf neue Kulturschalen aufgeteilt. Hierfür wurde zunächst das alte Medium mittels Glaspipette und automatischem Sauger abgesaugt. Im Anschluss wurden die Zellkulturschalen

zweimal mit je 5 ml PBS (400 g NaCl, 10 g KCl, 12 g KH₂PO₄, 72 g Na₂HPO₄ auf 5000 ml Ampuwa) gewaschen. Daraufhin wurden je 1 ml Trypsin (Gibco, ThermoFisher, Bleiswijk, Holland) zu den Zellen gegeben und die Schalen anschließend im Brutschrank für 10 Minuten bei +37 °C, 100% Luftfeuchte und 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert, um die Zellen zu lösen. Nach 10 Minuten wurden die Zellen in den Kulturschalen bei geschlossenem Deckel vorsichtig durch wiederholte Schüttelbewegungen, Drehungen und leichtes Anschlagen gegeneinander abgeklopft. Lichtmikroskopisch wurde der Erfolg dieser mechanischen Lösung überprüft und bei zufriedenstellendem Ergebnis wurde jeder Zellkulturschale 1 ml DMEM-Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin) zugegeben, um die chemische Lyse durch Trypsin zu stoppen. Die Mischung aus Zellen, Trypsin und angereichertem Medium wurden mittels elektrischer Pipette abgenommen und in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Die verbliebenen Zellkulturschalen wurden im Anschluss mit 5 ml angereichertem Medium gespült und auch dieses Medium wurde in das 50 ml Reaktionsgefäß gegeben. Durch Zentrifugation mit 900 Umdrehungen/Minute für 3 Minuten wurden die Zellen vom flüssigen Überstand gelöst und dieser flüssige Überstand wurde in der Folge mittels Glaspipette und automatischem Sauger abgenommen. Das verbliebenen Zellpellet wurde in neuem angereichertem Medium suspendiert und je 1 ml dieser Suspension wurde auf neue Zellkulturschalen verteilt. Diesem Milliliter wurden weitere 9 ml des angereicherten Mediums zugegeben, um das Volumen wieder auf 10 ml pro Zellkulturschale aufzufüllen. Die aufgeteilten Zellen wurden wieder bei +37 °C, 100% Luftfeuchte und 5% CO₂ Atmosphäre im Brutschrank inkubiert.

Western Blots

Western Blotting ist ein etabliertes Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von Proteinen. Um den Schritt des Western Blotting zu ermöglichen, müssen die Proteine zuerst aus den Zellen isoliert werden und dann mithilfe einer Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gelelektrophorese aufgetrennt werden.

Proteinisolation

Zur Proteinisolation aus den Zellen wurde zunächst ein Homogenisationspuffer angesetzt. Dieser setzte sich aus 6 ml Homogenisations-Buffer (5 mmol/L EDTA, 25 mmol/L NaF, 300 mmol/L Sucrose, 30 mmol/L KH₂PO₄) für Western Blot, einer ¼ Complete Tablette EDTA-free (#11873580001; Roche, Penzberg, Germany), einer Phosphatase Inhibitor Tablette (PhosStop, Roche, Penzberg, Germany) und 60 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) zusammen.

100 µl dieses Gesamtlysepuffers wurden in der Folge jeder Zellkulturschale zugegeben und die Zellen im Anschluss mit einem Cellscrapper händisch abgekratzt. Die so entstandene Emulsion wurde mittels Pipette aufgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Bedarfsweise konnte diese Emulsion durch Ultraschallbehandlung zusätzlich homogenisiert werden.

Um die spätere relative Quantifizierung der einzelnen Proteine zu ermöglichen, musste vorher gewährleistet werden, dass alle Proben, die untersucht werden sollten, annähernd die gleiche absolute Proteinmenge enthielten. Um die absolute Proteinmenge, dieser Proben nun mittels photometrischer Absorptionsmessung zu bestimmen, wurden je 2 µl der Proben weiterhin mit 18 µl Ampuwa, 100 µl Reagenz A (BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) und weiteren 800 µl Reagenz B (BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) auf ein Gesamtvolumen von 920 µl vermischt und anschließend bei Raumtemperatur (+22 °C) für 15 Minuten inkubiert.

Proteinquantifizierung

Die photometrische Proteinbestimmung erfolgte dann in Analogie zur Lowry Methode. In einem alkalischen Milieu werden zweiwertige Kupferionen zunächst zu einwertigen Kupferionen reduziert. Diese positiv geladenen, einwertigen Kupferionen reagieren mit den negativ geladenen Proteinen und bilden einen Kupfer-Protein-Komplex. Dieser Komplex reduziert infolge seiner elektrochemischen Eigenschaften das gelbe Folin-Ciocalteu Reagenz, bestehend aus Molybdän- und Wolframheteropolysäure, welches als Farbindikator in der Mischung fungiert. Denn aus dem in der Lösung enthaltenen sechswertigen Molybdän entsteht vierwertiges Molybdänblau. Proportional zur Proteinkonzentration kommt es so zur tiefen Blaufärbung der Proben, in denen dann mittels Eichkurve die absolute Proteinkonzentration in Abhängigkeit der photometrisch bestimmten Absorption bestimmt werden kann. Die Kalkulation erfolgte automatisch am Photometer durch Doppelbestimmung und anschließender Mittelwerterhebung. Die so bestimmten Proteinmengen dienten als Grundlage für die folgende elektrophoretische Auftrennung.

Gelelektrophorese

Wie die meisten Makromoleküle, tragen auch Proteine aufgrund ihrer funktionellen Gruppen und Faltungsstruktur eine molekülspezifische Ladung. Im Verfahren der Elektrophorese wird diese Ladung genutzt, um Proteine nach ihrer molekularen Masse aufzutrennen. Da sich die Ladungen der Proteine aber unterscheiden und so eine reine Auftrennung nach der Molekülmasse erschweren, müssen die Ladungsverteilungen in einem ersten Schritt egalisiert

werden. Das Volumen von je 100 µg Proteinmasse wurde hierzu mit destilliertem Wasser (Braun, Frankfurt am Main, Deutschland) auf 20 µl aufgefüllt und mit 20 µl Ladepuffer versehen. Diese Proben wurden im Heizblock für 5 Minuten bei +95 °C gekocht, um die Proteine zu denaturieren. In der Folge wurde durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS, Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) die nicht-kovalenten intramolekularen Wechselwirkungen gestört und die Proteine somit vollständig entfaltet. Dadurch, dass unabhängig vom vorliegenden Protein SDS immer im gleichen Verhältnis gebunden wird, werden die Eigenladungen der Proteine überdeckt. Außerdem wurde den Proteinen Dithiothreitol (DTT, Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) zugegeben, ein potentes Reduktionsmittel. Strukturebend in vielen Proteinen sind sogenannte Disulfidbrücken. Diese Disulfidbrücken werden durch DTT reduziert. Dadurch wird die komplexe Architektur der Proteine aufgehoben und diese in ihrer Strukturchemie vereinheitlicht.

Durch diese Vereinheitlichung ist es in der Folge möglich die Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Hierfür wird an einem Polyacrylamidgel, das als Trägermedium diente, über eine bestimmte Zeit eine Spannung angelegt. Je kleiner ein Protein ist, desto weiter wird es durch die Spannung in derselben Zeiteinheit in Richtung der Anode getrieben. Um die Größenbestimmung der entstehenden Banden zu erleichtern, läuft ein Standardproteingemisch als Referenz mit, der sogenannte Größenmarker.

Die Polyacrylamidgele setzen sich aus einem Sammelgel und einem Trenngel zusammen. Die Bestandteile dieser Gele werden in der Folge genannt (Tabelle 18 und 19).

Die Trenngele setzten sich wie folgt zusammen:

Tabelle 18: Zusammensetzung der Trenngele

Bestandteil für ein 10%-iges Gel	Volumen
- H ₂ O	- 7,9 ml
- 30% acryl-bisacrylamide mix	- 6,7 ml
- 1,5 M Tris (pH 8,8)	- 5,0 ml
- 10% SDS	- 0,2 ml
- 10% Ammoniumpersulfat	- 0,2 ml
- TEMED	- 0,008 ml

Die Sammelgele setzten sich wie folgt zusammen:

Tabelle 19: Zusammensetzung der Sammelgele

Bestandteil	Volumen
- H ₂ O	- 3,4 ml
- 30% acryl-bisacrylamide mix	- 0,83 ml
- 1,5 M Tris (pH 6,8)	- 0,63 ml
- 10% SDS	- 0,05 ml
- 10% Ammoniumpersulfat	- 0,05 ml
- TEMED	- 0,005 ml

Die Gele wurden in 50 ml Reaktionsgefäßen gemischt und vorsichtig zwischen zwei, sich in einer Halterung im Abstand von 1,5 mm befindliche, Glasplatten pipettiert. Zunächst wurden die Trenngele eingebracht und nachdem diese gehärtet waren, anschließend die Sammelgele auf diese aufgetragen. In diese Sammelgele wurden Kämme gesteckt und das Aushärten abgewartet. Nachdem die Gele gehärtet waren, wurden die Kämme vorsichtig entfernt und die dadurch entstehenden Slots bedarfsweise von überschüssigen Gelresten gereinigt. Das Härten der Gele ist eine Folge der Polymerisation der Acrylamid-Monomere, die dadurch ein komplexes Gitter bilden, durch das die Proteine zukünftig hindurchwandern müssen.

Elektrophorese

Die fertigen Gele wurden nun mitsamt ihrer Haltevorrichtung in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese Kammer mit Elektrophoresepuffer (720 g Glycin, 151,5 g Tris, 50 g SDS auf 5.000 ml Ampuwa) gefüllt. Die Slots des Sammelgels wurden nun, dem vorher festgelegten Ladeplan folgend, mit 50 µg Protein pro Slot beladen. In den ersten Slot wurden immer 5 µl Marker gegeben. Dieser Marker enthielt gefärbte Proteine einer bekannten Größe, die später als Referenzgrößen herangezogen wurden. Die folgenden Slots wurden mit je 18 µl der entsprechenden Probe gefüllt (entsprach 50 µg Protein). Die Blot-Vorrichtung wurde nun an eine Stromquelle angeschlossen und die Elektrophorese mit einer Spannung von 80 Volt gestartet. Wenn sichtbar wurde, dass sich der Marker ganz links aufzutrennen begann (nach ca. 20 Minuten), wurde die Spannung an der Stromquelle auf 100 Volt erhöht und die Elektrophorese für 60-90 Minuten fortgesetzt.

Um die Sichtbarkeit der Proteinbanden zu gewährleisten, müssen diese in der Folge von den Gelen auf eine geeignete Membran übertragen werden. Dies erfolgt mittels Nass-Transfer durch einen Tank-Blot. Für diesen Tank-Blot wurde eine Schichtung aus einem schwarzen Schwamm, drei Filtern, dem Elektrophorese-Gel, einer Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0,2 µm; #1620112, BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) wieder vier Filtern und einem weißen Schwamm zwischen zwei schwarzen Lochplatten luftblasenfrei eingespannt. Diese Konstruktion wird anodenwärts gerichtet in den Tank gegeben, dieser in unserem Fall mit 1x TOWBIN (1.440 ml Ampuwa, 160 ml 10x TOWBIN (30,28 g Tris-Base, 114,13 g Glycin, auf 1.000 ml Ampuwa), 400 ml Methanol) aufgefüllt und bei 0,3 Ampere für 60-120 Minuten geblottet. Da theoretisch die Gefahr der Überhitzung besteht wird dem Tank zusätzlich ein Kühlakku zugegeben.

Nach dem Blotten wurde die Membran aus der Vorrichtung entnommen und in destilliertem Wasser gewaschen. Dies dient dem Entfernen von Methanolresten, welches in der Pufferlösung enthalten war. Um den Erfolg und die Qualität der Übertragung der Proteinbanden auf die Nitrozellulosemembran zu überprüfen erfolgte im Anschluss eine einminütige Färbung mit Ponceau Rot (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland). Dieser Farbstoff hat die Eigenschaft, die Proteine reversibel anzufärben. Ist eine zufriedenstellende Anfärbung erreicht worden, kann der Farbstoff durch mehrmaliges kurzes (5 Minuten) Waschen in PBS-T-Lösung (Phosphate-Buffered Saline: 137 mmol/L NaCl; 2,7 mmol/L KCl; 4,3 mmol/L Na₂HPO₄; 1,47 mmol/L KH₂PO₄, pH 7,4 mit 0,1% Tween) entfernt werden und die Membranen dann geblockt werden.

Das Blocken, welches dazu diente, freie Bindungsstellen der Membran durch Milchproteine zu besetzen und somit davor zu bewahren, dass sich zukünftig unspezifische Antikörperbindungen an ihnen ereignen, wird erreicht, indem die Membran auf einem Schüttler für 2 Stunden in 5% Milch (Magermilchpulver, TSI GmbH & Co. KG, Zeven, Deutschland) gelöst und dann in 1xPBS-T geschwenkt wird. Bei Bedarf wurde die Membran vor dem Blocken zugeschnitten, da durch die Ponceau Rot Färbung die Banden gleichmäßig zu sehen sind und so ein exaktes Zuschneiden ermöglichen.

Immundetektion

Um die Proteine spezifisch nachweisen zu können, wird eine Antigen-Antikörper Reaktion angeschlossen. Der Membran, auf der die Proteine aufgetragen sind, wird ein Antikörper spezifisch zugegeben, der ein bestimmtes Protein detektieren soll. Die Primärantikörper, die in verschiedenen Wirtsorganismen (z. B Maus (*mouse*), Hase (*rabbit*) etc.) hergestellt werden, binden zum einen spezifisch an die entsprechenden Epitope der Proteine, die nachgewiesen werden sollen, aber auch unspezifisch an andere freie Bindungsstellen. Die Primärantikörper (Tabelle 20) wurden in ihrer entsprechenden Verdünnung (z.B 1:1.000, 1:5.000, 1:10.000) in 7 ml 5% Milch in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und die Membranen darin über Nacht, in einem im Kühlschrank befindlichen Überkopf-Schüttler, bei +4 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Membranen zunächst je zweimal für 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Dadurch sollen die unspezifisch gebundenen Antikörper entfernt werden. Um im Anschluss die Sekundärantikörper (Tabelle 21) aufzutragen, wurden die Membranen in 50 ml 0,5% Milch gegeben und 5 µl des Sekundärantikörper dazugegeben, sodass ein Verhältnis von 1:10.000 resultierte. Die Sekundärantikörper richten sich gegen den Primärantikörper. Darüber hinaus sind die Sekundärantikörper mit Enzymen gekoppelt, die bei Reaktion mit den entsprechenden Indikatorsubstanzen luminisieren und somit ein Sichtbarwerden der Banden hervorrufen. Dieser Ansatz wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschgang für 5 Minuten in PBS-T und zwei Waschgänge für jeweils 10 Minuten in PBS-T. Die Membranen wurden kurz mit destilliertem Wasser gespült und in der Folge entwickelt. Zur Entwicklung wurden die Membranen, nachdem sie kurz getrocknet wurden, in je 1 ml ECL-Reagenz 1 und 1 ml Reagenz 2 (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) gelegt, gleichmäßig mit der Mischung benetzt und im Anschluss luftblasenfrei auf dem Tablett des Detektionsgerätes platziert. Diese Reagenzien enthalten Luminol und Wasserstoffperoxid. Die Sekundärantikörper sind mit dem Enzym Meerrettichperoxidase

gekoppelt. Diese Meerrettichperoxidase katalysiert nun die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid. Reagiert das reduzierte Luminol in der Folge mit dem Sauerstoff der Raumluft, kommt es zu einer chemischen Reaktion, bei der Licht emittiert wird, das mit der Detektionskamera des Fusion SL nachgewiesen werden kann. Die Auswertung erfolgte mittels FUSION-Software.

Tabelle 20: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller/Nr.
anti-BAK	1:1.000	Mouse	abcam, ab104124
anti-BAX	1:1.000	Rabbit	abcam, ab32503
anti-Catalase	1:1.000	Rabbit	Cell Signaling, #14097
anti-GAPDH	1:5.000	Mouse	Millipore, MAB374
anti-p53	1:1.000	Mouse	Santa Cruz, sc-17846
anti-SOD-1	1:5.000	Rabbit	Santa Cruz, sc-11407

Tabelle 21: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller/Nr.
anti-mouse-Antikörper	Biorad, Kat.Nr.: 170-6516
anti-rabbit-Antikörper	Biorad, Kat.Nr.: 172-1019

Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (*realtime PCR*)

Eine Polymerase Kettenreaktion ist ein hochspezifisches Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren (entweder Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA)). Die Amplifikation bietet die Möglichkeit bei Vergleichen mit Haushaltsgenen (Gene, die unabhängig der Stoffwechselsituation der Zellen exprimiert werden) herauszufinden, ob bestimmte Nukleinsäuren vermehrt oder vermindert gebildet wurden.

Einem wichtigen Paradigma der Biologie folgend entstehen während der Transkription der Gene zunächst eine mRNA (*messenger RNA*) und durch die Translation dieser mRNA dann ein Protein. Diese sogenannte Proteinbiosynthese ist eine komplexe Reihe vieler Mechanismen und enzymatischer Reaktionen und beansprucht je nach exprimiertem Protein unterschiedlich viel Zeit. Änderungen auf Ebene der RNA zeigen sich dagegen schon früher. Daher ist es ratsam neben der Detektion spezifischer Proteine auch deren Vorstufen zu analysieren und zu quantifizieren. Dies ist mittels PCR möglich.

Die PCR beruht auf den Mechanismen der zellulären DNA-Replikation, wird aber *in vitro* durchgeführt. Zuerst wird die doppelsträngige DNA, das sogenannte Template (von englisch *template* die Schablone) durch Hitze getrennt. Anschließend synthetisiert eine DNA-Polymerase an jedem Einzelstrang in jeweils eine Richtung einen neuen Tochterstrang. Durch mehrfache Wiederholungen dieser Reaktion wird ein spezifisch festgelegter DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt, das heißt amplifiziert. Schon sehr kleine Mengen Ausgangs-DNA genügen für die erfolgreiche Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes, da die Reaktion hochspezifisch abläuft und eine enorme Vervielfältigung stattfindet.

Zu Beginn des ersten Reaktionszyklus enthält der Reaktionsansatz folgendes: doppelsträngige Ausgangs-DNA, vier verschiedene Nukleotide als Bausteine der DNA (im Einzelnen: desoxyAdenintriphosphat, desoxyGuanintriphosphat, desoxyCytosintriphosphat und desoxyThymidintriphosphat) und DNA-Polymerasen, wobei man eine besondere, hitzestabile DNA-Polymerase verwendet. Diese sind auch nach dem Erhitzen auf hohe Temperaturen, die zur Denaturierung der DNA erforderlich sind, noch reaktionsfähig. Solche Polymerasen stammen aus thermophilen Bakterien, so zum Beispiel die Taq-Polymerase aus *thermus aquaticus*. Schließlich enthält der Reaktionsansatz noch zwei verschiedene sogenannte Primer. Das sind zwei kurze Oligonukleotide unterschiedlicher Nukleotidsequenz die der DNA-Polymerase als Anknüpfungspunkt für das nächste passende Nukleotid dienen. Jeder Primer begrenzt einen zu amplifizierenden DNA-Strang in eine Richtung.

Die Reaktion läuft folgendermaßen ab: Die Temperatur wird zuerst auf +90 °C erhöht, wodurch die DNA denaturiert und sich in Einzelstränge auftrennt. Im nächsten Schritt wird die Temperatur auf die sogenannte *Annealing*-Temperatur (von englisch *annealing* schmelzen) von +50-60 °C gesenkt. Jetzt können sich die Primer an die komplementären DNA-Sequenzen anlagern. In der nun folgenden Elongationsphase wird die Temperatur wieder auf +70 °C erhöht. Dies ist die optimale Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase, bei der sich die Nukleotide an die Primer anhängen. Jeder Primer wird immer nur an seinem 3'OH-Ende verlängert, dem Anknüpfungspunkt für das nächste komplementäre Desoxyribonukleotid.

Auf diese Art und Weise werden in jedem Zyklus, der abläuft, die vorhandenen spezifischen DNA-Fragmente verdoppelt.

RNA-Isolation

Die PCR ist eine sehr sensitive Nachweismethode und daher anfällig für Störungen durch Verunreinigungen. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass die Proben, die untersucht werden, gut vorbehandelt werden und möglichst von anderen Inhaltsstoffen gereinigt werden. Zur Homogenisierung und Phasentrennung wurden den Zellkulturschalen zu diesem Zweck zunächst 1000 µl Omega RNA-Solv Reagent (OmegaBio-TeK Inc., Norcross, Georgia, USA) zugegeben und die Zellen wurden in der Folge mittels Cellscaper mechanisch von der Platte gelöst, abgeschabt und mittels Pipette in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Diese Reaktionsgefäße wurden bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert und dann wurde jedem Reaktionsgefäß 200 µl Chloroform zugegeben und die Mischung mithilfe eines Vortex gut vermischt. Durch Zugabe des Omega RNA-Solv Reagent kommt es zur Homogenisierung und Lyse der Proben. Dies bedeutet, dass die RNA strukturell erhalten bleibt, die restlichen Proteine und Enzyme (so auch RNAsen) jedoch denaturiert werden. Das Hinzugeben von Chloroform führt dann im weiteren Verlauf zu einer weiteren Denaturierung sowie Trennung der Suspension in eine organische und eine wässrige Phase. Nach einer erneuten Inkubationsphase von 15 Minuten wurden die Proben für 10 Minuten bei 13.000 Umdrehungen/Minute in einer auf +4 °C gekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Durch die Zentrifugation trennen sich im Reaktionsgefäß drei Phasen voneinander. Die oberste wässrige Phase, in der die RNA enthalten ist, wurde entnommen, direkt auf Eis gestellt und der Rest wurde in einem halogenhaltigen Abfall verworfen.

Um die RNA in der Folge zu präzipitieren, wurde der wässrigen Phase jeweils 500 µl Isopropanol (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) zugegeben. Und die neu entstandene Mischung zuerst auf Eis gefällt und dann für 60 Minuten bei 13.000 Umdrehungen/Minute in einer auf +4 °C gekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Der sich abhebende Isopropanol-Überstand wurde abgenommen und das zurückbleibende Pellet mit 1 ml 75% Ethanol-Aqua gemischt. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 13.000 Umdrehungen/Minute bei +4 °C. Nun wurden alle Flüssigkeitsreste abgesaugt und die Proben optional an der Luft zum Trocknen kurz stehengelassen.

Anschließend wurden 50 µl destilliertes Wasser zu jeder Probe zugegeben und die Proben für 5 Minuten bei +60 °C im Thermoschüttler inkubiert. Dadurch lösen sich die Probenpellets vollständig auf und machen somit eine nachfolgende Quantifizierung erst möglich. Die folgende Quantifizierung der RNA-Menge erfolgt mittels NanoDrop Software. Je 1 µl der

Proben wird photometrisch auf den Gehalt an RNA geprüft. Als Referenzwert dient eine Leermessung mit DEPC-H₂O. Zwischen jeder Messung wurde das Gerät mit einem feinen Zellstofftuch geeinigt.

Die so ermittelten RNA-Konzentrationen in den Proben wurden dafür verwendet ein Volumen von 2 µg RNA in ein neues Reaktionsgefäß zu überführen und mit destilliertem Wasser auf 10 µl aufzufüllen.

Da es zu Verunreinigungen der RNA mit DNA-Resten kommen kann, schließt sich in der Folge ein Arbeitsschritt an, in dem dieser DNA-Rest abgebaut werden sollte. Hierfür wurde den Proben (2 µg/10 ml) jeweils 10 µl eines Mastermix (Tabelle 22) zugegeben. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 22: Zusammensetzung des Mastermix zum DNase-Verdau

Substanz	Menge
Aqua ad (Braun) – H ₂ O	5,5 µl
DNase I + MgCl ₂ Buffer	2 µl
DNase I	2 µl
RNAse Inhibitor (aus RT KIT)	0,5 µl

Der RNAse-Inhibitor (VWR International GmbH, Darmstadt Deutschland) dient dabei dazu, die RNAse am Abbau der RNA, die analysiert werden soll, zu hindern. Die DNase I (VWR International GmbH, Darmstadt Deutschland), die zugegeben wird, verdaut die DNA und reinigt somit die Proben von diesen überschüssigen Nukleinsäuren. Das zugegebene Magnesiumchlorid ist ein wichtiger Kofaktor in den Katalysen der Endonukleasen.

Die Mischung aus Proben und Mastermix wurde anschließend in einen Thermozykler (peqStar Universal 96, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) gegeben, der eine Reihe von Reaktionsschritten katalysierte, indem die Temperatur moduliert wurde.

Dieser Mix wird in einem Thermocycler (VWR) mit folgendem Programm inkubiert:

Step 1 (Annealing)	+25 °C	10 min
Step 2 (Elongation)	+37 °C	120 min
Step 3 (Termination)	+85 °C	5 min
Storage	+4 °C	Unendlich

cDNA-Synthese

Die gereinigten Proben konnten in der Folge weiterverarbeitet werden. Aus reiner RNA sollten komplementäre DNA-Stränge (*copy* DNA – cDNA) synthetisiert werden. Die hierfür benötigten Substrate sind folgende (Tabelle 23):

Tabelle 23: Zusammensetzung der Substrate zur cDNA-Synthese

Substrat	Menge
10x RT Puffer	2 µl
25x dNTP Mix	0,8 µl
10x RT Random Primers	2 µl
Multiscribe Reverse Transkriptase	1 µl
RNAse Inhibitor	1 µl
Aqua ad (Braun) – H ₂ O	3,2 µl

Aus den Substraten wurde ein neuer Mastermix hergestellt und 10 µl dieses Mastermix wurden den gereinigten RNA-Proben zugegeben. Erneut im Mastermix enthalten war der RNAse-Inhibitor (VWR International GmbH, Darmstadt Deutschland), um zu verhindern, dass die RNA abgebaut wurde. Durch die Reverse Transkriptase wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Um die Startstelle der Polymerisierung erkennen zu können werden sogenannte Primer benötigt. Zur Synthese der cDNA dienten die Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin, die in dem dNTP-Mix enthalten waren. Der RT-Puffer stellte optimale pH Milieus für die Reverse Transkriptase her. Die Mischung aus Mastermix und Proben wurde erneut in den Thermozykler gegeben. Durch Erwärmung und Abkühlung der Proben nach einem festgelegten Schema wurde die Katalyse durch die Reverse Transkriptase unterstützt und beschleunigt.

Dieser Mix wird in einem Thermocycler (VWR) mit folgendem Programm inkubiert:

Step 1 (Annealing)	+25 °C	10 min
Step 2 (Elongation)	+37 °C	120 min
Step 3 (Termination)	+85 °C	5 min
Storage	+4 °C	Unendlich

Die cDNA wurde in unseren Versuchen für Real-Time PCRs eingesetzt. Aufbewahrt wurde sie bei -20 °C.

Im letzten Schritt wird die so synthetisierte cDNA quantitativ analysiert. Hierfür wurde zunächst die cDNA-Proben mit 80 µl destilliertem Wasser auf 1:5 verdünnt. Je 1 µl dieser Verdünnung wurde dann zusammen mit 19 µl eines Mastermix (Tabelle 24), der diejenige *Gene expression assay* Sonde (Tabelle 25) enthält, deren Gen untersucht werden soll, auf einer Mikrotiterplatte aufgetragen. Dieser Mastermix setzte sich aus den folgenden Substraten zusammen:

Tabelle 24: Zusammensetzung des Mastermix zur quantitativen cDNA-Analyse

Substrat	Menge
Destilliertes Wasser	14,5 µl
TaqMan MasterMix	5 µl
Gene expression assay Sonde	0,5 µl

Die Platte wurde, nachdem alle Proben aufgetragen wurden, mit einer Folie versiegelt und anschließend bei 600 Umdrehungen/Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Die zentrifugierte Platte wurde dann in das StepOne realtime PCR-System eingespannt und analysiert.

Tabelle 25: Verwendete Gene expression assay Sonden

Gene	Sondennummer
GAPDH	Hs99999905_m1
IL-6	Hs00174131_m1
TNF α	Hs00174128_m1

Quantitative Realtime-PCR mittels spezifischer TaqMan-Sonden [67]

Bei der quantitativen Real-Time PCR werden fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt, mit deren Hilfe der Nachweis und die Quantifizierung der PCR-Produkte möglich ist. Die Fluoreszenzen können dabei mittels spezieller Leuchtdioden (LED) Lampen im rt-PCR-Gerät nachgewiesen werden. Ähnlich wie bei der traditionellen PCR, werden auch bei der rt-PCR sequenzspezifische komplementäre Sonden verwendet. Die beigefügte DNA-Polymerase bindet an die Sonde und ermöglicht die Elongation des DNA-Strangs. Ist die Elongation beendet, löst sich die Polymerase, was den *Quencher* (das Fluoreszenzmolekül) freisetzt. Ein Quencher, entspricht also einem Kopiervorgang in einem direkt proportionalen Verhältnis (und gleichzeitig hoch sensitiv). Überschreitet, die so generierte DNA-Menge einen Schwellenwert (Baseline), kann eine PCR-Exponentialkurve abgeleitet werden. Der Exponentialfunktion

entsprechend steigt auch die Geschwindigkeit der Vervielfältigung mit jedem Schritt. Von besonderer Bedeutung ist hierbei der sogenannte *Cycle Threshold* Wert (CT-Wert). Dies ist der Zyklus, an dem die Amplifikation ihr Geschwindigkeitsoptimum erreicht. Hiernach fällt die Steigung der Kurve wieder ab, da die notwendigen Synthesubstrate aufgebraucht wurden. Die jeweilige Genexpression wird dann auf die Expression eines *Housekeeping* Gens (in unserem Fall Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)) normiert.

Statistische Analyse

Alle normalverteilten Werte sind als Mittelwert±Standardabweichung (SD) angegeben und alle nicht normalverteilten Werte als Median und Interquartilsabstand (IQR). Der Shapiro-Wilk Test wurde zur Analyse der Normalverteilung verwendet. Der Student's t-Test, der unpaare t-Test, der Mann–Whitney-U Test und eine *one way analysis of variance* (ANOVA) wurden für Intergruppenvergleiche eingesetzt. Post-hoc multiple Vergleichstests wurden entsprechend der Bonferroni-Methode adjustiert. Die statistischen Analysen wurden mittels STATA Version 16.1 (StataCorp, College Station, Texas, USA) und GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt. Ein zweiseitiger p-Wert <0.05 wurde als statistisch signifikant festgelegt.

4. ERGEBNISSE

4.1 IN VIVO ERGEBNISSE

Zwischen Januar und Juli 2021 wurden 30 freiwillige Teilnehmer in die Studie eingeschlossen. Ein Drittel (10/30) waren weiblich, das mediane Alter betrug 25 Jahre (IQR 22-29), das durchschnittliche Gewicht betrug 72±12 kg. Obwohl die Teilnehmer randomisiert wurden, hatten Teilnehmer der Placebogruppe niedrigere Serum Natriumkonzentrationen (139±2 vs. 142±2 mmol/L; p<0,01) und höhere Serum Vitamin D-Spiegel (29 ng/ml IQR 18-38 vs. 13 ng/ml IQR 12-20; p<0,01). Tabelle 26 fasst die wesentlichen Charakteristika der Probanden zusammen.

Tabelle 26: Baselinecharakteristika der Studienteilnehmer

Werte sind Mittelwerte (SD), Median (IQR) oder Zahlen (%)	Gesamtkohorte n=30	HCT n=20	Placebo n=10	p-Wert
Alter, Jahre, Median (IQR)	25 (22; 29)	24,5 (22; 28,5)	26,5 (21; 29)	0,88
Männer, n (%)	20 (67)	14 (70)	6 (60)	0,69
Größe, cm, Mittelwert (SD)	176 (8)	176 (8)	177 (9)	0,94
Gewicht, kg, Mittelwert (SD)	71 (12)	72 (13)	71 (12)	0,77
Körpermassenindex, kg/m ² , Mittelwert (SD)	23 (3)	23 (3)	23 (3)	0,68
Hauttyp Score, Mittelwert (SD)	28 (6)	28 (6)	28 (5)	0,91
Raucher, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1,00
eGFR, ml/min/1,73 m ² , Median (IQR)	118 (105; 126)	121 (111; 127)	115 (99; 118)	0,15
SBP, mmHg, Mittelwert (SD)	134 (12)	133 (12)	135 (12)	0,79
DBP, mmHg, Mittelwert (SD)	80 (8)	79 (7)	81 (9)	0,37
Vitamin D, ng/ml, Median (IQR)	17 (13; 23)	13 (12; 20)	29 (18; 38)	<0,01
Natrium, mmol/L, Mittelwert (SD)	140 (2)	141 (2)	139 (2)	<0,01
Kalium, mmol/L, Mittelwert (SD)	3,97 (0,22)	4,00 (0,19)	3,91 (0,26)	0,29

(DBP – diastolischer Blutdruck, eGFR – geschätzte glomeruläre Filtrationsrate, IQR – Interquartilsabstand, SD - Standard Abweichung, SBP - systolischer Blutdruck)

Änderungen der Lichtempfindlichkeitsschwelle (MED-UVA und MED-UVB)

Die Lichtempfindlichkeitsschwelle im UVA-Bereich (MED-UVA) änderte sich weder in der HCT-Gruppe noch in der Placebogruppe (Delta zwischen Baseline und Tag 15 in beiden Gruppen, $0,0 \text{ J/cm}^2$; $p=0,99$). Die Lichtempfindlichkeitsschwelle für UVB-Licht (MED-UVB) änderte sich nicht in der HCT-Gruppe (Delta zwischen Baseline und Tag 15, $0,0 \text{ J/cm}^2$; $p=0,86$), und nahm in der Placebogruppe signifikant ab (Delta zwischen Baseline und Tag 15, $0,2 \text{ J/cm}^2$; $p=0,04$) (Abbildung 6). Der Intergruppenvergleich zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,06$).

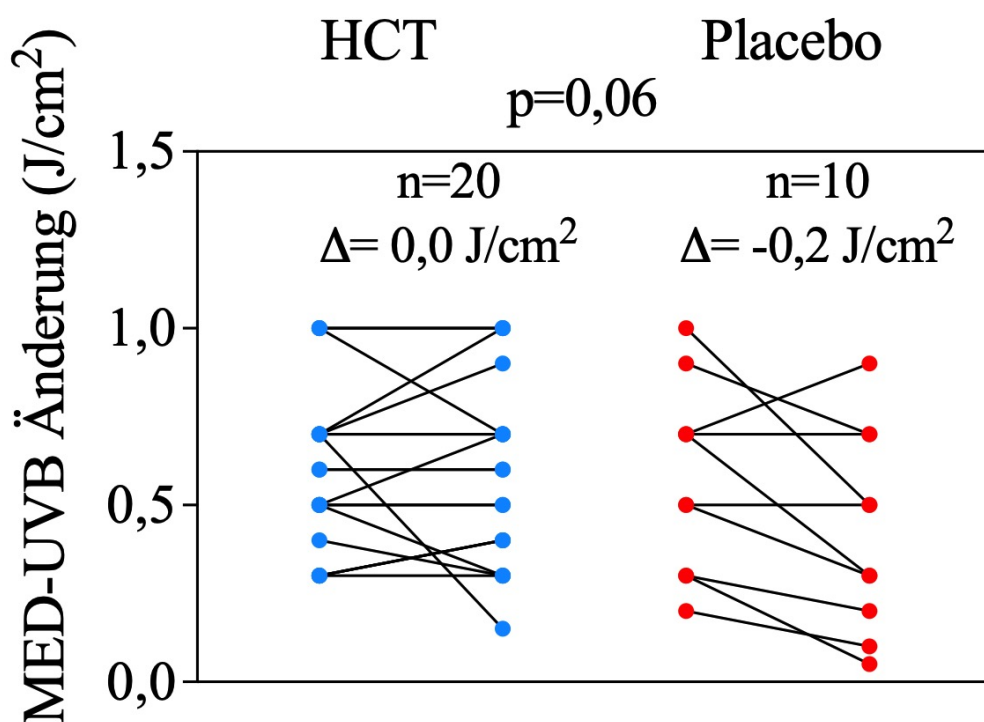


Abbildung 6: Vorher-Nachher-Blot der Minimalen Erythem-Dosis im UVB-Bereich

(D – Tag, HCT – Hydrochlorothiazid, MED – Minimale Erythemdosis, UVB – Ultraviolettes Licht Typ B)

Blutdruckänderungen

Der SBP nahm vom Untersuchungsbeginn verglichen mit Tag 23 signifikant um $5,2 \pm 9,2$ mmHg ($p=0,02$) in der HCT-Gruppe bzw. um $5,4 \pm 7,3$ mmHg ($p=0,05$) in der Placebogruppe ab. Der Intergruppenvergleich zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,94$) (Abbildung 7). Der DBP nahm um $4,3 \pm 6,1$ mmHg signifikant in der HCT-Gruppe ab ($p=0,05$). In der Placebogruppe hingegen zeigte sich keine Änderung ($1,9 \pm 6,6$ mmHg, $p=0,41$). Der Intergruppenvergleich zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,34$) (Abbildung 7).

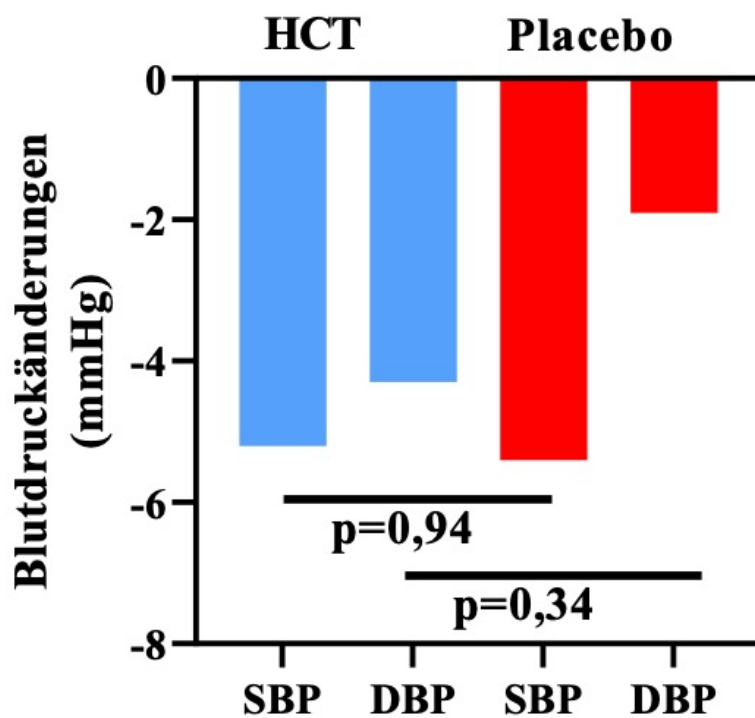


Abbildung 7: Änderungen des Blutdrucks

(DBP – diastolischer Blutdruck, HCT – Hydrochlorothiazid, SBP – systolischer Blutdruck)

Vitamin D-Spiegel im Serum

In der HCT-Gruppe stieg der Serum Vitamin D-Spiegel um 3,1 ng/ml (IQR 1,3-5,1; $p < 0,01$) signifikant an. In der Placebogruppe stieg der Serum Vitamin D-Spiegel nicht signifikant um 1,2 ng/ml (IQR -1,8-3,4; $p = 0,42$) an (Abbildung 8). Der Intergruppenvergleich zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,52$).

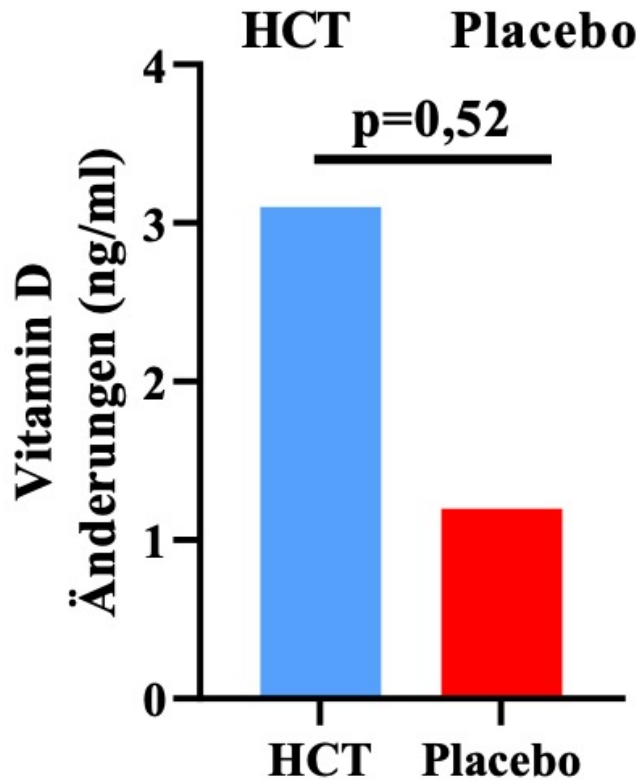


Abbildung 8: Änderungen der Serum Vitamin D-Spiegel

(HCT – Hydrochlorothiazid)

Nierenretentionswerte und Blutelektrolyte

Die Serumelektrolyte (Natrium und Kalium) änderten sich nicht durch die HCT- oder Placebo-Therapie und es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Änderungen des Serum-Natrium HCT $-0,4 (\pm 1,84)$ mmol/L, Placebo $+0,44 (\pm 1,87)$ mmol/L; für Intergruppenvergleich $p=0,27$; Änderungen des Serum-Kalium HCT $+0,11 (\pm 0,27)$ mmol/L, Placebo $-0,11 (\pm 0,26)$ mmol/L; für Intergruppenvergleich $p=0,05$). Auch die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) zeigte keine Änderung in beiden Gruppen (Änderung des Serum-Kreatinins HCT $-0,027 (\pm 0,095)$ mg/dl, Placebo $+0,014 (\pm 0,067)$ mg/dl; für Intergruppenvergleich $p=0,25$; Änderung der eGFR HCT $-6,07 (\pm 7,69)$ ml/min/1,73 m², Placebo $-4,65 (\pm 9,30)$ ml/min/1,73 m²; für Intergruppenvergleich $p=0,69$) (Abbildung 9).

Adhärenz

Alle Teilnehmer waren adhärenz zur Studienmedikation, was mittels toxikologischer Analysen (via UHPLC-HRMS/MS) von Urin-, Speichel- und Blutproben sichergestellt wurde.

Pyrimidindimere

In beiden Gruppen konnten mittels UHPLC-HRMS/MS keine Pyrimidindimere im Urin nachgewiesen werden.

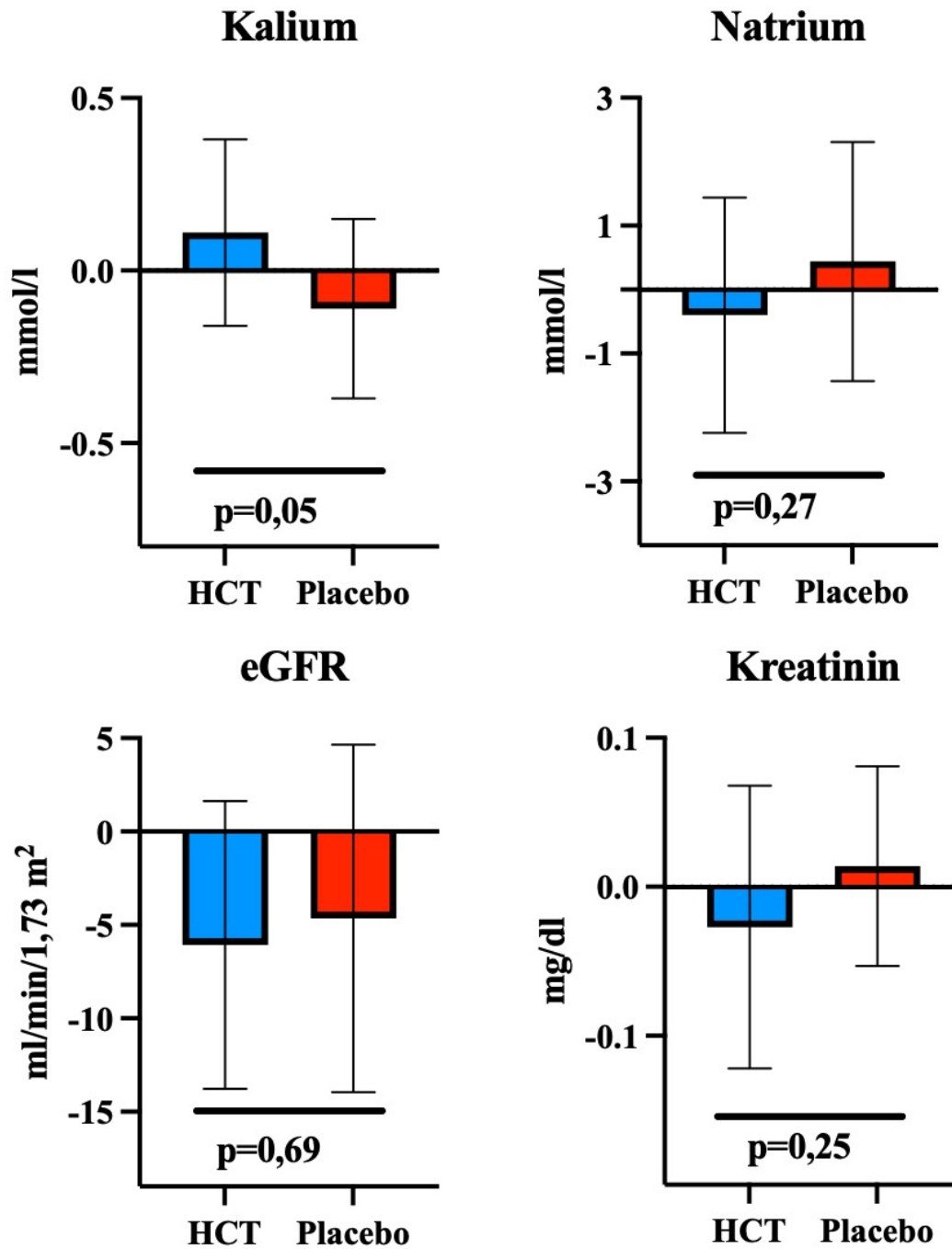


Abbildung 9: Änderungen der Nierenretentionsparameter und Serumelektrolyte (eGFR – geschätzte glomeruläre Filtrationsrate, HCT – Hydrochlorothiazid)

4.2 IN VITRO ERGEBNISSE

Da in den klinischen Experimenten keine Hautreaktionen auf UVA-Licht zu dokumentieren waren, konzentrierten sich die präklinischen Experimente auf die Interaktionen von HCT mit UVB-Licht. Zunächst wurde die Sensitivität der HaCaT Zellen auf UVB-Licht in einem Pilotexperiment nachgewiesen. Eine einmalige Bestrahlung der Zellen mit 100 J/m^2 führte 24 Stunden nach der Bestrahlung zu einer vermehrten Expression der inflammatorischen Markergene Interleukin 6 (IL-6) (relative mRNA-Expression/GAPDH in nichtbehandelten HaCaT Zellen $1,82 \pm 0,6$ vs. $7,54 \pm 2,1$ in Zellen, die mit 100 J/m^2 UVB beleuchtet wurden; $p=0,03$) und dem Tumor Nekrosis Faktor alpha ($\text{TNF}\alpha$) (relative mRNA-Expression/GAPDH in nichtbehandelten HaCaT Zellen $1,31 \pm 0,4$ vs. $4,20 \pm 0,7$ in Zellen, die mit 100 J/m^2 UVB beleuchtet wurden; $p=0,01$) (Abbildung 10).

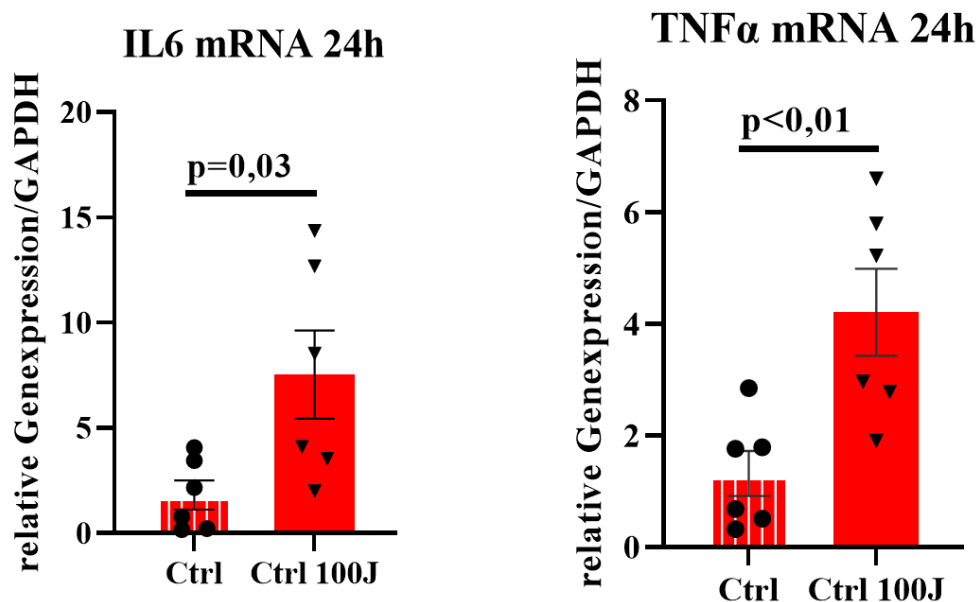


Abbildung 10: Relative mRNA-Expression der inflammatorischen Markergene IL-6 und $\text{TNF}\alpha$

(Ctrl - Kontrollgruppe, Ctrl 100J – Kontrollgruppe mit Bestrahlung, IL 6 - Interleukin 6, $\text{TNF}\alpha$ - Tumor Nekrosis Faktor alpha, J - Joule, GAPDH - Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)

Im Anschluss wurden 4 Gruppen gebildet, die miteinander verglichen wurden: 1.) HaCaT Zellen, die mit 1 mmol/L HCT inkubiert und dann mit 100 Joule (J) beleuchtet wurden (HCT+100J), 2.) HaCaT Zellen, die nur mit 1 mmol/L HCT inkubiert wurden (HCT), 3.) HaCaT-Zellen, die nur beleuchtet wurden (Ctrl + 100J) 4.) HaCaT Zellen, die als Kontrolle

dienten und nicht behandelt wurden (Ctrl). Zur Analyse der Genexpression wurden zwei Zeitpunkte gewählt, 6 Stunden nach Bestrahlung und 24 Stunden nach Bestrahlung.

Sechs Stunden nach einer UVB- Bestrahlung wurde die Phosphorylierung des Onkoproteins p53 (pp53) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe in Ctrl+100J nicht vermehrt hochreguliert ($1,57 \pm 0,2$ IOD/GAPDH; $p=0,59$ vs. Ctrl). Die Kombination aus HCT und Bestrahlung führte jedoch zu einer Hochregulation von pp53 (HCT+100J: $1,83 \pm 0,32$ IOD/GAPDH; $p < 0,01$ vs. HCT). Der Vergleich zwischen HCT+100J und Ctrl+100J zeigte jedoch keinen additiven Effekt von HCT ($p=0,99$ vs. Ctrl+100J). Ferner blieb die Gesamtexpression des nicht-phosphorylierten Onkoproteins p53 in allen Gruppen unverändert (Ctrl+100J: $1,23 \pm 0,44$ vs. HCT+100J $1,33 \pm 0,47$ IOD/GAPDH; $p=0,74$) (Abbildung 11). Auch nach 24 Stunden änderte sich die Expression der Proteine p53 und pp53 nicht signifikant durch die Kombination aus HCT und Bestrahlungstherapie (Abbildung 12).

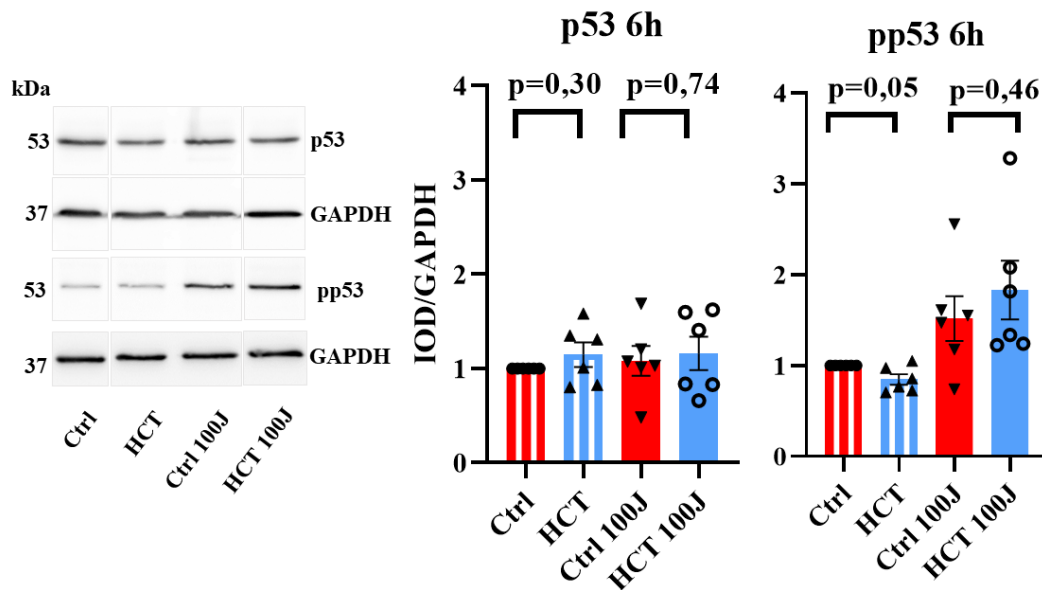


Abbildung 11: Proteinexpression des Onkoprotein p53 und dessen phosphorylierten Zustandes pp53 nach 6 Stunden

(Ctrl – Kontrollgruppe, Ctrl 100J – Kontrollgruppe mit Bestrahlung, GAPDH – Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, HCT – Hydrochlorothiazid, HCT 100J – Hydrochlorothiazid und Bestrahlung, IOD – Integrated Optical Density, J – Joule, p53 – Tumorsuppresorprotein 53, pp53 – phosphoryliertes Tumorsuppresorprotein 53)

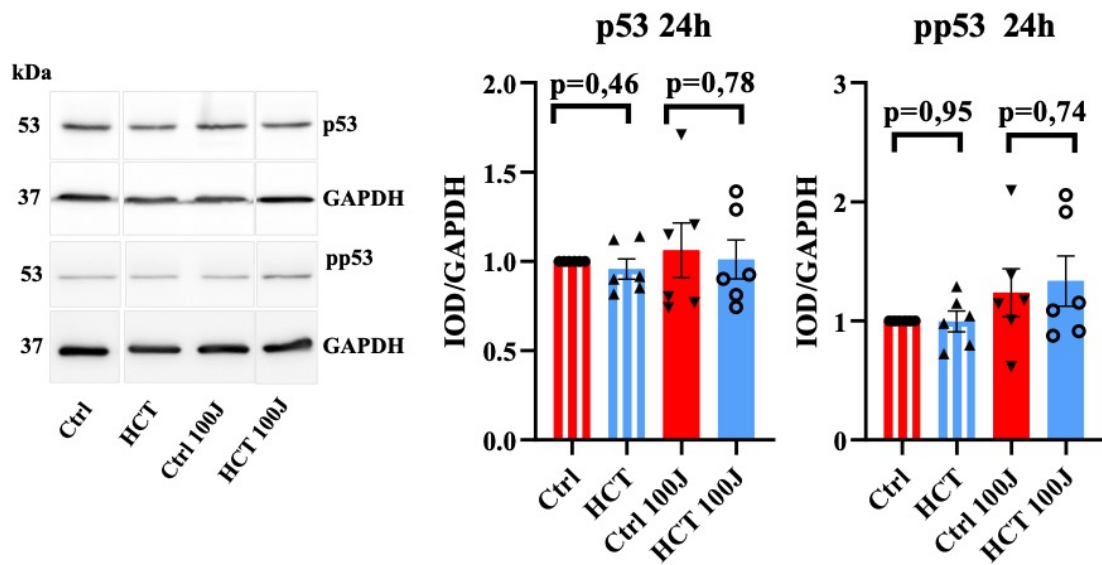


Abbildung 12: Proteinexpression des Onkoproteins p53 und dessen phosphorylierten Zustandes pp53 nach 24 Stunden

(Ctrl – Kontrollgruppe, Ctrl 100J – Kontrollgruppe mit Bestrahlung, GAPDH - Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, HCT – Hydrochlorothiazid, HCT 100J – Hydrochlorothiazid und Bestrahlung, IOD – Integrated optical density, J – Joule, p53 – Tumorsuppresorprotein 53, pp53 – phosphoryliertes Tumorsuppresorprotein 53)

24 Stunden nach der Bestrahlung blieb die Expression von SOD-1 und Katalase, zwei Proteinen, die reaktive Sauerstoffspezies reduzieren, durch HCT-Therapie unverändert (SOD 1: Ctrl+100J: $1,55 \pm 0,66$ vs. HCT+100J: $1,35 \pm 0,52$ IOD/GAPDH; $p=0,60$) (Catalase: Ctrl+100J: $1,15 \pm 0,24$ vs. HCT+100J: $1,21 \pm 0,47$ IOD/GAPDH; $p=0,81$) (Abbildung 13).

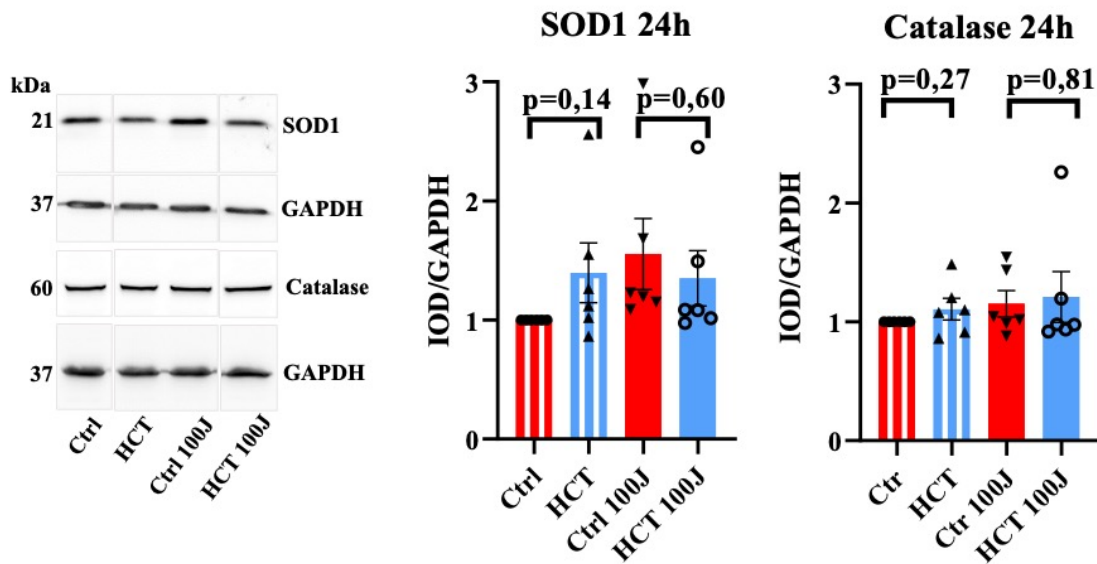


Abbildung 13: Proteinexpression der Proteine SOD-1 und Catalase nach 24 Stunden

(Ctrl – Kontrollgruppe, Ctrl 100J – Kontrollgruppe mit Bestrahlung, GAPDH - Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, HCT – Hydrochlorothiazid, HCT 100J – Hydrochlorothiazid und Bestrahlung, IOD – Integrated optical density, J – Joule, SOD-1 – Superoxiddismutase 1)

Die Expression pro-apoptotischer Markerproteine, Bax und Bak, wurde numerisch durch UVB-Bestrahlung erhöht, während ihre Ausprägung durch eine zusätzliche HCT-Behandlung sogar vermindert wurde (Bax: Ctrl+100J: $1,37 \pm 0,18$ vs. HCT+100J: $1,06 \pm 0,20$ IOD/GAPDH; $p=0,03$) (Bak: Ctrl+100J: $1,85 \pm 0,88$ vs. HCT+100J: $1,14 \pm 0,29$ IOD/GAPDH; $p=0,11$) (Abbildung 14).

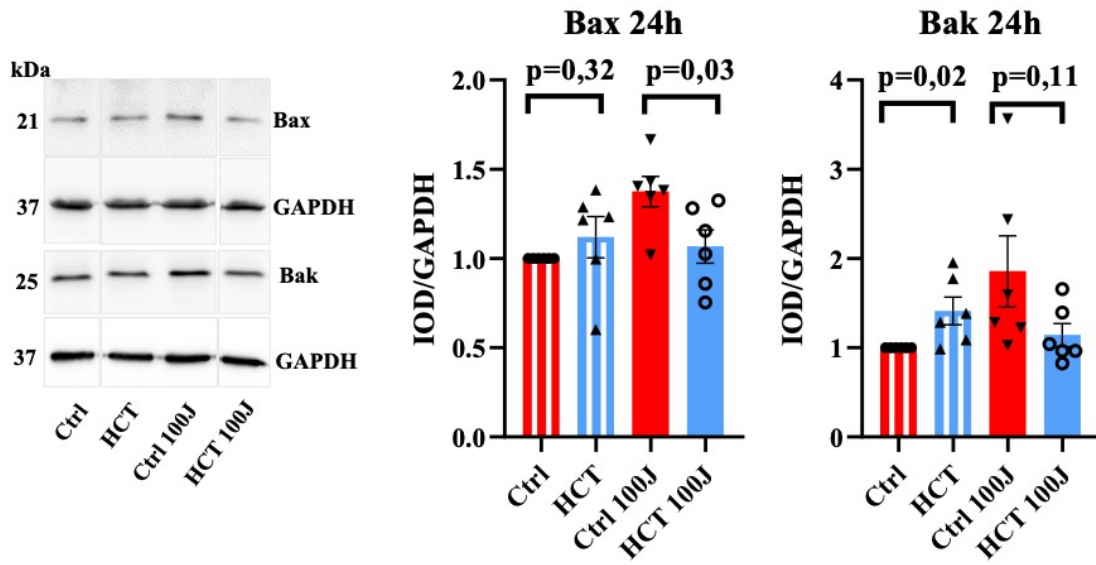


Abbildung 14: Proteinexpression der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak

(Bak - *Bcl-2 homologous antagonist killer protein*, Bax - *Bcl-2-associated X protein*, Ctrl – Kontrollgruppe, Ctrl 100J – Kontrollgruppe mit Bestrahlung, GAPDH - Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, HCT – Hydrochlorothiazid, HCT 100J – Hydrochlorothiazid und Bestrahlung, IOD – Integrated optical density, J – Joule)

5. DISKUSSION

Dies war eine zweigeteilte, translationale Arbeit. Im ersten Teil, einer randomisierten, Placebo-kontrollierten, doppelblinden Studie konnte gezeigt werden, dass eine Kurzzeithherapie mit einer kumulativen Dosis von 375 mg HCT über einen Zeitraum von 15 Tagen keine Änderungen der Lichtempfindlichkeitsschwelle für UVA- und UVB-Licht in 20 gesunden Probanden hervorrief. In dieser HCT Therapiedauer und -dosis zeigten sich keine Hinweise auf fotosensibilisierende Eigenschaften. Ferner konnten keine Pyrimidindimere im Urin der Probanden nachgewiesen werden. Pyrimidindimere sind Abbauprodukte der Nukleotidexzisionsreparatur und könnten somit als Surrogatparameter für die Entstehung von UV-induzierten DNA-Schäden in der Haut dienen. HCT war in dieser Analyse nicht mit der Bildung von Pyrimidindimeren assoziiert.

Diese Ergebnisse werden von den *in vitro* Experimenten im zweiten Teil dieser Arbeit gestützt. Eine Bestrahlung von unbehandelten HaCaT Zellen führte zur vermehrten Expression von inflammatorischen Markergenen (IL-6 und TNF α). Wurden HaCaT Zellen vor der Bestrahlung mit HCT behandelt konnten allerdings keine vermehrte Expression von Onkoproteinen (wie p53 und pp53) oder Proteinen, die an der antioxidativen Kapazität der Zelle beteiligt sind und die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) reduzieren (SOD-1, Catalase), nachgewiesen werden. Die Kombination von HCT mit einer hochenergetischen UVB-Bestrahlung potenzierte nicht die schädlichen Folgen der alleinigen Bestrahlung.

Seit der Markteinführung von HCT vor über 60 Jahren steht die Substanz im Verdacht fotosensibilisierend und fototoxisch zu sein [2]. Es wird vermutet, dass Thiaziddiuretika und Thiazid-ähnliche Diuretika infolge ihrer chemischen Struktur mit Sulfonamidgruppen und halogenierten aromatisierten Kohlenwasserstoffen Photonen absorbieren können und an die umliegenden Gewebe abgeben können, was dann zu strukturellen Schäden im Gewebe führen kann [56]. Ferner zeigen pharmakoepidemiologische Studien, dass HCT insbesondere in europäischen Populationen mit einer erhöhten Inzidenz an Hautkrebs assoziiert ist [1,24,26,31,41,53,59,61,62,64,77,87,88,93–95]. In diesen Studien wurde besonders auf die scheinbare Dosisabhängigkeit hingewiesen, denn vor allem langjährige Einnahmen von >25.000-50.000 mg waren mit einer erhöhten Auftretenswahrscheinlichkeit von Hautkrebs verbunden [71]. Dies führte dazu, dass die EMA zusammen mit nationalen Behörden, wie dem BfArM, eine offizielle Warnung veröffentlichte, in der auf die potenziellen kanzerogenen Einflüsse von HCT hingewiesen wurde. Ausschlaggebend für die Veröffentlichung des Rote-Hand-Briefes waren insbesondere zwei Fall-Kontroll-Studien aus Dänemark: Pedersen et al. veröffentlichten Daten, die HCT mit einer adjustierten Risikoerhöhung von 1,29 (95%

Konfidenzintervall: 1,23-1,35) für Basalzellkarzinome bzw. von 3,98 (95% Konfidenzintervall: 3,68-4,31) für spinozelluläre Karzinome assoziierten [88]. Zum anderen wurde eine Studie von Pottegard et al. veröffentlicht, die ein 2,1-fach erhöhtes Risiko für das Auftreten von Lippenkarzinomen (95% Konfidenzintervall: 1,7-2,6) mit einer langjährigen HCT-Therapie assoziierten. Besonders hervorzuheben an dieser Studie ist die Dosis-Wirkungs-Beziehung, denn höhere kumulative Dosen von HCT gingen mit einem höheren Risiko für das Auftreten von Lippenkrebs einher (≥ 25.000 mg: OR 3,9; 95% Konfidenzintervall: 3,0-4,9; ≥ 100.000 mg: OR 7,7; 95% Konfidenzintervall: 5,7-10,5) [93]. In dem Rote-Hand-Brief wird darauf hingewiesen, dass der Einsatz von HCT besonders in Risikogruppen für die Entstehung von Hautkrebs, oder in Patienten mit vorbestehendem Hautkrebs „sorgfältig abzuwägen ist“. Ferner wird empfohlen, dass Patienten, die eine Therapie mit HCT erhalten über das Risiko in Kenntnis gesetzt werden sollen und Patienten sollte geraten werden, die Haut auf verdächtige Veränderungen zu untersuchen und gegebenenfalls verdächtige Veränderungen zu biopsieren. Auch zu einem Schutz vor starker Sonnenexposition wird geraten. Nach der Veröffentlichung dieses Rote-Hand-Briefes am 17.10.2018 ging die Anzahl an Verschreibungen von HCT zurück, ohne dass es einen ausreichenden Ersatz durch andere, ähnlich wirksame antihypertensive Substanzen gegeben hat. Dies hat mutmaßlich in 840.000 Patienten allein in Deutschland zu einer Verschlechterung der Blutdruckkontrolle geführt [71,96]. Es ist zu beachten, dass pharmakoepidemiologische Studien ein geeignetes Werkzeug darstellen, um Pharmakovigilanz zu beurteilen, sie sich jedoch nicht dazu eignen, Kausalitäten abzuleiten und anfällig sind für Störungen wie beispielsweise Konfounding. Assoziationen von HCT mit erhöhten Hautkrebsrisiken beschränken sich auf Fall-Kontroll-Studien. Und auch diese Fall-Kontroll-Studien sind nicht einheitlich. Eine Studie aus Taiwan konnte kein gesteigertes Hautkrebsrisiko bei Patienten nachweisen, die lange Zeit (kumulative Dosis ≥ 50.000 mg) mit HCT behandelt wurden [95]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt eine Studie aus den USA, die Daten von >4,4 Millionen Patienten auswertete. Es wurden das Hautkrebsrisiko von Patienten, die neu mit einer arteriellen Hypertonie diagnostiziert wurden und entweder einen ACE Hemmer oder HCT erhielten untersucht. Die Analyse kam auch nach Adjustierung für bestimmte Faktoren, wie die z. B. Ethnizität, Versicherungsstatus und Komorbiditäten zu dem Ergebnis, dass sich das Krebsrisiko zwischen den beiden Gruppen nicht wesentlich unterschied [9]. Eine Meta-Analyse von randomisierten, kontrollierten Studien konnte ebenso keine erhöhte Hautkrebsinzidenz oder sonstige gesteigerte Krebsrisiken in Patienten, die HCT zur Blutdrucktherapie einnahmen, feststellen [19]. Eine rezent publizierte Studie aus Japan, die bei älteren Patienten (≥ 60 Jahre) mit arterieller Hypertonie unter HCT Behandlung das Auftreten

von Hautkrebs untersuchte, konnte feststellen, dass eine HCT-Therapie bei Patienten mit dunklerem Hauttyp mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von spinzellulären Karzinomen assoziiert war (Risikosteigerung 1,58; 95% KI: 1,04-2,40) [43]. Diese moderate Risikoerhöhung konnte auch eine kürzliche *propensity-score* gematchte Studie aus Deutschland nachweisen. Hier wurden 122.554 Patienten 1:1 gematcht und es wurden Patienten, die HCT einnahmen verglichen mit Patienten, die nicht-HCT Diuretika einnahmen. Über den Beobachtungszeitraum von 8 Jahren kam es zu einer leicht erhöhten Inzidenz an Hautkrebsfällen bei Patienten, die HCT einnahmen (Inzidenz Rate Ratio 1,15; 95% Konfidenzintervall: 1,06-1,24). Interessanterweise war das Risiko für Krebs im allgemeinen bei Patienten, die mit HCT behandelt wurden, niedriger (Inzidenz Rate Ratio 0,84; 95% Konfidenzintervall: 0,82-0,87) [38].

Die kleine Auswahl dieser retrospektiven Studien zeigt, dass es weiterhin eine Vielzahl offener Fragen gibt im Hinblick auf die Assoziation zwischen HCT-Therapie und der Auftretenswahrscheinlichkeit für Hautkrebs [50]. Insgesamt existiert widersprüchliche Evidenz, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* über die potenzielle fotosensibilisierende und fototoxische Wirkung von HCT. Chemisch betrachtet, erscheint HCT als potenzieller Photonenabsorber [56]. Es wird postuliert, dass in der Haut diese Energie dann an die umliegenden Gewebe abgegeben wird, was zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies, chronischen Entzündungsprozessen und DNA-Schäden führen könnte [56,75,76]. Langfristig betrachtet kann dies die Entstehung präkanzeröser Läsionen [58,108,109] und die Krebsentstehung fördern [13]. Auch die Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft und diverse Fachgesellschaften haben zu dem oben genannten Rote-Hand-Brief Stellung bezogen. So heißt in der Stellung der Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft, dass eine generelle Therapieumstellung aller HCT behandelten Patienten nicht erforderlich ist und stattdessen in jeden Fall individuell geprüft werden sollte [3]. Bei HCT Anwendung sollten regelmäßige Hautinspektionen und UV-Sonnenschutz empfohlen werden. Ferner wird explizit darauf hingewiesen, dass weitere Studien zum Krebsrisiko von Antihypertensiva notwendig sind.

Zusätzlich dazu haben klinische Studien gezeigt, dass UV-Exposition zur vermehrten Entstehung von Pyrimidindimeren führt [81,91]. Pyrimidindimere sind Abbauprodukte der DNA-Nukleotidexzisionsreparatur und entstehen vermehrt infolge von UV-induzierten DNA-Schäden [55,78]. Damit stellen sie einen potenziellen Surrogatparameter für kanzeröse Mechanismen, vor allem in der Haut, dar. In klinischen Studien an Patienten die eine

Fotochemotherapie erhalten haben, wurde gezeigt, dass das Krebsrisiko für maligne Melanome und nicht-melanotische Hautkrebsarten gleichermaßen zunimmt [106,107]. Diese Studien sind als *proof-of-concept* für die Zusammenhänge aus Fotosensibilisierung bzw. Fototoxizität und Hautkrebsentstehung anzusehen. Jedoch muss beachtet werden, dass Fototoxizität nicht zwangsläufig zur Hautkrebsentstehung führt. Fototoxizität kann auftreten, ohne kanzerogene Effekte zu verursachen und Hautkrebs kann auch ohne den Einfluss fototoxischer Mechanismen entstehen.

Fototoxizität ist ein vorwiegend UVA-Licht vermittelter Mechanismus [10]. In unserer Studie war HCT (375 mg für 15 Tage) nicht mit einer erhöhten Sensibilität für UVA-Licht assoziiert und es konnten keine fototoxischen Reaktionen festgestellt werden. UVB-Licht ist dagegen eine energiereichere Lichtform, die zu direkten DNA-Schäden führen kann [25,55,97]. Eine erhöhte Sensibilität gegenüber UVB-Licht könnte daher zu einem erhöhten Krebsrisiko, vermittelt über Mutationen, führen. Teilnehmer unserer Studie, die HCT einnahmen, zeigten keine Änderungen ihrer Lichtempfindlichkeit im UVB-Spektrum und ebenso keine Produktion von Pyrimidindimeren als Folge einer Ganzkörperbestrahlung mit UVA- und UVB-Licht.

Dies sind neue Erkenntnisse, denn klinische Studien zum Einfluss von HCT auf die dermale Fotosensibilität sind bisher nicht durchgeführt worden. In zwei präklinischen Arbeiten wurde der Einfluss einer Kombination aus UVB-Bestrahlung und HCT auf die Entstehung von nicht-melanotischem Hautkrebs untersucht [58,63]. In diesen Studien blieb die Zeit bis zur Hautkrebsentstehung in den respektiven HCT-Gruppen unverändert verglichen mit den Kontrollgruppen. Dies zeigte sich auch unabhängig der verwendeten HCT Dosis [63].

Unsere Ergebnisse lassen schließen, dass die kumulative Dosis von 375 mg HCT über einen Zeitraum von 15 Tagen in gesunden Probanden nicht mit einer gesteigerten Fotosensibilität für UVA-Licht und UVB-Licht assoziiert war. Darüber hinaus kam es nicht zu kanzerogenen Reaktionen, denn es waren keine akuten DNA-Schäden, ermittelt mittels Bestimmung von Pyrimidindimeren, nachweisbar. In dieser Hinsicht ist kritisch anzumerken, dass nur reparierte Pyrimidindimere ausgeschieden werden. Theoretisch ist es möglich, dass kutane DNA-Schäden entstehen, aber nicht durch die Nukleotidexzisionsreparatur entfernt werden. Da unsere Probanden gesunde Freiwillige waren und keine Vorgeschichte einer dermatologischen Erkrankung hatten, ist allerdings nicht davon auszugehen, dass Schäden der Nukleotidexzisionsreparatur vorlagen. Ebenso ist es möglich, dass die potenzielle HCT-vermittelte gesteigerte Krebsinzidenz durch immunologische Mechanismen vermittelt wird.

Unsere klinische Studie war jedoch nicht darauf ausgerichtet, mögliche immunologische Effekte einer HCT-Therapie zu evaluieren.

In der Literatur finden sich Fallschilderungen, die fototoxische Reaktionen von HCT beschreiben [2]. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass theoretisch jedes Medikament bei individueller Prädisposition zu einer kutanen Nebenwirkung im Sinne einer Fotoallergie führen kann und diese Fotoallergie sich klinisch ähnlich wie eine fototoxische Reaktion präsentieren kann [37]. Es ist daher möglich, dass fototoxische Reaktionen auf HCT keinen Klasseneffekt darstellen, sondern individuelle allergische Reaktionen sein könnten. Diese Hypothese wird durch unsere Ergebnisse gestützt, in der 20 gesunde Freiwillige keine Hautreaktionen nach HCT-Einnahme zeigten.

Zwei *in vitro* arbeiten legen den Verdacht nahe, HCT könne fototoxische Reaktionen hervorrufen. Zum einen wiesen Wulf et al. nach, dass die Kombination aus UVA-Licht und HCT zu einer geringeren Zellproliferation von HaCaT Zellen führte [104]. Diese Effekte waren proportional zur verwendeten HCT-Dosis [104]. Zum anderen konnte in albino haarlosen Mäusen mit einem XPa Knockout (ein Gen, das für die Nukleotidexzisionsreparatur kodiert) nachgewiesen werden, dass die Kombination aus UVA-Licht und HCT zu einer erhöhten Bildung von Pyrimidindimeren führte [57]. Allerdings zeigte eine weitere Studie in albino haarlosen XPa Knockout Mäusen, dass die Kombination von UVB-Licht und HCT nicht zu einer erhöhten Krebsinzidenz führte [58]. Unsere *in vitro* Daten stimmen mit diesen zuletzt erwähnten Resultaten überein. Die Kombination aus UVB-Licht und HCT führte in den von uns beobachteten HaCaT Keratinozyten nicht zu einer vermehrten Bildung von proapoptischen Proteinen, Onkoproteinen oder Proteinen, die reaktive Sauerstoffspezies reduzieren.

Humane Keratinozyten reagieren mit einer inflammatorischen Reaktion auf eine Bestrahlung deren Intensität über der jeweiligen MED liegt. Klinisch manifestieren sich diese Effekte als Sonnenbrand mit Hyperalgesie, Rötung und Überwärmung der Haut [72]. Aus diesem Grund wurden in einem ersten Schritt die Expression von inflammatorischen Markerproteinen IL-6 und TNF α analysiert. Eine Bestrahlung führte zur verstärkten Expression dieser Markergene. Eine zusätzliche Behandlung mit HCT führte aber nicht zu einer Potenzierung dieser Effekte. HCT hatte in unseren Experimenten also keinen Einfluss auf Entzündungsprozesse nach Bestrahlung.

Neben inflammatorischen Reaktionen sind Mechanismen der Zellzyklusregulation wichtige Treiber von Mutationen und damit der Krebsentstehung [15]. Aus diesem Grund wurden die bekannten Onkoproteine p53 und dessen phosphorylierter (=aktivierter) Zustand pp53 analysiert. Denn die Phosphorylierung des p53 ist ein möglicher Indikator für kanzerogene Prozesse und DNA-Schäden [116,121]. Sechs Stunden nach Bestrahlung der HaCaT Zellen kam es zu einer vermehrten Phosphorylierung des Onkoproteins p53, was die potenziellen kanzerogenen Effekte der Bestrahlung zeigte [11,97,109]. Eine vorherige Behandlung mit HCT führte weder zu einer zusätzlichen gesteigerten Expression noch zu einer gesteigerten Phosphorylierung dieses Onkoproteins. In unseren Experimenten ließ sich keine vermehrte Phosphorylierung von p53 durch die Kombination aus UVB und HCT nachweisen. Auch dies spricht gegen potenzielle kanzerogene Mechanismen als Folge einer HCT-Therapie.

Neben Inflammation und Zellzyklusregulation wurde auch die Entstehung von ROS und damit assoziierte oder unabhängig davon auftretende Apoptosewege untersucht. ROS entstehen als Folge von Radikalbildungen durch Energieübertragung der UV-Energie auf das Gewebe [4]. SOD-1 und Katalase, zwei Enzyme, die ROS reduzieren, wurden durch eine Bestrahlung hochreguliert. Eine HCT-Behandlung und nachfolgende Bestrahlung führte aber nicht zu einer gesteigerten Expression. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es nicht zu einer erhöhten Radikalbildung durch die Kombination aus HCT und Bestrahlung gekommen ist. Auch über diese Stoffwechselfprozesse sind keine zusätzlichen potenziellen Schädigungen an den Zellen entstanden. Selwaag et al. konnten in Experimenten allerdings zeigen, dass es im Zuge einer HCT-Therapie und nachfolgenden UVA-Bestrahlung zur vermehrten Entstehung von ROS gekommen ist, die mittels antioxidativer Substanzen wiederum reduziert werden konnten [104]. Diesbezüglich ist zu erwähnen, dass unterschiedliche Bestrahlungsarten verwandt wurden. So testeten Selwaag et al. UVA-Licht und in unseren Experimenten wurde UVB-Licht herangezogen. Eine weitere präklinische Arbeit konnte ebenfalls potenzielle kanzerogene Einflüsse von HCT in Kombination mit einer UVA-Bestrahlung nachweisen. Bigagli et al. beleuchteten HaCaT Zellen mit 10 J/cm² UVA über 40 Minuten zweimal pro Woche über einen Zeitraum von neun Wochen. Zusätzlich wurden die Zellen mit HCT in unterschiedlichen Dosen behandelt. Diese Langzeit-Bestrahlung führte bei gleichzeitiger HCT-Behandlung (70 ng/ml entspricht in etwa Plasma-Spiegel einer HCT-Therapie von 12,5 mg/Tag) zur Hochregulation von Proteinen des Wnt-Signalweges und von Prostaglandin E₂, also inflammatorischen Proteinen. Beides begünstigt die Entstehung von nicht-melanotischen Hautkrebsarten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Therapie zu genotoxischen Schäden und zur Apoptoseresistenz führte [7,8]. Diese präklinische Studie ist einzigartig dahingehend, dass

Langzeit-Bestrahlungseffekte (40 Minuten) und viele kumulative Bestrahlungen über mehrere Wochen (18 Bestrahlungen in neun Wochen) getestet werden.

In unseren Experimenten kam es durch die Kombination aus HCT und UVB-Bestrahlung nicht zu einer Hochregulierung von Proteinen, die die Apoptose beeinflussen. Bax ist ein Protein das als Reaktion von Zellschädigungsmechanismen durch p53 und pp53 aktiviert wird, die Apoptoseeinleitung unterbindet und somit die Krebsentstehung fördert [117]. Bax und Bak wurden nicht durch eine HCT- und Bestrahlungstherapie hochreguliert, was in Einklang mit der fehlenden Änderung des p53 und pp53 zu sehen ist. Die anfallenden Schädigungsmechanismen haben also nicht zur Terminierung des vorzeitigen, selbstprogrammierten Zelltodes geführt. Ebenfalls in Einklang mit unserern Ergebnissen ist eine tierexperimentelle Studie, in der haarläuse Mäuse mit HCT behandelt und dann mit UVB-Licht beleuchtet wurden. Die Autoren bildeten drei Gruppen mit je 25 Mäusen: Eine Kontrollgruppe, eine Gruppe mit einer mittleren HCT-Dosis (Äquivalenzdosis im Menschen 50 mg/Tag) und eine Gruppe mit einer hohen HCT-Dosis (Äquivalenzdosis im Menschen 100 mg/Tag). Die Zeit bis zur Entstehung des ersten, zweiten und dritten Hauttumors wurden in der Folge betrachtet. Alle entstanden Tumoren wurden als spinozelluläre Karzinome klassifiziert. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Zeit bis zur Entstehung der Tumoren. Also konnten auch hier keine verstärkenden Effekte der HCT-Therapie beobachtet werden [63]. Dies entspricht unseren *in vivo* und *in vitro* Ergebnissen.

Zusammenfassend ließen sich keine fotosensibilisierenden, fototoxischen oder kanzerogenen Effekte von HCT *in vitro* und *in vivo* nachweisen. Ob dies durch den Gesundheitsstatus und das Alter der Probanden, die relativ geringe Dosis an HCT, die niedrige Dosis an kontrollierter Bestrahlung und der kurzen Beobachtungszeit liegt, muss weiter untersucht werden [50]. Die Empfehlungen des Rote-Hand-Briefes zum Hautkrebsrisiko von HCT und die Totalität der Evidenz sollte auf Grundlage der vorliegenden Studien nicht missachtet werden. Patienten sollten zum Sonnenschutz aufgefordert, zu regelmäßigen Hautinspektionen angeleitet und Risikopatienten identifiziert werden und gegebenenfalls auf ein anderes diuretisches Antihypertensivum eingestellt werden.

Stärken und Limitationen

Die Stärken unserer Studie liegen im Placebo kontrollierten, doppelt-verblindeten und randomisierten Design und der standardisierten Anwendung der verwendeten UVA- und UVB-Bestrahlung. Als Limitation sollte diskutiert werden, dass gesunde Probanden untersucht wurden. Eine mögliche Vermittlung kanzerogener Effekte durch zugrundeliegende Erkrankungen wie beispielsweise eine arterielle Hypertonie könnte dadurch unterschätzt worden sein. Denn arterielle Hypertonie ist mit verschiedenen Krebserkrankungen assoziiert [40]. Zudem wurden in unserer Studie junge Probanden getestet. Hautzellseneszenz und andere Alterungsprozesse wie eine Abnahme der Immunfunktion und Änderungen des Stoffwechsels beeinflussen nachgewiesenermaßen die Krebsentstehung [14]. Zudem wiesen alle untersuchten Teilnehmer eine gute Nieren- und Leberfunktion auf. Daher ist nicht davon auszugehen, dass es zu Metabolisierungsproblemen von HCT in unseren Probanden gekommen ist. Eine eingeschränkte Metabolisierung könnte in älteren und kränkeren Patienten hingegen zur Kumulation und folglich zu gesteigerten Nebenwirkungen von HCT führen. Es sollte auch berücksichtigt werden, dass bei älteren Patienten häufig eine Polypharmazie besteht, sodass sich die isolierten fotosensibilisierenden oder fototoxischen Effekte von HCT nicht gezielt untersuchen lassen würden.

Eine Fallzahlplanung war im Vorfeld infolge unzureichend detaillierter Informationen über das fotosensibilisierende Potenzial von HCT nicht möglich, weshalb das *Feasability* Prinzip zugrunde gelegt wurde und die Populationsgröße entsprechend auf $n=30$ festgelegt wurde [12]. Ebenfalls sollte berücksichtigt werden, dass die Dauer der Einnahme der Studienmedikation bei 15 Tagen lag. Dies hatte vor allem ethische Gründe, da keine klinische Indikation für die Behandlung mit HCT bestand. Allerdings ist davon auszugehen, dass bereits nach einer einwöchigen Medikamenteneinnahme einer fotosensibilisierenden Substanz eine Änderung der MED, insbesondere im UVA-Bereich zu erwarten wäre. Die Patienten aus den pharmakoepidemiologischen Studien, die HCT mit Hautkrebs in Verbindung brachten, nahmen teilweise >25.000 mg kumulativ ein, was die Fläche unter der Kurve entsprechend vervielfältigt, prospektiv jedoch nicht zu untersuchen ist.

Eine weitere Limitation ergibt sich aus der Tatsache, dass neben dem artifiziellen Licht, dem unsere Probanden ausgesetzt waren, auch natürliches Licht, die Ergebnisse beeinflusst hat. Zwar wurden die Probanden angewiesen, Sonnenbäder zu vermeiden, jedoch konnte für dennoch auftretende interindividuelle Schwankungen in der Exposition gegen natürliches Licht nicht kontrolliert werden. Dieser Faktor galt aber ebenso für die Kontroll-, wie für HCT-Gruppe

und dürfte aus diesem Grund nicht zu sehr ins Gewicht fallen. Ferner wurde der Rücken der Probanden für die MED-Bestimmung gewählt, der in der Regel wenig sonnenexponiert ist.

Fazit

In der vorliegenden Studie war eine Therapie mit einer kumulativen Dosis von 375 mg HCT über 15 Tage nicht mit fotosensibilisierenden oder fototoxischen Effekten in gesunden Probanden assoziiert. Ferner wurden keine Marker der Apoptose, von reaktiven Sauerstoffspezies oder der Krebsentstehung in humanen Keratinozyten beobachtet, die mit HCT und UVB-Licht behandelt wurden. HCT war in dieser Studie an gesunden Probanden nicht mit akuten kutanen Sicherheitsbedenken assoziiert. Infolge der Limitationen unserer Studie sind zukünftig weitere randomisierte und mechanistische Studien, insbesondere in hypertensiven Patienten mit einhergehender Polypharmazie dringend notwendig, um vorhandene Evidenzlücken zu schließen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adalsteinsson JA, Muzumdar S, Waldman R, Hu C, Wu R, Ratner D, Ungar J, Silverberg JI, Olafsdottir GH, Kristjansson AK, Tryggvadottir L, Jonasson JG (2021) Association between hydrochlorothiazide and the risk of in situ and invasive squamous cell skin carcinoma and basal cell carcinoma: A population-based case-control study. *J Am Acad Dermatol* 84:669–675
2. Addo HA, Ferguson J, Frain-Bell W (1987) Thiazide-induced photosensitivity: a study of 33 subjects. *Br J Dermatol* 116:749–60
3. Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft <https://www.akdae.de/Stellungnahmen/Weitere/20181220.pdf>.
4. Awad F, Assrawi E, Louvrier C, Jumeau C, Giurgea I, Amselem S, Karabina S-A (2018) Photoaging and skin cancer: Is the inflammasome the missing link? *Mech Ageing Dev* 172:131–137
5. Beaney T, Schutte AE, Tomaszewski M, Ariti C, Burrell LM, Castillo RR, Charchar FJ, Damasceno A, Kruger R, Lackland DT, Nilsson PM, Prabhakaran D, Ramirez AJ, Schlaich MP, Wang J, Weber MA, Poulter NR, MMM Investigators (2018) May measurement month 2017: an analysis of blood pressure screening results worldwide. *Lancet Glob Health* 6:e736–e743
6. Benjamin CL, Ananthaswamy HN (2007) p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* 224:241–8
7. Bigagli E, Cinci L, D’Ambrosio M, Nardini P, Portelli F, Colucci R, Lodovici M, Mugelli A, Luceri C (2021) Hydrochlorothiazide use and risk of nonmelanoma skin cancers: a biological plausibility study. *Oxid Med Cell Longev* 2021:6655542
8. Bigagli E, Mugelli A, Mancina G (2022) A reverse translational pharmacological approach to understand the underlying mechanisms of the reported association between hydrochlorothiazide and non-melanoma skin cancer. *J Hypertens* 40(9):1647-1649.
9. Birck MG, Moura CS, Machado MAA, Liu JL, Abrahamowicz M, Pilote L, Bernatsky S (2023) Skin cancer and hydrochlorothiazide: novel population-based analyses considering personal risk factors including race/ethnicity. *Hypertension* 80:2218–2225

10. Blakely KM, Drucker AM, Rosen CF (2019) Drug-induced photosensitivity-an update: culprit drugs, prevention and management. *Drug Saf* 42:827–847
11. Bolshakov S, Walker CM, Strom SS, Selvan MS, Clayman GL, El-Naggar A, Lippman SM, Kripke ML, Ananthaswamy HN (2003) p53 mutations in human aggressive and nonaggressive basal and squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 9:228–34
12. Browne RH (1995) On the use of a pilot sample for sample size determination. *Stat Med* 14:1933–40
13. Cameron MC, Lee E, Hibler BP, Barker CA, Mori S, Cordova M, Nehal KS, Rossi AM (2019) Basal cell carcinoma: Epidemiology, pathophysiology, clinical and histological subtypes and disease associations. *J Am Acad Dermatol* 80:303–317
14. Chambers ES, Vukmanovic-Stejić M (2020) Skin barrier immunity and ageing. *Immunology* 160:116–125
15. Chen AC, Halliday GM, Damian DL (2013) Non-melanoma skin cancer: carcinogenesis and chemoprevention. *Pathology* 45:331–341
16. Chow CK, Teo KK, Rangarajan S, Islam S, Gupta R, Avezum A, Bahonar A, Chifamba J, Dagenais G, Diaz R, Kazmi K, Lanas F, Wei L, Lopez-Jaramillo P, Fanghong L, Ismail NH, Puoane T, Rosengren A, Szuba A, Temizhan A, Wielgosz A, Yusuf R, Yusufali A, McKee M, Liu L, Mony P, Yusuf S, PURE (Prospective Urban Rural Epidemiology) Study investigators (2013) Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. *JAMA* 310:959–68
17. Clark CE, Taylor RS, Shore AC, Ukoumunne OC, Campbell JL (2012) Association of a difference in systolic blood pressure between arms with vascular disease and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 379:905–914
18. Clement DL, de Buyzere ML, de Bacquer DA, de Leeuw PW, Duprez DA, Fagard RH, Gheeraert PJ, Missault LH, Braun JJ, Six RO, van der Niepen P, O’Brien E, Office versus Ambulatory Pressure Study Investigators (2003) Prognostic value of ambulatory blood-pressure recordings in patients with treated hypertension. *New Engl J Med* 348:2407–15
19. Copland E, Canoy D, Nazarzadeh M, Bidel Z, Ramakrishnan R, Woodward M, Chalmers J, Teo KK, Pepine CJ, Davis BR, Kjeldsen S, Sundström J, Rahimi K, Blood Pressure

- Lowering Treatment Trialists' Collaboration (2021) Antihypertensive treatment and risk of cancer: an individual participant data meta-analysis. *Lancet Oncol* 22:558–570
20. Cornelissen VA, Smart NA (2013) Exercise training for blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *J Am Heart Assoc* 2:e004473
 21. Corrao G, Zambon A, Parodi A, Poluzzi E, Baldi I, Merlino L, Cesana G, Mancia G (2008) Discontinuation of and changes in drug therapy for hypertension among newly-treated patients: a population-based study in Italy. *J Hypertens* 26:819–24
 22. Cushman WC, Cutler JA, Hanna E, Bingham SF, Follmann D, Harford T, Dubbert P, Allender PS, Dufour M, Collins JF, Walsh SM, Kirk GF, Burg M, Felicetta J v, Hamilton BP, Katz LA, Perry HM, Willenbring ML, Lakshman R, Hamburger RJ (1998) Prevention and Treatment of Hypertension Study (PATHS): effects of an alcohol treatment program on blood pressure. *Arch Intern Med* 158:1197–207
 23. Daniel Grandt, Veronika Lappe, Ingrid Schubert (2022) *Arzneimittelreport*. Berlin
 24. Daniels B, Pearson S-A, Vajdic CM, Pottegård A, Buckley NA, Zoega H (2020) Risk of squamous cell carcinoma of the lip and cutaneous melanoma in older Australians using hydrochlorothiazide: A population-based case-control study. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 127:320–328
 25. Daya-Grosjean L, Sarasin A (2005) The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors. *Mutat Res* 571:43–56
 26. de Haan-Du J, Landman GWD, Groenier KH, Vissers PAJ, Louwman MWJ, Kleefstra N, de Bock GH (2021) The risk of cutaneous squamous cell carcinoma among patients with type 2 diabetes receiving hydrochlorothiazide: a cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 30:2114–2121
 27. Diao D, Wright JM, Cundiff DK, Gueyffier F (2012) Pharmacotherapy for mild hypertension. *Cochrane Database Syst Rev* 8:CD006742
 28. Ellison DH, Loffing J (2009) Thiazide effects and adverse effects: insights from molecular genetics. *Hypertension* 54:196–202
 29. Elwood JM, Jopson J (1997) Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer* 73:198–203

30. Ettehad D, Emdin CA, Kiran A, Anderson SG, Callender T, Emberson J, Chalmers J, Rodgers A, Rahimi K (2016) Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 387:957–967
31. Eworuke E, Haug N, Bradley M, Cosgrove A, Zhang T, Dee EC, Adimadhyam S, Petrone A, Lee H, Woodworth T, Toh S (2021) Risk of nonmelanoma skin cancer in association with use of hydrochlorothiazide-containing products in the United States. *JNCI Cancer Spectr* 5:9
32. Flohil SC, de Vries E, Neumann HAM, Coebergh J-WW, Nijsten T (2011) Incidence, prevalence and future trends of primary basal cell carcinoma in the Netherlands. *Acta Derm Venerol* 91:24–30
33. Forouzanfar MH, Liu P, Roth GA, Ng M, Biryukov S, Marczak L, Alexander L, Estep K, Abate KH, Akinyemiju TF, Ali R, Alvis-Guzman N, Azzopardi P, Banerjee A, Bärnighausen T, Basu A, Bekele T, Bennett DA, Biadgilign S, Catalá-López F, Feigin VL, Fernandes JC, Fischer F, Gebru AA, Gona P, Gupta R, Hankey GJ, Jonas JB, Judd SE, Khang YH, Khosravi A, Kim YJ, Kimokoti RW, Kokubo Y, Kolte D, Lopez A, Lotufo PA, Malekzadeh R, Melaku YA, Mensah GA, Misganaw A, Mokdad AH, Moran AE, Nawaz H, Neal B, Ngalesoni FN, Ohkubo T, Pourmalek F, Rafay A, Rai RK, Rojas-Rueda D, Sampson UK, Santos IS, Sawhney M, Schutte AE, Sepanlou SG, Shifa GT, Shiue I, Tedla BA, Thrift AG, Tonelli M, Truelsen T, Tsilimparis N, Ukwaja KN, Uthman OA, Vasankari T, Venketasubramanian N, Vlassov VV, Vos T, Westerman R, Yan LL, Yano Y, Yonemoto N, el Sayed Zaki M, Murray CJL (2017) Global burden of hypertension and systolic blood pressure of at least 110 to 115mmHg, 1990-2015. *JAMA* 317:165–182
34. Gaborieau V, Delarche N, Gosse P (2008) Ambulatory blood pressure monitoring versus self-measurement of blood pressure at home: correlation with target organ damage. *J Hypertens* 26:1919–27
35. Gordon R (2013) Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors. *Semin Oncol Nurs* 29:160–9
36. Gottesman RF, Albert MS, Alonso A, Coker LH, Coresh J, Davis SM, Deal JA, McKhann GM, Mosley TH, Sharrett AR, Schneider ALC, Windham BG, Wruck LM, Knopman DS (2017) Associations between midlife vascular risk factors and 25-year

- incident dementia in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) cohort. *JAMA Neurol* 74:1246–1254
37. Götzinger F, Reichrath J, Millenaar D, Lauder L, Meyer MR, Böhm M, Mahfoud F (2022) Photoinduced skin reactions of cardiovascular drugs—a systematic review. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother* 8:420–430
 38. Götzinger F, Wilke T, Hardtstock F, Krieger J, Maywald U, Kunz M, Lauder L, Schulz M, Mahfoud F, Böhm M (2023) Association of hydrochlorothiazide treatment compared with alternative diuretics with overall and skin cancer risk: a propensity-matched cohort study. *J Hypertens* 41:926–933
 39. Hamdidouche I, Jullien V, Boutouyrie P, Billaud E, Azizi M, Laurent S (2017) Routine urinary detection of antihypertensive drugs for systematic evaluation of adherence to treatment in hypertensive patients. *J Hypertens* 35:1891–1898
 40. Hamet P (1996) Cancer and hypertension. An unresolved issue. *Hypertension* 28:321–4
 41. Han S, Wolfe CM, Angnardo L, Pedersen SA, Gaist D, Pottegård A, Cognetta AB (2020) Hydrochlorothiazide use and increased squamous cell carcinoma burden in a high-risk mohs population: a cross-sectional study. *Dermatol Surg* 46:704–708
 42. Harrison DG, Coffman TM, Wilcox CS (2021) Pathophysiology of hypertension: the mosaic theory and beyond. *Circ Res* 128:847–863
 43. Hashizume H, Nakatani E, Sasaki H, Miyachi Y (2023) Hydrochlorothiazide increases risk of nonmelanoma skin cancer in an elderly Japanese cohort with hypertension: The Shizuoka study. *JAAD Int* 12:49–57
 44. He FJ, Li J, Macgregor GA (2013) Effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure. *Cochrane Database Syst Rev* 4:CD004937
 45. Helfer AG, Michely JA, Weber AA, Meyer MR, Maurer HH (2015) Orbitrap technology for comprehensive metabolite-based liquid chromatographic-high resolution-tandem mass spectrometric urine drug screening - exemplified for cardiovascular drugs. *Anal Chim Acta* 891:221–33
 46. Helfer AG, Michely JA, Weber AA, Meyer MR, Maurer HH (2017) Liquid chromatography-high resolution-tandem mass spectrometry using Orbitrap technology

for comprehensive screening to detect drugs and their metabolites in blood plasma. *Anal Chim Acta* 965:83–95

47. Herzinger T, Berneburg M, Ghoreschi K, Gollnick H, Hölzle E, Hönigsmann H, Lehmann P, Peters T, Röcken M, Scharffetter-Kochanek K, Schwarz T, Simon J, Tanew A, Weichenthal M (2016) S1-Guidelines on UV phototherapy and photochemotherapy. *J Dtsch Dermatol Ges* 14:853–76
48. Hodgkinson J, Mant J, Martin U, Guo B, Hobbs FDR, Deeks JJ, Heneghan C, Roberts N, McManus RJ (2011) Relative effectiveness of clinic and home blood pressure monitoring compared with ambulatory blood pressure monitoring in diagnosis of hypertension: systematic review. *BMJ* 342:d3621
49. <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/print.html>. Hautkrebsinzidenz.
50. Jensen GB (2023) Phototoxic and carcinogenic effects of hydrochlorothiazide: experimental study contrasting the pharmacoepidemiological evidence showing increased risk of skin cancer. *J Hypertens* 41:1699–1700
51. Kampmann J, Siersbaek-Nielsen K, Kristensen M, Hansen JM (1974) Rapid evaluation of creatinine clearance. *Acta Med Scand* 196:517–20
52. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J (2005) Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365:217–23
53. Kim JC, Kim YC, Choi JW (2021) Use of hydrochlorothiazide and risk of nonmelanoma skin cancer in Koreans: a retrospective cohort study using administrative healthcare data. *Clin Exp Dermatol* 46:680–686
54. Koch CA, Mazzaferri EL, Larry JA, Fanning TS (1996) Bullous pemphigoid after treatment with furosemide. *Cutis* 58:340–4
55. Kotova N, Hemminki K, Segerbäck D (2005) Urinary thymidine dimer as a marker of total body burden of UV-inflicted DNA damage in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:2868–72
56. Kreutz R, Algharably EAH, Douros A (2019) Reviewing the effects of thiazide and thiazide-like diuretics as photosensitizing drugs on the risk of skin cancer. *J Hypertens* 37:1950–1958

57. Kunisada M, Masaki T, Ono R, Morinaga H, Nakano E, Yogiarti F, Okunishi K, Sugiyama H, Nishigori C (2013) Hydrochlorothiazide enhances UVA-induced DNA damage. *Photochem Photobiol* 89:649–54
58. Kunisada M, Yamano N, Hosaka C, Takemori C, Nishigori C (2018) Inflammation due to voriconazole-induced photosensitivity enhanced skin phototumorigenesis in Xpa-knockout mice. *Photochem Photobiol* 94:1077–1081
59. Lecaros-Astorga DA, Molina-Guarneros JA, Rodríguez-Jiménez P, Martín-Arias LH, Sainz-Gil M (2021) Hydrochlorothiazide use and risk of non-melanoma skin cancer in Spain: A case/non-case study. *Int J Clin Pharmacol Ther* 59:280–288
60. Lee JJ, Downham TF (2006) Furosemide-induced bullous pemphigoid: case report and review of literature. *J Drugs Dermatol* 5:562–4
61. Lee SM, Kim K, Yoon J, Park SK, Moon S, Lee SE, Oh J, Yoo S, Kim K-I, Yoon H-J, Lee H-Y (2020) Association between use of hydrochlorothiazide and nonmelanoma skin cancer: common data model cohort study in asian population. *J Clin Med* 9(9):2910
62. León-Muñoz LM, Duarte-Salles T, Llorente A, Díaz Y, Puente D, Pottegård A, Montero-Corominas D, Huerta C (2021) Use of hydrochlorothiazide and risk of skin cancer in a large nested case-control study in Spain. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 30:1269–1278
63. Lerche CM, Al-Chaer RN, Wulf HC (2022) Does systemic hydrochlorothiazide increase the risk of developing ultraviolet radiation-induced skin tumours in hairless mice? *Exp Dermatol* 32(4):341-347.
64. Letellier T, Le Borgne F, Kerleau C, Gaultier A, Dantal J, Ville S, Divat Consortium (2020) Association between use of hydrochlorothiazide and risk of keratinocyte cancers in kidney transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol* 15:1804–1813
65. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R, Prospective Studies Collaboration (2002) Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 360:1903–13
66. Lip GYH, Coca A, Kahan T, Boriani G, Manolis AS, Olsen MH, Oto A, Potpara TS, Steffel J, Marín F, de Oliveira Figueiredo MJ, de Simone G, Tzou WS, En Chiang C, Williams B (2017) Hypertension and cardiac arrhythmias: executive summary of a

- consensus document from the European Heart Rhythm Association (EHRA) and ESC Council on Hypertension, endorsed by the Heart Rhythm Society (HRS), Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS), and Sociedad Latinoamericana de Estimulación Cardíaca y Electrofisiología (SOLEACE). *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother* 3:235–250
67. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–8
 68. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F (2012) A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 166:1069–80
 69. Lonn EM, Bosch J, López-Jaramillo P, Zhu J, Liu L, Pais P, Diaz R, Xavier D, Sliwa K, Dans A, Avezum A, Piegas LS, Keltai K, Keltai M, Chazova I, Peters RJG, Held C, Yusuf K, Lewis BS, Jansky P, Parkhomenko A, Khunti K, Toff WD, Reid CM, Varigos J, Leiter LA, Molina DI, McKelvie R, Pogue J, Wilkinson J, Jung H, Dagenais G, Yusuf S, HOPE-3 Investigators (2016) Blood-pressure lowering in intermediate-risk persons without cardiovascular disease. *New Engl J Med* 374:2009–20
 70. Madan V, Lear JT, Szeimies R-M (2010) Non-melanoma skin cancer. *Lancet* 375:673–85
 71. Mahfoud F, Kieble M, Enners S, Werning J, Laufs U, Millenaar D, Böhm M, Kintscher U, Schulz M (2020) “Dear Doctor” warning letter (Rote-Hand-Brief) on hydrochlorothiazide and its impact on antihypertensive prescription. *Dtsch Arztebl Int* 117:687–688
 72. Matsumura Y, Ananthaswamy HN (2004) Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 195:298–308
 73. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Butler J, Čelutkienė J, Chioncel O, Cleland JGF, Coats AJS, Crespo-Leiro MG, Farmakis D, Gilard M, Heymans S, Hoes AW, Jaarsma T, Jankowska EA, Lainscak M, Lam CSP, Lyon AR, McMurray JJ V, Mebazaa A, Mindham R, Muneretto C, Francesco Piepoli M, Price S, Rosano GMC, Ruschitzka F, Kathrine Skibelund A, de Boer RA, Christian Schulze P, Abdelhamid M, Aboyans V, Adamopoulos S, Anker SD, Arbelo E, Asteggiano R, Bauersachs J, Bayes-Genis A, Borger MA, Budts W, Cikes M, Damman K, Delgado V, Dendale P, Dilaveris P, Drexel H, Ezekowitz J, Falk V, Fauchier L,

- Filippatos G, Fraser A, Frey N, Gale CP, Gustafsson F, Harris J, Iung B, Janssens S, Jessup M, Konradi A, Kotecha D, Lambrinou E, Lancellotti P, Landmesser U, Leclercq C, Lewis BS, Leyva F, Linhart A, Løchen M-L, Lund LH, Mancini D, Masip J, Milicic D, Mueller C, Nef H, Nielsen J-C, Neubeck L, Noutsias M, Petersen SE, Sonia Petronio A, Ponikowski P, Prescott E, Rakisheva A, Richter DJ, Schlyakhto E, Seferovic P, Senni M, Sitges M, Sousa-Uva M, Tocchetti CG, Touyz RM, Tschoepe C, Waltenberger J, Adamo M, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Čelutkienė J, Chioncel O, Cleland JGF, Coats AJS, Crespo-Leiro MG, Farmakis D, Gardner RS, Gilard M, Heymans S, Hoes AW, Jaarsma T, Jankowska EA, Lainscak M, Lam CSP, Lyon AR, McMurray JJ V, Mebazaa A, Mindham R, Muneretto C, Piepoli MF, Price S, Rosano GMC, Ruschitzka F, Skibelund AK (2021) 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* 42:3599–3726
74. Moll I, Jung EG (2016) *Dermatologie*. Thieme, Stuttgart
75. Moore DE (1998) Mechanisms of photosensitization by phototoxic drugs. *Mutat Res* 422:165–73
76. Moore DE (2002) Drug-induced cutaneous photosensitivity: incidence, mechanism, prevention and management. *Drug Saf* 25:345–72
77. Morales DR, Pacurariu A, Slattery J, Kurz X (2020) Association between hydrochlorothiazide exposure and different incident skin, lip and oral cavity cancers: A series of population-based nested case-control studies. *Br J Clin Pharmacol* 86:1336–1345
78. Mouret S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T (2006) Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13765–70
79. Murray CJL, Aravkin AY, Zheng P, Abbafati C, Abbas KM, Abbasi-Kangevari M, Abd-Allah F, Abdelalim A, Abdollahi M, Abdollahpour I, Abegaz KH, Abolhassani H, Aboyans V, Abreu LG, Abrigo MRM, Abualhasan A, Abu-Raddad LJ, Abushouk AI, Adabi M, Adekanmbi V, Adeoye AM, Adetokunboh OO, Adham D, Advani SM, Agarwal G, Aghamir SMK, Agrawal A, Ahmad T, Ahmadi K, Ahmadi M, Ahmadi H, Ahmed MB, Akalu TY, Akinyemi RO, Akinyemiju T, Akombi B, Akunna CJ, Alahdab F, Al-Aly Z, Alam K, Alam S, Alam T, Alanezi FM, Alanzi TM, Alemu B

wassihun, Alhabib KF, Ali M, Ali S, Alicandro G, Alinia C, Alipour V, Alizade H, Aljunid SM, Alla F, Allebeck P, Almasi-Hashiani A, Al-Mekhlafi HM, Alonso J, Altirkawi KA, Amini-Rarani M, Amiri F, Amugsi DA, Ancuceanu R, Anderlini D, Anderson JA, Andrei CL, Andrei T, Angus C, Anjomshoa M, Ansari F, Ansari-Moghaddam A, Antonazzo IC, Antonio CAT, Antony CM, Antriyandarti E, Anvari D, Anwer R, Appiah SCY, Arabloo J, Arab-Zozani M, Ariani F, Armoon B, Ärnlov J, Arzani A, Asadi-Aliabadi M, Asadi-Pooya AA, Ashbaugh C, Assmus M, Atafar Z, Atnafu DD, Atout MMW, Ausloos F, Ausloos M, Ayala Quintanilla BP, Ayano G, Ayanore MA, Azari S, Azarian G, Azene ZN, Badawi A, Badiye AD, Bahrami MA, Bakhshaei MH, Bakhtiari A, Bakkannavar SM, Baldasseroni A, Ball K, Ballew SH, Balzi D, Banach M, Banerjee SK, Bante AB, Baraki AG, Barker-Collo SL, Bärnighausen TW, Barrero LH, Barthelemy CM, Barua L, Basu S, Baune BT, Bayati M, Becker JS, Bedi N, Beghi E, Béjot Y, Bell ML, Bennitt FB, Bensenor IM, Berhe K, Berman AE, Bhagavathula AS, Bhageerathy R, Bhala N, Bhandari D, Bhattacharyya K, Bhutta ZA, Bijani A, Bikbov B, bin Sayeed MS, Biondi A, Birihane BM, Bisignano C, Biswas RK, Bitew H, Bohlouli S, Bohluli M, Boon-Dooley AS, Borges G, Borzì AM, Borzouei S, Bosetti C, Boufous S, Braithwaite D, Breitborde NJK, Breitner S, Brenner H, Briant PS, Briko AN, Briko NI, Britton GB, Bryazka D, Bumgarner BR, Burkart K, Burnett RT, Burugina Nagaraja S, Butt ZA, Caetano dos Santos FL, Cahill LE, Cámara LLA, Campos-Nonato IR, Cárdenas R, Carreras G, Carrero JJ, Carvalho F, Castaldelli-Maia JM, Castañeda-Orjuela CA, Castelpietra G, Castro F, Causey K, Cederroth CR, Cercy KM, Cerin E, Chandan JS, Chang K-L, Charlson FJ, Chattu VK, Chaturvedi S, Cherbuin N, Chimed-Ochir O, Cho DY, Choi J-YJ, Christensen H, Chu D-T, Chung MT, Chung S-C, Cicuttini FM, Ciobanu LG, Cirillo M, Classen TKD, Cohen AJ, Compton K, Cooper OR, Costa VM, Cousin E, Cowden RG, Cross DH, Cruz JA, Dahlawi SMA, Damasceno AAM, Damiani G, Dandona L, Dandona R, Dangel WJ, Danielsson A-K, Dargan PI, Darwesh AM, Daryani A, Das JK, das Gupta R, das Neves J, Dávila-Cervantes CA, Davitoiu DV, de Leo D, Degenhardt L, DeLang M, Dellavalle RP, Demeke FM, Demoz GT, Demsie DG, Denova-Gutiérrez E, Derveniz N, Dhungana GP, Dianatinasab M, Dias da Silva D, Diaz D, Dibaji Forooshani ZS, Djalalinia S, Do HT, Dokova K, Dorostkar F, Doshmangir L, Driscoll TR, Duncan BB, Duraes AR, Eagan AW, Edvardsson D, el Nahas N, el Sayed I, el Tantawi M, Elbarazi I, Elgendy IY, El-Jaafary SI, Elyazar IR, Emmons-Bell S, Erskine HE, Eskandarieh S, Esmaeilnejad S, Esteghamati A, Estep K, Etemadi A, Etisso AE, Fanzo J, Farahmand M, Fareed M,

Faridnia R, Farioli A, Faro A, Faruque M, Farzadfar F, Fattahi N, Fazlzadeh M, Feigin VL, Feldman R, Fereshtehnejad S-M, Fernandes E, Ferrara G, Ferrari AJ, Ferreira ML, Filip I, Fischer F, Fisher JL, Flor LS, Foigt NA, Folayan MO, Fomenkov AA, Force LM, Foroutan M, Franklin RC, Freitas M, Fu W, Fukumoto T, Furtado JM, Gad MM, Gakidou E, Gallus S, Garcia-Basteiro AL, Gardner WM, Geberemariam BS, Gebreslassie AAAA, Geremew A, Gershberg Hayoon A, Gething PW, Ghadimi M, Ghadiri K, Ghaffarifar F, Ghafourifard M, Ghamari F, Ghashghaee A, Ghiasvand H, Ghith N, Gholamian A, Ghosh R, Gill PS, Ginindza TGG, Giussani G, Gnedovskaya E v, Goharinezhad S, Gopalani SV, Gorini G, Goudarzi H, Goulart AC, Greaves F, Grivna M, Grosso G, Gubari MIM, Gugnani HC, Guimarães RA, Guled RA, Guo G, Guo Y, Gupta R, Gupta T, Haddock B, Hafezi-Nejad N, Hafiz A, Haj-Mirzaian A, Haj-Mirzaian A, Hall BJ, Halvaei I, Hamadeh RR, Hamidi S, Hammer MS, Hankey GJ, Haririan H, Haro JM, Hasaballah AI, Hasan MM, Hasanpoor E, Hashi A, Hassanipour S, Hassankhani H, Havmoeller RJ, Hay SI, Hayat K, Heidari G, Heidari-Soureshjani R, Henrikson HJ, Herbert ME, Herteliu C, Heydarpour F, Hird TR, Hoek HW, Holla R, Hoogar P, Hosgood HD, Hossain N, Hosseini M, Hosseinzadeh M, Hostiuc M, Hostiuc S, Househ M, Hsairi M, Hsieh VC, Hu G, Hu K, Huda TM, Humayun A, Huynh CK, Hwang B-F, Iannucci VC, Ibitoye SE, Ikeda N, Ikuta KS, Ilesanmi OS, Ilic IM, Ilic MD, Inbaraj LR, Ippolito H, Iqbal U, Irvani SSN, Irvine CMS, Islam MM, Islam SMS, Iso H, Ivers RQ, Iwu CCD, Iwu CJ, Iyamu IO, Jaafari J, Jacobsen KH, Jafari H, Jafarinia M, Jahani MA, Jakovljevic M, Jalilian F, James SL, Janjani H, Javaheri T, Javidnia J, Jeemon P, Jenabi E, Jha RP, Jha V, Ji JS, Johansson L, John O, John-Akinola YO, Johnson CO, Jonas JB, Joukar F, Jozwiak JJ, Jürisson M, Kabir A, Kabir Z, Kalani H, Kalani R, Kalankesh LR, Kalhor R, Kanchan T, Kapoor N, Karami Matin B, Karch A, Karim MA, Kassa GM, Katikireddi SV, Kayode GA, Kazemi Karyani A, Keiyoro PN, Keller C, Kemmer L, Kendrick PJ, Khalid N, Khammarnia M, Khan EA, Khan M, Khatab K, Khater MM, Khatib MN, Khayamzadeh M, Khazaei S, Kieling C, Kim YJ, Kimokoti RW, Kisa A, Kisa S, Kivimäki M, Knibbs LD, Knudsen AKS, Kocarnik JM, Kochhar S, Kopec JA, Korshunov VA, Koul PA, Koyanagi A, Kraemer MUG, Krishan K, Krohn KJ, Kromhout H, Kuate Defo B, Kumar GA, Kumar V, Kurmi OP, Kusuma D, la Vecchia C, Lacey B, Lal DK, Lalloo R, Lallukka T, Lami FH, Landires I, Lang JJ, Langan SM, Larsson AO, Lasrado S, Lauriola P, Lazarus J v, Lee PH, Lee SWH, LeGrand KE, Leigh J, Leonardi M, Lescinsky H, Leung J, Levi M, Li S, Lim L-L, Linn S, Liu S, Liu S, Liu Y, Lo J, Lopez AD, Lopez JCF, Lopukhov PD, Lorkowski S, Lotufo

PA, Lu A, Lugo A, Maddison ER, Mahasha PW, Mahdavi MM, Mahmoudi M, Majeed A, Maleki A, Maleki S, Malekzadeh R, Malta DC, Mamun AA, Manda AL, Manguerra H, Mansour-Ghanaei F, Mansouri B, Mansournia MA, Mantilla Herrera AM, Maravilla JC, Marks A, Martin R v, Martini S, Martins-Melo FR, Masaka A, Masoumi SZ, Mathur MR, Matsushita K, Maulik PK, McAlinden C, McGrath JJ, McKee M, Mehndiratta MM, Mehri F, Mehta KM, Memish ZA, Mendoza W, Menezes RG, Mengesha EW, Mereke A, Mereta ST, Meretoja A, Meretoja TJ, Mestrovic T, Miazgowski B, Miazgowski T, Michalek IM, Miller TR, Mills EJ, Mini G, Miri M, Mirica A, Mirrahimov EM, Mirzaei H, Mirzaei M, Mirzaei R, Mirzaei-Alavijeh M, Misganaw AT, Mithra P, Moazen B, Mohammad DK, Mohammad Y, Mohammad Gholi Mezerji N, Mohammadian-Hafshejani A, Mohammadifard N, Mohammadpourhodki R, Mohammed AS, Mohammed H, Mohammed JA, Mohammed S, Mokdad AH, Molokhia M, Monasta L, Mooney MD, Moradi G, Moradi M, Moradi-Lakeh M, Moradzadeh R, Moraga P, Morawska L, Morgado-da-Costa J, Morrison SD, Mosapour A, Mosser JF, Mouodi S, Mousavi SM, Mousavi Khaneghah A, Mueller UO, Mukhopadhyay S, Mullany EC, Musa KI, Muthupandian S, Nabhan AF, Naderi M, Nagarajan AJ, Nagel G, Naghavi M, Naghshtabrizi B, Naimzada MD, Najafi F, Nangia V, Nansseu JR, Naserbakht M, Nayak VC, Negoï I, Ngunjiri JW, Nguyen CT, Nguyen HLT, Nguyen M, Nigatu YT, Nikbakhsh R, Nixon MR, Nnaji CA, Nomura S, Norrving B, Noubiap JJ, Nowak C, Nunez-Samudio V, Oțoiu A, Oancea B, Odell CM, Ogbo FA, Oh I-H, Okunga EW, Oladnabi M, Olagunju AT, Olusanya BO, Olusanya JO, Omer MO, Ong KL, Onwujekwe OE, Orpana HM, Ortiz A, Osarenotor O, Osei FB, Ostroff SM, Otstavnov N, Otstavnov SS, Øverland S, Owolabi MO, P A M, Padubidri JR, Palladino R, Panda-Jonas S, Pandey A, Parry CDH, Pasovic M, Pasupula DK, Patel SK, Pathak M, Patten SB, Patton GC, Pazoki Toroudi H, Peden AE, Pennini A, Pepito VCF, Peprah EK, Pereira DM, Pesudovs K, Pham HQ, Phillips MR, Piccinelli C, Pilz TM, Piradov MA, Pirsheh M, Plass D, Polinder S, Polkinghorne KR, Pond CD, Postma MJ, Pourjafar H, Pourmalek F, Poznańska A, Prada SI, Prakash V, Pribadi DRA, Pupillo E, Quazi Syed Z, Rabiee M, Rabiee N, Radfar A, Rafiee A, Raggi A, Rahman MA, Rajabpour-Sanati A, Rajati F, Rakovac I, Ram P, Ramezanzadeh K, Ranabhat CL, Rao PC, Rao SJ, Rashedi V, Rathi P, Rawaf DL, Rawaf S, Rawal L, Rawassizadeh R, Rawat R, Razo C, Redford SB, Reiner RC, Reitsma MB, Remuzzi G, Renjith V, Renzaho AMN, Resnikoff S, Rezaei N, Rezaei N, Rezapour A, Rhinehart P-A, Riahi SM, Ribeiro DC, Ribeiro D, Rickard J, Rivera JA, Roberts NLS, Rodríguez-Ramírez S, Roever L, Ronfani L, Room R, Roshandel G, Roth GA,

Rothenbacher D, Rubagotti E, Rwegerera GM, Sabour S, Sachdev PS, Saddik B, Sadeghi E, Sadeghi M, Saeedi R, Saeedi Moghaddam S, Safari Y, Safi S, Safiri S, Sagar R, Sahebkar A, Sajadi SM, Salam N, Salamati P, Salem H, Salem MRR, Salimzadeh H, Salman OM, Salomon JA, Samad Z, Samadi Kafil H, Sambala EZ, Samy AM, Sanabria J, Sánchez-Pimienta TG, Santomauro DF, Santos IS, Santos JV, Santric-Milicevic MM, Saraswathy SYI, Sarmiento-Suárez R, Sarrafzadegan N, Sartorius B, Sarveazad A, Sathian B, Sathish T, Sattin D, Saxena S, Schaeffer LE, Schiavolin S, Schlaich MP, Schmidt MI, Schutte AE, Schwebel DC, Schwendicke F, Senbeta AM, Senthilkumaran S, Sepanlou SG, Serdar B, Serre ML, Shadid J, Shafaat O, Shahabi S, Shaheen AA, Shaikh MA, Shalash AS, Shams-Beyranvand M, Shamsizadeh M, Sharafi K, Sheikh A, Sheikhtaheri A, Shibuya K, Shield KD, Shigematsu M, Shin J il, Shin M-J, Shiri R, Shirkoohi R, Shuval K, Siabani S, Sierpinski R, Sigfusdottir ID, Sigurvinsdottir R, Silva JP, Simpson KE, Singh JA, Singh P, Skiadaresi E, Skou STS, Skryabin VY, Smith EUR, Soheili A, Soltani S, Soofi M, Sorensen RJD, Soriano JB, Sorrie MB, Soshnikov S, Soyiri IN, Spencer CN, Spotin A, Sreeramareddy CT, Srinivasan V, Stanaway JD, Stein C, Stein DJ, Steiner C, Stockfelt L, Stokes MA, Straif K, Stubbs JL, Sufiyan MB, Suleria HAR, Suliankatchi Abdulkader R, Sulo G, Sultan I, Szumowski Ł, Tabarés-Seisdedos R, Tabb KM, Tabuchi T, Taherkhani A, Tajdini M, Takahashi K, Takala JS, Tamiru AT, Taveira N, Tehrani-Banihashemi A, Temsah M-H, Tesema GA, Tessema ZT, Thurston GD, Titova MV, Tohidinik HR, Tonelli M, Topor-Madry R, Topouzis F, Torre AE, Touvier M, Tovani-Palone MRR, Tran BX, Travillian R, Tsatsakis A, Tudor Car L, Tyrovolas S, Uddin R, Umeokonkwo CD, Unnikrishnan B, Upadhyay E, Vacante M, Valdez PR, van Donkelaar A, Vasankari TJ, Vasseghian Y, Veisani Y, Venketasubramanian N, Violante FS, Vlassov V, Vollset SE, Vos T, Vukovic R, Waheed Y, Wallin MT, Wang Y, Wang Y-P, Watson A, Wei J, Wei MYW, Weintraub RG, Weiss J, Werdecker A, West JJ, Westerman R, Whisnant JL, Whiteford HA, Wiens KE, Wolfe CDA, Wozniak SS, Wu A-M, Wu J, Wulf Hanson S, Xu G, Xu R, Yadgir S, Yahyazadeh Jabbari SH, Yamagishi K, Yaminfirooz M, Yano Y, Yaya S, Yazdi-Feyzabadi V, Yeheyis TY, Yilgwan CS, Yilma MT, Yip P, Yonemoto N, Younis MZ, Younker TP, Yousefi B, Yousefi Z, Yousefinezhadi T, Yousuf AY, Yu C, Yusefzadeh H, Zahirian Moghadam T, Zamani M, Zamanian M, Zandian H, Zastrozhin MS, Zhang Y, Zhang Z-J, Zhao JT, Zhao X-JG, Zhao Y, Zhou M, Ziapour A, Zimsen SRM, Brauer M, Afshin A, Lim SS (2020) Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–

- 2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019. *Lancet* 396:1223–1249
80. Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL (2010) Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol* 49:978–86
 81. Narbutt J, Philipsen PA, Lesiak A, Sandberg Liljendahl T, Segerbäck D, Heydenreich J, Chlebna-Sokol D, Olsen P, Harrison GI, Pearson A, Baczynska K, Rogowski-Tylman M, Wulf HC, Young AR (2018) Children sustain high levels of skin DNA photodamage, with a modest increase of serum 25-hydroxyvitamin D₃ , after a summer holiday in Northern Europe. *Br J Dermatol* 179:940–950
 82. Neter JE, Stam BE, Kok FJ, Grobbee DE, Geleijnse JM (2003) Influence of weight reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Hypertension* 42:878–84
 83. O'Donnell MJ, Chin SL, Rangarajan S, Xavier D, Liu L, Zhang H, Rao-Melacini P, Zhang X, Pais P, Agapay S, Lopez-Jaramillo P, Damasceno A, Langhorne P, McQueen MJ, Rosengren A, Dehghan M, Hankey GJ, Dans AL, Elsayed A, Avezum A, Mondo C, Diener H-C, Ryglewicz D, Czlonkowska A, Pogosova N, Weimar C, Iqbal R, Diaz R, Yusuf K, Yusufali A, Oguz A, Wang X, Penaherrera E, Lanan F, Ogah OS, Ogunniyi A, Iversen HK, Malaga G, Rumboldt Z, Oveisgharan S, al Hussain F, Magazi D, Nilanont Y, Ferguson J, Pare G, Yusuf S, INTERSTROKE investigators (2016) Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. *Lancet* 388:761–75
 84. Oxlund CS, Henriksen JE, Tarnow L, Schousboe K, Gram J, Jacobsen IA (2013) Low dose spironolactone reduces blood pressure in patients with resistant hypertension and type 2 diabetes mellitus: a double blind randomized clinical trial. *J Hypertens* 31:2094–102
 85. Panayiotou BN, Prasad M v, Zaman MN (1997) Frusemide-induced bullous pemphigoid. *Br J Clin Pract* 51:49–50
 86. Pape H, Silbernagl S, Kurtz A (2019) *Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

87. Park E, Lee Y, Jue M-S (2020) Hydrochlorothiazide use and the risk of skin cancer in patients with hypertensive disorder: a nationwide retrospective cohort study from Korea. *Korean J Internal Med* 35:917–928
88. Pedersen SA, Gaist D, Schmidt SAJ, Hölmich LR, Friis S, Pottegård A (2018) Hydrochlorothiazide use and risk of nonmelanoma skin cancer: A nationwide case-control study from Denmark. *J Am Acad Dermatol* 78:673-681.e9
89. Pedersen SA, Johannesdottir Schmidt SA, Hölmich LR, Friis S, Pottegård A, Gaist D (2019) Hydrochlorothiazide use and risk for Merkel cell carcinoma and malignant adnexal skin tumors: a nationwide case-control study. *J Am Acad Dermatol* 80:460-465.e9
90. Peris K, Fargnoli MC, Garbe C, Kaufmann R, Bastholt L, Seguin NB, Bataille V, Marmol V del, Dummer R, Harwood CA, Hauschild A, Höller C, Haedersdal M, Malvehy J, Middleton MR, Morton CA, Nagore E, Stratigos AJ, Szeimies R-M, Tagliaferri L, Trakatelli M, Zalaudek I, Eggermont A, Grob JJ, European Dermatology Forum (EDF) the EA of D-O (EADO) and the EO for R and T of C (EORTC) (2019) Diagnosis and treatment of basal cell carcinoma: European consensus-based interdisciplinary guidelines. *Eur J Cancer* 118:10–34
91. Petersen B, Wulf HC, Triguero-Mas M, Philipsen PA, Thieden E, Olsen P, Heydenreich J, Dadvand P, Basagaña X, Liljendahl TS, Harrison GI, Segerbäck D, Schmalwieser AW, Young AR, Nieuwenhuijsen MJ (2014) Sun and ski holidays improve vitamin D status, but are associated with high levels of DNA damage. *J Invest Dermatol* 134:2806–2813
92. Pflugfelder A, Kochs C, Blum A, Capellaro M, Czeschik C, Dettenborn T, Dill D, Dippel E, Eigentler T, Feyer P, Follmann M, Frerich B, Ganten M-K, Gärtner J, Gutzmer R, Hassel J, Hauschild A, Hohenberger P, Hübner J, Kaatz M, Kleeberg UR, Kölbl O, Kortmann R-D, Krause-Bergmann A, Kurschat P, Leiter U, Link H, Loquai C, Löser C, Mackensen A, Meier F, Mohr P, Möhrle M, Nashan D, Reske S, Rose C, Sander C, Satzger I, Schiller M, Schlemmer H-P, Strittmatter G, Sunderkötter C, Swoboda L, Trefzer U, Voltz R, Vordermark D, Weichenthal M, Werner A, Wesselmann S, Weyergraf AJ, Wick W, Garbe C, Schadendorf D, German Dermatological Society, DermatologicCooperative Oncology Group (2013) Malignant melanoma S3-guideline “diagnosis, therapy and follow-up of melanoma”. *J Dtsch Dermatol Ges* 11:1–116, 1–126

93. Pottegård A, Hallas J, Olesen M, Svendsen MT, Habel LA, Friedman GD, Friis S (2017) Hydrochlorothiazide use is strongly associated with risk of lip cancer. *J Intern Med* 282:322–331
94. Pottegård A, Pedersen SA, Schmidt SAJ, Hölmich LR, Friis S, Gaist D (2018) Association of hydrochlorothiazide use and risk of malignant melanoma. *JAMA Intern Med* 178:1120–1122
95. Pottegård A, Pedersen SA, Schmidt SAJ, Lee C-N, Hsu C-K, Liao T-C, Shao S-C, Lai EC-C (2019) Use of hydrochlorothiazide and risk of skin cancer: a nationwide Taiwanese case-control study. *Br J Cancer* 121:973–978
96. Pottegård A, Bech BH, Pedersen SA, Christensen B (2021) Use of hydrochlorothiazide in Denmark following publication of skin cancer risk findings. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 30:1611–1616
97. Queille S, Luron L, Spatz A, Avril MF, Ribrag V, Duvillard P, Hiesse C, Sarasin A, Armand JP, Daya-Grosjean L (2007) Analysis of skin cancer risk factors in immunosuppressed renal transplant patients shows high levels of UV-specific tandem CC to TT mutations of the p53 gene. *Carcinogenesis* 28:724–31
98. Richter LHJ, Jacobs CM, Mahfoud F, Kindermann I, Böhm M, Meyer MR (2019) Development and application of a LC-HRMS/MS method for analyzing antihypertensive drugs in oral fluid for monitoring drug adherence. *Anal Chim Acta* 1070:69–79
99. Rimoldi SF, Scherrer U, Messerli FH (2014) Secondary arterial hypertension: when, who, and how to screen? *Eur Heart J* 35:1245–54
100. Rovio SP, Pahkala K, Nevalainen J, Juonala M, Salo P, Kähönen M, Hutri-Kähönen N, Lehtimäki T, Jokinen E, Laitinen T, Taittonen L, Tossavainen P, Viikari JSA, Rinne JO, Raitakari OT (2017) Cardiovascular risk factors from childhood and midlife cognitive performance. *J Am Coll Cardiol* 69:2279–2289
101. Seaton B, Ali A (1984) Simplified manual high performance clinical chemistry methods for developing countries. *Med Lab Sci* 41:327–36
102. Selvaag E (1997) Clinical drug photosensitivity. A retrospective analysis of reports to the Norwegian Adverse Drug Reactions Committee from the years 1970-1994. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 13:21–3

103. Selvaag E, Thune P (1997) Phototoxicity to sulphonamide-derived oral antidiabetics and diuretics: investigations in hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 13:4–8
104. Selvaag E, Petersen AB, Gniadecki R, Thorn T, Wulf HC (2002) Phototoxicity to diuretics and antidiabetics in the cultured keratinocyte cell line HaCaT: evaluation by clonogenic assay and single cell gel electrophoresis Comet assay). *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 18:90–5
105. Stergiou GS, Alpert B, Mieke S, Asmar R, Atkins N, Eckert S, Frick G, Friedman B, Graßl T, Ichikawa T, Ioannidis JP, Lacy P, McManus R, Murray A, Myers M, Palatini P, Parati G, Quinn D, Sarkis J, Shennan A, Usuda T, Wang J, Wu CO, O’Brien E (2018) A universal standard for the validation of blood pressure measuring devices: Association for the Advancement of Medical Instrumentation/European Society of Hypertension/International Organization for Standardization (AAMI/ESH/ISO) Collaboration Statement. *J Hypertens* 36:472–478
106. Stern RS, Laird N, Melski J, Parrish JA, Fitzpatrick TB, Bleich HL (1984) Cutaneous squamous-cell carcinoma in patients treated with PUVA. *N Engl J Med* 310:1156–61
107. Stern RS, Nichols KT, Väkevä LH (1997) Malignant melanoma in patients treated for psoriasis with methoxsalen (psoralen) and ultraviolet A radiation (PUVA). The PUVA Follow-Up Study. *N Engl J Med* 336:1041–5
108. Stern RS (1998) Photocarcinogenicity of drugs. *Toxicol Lett* 102–103:389–92
109. Stern RS, Bolshakov S, Nataraj AJ, Ananthaswamy HN (2002) p53 mutation in nonmelanoma skin cancers occurring in psoralen ultraviolet a-treated patients: evidence for heterogeneity and field cancerization. *J Invest Dermatol* 119:522–6
110. Thomopoulos C, Parati G, Zanchetti A (2014) Effects of blood pressure lowering on outcome incidence in hypertension. 1. Overview, meta-analyses, and meta-regression analyses of randomized trials. *J Hypertens* 32:
111. Thomopoulos C, Parati G, Zanchetti A (2015) Effects of blood pressure-lowering on outcome incidence in hypertension: 5. Head-to-head comparisons of various classes of antihypertensive drugs - overview and meta-analyses. *J Hypertens* 33:1321–41

112. Thomopoulos C, Parati G, Zanchetti A (2015) Effects of blood pressure lowering on outcome incidence in hypertension: 4. Effects of various classes of antihypertensive drugs--overview and meta-analyses. *J Hypertens* 33:195–211
113. Thomopoulos C, Parati G, Zanchetti A (2015) Effects of blood pressure lowering on outcome incidence in hypertension: 4. effects of various classes of antihypertensive drugs - Overview and meta-analyses. *J Hypertens* 33:195–211
114. Thomopoulos C, Parati G, Zanchetti A (2017) Effects of blood-pressure-lowering treatment on outcome incidence: 12. Effects in individuals with high-normal and normal blood pressure: overview and meta-analyses of randomized trials. *J Hypertens* 35:2150–2160
115. Thomopoulos C, Parati G, Zanchetti A (2018) Effects of blood pressure-lowering treatment on cardiovascular outcomes and mortality: 14-effects of different classes of antihypertensive drugs in older and younger patients: Overview and meta-analysis. *J Hypertens* 36:1637–1647
116. Timofeev O, Koch L, Niederau C, Tscherne A, Schneikert J, Klimovich M, Elmshäuser S, Zeitlinger M, Mernberger M, Nist A, Osterburg C, Dötsch V, Hrabé de Angelis M, Stiewe T (2020) Phosphorylation control of p53 DNA-binding cooperativity balances tumorigenesis and aging. *Cancer Res* 80:5231–5244
117. Toshiyuki M, Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293–299
118. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, Desormais I, De Backer G, Heagerty AM, Agewall S, Bochud M, Borghi C, Boutouyrie P, Brguljan J, Bueno H, Caiani EG, Carlberg B, Chapman N, Cífková R, Cleland JGF, Collet J-P, Coman IM, de Leeuw PW, Delgado V, Dendale P, Diener H-C, Dorobantu M, Fagard R, Farsang C, Ferrini M, Graham IM, Grassi G, Haller H, Hobbs FDR, Jelakovic B, Jennings C, Katus HA, Kroon AA, Leclercq C, Lovic D, Lurbe E, Manolis AJ, McDonagh TA, Messerli F, Muiesan ML, Nixdorff U, Olsen MH, Parati G, Perk J, Piepoli MF, Polonia J, Ponikowski P, Richter DJ, Rimoldi SF, Roffi M, Sattar N,

- Seferovic PM, Simpson IA, Sousa-Uva M, Stanton A V, van de Borne P, Vardas P, Volpe M, Wassmann S, Windecker S, Zamorano JL, Windecker S, Aboyans V, Agewall S, Barbato E, Bueno H, Coca A, Collet J-P, Coman IM, Dean V, Delgado V, Fitzsimons D, Gaemperli O, Hindricks G, Iung B, Jüni P, Katus HA, Knuuti J, Lancellotti P, Leclercq C, McDonagh TA, Piepoli MF, Ponikowski P, Richter DJ, Roffi M, Shlyakhto E, Simpson IA, Sousa-Uva M, Zamorano JL, Tsioufis C, Lurbe E, Kreutz R, Bochud M, Rosei EA, Jelakovic B, Azizi M, Januszewics A, Kahan T, Polonia J, van de Borne P, Williams B, Borghi C, Mancia G, Parati G, Clement DL, Coca A, Manolis A, Lovic D, Benkhedda S, Zelveian P, Siostrzonek P, Najafov R, Pavlova O, De Pauw M, Dizdarevic-Hudic L, Raev D, Karpettas N, Linhart A, Olsen MH, Shaker AF, Viigimaa M, Metsärinne K, Vavlukis M, Halimi J-M, Pagava Z, Schunkert H, Thomopoulos C, Páll D, Andersen K, Shechter M, Mercurio G, Bajraktari G, Romanova T, Trušinskis K, Saade GA, Sakalyte G, Noppe S, DeMarco DC, Caraus A, Wittekoek J, Aksnes TA, Jankowski P, Polonia J, Vinereanu D, Baranova EI, Foscoli M, Dikic AD, Filipova S, Fras Z, Bertomeu-Martínez V, Carlberg B, Burkard T, Sdiri W, Aydogdu S, Sirenko Y, Brady A, Weber T, Lazareva I, Backer T De, Sokolovic S, Jelakovic B, Widimsky J, Viigimaa M, Pörsti I, Denolle T, Krämer BK, Stergiou GS, Parati G, Trušinskis K, Miglinas M, Gerdts E, Tykarski A, de Carvalho Rodrigues M, Dorobantu M, Chazova I, Lovic D, Filipova S, Brguljan J, Segura J, Gottsäter A, Pechère-Bertschi A, Erdine S, Sirenko Y, Brady A (2018) 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J* 39:3021–3104
119. Williams B, MacDonald TM, Morant S v, Webb DJ, Sever P, McInnes GT, Ford I, Cruickshank JK, Caulfield MJ, Padmanabhan S, Mackenzie IS, Salsbury J, Brown MJ, British Hypertension Society programme of Prevention And Treatment of Hypertension With Algorithm based Therapy (PATHWAY) Study Group (2018) Endocrine and haemodynamic changes in resistant hypertension, and blood pressure responses to spironolactone or amiloride: the PATHWAY-2 mechanisms substudies. *Lancet Diabetes Endocrinol* 6:464–475
120. Willis I, Kligman AM (1968) The mechanism of photoallergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 51:378–84
121. Yogosawa S, Yoshida K (2018) Tumor suppressive role for kinases phosphorylating p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Sci* 109:3376–3382

122. Zhou B, Bentham J, di Cesare M, Bixby H, Danaei G, Cowan MJ, Paciorek CJ, Singh G, Hajifathalian K, Bennett JE, Taddei C, Bilano V, Carrillo-Larco RM, Djalalinia S, Khatibzadeh S, Lugero C, Peykari N, Zhang WZ, Lu Y, Stevens GA, Riley LM, Bovet P, Elliott P, Gu D, Ikeda N, Jackson RT, Joffres M, Kengne AP, Laatikainen T, Lam TH, Laxmaiah A, Liu J, Miranda JJ, Mondo CK, Neuhauser HK, Sundström J, Smeeth L, Soric M, Woodward M, Ezzati M, Abarca-Gómez L, Abdeen ZA, Rahim HA, Abu-Rmeileh NM, Acosta-Cazares B, Adams R, Aekplakorn W, Afsana K, Aguilar-Salinas CA, Agyemang C, Ahmadvand A, Ahrens W, al Raddadi R, al Woyatan R, Ali MM, Alkerwi A, Aly E, Amouyel P, Amuzu A, Andersen LB, Anderssen SA, Ängquist L, Anjana RM, Ansong D, Aounallah-Skhiri H, Araújo J, Ariansen I, Aris T, Arlappa N, Aryal K, Arveiler D, Assah FK, Assunção MCF, Avdicová M, Azevedo A, Azizi F, Babu B v, Bahijri S, Balakrishna N, Bandosz P, Banegas JR, Barbagallo CM, Barceló A, Barkat A, Barros AJD, Barros M v, Bata I, Batieha AM, Baur LA, Beaglehole R, Romdhane H ben, Benet M, Benson LS, Bernabe-Ortiz A, Bernotiene G, Bettiol H, Bhagyaraxmi A, Bharadwaj S, Bhargava SK, Bi Y, Bikbov M, Bjerregaard P, Bjertness E, Björkelund C, Blokstra A, Bo S, Bobak M, Boeing H, Boggia JG, Boissonnet CP, Bongard V, Braeckman L, Brajkovich I, Branca F, Breckenkamp J, Brenner H, Brewster LM, Bruno G, Bueno-de-Mesquita HB, Bugge A, Burns C, Bursztyn M, de León AC, Cacciottolo J, Cameron C, Can G, Cândido APC, Capuano V, Cardoso VC, Carlsson AC, Carvalho MJ, Casanueva FF, Casas J-P, Caserta CA, Chamukuttan S, Chan AW, Chan Q, Chaturvedi HK, Chaturvedi N, Chen C-J, Chen F, Chen H, Chen S, Chen Z, Cheng C-Y, Dekkaki IC, Chetrit A, Chiolero A, Chiou S-T, Chirita-Emandi A, Cho B, Cho Y, Chudek J, Cifkova R, Claessens F, Clays E, Concin H, Cooper C, Cooper R, Coppinger TC, Costanzo S, Cottel D, Cowell C, Craig CL, Crujeiras AB, Cruz JJ, D'Arrigo G, d'Orsi E, Dallongeville J, Damasceno A, Dankner R, Dantoft TM, Dauchet L, de Backer G, de Bacquer D, de Gaetano G, de Henauw S, de Smedt D, Deepa M, Dehghan A, Delisle H, Deschamps V, Dhana K, di Castelnuovo AF, Dias-da-Costa JS, Diaz A, Dickerson TT, Do HTP, Dobson AJ, Donfrancesco C, Donoso SP, Döring A, Doua K, Drygas W, Dulskiene V, Džakula A, Dzerve V, Dziankowska-Zaborszczyk E, Eggertsen R, Ekelund U, el Ati J, Ellert U, Elliott P, Elosua R, Erasmus RT, Erem C, Eriksen L, de la Peña JE, Evans A, Faeh D, Fall CH, Farzadfar F, Felix-Redondo FJ, Ferguson TS, Fernández-Bergés D, Ferrante D, Ferrari M, Ferreccio C, Ferrieres J, Finn JD, Fischer K, Föger B, Foo LH, Forslund A-S, Forsner M, Fortmann SP, Fouad HM, Francis DK, Franco M do C, Franco OH, Frontera G, Fuchs FD, Fuchs SC, Fujita Y,

Furusawa T, Gaciong Z, Gareta D, Garnett SP, Gaspoz J-M, Gasull M, Gates L, Gavrilu D, Geleijnse JM, Ghasemian A, Ghimire A, Giampaoli S, Gianfagna F, Giovannelli J, Goldsmith RA, Gonçalves H, Gross MG, Rivas JPG, Gottrand F, Graff-Iversen S, Grafnetter D, Grajda A, Gregor RD, Grodzicki T, Grøntved A, Gruden G, Grujic V, Gu D, Guan OP, Gudnason V, Guerrero R, Guessous I, Guimaraes AL, Gulliford MC, Gunnlaugsdottir J, Gunter M, Gupta PC, Gureje O, Gurzkowska B, Gutierrez L, Gutzwiller F, Hadaegh F, Halkjær J, Hambleton IR, Hardy R, Harikumar R, Hata J, Hayes AJ, He J, Hendriks ME, Henriques A, Cadena LH, Herrala S, Heshmat R, Hihtaniemi IT, Ho SY, Ho SC, Hobbs M, Hofman A, Dinc GH, Hormiga CM, Horta BL, Houti L, Howitt C, Htay TT, Htet AS, Hu Y, Huerta JM, Hussein AS, Huybrechts I, Hwalla N, Iacoviello L, Iannone AG, Ibrahim MM, Ikram MA, Irazola VE, Islam M, Ivkovic V, Iwasaki M, Jackson RT, Jacobs JM, Jafar T, Jamrozik K, Janszky I, Jasienska G, Jelakovic B, Jiang CQ, Joffres M, Johansson M, Jonas JB, Jørgensen T, Joshi P, Juolevi A, Jurak G, Jureša V, Kaaks R, Kafatos A, Kalter-Leibovici O, Kamaruddin NA, Kasaeian A, Katz J, Kauhanen J, Kaur P, Kavousi M, Kazakbaeva G, Keil U, Boker LK, Keinänen-Kiukaanniemi S, Kelishadi R, Kemper HCG, Kengne AP, Kersting M, Key T, Khader YS, Khalili D, Khang Y-H, Khaw K-T, Kiechl S, Killewo J, Kim J, Klumbiene J, Kolle E, Kolsteren P, Korrovits P, Koskinen S, Kouda K, Koziel S, Kristensen PL, Krokstad S, Kromhout D, Kruger HS, Kubinova R, Kuciene R, Kuh D, Kujala UM, Kula K, Kulaga Z, Kumar RK, Kurjata P, Kusuma YS, Kuulasmaa K, Kyobutungi C, Laatikainen T, Lachat C, Lam TH, Landrove O, Lanska V, Lappas G, Larijani B, Laugsand LE, Laxmaiah A, Bao KLN, Le TD, Leclercq C, Lee J, Lee J, Lehtimäki T, Lekhraj R, León-Muñoz LM, Levitt NS, Li Y, Lilly CL, Lim W-Y, Lima-Costa MF, Lin H-H, Lin X, Linneberg A, Lissner L, Litwin M, Lorbeer R, Lotufo PA, Lozano JE, Luksiene D, Lundqvist A, Lunet N, Lytsy P, Ma G, Ma J, Machado-Coelho GLL, Machi S, Maggi S, Magliano DJ, Majer M, Makdisse M, Malekzadeh R, Malhotra R, Rao KM, Malyutina S, Manios Y, Mann JI, Manzato E, Margozzini P, Marques-Vidal P, Marrugat J, Martorell R, Mathiesen EB, Matijasevich A, Matsha TE, Mbanya JCN, Posso AJMD, McFarlane SR, McGarvey ST, McLachlan S, McLean RM, McNulty BA, Khir ASM, Mediene-Benchekor S, Medzioniene J, Meirhaeghe A, Meisinger C, Menezes AMB, Menon GR, Meshram II, Metspalu A, Mi J, Mikkil K, Miller JC, Miquel JF, Mišigoj-Durakovic M, Mohamed MK, Mohammad K, Mohammadifard N, Mohan V, Yusoff MFM, Møller NC, Molnár D, Momenan A, Mondo CK, Monyeki KDK, Moreira LB, Morejon A, Moreno LA, Morgan K, Moschonis G, Mossakowska M, Mostafa A, Mota

J, Motlagh ME, Motta J, Muiesan ML, Müller-Nurasyid M, Murphy N, Mursu J, Musil V, Nagel G, Naidu BM, Nakamura H, Námešná J, Nang EEK, Nangia VB, Narake S, Navarrete-Muñoz EM, Ndiaye NC, Neal WA, Nenko I, Nervi F, Nguyen ND, Nguyen QN, Nieto-Martínez RE, Niiranen TJ, Ning G, Ninomiya T, Nishtar S, Noale M, Noboa OA, Noorbala AA, Noorbala T, Noto D, al Nsour M, O'Reilly D, Oh K, Olinto MTA, Oliveira IO, Omar MA, Onat A, Ordunez P, Osmond C, Ostojic SM, Otero JA, Overvad K, Owusu-Dabo E, Paccaud FM, Padez C, Pahomova E, Pajak A, Palli D, Palmieri L, Panda-Jonas S, Panza F, Papandreou D, Parnell WR, Parsaeian M, Pecin I, Pednekar MS, Peer N, Peeters PH, Peixoto SV, Pelletier C, Peltonen M, Pereira AC, Pérez RM, Peters A, Petkeviciene J, Pham ST, Pigeot I, Pikhart H, Pilav A, Pilotto L, Pitakaka F, Plans-Rubió P, Polakowska M, Polašek O, Porta M, Portegies ML, Pourshams A, Pradeepa R, Prashant M, Price JF, Puij M, Punab M, Qasrawi RF, Qorbani M, Radic I, Radisauskas R, Rahman M, Raitakari O, Raj M, Rao SR, Ramachandran A, Ramos E, Rampal S, Reina DAR, Rasmussen F, Redon J, Reganit PFM, Ribeiro R, Riboli E, Rigo F, de Wit TFR, Ritti-Dias RM, Robinson SM, Robitaille C, Rodríguez-Artalejo F, Rodríguez-Perez del Cristo M, Rodríguez-Villamizar LA, Rojas-Martinez R, Rosengren A, Rubinstein A, Rui O, Ruiz-Betancourt BS, Horimoto ARVR, Rutkowski M, Sabanayagam C, Sachdev HS, Saidi O, Sakarya S, Salanave B, Salazar Martinez E, Salmerón D, Salomaa V, Salonen JT, Salvetti M, Sánchez-Abanto J, Sans S, Santos D, Santos IS, dos Santos RN, Santos R, Saramies JL, Sardinha LB, Margolis GS, Sarrafzadegan N, Saum K-U, Savva SC, Scazufca M, Schargrodsky H, Schneider IJ, Schultsz C, Schutte AE, Sen A, Senbanjo IO, Sepanlou SG, Sharma SK, Shaw JE, Shibuya K, Shin DW, Shin Y, Siantar R, Sibai AM, Silva DAS, Simon M, Simons J, Simons LA, Sjöström M, Skovbjerg S, Slowikowska-Hilczer J, Slusarczyk P, Smeeth L, Smith MC, Snijder MB, So H-K, Sobngwi E, Söderberg S, Solfrizzi V, Sonestedt E, Song Y, Sørensen TI, Jérôme CS, Soumare A, Staessen JA, Starc G, Stathopoulou MG, Stavreski B, Steene-Johannessen J, Stehle P, Stein AD, Stergiou GS, Stessman J, Stieber J, Stöckl D, Stocks T, Stokwiszewski J, Stronks K, Strufaldi MW, Sun C-A, Sundström J, Sung Y-T, Suriyawongpaisal P, Sy RG, Tai ES, Tammesoo M-L, Tamosiunas A, Tang L, Tang X, Tanser F, Tao Y, Tarawneh MR, Tarqui-Mamani CB, Taylor A, Theobald H, Thijs L, Thuesen BH, Tjonneland A, Tolonen HK, Tolstrup JS, Topbas M, Topór-Madry R, Tormo MJ, Torrent M, Traissac P, Trichopoulos D, Trichopoulou A, Trinh OTH, Trivedi A, Tshepo L, Tulloch-Reid MK, Tuomainen T-P, Tuomilehto J, Turley ML, Tynelius P, Tzourio C, Ueda P, Ugel E, Ulmer H, Uusitalo HMT, Valdivia G, Valvi

D, van der Schouw YT, van Herck K, van Rossem L, van Valkengoed IG, Vanderschueren D, Vanuzzo D, Vatten L, Vega T, Velasquez-Melendez G, Veronesi G, Verschuren WMM, Verstraeten R, Victora CG, Viet L, Viikari-Juntura E, Vineis P, Vioque J, Virtanen JK, Visvikis-Siest S, Viswanathan B, Vollenweider P, Voutilainen S, Vrdoljak A, Vrijheid M, Wade AN, Wagner A, Walton J, Mohamud WNW, Wang M-D, Wang Q, Wang YX, Wannamethee SG, Wareham N, Wedderkopp N, Weerasekera D, Whincup PH, Widhalm K, Widyahening IS, Wiecek A, Wijga AH, Wilks RJ, Willeit J, Willeit P, Williams EA, Wilsgaard T, Wojtyniak B, Wong TY, Wong-McClure RA, Woo J, Woodward M, Wu AG, Wu FC, Wu SL, Xu H, Yan W, Yang X, Ye X, Yiallourou PK, Yoshihara A, Younger-Coleman NO, Yusoff AF, Yusoff MFM, Zambon S, Zdrojewski T, Zeng Y, Zhao D, Zhao W, Zheng Y, Zhu D, Zimmermann E, Zuñiga Cisneros J (2017) Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants. *Lancet* 389:37–55

123. Zhou B, Carrillo-Larco RM, Danaei G, Riley LM, Paciorek CJ, Stevens GA, Gregg EW, Bennett JE, Solomon B, Singleton RK, Sophiea MK, Iurilli ML, Lhoste VP, Cowan MJ, Savin S, Woodward M, Balanova Y, Cifkova R, Damasceno A, Elliott P, Farzadfar F, He J, Ikeda N, Kengne AP, Khang Y-H, Kim HC, Laxmaiah A, Lin H-H, Margozzini Maira P, Miranda JJ, Neuhauser H, Sundström J, Varghese C, Widyahening IS, Zdrojewski T, Abarca-Gómez L, Abdeen ZA, Abdul Rahim HF, Abu-Rmeileh NM, Acosta-Cazares B, Adams RJ, Aekplakorn W, Afsana K, Afzal S, Agdeppa IA, Aghazadeh-Attari J, Aguilar-Salinas CA, Agyemang C, Ahmad NA, Ahmadi A, Ahmadi N, Ahmadi N, Ahmadizar F, Ahmed SH, Ahrens W, Ajlouni K, Al-Raddadi R, Alarouj M, AlBuhairan F, AlDhukair S, Ali MM, Alkandari A, Alkerwi A, Allin K, Aly E, Amarapurkar DN, Amougou N, Amouyel P, Andersen LB, Anderssen SA, Anjana RM, Ansari-Moghaddam A, Ansong D, Aounallah-Skhiri H, Araújo J, Ariansen I, Aris T, Arku RE, Arlappa N, Aryal KK, Aspelund T, Assah FK, Assunção MCF, Auvinen J, Avdičová M, Azevedo A, Azimi-Nezhad M, Azizi F, Azmin M, Babu B v, Bahijri S, Balakrishna N, Bamoshmoosh M, Banach M, Banadinović M, Bandosz P, Banegas JR, Baran J, Barbagallo CM, Barceló A, Barkat A, Barreto M, Barros AJ, Barros MVG, Bartosiewicz A, Basit A, Bastos JLD, Bata I, Batiha AM, Batyrbek A, Baur LA, Beaglehole R, Belavendra A, ben Romdhane H, Benet M, Benson LS, Berkinbayev S, Bernabe-Ortiz A, Bernotiene G, Bettiol H, Bezerra J, Bhagyalaxmi A, Bhargava SK, Bia D, Biasch K, Bika Lele EC, Bikbov MM, Bista B, Bjerregaard P, Bjertness E, Bjertness

MB, Björkelund C, Bloch K v, Blokstra A, Bo S, Bobak M, Boeing H, Boggia JG, Boissonnet CP, Bojesen SE, Bongard V, Bonilla-Vargas A, Bopp M, Borghs H, Bovet P, Boyer CB, Braeckman L, Brajkovich I, Branca F, Breckenkamp J, Brenner H, Brewster LM, Briceño Y, Brito M, Bruno G, Bueno-de-Mesquita HB, Bueno G, Bugge A, Burns C, Bursztyń M, Cabrera de León A, Cacciottolo J, Cameron C, Can G, Cândido APC, Capanzana M v, Čapková N, Capuano E, Capuano V, Cardoso VC, Carlsson AC, Carvalho J, Casanueva FF, Censi L, Cervantes-Loaiza M, Chadjigeorgiou CA, Chamukuttan S, Chan AW, Chan Q, Chaturvedi HK, Chaturvedi N, Chee ML, Chen C-J, Chen F, Chen H, Chen S, Chen Z, Cheng C-Y, Cheraghian B, Cherkaoui Dekkaki I, Chetrit A, Chien K-L, Chioloro A, Chiou S-T, Chirita-Emandi A, Chirlaque M-D, Cho B, Christensen K, Christofaro DG, Chudek J, Cinteza E, Claessens F, Clarke J, Clays E, Cohen E, Concin H, Cooper C, Coppinger TC, Costanzo S, Cottel D, Cowell C, Craig CL, Crampin AC, Crujeiras AB, Cruz JJ, Csilla S, Cui L, Cureau F v, Cuschieri S, D'Arrigo G, d'Orsi E, Dallongeville J, Dankner R, Dantoft TM, Dauchet L, Davletov K, de Backer G, de Bacquer D, de Curtis A, de Gaetano G, de Henauw S, de Oliveira PD, de Ridder D, de Smedt D, Deepa M, Deev AD, DeGennaro VJ, Delisle H, Demarest S, Dennison E, Deschamps V, Dhimal M, di Castelnuovo AF, Dias-da-Costa JS, Diaz A, Dickerson TT, Dika Z, Djalalinia S, Do HT, Dobson AJ, Donfrancesco C, Donoso SP, Döring A, Dorobantu M, Dörr M, Doua K, Dragano N, Drygas W, Duante CA, Duboz P, Duda RB, Dulskiene V, Dushpanova A, Džakula A, Dzerve V, Dzionkowska-Zaborszczyk E, Eddie R, Eftekhari E, Eggertsen R, Eghtesad S, Eiben G, Ekelund U, El-Khateeb M, el Ati J, Eldemire-Shearer D, Eliasen M, Elosua R, Erasmus RT, Erbel R, Erem C, Eriksen L, Eriksson JG, Escobedo-de la Peña J, Eslami S, Esmacili A, Evans A, Faeh D, Fakhretdinova AA, Fall CH, Faramarzi E, Farjam M, Fattahi MR, Fawwad A, Felix-Redondo FJ, Felix SB, Ferguson TS, Fernandes RA, Fernández-Bergés D, Ferrante D, Ferrao T, Ferrari M, Ferrario MM, Ferreccio C, Ferreira HS, Ferrer E, Ferrieres J, Figueiró TH, Fink G, Fischer K, Foo LH, Forsner M, Fouad HM, Francis DK, Franco M do C, Frikke-Schmidt R, Frontera G, Fuchs FD, Fuchs SC, Fujita Y, Fumihiko M, Furdela V, Furer A, Furusawa T, Gaciong Z, Galbarczyk A, Galenkamp H, Galvano F, Gao J, Gao P, Garcia-de-la-Hera M, Garcia P, Gareta D, Garnett SP, Gaspoz J-M, Gasull M, Gazzinelli A, Gehring U, Geleijnse JM, George R, Ghanbari A, Ghasemi E, Gheorghe-Fronea O-F, Ghimire A, Gialluisi A, Giampaoli S, Gieger C, Gill TK, Giovannelli J, Gironella G, Giwerzman A, Gkiouras K, Goldberg M, Goldsmith RA, Gomez LF, Gomula A, Gonçalves H, Gonçalves M, Gonçalves Cordeiro da Silva B,

Gonzalez-Chica DA, Gonzalez-Gross M, González-Rivas JP, González-Villalpando C, González-Villalpando M-E, Gonzalez AR, Gorbea MB, Gottrand F, Graff-Iversen S, Grafnetter D, Grajda A, Grammatikopoulou MG, Gregor RD, Grodzicki T, Grosso G, Gruden G, Gu D, Guan OP, Gudmundsson EF, Gudnason V, Guerrero R, Guessous I, Guimaraes AL, Gulliford MC, Gunnlaugsdottir J, Gunter MJ, Gupta PC, Gupta R, Gureje O, Gurzkowska B, Gutierrez L, Gutzwiller F, Ha S, Hadaegh F, Haghshenas R, Hakimi H, Halkjær J, Hambleton IR, Hamzeh B, Hange D, Hanif AA, Hantunen S, Hao J, Hardman CM, Hari Kumar R, Hashemi-Shahri SM, Hata J, Haugsgjerd T, Hayes AJ, He Y, Heier M, Hendriks ME, Henrique R dos S, Henriques A, Hernandez Cadena L, Herqutanto, Herrala S, Heshmat R, Hill AG, Ho SY, Ho SC, Hobbs M, Holdsworth M, Homayounfar R, Horasan Dinc G, Horimoto AR, Hormiga CM, Horta BL, Houti L, Howitt C, Htay TT, Htet AS, Htike MMT, Hu Y, Huerta JM, Huhtaniemi IT, Huiart L, Huisman M, Husseini AS, Huybrechts I, Hwalla N, Iacoviello L, Iannone AG, Ibrahim MM, Ibrahim Wong N, Ikram MA, Iotova V, Irazola VE, Ishida T, Isiguzo GC, Islam M, Islam SMS, Iwasaki M, Jackson RT, Jacobs JM, Jaddou HY, Jafar T, James K, Jamrozik K, Janszky I, Janus E, Jarvelin M-R, Jasienska G, Jelaković A, Jelaković B, Jennings G, Jha AK, Jiang CQ, Jimenez RO, Jöckel K-H, Joffres M, Johansson M, Jokelainen JJ, Jonas JB, Jørgensen T, Joshi P, Joukar F, Józwiak J, Juolevi A, Jurak G, Jureša V, Kaaks R, Kafatos A, Kajantie EO, Kalamatayeva Z, Kalpourtzi N, Kalter-Leibovici O, Kampmann FB, Kannan S, Karaglani E, Kårhus LL, Karki KB, Katibeh M, Katz J, Kauhanen J, Kaur P, Kavousi M, Kazakbaeva GM, Keil U, Keinan Boker L, Keinänen-Kiukaanniemi S, Kelishadi R, Kemper HC, Keramati M, Kerimkulova A, Kersting M, Key T, Khader YS, Khalili D, Khaw K-T, Kheiri B, Kheradmand M, Khosravi A, Kiechl-Kohlendorfer U, Kiechl S, Killewo J, Kim DW, Kim J, Klakk H, Klimek M, Klumbiene J, Knoflach M, Kolle E, Kolsteren P, Kontto JP, Korpelainen R, Korrovits P, Kos J, Koskinen S, Kouda K, Kowlessur S, Koziel S, Kratenova J, Kriaucioniene V, Kristensen PL, Krokstad S, Kromhout D, Kruger HS, Kubinova R, Kuciene R, Kujala UM, Kulaga Z, Kumar RK, Kurjata P, Kusuma YS, Kutsenko V, Kuulasmaa K, Kyobutungi C, Laatikainen T, Lachat C, Laid Y, Lam TH, Landrove O, Lanska V, Lappas G, Larijani B, Latt TS, le Coroller G, le Nguyen Bao K, Le TD, Lee J, Lee J, Lehmann N, Lehtimäki T, Lemogoum D, Levitt NS, Li Y, Lilly CL, Lim W-Y, Lima-Costa MF, Lin X, Lin Y-T, Lind L, Lingam V, Linneberg A, Lissner L, Litwin M, Lo W-C, Loit H-M, Lopez-Garcia E, Lopez T, Lotufo PA, Lozano JE, Lukačević Lovrenčić I, Lukrafka JL, Luksiene D, Lundqvist A, Lundqvist R, Lunet N, Lustigová

M, Luszczki E, Ma G, Ma J, Machado-Coelho GL, Machado-Rodrigues AM, Macia E, Macieira LM, Madar AA, Maggi S, Magliano DJ, Magriplis E, Mahasampath G, Maire B, Majer M, Makdisse M, Malekzadeh F, Malekzadeh R, Malhotra R, Mallikharjuna Rao K, Malyutina SK, Maniego L v, Manios Y, Mann JI, Mansour-Ghanaei F, Manzato E, Marcil A, Mårild SB, Marinović Glavić M, Marques-Vidal P, Marques LP, Marrugat J, Martorell R, Mascarenhas LP, Matasin M, Mathiesen EB, Mathur P, Matijasevich A, Matlosh P, Matsha TE, Mavrogianni C, Mbanya JCN, Mc Donald Posso AJ, McFarlane SR, McGarvey ST, McLachlan S, McLean RM, McLean SB, McNulty BA, Mediene Benchekor S, Medzioniene J, Mehdipour P, Mehlig K, Mehrparvar AH, Meirhaeghe A, Meisinger C, Mendoza Montano C, Menezes AMB, Menon GR, Mereke A, Meshram II, Metspalu A, Meyer HE, Mi J, Michels N, Mikkil K, Milkowska K, Miller JC, Minderico CS, Mini G, Mirjalili MR, Mirrakhimov E, Mišigoj-Duraković M, Modesti PA, Moghaddam SS, Mohajer B, Mohamed MK, Mohamed SF, Mohammad K, Mohammadi MR, Mohammadi Z, Mohammadifard N, Mohammadpourhodki R, Mohan V, Mohanna S, Mohd Yusoff MF, Mohebbi I, Mohebi F, Moitry M, Møllehave LT, Molnár D, Momenan A, Mondo CK, Monterrubio-Flores E, Monyeki KDK, Moon JS, Moosazadeh M, Moreira LB, Morejon A, Moreno LA, Morgan K, Moschonis G, Mossakowska M, Mostafa A, Mostafavi S-A, Mota J, Motlagh ME, Motta J, Moura-dos-Santos MA, Mridha MK, Msyamboza KP, Mu TT, Muhihi AJ, Muiesan ML, Müller-Nurasyid M, Murphy N, Mursu J, Musa KI, Musić Milanović S, Musil V, Mustafa N, Nabipour I, Naderimagham S, Nagel G, Naidu BM, Najafi F, Nakamura H, Námešná J, Nang EEK, Nangia VB, Narake S, Ndiaye NC, Neal WA, Nejatizadeh A, Nenko I, Neovius M, Nguyen CT, Nguyen ND, Nguyen Q v, Nguyen QN, Nieto-Martínez RE, Niiranen TJ, Nikitin YP, Ninomiya T, Nishtar S, Njelekela MA, Noale M, Noboa OA, Noorbala AA, Norat T, Nordendahl M, Nordestgaard BG, Noto D, Nowak-Szczepanska N, Nsour M al, Nunes B, O'Neill TW, O'Reilly D, Ochimana C, Oda E, Odili AN, Oh K, Ohara K, Ohtsuka R, Olié V, Olinto MTA, Oliveira IO, Omar MA, Onat A, Ong SK, Ono LM, Ordunez P, Ornelas R, Ortiz PJ, Osmond C, Ostojic SM, Ostovar A, Otero JA, Overvad K, Owusu-Dabo E, Paccaud FM, Padez C, Pahomova E, Paiva KM de, Pająk A, Palli D, Palmieri L, Pan W-H, Panda-Jonas S, Panza F, Paoli M, Papandreou D, Park S-W, Park S, Parnell WR, Parsaeian M, Pasquet P, Patel ND, Pavlyshyn H, Pećin I, Pednekar MS, Pedro JM, Peer N, Peixoto SV, Peltonen M, Pereira AC, Peres KG, Peres MA, Peters A, Petkeviciene J, Peykari N, Pham ST, Pichardo RN, Pigeot I, Pikhart H, Pilav A, Pilotto L, Pitakaka F, Piwonska A, Pizarro A n, Plans-Rubió P, Polašek O, Porta M, Poudyal A,

Pourfarzi F, Pourshams A, Poustchi H, Pradeepa R, Price AJ, Price JF, Providencia R, Puhakka SE, Puiu M, Punab M, Qasrawi RF, Qorbani M, Queiroz D, Quoc Bao T, Radić I, Radisauskas R, Rahimikazerooni S, Rahman M, Raitakari O, Raj M, Rakhimova EM, Ramachandra Rao S, Ramachandran A, Ramos E, Rampal L, Rampal S, Rangel Reina DA, Rarra V, Rech CR, Redon J, Reganit PFM, Regecová V, Revilla L, Rezaianzadeh A, Ribeiro R, Riboli E, Richter A, Rigo F, Rinke de Wit TF, Ritti-Dias RM, Robitaille C, Rodríguez-Artalejo F, Rodríguez-Perez M del C, Rodríguez-Villamizar LA, Roggenbuck U, Rojas-Martinez R, Romaguera D, Romeo EL, Rosengren A, Roy JG, Rubinstein A, Ruidavets J-B, Ruiz-Betancourt BS, Ruiz-Castell M, Rusakova IA, Russo P, Rutkowski M, Sabanayagam C, Sabbaghi H, Sachdev HS, Sadjadi A, Safarpour AR, Safi S, Safiri S, Saidi O, Sakarya S, Saki N, Salanave B, Salazar Martinez E, Salmerón D, Salomaa V, Salonen JT, Salvetti M, Sánchez-Abanto J, Sans S, Santos DA, Santos IS, Santos LC, Santos MP, Santos R, Saramies JL, Sardinha LB, Sarganas G, Sarrafzadegan N, Sathish T, Saum K-U, Savva S, Sawada N, Sbaraini M, Sczufca M, Schaan BD, Schargrodsky H, Schipf S, Schmidt CO, Schnohr P, Schöttker B, Schramm S, Schultz C, Schutte AE, Sebert S, Sein AA, Sen A, Senbanjo IO, Sepanlou SG, Servais J, Shalnova SA, Shamah-Levy T, Shamshirgaran M, Shanthirani CS, Sharafkhan M, Sharma SK, Shaw JE, Shayanrad A, Shayesteh AA, Shi Z, Shibuya K, Shimizu-Furusawa H, Shin DW, Shirani M, Shiri R, Shrestha N, Si-Ramlee K, Siani A, Siantar R, Sibai AM, Silva CR de M, Silva DAS, Simon M, Simons J, Simons LA, Sjöström M, Slowikowska-Hilczer J, Slusarczyk P, Smeeth L, So H-K, Soares FC, Sobngwi E, Söderberg S, Soemantri A, Sofat R, Solfrizzi V, Somi MH, Sonestedt E, Song Y, Sørensen TI, Sørgerd EP, Sorić M, Sossa Jérôme C, Soumaré A, Sparboe-Nilsen B, Sparrenberger K, Staessen JA, Starc G, Stavreski B, Steene-Johannessen J, Stehle P, Stein AD, Stergiou GS, Stessman J, Stieber J, Stöckl D, Stocks T, Stokwiszewski J, Stronks K, Strufaldi MW, Suka M, Sun C-A, Sung Y-T, Suriyawongpaisal P, Sy RG, Syddall HE, Sylva RC, Szklo M, Tai ES, Tammesoo M-L, Tamosiunas A, Tan EJ, Tang X, Tanser F, Tao Y, Tarawneh MR, Tarqui-Mamani CB, Taylor A, Taylor J, Tebar WR, Tell GS, Tello T, Tham YC, Thankappan K, Theobald H, Theodoridis X, Thijs L, Thinggaard M, Thomas N, Thorand B, Thuesen BH, Timmermans EJ, Tjandrarini DH, Tjonneland A, Toft U, Tolonen HK, Tolstrup JS, Topbas M, Topór-Madry R, Tormo MJ, Tornaritis MJ, Torrent M, Torres-Collado L, Touloumi G, Traissac P, Triantafyllou A, Trichopoulos D, Trichopoulou A, Trinh OT, Trivedi A, Tshepo L, Tsugane S, Tuliakova AM, Tulloch-Reid MK, Tullu F, Tuomainen T-P, Tuomilehto J, Turley ML,

Twig G, Tynelius P, Tzourio C, Ueda P, Ugel E, Ulmer H, Uusitalo HM, Valdivia G, Valvi D, van Dam RM, van den Born B-J, van der Heyden J, van der Schouw YT, van Herck K, van Minh H, van Schoor NM, van Valkengoed IG, van Zutphen EM, Vanderschueren D, Vanuzzo D, Varbo A, Vasani SK, Vega T, Veidebaum T, Velasquez-Melendez G, Veronesi G, Verschuren WM, Verstraeten R, Victora CG, Viet L, Villalpando S, Vineis P, Vioque J, Virtanen JK, Visvikis-Siest S, Viswanathan B, Vlasoff T, Vollenweider P, Voutilainen A, Wade AN, Walton J, Wambiya EO, Wan Bekkar WM, Wan Mohamad WN, Wanderley Júnior R de S, Wang M-D, Wang N, Wang Q, Wang X, Wang YX, Wang Y-W, Wannamethee SG, Wareham N, Wei W, Weres A, Werner B, Whincup PH, Widhalm K, Wiecek A, Wilks RJ, Willeit J, Willeit P, Williams EA, Wilsgaard T, Wojtyniak B, Wong-McClure RA, Wong A, Wong TY, Woo J, Wu FC, Wu S, Wyszynska J, Xu H, Xu L, Yaacob NA, Yan W, Yang L, Yang X, Yang Y, Yasuharu T, Ye X, Yiallourous PK, Yoosefi M, Yoshihara A, You S-L, Younger-Coleman NO, Yusoff AF, Zainuddin AA, Zakavi SR, Zamani F, Zambon S, Zampelas A, Zapata ME, Zaw KK, Zejglicova K, Zeljkovic Vrkic T, Zeng Y, Zhang L, Zhang Z-Y, Zhao D, Zhao M-H, Zhen S, Zheng Y, Zholdin B, Zhu D, Zins M, Zitt E, Zocalo Y, Zoghalmi N, Zuñiga Cisneros J, Ezzati M (2021) Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *Lancet* 398:957–980

124. Zillich AJ, Garg J, Basu S, Bakris GL, Carter BL (2006) Thiazide diuretics, potassium, and the development of diabetes: a quantitative review. *Hypertension* 48:219–24

7. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Herrn Professor Böhm für die Gelegenheit zur klinischen und wissenschaftlichen Arbeit und der Möglichkeit einer Promotion in seiner Klinik danken.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater und klinischen Mentor Herrn Professor Felix Mahfoud, der mich während des gesamten Prozesses dieser Arbeit stetig unterstützt und gefördert hat, der mir jederzeit zu Rate stand und immer mit konstruktiver Kritik und motivierenden Vorschlägen zur Seite stand. Durch die Zusammenarbeit konnte ich viele neue Dinge persönlich wie beruflich lernen und erfahren, wofür ich sehr dankbar bin.

Meinem „Betreuer-Team“, bestehend aus Frau Dr. rer. nat. Angelika Wachter, Herr Dr. med. Dominic Millenaar, Herr Dr. med. Lucas Lauder und Herr Dr. rer. nat. Mathias Hohl möchte ich ebenso sehr danken. Ohne Eure herausragende und unermüdliche Hilfe und Unterstützung wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen. Ich bin euch allen sehr dankbar.

Dann möchte ich danken,

Den großartigen Helferinnen Nina Rebmann, Julia Weber, Jannette Zimolong, Simone Jäger, Freya Lau und Barbara Neurath für ihre Ratschläge, ihren Enthusiasmus und ihre Geduld.

Herrn Professor Christian Ukena für sein Vorbild und seine Unterstützung.

Herrn Professor Markus Robert Meyer und dessen Team für die toxikologischen Analysen.

Herrn Professor Jörg Reichrath für seine fachspezifischen Ratschläge und sein offenes Ohr.

Frau Dagmar Hennes für ihre Unterstützung und geduldige Hilfe in der Lichttherapie.

Meinem Freund Dr. med. Michael Kunz, der mich anweist und anspricht ein besserer Mensch zu sein und mir ein großartiges Vorbild ist.

Allen freiwilligen Teilnehmerinnen und Teilnehmern.

Meinen Kolleginnen und Kollegen.

Meiner Familie und meinen Freunden ohne die ich nichts wäre.

8. PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

Publikationen

Götzinger F, Reichrath J, Millenaar D, Lauder L, Meyer MR, Böhm M, Mahfoud F. Photoinduced skin reactions of cardiovascular drugs - a systematic review. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*. 2022 Jun 8;8(4):420-430. doi: 10.1093/ehjcvp/pvac017. PMID: 35278085.

Götzinger F, Wilke T, Hardtstock F, Krieger J, Maywald U, Kunz M, Lauder L, Schulz M, Mahfoud F, Böhm M. Association of hydrochlorothiazide treatment compared with alternative diuretics with overall and skin cancer risk: a propensity-matched cohort study. *J Hypertens*. 2023 Jun 1;41(6):926-933. doi: 10.1097/HJH.0000000000003414. PMID: 36927711.

Götzinger F, Hohl M, Lauder L, Millenaar D, Kunz M, Meyer MR, Ukena C, Lerche CM, Philipsen PA, Reichrath J, Böhm M, Mahfoud F. A randomized, placebo-controlled, trial to assess the photosensitizing, phototoxic and carcinogenic potential of hydrochlorothiazide in healthy volunteers. *J Hypertens*. 2023 Nov 1;41(11):1853-1862. doi: 10.1097/HJH.0000000000003558. PMID: 37702559.

Sonstige Publikationen

Al Ghorani H, **Götzinger F**, Böhm M, Mahfoud F. Arterial hypertension - Clinical trials update 2021. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2022 Jan;32(1):21-31. doi: 10.1016/j.numecd.2021.09.007. Epub 2021 Sep 16. PMID: 34690044; PMCID: PMC8444354.

Mahfoud F, **Götzinger F**, Millenaar D. Meta-Analysis in Renal Denervation - Or How to Compare Apples With Oranges? *Cardiovasc Revasc Med*. 2022 Jan;34:119-120. doi: 10.1016/j.carrev.2021.10.013. Epub 2021 Nov 6. PMID: 34753669.

Götzinger F, Kunz M, Lauder L, Böhm M, Mahfoud F. Arterial hypertension - clinical trials update 2022. *Hypertens Res*. 2022 Jul;45(7):1140-1146. doi: 10.1038/s41440-022-00931-2. Epub 2022 May 13. Erratum in: *Hypertens Res*. 2022 Sep;45(9):1528. PMID: 35562419.

Kunz M, **Götzinger F**, Emrich I, Schwenger V, Böhm M, Mahfoud F. Cardio-renal interaction - Clinical trials update 2022. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2022 Nov;32(11):2451-2458. doi: 10.1016/j.numecd.2022.07.002. Epub 2022 Jul 19. PMID: 36064690.

Al Ghorani H, Kulenthiran S, Recktenwald MJM, Lauder L, Kunz M, **Götzinger F**, Ewen S, Ukena C, Böhm M, Mahfoud F. 10-Year Outcomes of Catheter-Based Renal Denervation in Patients With Resistant Hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2023 Feb 7;81(5):517-519. doi: 10.1016/j.jacc.2022.11.038. PMID: 36725181.

Götzinger F, Lauder L, Sharp ASP, Lang IM, Rosenkranz S, Konstantinides S, Edelman ER, Böhm M, Jaber W, Mahfoud F. Interventional therapies for pulmonary embolism. *Nat Rev Cardiol.* 2023 in press

Hohl M, Lauder L, Sevimli Ö, Tokcan M, Wagmann L, **Götzinger F**, Schneider C, Hübner U, Lehnert U, Meyer MR, Böhm M, Mahfoud F. Efficacy of antihypertensive drugs of different classes after renal denervation in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2023 accepted

Kongressbeiträge

Jahrestagung der DGK Mannheim 2022	Hydrochlorothiazide did not lead to phototoxic reactions and DNA damage in healthy volunteers - the "HCTox-Study"
Joint international Symposium of Vitamin D and Phototherapy Homburg 2022	Hydrochlorothiazide did not lead to phototoxic reactions and DNA damage in healthy volunteers - the "HCTox-Study"
ESC Congress Barcelona 2022	Hydrochlorothiazide did not lead to phototoxic reactions and DNA damage in healthy volunteers - the "HCTox study"
ISH Congress Kyoto 2022	Hydrochlorothiazide did not lead to phototoxic reactions and DNA damage in healthy volunteers - the "HCTox study"
Jahrestagung der DGK Mannheim 2023	Association of hydrochlorothiazide treatment compared to alternative diuretics with overall and skin cancer risk: A propensity-matched cohort study

Forschungsförderung

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Herzstiftung mit **69.500 Euro** gefördert.

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Flow-chart der Probandenrekrutierung	32
Abbildung 2: Ablaufplan der klinischen Studie.....	34
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Lichttreppenuntersuchung und deren Auswertung nach 24 Stunden	37
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Ganzkörperbestrahlung und nachfolgender Bestimmung der Pyrimidindimere im Urin.....	39
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Laborexperimente	45
Abbildung 6: Vorher-Nachher-Blot der Minimalen Erythem-Dosis im UVB-Bereich.....	60
Abbildung 7: Änderungen des Blutdrucks.....	61
Abbildung 8: Änderungen der Serum Vitamin D-Spiegel.....	62
Abbildung 9: Änderungen der Nierenretentionsparameter und Serumelektrolyte.....	64
Abbildung 10: Relative mRNA-Expression der inflammatorischen Markergene IL-6 und TNF α	65
Abbildung 11: Proteinexpression des Onkoprotein p53 und dessen phosphorylierten Zustandes pp53 nach 6 Stunden	66
Abbildung 12: Proteinexpression des Onkoproteins p53 und dessen phosphorylierten Zustandes pp53 nach 24 Stunden	67
Abbildung 13: Proteinexpression der Proteine SOD-1 und Catalase nach 24 Stunden.....	68
Abbildung 14: Proteinexpression der pro-apoptischen Proteine Bax und Bak	69

10. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Diagnostische Grenzwerte der arteriellen Hypertonie in Abhängigkeit der Messmethode [118].....	13
Tabelle 2: Graduierung der arteriellen Hypertonie in Abhängigkeit des Praxisblutdrucks [118]	13
Tabelle 3: Therapiestrategien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie in Abhängigkeit des CV-Risikos und der Schwere der arteriellen Hypertonie [118]	14
Tabelle 4: Maßnahmen der Lebensstiländerung und dadurch hervorgerufene potenzielle Senkungen des Blutdrucks	15
Tabelle 5: Antihypertensiv wirksame Substanzen und deren Vor- bzw. Nachteile in der Dauertherapie [118].....	16
Tabelle 6: Ursprungsgewebe der häufigsten Hautkrebsentitäten.....	18
Tabelle 7: Zusammenstellung wichtiger Aspekte zur Inzidenz, klinischer Erscheinung und Therapie der wichtigsten Hautkrebsentitäten [35,74,90,92]	20
Tabelle 8: Faktoren, die die fotosensibilisierenden Reaktionen eines Individuums beeinflussen [37]	24
Tabelle 9: Unterscheidungsmerkmale zwischen Fototoxizität und Fotoallergie [29].....	26
Tabelle 10: Venöse Blutentnahmen und Laborwerte, die bestimmt wurden	35
Tabelle 11: Bestrahlungsdosen für Probanden des Hauttyps I und II während der Lichttreppe	38
Tabelle 12: Bestrahlungsdosen für Probanden des Hauttyps III und IV während der Lichttreppe	38
Tabelle 13: Bestrahlungsdosen für Probanden des Hauttyp I und II während der Ganzkörperbestrahlungen.....	39
Tabelle 14: Bestrahlungsdosen für Probanden des Hauttyp III und IV während der Ganzkörperbestrahlungen.....	39
Tabelle 15: Verwendete Geräte für die präklinischen Experimente	41
Tabelle 16: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die präklinischen Experimente.....	42
Tabelle 17: Verwendete Softwareprogramme.....	43
Tabelle 18: Zusammensetzung der Trenngele.....	49
Tabelle 19: Zusammensetzung der Sammelgele	49
Tabelle 20: Verwendete Primärantikörper	52
Tabelle 21: Verwendete Sekundärantikörper	52
Tabelle 22: Zusammensetzung des Mastermix zum DNase-Verdau	55

Tabelle 23: Zusammensetzung der Substrate zur cDNA-Synthese.....	56
Tabelle 24: Zusammensetzung des Mastermix zur quantitativen cDNA-Analyse	57
Tabelle 25: Verwendete Gene expression assay Sonden	57
Tabelle 26: Baselinecharakteristika der Studienteilnehmer	59

11. LEBENSLAUF

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

12. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe. Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung sind mir bekannt.

Homburg,

Felix Götzinger