

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der  
Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Einfluss oral eingenommener Carotinoide auf den  
antioxidativen Status der Haut, die Radikalschutzfunktion der  
Haut und auf das Lipidprofil der Haut“

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Annette Friedrich  
aus Dresden

Datum der Promotion: 30.05.2015

## **Abstract**

### **Zusammenfassung deutsch**

#### **Einfluss oral eingenommener Carotinoide auf den antioxidativen Status der Haut, die Radikalschutzfunktion der Haut und auf das Lipidprofil der Haut**

Annette Friedrich

In der Arbeit wurden die Bioverfügbarkeit und die antioxidative Wirkung von oral eingenommenen Carotinoiden auf die Haut untersucht. Hierfür kamen verschiedene spektroskopische Methoden zur Anwendung. Es wurde eine doppelt verblindete, placebokontrollierte Studie an 22 Probanden über 20 Wochen durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war es, eine *In-vivo*-Methode zur Untersuchung der antioxidativen Schutzwirkung natürlich vorkommender Antioxidantien vor Radikalbildung durch sichtbare und infrarotnahe (Vis/NIR) Bestrahlung zu entwickeln. Mit Hilfe nichtinvasiver Methoden sollten folgende Fragen geklärt werden:

Sind natürliche Carotinoide in der Dosierung bioverfügbar und ihre Konzentrationen in der Haut messbar?

Wirkt sich die Gabe von Carotinoiden auf das gesamte antioxidative Potential aus? Ist dies messbar mit der Elektronenspinresonanz- (ESR) Spektroskopie?

Können Antioxidantien vor Radikalbildung durch externen Stress, beispielsweise induziert durch sichtbare und infrarotnahe (Vis/NIR) Strahlung, schützen?

Hat die Carotinoidzufuhr einen Einfluss auf das Lipidprofil der Haut und die Hautbarriere?

In der Ramanspektroskopie war gut sichtbar, dass die Carotinoide gut in die Haut aufgenommen werden. Signifikante Anstiege der cutanen Carotinoidkonzentrationen zeigten sich selbst bei moderater Dosierung.

Die Anreicherung der Haut mit Carotinoiden erhöhte die radikalfangenden Eigenschaften der Haut. Da das Testradikal TEMPO sehr wohl mit Vitamin C, nicht jedoch direkt mit den cutanen Carotinoiden reagiert, zeigt dieses Ergebnis, dass Carotinoide ihre Wirkung im Zusammenspiel mit den anderen Bestandteilen des antioxidativen Netzwerks entfalten und dieses insgesamt stärken. Diese Untersuchungen bestätigen, dass Carotinoide als Markersubstanzen angesehen werden können.

In Bezug auf Schutz vor Radikalbildung bei externem Stress zeigte sich in der vorliegenden Arbeit erstmalig, dass Antioxidantien wie z.B. die im Grünkohlextrakt enthaltenen Antioxidantien in der Lage sind, Radikale abzufangen bzw. dazu führen können, dass die Radikalbildung unter Stresseinwirkung kleiner ist. Somit können Antioxidantien einer frühzeitigen Hautalterung und radikalinduzierten (Haut-)krankheiten vorbeugen. Der Nachweis erfolgte mittels ESR-Spektroskopie unter Bestrahlung im sichtbaren und nahinfraroten Bereich.

Es konnte eine Methode zur Messung der Hautlipide an gesunden Probanden etabliert werden. Allerdings war der Einfluss bei den untersuchten Probanden auf die Hautlipide eher gering. Es zeigte sich lediglich ein Anstieg des Ceramids (NS) in der Verumgruppe. Hier sind weitere Untersuchungen an Probanden mit z.B. Barrierestörungen durchzuführen.

## **Abstract**

### **Influence of orally taken carotenoids on the antioxidative status of the skin, the radical protection function of the skin and the skin lipids**

Annette Friedrich

In this work, the bioavailability and the antioxidant effect of orally administered carotenoids on the skin were examined. For this purpose different spectroscopic methods were used. A double-blind placebo-controlled study was conducted in 22 subjects over a time period of 20 weeks.

The aim of this work was to develop an *in vivo* method to enable studying the antioxidative and protective effects of naturally occurring antioxidants against radical formation by visible and near infrared (Vis / NIR) radiation. With the help of non-invasive methods the following questions were to be answered:

Are natural carotenoids in this dosage bioavailable after intake and their cutaneous concentrations measurable?

Does the intake of carotenoids have an effect on the whole antioxidative status? Can this be measured by the electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy?

Can antioxidants provide protection against radical formation induced by external stress, for example by visible and near infrared (Vis/NIR) radiation?

Does the intake of carotenoids have an influence on the lipid profile of the skin and the skin barrier?

Raman spectroscopy clearly demonstrated that the carotenoids are well absorbed into the skin. Significant increases of the cutaneous carotenoid concentrations were observed even at moderate dosage.

The cutaneous enrichment with carotenoids increased the radical scavenging properties of the skin. The test radical TEMPO reacts very well with vitamin C, but not directly with the cutaneous carotenoids. Consequently, the carotenoids exert their effect in combination with other ingredients of the antioxidant network, and strengthen it as a whole. This study confirmed that carotenoids may be regarded as marker substances.

The protection against free radical formation in external stress was shown for the first time in the present work. Antioxidants contained in the kale extract may intercept the radicals when exposed to stress and so reduce the formation of free radicals. In this manner premature skin aging and radical-induced (skin) diseases can be prevented. Detection was by means of EPR spectroscopy, under irradiation in the visible and near infrared range.

A method for measuring skin lipids in healthy subjects was established. However, in the population examined the influence on the skin lipids had been rather low. An increase was only observed for ceramide (NS) in the verum group. Further studies should be conducted for example in subjects with skin barrier diseases.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>2</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>2</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>4</b>
1.1 Motivation .....	4
1.2 Hintergrund.....	6
<b>2 Grundlagen</b> .....	<b>9</b>
2.1 Aufbau der Haut.....	9
2.2 Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie .....	16
2.3 Ramanspektroskopie .....	20
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
3.1 Materialliste .....	23
3.2 Studienpräparat .....	23
3.3 Studiendesign .....	24
3.4 Ein-und Ausschlusskriterien .....	27
3.5 Probanden .....	28
3.6 Fragebögen .....	29
3.7 Bestimmung der cutanen Carotinoidkonzentrationen.....	30
3.8 Bestimmung des antioxidativen Status der Haut.....	31
3.9 Bestimmung des oxidativen Stresses der Haut.....	34
3.10 Bestimmung des Lipidprofils der Haut .....	38
3.11 Statistik.....	41
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
4.1 Lebensstil und Ernährung der Probanden während der Studie .....	42
4.2 Bestimmung der cutanen Carotinoidkonzentrationen.....	43
4.3 Bestimmung des antioxidativen Status der Haut.....	48
4.4 Bestimmung der Radikalschutzfunktion der Haut.....	51
4.5 Bestimmung des Lipidprofils der Haut .....	53
<b>5 Diskussion</b> .....	<b>56</b>
5.1 Fehlerdiskussion .....	56
5.2 Cutane Carotinoide .....	57
5.3 Antioxidatives Schutzsystem der Haut und Carotinoide im Netzwerk .....	59
5.4 Schutz vor Radikalbildung im Vergleich mit anderen Studien.....	61
5.5 Analyse der Hautlipide .....	62
<b>6 Schlussfolgerung und Ausblick</b> .....	<b>63</b>
<b>7 Zusammenfassung</b> .....	<b>65</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>67</b>
<b>9 Anhang: Fragebögen</b> .....	<b>71</b>
<b>Curriculum vitae</b> .....	<b>82</b>
<b>Publikationsliste</b> .....	<b>83</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>84</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>86</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Haut [Universität Heidelberg, Dermatologie] .....	9
Abbildung 2: Ceramid, bestehend aus Sphingoidbase und Fettsäure .....	11
Abbildung 3: Strukturformel des Beta-Carotins [FU Berlin, Chemie] .....	14
Abbildung 4: Zeeman-Aufspaltung eines Elektrons im Magnetfeld .....	17
Abbildung 5: Strukturformel TEMPO [Sigma-Aldrich] .....	18
Abbildung 6: ESR-Absorptionspektrum (Ableitung) von TEMPO .....	19
Abbildung 7: Strukturformel von PCA [Sigma Aldrich] .....	20
Abbildung 8: Typisches Ramanspektrum der Carotinoide, aus [19] .....	22
Abbildung 9: Studiendesign .....	25
Abbildung 10: Altersverteilung .....	28
Abbildung 11: BMI-Verteilung .....	28
Abbildung 12: Geschlechtsverteilung Placebo .....	29
Abbildung 13: Geschlechtsverteilung Verum .....	29
Abbildung 14: Rauchgewohnheiten Placebo .....	29
Abbildung 15: Rauchgewohnheiten Verum .....	29
Abbildung 16: In vivo L-Band (1.3 GHz) ESR- Spektrometer mit Armschiene .....	31
Abbildung 17: Vorbereiten von 4 Messpunkten für zwei Doppelmessungen .....	32
Abbildung 18: Exponentieller Abfall des ESR-Testmarkers TEMPO .....	34
Abbildung 19: ESR-Messvorrichtung mit Vis/NIR Bestrahlung .....	35
Abbildung 20: ESR-Messung PCA unbestrahlt und bestrahlt mit Vis/NIR .....	37
Abbildung 21: Intensität des PCA-Signals, .....	38
Abbildung 22: Lipidextraktion .....	39
Abbildung 23: Densitogram .....	40
Abbildung 24: Absolute Carotinoidwerte der Placebogruppe .....	44
Abbildung 25: Absolute Carotinoidwerte der Verumgruppe .....	44
Abbildung 26: Relative Carotinoidkonzentrationen .....	45
Abbildung 27: Entwicklung der cutanen Carotinoidwerte in a.u. ....	46
Abbildung 28: Zeitliche Entwicklung der relativen Werte der cutanen Carotinoide .....	46
Abbildung 29: Absolute Carotinoidwerte in a.u. , Raucher versus Nichtraucher .....	47
Abbildung 30: Relative Carotinoidwerte, Raucher versus Nichtraucher .....	48
Abbildung 31: Normierte Mittelwerte der ESR-Intensität .....	49
Abbildung 32: Absolute Ratenkonstanten der Placebogruppe .....	50
Abbildung 33: Absolute Ratenkonstanten der Verumgruppe .....	50
Abbildung 34: Relative Ratenkonstanten bezogen auf ihre Ausgangswerte .....	51
Abbildung 35: Radikalbildung über die Zeit Verum und Placebo V1-V4 .....	53
Abbildung 36: Bestimmung der Ausgangs-Lipidfraktionen an (Visite 1) an unbehandelter Haut .....	54
Abbildung 39: Ergebnisse der Lipidextraktionen .....	55

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Fragestellungen .....	5
Tabelle 2: Material .....	23
Tabelle 3: Ein- und Ausschlusskriterien der Studie .....	27
Tabelle 4: Probandendaten .....	28
Tabelle 5: Ausgangswerte der cutanen Carotinoide und Verteilung der Probanden .....	43

## Abkürzungsverzeichnis

A	Alpha-Hydroxy-Fettsäure
a.u.	arbitrary units, willkürliche Einheiten
B	Magnetfeldstärke
CO	Cholesteroleat
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
$\Delta E$	Energiedifferenzen
ECM	Extrazelluläre Corneummatrix
ESR	Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie
f	Absorptionsfrequenz
G	g-Faktor, Landé-Faktor
GHz	Gigahertz
GT	Glyceroltrioleat
H	Plancksches Wirkungsquantum
H	6-Hydroxysphingosin
HPTLC	high-performance thin-layerchromatography, Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie
I	Signalintensität
k	Ratenkonstante
kcal	Kilokalorien
lat.	Lateinisch
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mT	Millitesla
M	BohrschesMagneton
$\mu\text{m}$	Mikrometer
N	Stickstoff
N	nicht hydroxylierte Fettsäure
NIR	nearinfrared, infrarotnah
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
O	Omega-Hydroxy-Fettsäure
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p	Signifikanzwert, Überschreitungswahrscheinlichkeit
P	Phytosphingosin
PC	Phosphatidylcholin
PCA	Carboxy-2,2,5,5-Tetramethyl-1-Pyrrolidinoxy
R	Molekülrest
R*	Radikal
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
S	Sphingosin
SM	Sphingomyelin
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust
UV	Ultraviolett
UVA	ultraviolett A
UVB	ultraviolett B
V	Visite
Vis / NIR	sichtbar und infrarotnah

# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation

Unsere Haut bildet die Grenzschicht nach außen und ist daher oxidativen Schädigungen per se ausgesetzt. Sonnenlicht, Umweltverschmutzung, Abgase wirken sich oxidativ auf unsere Haut aus. [1, 2] In der Stadt spielen Abgase und Schadstoffe eine nicht unerhebliche Rolle; Klimaanlage trocknen unsere Haut zusätzlich aus. Diese exogenen Umstände sind mitverantwortlich für die Entstehung einer Reihe von Hauterkrankungen wie beispielsweise Neurodermitis. Um uns vor oxidativen Einflüssen unserer Umgebung zu schützen, sind Antioxidantien, v.a. Carotinoide, in unserer Haut enthalten – ähnlich wie sich Antioxidantien in Gemüse und Früchten auch in deren Schale konzentrieren.

Unsere Haut als äußere Barriere speichert, vor allem im *Stratum corneum*, Antioxidantien, die durch Reduktion exogene Noxen abwehren können und sich dabei verbrauchen. Viele Antioxidantien müssen wir mit der Nahrung aufnehmen. Bei mangelhafter Ernährung und in Situationen mit vermehrtem Verbrauch kann es eine sinnvolle Alternative sein, Antioxidantien in physiologischer Höhe zu supplementieren. [3] Bisherige Untersuchungen haben ergeben, dass mit der Nahrung aufgenommene Carotinoide tatsächlich bis in die Haut gelangen und dort mit der Ramanresonanz-Spektroskopie auch nachgewiesen werden können. [4]

In der vorliegenden Studie wurde eine *in-vivo*-Methode zur Untersuchung des antioxidativen Potentials und der antioxidativen Schutzwirkung von natürlich vorkommenden Antioxidantien vor Radikalbildung durch sichtbare und infrarotnahe (Vis/NIR) Bestrahlung entwickelt. Mit Hilfe nichtinvasiver Methoden sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Führt die Anreicherung der Haut mit natürlich vorkommenden Antioxidantien zu einer Erhöhung des antioxidativen Potentials in der menschlichen Haut?
- Wirkt sich die Gabe von Carotinoiden auf das gesamte antioxidative Potential aus? Ist dies messbar mit der Elektronenspinresonanz-(ESR) Spektroskopie? Spiegelt sich die Carotinoideinnahme in einer erhöhten Ratenkonstante wider?
- Können Antioxidantien vor oxidativem Stress, vor vermehrter Radikalbildung, wie sie beispielsweise induziert werden kann durch sichtbare und infrarotnahe (Vis/NIR) Strahlung, schützen?
- Haben Antioxidantien einen positiven Einfluss auf das Lipidprofil der Haut und die Hautbarriere?

Um diese Fragen zu klären, wurden unterschiedliche spektroskopische oder analytische Methoden eingesetzt. In Tabelle 1 sind die Fragestellungen und die dafür eingesetzten Methoden zusammengefasst.

Tabelle 1: Fragestellungen

Fragestellung	Gerät /Methode
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sind Carotinoide bioverfügbar?</li> <li>• Sind die Konzentrationen von Carotinoiden in der Haut messbar?</li> </ul>	Raman-Resonanz-Spektroskopie
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Treten Carotinoide mit den übrigen Antioxidantien in Wechselwirkung?</li> </ul>	Elektronenspinresonanz (ESR) –spektroskopie+Testradikal
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bieten natürlich vorkommende Carotinoide einen Schutz vor Radikalbildung durch externen Stress?</li> </ul>	Elektronenspinresonanz (ESR) –spektroskopie+ Testradikal mit Bestrahlung
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beeinflusst die Zufuhr natürlich vorkommender Carotinoide das Lipidprofil der Haut und die Hautbarriere?</li> </ul>	Lipidextraktion

Um diese Fragen beantworten zu können, wurde eine doppelblinde, placebo-kontrollierte Studie mit 24 gesunden Probanden durchgeführt. Ergänzend zu ihrer üblichen Ernährung erhielten die Probanden ein natürliches carotinoidreiches Grünkohlextrakt oder ein Placebo. Vor und nach der Einnahme wurden *in-vivo*-

Untersuchungen zur Bestimmung der antioxidativen Schutzfunktion der Haut und dem Einwirken von äußerem oxidativen Stress durchgeführt. Abschließend wurden die Hautlipide untersucht.

Die Durchführung solcher Untersuchung *in vivo* war von hohem Interesse, einerseits zur Testung von natürlich vorkommenden Antioxidantien zur antioxidativen Schutzwirkung gegen die Einwirkung von exogenen Stressoren, desweiteren zur Untersuchung der Radikalbildung durch Vis/NIR-Bestrahlung.

Zusätzlich wurden die Ernährungsgewohnheiten der Probanden mit Hilfe eines Fragebogens erhoben, da die Konzentration der Antioxidantien in der Haut durch Ernährung und Lebensstil beeinflusst wird. [4]

## **1.2 Hintergrund**

Derzeit existieren mit der Elektronenspinresonanzspektroskopie und der resonanten Ramanspektroskopie zwei nichtinvasive Methoden, mit denen es möglich ist, *in vivo* die antioxidative Kapazität der Haut zu bestimmen. [5, 6]

Die durch die Ernährung aufgenommenen, schließlich und letztendlich in die Haut gelangten und dort gespeicherten Carotinoide haben sich als ein sehr guter Marker für das antioxidative Netzwerk der Haut erwiesen. [6] Die in der Haut gespeicherten Carotinoide können mit der resonanten Ramanspektroskopie bestimmt werden. Dass die Carotinoide tatsächlich durch die Nahrung aufgenommen und in der Haut gespeichert werden, wurde mit Hilfe dieser Methode, aber auch anderen bereits nachgewiesen z.B. durch Stahl et al. [7, 8]

Allerdings erscheinen die mit der Nahrung aufgenommenen Carotinoide nicht unmittelbar nach Aufnahme in der äußersten Hautschicht, dem *Stratum corneum*, sondern erst mit einer gewissen Verzögerung. Außerdem stellten Meinke et al. fest, dass die Konzentrationserhöhung der Carotinoide in der Haut, im Gegensatz

zum Blut, nach der Beendigung der Supplementation mit Carotinoiden zunächst nur langsam abfällt. [4]

Zusätzlich zur Bestimmung der Carotinoide mit der resonanten Ramanspektroskopie gibt es eine weitere Methode zur *in vivo*- Bestimmung des antioxidativen Netzwerks, die Elektronenspinresonanz- (ESR) spektroskopie. Diese Methode ermöglicht indirekt eine Aussage durch Zuhilfenahme des Testradikals TEMPO (2,2,6,6- Tetramethylpiperidin-1). Das amphiphile und semistabile Testradikal TEMPO dient dabei als Oxidationsmittel. TEMPO wird topisch auf das zu untersuchende Hautareal aufgetragen und dann mittels ESR-Spektroskopie visualisiert [6]. TEMPO reagiert mit verschiedenen reduzierenden Stoffen in der Haut wie z.B. Vitamin C und wird dabei selbst zu seinem entsprechenden Hydroxylamin reduziert. Es reagiert jedoch nicht direkt mit Carotinoiden wie Beta-Carotin oder Lycopin. [9]

Es wurde bereits mit der *in vivo*-ESR-Spektroskopie gezeigt , dass die Verabreichung eines wasserlöslichen Apfelbeerenextraktes (*Aronia melanocarpa*) und von Vitamin C den antioxidativen Status der Haut tatsächlich verbessern kann. [10]

Als ein weiterer Aspekt wurde der Einfluss von Bestrahlung durch einen Sonnensimulator untersucht. Für die endogene Vitamin D-Bildung ist ein geringes Maß an UVB-Strahlung des Sonnenlichts essentiell. Allerdings genügen hierfür wenige Sonnenminuten pro Tag. Wird ein kritisches Maß überschritten, wirkt Sonnenstrahlung schädlich. Die schädigende Wirkung der Sonnenstrahlung beruht auf der Bildung von freien Radikalen im menschlichen Gewebe. [11, 12]

Die Prävention vor vorzeitiger Hautalterung und v.a. vor Hautkrebs ist wichtig. Die Folgen übermäßiger Sonneneinwirkung auf die Haut können sich in vorzeitiger Hautalterung, Entzündungen der Haut sowie einem erhöhten Hautkrebsrisiko zeigen. [2, 11, 13] „Die kumulativ einwirkende solare ultraviolette Strahlung ist für die weltweite Zunahme der nichtmelanozytären Hautkarzinome verantwortlich.“ schreibt Fartasch et al. über den Zusammenhang zwischen beruflich bedingter Sonnenexposition und hellem Hautkrebs. [14] Kürzlich wurde gezeigt, dass für die Radikalproduktion während des Einwirkens von Sonnenlicht nicht ausschließ-

lich UVA- und UVB-Strahlung verantwortlich sind. Energieärmere infrarotnahe Strahlung und Infrarotstrahlung sind ebenfalls verantwortlich für die Produktion hochreaktiver Radikale. Betrachtet man das gesamte Spektrum des Sonnenlichts, sind es sogar 50% der Radikale, die von anderen als UVA und UVB produziert werden. [15] Daher wurde in den hier durchgeführten Untersuchungen die Vis/NIR-Bestrahlung zur Bildung von ROS in der Haut eingesetzt.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Aufbau der Haut

Unsere Haut erfüllt vor allem eine Schutz- und Barrierefunktion. Einerseits schützt sie vor äußeren Irritationen und andererseits vor transepidermalemem Wasserverlust nach außen. [16, 17]

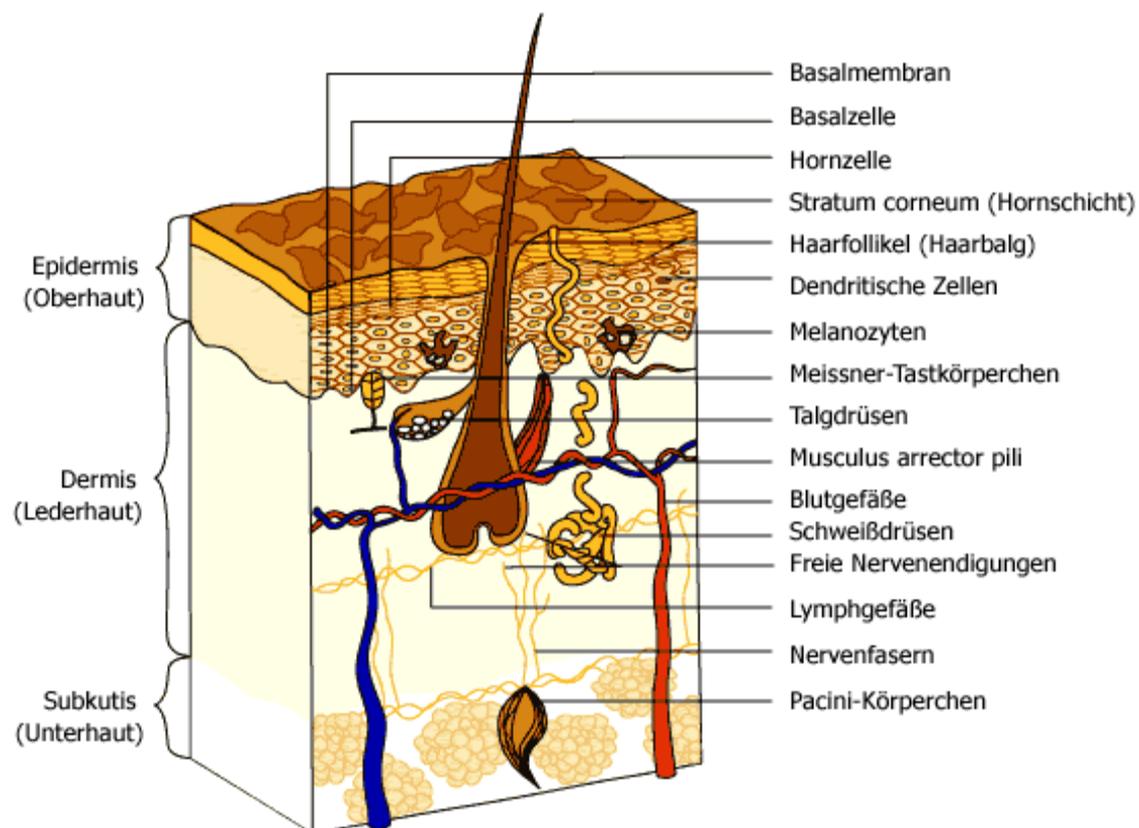


Abbildung 1: Aufbau der Haut [Universität Heidelberg, Dermatologie]<sup>1</sup>

Die Haut besteht, wie in Abbildung 1 zu sehen ist, aus drei Schichten. Von außen nach innen sind dies Epidermis, der darunterliegenden Cutis und der Subcutis. Die Epidermis ist nicht durchblutet und besteht aus mehrschichtigem verhorntem Plattenepithel. Sie enthält das *Stratum basale*, das *Stratum spinosum*, das

<sup>1</sup> Aufbau der Haut, Universitätsklinikum Heidelberg, Abteilung Dermatologie

([http://skincare.dermis.net/content/e01aufbau/e660/e661/index\\_ger.html](http://skincare.dermis.net/content/e01aufbau/e660/e661/index_ger.html), Zugang am 12.01.2013)

*Stratum granulosum*, das *Stratum lucidum* an Handinnenflächen und Fußsohlen, sowie abschließend das *Stratum corneum*. Die unter der Epidermis befindliche Cutis setzt sich zusammen aus *Stratum reticulare* und *Stratum papillare* und enthält hauptsächlich Blutkapillaren, elastische Fasern, Kollagenfasern, Haarfollikel und Schweißdrüsen. Die Subcutis enthält hauptsächlich lockeres Bindegewebe und univakuoläres Fettgewebe, Nerven und Blutgefäße. [18]

Das *Stratum corneum* hat eine Dicke von nur 10-15 µm, besteht aus verhornten Plattenepithelzellen und regeneriert sich etwa alle vier Wochen. Stratum (lat.) bedeutet Decke und corneum (lat.) Horn. Die Korneozyten als Hauptzellen dieser Schicht sind aus Keratinozyten hervorgegangen, haben ihren Zellkern verloren und sind an die Oberfläche der Haut gewandert. Sie sind „ziegelmauerartig“ überlappend angeordnet und von interzellulären *Stratum-corneum*-Lipiden umgeben. [19]

Außerdem ist bekannt, dass die Haut im Laufe der Zeit zunehmend rauer wird. Auf einen Zusammenhang zwischen der Rauigkeit der Haut und der Konzentration des Carotinoids Lycopin in der Haut stießen Darvin et al. Sie fanden heraus, dass die Haut weniger rau war, je höher die Lycopinwerte in der Haut lagen. [20]

Daher kann durchaus erwartet werden, dass die Höhe der Gesamtcarotinoide in der Haut einen Einfluss auf das Lipidprofil der Haut hat.

### **2.1.1 Hautlipide**

Im *Stratum corneum* befinden sich Korneozyten, die von Lipiden umgeben sind. Die Lipide füllen dabei den Interzellularraum fast vollständig aus. Sie umschließen die Korneozyten ähnlich wie der Mörtel die Ziegelsteine einer Mauer. [21] Durch dieses spezielle Muster und die besondere Struktur der Lipide stellt das *Stratum corneum* eine einzigartige wasserabweisende Schutzschicht dar.

[22] Das *Stratum corneum* erfüllt somit die Hauptfunktion der Haut als Schutz nach innen und Barriere nach außen. [19]

Die *Stratum-corneum*-Lipide bestehen hauptsächlich aus Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren. Cera (lat.) bedeutet Bienenwachs. Den Ceramiden kommt dabei eine Schlüsselfunktion zu. Ceramide sind Sphingolipide und bestehen aus einer Sphingoidbase und einer Fettsäure, mit der sie durch eine Amidbindung verbunden sind (Abbildung 2).

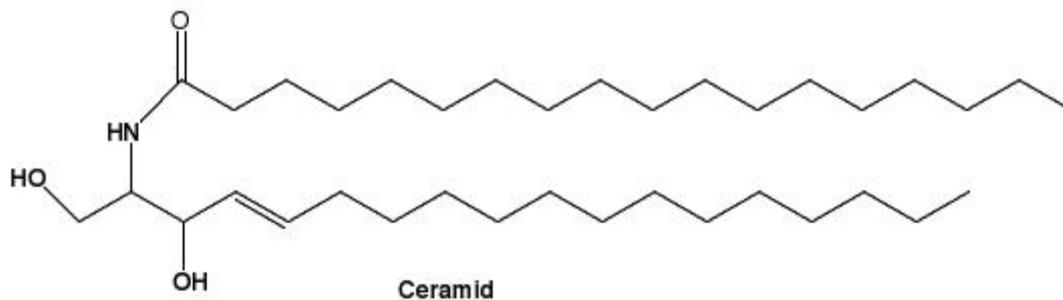


Abbildung 2: Ceramid, bestehend aus Sphingoidbase und Fettsäure  
[Universität Zürich, Abteilung Biochemie]<sup>2</sup>

Ceramide sind bipolar. Gemeinsam mit Cholesterol und freien Fettsäuren bilden sie bilamelläre Membranen. Je nach Zustand sind Ceramide sehr unterschiedlich ausgerichtet. Sie können voll ausgestreckt, haarnadelartig oder wie ein „V“ ausgerichtet sein. [19, 23]

Veränderungen dieser speziellen Lipidzusammensetzung können die Barriere durchlässig machen. Dies kann zu einem transepidermale Wasserverlust führen, die Haut trocknet aus, [16] was zu diversen Hauterkrankungen wie z. B. Xerose [24] führen kann. So wurden bei Patienten mit Neurodermitis erniedrigte Werte der *Stratum-corneum*-Ceramide 1 und 3 und ihrer Ceramid-Vorstufe *Sphinganin* gefunden. [17, 25] Auch wurde berichtet, dass sich *Stratum-corneum*-

---

<sup>2</sup>Ceramid, Universität Zürich, Abteilung Biochemie

(<http://www.bioc.uzh.ch/blexon/detail/c.ceramid.jpg>, Zugang am 10.10.2013)

Lipide im Verlauf des Lebensalters verändern: junge Haut enthält deutlich höhere Lipidkonzentrationen als ältere Haut. [26].

### **2.1.2 Antioxidatives Schutzsystem der Haut**

Unser aerober Organismus verfügt über ein ausgeklügeltes Balancesystem, welches im Normalfall annähernd ein oxidatives Gleichgewicht zwischen freien Radikalen auf der einen und Antioxidantien auf der anderen Seite sichert, wobei geringe Schäden durch freie Radikale durchaus geschehen können. Es ist effizienter, diese zu reparieren, als ständig das antioxidative System zu aktivieren. [27] Insgesamt jedoch sollte das Verhältnis prooxidativer und antioxidativer Substanzen annähernd ausgeglichen sein.

Die meisten Antioxidantien können vom menschlichen Organismus nicht oder nicht in ausreichender Menge synthetisiert werden. Zur Aufrechterhaltung des oxidativen Gleichgewichts ist es daher essentiell, dass Antioxidantien in ausreichender Menge mit der Nahrung aufgenommen werden.

Zu den Antioxidantien gehören neben Vitaminen (Vitamin A, Vitamin C, Vitamin E) Carotinoide, Polyphenole und endogene antioxidative Enzymsysteme. Carotinoide sind lipophile Pigmente, die den Pflanzen ihre gelbliche oder rötliche Farbe geben. Zu den Carotinoiden zählen hauptsächlich das Beta-Carotin als Vorstufe von Vitamin A sowie Lutein, Alpha-Carotin, Lycopin, Zeaxanthin und Cryptoxanthin. An Polyphenolen ist vor allem das Resveratrol mit seiner gefäß- und kardioprotektiven Wirkung zu nennen. Aber auch Flavonoide, Anthocyane und Proanthocyanidine sind wichtige Vertreter.

An endogenen antioxidativ wirkenden Enzymsystemen sind hauptsächlich die Glutathionperoxidase, die Katalase und die Superoxiddismutase beteiligt. Außerdem gibt es noch Spurenelemente wie Magnesium, Selen und Zink, die allein dadurch antioxidativ wirken, dass sie andere Antioxidantien in ihrer Wirkung unterstützen.

Die Hauptfunktion der Antioxidantien ist das Abfangen überschüssiger freier Radikale, die bei Stoffwechselprozessen, bei Entzündungen oder exogen durch UV-Bestrahlung in vermehrter Konzentration anfallen. Antioxidantien schützen hierdurch Zellkompartimente und DNA vor oxidativen Schäden.

### **2.1.3 Cutane Carotinoide**

Die cutanen Carotinoide befinden sich u.a. in der nichtdurchbluteten Epidermis. Die Konzentration cutaner Carotinoide kann als ein Marker für das antioxidative Schutzsystem des menschlichen Körpers angesehen werden. [6] Das häufigste cutane Carotinoid ist das Beta-Carotin. Weitere Vertreter sind das Lutein, das Zeaxanthin, das Lycopin, das Cryptoxanthin. Enthalten sind Carotinoide hauptsächlich in Gemüse und Obst. Beta-Carotin wird außerdem Lebensmitteln und Getränken wie z.B. Fanta® als Lebensmittelfarbstoff zugesetzt.

Carotinoide gelangen über die Nahrung in die Haut. Wie fast alle peroral eingenommenen Stoffe werden sie zunächst von den Darmzellen resorbiert, gelangen so ins Blut und schließlich in die Vena portae hepatis. Der First-Pass-Effekt ist bei Carotinoiden gering, so dass ihre Bioverfügbarkeit sehr gut ist. Sie zirkulieren im Blut, gelangen dann über den Weg der Schweißdrüsen und das Sebum aus der Cutis auf die Hautoberfläche, um dann anschließend wieder den rückläufigen Weg zu nehmen und in die oberste Schicht der Epidermis, das *Stratum corneum* zu diffundieren. [28, 29]

Aus vorhergehenden Studien ist bereits bekannt, dass die Aufnahme von Carotinoiden in einer moderaten Konzentration im Rahmen einer an Gemüse und Obst reichen Ernährung verschiedene positive Einflüsse auf die Gesundheit haben kann. Als positive Effekte seien genannt ein erhöhter Schutz vor der schädigenden Wirkung von UV-Strahlung, eine Verbesserung der Mikrozirkulation sowie ein Schutz vor vorzeitiger Hautalterung. [27, 30-32]

Die von Pflanzen synthetisierten Carotinoide haben schon für die jeweilige Gemüsepflanze antioxidative Funktionen zu erfüllen. Alpha- und Beta-Carotin als Farbstoffe der Karotte sorgen für Schutz vor Infektionen und vor der schädlichen Wirkung der UV-Strahlen der Sonne. Beta-Carotin, dargestellt in Abbildung 3, als wichtigste Vorstufe von Vitamin A, wird nach Aufnahme in den menschlichen Organismus v.a. in der Haut gespeichert. Es wird, wie andere Carotinoide auch, nur bei Bedarf in Vitamin A umgewandelt. Daher wird Beta-Carotin auch als Retinoläquivalent bezeichnet, wobei beim Menschen sechs Einheiten Beta-Carotin einer Einheit Vitamin A entsprechen.

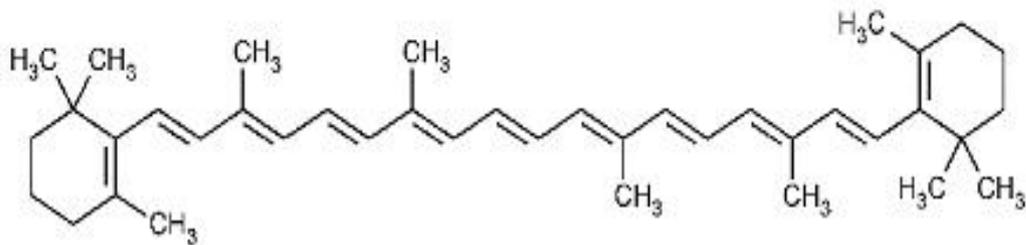
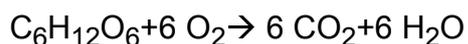


Abbildung 3: Strukturformel des Beta-Carotins [FU Berlin, Chemie]<sup>3</sup>

#### 2.1.4 Freie Radikale

In physiologischer Konzentration entstehen freie Radikale im Zuge von Stoffwechselfvorgängen unseres Körpers, wie z.B. bei der oxidativen Phosphorylierung während der Atmungskette in den Mitochondrien unserer Zellen. Die Atmungskette als Umkehrreaktion der Photosynthese der Pflanzen dient selbst wiederum der Energiegewinnung aus Kohlenhydraten, Eiweiß und Fetten, aber auch der Synthese der vom Organismus benötigten Stoffe. Ausgehend von 180 g Glucose lässt sich die Zellatmung folgendermaßen zusammenfassen:



Dabei entstehen 674 kcal, die gespeichert werden in Form von Adenosin-triphosphat.

<sup>3</sup> Strukturformel des Beta-Carotins, Freie Universität Berlin, Abteilung Chemie

(<http://www.chemie.fu-berlin.de/chemistry/oc/terpene/carotin.html>, Zugang am 22.05.2013)

Auch für viele weitere Stoffwechselfvorgänge des Körpers ist das Vorhandensein freier Radikale essentiell.

Chemisch gesehen sind freie Radikale, oft in Form von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auftretend, ungesättigte Moleküle d.h. sie besitzen nicht, wie in der Natur üblich, ein Elektronenpaar, sondern nur ein ungepaartes Elektron. Daher sind sie reaktionsfreudig und haben das Bestreben, ihr fehlendes Elektron schnellstens zu ersetzen. So greifen sie in ihrem Streben nach Sättigung andere nichtradikalische Moleküle verschiedenster Körperzellen an, um ihr fehlendes Elektron wieder zu erlangen. Diesen Molekülen fehlt dann ebenfalls ein Elektron und sie werden selbst zu freien Radikalen. Eine Reaktionskaskade kann entstehen, an deren Ende Veränderungen an Zellen von Bindegewebe, Muskeln, Blutgefäßen stehen können.

Die Konzentration der freien Radikale kann über das physiologische Maß hinaus ansteigen, durch Kombination ungünstiger Faktoren wie z. B. niederschwellige chronische Entzündungen, chronischen Alkohol- oder Nikotinabusus, kumulative Überexposition gegenüber ultravioletter Strahlung, länger andauerndes Schlafdefizit, chronischen Stress im Berufs- oder Privatleben oder dauerhafte exzessive sportliche Betätigung. In diesen Situationen können höhere Konzentrationen freier Radikale entstehen, die zu oxidativer Zellschädigung führen können, unterschiedliche Zellstrukturen angreifen und damit die Entstehung oder den Ausbruch von Krankheiten begünstigen können. [33] So können freie Radikale mitverantwortlich sein bei der Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen wie Hauttumoren, [34, 35] Diabetes, [36] Arteriosklerose [1] oder neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer oder Morbus Parkinson. [37-39]

Das Neutralisieren von freien Radikalen geschieht durch das antioxidative Schutzsystem. Antioxidantien können den freien Radikalen ihr fehlendes Radikal zurückgeben und diese somit wieder in einen energetisch bevorzugten Zustand überführen. Dieser Mechanismus schützt die Zellen vor Oxidationsprozessen von interzellulären Proteinen, vor Zellkernschädigung wie DNS-Oxidation oder Zellmembranschädigung, welche mit Lipidperoxidation einhergeht. [12, 40].

Entscheidend ist das oxidative Gleichgewicht zwischen Antioxidantien und freien Radikalen im gesunden menschlichen Organismus.

## **2.2 Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie**

Der antioxidative Status der Haut kann mit zweierlei Möglichkeiten bestimmt werden. Eine Möglichkeit, *in vivo* den antioxidativen Status der Haut zu bestimmen, bietet die nichtinvasive Elektronen-Spin-Resonanzspektroskopie (ESR). Die ESR-Spektroskopie nutzt die paramagnetischen Eigenschaften ungepaarter Elektronen.

Das ESR-Gerät ist aufgebaut aus einer Mikrowelleneinheit mit konstanter Mikrowellenfrequenz (z.B. 1,3 GHz) und einem variablen äußeren Magnetfeld. Paramagnetische Substanzen, wie z.B. ungepaarte freie Elektronen einer Markersubstanz, absorbieren die Strahlung einer Mikrowelleneinheit in einem variablen Magnetfeld.

Im L-Band arbeitet das ESR-Gerät mit einer relativ niedrigen Mikrowellenfrequenz von 1,3 GHz (1-1,5 GHz). Insgesamt kann die Frequenz der Mikrowellenstrahlung variieren von ca. 1 GHz (L-Band) über 10 GHz (X-Band) bis über 100 GHz (W-Band), wobei sich niedrigere Frequenzen für *in-vivo*-Untersuchungen eignen und höhere für *in-vitro*-Untersuchungen exzidierte Haut. Bei höherer Mikrowellenfrequenz würde der Anteil der an der Signalentstehung beteiligten Elektronen zwar die Empfindlichkeit der Messung verstärken, gleichzeitig wäre aber die durch das Wasser im menschlichen Gewebe bedingte Absorption größer. Außerdem würde mit zunehmender Magnetfeldstärke der technische Aufwand bedeutend größer.

Für die hier durchgeführten Messungen ist der Einsatz eines Labels, auch als Markersubstanz, Testradikal oder Spinsonde bezeichnet, notwendig. Das ESR-Gerät misst die Signalintensität dieses *Testradikals*. Das hier zum Einsatz kommende *Testradikal TEMPO* bzw. *PCA* weist ein ungepaartes freies Elektron

auf und besitzt somit ein paramagnetisches Moment. Wird ein ungepaartes Elektron in ein von außen angelegtes Magnetfeld gebracht, so spalten sich die Energien des Elektrons in zwei Energiezustände  $E^-$  (Grundzustand des Elektrons) und  $E^+$  (aktivierter Zustand des Elektrons) auf. In dem Moment, in dem das Magnetfeld zugeschaltet wird, werden die zuvor entarteten Bindungszustände des Elektrons in zwei verschiedene Energieniveaus aufgespalten. Diese Aufspaltung wird in der Atomphysik als *Zeeman-Effekt* bezeichnet und geschieht proportional zum äußeren Magnetfeld. Je größer das von außen angelegte Magnetfeld ist, desto stärker werden die Elektronen aufgespalten. Dies ist in Abbildung 4 zu erkennen.

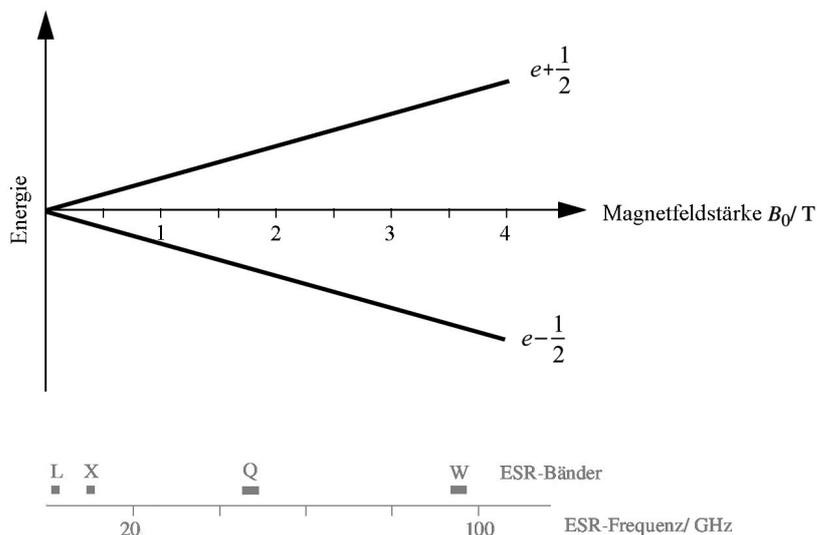


Abbildung 4: Zeeman-Aufspaltung eines Elektrons im Magnetfeld  
Frequenzbereiche der einzelnen ESR-Bänder

In der Kernspintomographie wird dieses Prinzip ebenfalls genutzt. Allerdings werden hier nicht die Energiezustände von Elektronen, sondern von Wasserstoffatomkernen, also Protonen, aufgespalten.

Wird nun mit Mikrowellenstrahlung konstanter Frequenz bestrahlt, deren Energie genau der Differenz des entstandenen Energieniveaus ( $\Delta E$ ) entspricht, liegen Resonanzbedingungen vor und die Mikrowellenenergie wird durch das jeweilige

Testradikal absorbiert. Dieser Vorgang wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\Delta E = h \cdot f = g \cdot \mu_B \cdot B$$

wobei:

$h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$	Plancksche Konstante
$f$	Frequenz der Strahlung (hier Mikrowelle) in Hz
$g \cong 2$	Landé Faktor
$\mu_B \cong 9,247 \cdot 10^{-24} \text{ J}\cdot\text{T}^{-1}$	Bohrsches Magnetron
$B$	Magnetische Induktion des angelegten Magnetfelds in Tesla

Diese Absorption wird durch eine Photodiode detektiert. Das daraus entstandene Absorptionsspektrum der ersten Ableitung wird anschließend ausgewertet.

### 2.2.1 Einsatz von Testradikalen (Spinmarkern)

Bei der *in vivo* ESR-Spektroskopie mittels L-Band Spektrometer können keine kurzlebigen gebildeten Radikale nachgewiesen werden. Es lassen sich aber indirekt über das Abreagieren von Testradikalen Aussagen über das antioxidative Potenzial oder über die Bildung von kurzlebigen Radikalen treffen.

In vivo können nur wenige Testradikale verwendet werden. Ein solches Testradikal ist das in Abbildung 5 dargestellte semistabile Stickoxid 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1 auch TEMPO genannt.

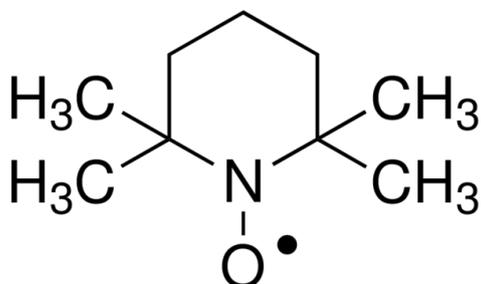
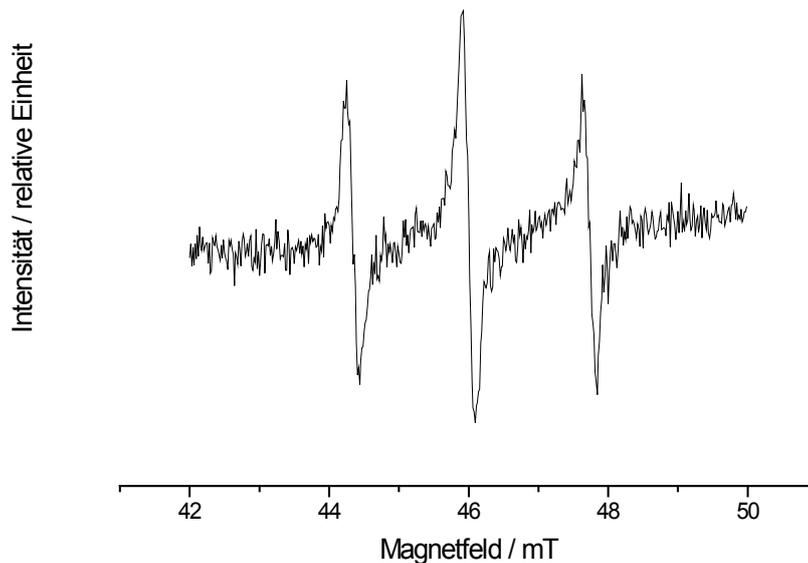


Abbildung 5: Strukturformel TEMPO [Sigma-Aldrich]

Ein typisches ESR-Spektrum des Nitroxides ist in Abbildung 6 dargestellt.



*Abbildung 6: ESR-Absorptionspektrum (Ableitung) von TEMPO  
nach Penetration in die menschliche Haut eines Probanden*

Testradikale wie TEMPO fungieren als Hilfsstoffe für die ESR-Spektroskopie.

TEMPO ist selbst ein recht stabiles freies Radikal, wird zunächst auf die Haut aufgebracht und dringt aufgrund seiner Lipophilie relativ gut in die Haut ein. Die Bestimmung des antioxidativen Potentials der Haut erfolgt in der ESR-Spektroskopie quasi indirekt über den Abfall der Konzentration des zuvor auf die Haut aufgetragenen Testradikals.

Die Antioxidantien in der Haut neutralisieren das Testradikal TEMPO, indem sie dem Testradikal das ihm fehlende Elektron zurückgeben. Hierbei werden die Antioxidantien selbst oxidiert und müssen dann durch andere Antioxidantien regeneriert werden.

Obwohl das Testradikal TEMPO nicht direkt mit den Carotinoiden des verabreichten Grünkohlextraktes reagiert, wurde untersucht, ob die verabreichten Carotinoide quasi durch Interagieren mit dem gesamten antioxidativen Netzwerk

der Haut in der Lage sind, die radikalfangenden Eigenschaften der Haut bzw. ihre sogenannte antioxidative Kapazität zu erhöhen.

Zur Bestimmung der bei Bestrahlung entstehenden Radikale wird als Testradikal das im Vergleich zu TEMPO etwas stabilere Stickoxidradikal 3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy (PCA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) genutzt, dargestellt in Abbildung 7.

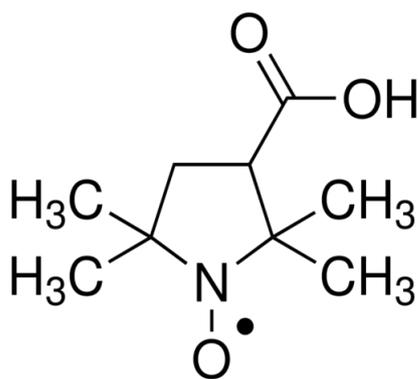


Abbildung 7: Strukturformel von PCA [Sigma Aldrich]

Das hydrophilere PCA hat sich im Vergleich zu TEMPO als geeignet erwiesen, da es nicht direkt oder nur sehr langsam mit den Antioxidantien in der Haut reagiert. [41] Allerdings reagiert PCA sehr gut mit kurzlebigen Radikalen, beispielsweise durch Bestrahlung induziert. [42]

### 2.3 Ramanspektroskopie

Die resonante Ramanspektroskopie ermöglicht es, die Aufnahme der Carotinoide in die Haut, also ihre Bioverfügbarkeit zu untersuchen. Sie wurde nach ihrem Erfinder, dem indischen Physiker Chandrasekhara Venkata Raman benannt, der für seine Erfindung 1930 den Nobelpreis erhielt. Der Raman-Effekt beschreibt die Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und der Elektronen-

hülle der bestrahlten Moleküle. Das Prinzip der Methode besteht darin, dass sich der zurückgeworfene Strahl monochromatischen Lichtes, meist eines Laserstrahls, je nach bestrahltem Stoff verändert: Werden Moleküle mit monochromatischem Licht bestrahlt, so wird ein Teil des einfallenden Lichtes gestreut.

Der Großteil allerdings wird elastisch gestreut d.h. einfallender Strahl und Streulicht haben die gleiche Frequenz und Energie. Jedoch ein sehr kleiner Teil wird von der Probe inelastisch gestreut – das ist die Ramanstrahlung. Durch diese inelastische Streuung wird Schwingungsanregung induziert. Die Ramanstrahlung stellt nur einen sehr kleinen Teil des gesamten Streulichts dar. Die Anregung erfolgt bei der klassischen Ramanspektroskopie in einen virtuellen Zustand. Dieser Anteil des emittierten Streulichts ist spezifisch verändert und erlaubt Rückschlüsse auf das Vorhandensein und die Konzentration der bestrahlten Stoffe.

Dieser Anteil weist eine geringere oder höhere Frequenz als die des einfallenden Lichtes auf. Wurde Energie von der bestrahlten Materie absorbiert, sind Energie und Frequenz des emittierenden Photons geringer als die des anregenden Photons, sprechen wir von Stokes-Raman-Streuung. Fand jedoch umgekehrt eine Energieübertragung von der bestrahlten Materie auf das Licht statt, wie es beispielsweise bei fluoreszierenden Stoffen der Fall ist, sprechen wir von Anti-Stokes-Raman-Strahlung.

Bei der Methode der resonanten Ramanspektroskopie erfolgt die Anregung in einem Absorptionsniveau und erzielt im Gegensatz zur klassischen Spektroskopie stärkere Signale und ist somit effektiver. Dies kann zur Bestimmung der Carotinoide bei zwei Wellenlängen eingesetzt werden. [43] Hierzu regt man bei 488 nm nahezu alle Carotinoide an und bei 514 nm überwiegend Lycopin, da Lycopin verschobene Absorptionsbanden besitzt.

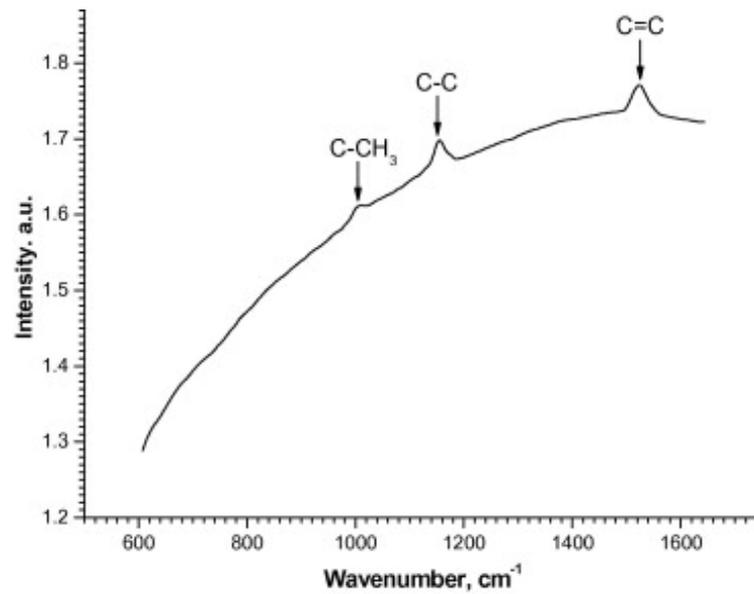


Abbildung 8: Typisches Ramanspektrum der Carotinoide, aus [19]

Die Abbildung 8 zeigt das typische Spektrum des Carotinoids Lycopin, gemessen bei 514 nm. [43] Das typische Spektrum enthält drei Raman-Peaks. Diese entstehen durch Kippbewegungen von Methylgruppen der Carotinoid-Moleküle während der Messung. [43]

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialliste

Folgende Chemikalien und Materialien kamen während der Studie zur Anwendung:

Tabelle 2: Material

Material	Herkunft
TEMPO 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1	Sigma-Aldrich, Steinheim
PCA Carboxy-2,2,5,5-Tetramethyl-1-Pyrrolidinoxy	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Epikutanpflaster (Okklusivplaster)	Finn Chamber Eptest Ltd Oy
Filterpapierscheiben	Eptest Ltd Oy, Tuusula, Finland
Cyclohexan	Carl Roth, Karlsruhe

#### 3.2 Studienpräparat

Als Studienpräparat wurde ein an natürlichen Antioxidantien reiches Präparat gewählt. Dieses wurde den Teilnehmern der Verumgruppe über einen Zeitraum von acht Wochen in oraler Form verabreicht. Das Präparat Lutex TM (Bioactive Food GmbH, Bad Segeberg, Germany) besteht aus Grünkohlextrakt (*Brassicaoleracea* convar. *acephala* var. *sabellica* L.), Sanddornextrakt (*Hippophaerhamnoides* L.) sowie Olivenöl und enthält daher eine große Menge an natürlichen Carotinoiden, so dass mit diesem Präparat eine natürliche vitamin- und carotinoidreiche Ernährung abgebildet werden kann.

Die verabreichte Tagesmenge bei dieser Studie bestand aus folgender moderater Dosierung: 2200 µg Lutein, 1000 µg Beta-Carotin, 50 µg Alphacarotin, 400 µg Lycopin, 700 µg Zeaxanthin und 100 µg Cryptoxanthin. Insgesamt waren es 4450 µg Carotinoide. Außerdem enthielt das Studienpräparat Sanddornöl und als Füllstoff Olivenöl.

Die Teilnehmer der Placebogruppe erhielten ein wirkstofffreies Präparat mit Olivenöl, ebenfalls über einen Zeitraum von acht Wochen.

### **3.3 Studiendesign**

Ziel war die *In-vivo*-Bestimmung des antioxidativen Status der Haut mit verschiedenen nichtinvasiven Messmethoden vor und nach achtwöchiger Einnahme eines carotinoidreichen natürlichen Extraktes.

Zunächst wurde die Methode an 3 Probanden entwickelt und im Anschluss an 22 Probanden randomisiert, placebokontrolliert und doppelblind durchgeführt. Die 24 Probanden wurden am Tag ihrer ersten Visite randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilt. 12 Probanden erhielten das Verumsupplement; 12 weitere Probanden erhielten Placebo. Zwei Probanden schieden aus persönlichen Gründen nach der ersten Visite aus, so dass die gesamte Studie von 22 Studienteilnehmern durchlaufen wurde.

Die Studie umfasste vier Visiten und dauerte 20 Wochen. Dabei wurde das Studienpräparat während der ersten acht Wochen eingenommen. Das Studiendesign ist in Abbildung 9 dargestellt.

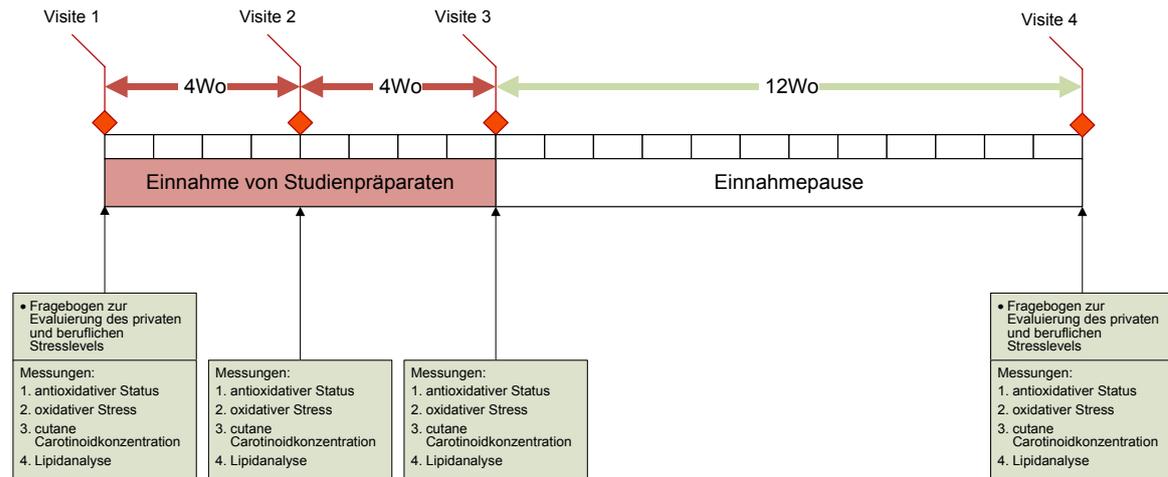


Abbildung 9: Studiendesign

An jeder der vier Visiten wurden folgende Messungen durchgeführt:

- Bestimmung der radikalfangenden Eigenschaften der Haut mittels ESR (antioxidativer Status)
- Bestimmung des Schutzes der Haut vor Radikalbildung durch einen äußeren oxidativen Stressor (sichtbare und infrarotnahe Bestrahlung)
- Bestimmung der cutanen Carotinoide mittels Raman-Resonanzspektroskopie
- Bestimmung der Hautlipide

Am Abend der ersten Visite begannen die Probanden mit der Einnahme der Studienpräparate. Die zweite Visite fand nach vier Wochen; die dritte Visite nach acht Wochen statt. Nach weiteren 12 Wochen, in denen keine Supplements mehr eingenommen wurden, erfolgt eine vierte Abschlussvisite.

### Visite 1:

Screening: Die Ramanwerte der Probanden mussten unter 8 willkürliche Einheiten liegen, andernfalls erfolgte kein Einschluss in die Studie. Lagen die Ramanwerte unter 8 willkürliche Einheiten, erfolgten alle geplanten Messungen. Bei der ersten Visite erhielten die Probanden das Prüfpräparat – entweder den Wirkstoff oder das wirkstofffreie Präparat. Die

Präparate wurden nach Vorgaben des Herstellers verabreicht. Mit der Einnahme wurde am Abend nach erfolgter erster Visite begonnen. Außerdem wurden die Probanden gebeten, einen Fragebogen zu Lebensstil und Ernährungsgewohnheiten auszufüllen.

### Visite 2:

4 Wochen nach Beginn der Einnahme erfolgte eine zweite Visite, bei der das Befinden der Probanden und nach dem Auftreten ungewöhnlicher Ereignisse in der Zwischenzeit gefragt wurde. Sämtliche Messungen aus der Visite 1 wurden wiederholt.

### Visite3:

Nach weiteren vier Wochen erfolgte die Visite 3. Die 8-wöchige Applikation des Prüfpräparats war nun beendet. Die Probanden wurden erneut nach ihrem Befinden und nach evtl. aufgetretenen unerwünschten Ereignissen befragt. Es fanden auch hier alle Untersuchungen analog zu den vorangegangenen Visiten statt.

### Visite 4:

Bei der Abschlussvisite nach weiteren 12 Wochen wurden sämtliche Untersuchungen wiederholt. Weiterhin wurden erneut die Fragebögen ausgeteilt.

Als Zeitpunkt zur Studiendurchführung wurde bewusst das Herbst- und Winterhalbjahr (16.09.2011 - 23.02.2012) gewählt, um mögliche Einflüsse durch natürliches Sonnenlicht so gering wie möglich zu halten. Auch wurden die Probanden gebeten, auf Solariumsbesuche während der gesamten Untersuchungsperiode sowie während des Zeitraums der 24 Stunden vor jeder Visite auf Pflegeprodukte an den Unterarmen zu verzichten.

Der Fragebogen diente zur Evaluierung des Lebensstils und der Ernährungsgewohnheiten der Probanden und um überprüfen zu können, ob oder inwieweit diese äußeren Umstände der Probanden annähernd konstant geblieben sind.

### 3.4 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Ein- und Ausschlusskriterien für diese Studie sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Ein- und Ausschlusskriterien der Studie

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> <li>• gesunde Probanden</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ramanwerte (Konzentration der Carotinoide) <math>&gt; 8 \cdot 10^{-4}</math> a.u., da sonst eine zusätzliche Einnahme von Carotinoiden nicht empfohlen wird</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 18 bis 70 Jahre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Störung der Barrierefunktion der Haut (Hauterkrankungen)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aufklärung der Probanden über die Ziele der Studie und die geplanten Messungen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Personen, die im Bereich des Unterarms metallische Implantate tragen (Schrauben, Stifte)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vorliegen einer schriftlichen Einwilligungserklärung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bekannte Allergien oder Nahrungsmittelunverträglichkeiten</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kinder</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwangere und stillende Mütter</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Personen, die keine eigenverantwortlichen Entscheidungen treffen können</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Studenten der Charité im Prüfungssemester</li> </ul>

Für die Bestimmung der cutanen Carotinoidwerte wurde festgelegt, dass die Ausgangswerte der Ramanwerte unter  $8 \times 10^{-4}$  willkürlichen Einheiten liegen sollen. Dies war eine Auflage der hiesigen Ethikkommission und hat den Hintergrund, dass es einerseits bei so einem guten Ausgangswert, der Durchschnittswert der Bevölkerung liegt bei  $5 \times 10^{-4}$  willkürliche Einheiten, wenig Sinn macht, weitere Carotinoide zuzuführen. Bei einer solchen Ausgangslage ist das Balancesystem des Körpers schon sehr gut trainiert, es sind ausreichend Antioxidantien vorhanden, um freie Radikale abfangen zu können. Eine evtl. Überdosierung muss zum Wohle des Probanden vermieden werden.

Da es für diese Studie erwünscht war, dass die äußeren Lebensumstände während des gesamten Studienzeitraums weitestgehend konstant gehalten werden, wurden Studenten der Charité im Prüfungssemester ebenfalls ausgeschlossen.

### 3.5 Probanden

Das Studienprotokoll wurde eingereicht von der lokalen Ethikkommission der Charite Berlin, in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki, revidiert im Jahr 1983, und akzeptiert. 24 Probanden wurden in die Studie eingeschlossen. 22 Probanden durchliefen die gesamte Studie bis zum Abschluss. Die Verteilung der 22 Probanden, welche die Studie bis zum Abschluss durchliefen, ist im Folgenden tabellarisch und graphisch dargestellt.

Tabelle 4: Probandendaten

		Gruppe Placebo	Gruppe Verum	Gesamt
Anzahl	Gesamt	12	10	22
	Männlich	7	4	11
	Weiblich	5	6	11
Alter [Jahre]	MW	39.67	36.30	38.14
	SD	12.93	7.32	10.88
	min	22	26	22
	max	66	47	66
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	MW	26.25	24.60	25.50
	SD	4.23	4.15	4.27
	min	20	20	20
	max	33	34	34
Rauchgewohnheit	R	5	3	8
	NR	7	7	14

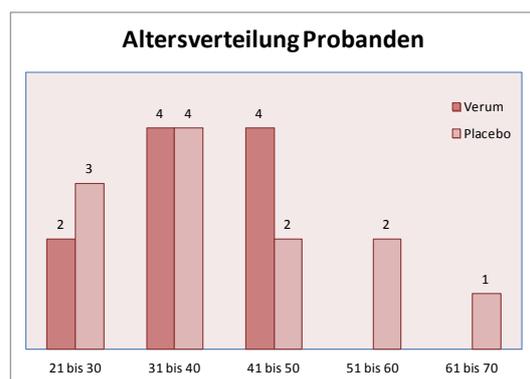


Abbildung 10: Altersverteilung

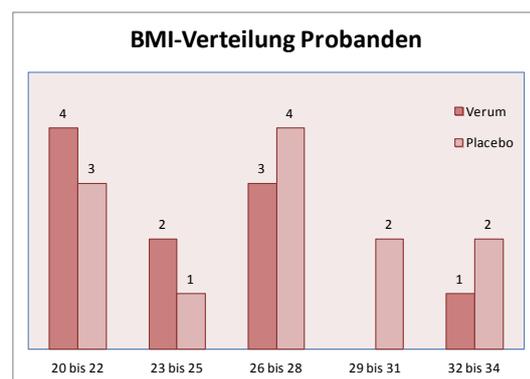


Abbildung 11: BMI-Verteilung

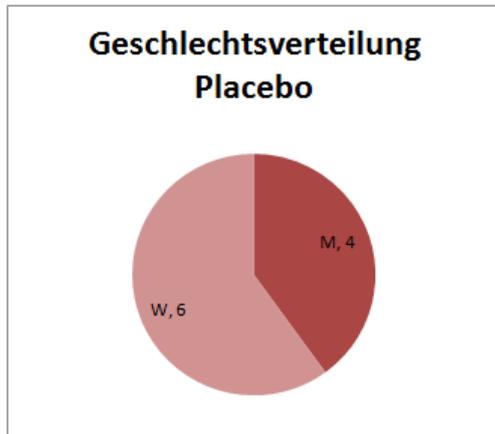


Abbildung 12:  
Geschlechtsverteilung Placebo

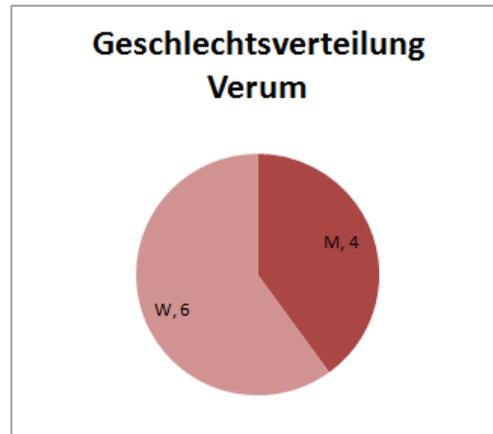


Abbildung 13:  
Geschlechtsverteilung Verum

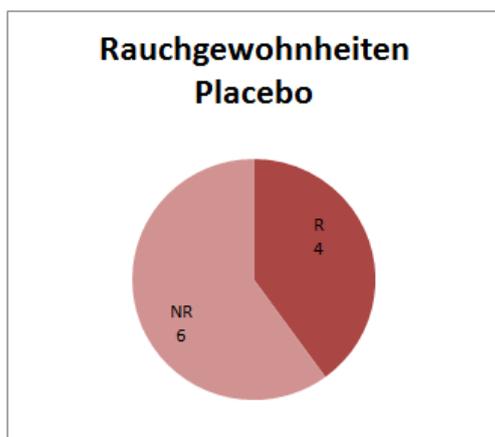


Abbildung 14:  
Rauchgewohnheiten Placebo

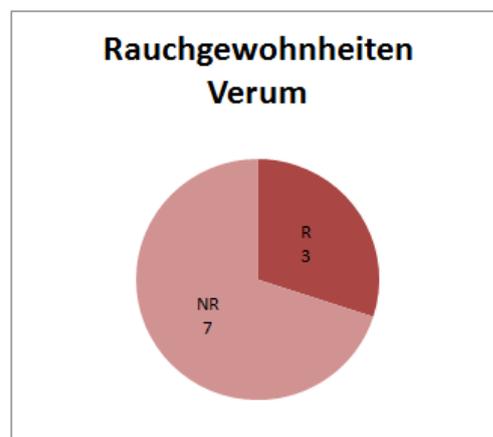


Abbildung 15:  
Rauchgewohnheiten Verum

Die Probanden wurden gebeten, während des Studienzeitraumes ihre Lebens- und Ernährungsgewohnheiten weitestgehend konstant zu halten.

### 3.6 Fragebögen

Zu Beginn und am Ende der Studie wurden die Probanden gebeten, einen Fragebogen zu Lifestyle und Ernährungsgewohnheiten auszufüllen, um zu erfahren, ob die Lebensumstände während der Zeitperiode der Studie annähernd gleichgeblieben sind. Entwickelt wurde dieser Fragebogen von Frau Anna Lauer im Rahmen ihrer Doktorarbeit [44]. Der Fragebogen ist im Anhang dieser Arbeit angefügt.

Alle Probanden haben einen Fragebogen ausgefüllt und Fragen beantwortet hinsichtlich Hauttyp, individueller Sonnenexposition, durchschnittlichem wöchentlichem Sportpensum, Häufigkeit von Infekten und Magen-Darmerkrankungen pro Jahr, Art und Menge von konsumiertem Gemüse und Obst pro Woche, Konsum von Alkohol und Nikotin. Die Angaben hinsichtlich Obst und Gemüse wurden von den Probanden selbst eingeschätzt und in Listen mit jeweils 13 gängigen Gemüsesorten und 13 gängigen Obstsorten eingetragen. Dabei konnten die Probanden die Kategorien „selten“, „einmal monatlich“, „einmal wöchentlich“ und „viermal pro Woche“ ankreuzen.

Anhand dieser Angaben wurde ermittelt, wie viel Carotinoide in dieser Studienpopulation mit der üblichen Nahrung und Verzehrmenge aufgenommen wurden. Als Grundlage für diese Berechnung/Abschätzung wurde die Lebensmitteltabelle von Souci, Fachmann und Kraut<sup>4</sup> genutzt. Diese Nährwerttabelle wird herausgegeben von der *Deutschen Forschungsanstalt* (DFA) für Lebensmittelchemie in Freising. Zugrunde gelegt bei der Berechnung/Abschätzung wurde das Verhalten einer typisch deutschen Durchschnittsfamilie d.h. beispielsweise Tomate, Paprika wurden als roh genossen angesehen; Brokkoli, Blumenkohl, Karotten als gekocht.

### **3.7 Bestimmung der cutanen Carotinoidkonzentrationen**

Zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit diente die Ramanmethode. Diese nichtinvasive Methode der resonanten Ramanspektroskopie erfolgte am linken Kleinfingerballen. Epidermis und somit auch das *Stratum corneum* sind am Handballen besonders dick und bietet somit genügend Reservoir für Antioxidantien. Daher ist die Konzentration der Carotinoide hier besonders hoch. [45]

---

<sup>4</sup> Lebensmitteltabelle nach Souci Fachmann Kraut  
(<http://www.sfk-online.net>, Zugang vom 01.-14.08.2012)

Zunächst wurde die zu untersuchende Stelle am Kleinfingerballen mit einem Filzstift markiert. Anschließend wurde der Proband gebeten, diese mit gleichmäßigem mittlerem Druck an die Messstelle des Geräts zu platzieren. Die Anregung erfolgte mit einem Argon-Laser. Die Frequenzunterschiede zwischen eingestrahlem Licht und dem emittierten Streulicht erlauben Rückschlüsse auf die Carotinoide im Kleinfingerballen.

Die Leistung des Laserstrahls wurde vor jeder Messung kalibriert. Die Spotgröße des Lasers auf die Haut betrug 6,5 mm Durchmesser. Gemessen wurde bei zwei Wellenlängen, bei 488 nm für Carotinoide und bei 514 nm für Lycopin. Jede Messung erfolgte dreimal, anschließend wurde der Mittelwert der Carotinoide gebildet. [46]

### **3.8 Bestimmung des antioxidativen Status der Haut**

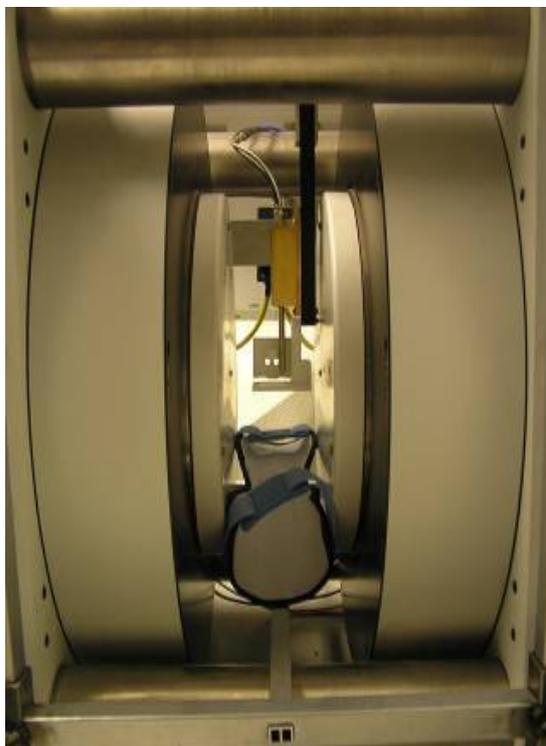


Abbildung 16: In vivo L-Band (1.3 GHz) ESR-Spektrometer mit Armschiene

Die Bestimmung des antioxidativen Status der Haut wurde mittels Elektronen – Spin – Resonanzspektroskopie durchgeführt. Hierzu wurde ein Testradikal auf die Haut aufgetragen und dessen Abbau in der Haut mittels der ESR-Spektroskopie gemessen. Wobei ein schneller Abbau des Radikals ein Hinweis auf eine hohe antioxidative Kapazität der Haut ist.

Die ESR-Messungen wurden mit dem L-Band ESR-Spektrometer (LBM MT 03; Magnettech, Berlin, Germany) mit folgenden Parametern durchgeführt: Mikrowellenfrequenz 1,3 GHz, Magnet-

feld 46 mT, der durchlaufene Magnetfeldbereich 8 mT, Zeit eines Durchlaufs 10 s sowie Amplitudenmodulation von 0,15 mT. Das L-Band arbeitet mit 1,3 GHz (1-1,5 GHz) mit einer relativ niedrigen Mikrowellenfrequenz.

Die Besonderheit dieses Gerätes ist, dass die Messungen *in vivo* erfolgen können. D.h. aufgrund einer speziell angefertigten Apparatur ist es möglich, den Arm des Probanden so in der Mitte des Magnetfelds zu platzieren, wie es für die Messungen nötig ist, zu sehen in Abbildung 16.

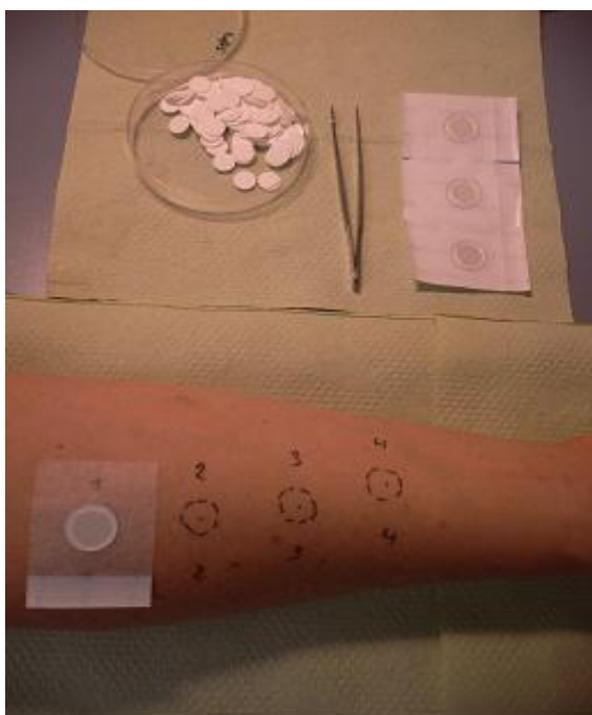


Abbildung 17:  
Vorbereiten von 4 Messpunkten für zwei  
Doppelmessungen  
mit dem ESR-Spektrometer

Als Messareal wurde die sonnenabgewandten Innenseite des rechten Unterarms der Probanden ausgewählt. Das Vorgehen war hierbei folgendermaßen: Zunächst wurde der rechte innere Unterarm der Probanden mit einem ethanolgetränktem Papierhandtuch gereinigt. Evtl. vorhandene Haare wurden durch vorsichtiges Rasieren entfernt. Anschließend wurden an 2 verschiedenen Stellen des rechten Unterarms 2 Messareale für 2 Doppelmessungen markiert. Auf jedes Messareal wurde eine Filterpapierscheibe (Durchmesser 12 mm, Epitest Ltd Oy, Tuusula, Finland)

gelegt. Auf diese Filterpapierscheibe wurden dann 50  $\mu$ l des ESR-Markers TEMPO (30 mM, Wasser:Ethanol, 1:1, v:v ) mit einer Pipette aufgebracht und zügig mit einem Epikutanpflaster (Finn Chamber Epitest Ltd Oy) okklusiv abgedeckt, um die Penetration von TEMPO in die Haut zu ermöglichen. Das Prozedere der Vorbereitung der vier Messpunkte wird in Abbildung 17 dargestellt.

Nach einer Penetrationszeit von 10 Minuten wurden das Epikutanpflaster und die Filterpapierscheibe wieder entfernt; der evtl. vorhandene Rest der Lösung

einmalig mit einem Papiertuch abgetupft und in die Mitte des Areal mit einem Filzstift ein Markierungspunkt gesetzt. Der Unterarm des Probanden wurde dann zügig auf der Armschiene des ESR-Gerätes platziert und vorsichtig bis auf die Höhe der Magnetspule angehoben.

Anschließend wurde die Reaktionskinetik des ESR-Markers TEMPO mit der Haut über die Zeit 12 min lang gemessen und aufgezeichnet. Pro Minute wurden vier Werte aufgezeichnet. Aus jeweils acht Werten wurde der Mittelwert gebildet. Während der Messung wird das Testradikal von den Antioxidantien in der Haut neutralisiert, seine Konzentration sinkt entsprechend, was sich als Signalabnahme während der ESR-Messung zeigt. Der Abfall der Signalintensität des Testradikals korreliert mit der antioxidativen Kapazität der Haut und kann durch die Exponentialfunktion  $I(t) = I_0 \cdot e^{-k \cdot t}$  dargestellt werden, wobei  $k$  die Ratenkonstante mit der Einheit  $\text{min}^{-1}$  darstellt. [47]

In dem Moment, in dem das Testradikal mit den in der Epidermis befindlichen Antioxidantien reagiert, wird es zum *entsprechenden* vom ESR-Gerät nicht mehr registriertem Hydroxylamin [48] entsprechend folgender Gleichung reduziert:



Ein schneller Abbau von TEMPO d.h. eine stark abfallende Kurve des Markers, weist auf eine hohe antioxidative Kapazität der Haut hin. Die Ratenkonstante der abfallenden Kurve des Markers TEMPO kann daher als ein Maß für die antioxidative Kapazität der Haut angesehen werden. Im folgenden Bild ist die ESR-Intensität des ESR-Markers TEMPO über die Zeit beispielhaft aufgetragen:

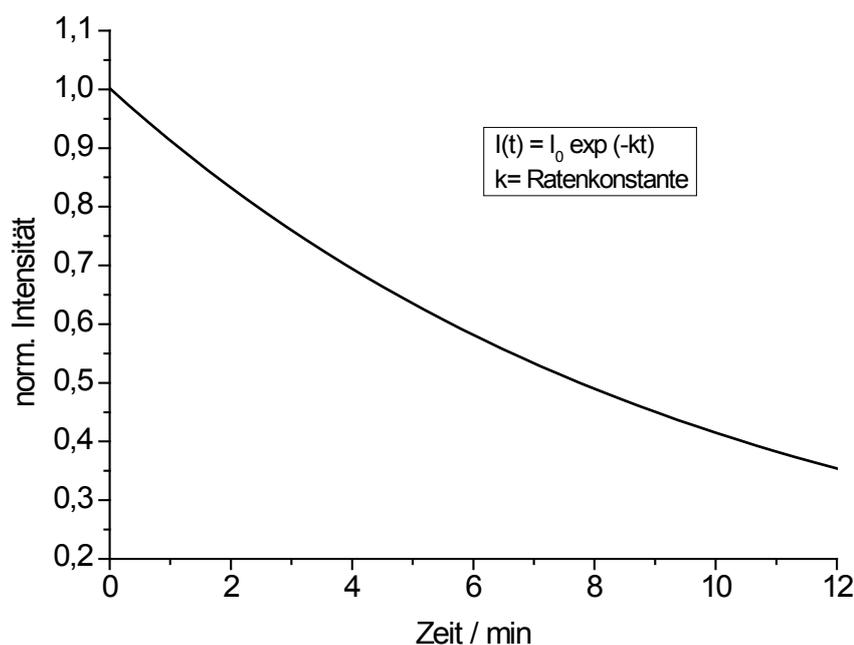


Abbildung 18: Exponentieller Abfall des ESR-Testmarkers TEMPO

Diese Reaktion beginnt natürlich unmittelbar nach dem Auftragen des Markers. D.h. zum Beginn der Messung ist der Marker zu einem geringfügigen Teil bereits abreagiert. Daher wird der entsprechende Ausgangswert der Signalintensität des Testradikals bestimmt und anschließend der relative Abfall.

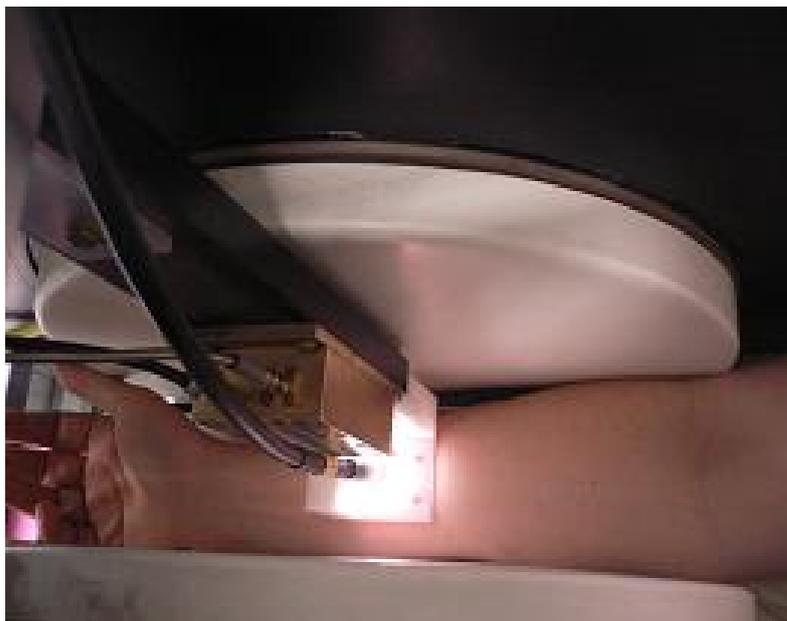
Der zur Anwendung kommende Marker Tempo ist eines der wenigen Nitroxide, welches auf die menschliche Haut aufgetragen werden darf. [6, 49] Aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaften penetriert es sehr gut in die äußerste Hautschicht, das *Stratum corneum*. Aus Gründen der Reproduzierbarkeit (Abweichungen der Ratenkonstanten unter 30%) wurden alle Messungen als *Doppelmessungen* durchgeführt.

### 3.9 Bestimmung des oxidativen Stresses der Haut

Es sollte die Frage untersucht werden, ob die in die Haut gelangten Antioxidantien eine cutane Radikalprotektion bewirken können. Zur Betrachtung

dieser Frage wurden die Probanden zusätzlich einem Stressor in Form von Bestrahlung ausgesetzt. Bestrahlt wurde mit einem lichtleitfasergekoppelten Sonnensimulator (Firma LOT Oriel GmbH & Co.KG) mit der Wellenlänge von 420-2000 nm und einer Leistung von 120 mW/cm<sup>2</sup>. Der Sonnensimulator ermöglicht es, Auswirkungen der Sonnenstrahlung unter Laborbedingungen zu untersuchen. Die Leistung des Sonnensimulators ist in etwa zweifach so hoch wie die der natürlichen Sonnenstrahlung.

Das Licht wurde über eine Faser in den ESR-Messraum eingeführt. Abbildung 19 zeigt die Versuchsdurchführung bei der Bestimmung der Photoprotektion vor Radikalwirkung, induziert durch sichtbares und infrarotnahes Licht (Vis/NIR). Hierfür wurde Vis/NIR-Strahlung gewählt, da sichtbares und infrarotnahes Licht zwar Radikale erzeugt, aber i.d.R. zu keiner anhaltenden Erythembildung führt.



*Abbildung 19: ESR-Messvorrichtung mit Vis/NIR Bestrahlung*

Wurden zuvor Antioxidantien eingenommen, so die Hypothese, entstehen zwar während der Bestrahlung Radikale; diese werden aber schnell von den Antioxidantien in der Haut abgefangen und können keinen Schaden anrichten. Das Testradikal PCA reagiert während der Bestrahlung ab, und zwar umso stärker, je mehr Radikale während der Bestrahlung in der obersten Hautschicht gebildet wurden. Der Abfall der Signalintensität des Testradikals korreliert mit der Radikalbildung bzw. mit der Änderung der Radikalbildung. [42] Ein schwächerer

Abfall hingegen nach Einnahme von Antioxidantien bedeutet eine geringere Radikalbildung.

Die Vorbereitung der Messareale am inneren rechten Unterarm erfolgte analog wie bei der vorhergehenden Messmethode d.h. zunächst Hautreinigung des rechten Unterarms mit Ethanol, Entfernung evtl. vorhandener Haare, Markierung von Messarealen für 2 Doppelmessungen an zwei Stellen des rechten Unterarms. Anders ist allerdings, dass nun als ESR-Markersubstanz 100 µl PCA-Lösung (50 mM, Wasser:Ethanol, 1:1, v:v) eingesetzt wurden, die auf jeweils zwei übereinandergelegte Filterpapierscheiben (Durchmesser 11 mm, Epitest Ltd Oy, Tuusula, Finland) aufgebracht wurden. Auch die Einwirkzeit ist mit 40 min wesentlich länger. Die PCA-Lösung wurde auf die zwei Filterpapierscheiben eines jeden Messareals appliziert, okklusiv abgedeckt mit einem Epikutanpflaster (Finn ChamberEpi Test Ltd Oy), um dann 40 min lang in die Haut penetrieren zu können.

Der Arm wurde anschließend im ESR-Spektrometer platziert und die Messungen wurden zunächst 12 min lang ohne äußere Bestrahlung durchgeführt, um eine mögliche Abnahme ohne Bestrahlung zu verfolgen. Der letzte Messpunkt wurde nach Ablauf der 12 Minuten als Ausgangswert für das 10-minütige Bestrahlen genutzt. Die *in situ*-Bestrahlung erfolgte mit einem Sonnensimulator (Wellenlänge: 420-2000 nm; Leistung: 120 mW/cm<sup>2</sup>) über eine Lichtleitfaser, die in dem ESR-Gerät so platziert wurde, dass der Lichtspot der Faser direkt auf das entsprechende Messareal zeigte. Die Messungen wurden für weitere 10 min während der Bestrahlung weitergeführt. Pro Minute wurden vier Werte aufgezeichnet. Aus jeweils acht Werten wurde der Mittelwert gebildet. Auch diese Messungen wurden als Doppelmessungen durchgeführt.

Das hydrophile und stabilere Testradikal PCA wurde an allen 4 Visiten 12 min unbestrahlt gemessen und anschließend weitere 10 min bestrahlt. Die folgende Darstellung in Abbildung 20 zeigt dies beispielhaft.

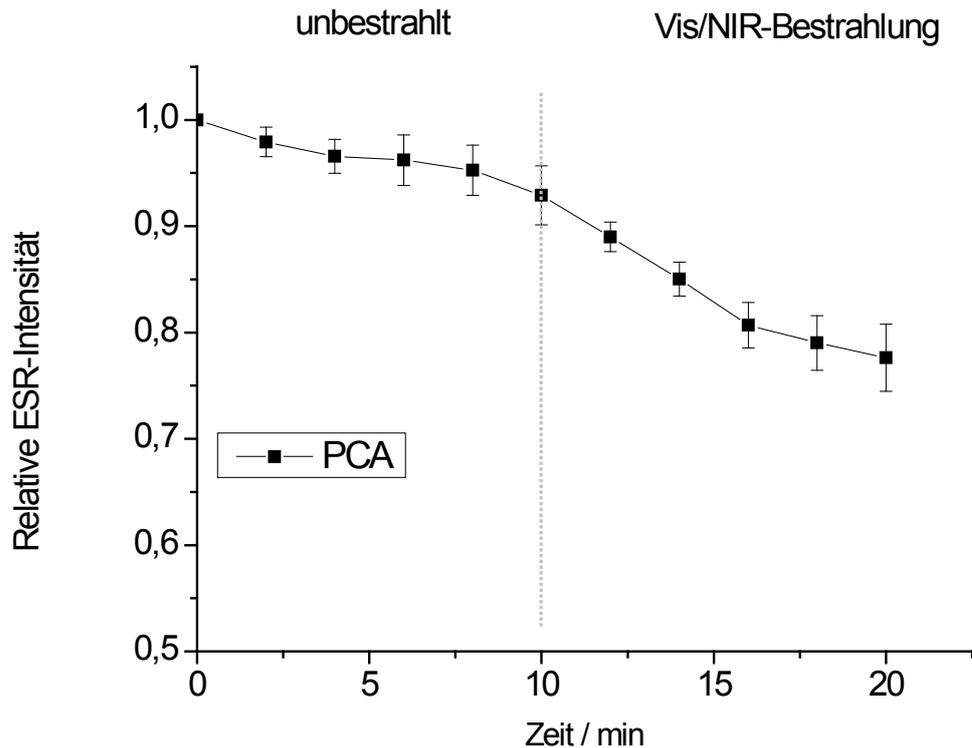


Abbildung 20: ESR-Messung PCA unbestrahlt und bestrahlt mit Vis/NIR

Die Differenzen aus beiden Messungen erlauben es, eine Aussage über die Änderung der Radikalbildung während der 10-minütigen Bestrahlung machen zu können. Waren die Differenzen nur gering, so bewirkte die Bestrahlung keine wesentliche Radikalwirkung an der Haut. Zeigten sich stärkere Differenzen nach Bestrahlung im Vergleich zu den unbestrahlten Vorwerten, so ist davon auszugehen, dass die Bestrahlung eine vermehrte Radikalbildung bewirkt hat. In Abbildung 21 ist dies einmal beispielhaft zu sehen:

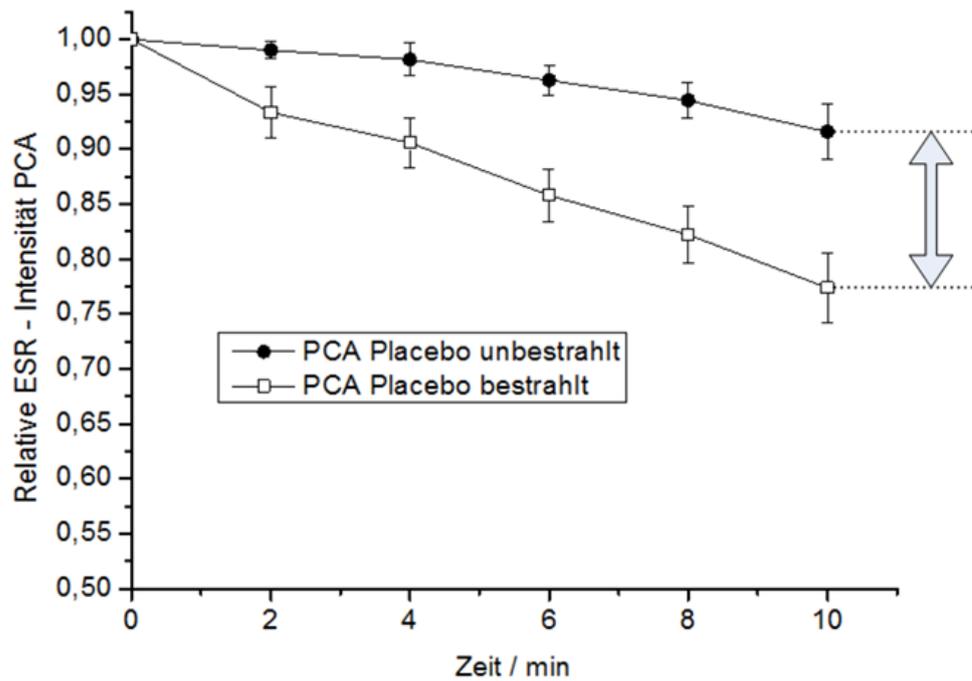


Abbildung 21: Intensität des PCA-Signals, ohne und mit Bestrahlung mit Vis/NIR (beispielhaft)

### 3.10 Bestimmung des Lipidprofils der Haut

Schließlich sollte die Frage beantwortet werden, ob die Carotinoideaufnahme in die Haut das Lipidprofil der Haut beeinflusst. Hierzu erfolgten zu jeder Visite 2 Lipidextraktionen am Unterarm der Probanden, eine an einem während der ESR bestrahlten (Messpunkt 3, Abbildung 22) und zum Vergleich eine an einem unbestrahlten und bisher gänzlich unbehandelten Areal des Probandenunterarms.

Extrahiert wurden die extrahierbaren nicht kovalent gebundenen Lipide der drei Gruppen

- Ceramiden,
- Cholesterol und
- freie Fettsäuren.

Je nach Länge ihrer Fettsäurekette werden 9 Ceramide unterschieden: das Ceramid1 (Cer 1 [OS]), das Ceramid 2 (Cer 2 [NS]), das Ceramid 3 (Cer 3 [OP]), das Ceramid 4 (Cer 4 [NP]), das Ceramid 5 (Cer 5 [OH]), das Ceramid 6 (Cer 6 [NH]/[AS]), das Ceramid 7 (Cer 7 [NH]), das Ceramid 8 (Cer 8 [AP]) sowie das Ceramid 9 (Cer 9 [AH]), wobei den Ceramiden 1 und 3 eine besondere Bedeutung zukommt.

Als Lipidextraktionsmittel diente eine Lösung bestehend aus Cyclohexan:Ethanol (1:4, v/v) [50, 51]. An jedem der beiden Hautpunkte wurde mit 15 ml extrahiert. Dabei war das Vorgehen wie folgt: ein mit jeweils 5 ml mit Extraktionsmittel gefülltes Zentrifugenröhrchen mit einem Durchmesser von etwa 7,3 cm wurde auf den entsprechenden Hautpunkt aufgelegt und dann unter dem Abzug 1 min lang vorsichtig geschwenkt. Diese Prozedur wurde an jedem Messpunkt dreimal durchgeführt, so dass pro Messpunkt jeweils 15 ml extrahiert wurden.

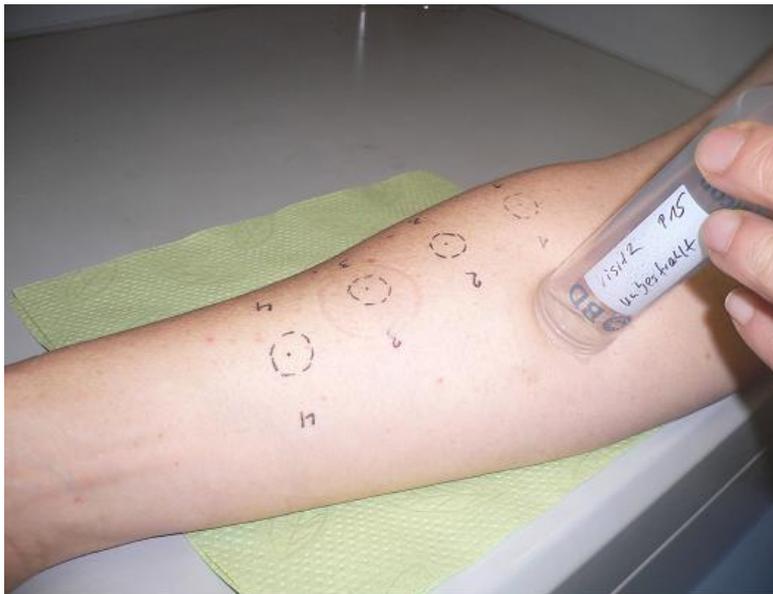
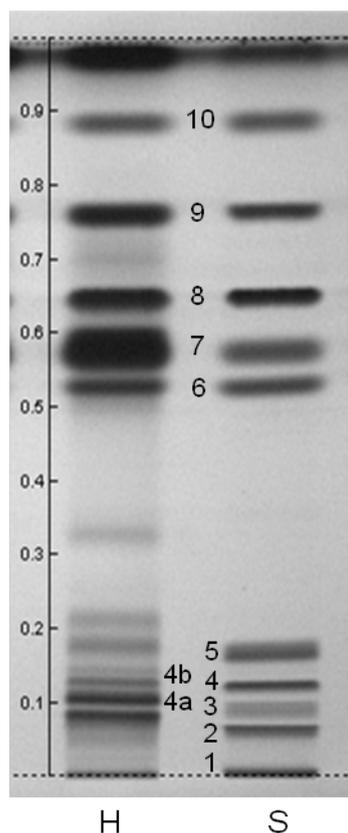


Abbildung 22: Lipidextraktion  
am Messpunkt 3 und an einem unbestrahlten Areal

Die Röhrchen wurden anschließend fest verschlossen, beschriftet und bis zur weiteren externen Analyse und Auswertung mittels Dünnschichtchromatographie im Frostschrank bei  $-20^{\circ}$  aufbewahrt. Die extrahierten Lipide wurden anschließend extern mittels Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie (HPTLC) in der Gruppe von Prof. Dr. Sascha Rohn Universität Hamburg analysiert. [50-52]

In der HPTLC werden die Ceramide 1 bis 9, aufsteigend nach ihrer Polarität klassifiziert, aufgetrennt. Die Ceramide 1-9 durchlaufen eine polare stationäre Phase aus Kieselgel unterschiedlich schnell. Je nach ihrer Polarität zeigen sie dabei ein charakteristisches Wanderungsverhalten. Ceramide mit einer langen Fettsäurekette laufen schneller durch die stationäre Phase. Die stationäre Phase ist polar. Daher kommt es zu stärkeren Wechselwirkungen und einige Substanzen werden stärker zurückgehalten. Ceramide mit einer kurzen Fettsäurekette weisen eine höhere Polarität auf und werden stärker zurückgehalten. Die Ceramide verlassen jedoch die stationäre Phase nicht; alle Ceramide bleiben auf der Kieselgelplatte, dargestellt in Abbildung 23.



Legende:

Links: Stratum corneum-Lipidextrakt aus humaner Haut (H)

Rechts Standard-Lipid-Mix (S)

- 01 PC und SM,
- 02 SCS,
- 03 Cer [AP],
- 04 Cer [NP],
- 05 Cer [NS],
- 06 Cholesterol,
- 07 OA,
- 08 GT,
- 09 CO,
- 10 Squalen,

aus [22]

Abbildung 23: Densitogram

### **3.11 Statistik**

Die Studie wurde an 22 Probanden durchgeführt. Es wurden vier verschiedene Messmethoden angewandt. Jede Messung wurde als Doppelmessung durchgeführt. Die Einzelmessungen wurden gemittelt und die Standardabweichung dieser Mittelwerte berechnet. Es wurden die Messergebnisse von allen vier Messzeitpunkten für jeden Probanden und für das gesamte Kollektiv auf ihre Signifikanz  $p$  untersucht, wobei  $p \leq 0,05$  als signifikant unterschiedlich interpretiert wird. Die beschreibende explorative Datenanalyse wurde durchgeführt mit Hilfe von PASW Statistics (Version 19, Inc. Chicago, IL). Auf Grund der geringen Probandenzahl sind die Daten nicht normal verteilt und es wurden nicht-parametrische Tests durchgeführt. Verbundene Vergleiche zum Vorher- und Nachher-Vergleich bei ein und demselben Individuum wurden mit Hilfe des Friedmann-Tests und des Wilcoxon-Tests durchgeführt. Unverbundene Daten zum Vergleich zwischen Verum- und der Kontrollgruppe wurden analysiert mit Hilfe des Kruskal-Wallis und des Mann-Whitney U Tests. Zudem wurden bei der Lipidanalyse mittels SPSS die Korrelationskoeffizienten bestimmt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 *Lebensstil und Ernährung der Probanden während der Studie*

Die Analyse der Fragebögen hat ergeben, dass Ernährungs- und Rauchgewohnheiten während der Studie weitgehend konstant geblieben sind. So konnte keine signifikante Änderung in der Aufnahme von Gemüse und Obst über den Zeitraum der Studie festgestellt werden.

Die Gesamtcarotinoidkonzentrationen wurden anhand der Lebensmitteltabelle von Souzi-Fachmann-Kraut abgeschätzt. Für gesunde Erwachsene empfiehlt die *Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE)*<sup>5</sup> eine durchschnittliche Verzehrmenge von 2-4 mg an Gesamtcarotinoiden pro Tag. Wobei auch angegeben wird, dass die tatsächliche Verzehrmenge in der deutschen Bevölkerung nur bei etwa 0,8 mg liegt. Bei den Probanden der vorliegenden Studie variierte die durch den Fragebogen erfasste durchschnittliche alimentäre Aufnahme an Carotinoiden von 0,25 mg bis 1,94 mg pro Tag. Die tägliche Supplementation lieferte in der Verumgruppe zusätzlich eine tägliche Gesamtcarotinoidaufnahme von 4,45 mg. Insgesamt summierte sich die tägliche Gesamtcarotinoidaufnahme durch die Supplementation auf  $2,13 \pm 1,97$  mg (Spanne von 0,25 - 6,39 mg).

Ebenso blieben die Rauchgewohnheiten gleich.

Es gab keine signifikanten Unterschiede in diesen Kategorien zwischen der Placebo- und der Verumgruppe. 2 Probanden erschienen aus Zeitgründen ab der zweiten Visite nicht mehr.

---

<sup>5</sup> Deutsche Gesellschaft für Ernährung  
(<http://www.was-esse-ich.de>, Zugang am 22.06.2012)

## 4.2 Bestimmung der cutanen Carotinoidkonzentrationen

Die cutanen Carotinoidkonzentrationen wurden mit der resonanten Ramanspektroskopie bestimmt und werden in willkürlichen Einheiten angegeben. Der Mittelwert der ermittelten Ausgangswerte der cutanen Carotinoide von allen 24 Probanden an Visite 1 betrug  $4,56 \cdot 10^{-4}$  willkürliche Einheiten. Die Frauen (n=11) zeigten mit einem Durchschnittswert von  $4,7 \cdot 10^{-4}$  unskalierte Einheiten um 6% höhere Ausgangswerte als die männlichen Probanden (n=13) mit einem Mittelwert von  $4,4 \cdot 10^{-4}$  willkürlichen Einheiten. Die cutanen Carotinoidwerte der rauchenden Probanden (n=10) waren in der Eingangsvisite um 38% niedriger als die der Nichtraucher (n=14).

*Tabelle 5: Ausgangswerte der cutanen Carotinoide und Verteilung der Probanden*

	Alle	Rauchgewohnheit		Genus		Raucher		Nichtraucher	
		Raucher	Nicht-raucher	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Anzahl	24	10	14	13	11	7	3	6	8
Mittelwert	4.56E-04	3.37E-04	5.41E-04	4.43E-04	4.72E-04	3.35E-04	3.42E-04	5.68E-04	5.21E-04
SD	1.78E-04	1.62E-04	1.39E-04	2.04E-04	1.51E-04	1.89E-04	9.96E-05	1.47E-04	1.40E-04
SD%	39.04%	47.89%	25.75%	45.99%	31.92%	56.45%	29.12%	25.80%	26.90%

Die resonante Ramanspektroskopie zeigt die Carotinoidaufnahme in die humane Haut nach vier- und achtwöchiger Supplementation, wie in Abbildung 24 bis Abbildung 27 dargestellt:

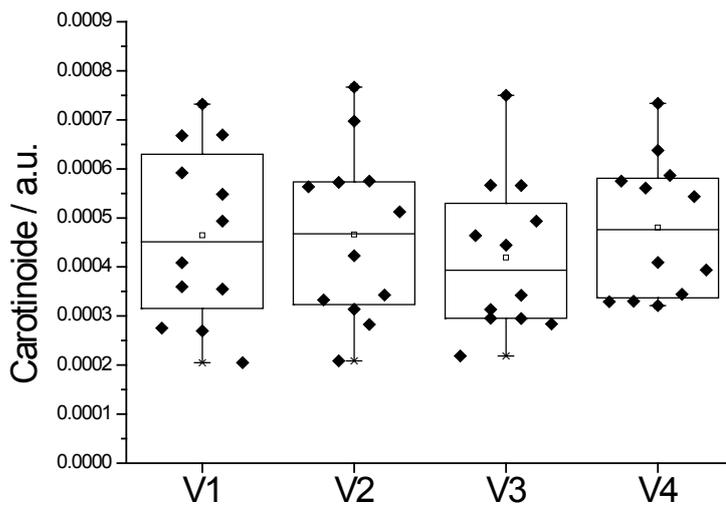


Abbildung 24: Absolute Carotinoidwerte der Placebogruppe an den Visiten 1 bis 4

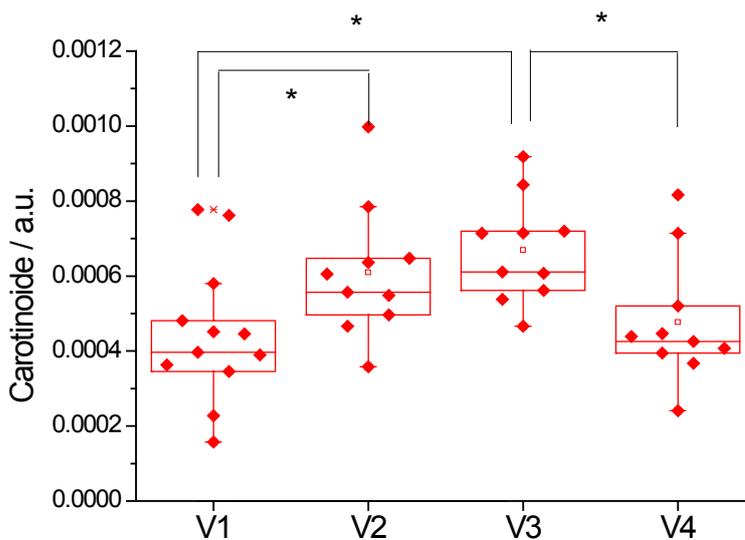


Abbildung 25: Absolute Carotinoidwerte der Verumgruppe an den Visiten 1 bis 4, \*  $p \leq 0,05$

In der Verumgruppe zeigte sich nach vier Wochen und nach achtwöchiger Carotinoideinnahme eine signifikante Erhöhung der cutanen Carotinoide bis zu 50%. Innerhalb der Verumgruppe zeigten sich eine signifikante Erhöhung zwischen Visite 1 und Visite 2 und zwischen Visite 1 und Visite 3. Nach der Einnahmepause erniedrigten sich die Werte wieder signifikant. In der

Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden. In einem weiteren Boxplot in Abbildung 26 wurden die Werte der Placebo- und der Verumgruppe in Relation zu den jeweiligen Ausgangswerten von Visite 1 dargestellt.

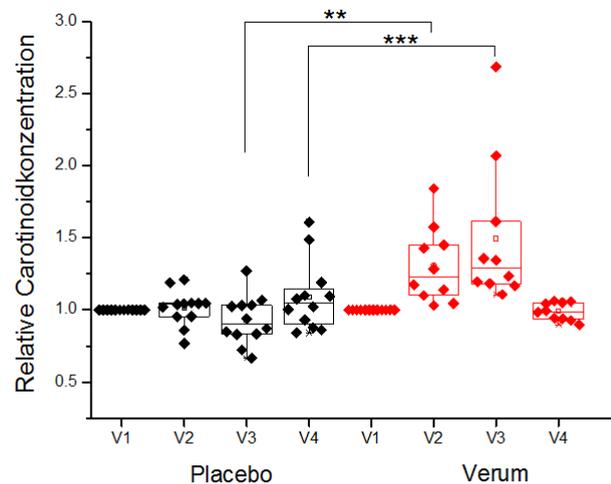


Abbildung 26: Relative Carotinoidkonzentrationen bezogen auf die Ausgangskonzentration der einzelnen Probanden  
 \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$

Es zeigte sich zusätzlich ein signifikanter Unterschied zwischen der Verum- und der Placebogruppe an den Visiten 2 und 3.

Abbildung 27 und Abbildung 28 zeigen den Verlauf der Mittelwerte der cutanen Carotinoide über die Zeit. Dargestellt sind die Mittelwerte und die jeweilige Standardabweichung. Es ist erkennbar, dass nach 4 Wochen noch keine Sättigung eingetreten ist, sondern von der Woche 4 zu 8 eine deutliche Erhöhung der cutanen Carotinoide erfolgt.

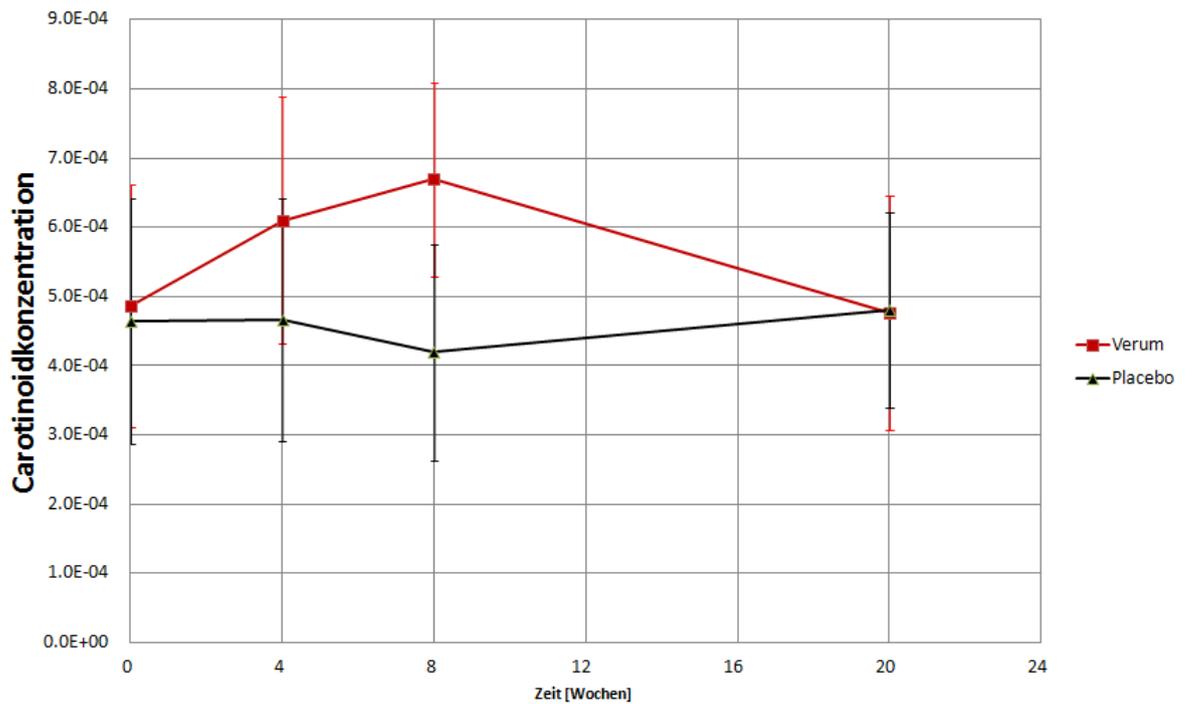


Abbildung 27: Entwicklung der cutanen Carotinoïdwerte in a.u.  
Die Messpunkte stellen die Visiten 1 (Woche 0), V2 (Woche 4), V3 (Woche 8), V4 (Woche 20) dar.

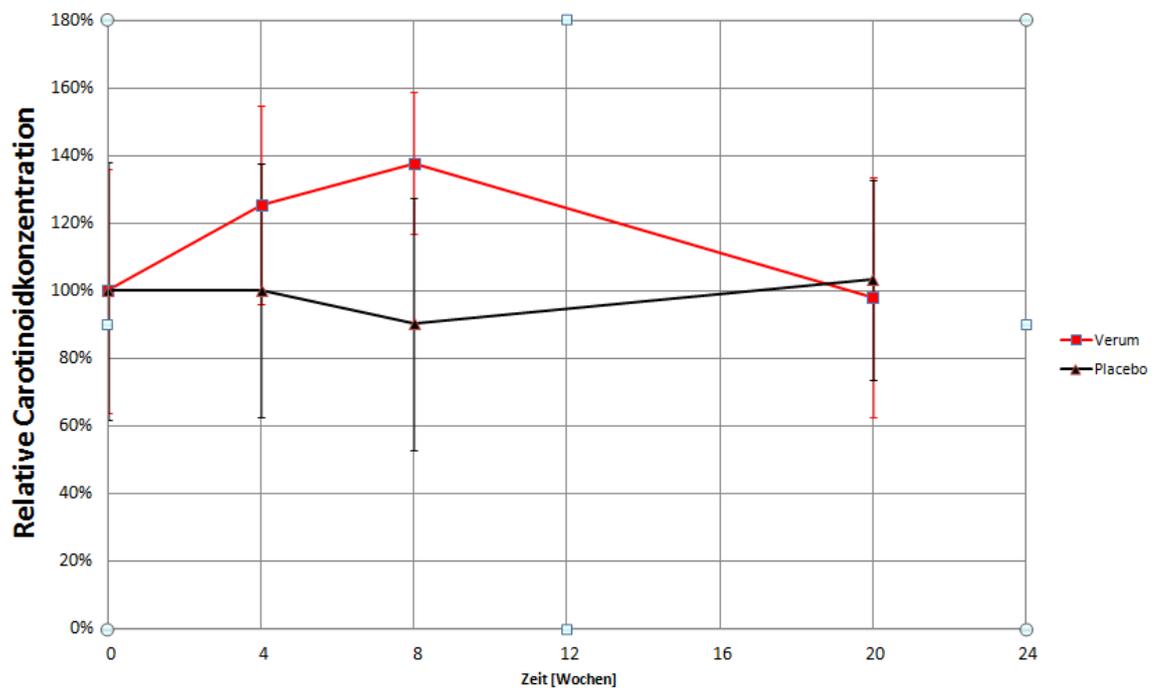


Abbildung 28: Zeitliche Entwicklung der relativen Werte der cutanen Carotinoïde

In den folgenden Abbildungen soll die Entwicklung der cutanen Carotinoidwerte, aufgesplittet nach Rauchern und Nichtrauchern betrachtet werden. Aus der Graphik von Abbildung 29 ist ersichtlich, dass die cutanen Carotinoidwerte der Raucher sowohl in der Verum- als auch in der Placebogruppe deutlich niedriger anfangen als die der Nichtraucher. Ebenfalls ist in Abbildung 29 zu sehen, dass der Anstieg der Raucher der Verumgruppe dennoch nicht wesentlich über die Anfangswerte der Nichtraucher hinausragt.

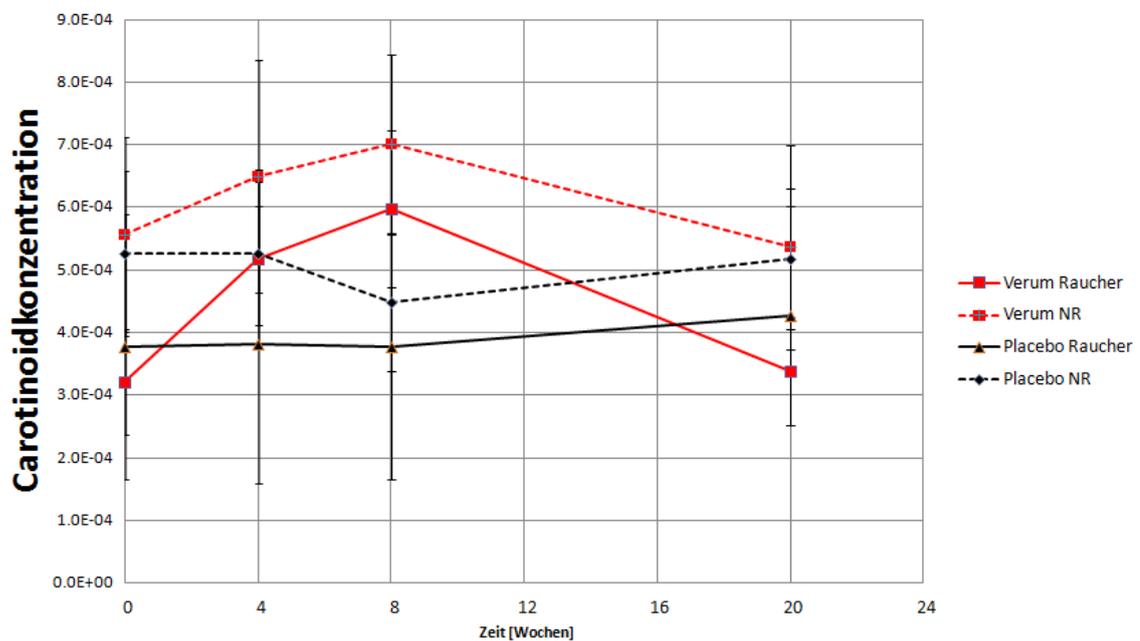


Abbildung 29: Absolute Carotinoidwerte in a.u. , Raucher versus Nichtraucher

Desweiteren fällt in Abbildung 30 auf, dass bei den Rauchern in der Verumgruppe der relative Anstieg an Visite 3 größer gegenüber der Nichtrauchergruppe ist.

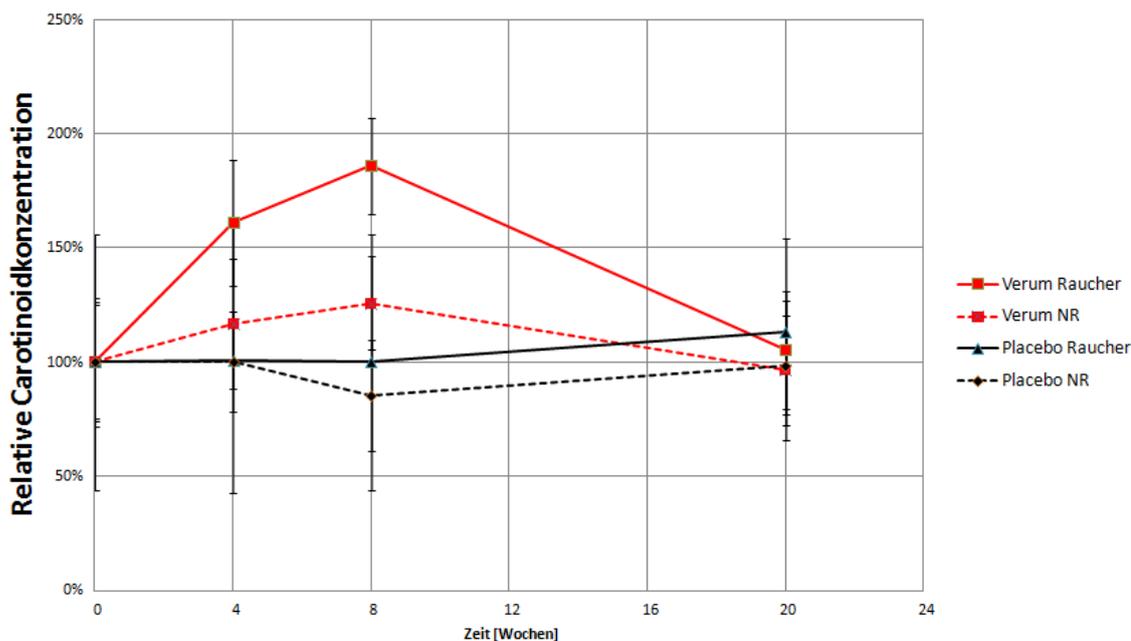


Abbildung 30: Relative Carotinoidwerte, Raucher versus Nichtraucher bezogen auf die Ausgangskonzentration der einzelnen Probanden

### 4.3 Bestimmung des antioxidativen Status der Haut

Für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität wurde die Ratenkonstante nach Applikation des Testradikals TEMPO bestimmt.

Die erhaltenen Kurven der Mittelwerte von TEMPO inklusive ihrer Ratenkonstanten sind für Placebo- und die Verumgruppe an Visite 1, 2, 3 und 4 in Abbildung 31 dargestellt. Es ist hier gut zu erkennen, dass sich nach vierwöchiger Einnahme des Prüfpräparates mit dieser Messmethode noch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Placebo- und der Verumgruppe zeigen. Jedoch an Visite 3 d.h. nach 8-wöchiger Einnahme der Carotinoide ist ein stärkerer Abfall der Ratenkonstante in der Verumgruppe zu beobachten.

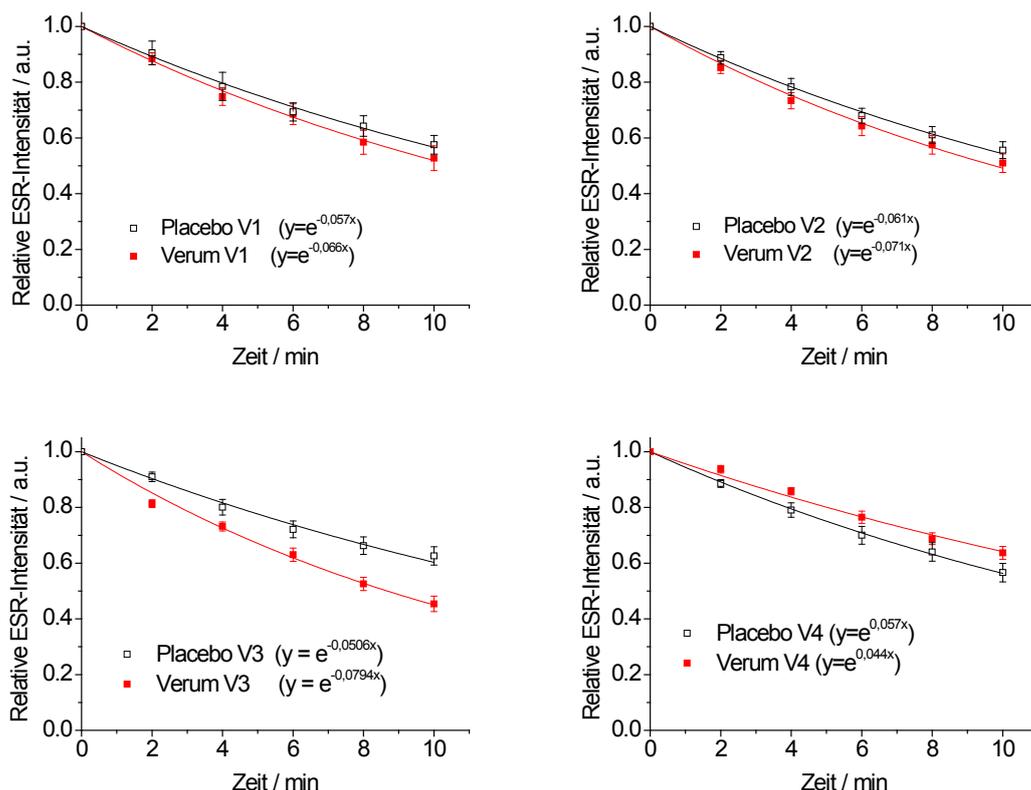


Abbildung 31: Normierte Mittelwerte der ESR-Intensität

ESR-Intensität des Testradikals TEMPO über die Zeit Visite 1 bis Visite 4

A) V1: n= 24

B) V2: n=22

C) V3: n=22

D) V4: n=22

Die absoluten Ratenkonstanten der Placebogruppe ließen keine relevanten Unterschiede erkennen.

Die an den 4 Visiten ermittelten absoluten Ratenkonstanten des Testradikals TEMPO der Placebo- und der Verumgruppe werden in Abbildung 32 und Abbildung 33 als Boxplot dargestellt, zunächst die Ratenkonstanten der Placebogruppe, anschließend der Verumgruppe.

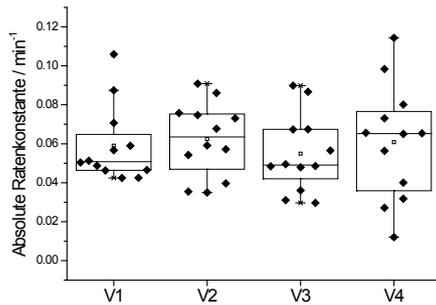


Abbildung 32:  
Absolute Ratenkonstanten der Placebogruppe  
an den Visiten 1 bis 4, \*  $p \leq 0,05$

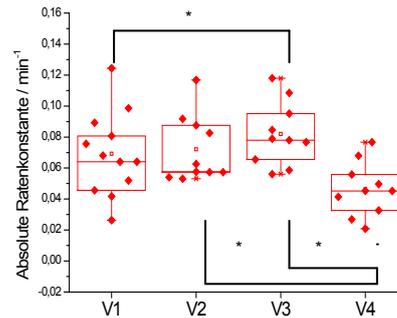


Abbildung 33:  
Absolute Ratenkonstanten der Verumgruppe  
der Visiten 1 bis 4, \*  $p \leq 0,05$

Bei der Ermittlung der ESR-Ratenkonstanten zeigte sich in der Verumgruppe eine Erhöhung bei Visite 2, wenn auch noch nicht signifikant unterschiedlich zu Visite 1. Jedoch an Visite 3, d.h. acht Wochen nach Beginn der täglichen Wirkstoffeinnahme, wurde eine signifikante Erhöhung der Ratenkonstanten im Vergleich zu den Ausgangswerten beobachtet.

Nach achtwöchiger Carotinoideinnahme waren daher die radikalfangenden Eigenschaften in der Verumgruppe signifikant um 48% erhöht. Außerdem zeigten die Abschlussvisite V4 signifikant niedrige Werte als bei V2 und V3.

In der Abbildung 34 wurden Verum- und Placebogruppe vergleichend als Boxplot dargestellt, wobei die Ratenkonstanten auf 1 normiert wurden.

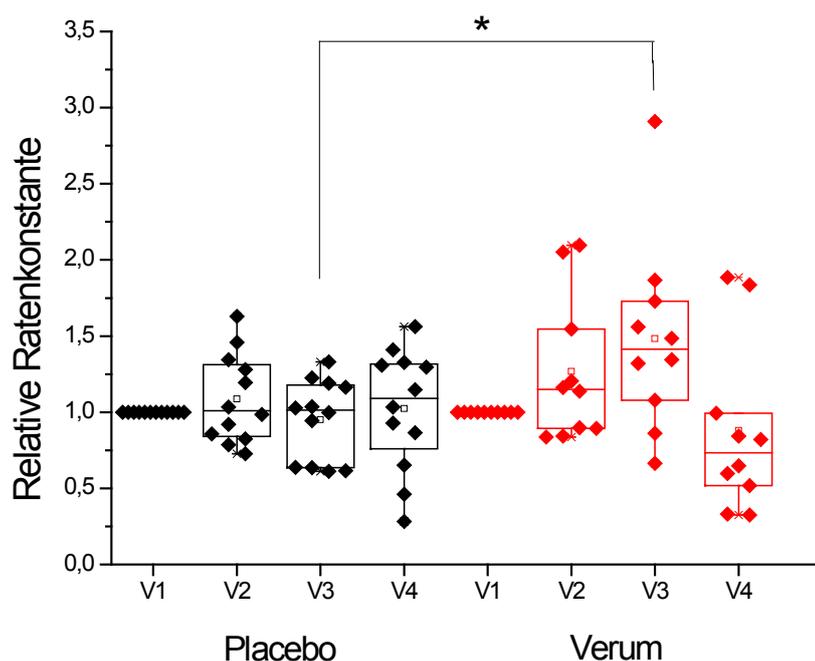


Abbildung 34: Relative Ratenkonstanten bezogen auf ihre Ausgangswerte als ein Maß für die antioxidative Kapazität der Haut Placebo und Verum an den Visiten 1 bis 4, \*  $p \leq 0,05$

Während sich in der Placebogruppe keine signifikanten Änderungen zeigten, kam es in der Verumgruppe ab Visite 3 zu einem signifikanten Anstieg der Ratenkonstanten. Die Abbildung zeigt, dass sich die Ratenkonstanten von Placebo und Verum nach 8 Wochen Einnahme signifikant unterscheiden.

Diese Erhöhung trat auf, obwohl das Testradikal TEMPO nicht direkt mit den Antioxidantien im Prüfpräparat reagiert.

#### 4.4 Bestimmung der Radikalschutzfunktion der Haut

Als nächstes sollte ein möglicher Radikalschutz gegenüber strahlungsinduzierten Radikalen untersucht werden. Hierzu wurde 10 min lang mit sichtbarem und infrarotnahem Licht bestrahlt und die Radikalwirkung bzw. die Änderung der Radikalwirkung bestimmt. Die zu beantwortende Frage war, ob nach Einnahme

eines natürlichen carotinoidreichen Extraktes eine cutane Radikalprotektion gegenüber bestrahlungsinduzierten Radikalen beobachtet wurde. Die Differenzen aus unbestrahlter und bestrahlter Messung erlauben eine Aussage über die Änderung der Radikalwirkung zwischen beiden Messungen.

In Abbildung 35 ist die Änderung der Radikalproduktion an allen vier Visiten nach 10 min Bestrahlung mit Vis/NIR als Boxplot dargestellt.

In der ersten Visite zeigte sich in der Placebogruppe nach einer Bestrahlungsdauer von 10 min mit Vis/NIR eine geringere Radikalbildung als in der Verumgruppe; dieser Unterschied war nicht signifikant.

An Visite 2, d.h. nach vierwöchiger Carotinoideinnahme, zeigten nach 10minütiger Bestrahlung mit Vis/NIR die Mediane beider Gruppen gleiche Werte, da die Verumgruppe im Vergleich zur Visite 1 abfiel.

Erst bei Visite 3 d.h. nach achtwöchiger Einnahme der Carotinoide waren die Differenzen aus unbestrahlter und bestrahlter Messung und damit die Radikalbildung in der Verumgruppe nach einer Bestrahlungsdauer von 10 min signifikant vermindert gegenüber der Kontrollgruppe. Zu diesem Zeitpunkt war bei der Verumgruppe eine verstärkte cutane Radikalprotektion gegenüber bestrahlungsinduzierten Radikalen zu beobachten.

In der vierten Kontrollvisite, nach 12 Wochen Einnahmepause, zeigten sich keine signifikanten Änderungen zwischen der Verum- und der Placebogruppe.

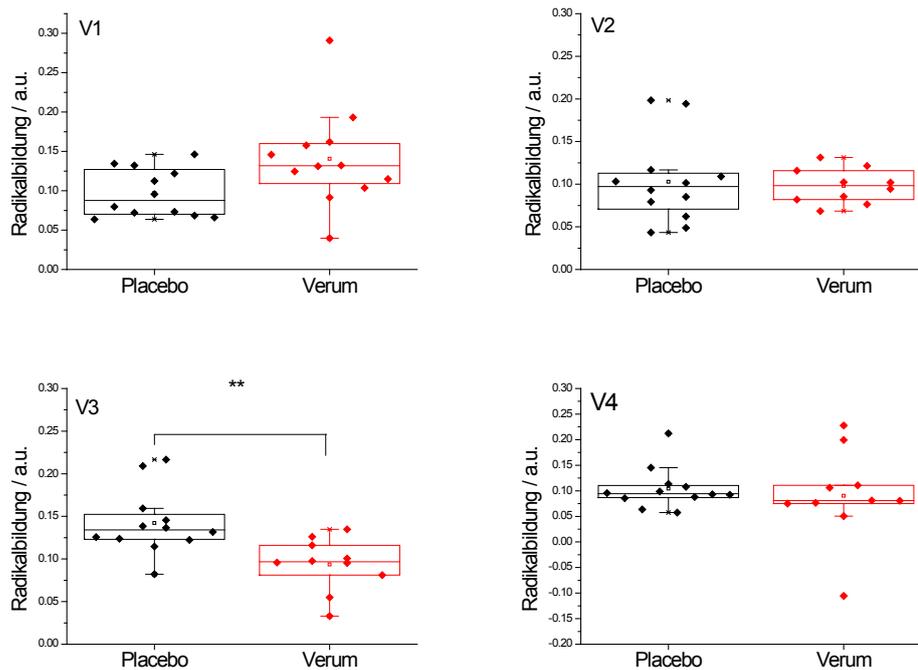


Abbildung 35: Radikalbildung über die Zeit Verum und Placebo V1-V4 nach 10 min Bestrahlung mit Vis/NIR ( $72\text{J}/\text{cm}^2$ ),  $** p \leq 0,01$

- A) V1:  $n=24$
- B) V2:  $n=22$
- C) V3:  $n=22$
- D) V4:  $n=22$

Es zeigte sich, dass bei Visite 3 die cutane Radikalwirkung während der Bestrahlung in der Verumgruppe vermindert ist. D.h. nach achtwöchiger Einnahme war nach zehnmütiger Bestrahlungsdauer mit Vis/NIR die Radikalbildung in der Verumgruppe um 34 % geringer als in der Placebogruppe.

#### 4.5 Bestimmung des Lipidprofils der Haut

Untersucht werden sollte, welchen Einfluss die Einnahme von natürlichen Carotinoiden auf das Lipidprofil der Haut und die Barrierefunktion der Haut hat.

Extrahiert und analysiert wurden, nachfolgend dargestellt, die Ceramide 1-9, und zwar Cer [OS], Cer [NS], Cer [OP], Cer [NP], Cer [OH], Cer [NH] / Cer [AS], Cer [NH], Cer [AP], Cer [AH] sowie Cholesterin und freie Fettsäuren.

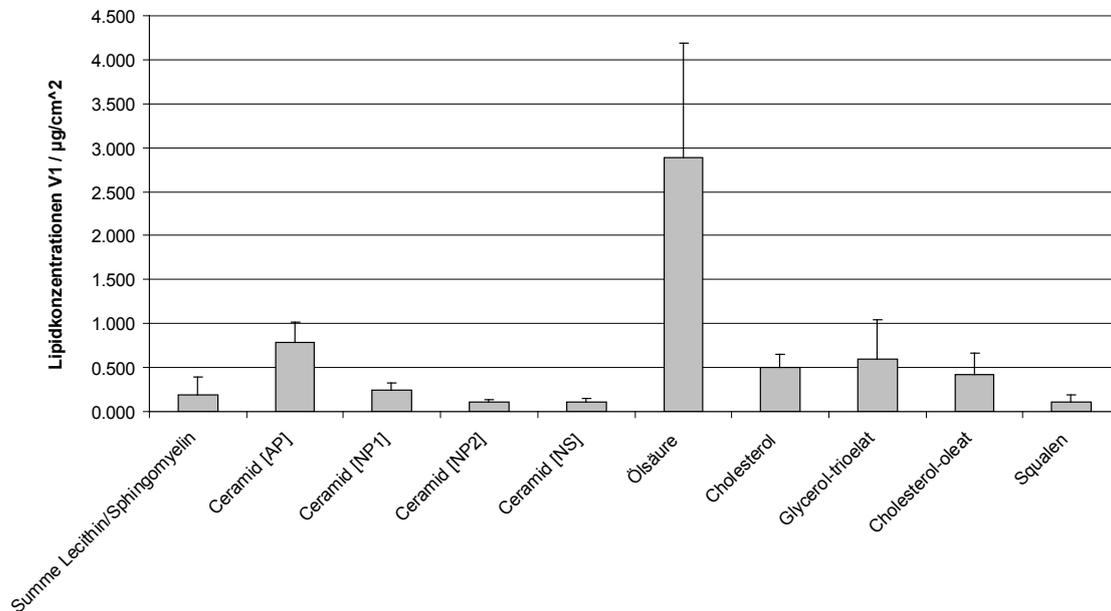


Abbildung 36: Bestimmung der Ausgangs-Lipidfraktionen an (Visite 1) an unbehandelter Haut

Generell wurden nach achtwöchiger Einnahme des carotinoidreichen Extraktes d.h. an Visite 3 keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verum- und der Placebogruppe festgestellt. Signifikante Anstiege zeigten sich zwischen der Verum- gegenüber der Placebogruppe nur bei den Ceramiden [NS]. Leichte nichtsignifikante Anstiege wurden in der Verum- gegenüber der Placebogruppe beobachtet bei den Ceramiden [NP2] und bei Cholesterin, dargestellt in Abbildung 39.

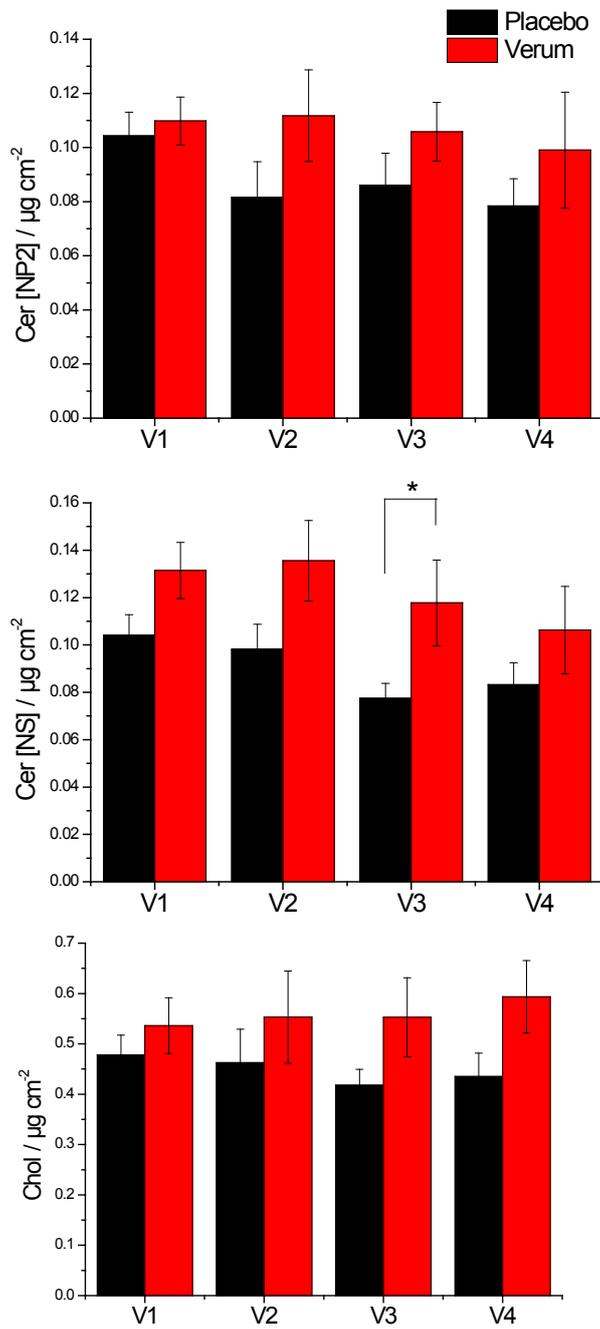


Abbildung 37: Ergebnisse der Lipidextraktionen der Verum- und Placebogruppe an 4 Visiten Placebo und Verum, \*  $p \leq 0,05$

## 5 Diskussion

### 5.1 Fehlerdiskussion

Der Fehler bei den Doppelmessungen am ESR-Gerät könnte durch folgende Punkte bedingt sein:

- 1) Beim Auftragen des Markers auf die Filterpapierscheiben könnte etwas heruntergelaufen sein, was einen Verlust von Marker zur Folge hätte.
- 2) Die Penetration des Markers ist von der Barrierewirkung der jeweiligen Haut abhängig und führt damit zu unterschiedlichen Ausgangswerten. Daher wurden nur Werte von  $0,1 \pm 25\%$  zugelassen. Um die dennoch nicht vermeidbaren Schwankungen um 0,1 a.u. zu korrigieren, wurde auf den Ausgangswert normiert.
- 3) Erschütterungen bei der ESR-Messung während des Messvorganges führen zu Artefakten. Solche Spektren wurden bei der Auswertung entfernt, kleine Störungen können aber übersehen worden sein.
- 4) Bei der Bestrahlung ist zu beachten, dass die Lichtleitfaser nicht komplett senkrecht auf das Zentrum der Leiterschleife und damit den zu bestrahlenden Hautpunkt gerichtet werden kann, sondern in einem minimalen Winkel abweicht. Die Ursache liegt in der Konstruktion der Anordnung. Es ist aber möglich, diese kleine Abweichung bereits beim Einlegen des Arms und Ausrichten des Messpunktes in die Mitte der Leiterschleife des ESR-Geräts vorausschauend zu berücksichtigen und dadurch im Vorfeld zu beheben. Außerdem tritt das Licht divergent aus, sodass ein gewisser Verlust unvermeidbar ist.
- 5) Der Arm der Probanden wurde relativ fest in die Vorrichtung eingespannt, um die Messungen durchführen zu können. Jedoch wird der Andruck des Armes sich doch von Proband zu Proband leicht unterscheiden
- 6) Ebenso ist die Peak-to-Peak-Auswertung der Spektren insofern fehlerbehaftet, als dass die Auswertung mit bloßem Auge erfolgt.

Bei der Nutzung des Raman-Spektrometers ist zu beachten, dass die Leistung des Gerätes mit zunehmender Anzahl der Betriebsstunden abnimmt. Dieser Fehler kann vernachlässigt werden, weil vor jeder Messung die Leistung des Lasers mit einem kalibrierten Leistungsmessgerät bestimmt wurde.

Weiterhin ist zu beachten, dass einerseits immer an einem exemplarischen Messpunkt gemessen wurde; die Haut jedoch in sich inhomogen sein kann und damit die Verteilung der Carotinoide ebenso inhomogen sein kann.

Bei der Lipidextraktion ist es wichtig, das Zentrifugenröhrchen ganz vorsichtig zu schwenken, da aufgrund der natürlichen Rundung des Arms leicht Extraktorflüssigkeit herauslaufen kann. Dies konnte nicht immer verhindert werden.

### **5.2 Cutane Carotinoide**

Die Ausgangswerte der cutanen Carotinoidwerte aller 24 Probanden lagen an Visite 1 im Mittel bei  $4,56 \cdot 10^{-4} \pm 1,78 \cdot 10^{-4}$  willkürlichen Einheiten.

Dieser Wert liegt unter, aber noch im Fehlerbereich, dem Durchschnittswert von  $5,36 \cdot 10^{-4} \pm 1,81 \cdot 10^{-4}$  willkürlichen Einheiten, wie in Meinke et al. bei einer Studie, an der 160 gesunde freiwillige Probanden teilnahmen, gezeigt wurde. [53]

Der niedrigere Ausgangswert dieser Studie erklärt sich durch den höheren Anteil der rauchenden Probanden (37,68% im Gegensatz zu 17,6%) und den höheren Anteil der männlichen Probanden (54% im Gegensatz zu 41%), dargestellt in Tabelle 5. In der Literatur wird berichtet, dass die Carotinoidwerte bei Männern in der Regel niedriger sind als bei Frauen. Ebenso sind sie bei Rauchern im Durchschnitt um etwa 20% geringer als bei Nichtrauchern. [45]

In dieser Studie lag der Anteil an rauchenden Probanden bei 37,68%. Die Ausgangswerte der Raucher waren um 38% niedriger als die der Nichtraucher; die Ausgangswerte der Frauen lagen um 6% über denen der Männer.

Die tägliche Einnahme des antioxidantienreichen Extraktes mit 4,45 mg Carotinoiden führte zu einer Anreicherung von Carotinoiden in der Haut, was für eine gute Bioverfügbarkeit spricht. Der Anstieg nach einer Einnahme des Extraktes nach 8 Wochen auf einen Absolutwert von 6.91 willkürlichen Einheiten ist vergleichbar mit Werten, die nach vierwöchiger Einnahme von täglich 9 mg eines vergleichbaren Extraktes gemessen wurden. [4] *In der vorliegenden Studie stiegen die cutanen Carotinoidwerte auch nach vierwöchiger Einnahme weiter an.* Das lässt den Schluss zu, dass bei länger andauernder Nahrungsergänzung eine geringere bis moderate Dosierung zu empfehlen ist.

2010 konnte durch Meinke et al. nachgewiesen werden, dass oral aufgenommene Carotinoide nicht sofort, sondern mit einer gewissen Verzögerung in der Haut sichtbar und messbar sind. [4] Nach Beendigung der Carotinoideaufnahme fallen die cutanen Carotinoidkonzentrationen auch nicht unmittelbar, sondern ebenfalls mit einer Verzögerung wieder ab, bilden ein gewisses antioxidatives Reservoir. [4]

Aus Studien mit der Einnahme von synthetischen Carotinoiden ist bekannt, dass die Carotinoide gut in die Haut aufgenommen werden und frühzeitige UV-induzierte Hautschäden reduzieren können. [32]

In einer Studie mit Verabreichung von wasserlöslichem Vitamin C konnten bei moderater täglicher Vitamin C-Gabe auch mittels in vivo ESR-Spektroskopie von 100 bzw. 180 mg Calciumascorbat bereits nach 2 Wochen maximale Konzentrationen in der Haut gemessen werden. [44] Vitamin C hat andere Transportwege. Es wird nach oraler Aufnahme fast vollständig über den Darm ins Blut aufgenommen, gelangt anschließend über transmembrane Transportproteine in die Zellen der Zielorgane. Diese Carrierproteine für Ascorbinsäure funktionieren über einen natrium-abhängigen Symport. Ein zweiter Transportmechanismus für die oxidierte Zwischenstufe Dehydroascorbinsäure ist der Antiport über

Glukose-Transporter. [54, 55] Die hier verabreichten Carotinoide haben eine sehr gute Bioverfügbarkeit. Im Gegensatz zu Vitamin C gelangen Carotinoide im Wesentlichen über die Schweißdrüsen und Talgdrüsen an die Hautoberfläche, um dann anschließend wieder in das *Stratum corneum* zurück zu penetrieren. [28]. Dies erklärt die verzögerte Erhöhung der Carotinoide in der Haut gegenüber der Vitamin C Anreicherung.

Der menschliche Organismus sichert auf ausgeklügelte Weise ein Gleichgewicht zwischen freien Radikalen und Antioxidantien. Dabei ist die Frage natürlich versus synthetisch hergestellte Antioxidantien nicht leicht zu beantworten. Angenommen wird, dass Antioxidantien, speziell Carotinoiden in ihrer natürlichen Matrix und ihrer natürlichen Kombination untereinander der Vorzug zu geben ist. [56, 57] In den Pflanzen, in denen Carotinoide vorkommen, übernehmen sie für diese ebenfalls antioxidative und immunologische Funktionen wie beispielsweise Schutz vor Infektionen oder Schutz vor Sonnenlicht.

### **5.3 Antioxidatives Schutzsystem der Haut und Carotinoide im Netzwerk**

Es lassen sich Carotinoide mit der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie nicht direkt nachweisen, da das Testradikal TEMPO sehr wohl mit hydrophilen Antioxidantien wie Vitamin C oder Glutathion, nicht jedoch direkt mit den lipophilen Carotinoiden reagiert. *Dennoch konnte bei dieser Studie gezeigt werden, dass das Testradikal TEMPO in der Verumgruppe schneller abreagiert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das antioxidative Schutzsystem der Haut insgesamt nach der Carotinoideaufnahme gestärkt wird.*

Bereits gezeigt wurde mit der *in vivo*-ESR-Spektroskopie, dass die Verabreichung eines wasserlöslichen Apfelbeerenextraktes (*Aronia melanocarpa*) und von

Vitamin C den antioxidativen Status der Haut tatsächlich verbessern kann [10], allerdings erhöhten sich die Carotinoide in dem Beobachtungszeitraum nicht.

Wenn Carotinoide mit anderen Antioxidantien im Netzwerk agieren, dann lässt der Nachweis eines Carotinoids oder Vitamins Rückschlüsse auf das Vorhandensein und die Funktion des gesamten antioxidativen Netzwerks zu. Dies ist im Einklang mit vorangegangenen Untersuchungen, die gezeigt haben, dass die mittels der resonanten Ramanspektroskopie bestimmten Carotinoide mit der Ratenkonstante korrelieren [6]. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Carotinoide als Markersubstanz für das gesamte antioxidative Netzwerk angesehen werden können.

Darvin et al. verglichen verschiedene Kombinationen von systemischer Gabe von Antioxidantien in Form von Tabletten und topischer Applikation von antioxidantienreichen Cremes mit und ohne Carotinoide. Nach achtwöchiger Applikation von antioxidantienreicher *Creme ohne Carotinode kam es dennoch zu einer Erhöhung der cutanen Carotinoide*. Die systemisch eingenommenen Carotinoide waren deutlich länger in der Haut nachweisbar. Die Carotinoid-Level nach topischer Applikation blieben etwa noch 2 Wochen nach Applikation bestehen; die Carotinoid-Level nach systemischer Gabe noch bis zu 5 Wochen. Vermutlich werden die systemisch verabreichten Carotinoide im Unterhautfettgewebe gespeichert und anschließend langsam über Schweiß und Sebum an die Hautoberfläche abgegeben. [5, 6]

Desweiteren verglichen Blume et al. die Lycopinlevel bei Probanden, die mit Lycopin substituiert wurden mit einer Placebogruppe; beide Gruppen erhielten eine lycopinarme Ernährung, gemessen wurden die Konzentrationen in der Haut und im Plasma. Es zeigten sich neben den erhöhten Lycopinleveln im Plasma und in der Haut, die bei 512 nm gemessen wurden, *auch erhöhte Werte von Beta-Carotin*, gemessen bei 488 nm, bei den mit Lycopin substituierten Probanden. Dies bedeute, so Blume, dass „der Anstieg des Lycopins in der Haut die Erhöhung des Beta-Carotins in der Haut stimuliert haben könnte.“ [43]

Carotinoide übernehmen auch für die Pflanze, in der sie natürlicherweise vorkommen, ebenfalls antioxidative z.B. photoprotektive Aufgaben.

Des Weiteren scheint eine natürliche moderate Dosierung ausreichend zu sein.

#### **5.4 Schutz vor Radikalbildung im Vergleich mit anderen Studien**

In der vorliegenden Studie hat sich gezeigt, dass die systemische Einnahme von Antioxidantien nicht nur zu einer erhöhten Ratenkonstante, sondern zusätzlich zu einem Zeitpunkt (Visite 3, nach zehnminütiger Bestrahlung mit Vis/NIR) zu einem signifikanten Schutz vor Radikalbildung geführt hat. Dies konnte in anderen Studien ebenfalls beobachtet werden. So wurde nach vorangegangener Antioxidantieneinnahme eine geringere Erythembildung nach UV-Bestrahlung beobachtet. [58, 59]

Nach topischer Aufnahme der Carotinoide durch Eincremen der Unterarme mit einer antioxidantienreichen Hyperforin-Lotion konnte durch Arndt et al. beobachtet werden, dass durch das Eincremen tatsächlich ein Schutz vor strahlungsinduzierter Radikalbildung erzielt werden konnte, wobei auch schon das Eincremen mit einer Placebocreme gegenüber dem Nichteincremen einen Schutz bewirkte. [60]

Studien, in denen Antioxidantien ebenfalls topisch appliziert wurden, zeigten ebenfalls eine geringe Radikalbildung während Vis/NIR-Bestrahlung. [42, 61]

## **5.5 Analyse der Hautlipide**

Die Analyse der Hautlipide erbrachte keine signifikanten Verbesserungen zwischen der Verumgruppe und der Placebogruppe. Allenfalls den signifikanten Anstieg eines Ceramids (Cer 2 NS) und den leichten Anstieg des Cholesterols in der Verumgruppe könnte man allenfalls als leichte Verbesserung der Hautbarriere auffassen.

Denkbar wäre auch eine Gegenreaktion gewesen, etwa dass die Lipide bei erhöhtem Stress mit einer Regeneration der Hautbarriere im Sinne einer Erhöhung der Lipide reagieren. Das war jedoch nicht der Fall. Möglicherweise sind Lipidveränderungen eher bei gestörter Hautbarriere wie z.B. bei Patienten mit Neurodermitis zu erwarten.

Für die Barrierefunktion der Haut kommt den *Stratum-corneum*-Lipiden die zentrale Bedeutung zu, besonders den langkettigen Ceramiden 1 und 3. Neurodermitis-Patienten zeigen geringere Konzentrationen an *Stratum-corneum*-Lipiden. Vor allem die Ceramid-Vorstufe Sphinganin ist erniedrigt, [17] was die Hautbarriere in der Folge brüchig und wasserdurchlässig macht und zur Austrocknung der Haut führt. Außerdem zeigen 30-50 % der Neurodermitis-Patienten eine Filaggrin-Mutation. [25, 62]

## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die doppelblinde placebokontrollierte Studie zur Untersuchung des Einflusses eines natürlichen antioxidantienreichen Supplements zeigte eine langsame, aber deutliche Aufnahme in die menschliche Haut. Durch diese Anreicherung wurden die radikalfangenden Eigenschaften der Haut verbessert und auch ein gewisser Schutz vor Radikalbildung erreicht. Auf die Hautlipide hatte die Aufnahme des antioxidantienreichen Extraktes insgesamt keinen signifikanten Einfluss.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Ernährung, reich an verschiedenen natürlichen Carotinoiden, den Hautschutz gegenüber freien Radikalen verbessern und damit einen Schutz bieten kann vor vorzeitiger Hautalterung und radikalassozierten Hauterkrankungen. Gleiches gilt für carotinoidhaltige Nahrungsergänzungsmittel in physiologischer Konzentration. Sie entfalten ebenso eine schützende Wirkung in der Haut. Bei Langzeitanwendung ist es vor allem ratsam, nicht zu hoch zu dosieren. Außerdem ist es wichtig zu beachten, dass Carotinoide, wenn sie in ihrer natürlichen Matrix verbleiben, die beste Wirkung entfalten können, da sie sich im Netzwerk gegenseitig Schutz bieten können.

Die größte Bedeutung hat eine natürliche antioxidantienreiche Ernährung, was bedeutet reich an Gemüse und Früchten. Sollte aus den unterschiedlichsten Gründen eine Supplementation mit natürlichen Carotinoiden erforderlich sein, so ist bei Langzeitdosierung anzuraten, diese niedriger zu dosieren. Dabei sollten Carotinoide nicht einzeln konsumiert werden, sondern immer in ihrer natürlichen biologischen Matrix belassen werden.

Diese Untersuchungen wurden an 22 gesunden Probanden mit gesunder Haut durchgeführt. Ein nächster Schritt könnte sein, diese Untersuchungen an Patienten mit gestörter Hautbarriere z.B. Atopikern durchzuführen.

Auch wäre es interessant zu erfahren, ob Carotinoide in physiologischer Dosierung eine Wirkung auf ganz konkrete Krankheitsbilder aufweisen, wie z.B.

in Bezug auf chronische Entzündungen oder auf die Entstehung von Hautkrebs. Denkbar wäre eine präventive Wirkung; es wurde aber auch von einer höheren Mortalität bei hoch dosierter Supplementation, insbesondere bei Einzelsubstanzen, berichtet.

## 7 Zusammenfassung

In der Arbeit wurden die Bioverfügbarkeit und die antioxidative Wirkung von oral eingenommenen Carotinoiden auf die Haut untersucht. Hierfür kamen verschiedene spektroskopische Methoden zur Anwendung. Es wurde eine doppelt verblindete, placebokontrollierte Studie an 22 Probanden über 20 Wochen durchgeführt. Resonante Raman-Untersuchungen haben gezeigt, dass die natürlichen Carotinoide gut in der Haut bioverfügbar sind. Die Aufnahme erfolgte langsam, daher ist bei längerer Einnahme eine niedrige Dosis zu empfehlen.

Ziel dieser Arbeit war es, eine *In-vivo*-Methode zur Untersuchung der antioxidativen Schutzwirkung natürlich vorkommender Antioxidantien vor Radikalbildung durch sichtbare und infrarotnahe (Vis/NIR) Bestrahlung zu entwickeln. Mit Hilfe nichtinvasiver Methoden sollten folgende Fragen geklärt werden:

Sind natürliche Carotinoide in der Dosierung bioverfügbar und ihre Konzentrationen in der Haut messbar?

Wirkt sich die Gabe von Carotinoiden auf das gesamte antioxidative Potential aus? Ist dies messbar mit der Elektronenspinresonanz- (ESR) Spektroskopie?

Können Antioxidantien vor Radikalbildung durch externen Stress, beispielsweise induziert durch sichtbare und infrarotnahe (Vis/NIR) Strahlung, schützen?

Hat die Carotinoidzufuhr einen Einfluss auf das Lipidprofil der Haut und die Hautbarriere?

In der Ramanspektroskopie war gut sichtbar, dass die Carotinoide gut in die Haut aufgenommen werden. Signifikante Anstiege der cutanen Carotinoidkonzentrationen zeigten sich selbst bei moderater Dosierung.

Die Anreicherung der Haut mit Carotinoiden erhöhte die radikalfangenden Eigenschaften der Haut. Da das Testradikal TEMPO sehr wohl mit Vitamin C, nicht jedoch direkt mit den cutanen Carotinoiden reagiert, zeigt dieses Ergebnis, dass Carotinoide ihre Wirkung im Zusammenspiel mit den anderen Bestandteilen des antioxidativen Netzwerks entfalten und dieses insgesamt stärken. Diese Untersuchungen bestätigen, dass Carotinoide als Markersubstanzen angesehen werden können.

In Bezug auf Schutz vor Radikalbildung bei externem Stress zeigte sich in der vorliegenden Arbeit erstmalig, dass Antioxidantien wie z.B. die im Grünkohlextrakt enthaltenen Antioxidantien in der Lage sind, Radikale abzufangen bzw. dazu führen können, dass die Radikalbildung unter Stresseinwirkung kleiner ist. Somit können Antioxidantien einer frühzeitigen Hautalterung und radikalinduzierten (Haut)-krankheiten vorbeugen. Der Nachweis erfolgte mittels ESR-Spektroskopie unter Bestrahlung im sichtbaren und nahinfraroten Bereich.

Es konnte eine Methode zur Messung der Hautlipide an gesunden Probanden etabliert werden. Allerdings war der Einfluss bei den untersuchten Probanden auf die Hautlipide eher gering. Es zeigte sich lediglich ein Anstieg des Ceramids (NS) in der Verumgruppe. Hier sind weitere Untersuchungen an Probanden mit z.B. Barrierestörungen durchzuführen.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] N.S. Dhalla, R.M. Temsah, T. Netticadan, Role of oxidative stress in cardiovascular diseases, *J Hypertens*, 18 (2000) 655-673.
- [2] C.S. Sander, H. Chang, F. Hamm, P. Elsner, J.J. Thiele, Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis, *Int J Dermatol*, 43 (2004) 326-335.
- [3] J. Lademann, A. Patzelt, S. Schanzer, H. Richter, M.C. Meinke, W. Sterry, L. Zastrow, O. Doucet, T. Vergou, M.E. Darvin, Uptake of antioxidants by natural nutrition and supplementation: pros and cons from the dermatological point of view, *Skin Pharmacol Physiol*, 24 (2011) 269-273.
- [4] M.C. Meinke, M.E. Darvin, H. Vollert, J. Lademann, Bioavailability of natural carotenoids in human skin compared to blood, *Eur J Pharm Biopharm*, 76 (2010) 269-274.
- [5] M.E. Darvin, J.W. Fluhr, S. Schanzer, H. Richter, A. Patzelt, M.C. Meinke, L. Zastrow, K. Golz, O. Doucet, W. Sterry, J. Lademann, Dermal carotenoid level and kinetics after topical and systemic administration of antioxidants: enrichment strategies in a controlled in vivo study, *J Dermatol Sci*, 64 (2011) 53-58.
- [6] S.F. Haag, B. Taskoparan, M.E. Darvin, N. Groth, J. Lademann, W. Sterry, M.C. Meinke, Determination of the antioxidative capacity of the skin in vivo using resonance Raman and electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Experimental Dermatology*, 20 (2011) 483-487.
- [7] W. Stahl, U. Heinrich, H. Jungmann, H. Sies, H. Tronnier, Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans, *Am J Clin Nutr*, 71 (2000) 795-798.
- [8] W. Stahl, U. Heinrich, H. Jungmann, H. Tronnier, H. Sies, Carotenoids in human skin: noninvasive measurement and identification of dermal carotenoids and carotenol esters, *Methods Enzymol*, 319 (2000) 494-502.
- [9] J. Fuchs, N. Groth, T. Herrling, G. Zimmer, Electron paramagnetic resonance studies on nitroxide radical 2,2,5,5-tetramethyl-4-piperidin-1-oxyl (TEMPO) redox reactions in human skin, *Free Radical Bio Med*, 22 (1997) 967-976.
- [10] M.C. Meinke, A. Lauer, S.F. Haag, M.E. Darvin, N. Groth, J. Lademann, Cutaneous radical scavenging effects of orally administered antioxidants measured by electron paramagnetic resonance spectroscopy, *e-SPEN Journal*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnme.2012.06.001> (2012).
- [11] J.L. Cho, M. Allanson, V.E. Reeve, Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  contributes to UV radiation-induced inflammation, epidermal hyperplasia and immunosuppression in mice, *Photochem Photobiol Sci*, 11 (2012) 309-317.
- [12] V.A. Terra, F.P. Souza-Neto, R.C. Pereira, T.N. Xavier Da Silva, L.N. Ramalho, R.C. Luiz, R. Cecchini, A.L. Cecchini, Nitric oxide is responsible for oxidative skin injury and modulation of cell proliferation after 24 hours of UVB exposures, *Free Radic Res*, (2012).
- [13] J.J. Thiele, F. Hamm, C.S. Sander, P. Elsner, Melanoma, but not nonmelanoma, skin cancer exhibits an up-regulated antioxidant network and increased lipid peroxidation, *J Invest Dermatol*, 119 (2002) 218-218.
- [14] M. Fartasch, T.L. Diepgen, J. Schmitt, H. Drexler, The relationship between occupational sun exposure and non-melanoma skin cancer: clinical basics, epidemiology, occupational disease evaluation, and prevention, *Dtsch Arztebl Int*, 109 (2012) 715-720.
- [15] L. Zastrow, N. Groth, F. Klein, D. Kockott, J. Lademann, R. Renneberg, L. Ferrero, The missing link—light-induced (280-1,600 nm) free radical formation in human skin, *Skin Pharmacol Physiol*, 22 (2009) 31-44.
- [16] J.A. Bouwstra, M. Ponc, The skin barrier in healthy and diseased state, *Biochim Biophys Acta*, 1758 (2006) 2080-2095.

- [17] G. Imokawa, A. Abe, K. Jin, Y. Higaki, M. Kawashima, A. Hidano, Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin?, *J Invest Dermatol*, 96 (1991) 523-526.
- [18] H. Schaefer, J. Lademann, The role of follicular penetration. A differential view, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14 Suppl 1 (2001) 23-27.
- [19] D. Kessner, A. Ruettinger, M.A. Kiselev, S. Wartewig, R.H. Neubert, Properties of ceramides and their impact on the stratum corneum structure. Part 2: stratum corneum lipid model systems, *Skin Pharmacol Physiol*, 21 (2008) 58-74.
- [20] M. Darvin, A. Patzelt, S. Gehse, S. Schanzer, C. Benderoth, W. Sterry, J. Lademann, Cutaneous concentration of lycopene correlates significantly with the roughness of the skin, *Eur J Pharm Biopharm*, 69 (2008) 943-947.
- [21] P.M. Elias, Epidermal lipids, barrier function, and desquamation, *J Invest Dermatol*, 80 (1983) 44s-49s.
- [22] M.C. Meinke, A. Friedrich, K. Tschersch, S.F. Haag, M.E. Darvin, H. Vollert, N. Groth, J. Lademann, S. Rohn, Influence of dietary carotenoids on radical scavenging capacity of the skin and skin lipids, *Eur J Pharm Biopharm*, 84 (2013) 365-373.
- [23] P.M. Elias, Structure and function of the stratum corneum extracellular matrix, *J Invest Dermatol*, 132 (2012) 2131-2133.
- [24] K. Akimoto, N. Yoshikawa, Y. Higaki, M. Kawashima, G. Imokawa, Quantitative analysis of stratum corneum lipids in xerosis and asteatotic eczema, *J Dermatol*, 20 (1993) 1-6.
- [25] A. Di Nardo, P. Wertz, A. Giannetti, S. Seidenari, Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis, *Acta dermato-venereologica*, 78 (1998) 27-30.
- [26] J. Rogers, C. Harding, A. Mayo, J. Banks, A. Rawlings, Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons, *Arch Dermatol Res*, 288 (1996) 765-770.
- [27] H. Sies, W. Stahl, Carotenoids and UV protection, *Photochem Photobiol Sci*, 3 (2004) 749-752.
- [28] M.E. Darvin, J.W. Fluhr, P. Caspers, A. van der Pool, H. Richter, A. Patzelt, W. Sterry, J. Lademann, In vivo distribution of carotenoids in different anatomical locations of human skin: comparative assessment with two different Raman spectroscopy methods, *Experimental Dermatology*, 18 (2009) 1060-1063.
- [29] J.W. Fluhr, P. Caspers, J.A. van der Pol, H. Richter, W. Sterry, J. Lademann, M.E. Darvin, Kinetics of carotenoid distribution in human skin in vivo after exogenous stress: disinfectant and wIRA-induced carotenoid depletion recovers from outside to inside, *J Biomed Opt*, 16 (2011) 035002.
- [30] S. De Spirt, H. Sies, H. Tronnier, U. Heinrich, An encapsulated fruit and vegetable juice concentrate increases skin microcirculation in healthy women, *Skin Pharmacol Physiol*, 25 (2012) 2-8.
- [31] B. Watzl, S.E. Kulling, J. Moseneder, S.W. Barth, A. Bub, A 4-wk intervention with high intake of carotenoid-rich vegetables and fruit reduces plasma C-reactive protein in healthy, nonsmoking men, *Am J Clin Nutr*, 82 (2005) 1052-1058.
- [32] D. Bouilly-Gauthier, C. Jeannes, Y. Maubert, L. Duteil, C. Queille-Roussel, N. Piccardi, C. Montastier, P. Manissier, G. Pierard, J.P. Ortonne, Clinical evidence of benefits of a dietary supplement containing probiotic and carotenoids on ultraviolet-induced skin damage, *Br J Dermatol*, 163 (2010) 536-543.
- [33] D.R. Bickers, M. Athar, Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease, *J Invest Dermatol*, 126 (2006) 2565-2575.
- [34] L.J. Marnett, Oxyradicals and DNA damage, *Carcinogenesis*, 21 (2000) 361-370.
- [35] C.S. Sander, H. Chang, F. Hamm, P. Elsner, J.J. Thiele, Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis, *Int J Dermatol*, 43 (2004) 326-335.

- [36] F. Giacco, M. Brownlee, Oxidative stress and diabetic complications, *Circ Res*, 107 (2010) 1058-1070.
- [37] B. Halliwell, Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?, *J Neurochem*, 97 (2006) 1634-1658.
- [38] M.S. Motherwell, L. Zuo, The novel role of mitochondrial induced oxidative stress and genetic mutations in Parkinson's disease, *Gene*, (2013).
- [39] L.M. Sayre, M.A. Smith, G. Perry, Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease, *Curr Med Chem*, 8 (2001) 721-738.
- [40] A.A. Woodall, S.W. Lee, R.J. Weesie, M.J. Jackson, G. Britton, Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity, *Biochim Biophys Acta*, 1336 (1997) 33-42.
- [41] S.F. Haag, A. Bechtel, M.E. Darvin, F. Klein, N. Groth, M. Schafer-Korting, R. Bittl, J. Lademann, W. Sterry, M.C. Meinke, Comparative study of carotenoids, catalase and radical formation in human and animal skin, *Skin Pharmacol Physiol*, 23 (2010) 306-312.
- [42] M.C. Meinke, S.F. Haag, S. Schanzer, N. Groth, I. Gersonde, J. Lademann, Radical protection by sunscreens in the infrared spectral range, *Photochem Photobiol*, 87 (2011) 452-456.
- [43] U. Blume-Peytavi, A. Rolland, M.E. Darvin, A. Constable, I. Pineau, C. Voit, K. Zappel, G. Schaefer-Hesterberg, M. Meinke, R.L. Clavez, W. Sterry, J. Lademann, Cutaneous lycopene and beta-carotene levels measured by resonance Raman spectroscopy: High reliability and sensitivity to oral lactycopene deprivation and supplementation, *Eur J Pharm Biopharm*, 73 (2009) 187-194.
- [44] A.C. Lauer, N. Groth, S.F. Haag, M.E. Darvin, J. Lademann, M.C. Meinke, Dose-dependent vitamin C uptake and radical scavenging activity in human skin measured with in vivo electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Skin Pharmacol Physiol*, 26 (2013) 147-154.
- [45] S.T. Mayne, B. Cartmel, S. Scarmo, H.Q. Lin, D.J. Leffell, E. Welch, I. Ermakov, P. Bhosale, P.S. Bernstein, W. Gellermann, Noninvasive assessment of dermal carotenoids as a biomarker of fruit and vegetable intake, *Am J Clin Nutr*, 92 (2010) 794-800.
- [46] M.E. Darvin, I. Gersonde, H. Albrecht, M. Meinke, W. Sterry, J. Lademann, Non-invasive in vivo detection of the carotenoid antioxidant substance lycopene in the human skin using the resonance Raman spectroscopy, *Laser Phys Lett*, 3 (2006) 460-463.
- [47] J. Fuchs, N. Groth, T. Herrling, In vivo measurement of oxidative stress status in human skin, *Method Enzymol*, 352 (2002) 333-339.
- [48] T. Herrling, J. Fuchs, J. Rehberg, N. Groth, UV-induced free radicals in the skin detected by ESR spectroscopy and imaging using nitroxides, *Free Radic Biol Med*, 35 (2003) 59-67.
- [49] J. Fuchs, N. Groth, T. Herrling, Cutaneous tolerance to nitroxide free radicals and nitron spin traps in the guinea pig, *Toxicology*, 126 (1998) 33-40.
- [50] H. Farwanah, R. Neubert, S. Zellmer, K. Raith, Improved procedure for the separation of major stratum corneum lipids by means of automated multiple development thin-layer chromatography, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 780 (2002) 443-450.
- [51] I. Schellenberg, K. Kabrodt, Optimierung einer AMD 2-Methode zur Bestimmung von Stratum corneum-Lipiden, *CAMAG Bibliography Service*, 105 (2010) 10-12.
- [52] F. Bonte, P. Pinguet, J.M. Chevalier, A. Meybeck, Analysis of all stratum corneum lipids by automated multiple development high-performance thin-layer chromatography, *J Chromatogr B Biomed Appl*, 664 (1995) 311-316.
- [53] M.C. Meinke, A. Lauer, B. Taskoparan, I. Gersonde, W. Sterry, J. Lademann, M.E. Darvin, Influence on the Carotenoid Levels of Skin Arising from Age, Gender, Body Mass Index in Smoking/Non-Smoking Individuals, *Free Rad. Antiox.*, 1 (2011) 6.
- [54] J. Mandl, A. Szarka, G. Banhegyi, Vitamin C: update on physiology and pharmacology, *Brit J Pharmacol*, 157 (2009) 1097-1110.

- [55] H. Steiling, K. Longet, A. Moodycliffe, R. Mansourian, E. Bertschy, H. Smola, C. Mauch, G. Williamson, Sodium-dependent vitamin C transporter isoforms in skin: Distribution, kinetics, and effect of UVB-induced oxidative stress, *Free Radical Bio Med*, 43 (2007) 752-762.
- [56] J. Lademann, S. Schanzer, M. Meinke, W. Sterry, M.E. Darvin, Interaction between carotenoids and free radicals in human skin, *Skin Pharmacol Physiol*, 24 (2011) 238-244.
- [57] M. Darvin, L. Zastrow, W. Sterry, J. Lademann, Effect of supplemented and topically applied antioxidant substances on human tissue, *Skin Pharmacol Physiol*, 19 (2006) 238-247.
- [58] S. Alaluf, U. Heinrich, W. Stahl, H. Tronnier, S. Wiseman, Dietary carotenoids contribute to normal human skin color and UV photosensitivity, *J Nutr*, 132 (2002) 399-403.
- [59] U. Heinrich, C. Gartner, M. Wiebusch, O. Eichler, H. Sies, H. Tronnier, W. Stahl, Supplementation with beta-carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema, *J Nutr*, 133 (2003) 98-101.
- [60] S. Arndt, S.F. Haag, A. Kleemann, J. Lademann, M.C. Meinke, Radical protection in the visible and infrared by a hyperforin-rich cream--in vivo versus ex vivo methods, *Exp Dermatol*, 22 (2013) 354-357.
- [61] M.C. Meinke, S. Schanzer, S.F. Haag, F. Casetti, M.L. Muller, U. Wolffe, A. Kleemann, J. Lademann, C.M. Schempp, In vivo photoprotective and anti-inflammatory effect of hyperforin is associated with high antioxidant activity in vitro and ex vivo, *Eur J Pharm Biopharm*, 81 (2012) 346-350.
- [62] J.M. Jungersted, T. Agner, Eczema and ceramides: an update, *Contact Dermatitis*, 69 (2013) 65-71.

## 9 Anhang: Fragebögen

### Fragebogen zur Ernährung und Lebensgewohnheiten

Bitte beantworten Sie den folgenden Fragebogen wahrheitsgemäß. Die Auswertung der Daten erfolgt ausschließlich im Rahmen der Studie. Keine der von Ihnen gemachten Angaben wird in Bezug zu Ihrem Namen veröffentlicht. Wenn Sie meinen, zu einer Frage gibt es keine passende Antwortmöglichkeit, nehmen Sie die Antwort, die am ehesten zutrifft.

1. Welche Probandennummer haben Sie?  
(bitte hier eintragen)\_\_\_\_\_
2. Wann sind Sie geboren? Geben Sie bitte Monat und Jahr an.  
Monat:\_\_\_\_\_/Jahr:\_\_\_\_\_
3. Sie sind  
 männlich       weiblich ?
4. Verwenden Sie regelmäßig Hautpflegeprodukte an den Unterarmen (z.B. Bodylotion)?  
 ja     nein

Enthält dieses Produkt Antioxidantien?

ja    nein    vielleicht

Nennen Sie den Namen des Produktes, welches Sie für die Unterarme am häufigsten verwenden:

(bitte Produktnamen eintragen)\_\_\_\_\_

**5. Angaben zum Hauttyp**

(bei allen Angaben zum Hauttyp (Punkt 5) sind nur Einmalnennungen möglich!

Kreuzen Sie bitte an)

Augenfarbe:	<input type="checkbox"/> braun	<input type="checkbox"/> grau	<input type="checkbox"/> blau	<input type="checkbox"/> grün
Haarfarbe (=natürliche Haarfarbe):	<input type="checkbox"/> braun	<input type="checkbox"/> schwarz	<input type="checkbox"/> blond	
Haben Sie Sommersprossen?	<input type="checkbox"/> ja		<input type="checkbox"/> nein	
Wenn ja, bekommen Sie im Sommer deutlich mehr Sommersprossen?	<input type="checkbox"/> ja		<input type="checkbox"/> nein	
Wie oft haben Sie Sonnenbrände pro Jahr?	<input type="checkbox"/> > 2 Mal pro Jahr		<input type="checkbox"/> ≤2 Mal pro Jahr	
Treten bei Ihnen Sonnenbrände auf, obwohl Sie starke Sonneneinstrahlung meiden?	<input type="checkbox"/> ja		<input type="checkbox"/> nein	
Werden Sie bei Sonnenstrahlung regelmäßig braun ohne vorher rot zu werden?	<input type="checkbox"/> ja		<input type="checkbox"/> nein	

**6. Angaben zur Sonnenexposition:**

Bitte schätzen Sie Ihre Sonnenexposition in den Sommermonaten des Jahres ein.

SoS= Sonnenschutz

Scha= Aufenthalt im Schatten

<input type="checkbox"/> immer SoS und/oder Scha  (Ich meide die Sonne.)	<input type="checkbox"/> nur gelegentlich SoS und/oder nur gelegentlich Scha  (Ich gehe lieber in die Sonne als in den Schatten und nehme Sonnenmilch, wenn es heiß ist.)	<input type="checkbox"/> selten SoS und/oder wenigScha  (Ich bade gern mal in der Sonne- auch wenn es richtig warm ist und habe öfter keinen Sonnenschutz parat.)
--	---	---

**7. Angaben zur körperlichen Bewegung**

Treiben sie Sport? (=mind. 30 Minuten körperlich anstrengende Bewegung am Stück ohne längere Pausen)

<input type="checkbox"/> nie
<input type="checkbox"/> <1x/Monat
<input type="checkbox"/> 1-2x/Monat
<input type="checkbox"/> ≥ 1x/Woche
<input type="checkbox"/> > 2x/Woche

8. Schätzen Sie bitte ein, wie viele Gehminuten pro Tag Sie insgesamt zu Fuß zurücklegen!

<input type="checkbox"/> <10 Minuten/ Tag
<input type="checkbox"/> 10 -20 Minuten/ Tag
<input type="checkbox"/> 20 -40 Minuten pro Tag
<input type="checkbox"/> >40 Minuten/ Tag

9. Stimmung

Wo befanden Sie sich im Schnitt während der letzten vier Wochen auf einer Skala von 1 bis 10, wenn 1 bedeutet "ich fühle mich nicht wohl" und 10 "ich fühle mich sehr wohl"?

1    2    3    4    5    6    7    8    9    10

10. Stress

Hatten Sie während der letzten vier Wochen einen geregelten Tagesablauf?

ja    nein

10.2 Hatten Sie den letzten vier Wochen eher viel oder eher wenig Stress?

eher wenig    eher viel

**10.3** Schätzen Sie bitte Ihr Stresslevel in den letzten vier Wochen noch etwas genauer ein!

<input type="checkbox"/> kaum Stress
<input type="checkbox"/> relativ wenig Stress
<input type="checkbox"/> mittelmäßiger Stress
<input type="checkbox"/> viel Stress
<input type="checkbox"/> sehr viel Stress

**10.4** Schätzen Sie bitte Ihren beruflichen Stress in den letzten vier Wochen ein!  
Dazu zählt auch Stress durch Ihre Ausbildung/Ihr Studium!

Wieviel beruflichen Stress hatten Sie in den letzten vier Wochen?

<input type="checkbox"/> kaum
<input type="checkbox"/> relativ wenig
<input type="checkbox"/> mittelmäßig
<input type="checkbox"/> viel
<input type="checkbox"/> sehr viel

**10.5** Schätzen Sie bitte Ihren privaten Stress in den letzten vier Wochen ein!

Wieviel privaten Stress hatten Sie in den letzten vier Wochen?

<input type="checkbox"/> kaum
<input type="checkbox"/> relativ wenig
<input type="checkbox"/> mittelmäßig
<input type="checkbox"/> viel
<input type="checkbox"/> sehr viel

**11. Fragen zur Gesundheit**

**11.1** Waren Sie in den letzten vier Wochen erkältet?

ja     nein

Schätzen Sie bitte die Schwere Ihrer Erkältung auf einer Skala von 1-6 ein:  
(Wenn mehr als eine Erkältung vorkam, dann die schwerere Erkältung beschreiben)

1= leichte Erkältung

6=schwere Erkältung

1         2         3         4     5     6

Geben Sie die Dauer der Erkältung in Tagen an!

Das Ende Ihrer Erkältung ist der Zeitpunkt der deutlichsten Beschwerdeverbesserung. Also der Zeitpunkt, zu dem Sie sich wieder annähernd so leistungsfähig wie vor der Erkältung fühlten.

1Tag Dauer    2 Tage    3 Tage    4 Tage    5Tage    6Tage    7Tage    8Tage  
 >8Tage

Waren Sie in den letzten vier Wochen so stark erkältet, dass Sie nicht zur Arbeit/  
zur Uni/zur Ausbildung gehen konnten?

ja     nein

Hatten Sie während der letzten vier Wochen Fieber?

ja     nein

Geben Sie die Dauer Ihrer Beschwerden in Tagen an!

Das Ende Ihres Infektes ist der Zeitpunkt der deutlichsten Beschwerdeverbesserung.  
Also der Zeitpunkt zu dem Sie sich wieder annähernd so gesund wie vor Ihren  
Beschwerden fühlten.

- 1Tag Dauer    2 Tage    3 Tage    4 Tage    5Tage    6Tage    7Tage    8Tage  
 >8Tage

**11.2** Gesundheit im Allgemeinen:

Wie häufig haben Sie Infekte pro Jahr? (z.B. Erkältungen oder Durchfallerkrankungen bei denen man sich krank fühlt)	<input type="checkbox"/> ≤ 2 / Jahr	<input type="checkbox"/> 2-4/ Jahr	<input type="checkbox"/> > 4/ Jahr
--	-------------------------------------	------------------------------------	------------------------------------

Nehmen Sie derzeit Medikamente ein?

- ja             nein

Wenn ja, welches Medikament nehmen Sie ein? \_\_\_\_\_

Aus welchem Grund nehmen Sie dieses Medikament ein?

\_\_\_\_\_

Seit wann nehmen Sie dieses Medikament ein? \_\_\_\_\_

**12.** Ernährungsgewohnheiten

Essen Sie eher viel oder eher wenig Gemüse?

- eher wenig             eher viel

Essen Sie eher viel oder eher wenig Obst und Gemüse?

- eher wenig             eher viel

Essen Sie eher viel oder eher wenig Obst?

- eher wenig             eher viel

Obst:

Diese Obstsorte esse ich....:	selten oder nie	≥1 Mal pro Monat	≥1Mal/ Woche	≥ 4 Mal pro Woche	weiß nicht
Apfel	<input type="checkbox"/>				
Orange	<input type="checkbox"/>				
Banane	<input type="checkbox"/>				
Kiwi	<input type="checkbox"/>				
Mango	<input type="checkbox"/>				
Wassermelone	<input type="checkbox"/>				
Erdbeeren	<input type="checkbox"/>				
Kirschen	<input type="checkbox"/>				
Feigen	<input type="checkbox"/>				
rote Trauben	<input type="checkbox"/>				
grüne Trauben	<input type="checkbox"/>				
Kaki/ Sharon	<input type="checkbox"/>				
Ananas	<input type="checkbox"/>				
Andere: _____	<input type="checkbox"/>				

Gemüse:

Diese Gemüsesorte esse ich....:	selten oder nie	>1 Mal pro Monat	>1Mal/ Woche	≥ 4 Mal pro Woche	weiß nicht
Tomate	<input type="checkbox"/>				
Tomatensoßen, Ketchup	<input type="checkbox"/>				
Paprika	<input type="checkbox"/>				
Brokkoli	<input type="checkbox"/>				
Kartoffeln	<input type="checkbox"/>				
Spinat	<input type="checkbox"/>				
Blattsalat	<input type="checkbox"/>				
Karotten	<input type="checkbox"/>				
Grünkohl	<input type="checkbox"/>				
Zucchini	<input type="checkbox"/>				
Gurke	<input type="checkbox"/>				
Blumenkohl	<input type="checkbox"/>				
Kürbis	<input type="checkbox"/>				
Andere: _____	<input type="checkbox"/>				

Fisch/Fleisch/Ei:

	selten oder nie	>1 Mal pro Monat	>1Mal/ Woche	≥ 4 Mal pro Woche	weiß nicht
Fisch esse ich	<input type="checkbox"/>				
rotes Fleisch esse ich	<input type="checkbox"/>				
Geflügel esse ich	<input type="checkbox"/>				
Eier (gekocht oder gebraten) esse ich	<input type="checkbox"/>				

**13. Kennen Sie den Wert Ihres BMI?**

<20	20-25	25-30	>30
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**14. Genussmittel**

**14.1 Wie häufig konsumieren Sie alkoholische Getränke?**

Selten/ nie	>1 Mal pro Monat	>1Mal/ Woche	≥ 4 Mal pro Woche
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**14.2 Wie Sind Sie derzeit aktiver Raucher?**

ja       nein

Wenn ja, wieviele Zigaretten rauchen Sie pro Tag im Schnitt?

<input type="checkbox"/> < 10 Zig/ Tag	<input type="checkbox"/> >10 Zig/ Tag
--	---------------------------------------

Seit wie vielen Jahren rauchen Sie?

<input type="checkbox"/> <5 Jahre	<input type="checkbox"/> 5 -10 Jahre	<input type="checkbox"/> 10 - 15 Jahre	<input type="checkbox"/> >15 Jahre
-----------------------------------	--------------------------------------	--	------------------------------------

**14.3 Wenn Sie derzeit nicht rauchen, haben Sie früher einmal geraucht?**

ja       nein

Über welchen Zeitraum haben Sie regelmäßig geraucht?

<input type="checkbox"/> <5 Jahre	<input type="checkbox"/> 5 -10 Jahre	<input type="checkbox"/> 10 - 15 Jahre	<input type="checkbox"/> >15 Jahre
-----------------------------------	--------------------------------------	--	------------------------------------

Wieviele Zigaretten haben Sie im Schnitt am Tag geraucht?

<input type="checkbox"/> < 10 Zig/ Tag	<input type="checkbox"/> >10 Zig/ Tag
--	---------------------------------------

Wie lange ist ihr Zigarettenkonsum her?

<input type="checkbox"/> <5 Jahre	<input type="checkbox"/> 5 -10 Jahre	<input type="checkbox"/> 10 - 15 Jahre	<input type="checkbox"/> >15 Jahre
-----------------------------------	--------------------------------------	--	------------------------------------

**15. Lebensstiländerung**

Änderung des Lebensstils in den letzten fünf Jahren			
Mein Lebensstil ist:	<input type="checkbox"/> gleichgeblieben	<input type="checkbox"/> leicht verändert	<input type="checkbox"/> grundlegend verändert
Leben sie heute eher gesünder oder ungesünder als vor fünf Jahren?	<input type="checkbox"/> gesünder	<input type="checkbox"/> ungesünder	<input type="checkbox"/> gleich gesund

## **Curriculum vitae**

**Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version der Arbeit nicht veröffentlicht.**

## Publikationsliste

Meinke MC, **Friedrich A**, Tscherch K, Haag SF, Darvin ME, Vollert H, Groth N, Lademann J, Rohn S. Influence of dietary carotenoids on radical scavenging capacity of the skin and skin lipids. Eur J PharmBiopharm. 84 (2013) 365–373

### Abstracts

Meinke MC, **Friedrich A**, Arndt S, Lauer A, Darvin ME, Lademann J. Changes in cutaneous radical scavenging activity after topical and systemic application of antioxidants. Antioxidant Symposium, New York Academy of Science, New York, 5. Juni 2014

Meinke MC, Lauer A, **Friedrich A**, Arndt S, Haag SF, Lademann J, New diagnostic possibilities using electron paramagnetic resonance spectroscopy to develop anti-aging strategies. ISBS-SICC 1st JOINT INTERNATIONAL CONGRESS, Ageing Skin: Diagnostic Tools and Cosmetic Treatment, Mailand, 15.-16. Oktober 2013

Meinke MC, **Friedrich A**, Darvin ME, Tscherch K, Haag SF, Rohn S, Vollert H, Lademann J, Gemüseextrakte zur Prävention von radikalinduzierten Hautkrankheiten und frühzeitiger Hautalterung, 86. Jahrestagung der NDG, Rostock 30. August 2013

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Friedrich, Annette, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss oral eingenommener Carotinoide auf den antioxidativen Status der Haut, die Radikalschutzfunktion der Haut und auf das Lipidprofil der Haut“ selbständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

**Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Annette Friedrich hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Meinke MC, **Friedrich A**, Tscherch K, Haag SF, Darvin ME, Vollert H, Groth N, Lademann J, Rohn S. Influence of dietary carotenoids on radical scavenging capacity of the skin and skin lipids. Eur J PharmBiopharm. 84 (2013) 365–373: Beitrag im Einzelnen: Erhebung der Primärdaten (selbständige Durchführung der Resonanz-Raman-Messungen, Erhebung der Umfragedaten, Extraktion der Lipide), statistische Auswertung, Unterstützung bei der Verfassung des Manuskriptes.

(70%)

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

.....

Berlin, den.....2014

## **Danksagung**

Ich möchte mich aufrichtig bei dem gesamten Team von Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. Jürgen Lademann für die anregende Arbeit im Team, den Austausch und die gegenseitige Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. Martina Meinke für den Vorschlag des sehr interessanten Themas sowie für ihre stete Unterstützung und ihre besondere Gabe der Motivation.

Auch möchte ich mich bei Herrn Dr. Stefan Haag und Herrn Dr. Maxim Darwin für die vielen Gespräche und konstruktiven Kritiken bedanken.

Außerdem war Frau Sabine Schanzer eine besondere Hilfe bei der Einarbeitung in das ESR-Gerät.

Nicht zuletzt empfand ich den regen Austausch mit den Mitdoktoranden als sehr hilfreich und motivierend.

Sehr bedanken möchte ich mich ebenfalls bei meinen Probanden, die durch ihre doch recht zeitaufwendige Teilnahme diese Studie erst ermöglichten.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden und Arbeitskollegen, die den Werdegang meiner Arbeit interessiert verfolgten, mir so manchen Dienst abnahmen und mich von Zeit zu Zeit mit netten Worten und Zuspruch unterstützten.

Ein abschließender Dank gilt meiner Familie, meinem Partner sowie meinem Sohn Marcel Johannes, die so einige Abende ohne mich verbracht haben.