

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

DISSERTATION

„Bildung von ROS und die endogene Antwort von Glutathion in
humanen Keratinozyten nach Supplementierung mit β -Carotin und
Bestrahlung im VIS/NIR-Bereich“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kristina Paula Vitt
aus Marburg an der Lahn

Datum der Promotion: 17.09.2021

Vorwort

Aus den Daten dieser Dissertation sind vorab folgende Publikationen und Poster hervorgegangen:

Publikation

Silke B. Lohan ^{a,*1}, Kristina Paula Vitt,¹ Patrik Scholz ^b, Cornelia M. Keck ^b, Martina C. Meinke ^a

ROS production and glutathione response in keratinocytes after application of β -carotene and VIS/NIR irradiation

Veröffentlicht in: Chemico-Biological Interactions 280 (2018) 1–7

Präsentation und Poster

Response of the endogenous antioxidant system after administration with antioxidants and moderate stress induction in keratinocytes

Veröffentlicht an der 23. GD-Jahrestagung 25-27. März 2019 in Düsseldorf

Inhaltsverzeichnis

VORWORT	2
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
TABELLENVERZEICHNIS	6
ABSTRAKT (DEUTSCH)	9
ABSTRACT (ENGLISCH)	11
1. EINLEITUNG	12
1.1 Motivation.....	12
2. GRUNDLAGEN	14
2.1 Anatomie und Physiologie der menschlichen Haut	14
2.1.1 Epidermis (Oberhaut)	15
2.1.2 Dermis	16
2.1.3 Subkutis.....	16
2.2 Sekundäre Keratinozyten: HaCaT Zellen	17
2.3 Sonnenstrahlung	18
2.3.1 UV- und VIS/NIR-Strahlung	19
2.3.2 Auswirkungen von Strahlung auf die Haut.....	20
2.4 Oxidativer Stress	20
2.5 Antioxidantien.....	21
2.5.1 Carotinoide (exogene AOs).....	22
2.5.2 Glutathion (GSH, endogenes AO)	24
2.6 Nanopartikel	26
Der Begriff Nanopartikel beschreibt Verbindungen von Atomen oder Molekülen, die laut Definition durch die Europäische Union eine Größe zwischen 1 und 100 Nanometern aufweisen, unabhängig ihres Aggregatzustandes. Nanopartikel finden Anwendung in der Medizin, Kosmetik, aber auch z. B in der Lackindustrie.	26
2.6.1 Nanokristalle.....	26
3. ZIELSETZUNG	27
4. MATERIAL UND METHODEN	28
4.1 Studiendesign	28

4.2 Nanopartikelformulierung.....	30
4.3 Zellkultur.....	31
4.3.1 Zelllinie – Kerantinozyten	31
4.3.2 Zellkultivierung	31
4.3.3 Zellviabilitätsbestimmung (XTT-Assay).....	32
4.3.4 Trypan-Blau-Färbung	33
4.4 Elektronenspinresonanz (ESR) -Spektroskopie.....	34
4.4.1 Spinmarker Tempo.....	35
4.4.2 Durchführung von ESR-Messungen	36
4.5 Bestrahlung.....	37
4.6 Resonanz -Raman-Spektroskopie (RRS)	37
4.6.1 Durchführung der RRS-Messungen.....	38
4.7 Messung von reduziertem (GSH) und oxidiertem (GSSG) Glutathion	39
5. ERGEBNISSE.....	41
5.1 Testung moderater Stressfaktoren.....	41
5.2 Zellviabilität (XTT).....	42
5.3 Untersuchung der Zellaufnahme von ausgewählten β -Carotin Konzentrationen mittels RRS	43
5.4 Untersuchung der Radikalproduktion mittels der Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie	44
5.5 Untersuchung des endogenen antioxidativen Systems: Glutathion	45
6. DISKUSSION	47
7. ZUSAMMENFASSUNG	53
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	53
9. EIDESSTATLICHE VERSICHERUNG.....	59
10. ANTEILSERKLÄRUNG.....	60
11. CURRICULUM VITAE.....	61
12. PUBLIKATIONSLISTE.....	62
13. DANKSAGUNG.....	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allgemeiner Aufbau der Haut und der Hautanhangsgebilde.....	15
Abbildung 2: Aufbau der Epidermis	16
Abbildung 3: Mikroskopische Aufnahme von kultivierten HaCaT-Zellen (Monolayer)	17
Abbildung 4: Aktionsspektrum der Haut.....	18
Abbildung 5: Eindringtiefe von UVC-,UVB-,UVA- Strahlen sowie sichtbarem und nahen Infrarot-Licht in die Haut.	19
Abbildung 6: Schematische Abbildung zur Auswirkungen von freien Radikalen auf die Zelle.....	21
Abbildung 7: Strukturformel von Betacarotin	24
Abbildung 8: Reduktion und Oxidation von GSH.....	25
Abbildung 9: Größenvergleich Nano zu Gigameter	26
Abbildung 10: Schematische Darstellung der ersten Testungen im ESR mit 42°C,37°C,22°C und dem NIR Strahlungsbereich.....	28
Abbildung 11a/b: Finales Studiendesign, RRS Testungen zur β -Carotin Aufnahme, Zellviabilitätstestungen mit Trypan Blau und XTT, ESR Testungen der 6 finalen Proben mit abschließender Bestimmung des GSH/GSSG	29
Abbildung 12: Reduktion von XTT zur Bildung des farbigen Formazanderivats.	33
Abbildung 13: Strukturformel von Trypan Blau	33
Abbildung 14: Aufspaltung von Elektronen in einem von außen angelegten Magnetfeld (Zeeman-Effekt).....	35
Abbildung 15: Strukturformel des ESR-Markers TEMPO.	35
Abbildung 16: Schematische Darstellung von ESR-Messungen mit dem ESR- Marker TEMPO; Markerlösung (schwarz), Markerlösung mit Zellen zur Erfassung der metabolischen Aktivität (blau), Markerlösung mit Zellen und externer Bestrahlung zur Beurteilung der Radikalinduzierung durch UV-Bestrahlung (rot).	36
Abbildung 17: Absorption von β -Carotin und Lycopin.....	38
Abbildung 18: Untersuchung der Radikalproduktion nach 32 min Bestrahlung mittels der ESR-Spektroskopie unter der Verwendung des Spinmarkers TEMPO [5 μ M] (n=6); Mittelwert \pm SEM und	41
Abbildung 19: Zellviabilität der HaCaT Zellen nach 1 Stunde Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von β -Carotin Nanokristallen (0,02, 0,05, 0,08, 0,1 und 0,2 μ g/ml) im Vergleich zu unbehandelten Zellen und einer positiv Kontrolle mit Triton X 0.1%, Mittelwert (n=6) \pm SEM, **p \leq 0,01.....	43
Abbildung 20: Messung der Aufnahme von β -Carotin-Nanokristallen (0,02 μ g/ml und 0,1 μ g/ml) in HaCaT-Zellen mittels der Resonanten Raman Spektroskopie bei 488 nm.	44
Abbildung 21: Messung der Radikalproduktion in HaCaT-Zellen vor/ nach VIS/NIR- Bestrahlung (46.8 J/cm ²) sowie ohne/ mit β -Carotin-Supplementation (0,02 und 0,1 μ g/ml) mittels der ESR-Spektroskopie. Mittelwert (n=6) \pm SEM, *p \leq 0.05, ** \leq 0.01. 45	
Abbildung 22: Verhältnis von GSH/GSSG in HaCaT-Zelllysaten nach gezielter Supplementierung mit zwei unterschiedlichen β -Carotin-Konzentrationen (0,02 und 0,1 μ g/ml) und Bestrahlung im VIS/NIR-Bereich (46.8 J/cm ²) ; Mittelwert (n=6) \pm SEM, *p \leq 0.05, ** \leq 0.01.....	46

Abbildung 23: Schematische Darstellung des endogenen AO Systems, nach Bestrahlung und Supplementierung zwei verschiedener Konzentrationen β -Carotin. 50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Zusammensetzung des antioxidativen Systems des Körpers. 22
Tabelle 2: Verwendete Einstellungen für die ESR-Messungen..... 30
Tabelle 3: Übersicht der gemessenen ESR-Proben 30

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AO	Antioxidantien
β	Beta
CAT	Catalase
cm ²	Quadratcentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESR	<i>engl: electron spin resonance</i> , Elektronen-Spin-Resonanz
et al.	<i>lat: et alteri</i> , und andere
Ghz	Gigahertz
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG	Glutathion-Disulfid (oxidierte Form)
GPX	Glutathion-Peroxidase
g/mol	Gramm pro Mol
H	Wasserstoff
HDL	<i>engl: high density lipoproteins</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IR	Infrarot (700 -2000 nm)
LDL	<i>engl: low density lipoproteins</i>
M	Molar
min	Minuten
mJ	Millijoule
ml, l	Milliliter, Liter
µg, mg	Mikrogramm, Milligramm
µmol/l	Mikromol pro Liter
MW	Mittelwert
NIR	Nahe Infrarotbereich
nm, µm, mm, cm	Nanometer, Mikrometer, Millimeter, Zentimeter
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
O ₂	Sauerstoff
ROS	<i>engl: reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RRS	Resonanz Raman Spektroskopie

SOD	Superoxid-Dismutase
Tab.	Tabelle
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy
UV	Ultraviolett
VLDL	<i>engl: Very low density lipoproteins</i>
VIS	engl: visible, sichtbar
z.B.	Zum Beispiel

Abstrakt (deutsch)

Unsere Haut ist täglich unterschiedlichen exogenen und endogenen Stressfaktoren ausgesetzt, zum Beispiel UV-Strahlung, Toxinen, aber auch unser Schlaf-/ Lebensrhythmus sowie unsere Ernährung haben einen Einfluss auf ihren Stoffwechsel. Alle diese Faktoren können die Bildung von freien Radikalen (reaktiven Sauerstoffspezies, ROS) im Körper fördern, die zur Entstehung von sogenanntem oxidativen Stress führen können. In der Folge kann es zu einer Überlastung des antioxidativen System unseres Körpers kommen.

Das antioxidative System des Körpers stellt ein komplexes Schutzsystem dar. Man differenziert hier zwischen endogenen Antioxidantien (AO), die vom Körper synthetisiert und exogenen AO, die mit der Nahrung aufgenommen werden müssen.

Glutathion gehört zu einer der wichtigsten endogenen AO. Es kommt in allen Zellen vor und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von oxidativem Stress.

Zu einen der repräsentativsten, nicht-enzymatischen, exogenen AO gehören die Carotinoide. Sie stellen eine Markersubstanz für das gesamte antioxidative System dar.

Um das Zusammenspiel des endogenen und exogenen antioxidativen Systems nach moderater Stressinduktion näher zu untersuchen, wurden sekundäre Keratinozyten (HaCat-Zellen) mit unterschiedlichen Konzentrationen von Beta (β)-Carotin behandelt. Ziel war es den Einfluss von β -Carotin auf die Radikalschutzfunktion und den antioxidativen Status von Hautzellen nach Bestrahlung im sichtbaren und nahen Infrarotbereich (VIS/NIR, 700-2000 nm) zu untersuchen.

Die Aufnahme des lipophilen β -Carotins in die Hautzellen wurde durch eine Nanokristall-Formulierung ermöglicht. Überprüft wurde die Aufnahme der β -Carotin-Kristalle mittels der Resonanz Raman-Spektroskopie (RRS), die Zytotoxizität der verwendeten β -Carotin Konzentrationen wurde mittels eines Zellviabilitäts Assay (XTT) ermittelt. Die Entstehung von freien Radikalen während der VIS/NIR-Bestrahlung wurde mittels der Elektronenspinresonanz -(ESR)-Spektroskopie untersucht. Zur Überprüfung des endogenen oxidativen Status wurden das Level an reduziertem und oxidiertem Glutathion (GSH/ GSSG) mit einem fluoreszenzbasierten Assay untersucht.

Durch die RRS konnte eine konzentrationsabhängige Aufnahme von β -Carotin gezeigt werden. Der Redox-Status wurde vor und nach der Supplementierung mit zwei ausgewählten β -Carotin-Konzentrationen (0,02 und 0,1 $\mu\text{g/ml}$) und moderater Bestrahlung bestimmt.

Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung in der Bildung von ROS nach der VIS/NIR-Bestrahlung, die durch eine gezielte Supplementierung mit beiden β -Carotin-Konzentrationen reduziert werden konnte. Eine aktive Wechselwirkung zwischen den applizierten β -Carotin-Konzentrationen (exogene AO), dem endogenen AO-System Glutathion und der

Radikalbildung konnte nachgewiesen werden. Bei der niedrigeren β -Carotin-Konzentration konnte ein effektiverer Schutz vor mäßigem Stress beobachtet werden. Die höhere β -Carotin-Konzentration wirkte sich pro-oxidativ auf den Metabolismus aus.

Abstract (englisch)

Our skin is daily exposed to many different exogenous and endogenous stress factors, such as UV radiation, toxins but also sleep/life rhythm and our nutrition have an influence on our metabolism. All these factors promote the formation of free radicals, especially reactive oxygen species (ROS) in the body, which can lead to the development of oxidative stress. As a result, the redox status shifts in favour of the pro-oxidative side.

The antioxidant system of the body represent a complex protection system. A distinction can be made between endogenous AOs, which have to be synthesized by the body itself, and exogenous AOs, which must be ingested with food.

Glutathione is one of the most important endogenous AOs. It is present in all cells and plays an important role in the regulation of oxidative stress. Carotenoids are one of the most representative non-enzymatic exogenous AOs. They represent a marker substance for the whole antioxidative system.

To investigate the interaction between the endogenous and exogenous antioxidative system after moderate stress induction, secondary keratinocytes (HaCat cells) were treated with different concentrations of beta (β)-carotene. The aim was to investigate the influence of β -carotene on the radical protection function and the antioxidative status of skin cells after irradiation in the visible and near infrared range (VIS/NIR, 700-2000nm).

In order to enable the uptake of lipophilic β -carotene into skin cells, a nanocrystal formulation was used. The uptake of β -carotene crystals was analyzed by resonance Raman spectroscopy (RRS), the cytotoxicity of used β -carotene concentrations was investigated by a cell viability assay (XTT). The formation of free radicals during VIS/NIR irradiation was investigated by electron spin resonance (ESR) spectroscopy. To verify the endogenous oxidative status, the levels of reduced and oxidized glutathione (GSH/ GSSG) were investigated using a fluorescence-based assay.

By RRS a concentration-dependent uptake of β -carotene could be shown. The redox status was determined before and after supplementation with two selected β -carotene concentrations (0.02 and 0.1 $\mu\text{g/ml}$) and moderate irradiation. A significant increase in the ROS formation after VIS/NIR irradiation was measured, which could be reduced by specific supplementation with both β -carotene concentrations. An active interaction between the applied β -carotene concentrations (exogenous AO), the endogenous AO-system glutathione and radical formation could be proven. At the lower β -carotene concentration a more effective protection against moderate stress could be observed. The higher β -carotene concentration had a pro-oxidative effect on the metabolism.

1. Einleitung

1.1 Motivation

Im Alltag ist die menschliche Haut sehr vielen schädlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt, wie z.B. der Strahlung in Form von Sonnenlicht oder auch künstlicher UV- Strahlung, ebenso aber auch Abgasen und anderen schädlichen Umwelteinflüssen. Gerade in Großstädten oder Ballungsgebieten spielt dies eine wichtige Rolle und wirkt sich negativ auf das Abwehrsystem unserer Haut aus^{1,2} Hauterkrankungen wie etwa Neurodermitis oder auch Hautkrebs^{3,4} können die Folge sein.

Eine exzessive UV-Exposition wird als ein entscheidender Faktor für die Hautkrebsentstehung angesehen. Durch stetig verbesserte Sonnenschutzmittel, die im UV-Bereich schützen, könnte ein Rückgang von Hautkrebsraten erwartet werden. Jedoch verzeichnet die Statistik weltweit jährlich steigende Inzidenzraten für melanomen und nicht-melanomen Hautkrebs⁴. UV Licht ist ein dominierender Faktor, doch Studien konnten auch zeigen, dass bis zu 50% der Radikale im VIS-NIR Bereich gebildet werden⁵. Ein effizienter Lichtschutz bzw. die Supplementierung mit Antioxidantien ist essentiell, um die Haut vor freien Radikalen zu schützen und damit die Entstehung von chronischen und entzündlichen Erkrankungen zu minimieren⁶.

In einem gesunden Körper sorgt das antioxidative System für den Schutz der Haut vor freien Radikalen und es herrscht eine Balance zwischen den pro- und antioxidativen Prozessen (Redoxhomöostase). Eine Disbalance, die zu Gunsten der prooxidativen Seite ausfällt, sorgt für die Entstehung von sogenanntem oxidativen Stress, der sowohl von exogenen wie auch von endogenen Faktoren beeinflusst werden kann⁷.

Verantwortlich für den oxidativen Stress in der Haut sind vor allem reaktive Sauerstoffspezies (ROS), aber auch reaktive Nitrogenspezies sind daran beteiligt. Beide Spezies können Schädigungen von verschiedenen Zellkomponenten hervorrufen, z. B. der Zellmembran, der Proteine oder auch der DNA. Die kutanen Auswirkungen können vielseitig sein, es kann zu entzündlichen Reaktionen oder gar zur langfristigen Schädigungen kommen⁸. Man differenziert zwischen dem endogenen Abwehrsystem, das aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien (AO) besteht und dem exogenen Abwehrsystem, das dem Körper mit der Nahrung zugeführt werden muss. Für den Schutz gegen oxidativen Stress werden beide Systeme benötigt und es existieren komplexe Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Abwehrsystemen. Man spricht hier von synergetischen Effekten⁹.

Antioxidantien im Allgemeinen sind chemische Verbindungen, die durch Reduktion ihres Reaktionspartners in der Lage sind oxidative Prozesse zu verlangsamen oder auch zu verhindern und haben einen positiven Einfluss auf das Immunsystem^{10,11}.

Zu den wichtigsten endogenen Antioxidantien zählt u.a. die Superoxiddismutase (SOD), die Catalase (CAT) und Glutathion (GSH)¹².

Die wichtigsten Vertreter der exogenen Antioxidantien sind die Ascorbinsäure (Vitamin C), Vitamine E und die Carotinoide, wobei hier Beta (β)-Carotin und Lycopin mit etwa 60-70% den größten Teil der in der Haut vorkommenden Carotinoide darstellen¹³.

In vielen Studien konnte der positive Einfluss einer gesunden Ernährung, reich an Obst und Gemüse, auf den menschlichen Körper gezeigt werden^{14, 15}.

Es konnte aber auch demonstriert werden, dass Überdosen von Carotinoiden dem Organismus Schaden zuführen können und sich die Wirkung von Antioxidantien in Richtung Prooxidation verschiebt (prooxidativer Effekt). Dies konnte in Studien mit Rauchern gezeigt werden¹⁶.

Über das Zusammenspiel zwischen dem endogenen und dem exogenen System bei oxidativem Stress durch moderate Bestrahlung im VIS/NIR-Bereich ist nicht viel bekannt. Wie beeinflussen sich diese beiden Systeme gegenseitig?

Um diesen Zusammenhang näher zu untersuchen, sollten humane Hautzellen einem moderaten externen Stress ausgesetzt werden; zuvor sollte eine gezielte Supplementierung mit dem exogenen AO β -Carotin erfolgen. Um die Auswirkungen einer gezielten Supplementation von β -Carotin auf die Redoxhomöostase und die Radikalproduktion untersuchen zu können, mussten zuvor zwei Fragestellungen gelöst werden:

1. Wie kann β -Carotin einfach und nachweislich in die Zelle aufgenommen werden?
2. Welcher moderate exogener Stress soll verwendet werden?

Da Carotinoide lipophil sind, ist eine zelluläre Aufnahme mit einer normalen Suspension stark eingeschränkt. Um dieses Problem zu lösen, wurden Nanokristalle verwendet, mit denen die Aufnahme in die Zellen vereinfacht werden sollte.

Für den moderaten Stress wurde Bestrahlung ausgewählt. Bestrahlungsexperimente sind gut regulier- und reproduzierbar, Substanzen dagegen könnten noch weitere Signalkaskaden auslösen, so dass ein Kausalitätsbezug zwischen gezielter Supplementation mit β -Carotin und dem eingesetzten Stress erschwert werden würde.

UV Strahlung löst, vielfach nachgewiesen, starken oxidativen Stress bei Zellen aus und somit wurde eine moderate Strahlung im Bereich des sichtbaren und nahen Infrarot ausgewählt (VIS/NIR, 400-2000 nm).

Als nicht-invasive und hoch sensible Messmethode für freie Radikale hat sich die Elektronenspinresonanz -Spektroskopie bewährt. Dies konnte sowohl für Zellen als auch für Gewebe gezeigt werden.^{17, 18, 19}.

Durch Messungen mit der ESR-Spektroskopie können sowohl Stressreaktionen durch die Zugabe und Aufnahme von β -Carotin²⁰, als auch der oxidative Stress der Hautzellen nach Bestrahlung gemessen werden.

In dieser Studie wurde die Radikalproduktion von sekundären Keratinozyten (HaCat-Zellen) vor und nach der Bestrahlung im VIS/NIR Bereich und nach Zugabe von zwei verschiedenen β -Carotin Konzentrationen gemessen.

Es wurde untersucht, ob und inwiefern die Zugabe von β -Carotin das endogene antioxidative System und somit auch die Bildung von freien Radikalen beeinflusst.

Zusätzlich zu den Radikalmessungen wurde das Glutathion-Level (reduzierte und oxidierte Form: GSH/ GSSG) als Vertreter des endogenen antioxidativen Systems vor/nach Bestrahlung sowie vor/nach gezielter Supplementation mit den unterschiedlichen β -Carotin-Konzentrationen, charakterisiert.

2. Grundlagen

2.1 Anatomie und Physiologie der menschlichen Haut

Die Haut ist in ihrer Gesamtheit von 1,5 bis 2m² eines der größten Organe des menschlichen Körpers und erfüllt unterschiedlichste Aufgaben. Sie schützt den Körper mechanisch vor äußeren Einflüssen, (z.B. UV-Strahlung, Infektionen), ist maßgeblich an der Temperaturregulation beteiligt und ist ein Sinnesorgan, das thermische Reize, Berührungen und auch Schmerz übermitteln kann. Des Weiteren weist sie Sekretionsfunktionen auf und stellt einen wichtigen Bestandteil des Immunsystems dar. Sie übernimmt eine Barriere- und Reservoirfunktion, reguliert den Wasserhaushalt und schützt vor dem Einfluss exogener Substanzen^{21, 22}.

Die Haut kann generell in drei Schichten unterteilt werden (Abbildung 1): die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut) und die Subcutis (Unterhaut). Dazu kommen Hautanhangsgebilde wie Haare, Schweiß- und Talgdrüsen und Nägel²³.

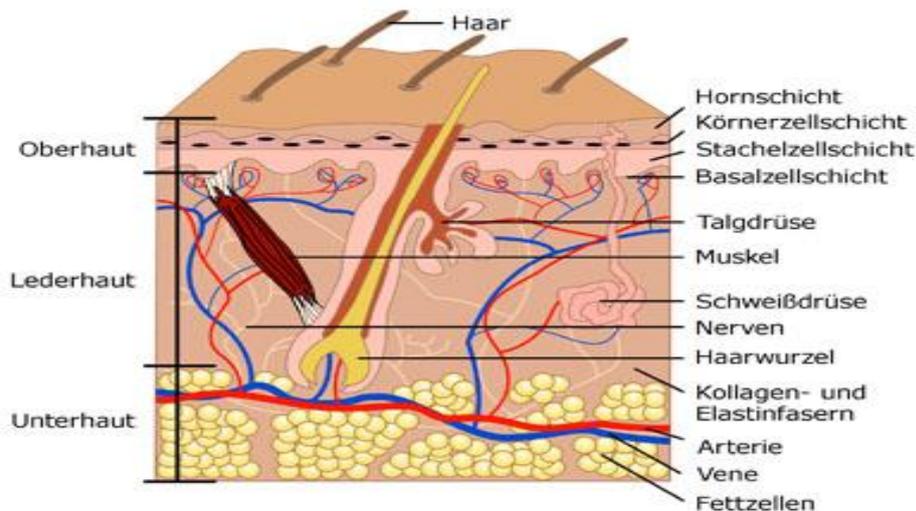


Abbildung 1: Allgemeiner Aufbau der Haut und der Hautanhangsgebilde.
 (Quelle: <http://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/hautkrebs/der-aufbau-der-haut.html>).

2.1.1 Epidermis (Oberhaut)

Die Epidermis wird in mehrere Schichten (Abbildung 1) unterteilt:

- a) *Stratum corneum* (Hornschicht): Diese Schicht besteht aus abgestorbenen Zellen (Korneozyten), die der Haut Festigkeit und Stabilität geben und die Hautbarriere zur Außenwelt darstellen.
- b) *Stratum granulosum* (Körnerschicht): In dieser Schicht wird das Keratin gebildet, das der Verhornung der Keratinozyten dient.
- c) *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht): Bestehend aus lebenden Keratinozyten, die den Nachschub für die Verhornung des *Stratum corneums* darstellen, sowie aus pigmentierten Zellen (Melanozyten).
- d) *Stratum basale* (Basalzellschicht): Ist aus Reihen von lebenden Epithelzellen (Keratinozyten) aufgebaut, die zur Neubildung der oberen Hautschichten und bei der Wundheilung essentiell sind. Des Weiteren befinden sich hier Nervenendigungen für den Tastsinn.

Die Epidermis (Abbildung 2) besteht aus über 90% Keratinocyten. Diese Zellen werden im *Stratum basale* gebildet und wandern im Laufe ihrer Entwicklung durch verschiedene Reifungsstadien nach außen zur Hornschicht (*Stratum corneum*). Während dieses Prozesses durchlaufen die Keratinozyten eine Differenzierung zu kernlosen keratinisierten Hornzellen (Korneozyten), die der Haut ihre Festigkeit verleihen und einen Schutz vor exogenen Faktoren darstellen. Die restlichen 10% der Epidermis bestehen aus Melanozyten

(Pigmentzellen), Langerhanszellen (Teil des immunologischen Apparates) und Merkel-Zellen^{24, 25}.

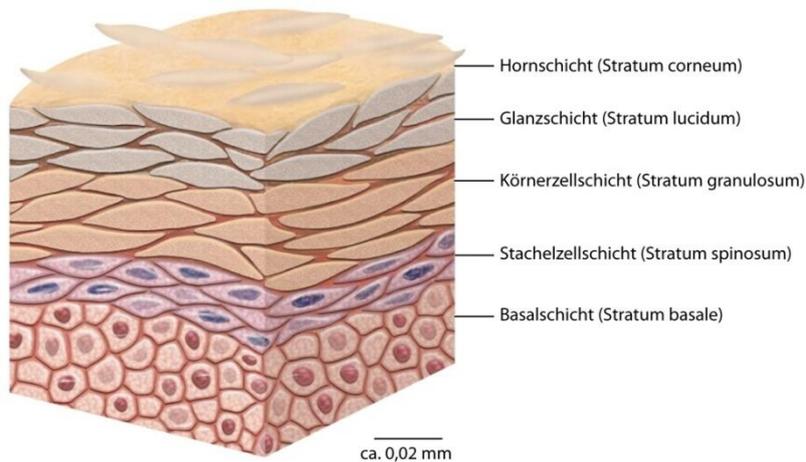


Abbildung 2: Aufbau der Epidermis
(Quelle: <https://www.enpevita.de/site/ExampleEvaluation.aspx?exampleid=154>).

2.1.2 Dermis

Die Dermis kann in zwei Schichten unterteilt werden, die Zapfenschicht (*Stratum papillare*), die ein lockeres Gewebe darstellt, in dem die Kollagenfasern lose und eher vertikal angeordnet sind und die Netzsicht (*Stratum reticulare*), in der eine höhere Faserdichte herrscht und eine eher horizontale Vernetzung vorhanden ist. Durch ihren hohen Bindegewebsanteil trägt die Dermis allgemein zur Festigkeit der Haut bei. Im unteren Teil der Dermis (*Stratum reticulare*) entspringen die Talg- und Schweißdrüsen sowie Haarwurzeln. Die Übergangsschicht zur Epidermis (*Stratum papillare*) ist unregelmäßig und zapfenförmig aufgebaut. In dieser Schicht befinden sich Blutgefäße, die zur Versorgung, der Haut und der Hautanhangsgebilde mit Nährstoffen benötigt werden²⁶.

2.1.3 Subkutis

Die Unterhaut (Subkutis) enthält größere Blutgefäße und Sinneszellen und ist aus lockerem Bindegewebe und subkutanem Fettgewebe aufgebaut. In dem Bindegewebe befinden sich Fasern, die die Subkutis mit den Muskeln, Knochen und Knorpeln verbinden. Das subkutane Fettgewebe dient als Kälteschutz, Energiespeicher und auch als mechanischer Schutz. Die Dicke der Unterhaut variiert je nach Körperregion.

Ebenso finden sich in der Unterhaut die Hautanhangsgebilde wie Schweißdrüsen, Haarbälge und Nägel²⁷.

2.2 Sekundäre Keratinozyten: HaCaT Zellen

In dieser Arbeit wurden sekundäre Keratinozyten verwendet, die auch als HaCaT-Zellen bezeichnet werden. Diese Zelllinie wurde ursprünglich von der Arbeitsgruppe Fusenig et al. der Peripherie eines primären malignen Melanoms der Rückenhaut eines 62 jährigen männlichen Patienten entnommen^{28, 29, 30, 31}.

Es handelt sich bei diesen Zellen um histologisch gesicherte benigne (gutartige) Zellen. Die Abkürzung „HaCaT“ steht für „**H**uman **a**dult low **C**alcium high **T**emperature keratinocytes“ (Abbildung 3). Diese Zelllinie eignet sich aufgrund ihres stabilen Wachstumszykluses und der phänotypischen Eigenschaften von basalen epidermalen Keratinozyten sehr gut für grundlegende Untersuchungen, wie z.B. die Reaktion auf Stressfaktoren. Für solche Untersuchungen werden meist Passagen < 80 verwendet, um eventuelle stoffwechselbezogene Veränderungen der Zellen zu vermeiden. Bei hohen Passagenzahlen (≥ 140 Passagen) können zahlreiche DNA-Translokationen und -deletionen nachgewiesen werden. HaCaT Zellen lassen sich einfach kultivieren und gehören zu den am meisten eingesetzten Hautmodellen bei *in vitro* Studien³².

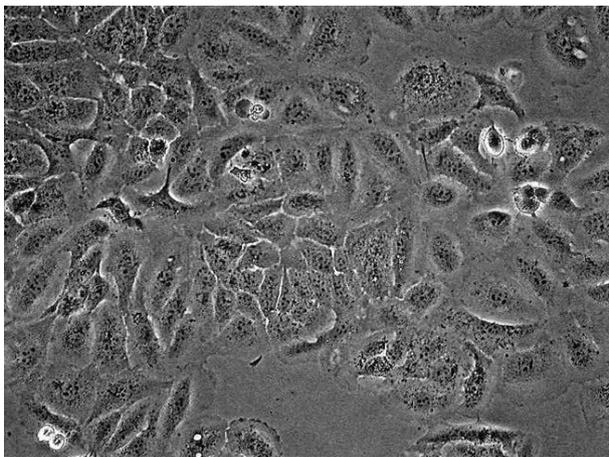


Abbildung 3: Mikroskopische Aufnahme von kultivierten HaCaT-Zellen (Monolayer)
(Quelle: <https://www.fishersci.com/shop/products/hacat-cells-t0020001/nc0309203>)

2.3 Sonnenstrahlung

Die menschliche Haut kommt als Kontaktorgan zur Umwelt nahezu täglich mit Sonnenstrahlung in Berührung, die sich auf Meereshöhe aus 6% ultravioletter (UVB, 280-320 nm und UVA 320-400 nm), 52% sichtbarer (VIS, 400-700 nm) und 42% infraroter (IR, 700 nm-1 mm) Strahlung zusammensetzt (Norm CIE 85 von 1989)³³. Prinzipiell ist eine regelmäßige Sonnenbestrahlung essentiell für den menschlichen Körper, besonders für die Bildung von Vitamin D und daher ein wichtiger Faktor für Gesundheit und Wohlbefinden³⁴.

Es ist aber auch bekannt, dass eine erhöhte Sonnenexposition zur Bildung von freien Radikalen (oxidativem Stress) führt. Häufig treten freie Radikale in Form von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) auf. Sie besitzen ein ungepaartes Elektron und sind somit sehr reaktionsfreudig. Sie können mit anderen nicht-radikalischen Molekülen reagieren, wodurch diese ebenfalls in neue freie Radikale verwandelt werden und eine Kettenreaktion induziert wird, die z.B. zelluläre Strukturen oxidieren lässt.

Eine Untersuchung des Einflusses verschiedener Spektralbereiche auf die Radikalproduktion in der Haut zeigte bei *in vivo*-Untersuchungen unterschiedlich starke Tendenzen auf: UV förderte die stärkste Radikalformierung, gefolgt von VIS- und NIR-Bestrahlung^{35, 36}. UV ist für mindestens 50% der ROS-Bildung verantwortlich, die restlichen Radikale werden durch die VIS/NIR-Strahlung erzeugt³⁷ (Abbildung 4).

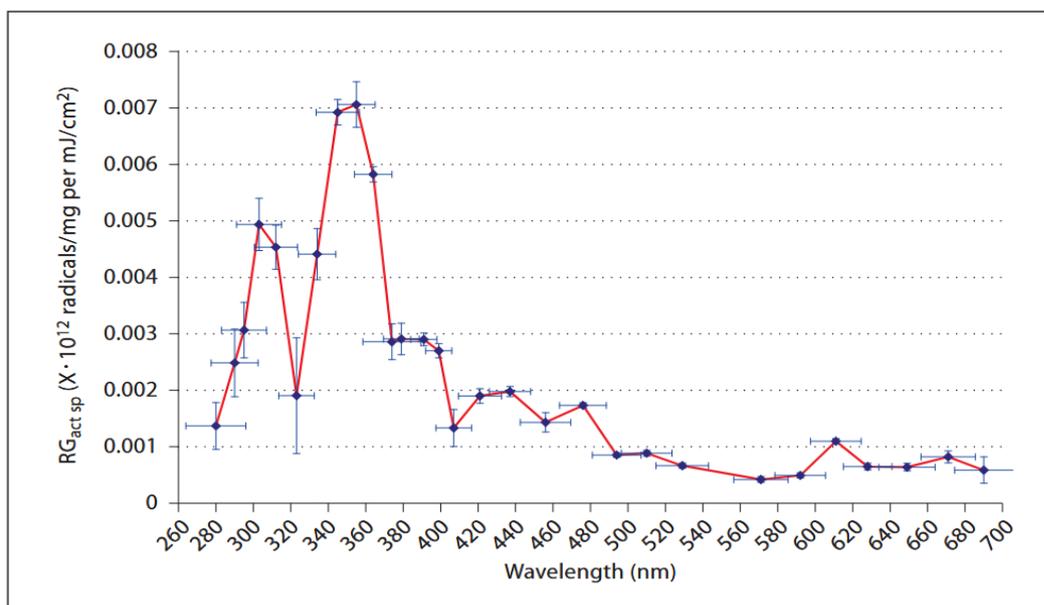


Abbildung 4: Aktionsspektrum der Haut.

Wellenlängenabhängigkeit für die Generierung von freien Radikalen ($RG_{act\ sp} = X \times 10^{12}$ Radikale / mg Haut pro mJ/cm^2 und pro nm)

Quelle: *Skin Pharmacol Physiol.* 2009;22(1):31-44..The missing link--light-induced (280-1,600 nm) free radical formation in human skin.

Zastrow L¹, Groth N, Klein F, Kockott D, Lademann J, Renneberg R, Ferrero L

2.3.1 UV- und VIS/NIR-Strahlung

Als UV-Strahlung wird die elektromagnetische Strahlung im Wellenbereich von 200 bis 400 nm bezeichnet. Man unterscheidet in diesem Bereich die UVC - (200-280nm) von der UVB - (280-320nm) und der UVA- (320-400nm) Strahlung. Die menschliche Haut kommt jedoch nur mit der UVB- und UVA-Strahlung in Kontakt, die UVC Strahlung wird schon vorher nahezu vollständig von der Ozonschicht absorbiert.

Einen Teil der UV-Strahlung absorbiert die menschliche Haut im *Stratum corneum*, die anderen Teile werden reflektiert oder diffus gestreut. Die Eindringtiefe des UV- Lichtes in die Haut ist abhängig vom Energiegehalt; je höher der Energiegehalt desto geringer ist die Eindringtiefe (Abbildung 5).

Die kurzwellige und energiereiche UVB-Strahlung schafft es nur bis in die Epidermis, während die langwellige und energiearme UVA- Strahlung bis in die Dermis und zum Teil auch Subkutis vordringen kann. UVA Strahlung macht insgesamt 95% der Gesamtheit der UV-Strahlung aus, UVB nur 5%.

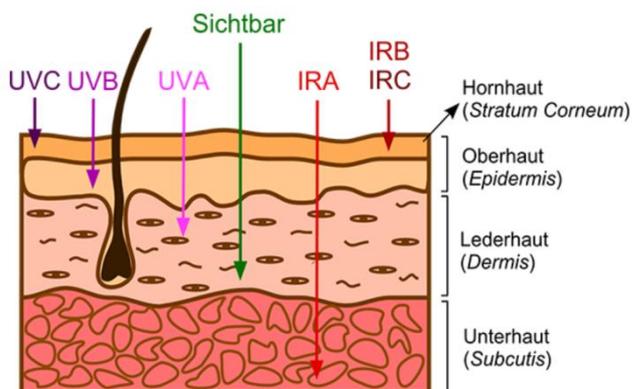


Abbildung 5: Eindringtiefe von UVC-,UVB-,UVA- Strahlen sowie sichtbarem und nahen Infrarot-Licht in die Haut.

(Quelle:https://www.baua.de/DE/Themen/Arbeitsgestaltung-im-Betrieb/Physikalische-Faktoren-und-Arbeitsumgebung/Optische-Strahlung/_functions/Haut.html)

Durch die niedrigere Energiezufuhr, kann die VIS und NIR-Strahlung, auch als Wärmestrahlung bezeichnet, besonders tief in das Gewebe eindringen und kann sogar die Subkutis erreichen. VIS-Bestrahlung induziert nicht nur direkt die Bildung von ROS, sondern es werden durch diese Bestrahlung auch vermehrt intrazelluläre Vorgänge ausgelöst, die mit Verzögerung zu oxidativem Stress führen²¹. Sehr viel langsamer sind die negativen Effekte bei der NIR Strahlung sie können nicht direkt zur Bildung von ROS führen, aber Prozesse beschleunigen⁵.

2.3.2 Auswirkungen von Strahlung auf die Haut

Wie so oft in der Natur, entscheidet die Dosis über einen eventuellen Nutzen oder auch Schaden für den Organismus.

Die Bildung von freien Radikalen hat einen großen Einfluss auf den Körper und die Haut, besonders auf deren metabolische Prozesse.

Eine moderate Dosis von UV-Strahlung wirkt sich positiv auf den menschlichen Körper aus. Das Immunsystem wird gestärkt und es wirkt stimmungsaufhellend. UV-B-Strahlung ist besonders wichtig, da sie mit für die Vitamin D Synthese verantwortlich ist. Eine Überschreitung der physiologischen Dosis kann zu pathologischen Reaktionen in der Haut führen. Durch eine exzessive Sonnenexposition können sämtliche Hautschichten geschädigt werden. Ebenfalls wird eine frühzeitige Hautalterung induziert (Photoalterung)^{38, 39, 40}.

UV-B-Strahlung ist vornehmlich für die Entstehung von Sonnenbränden, allergischen Reaktionen der Haut aber auch für Hautkrebs verantwortlich.

UV-A-Strahlung fördert, aufgrund seines tieferen Eindringens in die Haut (Abbildung 5) eine erhöhte Bildung von freien Radikalen in Gewebe/Zellen, Pigmentstörungen und ebenfalls die Entstehung von Hautkrebs durch Schädigung der DNA.

Aber nicht nur die UV-Strahlung schadet der Haut, es konnte in mehreren Studien mit Human- und Schweinehaut *in vivo* nachgewiesen werden, dass auch die energieweichere Strahlung im NIR Bereich zur Bildung von freien Radikalen führt.

Vergleicht man die verschiedenen Strahlungen miteinander, so zeigt sich schon nach ca. 2 Minuten bei allen Wellenlängen die Bildung der sogenannten ROS. Es zeigen sich aber deutliche Unterschiede in Abhängigkeit zur Wellenlänge. UV-Licht bildet im Vergleich zu NIR Strahlung ca. fünfmal so viele Radikale. Ist das körpereigene Abwehrsystem nicht in der Lage, diese Effekte zu kompensieren, durch z.B. das antioxidative System, Apoptose oder andere Abwehrmechanismen, kann es u.a. zu Mutationen der DNA kommen, die zu einem späteren Zeitpunkt eine pathologische Veränderung, wie z.B. die Entstehung eines Melanoms begünstigen können.

2.4 Oxidativer Stress

Im Allgemeinen äußert sich oxidativer Stress in einem Ungleichgewicht zwischen dem antioxidativen Abwehrsystem des Körpers und reaktiven Metaboliten. Die Entstehung von freien Radikalen, vor allem reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), ist ein normaler Prozess

innerhalb des Körpers, der durch viele Stoffwechselfvorgänge, insbesondere dem Energiestoffwechsel und Reaktionen des unspezifischen Immunsystems, verursacht wird. Kommt es zu einer übermäßigen Radikalbildung, kann es zu einer verstärkten Oxidation von Zellbestandteilen kommen, wodurch Zell- und Gewebsschädigungen begünstigt werden (Abbildung 6).

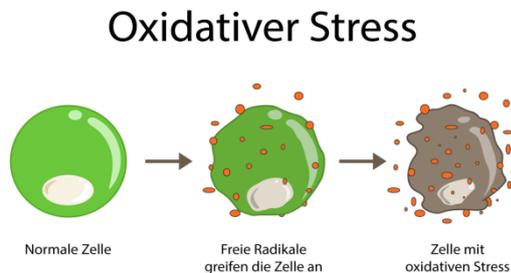


Abbildung 6: Schematische Abbildung **zur** Auswirkungen von freien Radikalen auf die Zelle (Quelle: <https://mein-tag.de/meine-medizin/wenn-oxidativer-stress-auf-anormale-proteine-trifft/>)

Um Schäden, die durch ROS verursacht werden können, besser zu kontrollieren und zu minimieren, steht den freien Radikalen das antioxidative Schutzsystem des Körpers gegenüber, das aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien (AO) besteht. Diese können entweder endogener (vom Körper selbst produziert) oder exogener Natur (mit der Nahrung zugeführt) sein. Kutane Carotinoide stellen lipophile exogene AO dar, die als Markersubstanz für die antioxidative Kapazität des Körpers angesehen werden können⁴¹. Für den Nachweis von ROS in Gewebe oder Zellkultur eignet sich die Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie, die eine sehr sensitive Methode darstellt⁴².

2.5 Antioxidantien

Antioxidantien (AOs) sind definiert als chemische Verbindungen, die in der Lage sind, eine Oxidation anderer Substanzen zu verlangsamen oder auch ganz zu verhindern. Sie unterstützen den Körper, indem sie als Radikalfänger reaktive Sauerstoffspezien inaktivieren, wenn diese die physiologische Menge überschreiten, die der Mensch für seine physiologischen Prozesse benötigt^{43, 44, 45}.

Viele AOs sind endogen, heißt physiologisch im Körper vorhanden, andere werden exogen dem Körper durch Nahrung zugeführt. Man unterscheidet generell also das endogene vom

exogenen System, wobei man innerhalb des endogenen Systems auch noch die enzymatischen von den nicht-enzymatischen unterscheidet.

Um den Körper ausreichend zu schützen braucht es ein komplexes Zusammenspiel beider Systeme, die sich gegenseitig beeinflussen können.

Tabelle 1:

Übersicht über die Zusammensetzung des antioxidativen Systems des Körpers.

Endogenes antioxidatives System		Exogenes antioxidatives System
Enzymatische Antioxidantien	Nicht-enzymatische Antioxidantien	Exogene Antioxidantien
Superoxide Dismutase (SOD)	Glutathion	Vitamin C
Catalase (CAT)	Coenzym Q10	Vitamin E
Glutathion Peroxidase (GPx)	Ubichinon	Carotinoide (u.a. α -Carotin, β -Carotin, Lycopin, Lutein)
Glutathion Disulfid Reductase	Bilirubin	Phytochemicals (Polyphenol, Flavonoide)
Glutathion-S-Transferase	Harnsäure	Spurenelemente, wie Selen und Zink

Die verschiedenen AOs haben unterschiedliche Wirkungsmuster; so unterscheidet man sogenannte Radikalfänger wie z.B. Vitamin E, Coenzym Q10, von den Reduktionsmitteln, z.B. Vitamin C.

2.5.1 Carotinoide (exogene AOs)

Carotinoide gehören zu den am weitest verbreiteten Antioxidantien, die mit der Nahrung dem Körper zugeführt werden müssen (exogene Antioxidantien)⁴⁶. Der menschliche Körper ist nicht in der Lage Carotinoide selbst zu synthetisieren, dies geschieht durch die Synthese in Pflanzen oder Mikroorganismen. Es handelt sich hierbei um sekundäre Pflanzenstoffe, die verschiedene Aufgaben im antioxidativen System übernehmen.

Es können zwei Gruppen von Carotinoiden unterschieden werden: Zur ersten Gruppe gehören Carotinoide, die aus nur aus Kohlenstoff und Wasserstoff aufgebaut sind, zur zweiten Gruppe zählen Carotinoide, die aus sauerstoffhaltigen Derivaten bestehen, den sogenannten Xanthophyllen⁴⁷.

Prinzipiell kommen Carotinoide in unterschiedlichen Lebensmitteln vor. Während die aus Kohlenstoff und Wasserstoff aufgebauten Carotinoide (z.B. β -Carotin oder Lycopin) eher in gelben oder orangefarbenen Gemüse vorkommen, sind die Xanthophylle eher in grünem Gemüse zu finden.

Auf Grund ihrer molekularen Struktur sind die Carotinoide Singulett-Sauerstoff-Inaktivatoren, wodurch Schädigungen durch ROS effektiv vermindert werden können.

Darüber hinaus können Carotinoide auch mit anderen durch UV-Strahlung gebildeten freien Radikalen reagieren, wodurch deren prooxidative Wirkung neutralisiert wird.

Im Dünndarm erfolgt die Absorption der Carotinoide durch die Mucosazellen. Über Lipoproteinpartikel gelangen sie dann ins Blut oder die Lymphe, wodurch sie im ganzen Körper verteilt werden. Da diese Partikel schnell durch das Enzym Lipoproteinlipase abgebaut werden, übernehmen sogenannte VLDL (very low density lipoproteins) den weiteren Transport, um dann im Plasma von LDL (low density lipoproteins) oder in seltenen Fällen von HDL (high density lipoproteins), übernommen zu werden.

Physiologisch sind beim Menschen je nach Ernährungsgewohnheiten und Sonnenexposition ca. 0,33-0,44 nmol/g Carotinoide im Blutplasma nachweisbar⁴⁸.

Jedoch wird die höchste Konzentration in der Epidermis und Subkutis nachgewiesen, ca 1,4 nmol/g - im Fettgewebe liegt sie sogar noch etwas höher⁴⁹.

Die Bioverfügbarkeit von Carotinoiden ist an die Nahrungszusammensetzung gebunden, da Carotine stark lipophil sind.

2.5.1.1 β -Carotin

Beta (β)-Carotin gehört mit zu den wichtigsten exogenen AOs und ist in vielen Nahrungsmitteln enthalten. Als wichtige Nahrungsquellen für β -Carotin sind z.B. Grünkohl und auch Karotten zu nennen, die einen sehr hohen Gehalt an β -Carotin aufweisen.

β -Carotin ist eines der effektivsten Radikalfänger und kann die Oxidation z. B. von Lipiden verhindern. Ebenso ist es in der Lage, sich im *Stratum Corneum* und im Unterhautfettgewebe anzureichern, wodurch es Strahlung absorbieren (Absorptionsmaximum bei 450 nm) und dadurch schädliche Auswirkungen auf die Haut verhindern kann. Carotinoide können allerdings auch bei zu hoher Konzentration oder auch bei hohem Sauerstoffpartialdruck eine prooxidative Wirkung haben.

Aufgebaut ist β -Carotin aus einer Kohlenstoffkette mit einer Ringstruktur an beiden Enden, diese sind durch eine Isoprenoidkette miteinander verbunden (Abbildung 7).

Insgesamt gibt es 9 konjugierte Doppelbindungen mit 4 Methylgruppen als Seitengruppen. Das Molekulargewicht beträgt 536,9 g/mol. Es besteht eine große Empfindlichkeit gegenüber Licht, Sauerstoff, Säuren wie auch hohen Temperaturen^{51, 50, 51}. Es handelt sich um eine kristalline Verbindung, welche nur in apolaren Lösungsmitteln löslich ist.

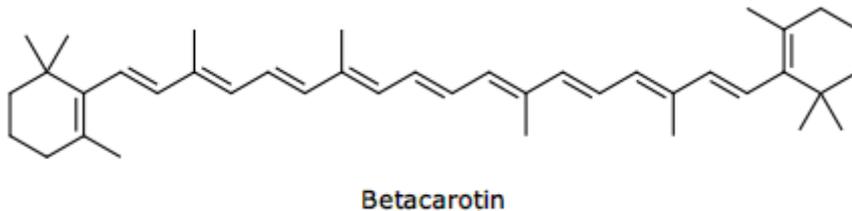


Abbildung 7: Strukturformel von *Betacarotin*
(Quelle: https://mylife-natureplus.de/img/cms/Betacarotin_1.png)

2.5.2 Glutathion (GSH, endogenes AO)

Glutathion (GSH) gehört zu den wasserlöslichen nicht-enzymatischen endogenen AOs und kommt in allen menschlichen Zellen vor.

Es ist ein Tripeptid und wird aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin gebildet. Aus diesen Aminosäuren wird es in einem zweistufigen Prozess synthetisiert.

GSH hält die reduzierenden Bedingungen in den Zellen aufrecht, indem es selbst oxidiert wird (Abbildung 8). Dies geschieht, indem sich zwei oxidierte GSH durch eine Disulfidbrücke verbinden und somit Glutathion-Disulfid (GSSG) entsteht. Die freien Sulfhydryl-(SH-) Gruppen des GSHs dienen als Elektronendonatoren, um die unbesetzte Stelle der freien Radikale zu besetzen und so unschädlich zu machen⁵².

Glutathion liegt in der Zelle in zwei verschiedenen Zuständen vor: als reduziertes GSH (Sulfhydryl) ca 99% in einer gesunden Zelle oder in der oxidierten Form GSSG (Disulfid)⁵³.

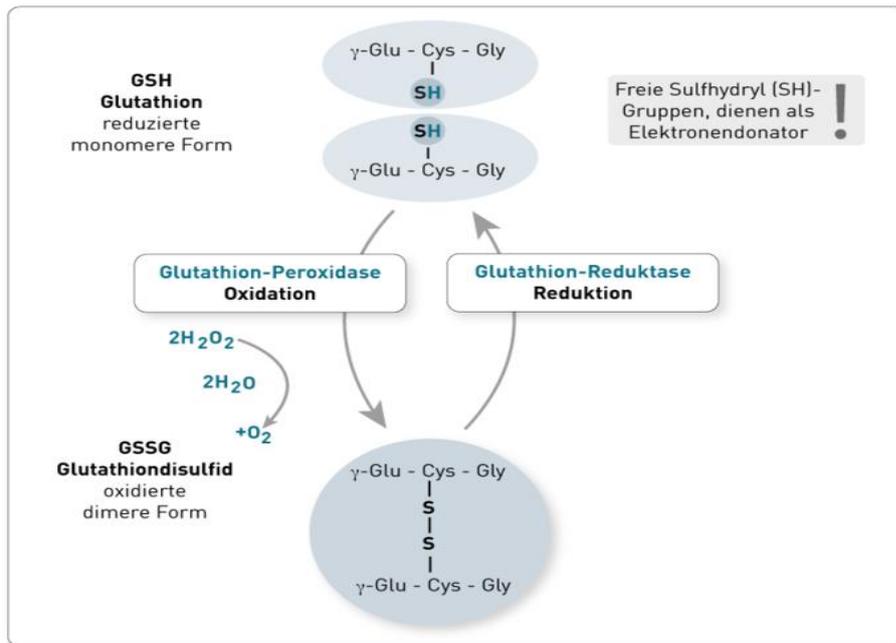


Abbildung 8: Reduktion und Oxidation von GSH

(Quelle: https://www.inflammatio.de/fileadmin/_processed_/5/6/csm_Gluthation_Abb_64f0edc187.png)

Die NADPH-abhängige Glutathionreduktase regeneriert GSSG zu GSH.

Prinzipiell versucht der Körper immer eine hohe Konzentration an reduziertem GSH in den Zellen aufrecht zu erhalten, um oxidativem Stress entgegenwirken zu können.

Die Konzentrationsbestimmung von der Gesamtmenge an Glutathion (GSH + GSSG) und GSSG erlaubt die Quantifizierung von GSH. Über das Verhältnis der beiden Moleküle lassen sich Rückschlüsse auf den oxidativen Stress innerhalb einer Zelle schließen⁵⁴.

2.6 Nanopartikel

Der Begriff Nanopartikel beschreibt Verbindungen von Atomen oder Molekülen, die laut Definition durch die Europäische Union eine Größe zwischen 1 und 100 Nanometern aufweisen, unabhängig ihres Aggregatzustandes⁵⁵. Nanopartikel finden Anwendung in der Medizin, Kosmetik, aber auch z. B. in der Lackindustrie.

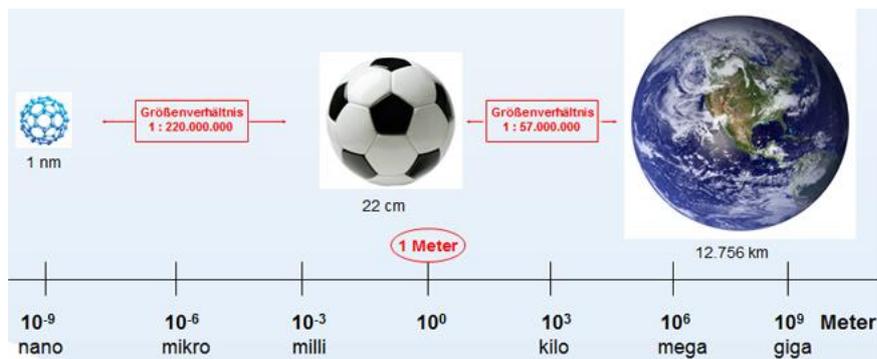


Abbildung 9: Größenvergleich Nano zu Gigameter

(Quelle: https://www.nanowissen.bayern.de/nanolab/mit_hightech_zwergen_auf_der_spur/pic/groesse_nvergleich.jpg)

2.6.1 Nanokristalle

Nanokristalle bestehen zu 100% aus dem reinen Wirkstoff, wodurch auch schwer lösliche Stoffe eine weitaus höhere Bioverfügbarkeit erreichen^{56,57}. Es ist somit keine Matrix aus z. B. Polymeren mehr nötig und sie besitzen sowohl eine höhere Sättigungslöslichkeit wie auch eine erhöhte Lösungsgeschwindigkeit, wenn man sie mit z.B. Mikropulvern vergleicht. Sie können somit leichter und schneller z.B. in Zellen aufgenommen werden⁶¹. Sie weisen nur eine Größe von einigen nm bis ≤ 100 nm auf.

Nanokristalle werden durch eine sogenannte Nassmahlung oder durch Hochdruckhomogenisation gewonnen, man erhält dadurch eine Nanosuspension, die sehr leicht in verschiedenen Formen weiter zu verarbeiten ist⁵⁸.

3. Zielsetzung

Die formulierte Hypothese dieser Arbeit war: „ β -Carotin schützt Hautzellen vor exogenem Stress“.

Vorab musste hierfür ein gut reproduzierbarer und moderater exogene Stressfaktor für die Zellen gefunden werden. Hierbei wurde als Stressor neben VIS/NIR Strahlung auch erhöhte Temperatur untersucht. Gemessen wurde die Radikalproduktion der sekundären Keratinozyten (HaCaT-Zellen) mittels der ESR-Spektroskopie. Abzuklären war auch wie und in welcher Konzentration das β -Carotin in die Zellen gelangen sollte. Die Aufnahme von β -Carotin Nanokristallen wurde mittels Raman Spektroskopie nachgewiesen und die Zellviabilität nach Gabe verschiedener Konzentrationen überprüft. In der finalen Testung sollte der Schutzeffekt von β -Carotin in zwei Konzentrationen untersucht werden und inwiefern die Zugabe von β -Carotin das endogene antioxidative System beeinflusst. Hierfür wurde zusätzlich zu den Radikalmessungen das Glutathion-Level (reduzierte und oxidierte Form: GSH/ GSSG) als Vertreter des endogenen antioxidativen Systems vor/nach Bestrahlung sowie vor/nach gezielter Supplementation mit den unterschiedlichen β -Carotin-Konzentrationen, charakterisiert, um das Zusammenspiel des endogenen und exogenen antioxidativen Systems nach moderater Stressinduktion näher zu untersuchen.

4. Material und Methoden

4.1 Studiendesign

Für die Studie musste vorab ein exogener moderater Stress festgelegt werden. Getestet wurden neben VIS/NIR-Bestrahlung auch unterschiedliche Temperaturen und die NIR-Bestrahlung alleine (Abbildung 10).



Abbildung 10: Schematische Darstellung der ersten Testungen im ESR mit 42°C, 37°C, 22°C und dem NIR Strahlungsbereich

Temperaturstress sowie NIR-Bestrahlung brachten im vorgesehen Zeitintervall nicht die gewünschte Radikalproduktion, weshalb die VIS/NIR-Bestrahlung ausgewählt wurde.



Abbildung 11 a: Finales Studiendesign, RRS Testungen zur β-Carotin Aufnahme, Zellviabilitätstestungen mit Trypan Blau und XTT



Abbildung 12 b: *Finales Studiendesign, ESR Testungen der 6 finalen Proben mit abschließender Bestimmung des GSH/GSSG*

Der Nachweis, dass UV-Bestrahlung starken oxidativen Stress auslöst, ist schon vielfach erbracht worden^{59, 60}. In dieser Studie wurde ein moderater Stress in Form von VIS/NIR-Bestrahlung gewählt.

Die Zellviabilität nach Bestrahlung wurde stets mit Trypan-Blau überprüft. Als Antioxidant wurde β -Carotin als Nanokristall verwendet.

Der Nachweis der Aufnahme wurde durch die Resonanz Raman Spektroskopie (RRS) ermittelt. Mittels eines Zellviabilitätstests (XTT) wurde die Verträglichkeit unterschiedlicher β -Carotin Konzentrationen untersucht, orientiert wurde sich hier an der physiologischen Konzentration im humanen Blutplasma. Final verwendet wurde die Konzentration von 0,1 und 0,02 $\mu\text{g/ml}$.

Die Radikalproduktion wurde nach einer Stunde Inkubationszeit von β -Carotin mit der ESR-Spektroskopie in einem Messzeitraum von 32 min untersucht unter Verwendung eines Biotemperators (37°C), um weiteren exogenen Stress (Temperaturstress) auszuschließen.

Tabelle 2: Verwendete Einstellungen für die ESR-Messungen

VERWENDETE EINSTELLUNGEN FÜR DIE ESR-MESSUNGEN	
Temperatur	37°C, Biotemperatur
Filter	Sonnensimulator, VIS new Filter (400FH90-50S), > 400 nm
Bestrahlungsbereich	VIS/NIR (400 – 2000 nm)
Leistung	46,8J/cm ²
Messzeit	32 Minuten
Messintervall	alle 4 Minuten

Getestet wurden abschließend die folgenden 6 Proben (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht der gemessenen ESR-Proben

ÜBERSICHT DER GEMESSENEN ESR-PROBEN					
Kontrolle (unbehandelt)	VIS/NIR	β-Carotin 0,1 µg/ml	β-Carotin 0,02 µg/ml	β-Carotin 0,1 µg/ml + VIS/NIR	β-Carotin 0,02 µg/ml + VIS/NIR

Nach der VIS/NIR-Bestrahlung mit und ohne Supplementation von β-Carotin wurden die 6 Proben für die Untersuchung im Anschluss auf ihren antioxidativen Status (β-Carotin (4.4), GSH/GSSG (4.5)) untersucht.

4.2 Nanopartikelformulierung

Für die Untersuchung der Wirkung einer gezielten Supplementation mit β-Carotin auf das antioxidative System von Hautzellen, wurde β-Carotin der Firma Sigma Aldrich, (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die β-Carotin Nanokristalle wurden von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Cornelia Keck (Universität Marburg) zur Verfügung gestellt. Hierfür wurden 3g der noch unbearbeiteten Suspension, welche 5% β-Carotin und 2,5% Alkyl Polyglycoside (Plantecare 2000, BASF, Deutschland) als Stabilisator enthielt, verwendet. Dieses wurde mit 100% destilliertem Wasser in einer Phiole mit Mahlperlen – (3 g (Ø 0.1 mm) und mit Zirkonperlen (3 g, Ø 0.5 mm) (Fritsch, Idar Oberstein, Deutschland) - zum Zerkleinern

gegeben. Für 8 Stunden wurde die Suspension dann in einem Magnetrührer bei 800rpm verarbeitet und konstant auf unter 10°C heruntergekühlt⁶¹.

Überprüft wurde die Größe/Größenverteilung der Partikel dann anschließend durch die Messung der dynamische Lichtstreuung (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK), durch Laserbeugung (LD Mastersizer 2000, Malvern Instruments, UK) und durch Lichtmikroskopie (DM1000, Leica Microsystems, Deutschland). Der abschließende Durchmesser der β -Carotin-Kristalle entsprach in etwa 150 nm.

Mit dem Verfahren der Laserbeugung und der zusätzlichen Kontrolle durch die Lichtmikroskopie wurde das Vorhandensein größerer Partikel ausgeschlossen. Die Verteilung der Partikel wurde durch die dynamische Lichtstreuungsmessung geprüft; der Polydispersitätsindex lag unter 0,25. Dieser Index beschreibt die Molekulargewichtsverteilung einzelner Molekülmassen in Proben von polymeren Stoffen. Die Verteilung ist wichtig für die späteren physikalischen, mechanischen und rheologischen Eigenschaften⁶².

4.3 Zellkultur

4.3.1 Zelllinie – Keratinozyten

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um sekundäre Keratinozyten aus der HaCaT Zelllinie (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Cell line service, item Nummer: 300493 Deutschland) mit der Passagenzahl 49.

4.3.2 Zellkultivierung

Um die HaCaT-Keratinozyten nicht vorzeitigem Stress auszusetzen, wurden alle Reagenzien vor Beginn auf 37°C erwärmt.

Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) unter Zugabe von 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 2% Glutamine (Biochrom, Berlin, Deutschland) und 10% FCS (PAA Laboratories, Vienna, Österreich) kultiviert.

Kultiviert wurde in 75 cm² Flaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit.

Nach dem Erreichen einer Konfluenz von ca 80%, wurden die Zellen über eine Trypsination (0,5% Trypsin und 0,2% EDTA, Gibco, Introgen, Carlsbad, CA, USA) geerntet, gezählt und anschließend wieder in einer neuen 75 cm² Flasche ausgesät oder für die experimentellen Untersuchungen verwendet.

4.3.3 Zellviabilitätsbestimmung (XTT-Assay)

Für die Vitalitätsbestimmung der Zellen wurde mit dem auf Tetrazoliumsalz basierenden XTT Assay (Roche, Berlin, Germany) gearbeitet. Hierbei handelt es sich um eine verbreitete Methode, um die Vitalität metabolisch aktiver Zellen nachzuweisen.

In den Mitochondrien der aktiven Zellen wird das gelbe Tetrazoliumsalz XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid) durch Reduktasen der Atmungskette zu Formazan metabolisiert (Abbildung 12), dieses färbt sich orange. Dieser Farbumschlag ist durch Messung der optischen Dichte nachweisbar. Die Intensität des Farbumschlages ist direkt proportional zur Zellviabilität.

Für die Untersuchungen wurden 1.5×10^4 Zellen/Well in einer 96-Mikrowell-Platte (Falcon®, VWR, Darmstadt, Deutschland) für 24h bei 37°C und 45% CO₂ inkubiert.

Nach dieser Zeit wurden 100 µl RPMI-Medium mit verschiedenen β-Carotin Konzentrationen versetzt (0,2 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,08 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,02 µg/ml) und die Zellen erneut für eine Stunde bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Die finalen Konzentrationen an β-Carotin für die ESR-Testungen orientierten sich an der physiologischen Konzentration im Blutplasma und wurde durch vorangegangene Viabilitätsuntersuchungen festgelegt.

Eine Positivkontrolle zur Überprüfung des Testverfahrens wurde mit Triton-X (0,1%, Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Nach der einstündigen Inkubationszeit wurden der Überstand mit β-Carotin nach Zentrifugation (beginnend mit 7 Minuten mit 380 g, dann 1 Minute bei 1.6×10^4 g) vorsichtig entfernt, ohne das sich abgesetzte Zellpellet zu berühren. Das am Boden des Gefäßes übrig gebliebene Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und anschließend wird 100 µl RPMI Medium ohne Phenolrot versetzt. Es erfolgte die Zugabe von 50 µl/Well der XTT-Arbeitslösung, auf 50 µl/well der Zellsuspension und ein vorsichtiges Mischen der Lösungen. Nach erneuter Inkubation für 2 Stunden im CO₂-Inkubator (37°C) wurde die Platte noch einmal vorsichtig bewegt, um den Farbstoff gut zu verteilen. Wichtig war die Vermeidung von Luftblasen für das Messen der Platte.

Um die Zellviabilität nachzuweisen, wurde die Absorption bei 492 nm und die Referenz bei 690 nm mittels einem ELISA Reader (Enspire, PerkinElmer, Waltham, USA) durchgeführt.

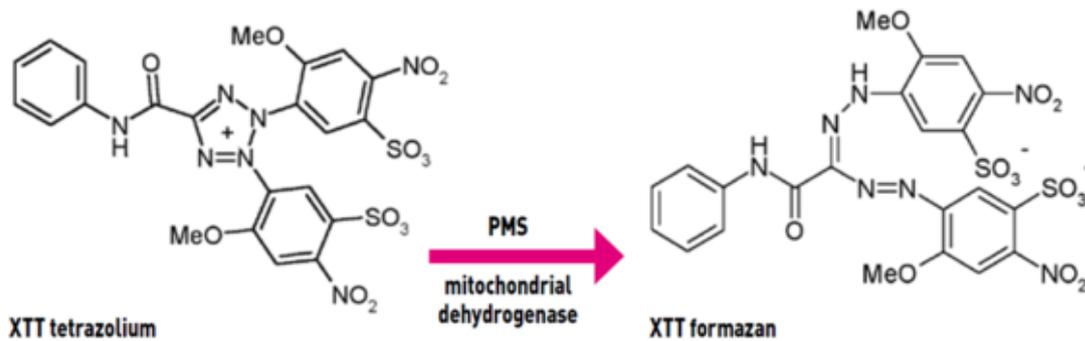


Abbildung 13: Reduktion von XTT zur Bildung des farbigen Formazanderivats.
 (Quelle: <https://www.creative-bioarray.com/support/colorimetric-cell-viability-assay.htm>)

4.3.4 Trypan-Blau-Färbung

Die Trypan-Blau-Färbung (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) ist eine Standardmethode zum Nachweis der Zellviabilität. Chemisch handelt es sich um einen anionischen Diazofarbstoff, der sich an Proteine bindet⁶³ (Abbildung 13). Andere Namen sind auch: 3,3'-Dimethyl-4,4'-bis(5-amino-4-hydroxy-2,7-disulfonaphthyl-3-azo)-[1,1'-biphenyl], Benzaminblau oder Direkt Blau 14.

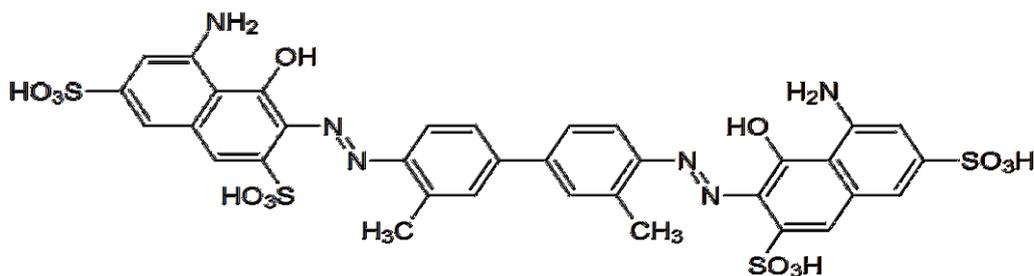


Abbildung 14: Strukturformel von Trypan Blau

(Quelle : Von Kuebi = Armin Kübelbeck - own work, made with BKchem, Gemeinfrei,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5829625>)

Der Farbstoff Trypan-Blau kann nicht ins Innere einer intakten Zelle gelangen und färbt somit nur geschädigte oder tote Zellen, die eine geschädigte Zellmembran aufweisen, dunkelblau an. Nicht durch die Färbung zu beurteilen ist, ob eine Zelle noch voll funktionsfähig ist. Trypan-Blau ist stark zytotoxisch, so dass eine Auswertung innerhalb weniger Minuten stattfinden muss, um Verfälschungen zu vermeiden. Es findet neben der Anwendung zur Zellviabilitätsbestimmung auch Anwendung in der Augen Chirurgie; hier um erkranktes Gewebe zu markieren.

Nach allen durchgeführten ESR-Messungen wurde die Zellviabilität mittels dieser Färbung überprüft. Dafür wurden jeweils 100 μl der zu untersuchenden Zellsuspension mit 20 μl Trypan-Blau für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Auszählung wurden dann 10 μl verwendet und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter einem Leica DMi 1 Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) gezählt. Dadurch konnte das Verhältnis von toten zu lebenden Zellen bestimmt werden.

4.4 Elektronenspinresonanz (ESR) -Spektroskopie

Um oxidativen Stress in Hautzellen nachweisen zu können, ist die Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie gut geeignet. Man nennt sie auch paramagnetische Spektroskopie, weil man mit ihr paramagnetische Stoffe untersuchen kann. Dies wird ermöglicht, wenn ein oder auch mehrere ungepaarte Elektronen vorhanden sind. Diese ungepaarten Elektronen sind permanent in Bewegung und durch ihren quantenmechanischen Eigendrehimpuls können sie ein magnetisches Feld erzeugen.

Der Aufbau des ESR-Gerätes besteht aus einer Mikrowelleneinheit, die während der Messung die Frequenz der Mikrowelle konstant hält und einem äußeren variablen Magnetfeld. Bringt man ein ungepaartes Elektron in dieses Magnetfeld, spaltet es sich durch die Mikrowellen-Strahlung in zwei Energieniveaus auf: den Grundzustand des Elektrons E_- und dem aktivierten Zustand E_+ . Man nennt diese Energie-Aufspaltung den *Zeeman-Effekt*. Er ist proportional zum von außen angelegten Magnetfeld (Abbildung 14). Um vom energetisch niederen Energieniveau auf das angeregte Energieniveau zu kommen, muss Energie in Form von Mikrowellenstrahlung absorbiert werden (Resonanzbedingung). Je stärker das äußere Magnetfeld ist desto stärker ist die Aufspaltung. Als ESR-Signal erhält man dann nicht das Absorptionssignal, sondern die erste Ableitung.

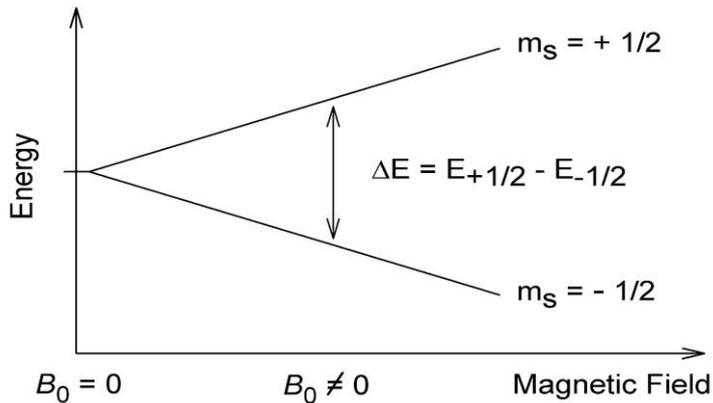


Abbildung 15: Aufspaltung von Elektronen in einem von außen angelegten Magnetfeld (Zeeman-Effekt) https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/a9/EPR_splitting.jpg/1280px-EPR_splitting.jpgQuelle:

4.4.1 Spinmarker Tempo

Da freie Radikale sehr reaktionsfreudig sind, wurde als stabilisierende Markersubstanz das semistabile Radikal TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy) verwendet (Abbildung 15). TEMPO besitzt ein ungepaartes freies Elektron und damit ein paramagnetisches Moment. Man nennt einen solchen Stoff auch Radikalfänger. TEMPO kann mit freien Radikalen reagieren und bildet einen Komplex, der mit der ESR-Spektroskopie nicht mehr detektierbar ist⁶⁴.

Im Versuch wird das ESR-Signal des ungebundenen Markers TEMPO gemessen, welches umgekehrt proportional zur Anzahl der freien Radikale in der Probe ist. Das heißt, je mehr nicht detektierbares TEMPO vorhanden ist, um so mehr freie Radikale wurden gebildet und das Signal fällt über die Zeit ab (Abbildung 16).

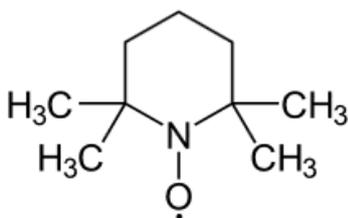


Abbildung 16: Strukturformel des ESR-Markers TEMPO. (Quelle: Von NEUROtiker - Eigenes Werk, Gemeinfrei, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3519555>).

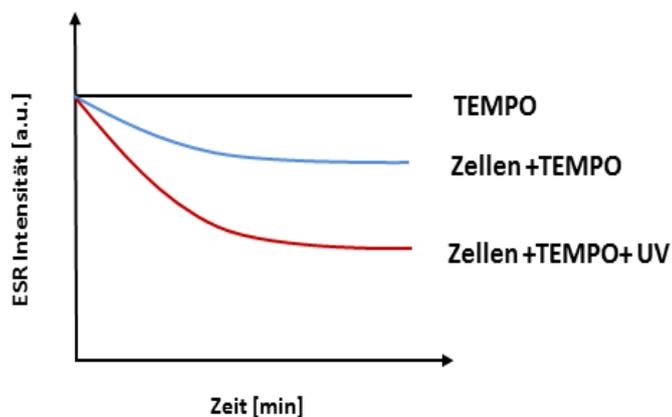


Abbildung 17: Schematische Darstellung von ESR-Messungen mit dem ESR-Marker TEMPO; Markerlösung (schwarz), Markerlösung mit Zellen zur Erfassung der metabolischen Aktivität (blau), Markerlösung mit Zellen und externer Bestrahlung zur Beurteilung der Radikalinduzierung durch UV-Bestrahlung (rot).

4.4.2 Durchführung von ESR-Messungen

Um die Entstehung von oxidativem Stress in den HaCaT-Zellen nachzuweisen, wurde ein X-Band-ESR-Spektrometer (MiniScope MS 400, Magnettech, Berlin, Deutschland) verwendet. Folgende Messparameter wurden hierbei eingestellt: Mikrowellenfrequenz 9,4 GHz, Mikrowellen Leistung 10 mW, Magnetfeld 336 mT, Sweep 5,3 mT, Modulationsamplitude 0,2 mT, Mikrowellendämpfung : 10 dB, Sweep Zeit 20 s. Während der Testung wurde als Spinmarker TEMPO (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) verwendet.

Für die ESR Messungen wurden jeweils 1×10^6 Zellen/ml zuvor mit β -Carotin (0,02 und 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für eine Stunde bei 37°C , 5% CO_2 und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Diese beiden Konzentrationen wurden auf Grund ihrer guten Ergebnisse bei den vorangegangenen Zellviabilitätsuntersuchungen mittels XTT ausgewählt.

Danach wurde der Überstand vorsichtig entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Um den Metabolismus der Zelle zwischen den Testungen zu gewährleisten, wurde das Zellpellet in einer PBS/Glukose Lösung (1 mg/ml) (Merck, Darmstadt, Deutschland) resuspendiert. Bis zur Testung im ESR-Gerät wurden die Proben in einem Wasserbad mit konstanten 37°C aufbewahrt, um zusätzlichen Stress durch Temperaturänderungen zu vermeiden.

Unmittelbar vor der Messung im ESR-Gerät wurde die zu untersuchende Probe mit dem Spinmarker TEMPO (Stammlösung: 1 mM in PBS), versetzt (Endkonzentration: 5 μM).

Für die Versuche wurden 500 μl der mit TEMPO angereicherten Zellsuspension in eine spezielle Zellküvette (Magnettech, Berlin, Deutschland) gefüllt. Beim Befüllen der Küvette

war darauf zu achten, dass keine Luftblasen entstehen, die die ESR-Messung beeinflussen könnten.

Um auch hier sicherzustellen, dass kein zusätzlicher externer Stress die Messergebnisse verfälscht, wurde ein Biotemperatur (BTC01, Magnettech, Berlin, Deutschland) verwendet, der die Temperatur konstant bei 37°C hielt.

Für die Auswertung der Daten wurde die Analyse-Software Mplot (Magnettech, Berlin, Germany) genutzt.

Hierbei wurde die temporäre Verringerung des am Anfang gemessenen TEMPO Spektrums (peak to peak analysis) berechnet.

Alle Ergebnisse wurden zu den unbehandelten Kontrollzellen normiert.

Für Ergebnisse der Versuchsreihe (n=6) wurden die entsprechenden Mittelwerte berechnet.

4.5 Bestrahlung

Für die Bestrahlung der Zellen im Rahmen der ESR-Testung wurde ein Sonnensimulator (Low Cost Solar Simulator LS0104 mit einer Type Xenon short arc 150W, LOT-Quantum Design GmbH) mit einer optischen Faser VIS/NIR (420-2000 nm; LOT-Quantum Design GmbH) in Kombination mit einem Langwellenfilter 400FH90-50s (LOT-Quantum Design GmbH) verwendet. Bestrahlt wurde im Bereich des nahen Infrarot (IR) und des sichtbaren Lichts (VIS) bei 400 nm - 2000 nm.

Die Zellen wurden mit einer Bestrahlungsdosis von 46,8 J/cm² bestrahlt. Vor und nach jeder Testreihe wurde die Intensität der Bestrahlung mit einem Leistungsmessgerät überprüft. Direkt nach der Initialmessung jeder Probe wurde mit der kontinuierlichen Bestrahlung begonnen.

4.6 Resonanz -Raman-Spektroskopie (RRS)

Benannt nach dem indischen Physiker und Nobelpreisträger Chandrasekhara Venkata Raman beschreibt der sogenannte Raman-Effekt die Wechselwirkung zwischen der Elektronenhülle eines bestrahlten Moleküls und der angesetzten elektromagnetischen Strahlung. Es handelt es sich hierbei um eine Methode zur spektroskopische Untersuchung von Molekülen oder anderen Festkörpern unter zur Hilfenahme inelastischer Streuung des Lichts. Der zurückgeworfene Strahl eines monochromatischen Lichts, üblicherweise ein Laser, wird durch die angestrahlte Probe verändert. Der kleinere Teil der Probe der inelastisch gestreut wird, nennt sich Ramanstrahlung. Der Rest des Strahls wird elastisch

gestreut und der einfallende Strahl und das Streulicht haben die gleiche Frequenz und Energie. Angeregt wird in der klassischen Ramanspektroskopie in einem virtuellen Zustand. Es ist mit dieser Methode möglich, bestimmte Moleküle nachzuweisen⁶⁶.

In dieser Arbeit wurde die Methode der resonanten Ramanspektroskopie angewandt. Hierbei wird nur ein Teil des Proteins durch den Laser angeregt und das daraus resultierende Streulicht dann ausgewertet. Der größte Teil besteht aus der sogenannten Rayleigh-Streuung, einige der Linien sind hier jedoch um den Betrag einer Schwingungsanregung verschoben. Diese Verschiebungen relativ zur Anregungswellenlänge bilden dann das Raman-Spektrum. Da die klassischen Ramanlinien viel kleiner sind, können sie in diesem Spektrum nicht gesehen werden. Zur Bestimmung des Gesamt-Carotinoid-Levels wurde Licht der Wellenlänge 488 nm verwendet, Lycopin kann mit einer Wellenlänge bei 514 nm detektiert werden (Abbildung 17)

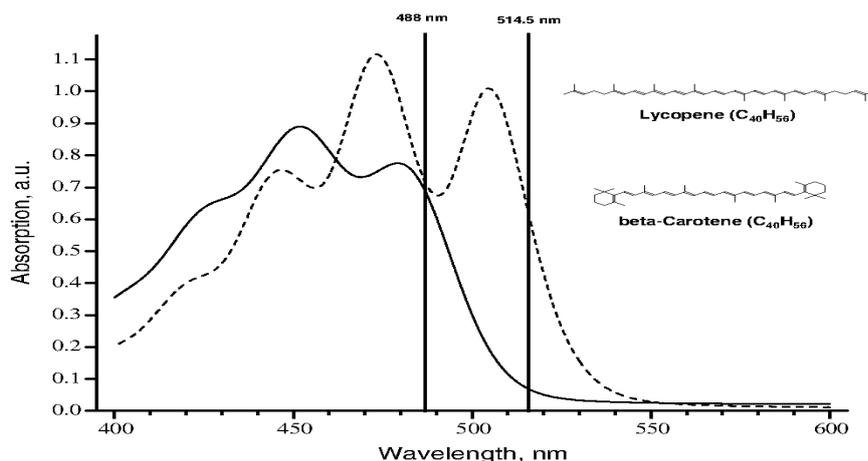


Abbildung 18: Absorption von β -Carotin und Lycopin

Quelle: https://www.spiedigitallibrary.org/ContentImages/Journals/JBOPFO/18/6/061230/FigureImages/JBO_18_6_061230_f001.png

Diese nicht-invasive, sehr empfindliche Messmethode, erlaubt es, β -Carotin in Gewebe oder Suspensionen nachzuweisen⁶⁵ und ist gerade bei wässrigen Proben sehr zuverlässig im Vergleich zur z.B. der Infrarot-Spektroskopie und somit für die Untersuchung von HaCaT Zellsuspensionen sehr geeignet.

4.6.1 Durchführung der RRS-Messungen

Um die Aufnahme von β -Carotin in lebenden Zellen nachzuweisen, wurde die Resonanz Raman Spektroskopie (RSS) verwendet.

Für die Messung wurden HaCaT-Zellen mit den zwei ausgewählten β -Carotin Konzentrationen (0,02 und 0,1 $\mu\text{g/ml}$) für 1 Stunde inkubiert. Danach wurden die intakten Zellen (1×10^6 Zellen/ml) gewaschen und in einer PBS/Glucose Lösung suspendiert und direkt mittels RRS gemessen. Dafür wurden 500 μl der Zellsuspension in eine 1,00 mm Quartz-Glasküvette (Hellma®Analytics GmbH, Müllheim, Deutschland) gefüllt und bei 488nm angeregt. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrollzellen verwendet.

Jede einzelne Probe wurde dreifach gemessen; insgesamt wurde die β -Carotin Aufnahme dreimal an unterschiedlichen Messtagen untersucht

4.7 Messung von reduziertem (GSH) und oxidiertem (GSSG) Glutathion

Um die Auswirkung einer gezielten Supplementation mit β -Carotin auf das endogene antioxidative System zu untersuchen, wurde das Verhältnis von reduziertem (GSH) zu oxidiertem (GSSG) Glutathion photometrisch bestimmt.

Für die Konzentrationsbestimmung wurde der Amplite™ Flourimetric Glutathion GSH/GSSG Ratio Assay Kit (AAT Bioquest, Sunnyvale, CA, U.S.A) verwendet, mit dem man reduziertes und oxidiertes GSH anhand eines nicht-fluoreszierenden Farbstoffes, der in Kombination mit GSH eine stark fluoreszierende Reaktion zeigt, nachweisen kann.

Von den vorbehandelten HaCaT-Zellen (1×10^6), die mit den ausgewählten β -Carotin-Konzentrationen (0,02 und 0,1 $\mu\text{g/ml}$) behandelt wurden, wurde nach der VIS/NIR-Bestrahlung im ESR-Gerät das Zelllysate gewonnen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und im Anschluss in eiskaltem Triton-X (0.1%ig) resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis gelagert. Danach wurden die Zellsuspensionen auf Eis für 90 Sekunden mit Ultraschall behandelt (UP100H, Hielscher Ultrasonics, Teltow, Deutschland). Um das Zelllysate zu gewinnen, wurde die Zellsuspension für 7 Minuten bei 380g und 1 Minute bei $1.6 \times 10^4\text{g}$ (Universal 320 R, Firma Hettich Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Für die weiteren Untersuchungen wurden 100 μl des Überstandes verwendet. Die nicht verwendeten Reste der Proben wurden bei -80°C eingefroren.

Für die Messung im ELISA Reader wurde eine 96Well-Platte verwendet (Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland) und 50 μl des Zelllysats mit entweder 50 μl des GSH Assays oder 50 μl der Total-GSH-Mixtur des Assays gemischt. Die Platte wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmessung bei einer Anregung von 490 nm und einer Emission von 520 nm.

Die Auswertung der Konzentrationen von reduziertem und oxidiertem GSH erfolgte mit einer erstellten Standardkurve von GSH und Total GSH. Insgesamt wurden drei Testreihen mit jeweiliger Doppelmessung untersucht.

4.8 Statistische Auswertung

Um die gewonnenen Daten statistisch auszuwerten, wurde das Programm IBM SPSS Statistics 22 (IBM, Chicago, Illinois, USA) verwendet. Dabei wurden zwei verschiedene Algorithmen angewendet. Der Generalized Estimating Equation (GEE) wurde zur Analyse eines gesamten Messzeitraums genutzt. Um die statistische Signifikanz zu einem bestimmten Zeitpunkt zu untersuchen, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Ab einem p-Wert von $\leq 0,05$ ergab sich eine statistische Signifikanz.

5. Ergebnisse

5.1 Testung moderater Stressfaktoren

Um die antioxidative Wirkung von β -Carotin zu untersuchen, musste zuvor eine Form von oxidativem Stress festgelegt werden, der die Zellen zwar signifikant stresst, sich aber nicht signifikant auf ihre Zellviabilität auswirkt. Zum Zweck dieser Untersuchungen wurden vorab verschiedene Messungen mit der ESR-Spektroskopie durchgeführt. Es wurde Bestrahlung im sichtbaren nahen IR Bereich sowie unterschiedliche Temperaturen (Abbildung 18) untersucht.

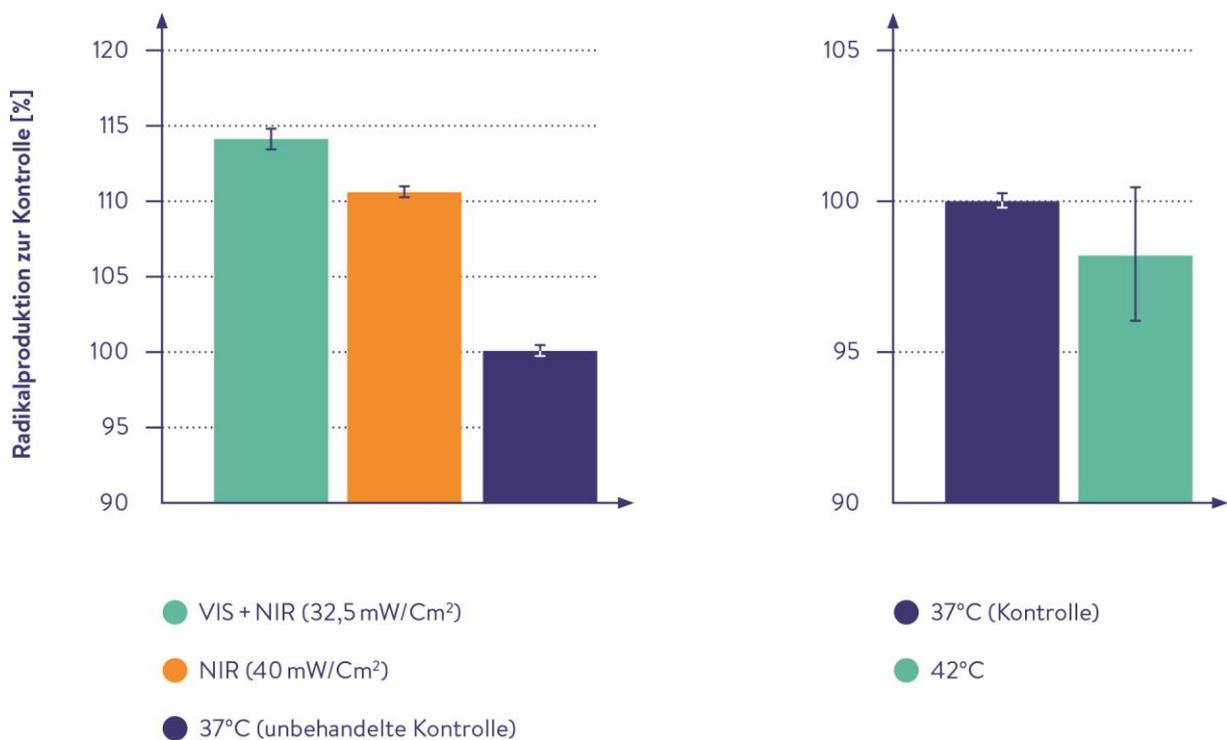


Abbildung 19: Untersuchung der Radikalproduktion nach 32 min Bestrahlung im VIS (32,5W/Cm²), NIR (40mW/Cm²) und 37°C (unbehandelte Kontrolle) und im Vergleich 37°C (Kontrolle und 42°C mittels der ESR-Spektroskopie unter der Verwendung des Spinmarkers TEMPO [5 μ M] (n=6); Mittelwert \pm SEM

In Abbildung 17 ist erkennbar, dass nach der Bestrahlung mit VIS und NIR die meisten Radikale in den HaCaT Zellen nach 32 Minuten gebildet werden. Es gibt einen deutlichen Anstieg in der Radikalproduktion der HaCaT-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (unbestrahlte Zellen). Wobei nur der VIS/NIR Bereich deutlich über 110% liegt. Vergleicht man die Testungen mit dem Stressfaktor Temperatur, physiologische Temperatur (37°C) versus erhöhter Temperatur (42°C) ist kein eindeutiger Anstieg in der Radikalproduktion im

Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen. In dem festgelegten Zeitraum von 32 Minuten konnte nur mit der Bestrahlung im Bereich VIS/NIR (400nm - 2000nm) ein moderater, aber messbarer Stress, im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

5.2 Zellviabilität (XTT)

Um die passende Konzentration an β -Carotin zu ermitteln, wurde die Zellviabilität der HaCaTt-Zellen mit einem Tetrazolium-Salz basierten Assay bestimmt (XTT). Hierbei wurde die Entwicklung von NAD(P)H durch Glycolyse gemessen, die mit dem Metabolismus aktiver Zellen korreliert. Die eingesetzten Konzentrationen an β -Carotin orientierten sich an den menschlichen Blutplasma-Konzentrationen die bei ca. 0,33-0,44 nmol/g Carotinoiden liegen

53

Nach einer Stunde Inkubation mit den unterschiedlichen β -Carotin Konzentrationen (0,02, 0,05, 0,08, 0,1 und 0,2 μ g/ml) ist keine signifikante Beeinflussung der Zellviabilität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Negativkontrolle) zu erkennen (Abbildung 19).

Eine β -Carotin Konzentration von 0,02 μ g/ml zeigte die geringsten Auswirkungen auf den Metabolismus (95%) der Zellen. Eine zehnfach höhere Konzentration hingegen (0,2 μ g/ml) zeigte den größten Einfluss auf den Zellmetabolismus (90%) im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Positivkontrolle wurde mit Triton X (0.1%) durchgeführt. Es zeigte sich eine verringerte Zellviabilität mit einer Signifikanz von $p \leq 0,01$.

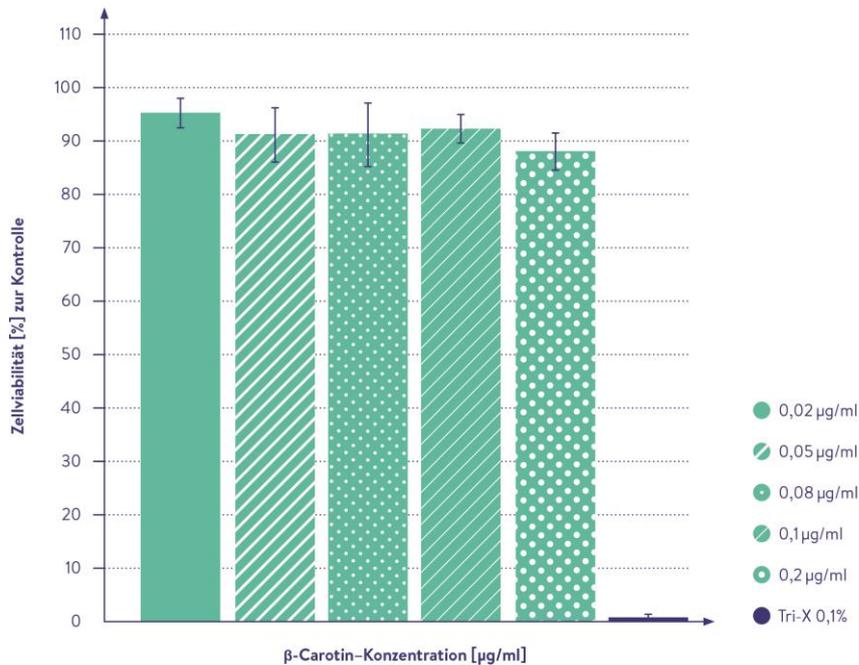


Abbildung 20: Zellviabilität der HaCaT Zellen nach 1 Stunde Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von β -Carotin Nanokristallen (0,02, 0,05, 0,08, 0,1 und 0,2 $\mu\text{g/ml}$) im Vergleich zu unbehandelten Zellen und einer positiv Kontrolle mit Triton X 0.1%, Mittelwert ($n=6$) \pm SEM, $**p \leq 0,01$.

Für die weiteren Untersuchungen wurden eine β -Carotin Konzentrationen von 0,02 und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ausgewählt.

5.3 Untersuchung der Zellaufnahme von ausgewählten β -Carotin Konzentrationen mittels RRS

Die RRS ermöglicht die Untersuchung der Konzentration von Carotinoiden in die Haut sowie auch in Blut/Flüssigkeiten^{45,46}. Um die Aufnahme der ausgewählten β -Carotin-Konzentrationen (0,02 und 0,1 $\mu\text{g/ml}$) in HaCaT-Keratinocyten zu untersuchen, wurde eine Wellenlänge von 488 nm verwendet. Nach einer Stunde Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Konzentrationen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und im Anschluss die Zellsuspensionen mittels RRS gemessen. Es kann gezeigt werden, dass β -Carotin-Nanokristalle generell von HaCaT-Zellen aufgenommen werden können. Es kann eine positive Korrelation zwischen der nachweisbaren Konzentration von β -Carotin in den Zellen und der Konzentration des supplementierten β -Carotins festgestellt werden (Abbildung 19). So erhöhte sich die Aufnahme des β -Carotins um den Faktor 4,5 bei einer Erhöhung auf die 5fache Dosis ($p \leq 0,05$).

Verglichen mit den unbehandelten Zellen zeigten die Zellen nach einer Inkubation mit der Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ eine Signifikanz von $p \leq 0,01$.

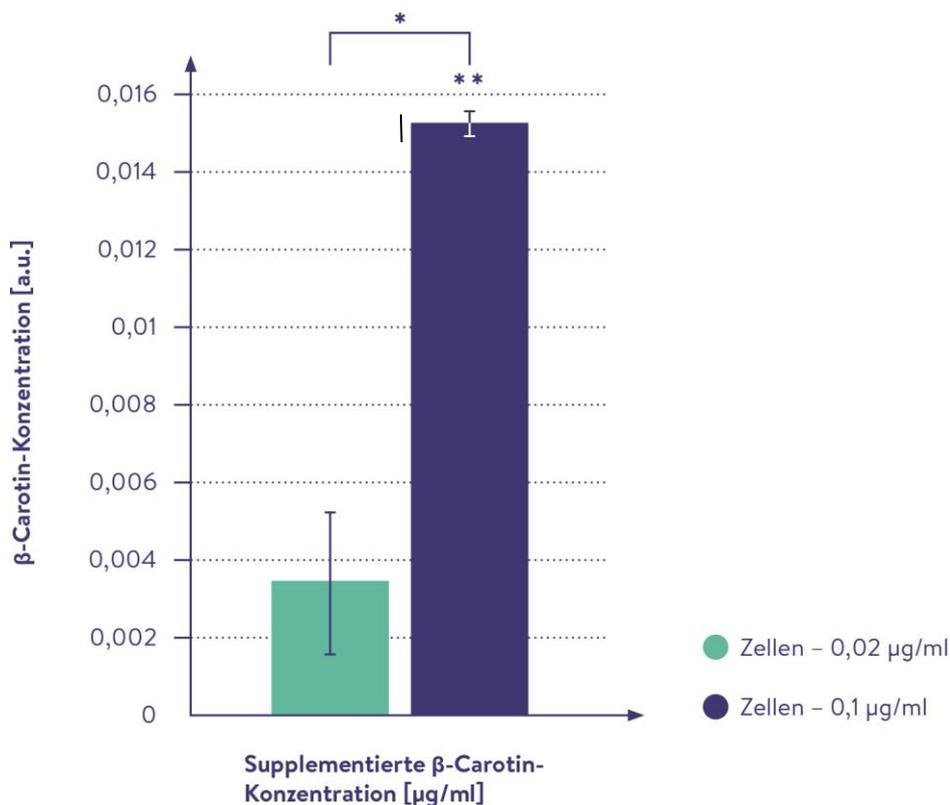


Abbildung 21: Messung der Aufnahme von β -Carotin-Nanokristallen (0,02 $\mu\text{g/ml}$ und 0,1 $\mu\text{g/ml}$) in HaCaT-Zellen mittels der Resonanten Raman Spektroskopie bei 488 nm.

5.4 Untersuchung der Radikalproduktion mittels der Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie

Um die Radikalproduktion vor und nach der VIS/NIR-Bestrahlung sowie mit den zwei unterschiedlichen β -Carotin-Konzentrationen zu untersuchen, wurde die ESR-Spektroskopie angewendet. Die Zellproben wurde hierzu direkt vor den ESR-Messungen mit dem Spinmarker TEMPO versetzt, das leicht von den Zellen aufgenommen werden kann und direkt mit freien Radikalen reagieren kann.

Es konnte nach der Aufnahme der zwei unterschiedlichen β -Carotin-Konzentrationen ein leichter oxidativer Stress nachgewiesen werden (Abbildung 20), im Vergleich zu den Kontrollzellen (ohne Bestrahlung bzw. ohne gezielter Supplementierung). Eine Konzentration von 0,02 $\mu\text{g/ml}$ β -Carotin förderte die Radikalproduktion um etwa 2%, wobei eine fünffach höhere Konzentration, im Vergleich zu den Kontrollzellen, die Radikalbildung um etwa 4% erhöhte. Durch vorhergehende Untersuchungen mit verschiedenen Strahlungsintensitäten und Temperaturen wurde eine Strahlung im VIS/NIR Bereich festgelegt. Es konnte bei dieser Bestrahlung eine Erhöhung des oxidativen Stresses um 10% im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen werden mit einer Signifikanz von $p \leq 0.01$. Eine Kombination der zuvor mit β -Carotin behandelten Zellen (1 Stunde Inkubation mit den zwei ausgewählten

Konzentrationen) gefolgt von einer Bestrahlung durch VIS/NIR konnte einen positiven Effekt des β -Carotins auf die Radikalentwicklung zeigen. Diese war, im Vergleich zu bestrahlten, nicht supplementierten Zellen verringert. Eine höhere β -Carotin-Konzentration von $0,1\mu\text{g/ml}$ war weniger effektiv, im Vergleich zur geringeren Konzentration. Dennoch zeigte sie eine Signifikanz von $p \leq 0.05$ im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen.

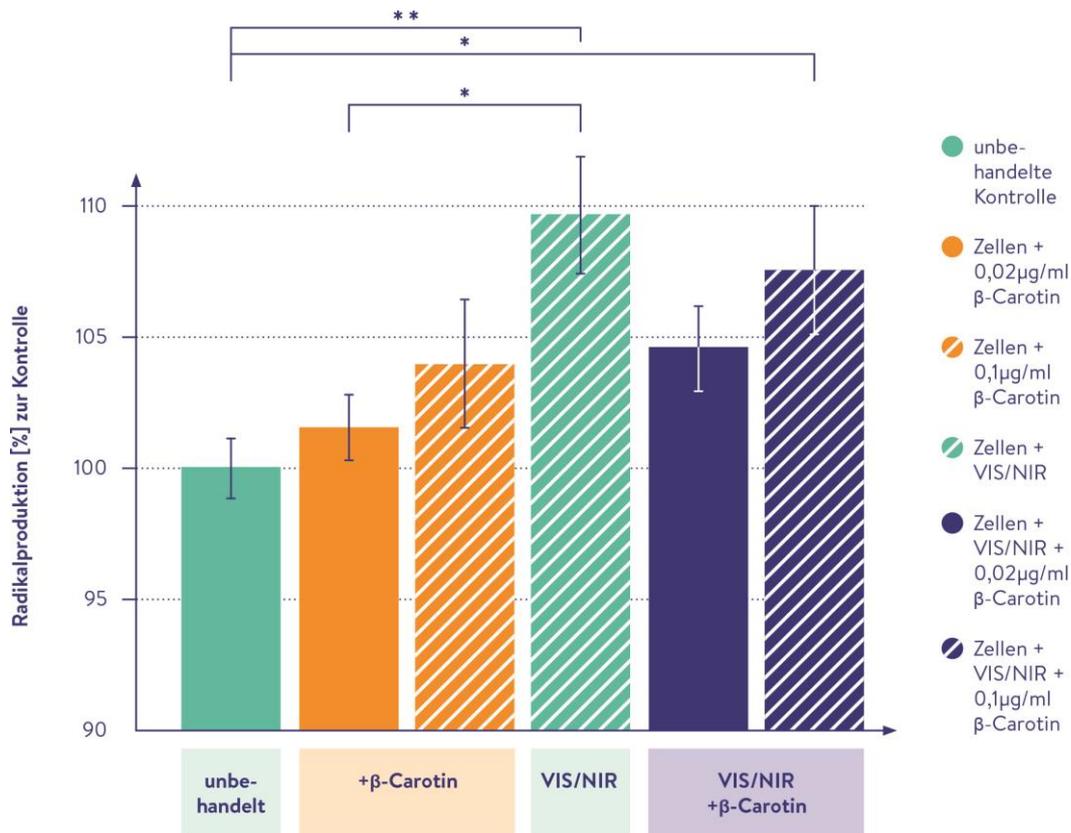


Abbildung 22: Messung der Radikalproduktion in HaCaT-Zellen vor/ nach VIS/NIR-Bestrahlung (46.8 J/cm^2) sowie ohne/ mit β -Carotin-Supplementation ($0,02$ und $0,1 \mu\text{g/ml}$) mittels der ESR-Spektroskopie. Mittelwert ($n=6$) \pm SEM, * $p \leq 0.05$, ** ≤ 0.01 .

5.5 Untersuchung des endogenen antioxidativen Systems: Glutathion

Um die Auswirkung der β -Carotin-Supplementierung und der VIS/NIR-Bestrahlung auf das endogene antioxidative System zu untersuchen, wurde die Konzentration von reduzierten und oxidierten Glutathion (GSH/GSSG) aus Zelllysaten durch einen fluoreszenzbasierten Assays bestimmt.

Die Behandlung der Zellen mit den ausgewählten Konzentrationen an β -Carotin führte zu einer deutlichen Verschiebung der Balance im Verhältnis von GSH/GSSG (Abbildung 22).

Schon die unbestrahlten Zellen zeigen einen Anstieg von freien Radikalen nach der Supplementierung mit β -Carotin, hier zeigt sich, dass die Aufnahme von $0,1 \mu\text{g/ml}$ β -Carotin die Zellen im Vergleich zu $0,02 \mu\text{g/ml}$ β -Carotin mehr stresst, was durch einen erhöhten Radikalanstieg zu erkennen ist. Den stärksten Anstieg in der Produktion von freien Radikalen zeigen die unbestrahlten Zellen nach VIS/NIR-Bestrahlung, gefolgt von den Zellen, die mit der höheren Dosis von $0,1 \mu\text{g/ml}$ β -Carotin supplementiert worden sind ($p \leq 0,05$).

Die Zellen, die eine Dosis von $0,02 \mu\text{g/ml}$ β -Carotin erhalten haben, zeigen einen ähnlichen Anstieg von freien Radikalen, wie die Zellen mit der gleichen Supplementierung, aber ohne Bestrahlung. Auch weisen sie deutlich weniger oxidative Prozesse als die unbestrahlten Zellen mit $0,1 \mu\text{g/ml}$ auf, hier mit einer Signifikanz von $p \leq 0,1$.

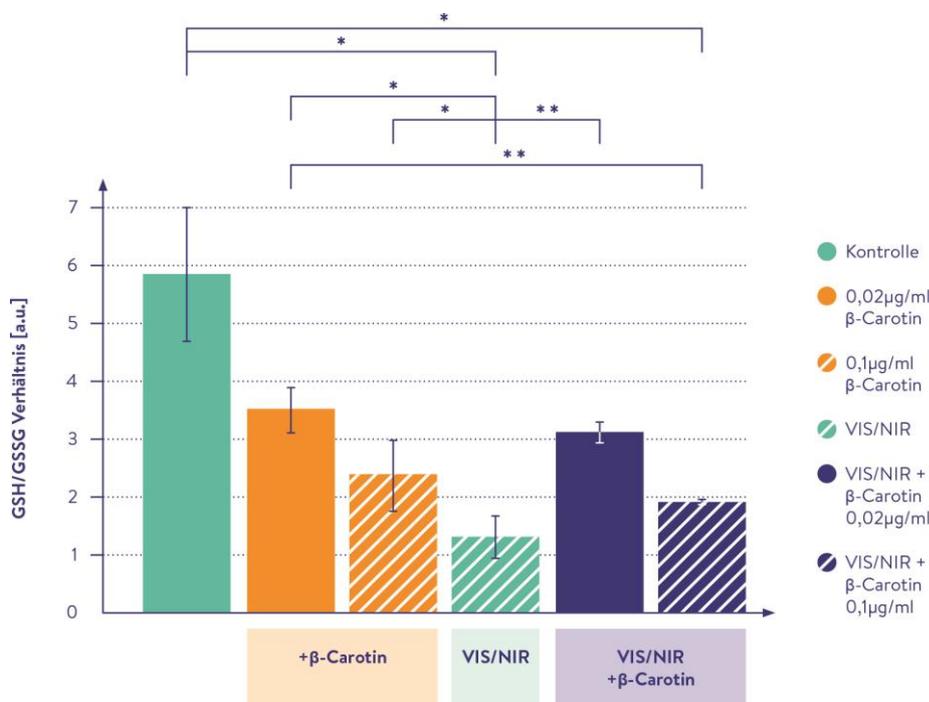


Abbildung 23: Verhältnis von GSH/GSSG in HaCaT-Zelllysaten nach gezielter Supplementierung mit zwei unterschiedlichen β -Carotin-Konzentrationen ($0,02$ und $0,1 \mu\text{g/ml}$) und Bestrahlung im VIS/NIR-Bereich ($46,8 \text{ J/cm}^2$); Mittelwert ($n=6$) \pm SEM, * $p \leq 0,05$, ** $\leq 0,01$.

6. Diskussion

In einem gesunden Körper herrscht eine Balance zwischen Antioxidantien und freien Radikalen, die jedoch durch die unterschiedlichsten externen und internen Stressfaktoren gestört werden kann.

In dieser Studie wurde untersucht, inwiefern sich moderater Stress in Form von Bestrahlung im VIS/NIR-Bereich sowie eine gezielte Supplementation eines exogenen Antioxidans (hier: β -Carotin) auf das antioxidative Schutzsystem auswirkt und inwieweit das antioxidative Schutzsystem durch eine gezielte Supplementation mit einem exogenen Antioxidans beeinflusst werden kann. Im Mittelpunkt stand hierbei die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen dem endogenen (am Beispiel von Glutathion) und dem exogenen antioxidativen Schutzsystem (am Beispiel von β -Carotin).

Eine erste Herausforderung in dieser Studie stellte die Aufnahme von β -Carotin in Hautzellen dar. β -Carotin ist stark lipophil⁶⁶ und dessen Aufnahme und Bioverfügbarkeit an den Fettstoffwechsel gebunden. Studien haben gezeigt, dass die generelle Verwendung von Nanopartikeln die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen und dessen Aufnahme in Haut/Hautzellen verbessern kann.

Nanokristalle ermöglichen, im Vergleich zu anderen Nanopartikeln, eine bessere Bioverfügbarkeit von besonders schwerlöslichen Wirkstoffen. Sie werden aus dem reinen Wirkstoff hergestellt, besitzen eine hohe kinetische Sättigungslöslichkeit und ein sehr gutes Auflösungsverhalten^{67, 68}. Es ist auch bekannt, dass die Resorptionsrate mit zunehmender Größe der Kristallstruktur abnimmt⁶⁹.

Für die Supplementierung der HaCaT-Zellen mit β -Carotin wurden Nanokristalle, in Form von sogenannten *smart crystals*⁷⁰, verwendet. Somit konnte auf übliche Lösungsmittel wie Tetrahydrofuran oder Butylhydroxytoluol verzichtet werden. Die konzentrationsabhängige Aufnahme des β -Carotins nach 1 Stunde Inkubation konnte mittels RRS gezeigt werden (Abbildung 20) und spricht für einen schnellen und effektiven Aufnahmemechanismus.

Zum großen Teil wird Carotin durch passive Diffusion in die Zelle aufgenommen, zum Teil jedoch auch durch rezeptorvermittelte Transportprozesse. Studien zeigten auch das SR-B1, ein Vertreter der ABC Transporter, Carotin in die Zelle schleusen kann⁷¹.

Es deutet sich durch diese Untersuchungen an, dass die exogen zugeführten AOs in Form von Nanokristallen die Aufnahme von schwerlöslichen Verbindungen in Zellen deutlich verbessern und somit das endogene Schutzsystem in seiner Wirkung unterstützt.

Dass die alleinige Aufnahme von β -Carotin-Nanokristallen nicht zu einer signifikanten Zunahme von freien Radikalen in Hautzellen führt, konnte schon durch Rancan et al. gezeigt werden. Die Aufnahme von Silikat-Nanokristallen der vergleichbareren Größe in Hautzellen

zeigte keine Bildung von freien Radikalen. Auch eine 100fach höhere Konzentration zeigte keine signifikante Erhöhung⁷².

Die Bildung von freien Radikalen wurde in dieser Studie erst durch gezielte Bestrahlung im VIS/NIR-Bereich induziert.

Durch einen Zellviabilitätstest (XTT) nach einer Stunde konnte auch hier keine Auswirkungen der verschiedenen Konzentrationen von 0,2-0,02 µg/ml auf die Zellviabilität festgestellt werden (Abbildung 19). Erst die ESR-Messungen der Proben zeigen, dass auch die reine Supplementierung ohne Bestrahlung zu einer dosisabhängigen Zunahme von freien Radikalen führt (Abbildung 21). Eine pro-oxidative Wirkung von β-Carotin wurde bereits in RAW264 murinen Makrophagen nachgewiesen, jedoch wurde hier eine bis zu 100fach stärker Dosierung als in dieser Studie an Carotinoiden verwendet.⁷³

Zusätzlich wurde das Lösungsmittel Tetrahydrofuran (THF) eingesetzt. Auf die Verwendung von Lösungsmittel zur Optimierung der Bioverfügbarkeit von β-Carotin konnte in der vorliegenden Studie, durch die Verwendung von *smart crystals* verzichtet werden, sodass zusätzliche Stressfaktoren, in Form von Lösungsmittels, vermieden und in physiologischen Konzentrationen gearbeitet werden konnte.

F. Liebel et al, zeigten ebenfalls, dass sich β-Carotin und β-Cryptoxanthin in RAW264 Zellen ansammeln und eine Veränderung des intrazellulären oxidativen Status hervorrufen können, der dann negative Auswirkungen auf die Abwehrfunktion der Zellen hat. Es wurde nach 3-24 Stunden ein Anstieg von GSH und GSSG gemessen⁷².

In dieser Studie lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung der Wechselwirkung zwischen dem endogenen und exogenen antioxidativen System nach gezielter moderater Stressinduktion und wie eine gezielte Supplementation das endogene Schutzsystem unterstützen kann und ab wann eine mögliche pro-oxidative Wirkung für den Metabolismus entsteht.

Die Entstehung von freien Radikalen (oxidativem Stress) lässt sich mittels der ESR-Spektroskopie untersuchen. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass nur NIR-Bestrahlung bzw. eine Temperatur von 42°C (Abbildung 18) keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe in einem Messfenster von 32 Minuten zeigen. Diese Zeitspanne wurde gewählt, um zu gewährleisten, dass metabolische Aktivität stattfinden kann.

Auf Grund der nicht signifikanten ROS-Bildung in dem zu messenden Zeitraum eigneten sich diese beiden Stressfaktoren nicht als moderate Stressfaktoren.

Eine Bestrahlung im VIS/NIR-Bereich zeigte eine deutliche Zunahme von ROS in den Zellen mit einer Signifikanz von $p \leq 0.01$ (Abbildung 21). Zudem fördert eine moderate Bestrahlung eine Beeinträchtigung der metabolischen Funktion, was durch einen Anstieg von GSSG (oxidierte Form von GSH) nachgewiesen werden konnte. Die Entstehung von freien

Radikalen wird also schon durch VIS/NIR Strahlung deutlich erhöht und hat somit Einfluss auf die Abwehrfunktion der Zelle⁷⁴. Der erhöhte Wert des oxidierten Glutathions (GSSG) zeigt eine aktive Gegensteuerung der Zellen an, um die Entwicklung von oxidativem Stress zu vermeiden⁷⁵. Andere Stressfaktoren für die HaCaT-Zellen, wie etwa ein Temperaturanstieg bei Strahlung, können durch die Verwendung eines Biotemperators während der gesamten Messung ausgeschlossen werden.

Durch die Behandlung der Zellen mit β -Carotin Konzentrationen von 0,02 und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ kann die Entstehung von ROS während der Bestrahlung mit VIS/NIR im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen minimiert und die Umwandlung von GSH in GSSG reduziert werden. Es erwies sich die niedrigere Konzentration von 0,02 $\mu\text{g/ml}$ β -Carotin sowohl bei der Vermeidung von ROS als auch im endogenen System als effektiver, im Vergleich zur 5fach höheren Konzentration (Abbildung 22). Die könnte durch den pro-oxidativen Effekt von höheren β -Carotin-Dosen zu erklären sein, die auch negative Auswirkungen auf die metabolischen Prozesse in der Zelle haben kann. So kann z. B. die Atmungskette negativ beeinflusst werden, wenn sich das nicht wasserlösliche β -Carotin in der Zelle ansammelt und somit einen pro-oxidativen Effekt haben. Der geringere Schutzeffekt und die pro-oxidative Wirkung unter Bestrahlung, bei der Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ β -Carotin, wäre so zu erklären. Ein Abfall der TEMPO-Konzentration bei der Messung, ausgelöst durch eine Interaktion zwischen TEMPO und β -Carotin, kann ausgeschlossen werden⁶⁴.

Generell konnten Studien zeigen, dass eine gezielte Supplementierung von Vitaminen oder Mineralien einen positiven und signifikanten Einfluss auf das endogene AO-System haben^{76,77}. Es konnte schon in vorherigen Studien von Lohan et al. gezeigt werden, dass man durch eine gezielte Supplementierung von endogenen AOs wie Q10 der Radikalproduktion in Zellen bei UV-Bestrahlung entgegenwirken kann⁴⁶. Ebenfalls konnte aber gezeigt werden, dass die positiven Effekte durch AO Supplementierung ihre Grenzen haben. So wirkt sich z.B. eine erhöhte Konzentration von Q10 negativ auf die Zellviabilität aus⁴⁶.

Weitere *in vitro*-Studien zeigten, dass die Supplementierung von HaCaT- Zellen mit *Lindera coreana* Blättern einen schützenden Effekt bei UVB-Strahlung hat. Die Lipidperoxidation konnte gehemmt werden und die Enzymaktivität der Antioxidantien wurde verstärkt, was zu einem niedrigeren Stresslevel führte⁷⁸. Eine andere Studie mit Ratten zeigte nach einer gezielten Supplementierung mit Lycopin eine Erhöhung der Superoxid-Dismutase (SOD), Catalase (CAT) und Glutathionen-Peroxidase (GPX), die zu den Schlüsselenzymen des antioxidativen Schutzsystems gehören.⁷⁹

In vivo Studien zeigten, dass eine ausgewogene Ernährung mit regelmäßigem Konsum von Früchten und Gemüse zu einem Anstieg von Carotinoiden in der Haut führen⁸⁰. Durch die

Supplementierung mit Vitamine C konnte auch eine Steigerung der Radikalfängeraktivität in der Haut nachgewiesen werden⁸¹.

Supplementiert man jedoch in nicht-physiologischen Konzentrationen entsteht eine Dysbalance zu Gunsten der pro-oxidativen Seite. Für die meisten Menschen konnte kein messbarer Vorteil nach unphysiologischer Supplementierung von AO nachgewiesen werden. Es konnte sogar ein Risikosteigerung für Krebs^{82, 83} und auch altersbedingtem grauem Star⁸⁴ nach Supplementierung mit verschiedenen Vitaminen/Mineralien festgestellt werden.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es synergetische Effekte zwischen dem endogenen und exogenen antioxidativen System gibt und bei einer Supplementierung mit dem exogenen Antioxidant β -Carotin die antioxidative Aktivität gesteigert werden kann. Jedoch bestand hier eine Konzentrationsabhängigkeit, die besonders im höheren Bereich pro-oxidative Wirkung entfalten konnte. Durch die angewendete Bestrahlung wird die natürliche Balance des antioxidativen Systems gestört und oxidativer Stress entsteht.

Dies geschieht unter einer erhöhten Bildung von ROS. Das β -Carotin kann die Regeneration des AO Systems bis zu einem gewissen Grad unterstützen, jedoch in Abhängigkeit von der verwendeten Dosis. Die niedrige β -Carotin Supplementierung zeigte im Vergleich zu der höheren Konzentration einen wirksamen Schutzeffekt bei Bestrahlung. Die höhere Konzentration führt zum Anstieg von ROS und vermindert die Konzentration von GSH (Abbildung 23).

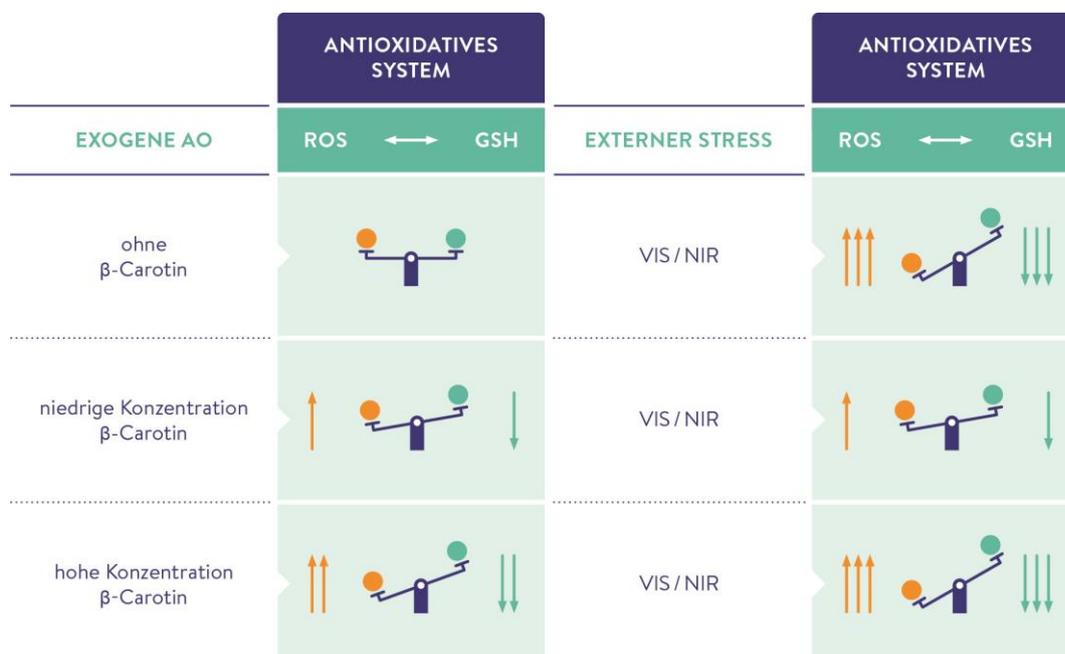


Abbildung 24: Schematische Darstellung des endogenen AO Systems, nach Bestrahlung und Supplementierung zwei verschiedener Konzentrationen β -Carotin.

Für die Identifikation von physiologischen Supplementierungsdosen, stellte sich die Kombination von Untersuchungen der Zellviabilität, der Radikalbildung (ROS) via ESR und die Auswertung des endogenen Systems (GSH) als eine sehr effektive Methodik innerhalb der Zellkultur da. Natürlich lassen sich die Ergebnisse einer *in vitro* Studie nicht 1 zu 1 auf *in vivo* übertragen, aber sie geben erste Hinweise wie man über externe Zugabe von AOs die Radikalbildung beeinflussen kann und wie das exogene und endogene AO System zusammenarbeiten.

7. Zusammenfassung

Abschließend konnten die Untersuchungen folgendes nachweisen: Hautzellen sind in der Lage über Nanokristalle β -Carotin, ohne die Verwendung von weiteren Lösungsmitteln, erfolgreich aufzunehmen. Schon die Aufnahme der niedrigen Partikelkonzentration hatte leichte negative Auswirkungen auf das AO-System, die Anzahl der ROS stieg und das Verhältnis von GSH zu GSSG verschob sich zugunsten der pro-oxidativen Seite. Eine 5fach höhere Konzentration von β -Carotin erzeugte aber einen deutlich höheren oxidativen Stress. Die niedrige Konzentration zeigte einen Schutzeffekt bei einer moderaten Bestrahlung im VIS/NIR Bereich, mit einer konstanten Temperatur von 37°C. Die bestrahlten und unbehandelten Kontrollzellen wiesen eine wesentliche höhere ROS-Konzentration und ein schlechteres Verhältnis von GSH zu GSSG auf.

Die niedrige Dosis an β -Carotin schützt die Zellen; die Zellen haben vergleichbare Messwerte wie die unbestrahlten Zellen, die mit 0,02 $\mu\text{g/ml}$ supplementiert wurden. Die ESR Messung erwies sich als eine sehr sensible Methode für diese Nachweise. Auch konnte gezeigt werden wie exogene AOs das endogene AO System beeinflussen können. Wobei der Schutzeffekt des β -Carotins stark dosisabhängig ist. Hier gilt also die Faustregel „**Viel hilft viel**“ nicht!

Dieses komplexe Zusammenspiel wirft natürlich noch viele weitere Fragen auf, die nicht alle in dieser Studie untersucht werden konnten. Die Lokalisation des aufgenommenen β -Carotins konnte mit den angewendeten Methoden nicht in den Zellen lokalisiert werden Auch ist es interessant zu untersuchen, ab welcher β -Carotin Konzentration die antioxidative Wirkung die pro-oxidativen Wirkung überwiegt. Spannend sind aber ebenso die verwendeten Nanokristalle. Wie gut lässt sich zum Beispiel das Ergebnisse auf die Haut übertragen, auf

eine topische Anwendung als Hautcreme und kann es vor der intensiveren UV-Strahlung schützen?

Die Ergebnisse dieser Studie bieten daher einen Ansatzpunkt für weitere, auch alltagsrelevante, Untersuchungen.

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 L.J. Marnett, Oxyradicals and DNA damage, *Carcinogenesis*, 21 (2000) 361-370.
- ⁴ 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.
- ⁵ Lohan, S.B., R. Muller, S. Albrecht, K. Mink, K. Tscherch, F. Ismaeel, J. Lademann, S.Rohn, M.C.Meinke, *Free radicals induced by sunlight in different spectral regions - in vivo versus ex vivo study*. *Exp Dermatol.*, 2016. **25**: p. 380-385.
- ⁶ Tran, D., J.P. Townley, T.M. Barnes, K.A. Greive, *An antiaging skin care system containing alpha hydroxy acids and vitamins improves the biomechanical parameters of facial skin*. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2015. **8**: p. 9-17.
- ⁷ H. Sies, Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *Exp. Physiol.* 82 (1997), 291-295
- ⁸ M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C.J. Rhodes, J. Telser, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol. Cell Biochem.* 266 (2004) 37–56
- ⁹ E.A. Offord, J.C. Gautier, O. Avanti, C. Scaletta, F. Runge, K. Kramer, L.A. Applegate, Photoprotective potential of lycopene, beta-carotene, vitamin E, vitamin C and carnosisic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts, *Free Radic. Biol. Med.* 32(2002) 1293–1303.
- ¹⁰ H.J. Forman, K.J. Davies, F. Ursini, How do nutritional antioxidants really work nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo, *Free Radic. Biol. Med.* 66 (2014) 24–35.
- ¹¹ S.J. Flora, Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure, *Oxid. Med. Cell Longev.* 2 (2009) 191–206.
- ¹² E. Birben, U.M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, O. Kalayci, Oxidative stress and antioxidant defense, *World Allergy Organ J.* 5 (2012) 9–19.
- ¹³ T.R. Hata, T.A. Scholz, I.V. Ermakov, R.W. McClane, F. Khachik, W. Gellermann, L.K. Pershing, Non-invasive raman spectroscopic detection of carotenoids in human skin, *J. Invest Dermatol* 115 (2000) 441–448.
- ¹⁴ STAHL, W.: Carotinoide: endogener Sonnenschutz. In: *Biologische Medizin* (2003), Nr. 2, S. 75–77
- ¹⁵ AUST, O. ; STAHL, W. ; SIES, H. ; TRONNIER, H. ; HEINRICH, U.: Supplementation with tomato-based products increases lycopene, phytofluene, and phytoene levels in

-
- human serum and protects against UV-light-induced erythema. In: *Int J Vitam Nutr Res* 75 (2005),Jan, Nr. 1, S. 54–60
- ¹⁶ Góralczyk, R. β -Carotene and lung cancer in smokers: Review of hypotheses and status of research. *Nutr. Cancer* **2009**, 61, 767–774.
- ¹⁷ S. Mrakic-Sposta, M. Gussoni, M. Montorsi, S. Porcelli, A. Vezzoli, A quantitative method to monitor reactive oxygen species production by electron paramagnetic resonance in physiological and pathological conditions, *Oxid. Med. Cell Longev.* 2014 (2014) 306179.
- ¹⁸ S.B. Lohan, A.C. Lauer, S. Arndt, A. Friedrich, K. Tscherch, S.F. Haag, Determination of the antioxidant status of the skin by in vivo-electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy, *Cosmetics* 2 (2015) 286–301.
- ¹⁹ S.B. Lohan, S. Bauersachs, S. Ahlberg, N. Baisaeng, C.M. Keck, R.H. Muller, E.Witte, K.Wolk, S. Hackbarth, B. Röder, J. Lademann, M.C. Meinke, Ultra-small lipid nanoparticles promote the penetration of coenzyme Q10 in skin cells and counteract oxidative stress, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 89 (2015) 201–207.
- ²⁰ A.C. Lauer, N. Groth, S.F. Haag, M.E. Darvin, J. Lademann, M.C. Meinke, Radical scavenging capacity in human skin before and after vitamin C uptake: an in vivo feasibility study using electron paramagnetic resonance spectroscopy, *J. Invest Dermatol* 133 (2013) 1102–1104.
- ²¹ J.A. Bouwstra, M. Ponec, The skin barrier in healthy and diseased state, *Biochim Biophys Acta*, 1758 (2006) 2080-2095.
- ²² 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.
- ²³ DocCheck Flexikon: Glossareintrag Haut. zuletzt geprüft am 8.10.2013: <http://flexikon.doccheck.com/de/Haut>"
- ²⁴ JUNQUEIRA L.C.U., CARNEIRO J. (2005): "Haut" In: Gratzl M. (Hrsg.): *Histologie*, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 305-313
- ²⁵ FRITSCH P. (2004): "Aufbau und Funktionen der Haut" In: Fritsch P. (ed): *Dermatologie und Venerologie, Lehrbuch und Atlas*, Springer Verlag, 3-42
FUCHS
- ²⁶ Faller; Schünke: *Der Körper des Menschen*, 15. Auflage, Thieme Verlag, 2008.
- ²⁷ DocCheck Flexikon: Glossareintrag Haut. zuletzt geprüft am 8.10.2013: <http://flexikon.doccheck.com/de/Haut>"
- ²⁸ Boukamp,P.: "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." *Journal of Cell Biology* 1988; 106(3): 761-771
- ²⁹ Combes, R., Balls, M., Curren, R., Fischbach, M., Fusenig, N., Kirkland, D., Lasne, C., Landolph, J., LeBoeuf, R., Marquardt, H., McCormick, J., Muller, L., Rivedal, E., Sabbioni, E., Tanaka, N., Vasseur, P., and Yamasaki, H.: "Cell Transformation Assays as Predictors of Human Carcinogenicity." *ECVAM-European Centre for the Validation*

-
- of Alternative Methods.; 2001;27; 745-767. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 39
- 30 Lehman,T.A.; Modali,R.; Boukamp,P.; Stanek,J.; Bennett,W.P.; Welsh,J.A. R.A.Metcalf, M.R. Stampfer, N. Fusenig, E.M. Rogan:"p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines." *Carcinogenesis* 1993; 14(5): 833-839 [published erratum appeared in *Carcinogenesis* 1993 Jul;14(7):1491]
- 31 van de Sandt, J., Roguet, R., Cohen, C., Esdaile, D., Ponc, M., Corsini, E., Barker, C., Fusenig, N., Liebsch, M., Benford, D., de Brugerolle de Fraissinette, A., and Fartasch, M.: "The Use of Human Ke-ratinocytes and Human Skin Models for Predicting Skin Irritation." *ECVAM - European Centre for Validation of Alternative Methods.*; 1997;27; 723-743. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 38
- 32 Schoop, V. M.; Mirancea, N.;Fusenig,N.E.: Epidermal Organization und Differentiation of HaCaT Kerainocytes in Organotropoc Coculture with Human Dermal Fibroblasten, in: *The Journal of Investigative Dermatology*, 1998.
- 33 Kochevar IE, Pathak MA. *Dermatology in General Medicine*, 220-229, 1999
- 34 JENKINS, M. ; HOLICK, M. F.: *Schützendes Sonnenlicht. Die heilsamen Kräfte der Sonne.*1.Aufl. Stuttgart : Karl F. Haug Verlag, 2005
- 35 S.B. Lohan, R. Muller, S. Albrecht, K. Mink, K. Tscherch, F. Ismaeel, J. Lademann, S. Rohn, M.C. Meinke, Free radicals induced by sunlight in different spectral regions - in vivo versus ex vivo study, *Exp Dermatol*, 25 (2016) 380-385
- 36 M.C. Meinke, R. Muller, A. Bechtel, S.F. Haag, M.E. Darvin, S.B. Lohan, F. Ismaeel, J. Lademann, Evaluation of carotenoids and reactive oxygen species in human skin after UV irradiation: a critical comparison between in vivo and ex vivo investigations, *Exp Dermatol*, 24 (2015) 194-197.
- 37 Zastrow L¹, Groth N, Klein F, Kockott D, Lademann J, Renneberg R, Ferrero L. The missing link--light-induced (280-1,600 nm) free radical formation in human skin. *Skin Pharmacol Physiol*. 2009;22(1):31-44
- 38 Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blandschun R, Wenk J. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol. Chem* 1997 Nov;378(11):1247-1257.
- 39 Burke KE. Photoaging: the role of oxidative stress. *G Ital Dermatol Venereol* 2010 Aug;145(4):445-459.
- 40 Wenk J, Brenneisen P, Meewes C, Wlaschek M, Peters T, Blandschun R, Ma W, Kuhr L, Schneider L, Scharffetter-Kochanek K. UV-induced oxidative stress and photoaging. *Curr. Probl. Dermatol* 2001;29:83-94.
- 41 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.
- 42 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.
- 43 Schulz, T. J., K. Zarse, A. Voigt, N. Urban, M. Birringer, M. Ristow, (2007): *Glucose restriction extends Caenorhabditis elegans life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress*. In: *Cell Metabolism*. 6(4); 280–293;
- 44 Ristow, M. K. Zarse, A. Oberbach, N. Klöting, M. Birringer, M. Kiehntopf, M. Stumvoll, C.R. Kahn, M. Blüher, (2009): *Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans*. In: *Proc Natl Acad Sci* 106: 8865-8870
- 45 Yun, J & Finkel, T. (2014): *Mitohormesis* in: *Cell Metabolism*, 19, 757-766
- 46 BIESALSKI H.K. (1997): "Betacarotin"; in: Biesalski, K.H.; Schrezenmeir, J.; Weber, P.; Weiß, H.: Vitamine, Physiologie, Pathophysiologie, Therapie; Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 20-33
- 47 KASPER, H.: Ernährungsmethoden und Diätetik. 10. Aufl. München : Elsevier, Urban, 2004
- 48 Watzl, B., Bub, A. (2001) Carotinoide. Ernährungs-Umschau, 48, 71-74.
- 49 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.
- 50 Black H.S, Lambert C.R. (2001): "Radical reactions of Carotenoids and Potential Influence on UV Carcinogenesis"; in: Thiele J., Elsner P.: Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology; *Curr Probl Dermatol*. Basel, karger 29, 140-156
- 51 Sies H., Stahl W. (2004): "Carotenoids and UV Protection"; *Photochem. Photobiolog. Sci.* 3, 749-752
- 52 F. Aslund, K. D. Berndt, A. Holmgren: Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. In: *J Biol Chem*. 272(49), 1997, S. 30780–30786.
- 53 Lu, S.C., Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*, 2009. 30(1-2): p. 42-59.
- 54 Droge, W., Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol*, 2002. 37(12): p. 1333-45.
- 55 Müller, R. H.; Alexiev, U.; Sinambela, P.; Keck, C. M.: Nanostructured Lipid Carriers (NLC) - the second generation of solid lipid nanoparticles
- 56 Müller, R. H., Keck, C. M., Twenty Years Drug nanocrystals – where we are, and where to go? *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80 (1), 1-3, 2012
- 57 Müller, R. H., Chen, R., Keck, C. M., smartCrystals for consumer care & cosmetics: enhanced dermal delivery of poorly soluble plant actives, *Household and Personal Care Today* 8 (5), 18-23, 2013

-
- 58 Müller, R. H., Gohla, S., Keck, C. M., State of the Art of Nanocrystals – special features, production, nanotoxicology aspects & intracellular delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78 (1), 1-9, 2011
- 59 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).
- 60 J.L. Cho, M. Allanson, V.E. Reeve, Hypoxia inducible factor-1alpha contributes to UV radiation-induced inflammation, epidermal hyperplasia and immunosuppression in mice, *Photochem Photobiol Sci*, 11 (2012) 309-317.
- 61 G.B. Romero, C.M. Keck, R.H. Müller, Small Scale Production of Nanocrystals in Drug Discovery and Development Phase, DPhG-Jahrestagung, Frankfurt, 2014, p. PT 08.
- 62 K. D. Lechner, Klaus Gehrke, Eckhard H. Nordmeier: *Makromolekulare Chemie : ein Lehrbuch für Chemiker, Physiker, Materialwissenschaftler und Verfahrenstechniker*. 5. Aufl. Springer Spektrum, Berlin 2014
- 63 applichem.com.
- 64 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.
- 65 M.E. Darvin, I. Gersonde, S. Ey, N.N.Brandt, H. Albrecht, S.A. Gonchukov, W.Sterry, J.Lademann, Noninvasive Detection of beta-Carotene and Lycopene in Human Skin using Raman Spectroscopy, *Laser Physics*, 14 (2004) 231-233.
- 66 Cooper, D. A., Webb, D. R. & Peters, J. C.(1997) Evaluation of the potential for olestra to affect the availability of dietary phytochemicals. *J Nutr*,127, 1699-1709
- 67 J.U. Junghanns, R.H. Muller, Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications, *Int. J. Nanomed.* 3 (2008) 295–309.
- 68 C.M. Keck, R.H. Muller, Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 62 (2006) 3–16.
- 69 L. Shang, K. Nienhaus, G.U. Nienhaus, Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters, *J. Nanobiotechnol.* 12 (2014) 5.
- 70 Keck, C.M., Kobierski, S. Mauludin, R., Müller, R.H. (2008) Second generation of drug nanocrystals for delivery of poorly soluble drugs: smartCrystal technology, *Dosis* 2, (24): 124- 128.
- 71 Reboule, Abou I, Mikail C, Ghiringhelli O, Andre M, Portugal H, Jourdheuil-Rahmani D, Amiot Mj, Lairon D, Borel P (2005a) Lutein Transport By Caco-2 TC-7 Cells Occurs Partly By A Facilitated Process Involving The Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI). *Biochem J* 387, 455-461
- 72 F. Rancan, B. Nazemi, S. Rautenberg, M. Ryll, S. Hadam, Q. Gao, S. Hackbarth, S. F. Haag, C. Graf, E. Rühl, U. Blume-Peytavi, J. Lademann, A. Voigt, M.C. Meinke, Ultraviolet radiation and nanoparticle induced intracellular free radicals generation measured in

-
- human keratinocytes by electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Skin. Res. Technol.* 20 (2014) 182–193.
- ⁷³ S. Katsuura, T. Imamura, N. Bando, R. Yamanishi, beta-Carotene and beta-cryptoxanthin but not lutein evoke redox and immune changes in RAW264 murine macrophages, *Mol. Nutr. Food Res.* 53 (2009) 1396–1405.
- ⁷⁴ F. Liebel, S. Kaur, E. Ruvolo, N. Kollias, M.D. Southall, Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes, *J. Invest Dermatol* 132 (2012) 1901–1907.
- ⁷⁵ G. Wu, Y.Z. Fang, S. Yang, J.R. Lupton, N.D. Turner, Glutathione metabolism and its implications for health, *J. Nutr.* 134 (2004) 489–492.
- ⁷⁶ A. Bhatnagar, Y. Tripathi, A. Kumar, Change in oxidative stress of normotensive elderly subjects following lifestyle modifications, *J. Clin. Diagn Res.* 10 (2016) CC09–CC13.
- ⁷⁷ P. Tauler, A. Aguilo, I. Gimeno, E. Fuentespina, J.A. Tur, A. Pons, Influence of vitamin C diet supplementation on endogenous antioxidant defences during exhaustive exercise, *Pflugers Arch.* 446 (2003) 658–664.
- ⁷⁸ J.L. Song, Y. Gao, Protective effects of *Lindera coreana* on UVB-induced oxidative stress in human HaCaT keratinocytes, *Iran. J. Pharm. Res.* 13 (2014) 1369–1378.
- ⁷⁹ H. Weilian, D. Dehui, L. Wei, In vivo antioxidant activity of lycopene from *Blakeslea Trispora* in rats, 2nd International Conference on Environment, Energy and Biotechnology, vol. 51, 2013, pp. 64–68.
- ⁸⁰ M.C. Meinke, S.B. Lohan, W. Kocher, B. Magnussen, M.E. Darvin, J. Lademann, Multiple spatially resolved reflection spectroscopy to monitor cutaneous carotenoids during supplementation of fruit and vegetable extracts in vivo, *Skin. Res. Technol.* 4 (2017) 459–462.
- ⁸¹ A.C. Lauer, N. Groth, S.F. Haag, M.E. Darvin, J. Lademann, M.C. Meinke, Dosedependent 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.
- ⁸² M. Misotti, P. Gnagnarella, Vitamin supplement consumption and breast cancer risk: a review, *Ecancermedicallscience* 7 (2013) 365.
- ⁸³ A.R. Mendelsohn, J.W. Larrick, Paradoxical effects of antioxidants on cancer, *Rejuvenation Res.* 17 (2014) 306–311.
- ⁸⁴ J. Zheng Selin, S. Rautiainen, B.E. Lindblad, R. Morgenstern, A. Wolk, High-dose supplements of vitamins C and E, low-dose multivitamins, and the risk of age-related cataract: a population-based prospective cohort study of men, *Am. J. Epidemiol.* 177 (2013) 548–555.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kristina Paula Vitt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Bildung von ROS und die endogene Antwort von Glutathion in humanen Keratinozyten nach Supplementierung mit β -Carotin und Bestrahlung im VIS/NIR-Bereich“ selbstständig 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen, Präsentationen, Poster

Kristina Paula Vitt hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen

Publikation

Silke B. Lohan ^{a,*1}, Kristina Paula Vitt, ¹, Patrik Scholz ^b, Cornelia M. Keck ^b, Martina C. Meinke ^a

ROS production and glutathione response in keratinocytes after application of β -carotene and VIS/NIR irradiation Chemico-Biological Interactions 280 (2018) 1–7

Beitrag im Einzelnen: vollständige Erhebung der Primärdaten (selbständige Durchführung der Elektronenspinresonanz (ESR) –Spektroskopie, Resonanz Raman Spektroskopie und GSH/GSSG Messungen), Vorbereitung der Datensätze für die Statistik, Unterstützung beim schreiben und gliedern des Manuskript und erstellen der Graphiken (Abbildungen 1-4)

Präsentation und Poster

Response of the endogenous antioxidant system after administration with antioxidants and moderate stress induction in keratinocytes

Beitrag im Einzelnen: vollständige Erhebung der Primärdaten (selbständige Durchführung der Elektronenspinresonanz (ESR) –Spektroskopie, Resonanz Raman Spektroskopie und GSH/GSSG Messungen) , Vorbereitung der Datensätze für die Statistik und Auswahl der Graphiken (Teil 5)

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Publikation

Silke B. Lohan ^{a,*1}, Kristina Paula Vitt,¹ Patrik Scholz ^b, Cornelia M. Keck ^b, Martina C. Meinke ^a

ROS production and glutathione response in keratinocytes after application of β -carotene and VIS/NIR irradiation *Chemico-Biological Interactions* 280 (2018) 1–7

Präsentation und Poster

Response of the endogenous antioxidant system after administration with antioxidants and moderate stress induction in keratinocytes (2019)

Danksagung

Herzlich danken möchte ich Frau Prof. Dr. rer. nat. Martina Meinke für die Möglichkeit diese Arbeit zu erstellen, die außerordentlich gute, fachübergreifende Betreuung und Geduld während der gesamten Zeit und die vielen intensiven und zielführenden Diskussionen.

Ein großer Dank an Dr. Silke Lohan, ohne die diese Arbeit und Publikation so heute nicht vollendet wäre. Ihre geduldige Art einen an das wissenschaftliche Arbeiten und die Arbeit im Labor heranzuführen sowie die immer schnelle und lösungsorientierte Hilfe in allen Bereichen, die so eine Arbeit erfordert, waren mir eine große Unterstützung

Auch möchte ich dem ganzen Team um Prof. Jürgen Lademann danken, für die Betreuung/Zusammenarbeit, welche die gute Durchführung dieser Studie ermöglicht habe.

Mein Dank gilt ebenso dem Team um Frau Prof. Dr. Cornelia Keck für die Bereitstellung der β -Carotin Nanokristalle. Ohne diese, wäre diese Studie nicht möglich gewesen.

Zum Schluss, aber nicht zuletzt geht der Dank an meine Familie, die nie müde wurde mich voranzutreiben. Ohne deren Unterstützung beim Schreiben und Gestalten dieser Arbeit, wäre dies wohl eine Lebensaufgabe geworden.