

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

DISSERTATION

Einfluss von Carotinoiden auf den Kollagen I-/Elastinindex und
Hautparameter – prospektiv placebokontrollierte Studie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ceylan Katrin Nowbary
aus Darmstadt

Datum der Promotion: 03.12.2021

Ein Teil der Ergebnisse, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurde am 19.07.2017 mit der Arbeitsgruppe Martina C. Meinke, Ceylan K. Nowbary, Sabine Schanzer, Henning Vollert, Jürgen Lademann und Maxim E. Darvin unter dem Titel „Influence of orally taken carotenoid-rich curly kale extract on collagen I/elastin index of the skin.“ in *Nutrients* veröffentlicht (Meinke et al., 2017).

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
Zusammenfassung	8
1. Abstract	8
1.1. Abstract (Deutsch)	8
1.2. Abstract (Englisch)	9
2. Einleitung	11
2.1. Einführung	11
2.2. Aufbau der Haut und ihre biomechanischen Eigenschaften	14
2.2.1. Biomechanische Eigenschaften der Haut	16
2.2.2. Dermale Strukturproteine Elastin und Kollagen	17
2.3. Antioxidantien und ihr Wirkmechanismus	18
2.3.1. Carotinoide	19
2.4. Antioxidantienmessungen	21
2.4.1. Resonanz-Raman-Spektroskopie	21
2.4.2. Reflexionsspektroskopie	26
2.5. Elastizitätsmessung der Haut	27
2.5.1. Saugmethode: Cutometer®	27
2.6. Bestimmung des Kollagen I-/Elastin-Index (SAAID)	28
2.6.1. Multiphotonen-Laser-Tomographie: DermaInspect®	28
2.6.2. Physikalische Grundlagen	30
2.6.3. Endogene Fluorophore	32
3. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	35
4. Material und Methoden	36
4.1. Freiwillige Probandinnen und Probenmaterial	36
4.2. Funktionsweise des Biozoom®	37
4.2.1. Messvorgang und Messparameter	38
4.3. Funktionsweise des CaroLED LMTB®	38
4.3.1. Messvorgang und Messparameter	39
4.4. Funktionsweise des Resonanz-Raman-Spektrometers	39
4.4.1. Messvorgang	40
4.4.2. Messparameter	41
4.5. Funktionsweise des Cutometer® MPA 580	41

4.5.1.	Messvorgang	42
4.5.2.	Messparameter	43
4.6.	Funktionsweise des DermalInspect®	46
4.6.1.	Messvorgang	47
4.6.2.	Messparameter	50
4.7.	Statistische Methoden	52
4.7.1.	Auswertung der Daten	53
5.	Ergebnisse.....	54
5.1.	Messung der Carotinoide mittels optischer Sensormethoden CaroLED LMTB® und Biozoom®	54
5.2.	Messung von Carotinoiden und Lycopin mittels Resonanz-Raman-Spektroskopie.....	56
5.3.	Messung der Hautfestigkeit und Bruttoelastizität mittels Cutometer®	60
5.4.	Messung des Kollagen I- / Elastinindex (SAAID) mittels DermalInspect®	62
6.	Diskussion.....	65
7.	Literaturverzeichnis	72
8.	Eidesstattliche Versicherung	80
9.	Anteilerklärung an der Publikation.....	81
10.	Lebenslauf	82
11.	Publikationsliste	84
12.	Danksagung	85

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AF	Autofluoreszenz
AP	Antioxidatives Potential
Ar	Argon
°C	Grad Celsius
CCD	Charge Coupled Device (Kamera)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
et al.	Lat.: et alteri, und andere
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	Infrarot
IU	Engl.: international units, internationale Einheiten
MPT	Multiphotonentomographie
MSRRS	Multiple spatially resolved reflectance spectroscopy
NIR	Nah-Infrarotbereich
R	Hauthärte
R/UF	Verbleibende Hautdeformität (relativ)
ROS	Engl: reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
SHG	Second harmonic generation
SAAID	SHG-to-AF Aging Index of Dermis
SRRS	Spatially resolved reflectance spectroscopy
Tab.	Tabelle
U	Engl.: unit, Einheit
UE	Sofortige elastische (lineare) Deformation der Haut
UF	Maximale Hautdeformation
UR	Elastisches Rückstellungsvermögen der Haut (unmittelbare elastische Erholung der Haut)
UR/UE	Elastische Funktion
UR/UF	Relative Elastische Erholung der Haut
UV	Verzögerte, viskose Deformation der Haut (vorübergehendes „Kriechen“)
	Ultraviolett
UV/UE	Viskoelastisches Verhältnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Abbildung der Haut (Hartmann, 2021).....	16
Abbildung 2: Struktur von β -Carotin.....	20
Abbildung 3: Struktur von Lycopin.....	20
Abbildung 4: Schematische Darstellung Raman-, Rayleigh-Streuung (Spiess & Klapötke, 1999).	23
Abbildung 5: Raman-Spektrum der Haut unter Anregung durch Argon-Laser bei 514,5nm (Darvin et al., 2004).....	24
Abbildung 6: Carotinoidbanden (Raman-Spektrum) der menschlichen Haut nach Einsatz eines Spektrenauswertprogrammes (Darvin et al., 2004).....	25
Abbildung 7: Absorptionsspektren von β -Carotin (–) und Lycopin (–) in Ethanol (Darvin et al., 2006).	26
Abbildung 8: Schematischer Aufbau der Cutometer-Sonde, Courage + Khazaka electronic GmbH (courage-khazaka, 2020).	27
Abbildung 9: Prinzip der Ein- und Zweiphotonen-Fluoreszenzanregung sowie des SHG-Effektes (modifiziert nach Zieger et al., 2016).	31
Abbildung 10: Emissionsspektren fluoreszierender Biomoleküle. Retinol (gelb), Riboflavin (schwarz), NADH (grün), Pyridoxin (grau), Folsäure (rot), Cholecalciferol (blau). (Modifiziert nach Zipfel et al., 2003; Kaatz & König, 2010).	32
Abbildung 11: Biozoom (www.mybiozoom.com, 2021).	38
Abbildung 12: CaroLED LMTB Sensor (Laser- und Medizintechnologie, Berlin, LMTB).....	39
Abbildung 13: schematischer Aufbau eines Raman-Spektrometers (Lademann et al., 2016) (1-Laser, 2-optisches Abbildungssystem, 3-Filter, 4-Handstück, 5-Haut, 6-Hauttyperkennung, 7-Spektrometer mit Detektor, 8-Computer).	40
Abbildung 14: Cutometer MPA 580.....	42
Abbildung 15: Messung der Hautelastizität mittels Cutometer (www.dermaviduals.de, 2020).	43
Abbildung 16: Messparameter des Cutometers (Modifiziert nach Spada et. al., 2019) y-Achse: Eindringtiefe der Haut, x-Achse: zeitlicher Verlauf des Messvorgangs.....	44
Abbildung 17: vereinfachter schematischer Aufbau des Lasers mit Scan-Detektor-Einheit (Kaatz & König, 2010).....	47
Abbildung 18: Multiphotonentomograph DermalInspect.....	47
Abbildung 19: Ansicht der Mai Tai-Control Software.	48
Abbildung 20: Orientierung der Bildaufnahmen mit dem Multiphotonentomographen (Darvin, 2017).	50
Abbildung 21: horizontale Bildgebung von der Hautoberfläche (Korneozyten, Bild a) bis in die Tiefe von 90 μ m (Kollagenfasern, Bild i).	50
Abbildung 22: Aufnahme von AF und SHG mittels Multiphotonentomographie zur Bestimmung der Elastin- und Kollagengehalte und Berechnung der SAAID-Werte (Kollagen I-/Elastinindex) mit entsprechender SAAID-Kurve. In der Tiefe von 0 bis 70 μ m überwiegt die AF (Elastin) und ab 70 μ m setzt das SHG-Signal (Kollagen) ein (rot).	52
Abbildung 23: Verlauf der gemittelten kutanen Carotinoidkonzentration gemessen mit CaroLED LMTB und Biozoom, (V = Verum, PL = Placebo).	54
Abbildung 24: Verlauf der gemittelten kutanen Carotinoidkonzentration gemessen mit Caro LED LMTB u. Biozoom (MSRRS) am Daumenballen (MW \pm s). + p<0,05 zwischen Placebo u. Verum; (*) p<0,1; *p<0,05; **p<0,01 zum Ausgangswert. N = 15 Placebo u. N = 14 Verum.	55
Abbildung 25: Korrelation zwischen der Verum-Gruppe Biozoom und CaroLED nach zehn Monaten am Daumenballen mit Regressionsgeraden, p = 5,441 e-05, R ² = 0,8691223.	55
Abbildung 26: Verlauf der Raman-Messwerte in der Placebo-Gruppe (A) der Studie.....	57

Abbildung 27: Verlauf der Raman-Messwerte in der Verum-Gruppe (B) der Studie.	57
Abbildung 28: Ramanspektroskopie, Mittelwerte von Lycopin und aller Carotinoide über einen Zeitraum von zehn Monaten, getrennt nach Hand (Ha) und Gesicht (Ge) sowie Verum (V) und Placebo (P).	59
Abbildung 29: Korrelation zwischen der Verum-Gruppe CaroLED und Raman-Spektroskopie nach zehn Monaten am Daumenballen mit Regressionsgerade, $p = 0,01168$, $R^2 = 0,6509849$	59
Abbildung 30: Verlauf der Cutometer-Messwerte in Verum- und Placebo-Gruppe für A = Hautfestigkeit (R0) und B = Bruttoelastizität (R2).	62
Abbildung 31: Gruppiertes Boxplot des SAAID für die Verum-Gruppe an Unterarm (UA) und im Gesicht (G) sowie für die Placebo-Gruppe an Unterarm (UAP) und Gesicht (GP) zu Studienbeginn (V01), nach fünf Monaten (V03) und zu Studienende nach zehn Monaten (V05). Das untere Ende der Box beschreibt das erste Quartil und das obere Ende das dritte Quartil. Die Linie innerhalb der Box das zweite Quartil, den Median.	63
Abbildung 32: Verteilung der Differenzen der Mittelwerte des Kollagen I-/Elastinindex für den Zeitraum von fünf Monaten (schwarz) und den Gesamtzeitraum der Studie von zehn Monaten (rot) unterteilt nach Messbereich und Placebo-/Verum-Gruppe (G_PL = Gesicht Placebo, G_V = Gesicht Verum, UA_PL = Unterarm Placebo, UA_V = Unterarm Verum).	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Fluoreszenzeigenschaften endogener Fluorophore (modifiziert nach (Kaatz & König, 2010)).	34
Tabelle 2: Entwicklung der Raman-Messwerte (Lycopin und Carotinoide, willkürliche Einheiten) in der Placebo-Gruppe zu Studienbeginn (V01), nach fünf (V03) und zehn Monaten (V05), p-Wert gemäß gepaarter t-Test.	58
Tabelle 3: Entwicklung der Raman-Messwerte (Lycopin und Carotinoide, willkürliche Einheiten) in der Verum-Gruppe zu Studienbeginn (V01), nach fünf (V03) und zehn Monaten (V05), p-Wert gemäß gepaarter t-Test.	58
Tabelle 4: Entwicklung der Cutometer Messwerte R0 und R2 für Verum- und Placebo-Gruppe. Absolute und prozentuale Entwicklung der Werte (R2 ist bereits ein prozentualer Wert, deshalb keine absolute Differenz), p-Wert gemäß gepaarter t-Test, zu Beginn (V01) und zu Studienende nach zehn Monaten (V05).	60

Zusammenfassung

1. Abstract

1.1. Abstract (Deutsch)

Einleitung: Antioxidantien, im Speziellen Carotinoide, die mit der Nahrung aufgenommen bzw. supplementiert werden müssen, stellen einen wirksamen Schutz vor Hautalterungsprozessen dar. Freie Radikale, die gebildet werden, wenn externe Umwelteinflüsse auf die Haut einwirken, können durch Antioxidantien abgebaut werden und bieten somit einen effektiven Schutz vor Hautschädigungen.

Methoden: In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden in einer Placebo-kontrollierten in vivo Studie an 29 Probandinnen verschiedene Messungen zur Detektion der Carotinoide, der Elastizität der Haut sowie des Kollagen I-/Elastinindex über einen Zeitraum von insgesamt zehn Monaten durchgeführt. Die Messungen wurden in vivo an der Gesichtshaut (Wange), am Daumenballen und an der Innenseite des Unterarmes vorgenommen. Von den 29 Probandinnen nahmen 14 täglich einmal drei carotinoidhaltige Grünkohlextrakt-Kapseln (insgesamt 1650 µg Carotinoide/Tag) ein (Verum-Gruppe), und 15 Frauen erhielten optisch identische Kapseln ohne Wirkstoff (Placebo-Gruppe). Die nichtinvasiven Messmethoden, die für diese Arbeit verwendet wurden, erlauben es, Aussagen zur Zusammensetzung, zu biomechanischen Eigenschaften und zum Antioxidantiengehalt der Haut zu treffen. Zur Bestimmung der Carotinoide wurden zwei verschiedene optische Sensoren (Biozoom® und CaroLED LMTB) sowie die Resonanz-Raman-Spektroskopie genutzt. Der Kollagen I-/Elastinindex wurde mittels Multiphotonentomographie bestimmt, und die Messung der Hautelastizität erfolgte mit dem Cutometer®.

Ergebnisse: In dieser Studie konnte bestätigt werden, dass die orale Supplementierung mit einem carotinoidreichen Grünkohlextrakt zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Carotinoide in der Haut, sowohl nach fünf als auch nach zehn Monaten, führt.

Nahrungsergänzungsmittel, die viele Antioxidantien enthalten, haben folglich einen Einfluss auf den kutanen Carotinoidgehalt.

Eine weitere Erkenntnis ist darüber hinaus der Einfluss von Carotinoiden auf die extrazelluläre Matrix der Dermis. Es wurde nachgewiesen, dass der Kollagen I-/Elastin Hautalterungsindex signifikant ansteigt, dieser sich aber nicht in der Steigerung der Elastizität der Haut widerspiegelt.

Schlussfolgerung: Zusammenfassend kann diese Arbeit als eine Grundlage für die Entwicklung weiterer Forschung bezüglich Hautalterung sowie hautschützender Effekte gesehen werden.

Die durchgeführten *in vivo* Untersuchungen zur Wechselwirkung von Carotinoiden/Antioxidantien und Hautalterung ergeben Aufschluss darüber, inwiefern eine gesunde Lebensweise, insbesondere eine antioxidantienreiche Ernährung, zur Verbesserung der Hautstruktur beiträgt.

1.2. Abstract (Englisch)

Influence of carotenoids on collagen I-/elastin index and skin parameters – prospective placebo-controlled study

Introduction: Antioxidants, especially carotenoids, which have to be consumed with food or supplemented, provide effective protection against skin aging processes. Free radicals, which are formed when external environmental influences act on the skin, can be metabolized by antioxidants and thus offer effective protection against skin damage.

Methods: In the present doctoral thesis, a placebo-controlled *in vivo* study on 29 test subjects carried out various measurements to detect the carotenoid concentrations, the elasticity of the skin and the collagen I / elastin index over a period of ten months. The measurements were taken *in vivo* on the skin of the face (cheek), on the ball of the thumb and on the inside of the forearm. Of the 29 test subjects, 14 took three carotenoid-containing curly kale extract capsules (a total of 1650 µg carotenoids / day) once a day (verum group), and 15 women received optically identical capsules without active ingredient (placebo group).

The noninvasive measurement methods used for this thesis allow statements to be made about the composition, biomechanical properties and antioxidant content of the skin.

Two different optical sensors (Biozoom® and CaroLED LMTB®) and resonance Raman spectroscopy were used to determine the carotenoids. The collagen I/elastin index was determined by multiphoton tomography and the skin elasticity was measured with the Cutometer®.

Results: This study confirmed that oral supplementation with a carotenoid-rich curly kale extract leads to a statistically significant increase of carotenoid concentration in the skin, both after five and ten months.

Food supplements that contain many antioxidants therefore have an influence on the cutaneous carotenoid content.

Another finding is the influence of carotenoids on the extracellular matrix of the dermis. It has been proven that the collagen I / elastin skin aging index increases significantly, but this is not reflected in the increase in elasticity of the skin.

Conclusion: In summary, this thesis can be seen as a basis for the development of further research into skin aging and skin protective effects. The *in vivo* investigations carried out on the interaction of carotenoids / antioxidants and skin aging provide information on the fact that a healthy lifestyle, in particular a diet rich in antioxidants, contributes to the improvement of the skin structure.

2. Einleitung

2.1. Einführung

Während der letzten Jahre sind Themen wie gesunde Ernährung, Anti-Aging und Lifestyle immer mehr in das Bewusstsein der Bevölkerung gerückt. Das Interesse daran wächst stetig und es ist weithin bekannt, dass sich eine ausgewogene Ernährung, mit viel Obst und Gemüse, positiv auf das Wohlbefinden und die Gesundheit des Menschen auswirkt (Fito & Konstantinidou, 2016; Sun et al., 2016; Dias, et al., 2014). Neben den physischen und physikalischen Eigenschaften der Haut trägt auch ein entsprechendes Erscheinungsbild zum Wohlbefinden des Individuums bei. Nicht umsonst wird die Haut auch als Spiegel der Seele bezeichnet.

Vor allem Vitamine (A, C, D, E), Carotinoide (β -Carotin, Lycopin, Lutein, Zeaxanthin) und andere Antioxidantien (Coenzym Q 10, Flavonoide etc.) stellen einen Schutzmechanismus dar, der Zellen und Bindegewebe des menschlichen Körpers vor oxidativem Stress schützt. Dieser kann Ursache oxidativer Zellschädigung und Hautalterung sein, führt aber auch zu neurologischen (Xin, et al., 2015) oder kardiovaskulären (Varga, et al., 2015) Erkrankungen und wird unter anderem durch Umwelteinflüsse wie Rauchen, Alkoholkonsum oder Sonneneinstrahlung verursacht. Oxidativer Stress kann aber auch durch psychischen Stress oder hohe körperliche Belastung, wie exzessiver Sport, hervorgerufen werden (Khoubnasabjafari et al., 2015; Mons et al., 2016; Varadinova et al., 2015; Yoshida et al., 2015; Grether-Beck et al., 2016; Schempp et al., 2000; Fluhr et al., 2011; Maeter et al., 2013; Darvin M. E. et al., 2013; Vierck et al., 2012). Durch vorgenannte Umwelteinflüsse entstehen freie Radikale (ROS – reactive oxygen species) im menschlichen Körper. Hierbei handelt es sich um hoch reaktive Substanzen, d. h. um Moleküle mit einem ungepaarten Elektron und dadurch bedingter hoher oxidativer Kapazität, die permanent in den Mitochondrien der Zellen gebildet werden. In hoher Konzentration können sie sogar Ursache von Hauttumoren sein. Dieser schädigenden Wirkung entgegenzuwirken, hat der Körper ein antioxidatives Netzwerk entwickelt, was in der Lage ist, freie Radikale zu neutralisieren (Thiele et al., 2001). Es sollten daher ausreichend Antioxidantien im Organismus vorhanden sein, so dass es nicht zu einer Verschiebung zu Gunsten der freien Radikalen kommt, die mit unkontrollierter Zellschädigung verbunden ist.

Carotinoide müssen mit der Nahrung aufgenommen werden. Bisher wurde zu deren Detektion die Hochdruckflüssigkeitstomographie (HPLC) verwendet. Nachteil dieser Untersuchungsmethode ist, dass sie sehr aufwändig und teuer ist und nicht *non invasiv* durchgeführt werden kann, d. h. es müssen zuvor invasiv Hautproben entnommen werden. Eine nichtinvasive Methode zum Nachweis von Aufnahme und Bioverfügbarkeit von Carotinoiden stellt beispielsweise seit einigen Jahren die Resonanz-Raman-Spektroskopie dar (Darvin et al., 2016; Darvin et al., 2013).

Bezüglich der Neutralisierung freier Radikale sind darüber hinaus die physiologische Zusammensetzung und Konzentration der Antioxidantien von Relevanz, da sehr hohe Konzentrationen eine paradoxe Wirkung haben können und somit pro-oxidativ wirken (Palozza et al., 2009; Lambert & Elias, 2010). In Zusammenschau der vorgenannten Aspekte, gibt es Hinweise, dass eine physiologisch relevante Erhöhung der Carotinoide und anderer Antioxidantien im Gewebe, z. B. durch Supplementierung mit Nahrungsergänzungsmitteln, einen positiven Effekt auf die Hautalterung hat (Darvin et al., 2006). Dieser Hypothese weiter nachzugehen, ist ein Aspekt der vorliegenden Arbeit. Es wurde der positive Effekt auf den Hautstatus, bedingt durch carotinoidhaltige Nahrungsergänzungsmittel, anhand von verschiedenen Hautparametern untersucht. Dazu gehören zunächst der Nachweis des Carotinoidgehalts der Haut, die Messung der Hautelastizität und des Kollagen I-/Elastinindex (Heinrich et al., 2016). Um diese Effekte genauer zu verstehen, bedarf es umfangreicher Untersuchungen. In dieser Arbeit werden verschiedene Techniken eingesetzt, um die Carotinoidkonzentration nicht invasiv in der Haut zu bestimmen.

Im weiteren Verlauf wird der Fokus dieser Arbeit vor allem auf dem Kollagen I-/Elastinindex liegen. Die dermalen Proteine Kollagen I und Elastin scheinen in engem Zusammenhang zur Hautalterung bzw. zum Anti-Aging-Effekt hinsichtlich der Ernährung bzw. Nahrungsergänzungsmitteln zu stehen und stellen entsprechende messbare Parameter dar (Gogly et al., 1997; Yasui et al., 2013). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass sich einerseits die Kollagen I- und Elastinstruktur aber andererseits auch deren Verhältnis zueinander mit dem Alter verändert (Knott et al., 2009; Sanchez et al., 2013; Koehler et al., 2009; Karagas et al., 2007). Die Elastizität der Haut steigt mit der Atrophie der Kollagen I-Faserbündel und der damit verbundenen Abflachung der Fasernetze sowie der Zunahme der elastischen Fasern an. Um diese Veränderung in der Haut nachzuweisen, bedurfte es früher der Entnahme entsprechender Hautbiopsien. Heutzutage gelingt der Nachweis nicht

invasiv in vivo durch die Zwei-Photonen-Tomographie, wobei Kollagen I mittels SHG- (second harmonic generation) und Elastin durch AF- (Autofluoreszenz) Signale in der Dermis nachgewiesen werden kann (König, 2000; König, 2008).

Mittels der Zweiphotonenmikroskopie kann dadurch der Kollagen I/Elastinindex - SAAID (SHG to AF aging index of dermis) bestimmt werden (Meinke et al., 2017; Meinke et al., 2010).

$$\text{SAAID} = (\text{SHG-AF})/(\text{SHG+AF}); \frac{(\text{Kollagenintensität}-\text{Elastinintensität})}{(\text{Kollagenintensität}+\text{Elastinintensität})}$$

Der Kollagen I-/Elastinindex ist ein objektiver Parameter zur nichtinvasiven in vivo Bestimmung der extrinsischen und intrinsischen Hautalterungsprozesse unterschiedlicher Hautareale dient.

Des Weiteren kann man mit ihm Hautschutzeffekte, Wundheilungsprozesse und die Erkennung von Hauterkrankungen beschreiben (Sugata et al., 2015; Cicchi et al., 2010).

Es ist bekannt, dass die Konzentration der dermalen Kollagentypen I, IV, VII und XVII mit dem Alter abnehmen (Farage et al., 2013; Langton et al., 2016). Im Gegensatz zu Kollagentyp I und III, kann man die Kollagentypen IV, VII und XVII nicht in vivo über den SAAID quantifizieren. Dies ist nur durch Anwendung spezieller Berechnungen möglich (Shirshin et al., 2017). Die Kollagentypen I, II, III und IV repräsentieren in etwa 95% des gesamten Kollagens im menschlichen Körper (van den Berg & Cabri, 2003).

Die Hypothese dieser Arbeit besteht darin, nachzuweisen, ob systemisch verabreichte Carotinoide, in dieser Studie carotinoidreiche Grünkohlextrakt kapseln, die Synthese von Kollagen I in den Fibroblasten signifikant erhöhen bzw. dessen natürliche Abnahme mit der Zeit verzögern. Diese Abnahme wird v. a. durch oxidativen Stress verursacht und trägt, wie erwähnt, zur vorzeitigen Hautalterung bei. Es haben sich unterschiedliche Verfahren etabliert, um diese zu quantifizieren.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei verschieden kutane Carotinoidsensoren, die auf Basis der Reflexionsspektroskopie (SRRS, spatially resolved reflectance spectroscopy) entwickelt wurden, verwendet. Mit diesen können Carotinoide in der Haut nicht invasiv gemessen werden (Meinke et al., 2017).

Darüber hinaus kam außerdem die Resonanz-Raman-Spektroskopie zur Bestimmung der kutanen Carotinoide zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um die ursprüngliche

Methode zur Erfassung der Carotinoide in der Haut. Diese ist jedoch wesentlich aufwändiger und teurer im Vergleich zu den neuen, kostengünstigen Reflexionssensoren, die ferner, aufgrund ihrer geringen Größe, flexibel eingesetzt werden können. Die Sekundärhypothese dieser Arbeit besteht darin, zu zeigen, dass auch die verwendeten Rückstreuungssensoren, ohne Raman-Aktivierung, die Carotinoide verlässlich messen.

Um den Carotinoidgehalt in der Haut der Probandinnen gezielt zu steigern, nahm eine Gruppe ein carotinoidreiches Grünkohlextrakt über zehn Monate ein. Eine Vergleichsgruppe erhielt entsprechend ein Placebo-Präparat. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass oral aufgenommene Carotinoide eine hohe Bioverfügbarkeit sowie Radikalfängerpotential besitzen, was sich positiv auf das Erscheinungsbild der Haut auswirkt (Meinke et al., 2010; Meinke, et al., 2013).

Mit der genannten Resonanz-Raman-Spektroskopie wurde eine qualitative Carotinoidmessung durchgeführt. Durch Anregung auf zwei unterschiedlichen Wellenlängen eines Argon-Lasers ist hier eine Unterscheidung der verschiedenen Carotinoide (Carotinoide und Lycopin) möglich. Diese Methode stellt somit eine Möglichkeit dar, Carotinoide direkt und nicht invasiv zu messen.

Um darüber hinaus den Einfluss von Carotinoiden auf die Elastizität der Haut zu untersuchen, wurde eine Saugmethode (Cutometer®) verwendet, die die Deformation (Elongation) auswertet.

Des Weiteren wurden die optischen Parameter der natürlichen Fluorophore Elastin und Kollagen I bei Zwei-Photonen-Anregung untersucht und als objektiver Hautalterungsparameter der Kollagen I-/Elastinindex (SAAID) berechnet.

Die nichtinvasiven Messungen, die alle in vivo durchgeführt wurden, fanden zu folgenden Zeitpunkten statt: vor, fünf und zehn Monate nach Einnahme des Präparates.

2.2. Aufbau der Haut und ihre biomechanischen Eigenschaften

Die Haut, das flächenmäßig größte Organ des Menschen, überzieht als Integumentum commune mit ca. 1,5 bis 2 m² den Körper des Individuums. Sie bildet außerdem ein Schutzorgan gegenüber mechanischen Einwirkungen, stellt aber auch eine Barriere gegenüber Bakterien dar und ist ein wichtiges Sinnes- und Immunorgan (Moll, 1998).

Somit stellt eine gesunde Haut wesentliche Überlebensfunktionen des menschlichen Organismus sicher.

Sie besteht aus drei Hauptschichten, s. Abbildung 1, und lässt sich von außen nach innen in Epidermis, Dermis und Subcutis einteilen. Ihr Kolorit wird bestimmt durch die Eigenfarbe des Gewebes, d.h. durch das endogene Pigment Melanin, durch exogene Pigmente und die Durchblutung.

Die Epidermis besteht aus einem mehrschichtigen, verhornenden Plattenepithel und ist gefäßlos. Je nach Körperregion, Alter und Geschlecht weist sie eine Dicke von 30 bis 300 µm auf (Moll, 1998).

Die Blutversorgung erfolgt von der Subcutis her durch je ein an der Subcutis-Dermis Grenze und unter dem Papillarkörper der Dermis gelegenes Gefäßnetz (mit Kurzschlussanastomosen zur Umgehung der Kapillarbereiche) (Boss, 1993).

Diese unterteilt sich wiederum in vier Schichten, von außen nach innen in das Stratum corneum, das Stratum granulosum, das Stratum spinosum und das Stratum basale.

Es handelt sich dabei um ein Proliferationsgewebe, wobei die Zellteilung vorwiegend im Stratum basale erfolgt. Mit der Zellneubildung wandern die Zellen unter Veränderung ihrer Struktur zur Hautoberfläche und werden letztendlich als Korneozyten (denukleinierte Keratinozyten) abgeschilfert. Die Erneuerung der Oberhaut nimmt unter physiologischen Bedingungen in etwa 30 Tage in Anspruch, d.h. von der Zellteilung bis zur Hornschuppe.

Die Epidermis besteht zum größten Teil, nahezu 90%, aus Keratinozyten. Darüber hinaus kommen noch Merkel-Zellen, Melanozyten, Langerhans-Zellen und Lymphozyten vor.

Ihre Hauptfunktion ist der Schutz vor mechanischen Einwirkungen, chemischen Reizungen, Austrocknung sowie Schutz gegenüber Strahleneinwirkungen (Sonnenstrahlen, meist UV-Strahlung) und die immunologische Abwehr.

An die Basalmembran der Epidermis schließt sich nach innen die Dermis an.

Die Fasern der Dermis sind in zwei Schichten angeordnet, dem Stratum papillare und dem Stratum reticulare. Das feinere oberflächliche Stratum papillare wird durch zarte elastische Fasern gebildet, den sogenannten papillären Elastikaplexus. Das breitere Stratum reticulare besteht aus kräftigen Kollagen- und elastischen Fasern. Diese sind in dicken gewellten Bändern angeordnet, Blutgefäße finden sich kaum.

Zwischen den Fasern findet sich die Interzellulärschicht (Matrix), welche hauptsächlich aus Glykosaminoglykanen (v.a. Hyaluronsäure) besteht. Die

vorherrschenden Zellen der Dermis sind Fibroblasten, die die Fasern und die Matrix der Dermis synthetisieren. Sie sind somit für die Produktion von Elastin und Kollagen verantwortlich. Außerdem finden sich in der Dermis Mastzellen, Makrophagen (M1- und M2-Makrophagen), T-Zellen und Histiozyten sowie Rezeptoren für Berührung, Druck, Schmerz und Temperatur (Meissnersche Tastkörperchen, Vater-Pacini-Körperchen) und freie Nervenendigungen.

In der Tiefe entspringen Haarfollikel sowie Schweißdrüsen, deren Ausführungsgänge die Dermis durchziehen.

An die Dermis schließt sich die Subcutis, das Unterhautfettgewebe, an, was durch lamellar angeordnetes Bindegewebe unterteilt wird. Es dient hauptsächlich der Isolierung, der Energiereserve und letztendlich auch der mechanischen Polsterung (Moll, 1998).

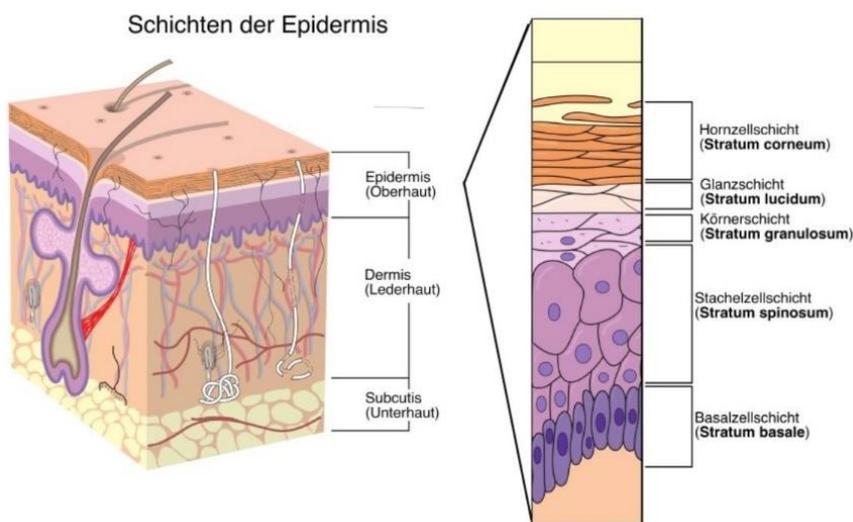


Abbildung 1: Abbildung der Haut (Hartmann, 2021).

2.2.1. Biomechanische Eigenschaften der Haut

Reißfestigkeit und Elastizität sind die wichtigsten biomechanischen Eigenschaften der Haut und hängen in erster Linie von der Struktur der Dermis ab. Kollagen ist das am häufigsten vorkommende Protein im menschlichen Körper (30%) und ein wesentlicher Bestandteil des Bindegewebes als wichtigstes Strukturprotein.

2.2.2. Dermale Strukturproteine Elastin und Kollagen

2.2.2.1. Kollagen

Kollagen ist ein Strukturprotein der extrazellulären Matrix und ein wesentlicher Bestandteil von Knorpel, Knochen, Sehnen, Haut und Bindegewebe (Moll, 1998). Die Synthese verläuft intrazellulär in den Fibroblasten, in den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums, die Prokollagen in den Extrazellularraum abgeben. Es sind 28 Kollagene bekannt (Typ-I- bis XXVIII-Kollagen), die biochemisch nicht identisch sind, wobei in der Dermis v. a. Typ-I-Kollagen vorherrscht (Moll, 1998). Dort entsteht das Kollagen nach enzymatischer Abspaltung terminaler Peptide.

Kollagen besteht folglich aus Polypeptidketten, die eine linksgängige Helix haben. Fibrillen bzw. feine Fasern, sind aus drei dieser Helices zu einer rechtsgängigen Helix zusammengefasst, welche sehr zugfest sind und dem Gewebezusammenhalt im Organismus dienen. Dies ist das gemeinsame strukturelle Merkmal von Kollagen. In entspanntem Zustand bilden Kollagenfasern ein gewelltes Netzwerk, was sich unter Dehnung in Richtung der einwirkenden Kraft glättet, solange bis alle Kollagenfasern gespannt sind. Wirkt eine besonders starke Kraft auf die Kollagenfasern ein, kommt es zur Verletzung im Sinne von plastischer Verformung der Haut, die nur bis zu einem gewissen Maße reversibel ist. Unter dem Elektronenmikroskop weisen die Kollagenfibrillen eine typische Querstreifung auf.

Besonders in Kollagen I findet man bis zu 96% der Dreifachhelix vor, wohingegen der Dreifachhelixanteil zum Beispiel bei Kollagen XII weniger als 10% beträgt (Ricard-Blum, 2011). Der periodische Aufbau ist die notwendige Voraussetzung, um aus intensivem Licht ein SHG-Signal (Frequenzverdopplung) zu erzeugen. Der für die Tomographie der Haut wesentliche Effekt ist die Frequenzverdopplung/SHG-Generierung. Hierdurch wird eine Stoffdifferenzierung möglich (Leonhardt, 1985).

2.2.2.2. Elastin

Das Protein Elastin bzw. die elastischen Fasern sind neben dem Kollagen die wichtigsten Fasern der Haut und bilden subepidermal ein feines Netz, den Elastikaplexus (vernetzte Tropoelastineinheiten). Diese Fasern sind erheblich dünner als das Kollagen und können bis auf mehr als das Doppelte ihre Länge ausgedehnt werden, bevor sie brechen. Besonders viele elastische Fasern sind im Gesicht und

Nacken zu finden. Sie sind im Wesentlichen für die Festigkeit und Elastizität der Dermis verantwortlich und reduzieren sich ab dem 30. Lebensjahr, was eine schlaffere Haut im Alter bedingt (Moll, 1998; Boss, 1993).

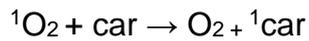
Elastische Fasern können mittels Zwei-Photonen-Anregung über die Autofluoreszenz nachgewiesen werden (Denk & Webb, 1990).

2.3. Antioxidantien und ihr Wirkmechanismus

Die menschliche Haut, insbesondere deren äußere Schicht, das Stratum corneum, ist permanenten Umwelteinflüssen ausgesetzt. Hierzu zählen u. a. UV-Strahlen, chemische Noxen und Bakterien. Zum Schutz gegenüber diesen externen Einflüssen verfügt der Körper über ein entsprechendes Abwehrsystem aus enzymatischen und nicht enzymatischen Antioxidantien (Thiele et al., 2001). Diese Antioxidantien schützen den Organismus vor schädigenden Effekten, die durch exzessive Oxidationsprozesse ausgelöst werden können (Palozza et al., 2003). Das Abwehrsystem besteht aus einem Zusammenspiel antioxidativer Moleküle unterschiedlicher Stoffgruppen. In dieser Arbeit werden speziell die Carotinoide im allgemeinen und Lycopin betrachtet, die aufgrund ihrer zahlreichen konjugierten Kohlenstoff-Doppelbindungen eine hohe antioxidative Aktivität haben.

Eine der zu berücksichtigenden Ursachen der Hautalterung ist oxidativer Stress in Form von freien Radikalen. Hierbei handelt es sich um Moleküle, die Sauerstoff enthalten und auch als reaktive Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) bezeichnet werden. Sie entstehen in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung und können in hoher Konzentration zu Zellschädigung und Hautalterung sowie zu Hautkrebs führen (Wenk & Meewes, 2001). Zu den molekularen Oxidantien gehören u. a. Ozon oder Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$, der eines der reaktivsten freien Radikale ist. Es handelt sich um einen (photo-) chemisch angeregten Sauerstoff (Klotz et al., 2001).

Carotinoide, insbesondere Lycopin, stellen effektive Singulett-Sauerstoff-Quencher dar (Klotz et al., 2001), d.h. aktivierte O_2 -Verbindungen werden inaktiviert sowie der Triplettzustand absorbiert (Palozza et al., 2009). Dabei wird Wärme freigesetzt, s. folgende Formel (der Triplettzustand wird durch die hochgestellte „1“ vor dem Sauerstoffmolekül gekennzeichnet):



Dieser sog. Quenching-Effekt stellt einen effektiven Schutz vor der zellzerstörenden Wirkung photooxidativer Prozesse dar. Ein Mangel an Antioxidantien f\u00fchrt zu einem \u00dcberangebot an freien Radikalen und folglich zu oxidativem Stress mit zellsch\u00e4digenden Prozessen.

2.3.1. Carotinoide

Carotinoide findet man weit verbreitet in der Natur. Sie sind u. a. fettl\u00f6sliche Antioxidantien, die in konzentrierter Form im Stratum corneum der Haut nachweisbar sind und die Haut vor freien Radikalen, und deren potenziell sch\u00e4dlichen Effekten, sch\u00fctzen. Sie geh\u00f6ren somit zu den Hauptbestandteilen des antioxidativen Systems des Menschen. Da sie im Organismus zwar metabolisiert aber nicht synthetisiert werden k\u00f6nnen, m\u00fcssen sie mit der Nahrung, d. h. durch den Verzehr von Obst und Gem\u00fcse, aufgenommen werden. Ihre Resorption erfolgt \u00fcber den D\u00fcnn darm. Sie werden vorwiegend im Fettgewebe und der Leber gespeichert. Ihre Schutzwirkung liegt in ihrer direkten antioxidativen Aktivit\u00e4t, die von ihrer chemischen Struktur abh\u00e4ngig ist. Je mehr Kohlenstoff-Doppelbindungen vorliegen, desto h\u00f6her ist ihre antioxidative Wirkung (Palozza & Krinsky, 1992). Es wurde jedoch auch die Umkehrung der antioxidativen zu einer prooxidativen Wirkung in vitro Versuchen beobachtet, was bei sehr hohen Carotinoidkonzentrationen vorkommen kann (Aldini et al., 2001).

Circa 70 % der Carotinoide der Haut machen β -Carotin und Lycopin aus. Sie repr\u00e4sentieren generell das antioxidative System im K\u00f6rper und bilden im Gewebe Schutzketten, die vor der destruktiven Wirkung freier Radikale sch\u00fctzen (Haag et al., 2011). In dieser Hinsicht spiegeln sie somit u. a. die Ern\u00e4hrungsgewohnheiten und den Lebensstil der Probandinnen in dieser Studie wider. Repr\u00e4sentativ f\u00fcr den Antioxidantienstatus der Haut wurden in dieser Arbeit Carotinoide und Lycopin nichtinvasiv gemessen.

2.3.1.1. β -Carotin

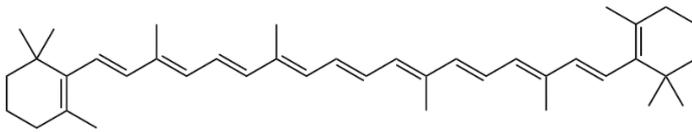


Abbildung 2: Struktur von β -Carotin.

β -Carotin ist das bekannteste Carotinoid und die wichtigste Vorstufe von Vitamin A (Retinol), auch als Provitamin A bezeichnet. Es findet sich in besonders hoher Konzentration in Grünkohl (8,68 mg β -Carotin/100g) und besteht aus einer Kohlenstoffkette mit jeweils einer Ringstruktur an beiden Enden, die wiederum durch eine Isoprenoidkette verbunden sind, s. Abbildung 2. Das gesamte Molekül enthält neun konjugierte Kohlenstoff-Doppelbindungen mit vier Methylgruppen als Seitengruppen und ist eine kristalline, in apolaren Lösungsmitteln lösliche, Verbindung. Das Molekulargewicht beträgt 536,9 g/mol. Es kommt sowohl in trans- als auch in cis-Isomerisierung vor, wobei in der Natur vor allem die trans-Form zu finden ist, welche sehr stabil ist. Erst eine Hitzebehandlung führt zur Umwandlung in die cis-Form und damit zum Aktivitätsverlust. β -Carotin ist empfindlich gegenüber Licht, Sauerstoff, Säure und hohen Temperaturen und besitzt eine hohe Quenching-Aktivität (Pfander, 1992). Aufgrund der durch β -Carotin bedingten gelblichen Verfärbung der Haut wird Licht besser absorbiert (Biesalski et al., 1997).

2.3.1.2. Lycopin

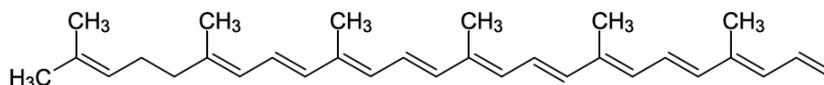


Abbildung 3: Struktur von Lycopin.

Lycopin ist ein azyklisches, linear aufgebautes Polyen, das zur Klasse der Carotinoide gehört und in hoher Konzentration in Tomaten, Wassermelonen und Papayas vorkommt. Es enthält elf konjugierte Kohlenstoff-Doppelbindungen, s. Abbildung 3, die dem Lycopin seine charakteristische rubinrote Farbe verleihen.

Außerdem ist dadurch seine Quenching-Aktivität in etwa doppelt so groß wie bei β -Carotin, d. h. es fängt z. B. doppelt so viel Singulett-Sauerstoff ab und ist damit der wirkungsvollste Sauerstoff-Quencher. Dies bedeutet, dass es in der Lage ist, durch freie Radikale aktivierte Sauerstoffverbindungen zu inaktivieren (Biesalski et al., 1997; Palozza & Krinsky 1992). Lycopin wird in der all-trans-Form aus der Nahrung aufgenommen und liegt im Blutkreislauf als Isomerengemisch (41-50% als *cis*-Isomer) vor, was in dieser Form höchstwahrscheinlich besser aus dem Dünndarm resorbiert werden kann. Aufgrund der fehlenden Ringstruktur besitzt Lycopin keine Provitamin A-Aktivität (Yeum & Russell, 2002).

2.4. Antioxidantienmessungen

Für die Messungen der Carotinoide in der Haut wurden zwei verschiedene optische Sensoren, Biozoom® und CaroLED LMTB®, sowie das Resonanz-Raman-Spektroskop benutzt.

2.4.1. Resonanz-Raman-Spektroskopie

Mit diesem laserspektroskopischen System kann man die charakteristischen Energieniveaus eines Moleküls messen. Die nach dem indischen Physiker C. V. Raman (1888-1970) benannte Raman-Spektroskopie beschreibt die spektroskopische Untersuchung der inelastischen Streuung von Licht an Molekülen oder Festkörpern und ermöglicht damit den Nachweis von Stoffen in und auf der Haut (Brandmüller & Moser, 1962). Im Jahr 2004 wurden von Gellerman et al. die ersten Untersuchungen beschrieben, Carotinoide am menschlichen Auge zu detektieren (Gellermann & Bernstein, 2004). Diese Methode wurde seitdem durch Darvin et al. weiterentwickelt. Bis dahin war die HPLC-Chromatographie (high performance liquid chromatography) der Goldstandard, um Carotinoide in der Haut zu bestimmen, wobei diese Methode jedoch nicht non invasiv möglich war und größere Gewebeproben benötigt wurden (Darvin et al., 2003).

Aufgrund der Tatsache, dass eine deutliche Korrelation zwischen der HPLC-Chromatographie und der Raman-Spektroskopie besteht, ergibt sich daraus inzwischen die Möglichkeit, einzelne Carotinoide, wie Lycopin und β -Carotin, in der

Haut in vivo nichtinvasiv und unmittelbar zu messen (Darvin et al., 2005; Ermakov et al., 2004).

Dabei wird Laserlicht in die Haut eingestrahlt und neben den eingestrahlten Frequenzen werden auch Frequenzen beobachtet, deren Unterschiede zur Frequenz des eingestrahlten Lichts Informationen über die Schwingungs- und Photonen-Prozesse liefern. Mit den jeweils erhaltenen Spektren können einzelne Substanzen nachgewiesen werden (Darvin et al., 2016).

Die in der Studie genutzten angeregten Wellenlängen liegen im blau-grün Bereich des Farbspektrums, welches mit dem maximalen Absorptionsvermögen von Carotinoiden zusammenfällt und bei Resonanzbedingungen zu einer entsprechenden Raman-Signalverstärkung führt. Hierzu wurde die duale Anregung mit einem Argonlaser bei 488 nm (Carotinoide) und 514,5 nm (Lycopin) verwendet (Darvin M. E. et al., 2006), so dass entsprechende Messwerte erhoben werden konnten.

2.4.1.1. Physikalische Grundlagen

Bei der Raman-Spektroskopie handelt es sich um eine laserspektroskopische Methode, mit der man die für ein Molekül typischen Energieniveaus detektieren kann. Darüber hinaus liefert sie Informationen über Schwingungszustände der Moleküle. Durch die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung und der Elektronenhülle eines Moleküls entsteht der Raman-Effekt. Er ist unabhängig von der Erregerstrahlung und Wellenlänge. Moleküle mit leicht deformierbaren Elektronenhüllen bzw. wenig polaren Bindungen sind Raman-aktiv (Manickavasagam, et al., 2014).

Bei der Bestimmung der Carotinoide in der Haut mittels Raman-Spektroskopie wird durch grüne und blaue Spektralfarbe (normochromatische Strahlung) eine Probe angeregt, wobei nur ein sehr geringer Teil elastisch in alle Raumrichtungen gestreut wird. Der größte Teil durchdringt die Probe (99,99%). Folglich hat die Frequenz der eingestrahlten Laserwellenlänge nahezu dieselbe Frequenz wie die Streustrahlung, die man als Rayleigh-Streuung bezeichnet (Lademann et al., 2016). Ein sehr kleiner Teil ($10^{-6}\%$), die sog. Raman-Strahlung, wird inelastisch gestreut und ist charakteristisch für das zu untersuchende Molekül.

Die Möglichkeit der Deformierung der Elektronenhülle eines Moleküls während des Schwingungsvorganges nach Anregung ist verantwortlich für die Raman-Streuung.

Dabei werden Bindungselektronen im Molekül periodisch verschoben und das Molekülgerüst in einen Schwingungszustand versetzt.

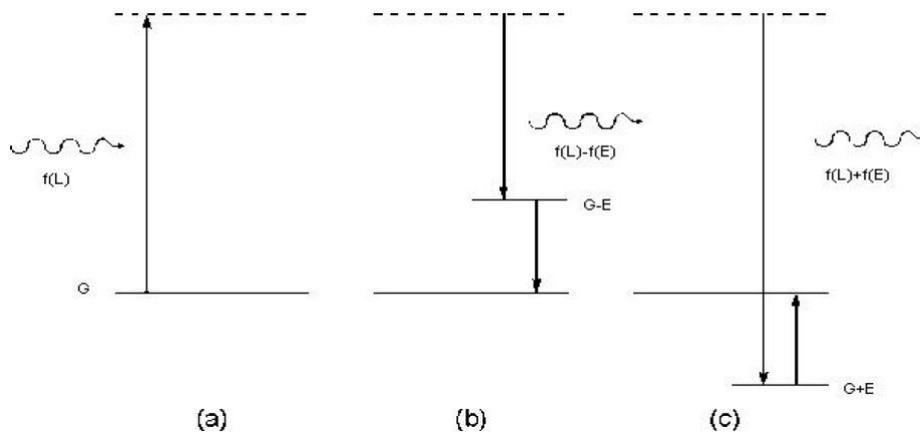


Abbildung 4: Schematische Darstellung Raman-, Rayleigh-Streuung (Spiess & Klapötke, 1999).

- (a) Die Probe wird durch die Anregungsstrahlung (Photonen des Lasers) $f(L)$ in einen energetisch angeregten Zustand gebracht.
- (b) Die angeregte Probe emittiert Photonen und geht dabei in einen energetischen Endzustand über ($G-E$), der dem Grundzustand (G) entspricht; Rayleigh-Streuung; die abgestrahlten Photonen haben nach der Schwingungsanregung eine längere Wellenlänge $f(L)-f(E)$; Raman-Stokes-Streuung.
- (c) Die angeregten Moleküle ($G+E$) geben Schwingungsenergie an die Photonen ab $f(L)+f(E)$ und besitzen nach der Wechselwirkung mit der Laserstrahlung eine niedrigere Schwingungsenergie; Antistokes-Raman-Streuung.

Den in Abbildung 4 beschriebenen Effekt der Frequenzverschiebungen nennt man Raman-Shift. Die Frequenzverschiebungen werden in Wellenzahlen (cm^{-1}) relativ zur Laserfrequenz angegeben, und die eingestrahlte Laser-Wellenlänge wird hier gleich null gesetzt. Stokes- und Antistokes-Strahlung haben den gleichen Shift, jedoch mit umgekehrten Vorzeichen, so dass im Folgenden nur noch die Stokes-Raman-Streuung dargestellt wird (Spiess & Klapötke, 1999).

Die Intensität des Raman-Peaks ist direkt proportional zur Molekülkonzentration (Koningstein, 1971). Mittels der Raman-Spektroskopie erhält man eine spektrale Information bezüglich der Moleküle mit Raman-aktiven Kohlenstoff-Doppelbindungen. Hierzu gehören aufgrund der Art ihrer Doppelbindungen insbesondere Carotinoide,

weshalb diese sehr gut zur Detektion mittels Raman-Streuung geeignet sind (Darvin et al., 2004).

Abbildung 5 zeigt die Absorptionsspektren der menschlichen Haut bei einer resonanten Anregungs-Wellenlänge von 514,5 nm. Das von der Haut detektierte Raman-Signal besteht aus einer großen Untergrundfluoreszenz mit kleinen Raman-Peaks.

Die Absorptionsspektren sind charakterisiert durch zwei prägnante Stokes-Linien bei 1156 cm^{-1} und bei 1523 cm^{-1} , bei nahezu gleicher Intensität. Diese Raman-Signale ergeben sich aus den Schwingungen der Kohlenstoff-Einfachbindungen (C–C) sowie der konjugierten Kohlenstoff-Doppelbindungen (C=C) (Ermakov et al. , 2004).

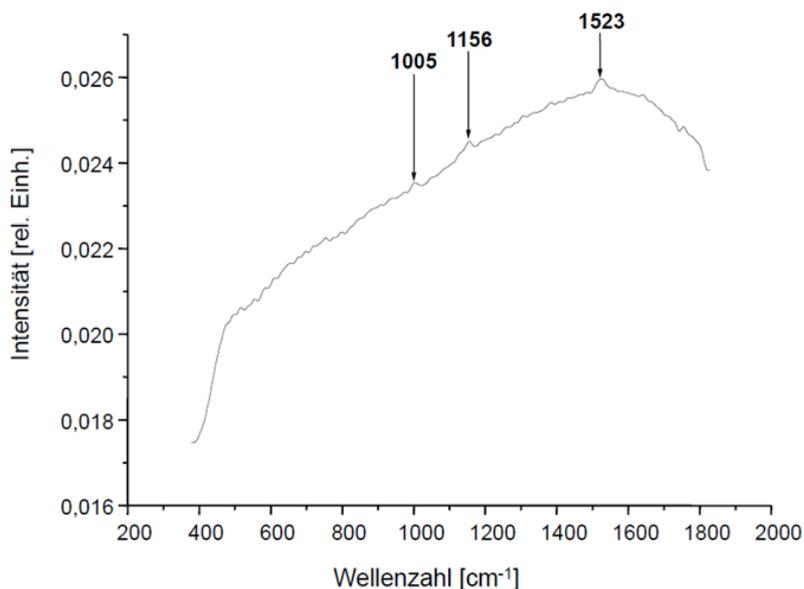


Abbildung 5: Raman-Spektrum der Haut unter Anregung durch Argon-Laser bei 514,5 nm (Darvin et al., 2004).

In Abbildung 6 ist die Stokes-Streuung nach Abzug der Untergrundfluoreszenz skizziert. Carotinoide sind, wie beschrieben, aufgrund ihrer leicht deformierbaren Elektronenhüllen (C-C, C=C) stark Raman-aktiv.

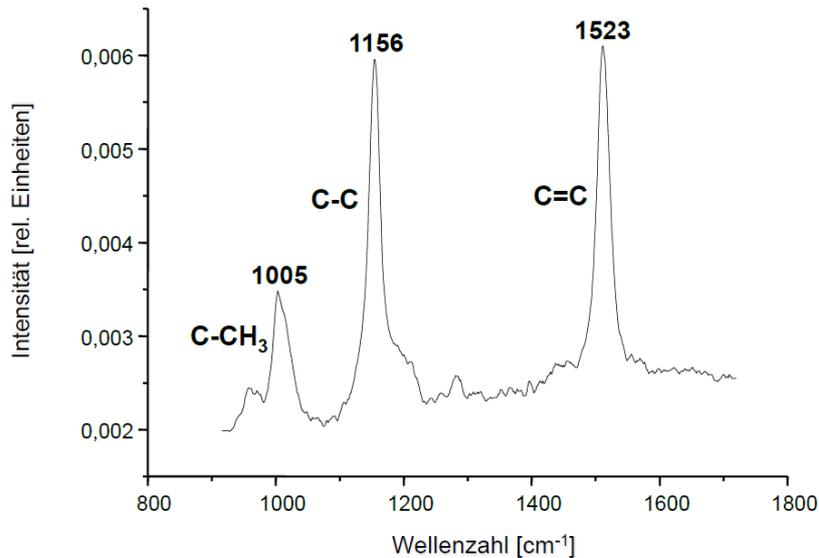


Abbildung 6: Carotinoidbanden (Raman-Spektrum) der menschlichen Haut nach Einsatz eines Spektrenauswertprogrammes (Darvin et al., 2004).

Im Rahmen der Entwicklung der Raman-Spektroskopie hat man das Spektrometer auf HPLC (High Performance Liquid Chromatography) - Messergebnisse geeicht, was bis vor einigen Jahren die Standardnachweismethode für Carotinoide war. Die Ergebnisse beider Methoden korrelieren miteinander, und es ist darüber hinaus die quantitative Bestimmung der Carotinoidkonzentration möglich. Bereits Haag et al. haben gezeigt, dass man mittels Raman-Spektroskopie die β -Carotin- und Lycopinkonzentration nichtinvasiv in der Haut nachweisen kann (Haag et al., 2011).

2.4.1.2. Absorptionsspektren der Carotinoide

Abbildung 7 zeigt die Absorptionsspektren von β -Carotin und Lycopin. β -Carotin und Lycopin werden beide bei einer Wellenlänge von 488nm (blaues Licht) angeregt, während Lycopin bei einer Wellenlänge von 514,5 nm (grünes Licht) deutlich stärker angeregt wird (Darvin et al., 2006). Somit kann man durch die unterschiedliche Anregungswellenlänge die einzelnen Carotinoide gut durch einen Argon Laser detektieren, da dieser beide Wellenlängen emittiert. Die Maxima beider Spektren liegen im sichtbaren Spektralbereich und eignen sich dadurch optimal zum Nachweis der genannten Substanzen mittels Raman-Spektroskopie in menschlicher Haut (Darvin et al., 2005; Darvin et al., 2006). Die Resonanz-Raman-Messung ist daher hochspezifische für den Carotinoidnachweis.

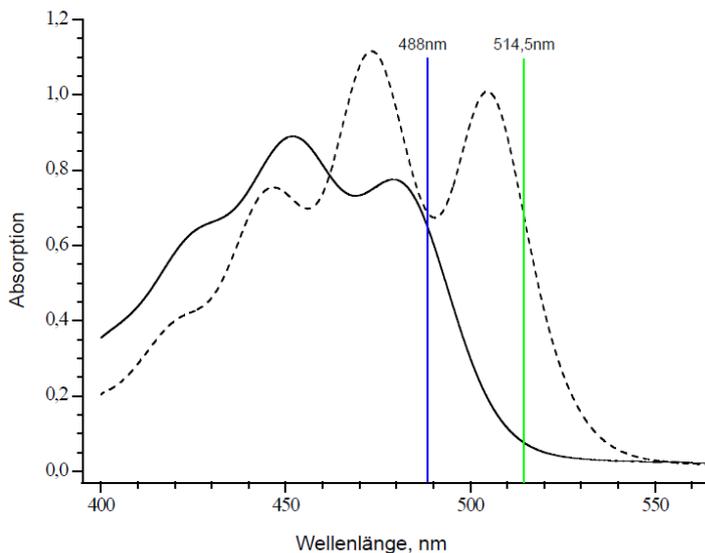


Abbildung 7: Absorptionsspektren von β -Carotin (–) und Lycopin (---) in Ethanol (Darvin et al., 2006).

2.4.2. Reflexionsspektroskopie

Die ortsaufgelöste Reflexionsspektroskopie, auch als spatially resolved reflectance spectroscopy (SRRS) bezeichnet, wird zur Messung des Carotinoidgehaltes in der Haut verwendet. Licht, welches von LEDs (light emitting diodes) ausgeht, wird dabei auf die Haut gerichtet. Über eine Spektralanalyse des reflektierten Lichts wird der Gehalt an Carotinoiden in der Haut bestimmt. Da nur ein Teil des Lichtes reflektiert und ein anderer Teil von den Carotinoiden absorbiert wird, handelt es sich um eine quasi absorbtionsspektrometrische Messung. Es ist somit möglich, eine Auskunft über die Antioxidantienversorgung im Bereich des untersuchten Hautareals zu geben.

Neben der einfachen SRRS gibt es auch die MSRRS (multiple spatially resolved reflectance spectroscopy), die die Rückstreumessung an vielen Orten gleichzeitig durchführt. Diese Messung ist nicht spezifisch für die Carotinoide und muss daher auf die Resonanz-Raman-Messung kalibriert werden.

2.5. Elastizitätsmessung der Haut

2.5.1. Saugmethode: Cutometer®

In dieser Arbeit wurde die Bestimmung der Elastizität der Haut mittels Ansaugverfahren durchgeführt. Graham und Holt entwickelten diese Saugmethode 1969 (Graham & Holt, 1969). Das auf dieser Methode basierende Cutometer®, wurde von der Firma COURAGE+KHAZAKA electronic GmbH entwickelt. Inzwischen erfolgte sein Einsatz in mehreren klinischen Studien, in denen es seine leichte Anwendbarkeit und Zuverlässigkeit in der Beurteilung von Hauteigenschaften zeigte (Akhtar et al.; 2011; Ohshima et al., 2013).

Dabei wird im rechten Winkel zur Hautoberfläche ein definiertes Stück Haut mittels eines Vakuums angesaugt, was in Abbildung 8 schematisch dargestellt ist. Gemessen wird dabei die Deformation der Haut sowie die Schnelligkeit und das Ausmaß deren Rückstellung. Es handelt sich also um die elastische Verformung der Haut (Messparameter UE), die viskoelastische Veränderung der Haut (Messparameter UV) und das elastische Rückstellmoment (Messparameter UR). In den darauffolgenden Jahren wurde das Verfahren weiterentwickelt und verbessert sowie das Cutometer® etabliert, womit hauptsächlich die Beschaffenheit der Dermis untersucht werden kann. In entsprechenden Studien konnte eine Abnahme der Elastizität mit zunehmendem Alter, abhängig von der untersuchten Körperstelle, nachgewiesen werden (Gniadecka & Serup, 1995). Das Cutometer® wird erfolgreich in der Forschung und Kosmetikindustrie eingesetzt und wurde daher auch für die Durchführung dieser Studie ausgewählt (Information und Gebrauchsanweisung zum Cutometer® MPA 580, 2004).

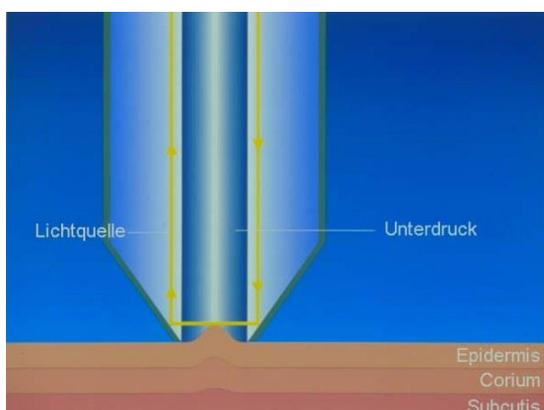


Abbildung 8: Schematischer Aufbau der Cutometer-Sonde, Courage + Khazaka electronic GmbH (courage-khazaka, 2020).

2.6. Bestimmung des Kollagen I-/Elastin-Index (SAAID)

2.6.1. Multiphotonen-Laser-Tomographie: DermalInspect®

Im Rahmen der Erforschung von Wechselwirkungen zwischen potenziellen Arzneiwirkstoffen bzw. chemischen Substanzen, in diesem Fall carotinoidreiche Nahrungsergänzungsmittel, greift man gerne auf mikroskopische Methoden zurück, da viele Prozesse auf zellulärer Ebene ablaufen. Sie bieten u. a. die Möglichkeit, Signale aus dem molekularen Stoffwechsel selbst zu detektieren. Mit der Multiphotonentomographie werden punktweise detektierte Signale mit dem Raster-scanning-Prinzip zu einem Bild zusammengesetzt.

Bei stark erhöhten Lichtintensitäten treten nichtlineare Effekte auf, die zur Bildentstehung genutzt werden. Die gleichzeitige Absorption von zwei (oder mehreren) Photonen wurde schon 1931 durch Maria Göppert-Mayer (Göppert-Mayer, 1931) vorhergesagt, konnte aber erst 1961 durch Kaiser und Garrett (Kaiser, 1961) bestätigt werden.

Bei der Multiphotonentomographie handelt sich um eine nicht-invasive Untersuchungsmethode mit höchster Auflösung, entwickelt durch Denk et al. im Jahr 1990 (Denk & Webb, 1990).

Für die Messungen der vorliegenden Arbeit wurde das DermalInspect®, ein Multiphotonen-Tomograph, der in dieser Form durch die Firma JenLab GmbH, Jena, entwickelt wurde, benutzt.

Mit einem Femtosekunden-Laser mit Wellenlängen im Nahen Infrarot (NIR), und Intensitäten zwischen MW/cm^2 bis GW/cm^2 , werden in den zu untersuchenden Hautarealen nichtlineare Effekte, wie die gleichzeitige Absorption zweier oder mehrerer Photonen oder Frequenzverdopplung, angeregt.

Die Anregung geschieht dabei ausschließlich in einem Fokusvolumen von unter einem bis wenige Kubikmikrometer. Außerhalb dieses Bereiches dominiert die lineare Wechselwirkung zwischen Laserstrahlung und Probe, in diesem Fall menschlicher Haut. Durch dieses „optische Fenster“ dringt die Strahlung, im Vergleich zu UV-Licht, tiefer in die Zellen der Haut ein, ohne schädliche Wechselwirkungen zu verursachen (Sordillo et al., 2014).

Eine Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen ist nicht notwendig, da es möglich ist, die endogenen Fluorophore zur Autofluoreszenz anzuregen, die es ermöglichen,

Eigenschaften der Zellen direkt zugänglich zu machen (König, 2000; Williams & Webb, 2001).

Die Signale liegen im sichtbaren Wellenlängenbereich und stammen aus einem räumlich eng begrenzten Ort, so dass automatisch eine dreidimensionale Information generiert werden kann. Zur Generierung eines Bildes wird grundsätzlich die Intensität des Fluoreszenzsignals genutzt.

Dieses basiert auf dem Prinzip der Fluoreszenzanregung eines Moleküls durch zwei oder mehrere Photonen. Jeder Laserpuls regt mehrere Moleküle zur Fluoreszenz an. Diese haben eine gewisse Lebensdauer in diesem angeregten Zustand und kehren nach einigen Nanosekunden wieder in den Grundzustand zurück.

Natürliche, in der Haut vorkommende Fluorophore bzw. fluoreszierende, extrazelluläre, dermale Matrixproteine, wie zum Beispiel Elastin oder Kollagen, können durch zwei oder mehrere Photonen geringer Energie spezifisch angeregt werden. Sie sind somit die Hauptträger der dermalen Fluoreszenz. Es kommt zur Autofluoreszenz, die man durch die Wahl der geeigneten Wellenlänge, bei der sie besonders effektiv zur Fluoreszenz angeregt werden, differenzieren kann.

Darüber hinaus kann man außerdem den Effekt der Induktion der Frequenzverdopplung (SHG - second harmonic generation) bestimmter Moleküle beobachten, was man sich bezüglich der Bildgebung bzw. Differenzierung des Fasernetzwerkes der Dermis zu Nutze machen kann.

Die Multiphotonentomographie stellt dem Untersucher umfangreiche Informationen zur Morphologie der Haut zur Verfügung und kann ohne Fluoreszenzfarbstoffe mit einem geringen Zeitaufwand von weniger als 15 Minuten durchgeführt werden.

Dadurch bietet sich die Möglichkeit, im Gegensatz zu früheren Studien, bei denen man zur Untersuchung Hautbiopsien entnehmen musste, in vivo, nicht invasiv, morphologische Strukturen der Haut, anhand hochauflösender Gewebeschnittbilder, qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Hierbei ist einerseits eine morphologische Unterscheidung der Zellen in der Haut und eine Differenzierung der einzelnen Faserqualitäten sowie deren Quantifizierung möglich (Kröger et al., 2020). Ein weiteres Vorteil stellt die beliebige Reproduzierbarkeit dar.

Folglich ist es heutzutage mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie möglich, Kollagen I bzw. Elastin in der Dermis nichtinvasiv in vivo nachzuweisen (König & Riemann, 2003; König, Ehlers & Stracke, 2006; König et al., 2006; Koehler et al. 2006).

2.6.2. Physikalische Grundlagen

2.6.2.1. Einphotonen-Fluoreszenzanregung

Bei der Einphotonen-Fluoreszenzanregung wird ein Fluoreszenzmolekül durch Absorption geeigneter Energie in Form eines Photons optisch angeregt, d.h. in einen energetisch höheren Zustand versetzt. Beim Übergang in den niederenergetischen Grundzustand kommt es zur Energieemission in Form eines neuen Photons (Fluoreszenz) (Lansing et al., 1989). Dieses muss die gleiche oder geringere Energie besitzen als das absorbierte Anregungsphoton (Stoke'sche Regel). Als Anregungsquelle werden bei der Einphotonen-Fluoreszenzanregung zum Beispiel Argon-Laser oder Festkörper-Laser mit einer Wellenlänge von 454-514 nm genutzt.

2.6.2.2. Zwei- oder Multiphotonen-Fluoreszenzanregung

Die Anregung erfolgt hierbei durch zwei oder mehr langwellige Photonen, wobei diese über ausreichend Energie verfügen müssen, um ein Fluoreszenzmolekül in einen angeregten Zustand zu versetzen. Zur Anregung verwendet man v. a. langwellige Strahlung des nahen Infrarotbereichs (NIR) (Zieger et al., 2016).

Es kann z. B. ein Molekül mit einem Photon der Wellenlänge λ_1 oder durch zwei Photonen der Wellenlänge λ_2 angeregt werden, s. Abbildung 9, wobei folgendes gilt:

Einphotonen-Fluoreszenzanregung: $E_1 = h \cdot c / \lambda_1$

Zweiphotonen-Fluoreszenzanregung: $E_1 = 2 \cdot E_2 = 2 \cdot h \cdot c / \lambda_2 \rightarrow \lambda_1 = \lambda_2 / 2$

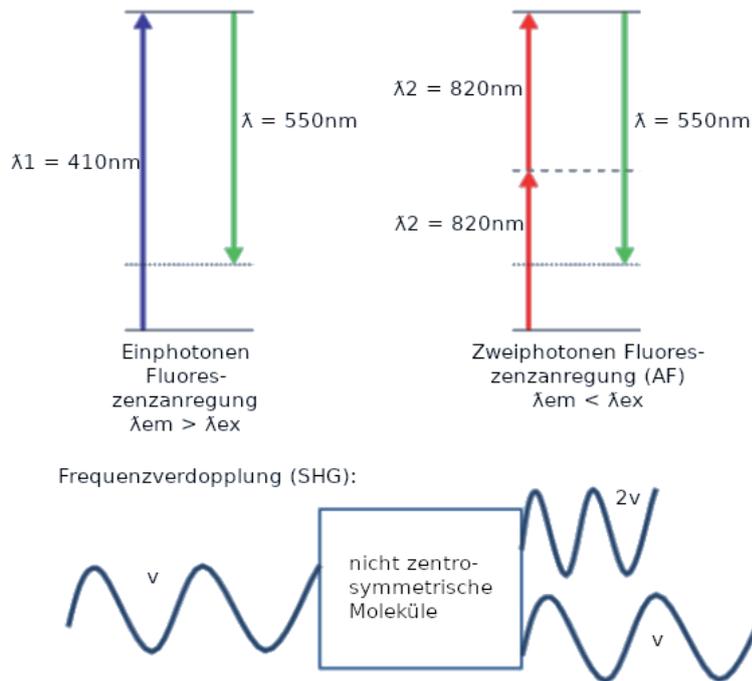


Abbildung 9: Prinzip der Ein- und Zweiphotonen-Fluoreszenzanregung sowie des SHG-Effektes (Modifiziert nach Zieger et al., 2016).

Voraussetzung für die Zwei- bzw. Multiphotonenanregung endogener Fluorophore, wie z. B. Elastin oder Kollagen I, ist eine hohe Energie- bzw. Photonenflussdichte, die man durch die Verwendung von Femtosekunden - gepulsten Lasern und Objektiven mit hoher numerischer Apertur erreichen kann (Denk & Webb, 1990). Durch kurze Pulse, statt konstanter Laserstrahlung, lassen sich außerdem Gewebeschäden vermeiden, da dadurch niedrigere mittlere Energiedichten im Gewebe erreicht werden und die Pulspausen eine Abkühlung des Gewebes ermöglichen (Kaatz & König, 2010). Im Gegensatz zur Einphotonenanregung ist das Fluoreszenzlicht (emittierte Licht) kurzwelliger und energiereicher als die Anregungsstrahlung und kann durch die Auswahl geeigneter Filtersysteme detektiert werden. Das Maximum der Zwei-Photonen-Anregung befindet sich zwischen 700 und 750 nm. Hierbei werden mehr als 50% der gesamten Fluoreszenz erzeugt (Zipfel et al., 2003).

2.6.2.3. Frequenzverdopplung

Ein für das dermale Kollagen I charakteristische Phänomen ist die sogenannte Frequenzverdopplung, SHG (second harmonic generation). Voraussetzung für deren Induktion ist das Vorhandensein nichtzentrosymmetrischer Molekülstrukturen, wie

man sie zum Beispiel in reifen Kollagenfasern findet (Friedl et al., 2007). Hierbei wird Licht der halben Ausgangswellenlänge erzeugt. Unter bestimmten Bedingungen entsteht bei Bestrahlung einiger Materialien durch einen Laser mit hoher Intensität Strahlung mit doppelter Frequenz, die der Halbierung der Wellenlänge entspricht. Die Voraussetzung für diesen Effekt wurde durch die Entwicklung des Lasers geschaffen und erstmals von Franken et al. in kristallinem Quarz gezeigt (Franken et. al., 1961).

2.6.3. Endogene Fluorophore

Fluoreszierende Biomoleküle kommen in allen Geweben vor, so auch in menschlicher Haut. Kenntnisse ihrer Anregungseigenschaften sind Voraussetzung für die effektive Nutzung der Multiphotonentomographie. Mit bestimmten Wellenlängen können endogene Fluorophore besonders effektiv angeregt werden und anschließend in einem bestimmten Wellenlängenbereich emittieren. Trotz häufiger spektraler Überlappung ist es möglich, durch die Wahl der geeigneten Anregungswellenlänge, die einzelnen Fluorophore anhand ihrer Emissionsspektren zu unterscheiden, s. Abbildung 10.

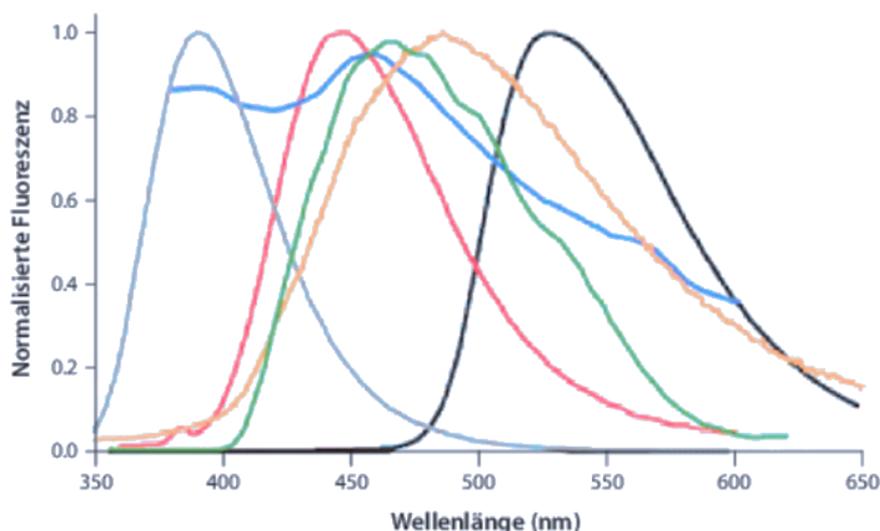


Abbildung 10: Emissionsspektren fluoreszierender Biomoleküle. Retinol (gelb), Riboflavin (schwarz), NADH (grün), Pyridoxin (grau), Folsäure (rot), Cholecalciferol (blau). (Modifiziert nach Zipfel et al., 2003; Kaatz & König, 2010).

Zu den wichtigsten endogenen Fluorophoren der Haut gehören die Nikotinsäure-Derivate NADH und NADPH, die sich konzentriert in den Mitochondrien der Zellen finden und wichtige Indikatoren für den Zellmetabolismus sind (König, 2000; Masters et al., 1997). Zu den fluoreszierenden Pigmenten der Haut gehören Melanin und Lipofuszin, die sich vorwiegend innerhalb der zytoplasmatischen Vesikeln befinden (Kaatz & König, 2010). Hierbei gibt Lipofuszin als Alterspigment einen Hinweis auf die Hautalterung und Melanin Auskunft über den Hauttypen und den individuellen UV-Schutz (Dimitrow et al., 2009; Kaatz & König, 2010).

Weitere wichtige Fluorophore sind die Strukturproteine Kollagen I, Elastin und Keratin. Im Gegensatz zu den anderen Fluorophoren, die meist intrazellulär auftreten, findet man diese in der extrazellulären Matrix. Somit sind sie hauptsächlich verantwortlich für die dermale Fluoreszenz. Insbesondere Elastin zeigt eine starke Autofluoreszenz (AF), während ein charakteristisches Phänomen des Kollagen I die sog. Frequenzverdopplung (SHG) ist. Die von der Dermis emittierten Photonen stammen folglich von Fluoreszenzprozessen und Effekten der Frequenzverdopplung und können über die entsprechende Filterwahl detektiert werden (Zoumi et al., 2002). In Tabelle 1 sind die wichtigsten Fluorophore der Haut mit ihren entsprechenden Anregungswellenlängen und Fluoreszenzmerkmalen aufgeführt.

Table 1: Fluoreszenzeigenschaften endogener Fluorophore (modifiziert nach (Kaatz & König, 2010)).

Fluorophor	Anregungs- wellenlänge (nm)	Emissions- maximum (nm)	Anregung	Referenz
Tryptophan Tryptophan	285 570	330 330	Einphotonen Zweiphotonen	Gryczynski et al. 1996 Gryczynski et al. 1996
Flavoproteine Flavoproteine	430-500 730	520-590 525	Einphotonen Zweiphotonen	Masters et al. 1999 Huang et al. 2002
NADH NADH	355 730	470 470	Einphotonen Zweiphotonen	Lakowicz et al. 1992 Huang et al. 2002
NAD(P)H NAD(P)H	340 730	470 460	Einphotonen Zweiphotonen	König & Schneckenburger 1994 Masters et al. 1998
Lipofuszin	364	555	Einphotonen	Marmorstein et al. 2002
Melanin (oxid.) Melanin	470 800	540 550	Einphotonen Zweiphotonen	Kayatz et al. 2001 Teuchner et al. 2003
Porphyrine	407	600, 620, 640	Einphotonen	König et al. 1995
Keratin Keratin	277 760	382 475	Einphotonen Zweiphotonen	Pena et al. 2005 Pena et al. 2005
Elastin Elastin	300-340 740	420-460 480	Einphotonen Zweiphotonen	König & Schneckenburger 1994 Zipfel et al. 2003
Kollagen Kollagen	300-340 730, 750	420-460 525	Einphotonen Zweiphotonen	König & Schneckenburger 1994 Zoumi et al. 2002

3. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Haut stellt nicht nur die äußere Barriere unseres Organismus gegenüber externen Einflüssen dar, sondern sie dient auch, v. a. im Gesicht, Repräsentationszwecken. Viele Menschen versuchen mit den unterschiedlichsten kosmetischen Produkten, den natürlichen Alterungsprozess der Haut aufzuhalten oder sogar umzukehren.

Aufgrund der Bedeutungszunahme der Ernährung, hinsichtlich Lifestyle und Anti-Aging, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die vermehrte orale Aufnahme von Antioxidantien (Carotinoiden) oxidativen Stress reduzieren und dadurch einen Schutz vor Zellschädigung bieten kann. Dazu wurden unterschiedliche, nicht invasive, in vivo Messverfahren angewendet. Die Tatsache, dass biologisches Gewebe eingestrahktes Licht zu einem Teil reflektiert, hat man sich hierbei zu Nutze gemacht.

Hauptziel der Arbeit ist zu untersuchen, ob die Einnahme von Carotinoiden einen Einfluss auf die Hautparameter Elastizität, Hautfestigkeit und den Kollagen I-/Elastinindex aufweist, die beide ein Maß für die Hautalterung darstellen. Die Hautparameter Elastizität und Hautfestigkeit wurden mittels Cutometer und der Kollagen I-/Elastin-Index der Haut mittels Zwei-Photonen-Tomographie nichtinvasiv in vivo untersucht.

Die Aufnahme und Bioverfügbarkeit der Carotinoide wurde zum einen mittels Resonanz-Raman-Spektroskopie und zum anderen mit zwei Rückstreuensensoren gemessen.

Die unterschiedlichen Messverfahren untersuchten die Validität der Rückstreuensensoren und dienten der Reproduzierbarkeit der Carotinoidbestimmung, da die menschliche Haut ein inhomogenes Gewebe darstellt, bedingt durch Falten, Muttermale, Narben etc.

4. Material und Methoden

4.1. Freiwillige Probandinnen und Probenmaterial

An dieser Studie, die im Herbst startete (Ende Oktober) und bis zum erneuten Herbstbeginn im darauffolgenden Jahr durchgeführt wurde, nahmen initial 34 hautgesunde weibliche Freiwillige im Alter von 40 bis 56 Jahren teil (mittleres Alter 49,2 Jahre), von denen 29 Teilnehmerinnen die Studie erfolgreich beendeten. Es wurden nur weibliche Probanden ausgewählt, da bei ihnen eine geringere Behaarung der Haut vorliegt und somit vorab ein Störfaktor bezüglich der Messungen ausgeschlossen werden konnte. Insgesamt gab es fünf Dropouts, drei in der Verum-Gruppe und zwei in der Placebogruppe. Zwei Probandinnen brachen die Teilnahme aufgrund von Magenproblemen ab und drei weitere kamen nicht zur dritten Nachuntersuchung. Keiner der Dropouts wurde ersetzt. Die verbliebenen 29 Probandinnen unterzogen sich alle den Messungen mit dem Zwei-Photonen-Tomographen, dem Cutometer® und den Carotinoidmessungen.

Unter den 29 Probandinnen waren 10 Raucherinnen und 19 Nichtraucherinnen. Alle Teilnehmerinnen hatten den Haut-Typ II, nach der Fitzpatrick Klassifikation (Fitzpatrick, 1988). Ausschlusskriterien für eine Studienteilnahme waren Hauterkrankungen, Schwangerschaft oder Stillzeit sowie bekannter Drogen- bzw. Alkoholabusus.

Die Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit den ethischen Richtlinien der Deklaration von Helsinki, und nach Erhalt eines positiven Votums der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin vor Studienbeginn, durchgeführt.

Alle Studienteilnehmerinnen haben zuvor eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben.

Probenmaterial:

Um den Carotinoidgehalt in der Haut zu erhöhen, nahm ein Teil der Probandinnen während der Studie, d. h. über einen Zeitraum von zehn Monaten, täglich drei Grünkohlkapseln auf einmal ein - im Folgenden die Verum-Gruppe. Diese Kapseln wurden *durch BioActive Food, Bad Segeberg, Deutschland*, bereitgestellt, wobei eine Kapsel folgende Substanzen enthielt:

- Lutein 430 µg
- Betakarotin 70 µg
- Lycopin 30 µg
- Zeaxanthin 20 µg

Insgesamt wurden somit täglich 1650 µg (3 Kapseln à 550 µg) Carotinoide supplementiert.

In bereits vorausgegangen Studien hatte sich gezeigt, dass o.g. Gemüseextrakt eine gute Bioverfügbarkeit hat und als Radikalfänger geeignet ist (Adur et al., 2014; Cicchi et al., 2010). Der Inhalt der Chargen wurde durch Resonanz-Raman-Spektroskopie auf die Wirksubstanz überprüft.

Die Kontrollgruppe erhielt optisch identische Placebo-Kapseln ohne Wirkstoff (Antioxidantien).

Alle Probandinnen führten ein Tagebuch, in dem sie die tägliche Einnahme protokollierten.

Die Messungen wurden vor, fünf und zehn Monate nach Beginn der Einnahme der Carotinoid-haltigen Kapseln durchgeführt. Gemessen wurde am Daumenballen, an der ventralen Seite des Unterarmes und an der Wange. Carotinoide kann man vor allem gut am Daumenballen nachweisen, da an dieser Körperregion das Stratum corneum dicker ist. Dadurch wird vermieden, dass beispielsweise Carotinoide im Blut im Rahmen der Messung miterfasst werden. Der Kollagen I-/Elastinindex wurde an der Wange und an der ventralen Seite des Unterarmes gemessen, um je eine sonnenexponierte und eine sonnengeschützte Hautpartie zu nutzen, die außerdem wenig behaart ist.

4.2. Funktionsweise des Biozoom®

Der MSRRS-Sensor Biozoom®, s. Abbildung 11, verwendet mehrere unterschiedlich positionierte Lichtsender und -detektoren (LED), die verschiedenen Abstände und Winkel zwischen Sender und Detektor für die Bestrahlung und Detektion aufweisen. Eine Messung dauert ca. 15 Sekunden. Der breite Messfleck (2 cm x 2 cm) macht den Sensor weniger anfällig für Fehler durch die Messposition (Meinke et al., 2017).

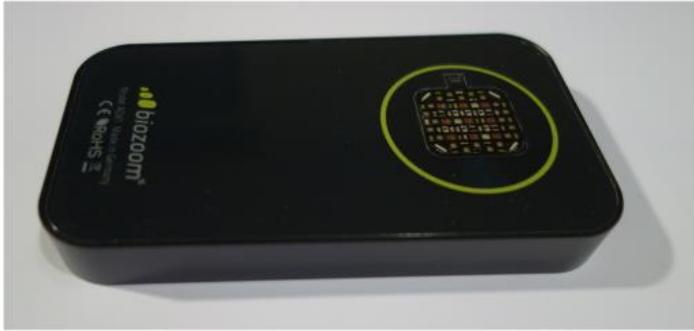


Abbildung 11: Biozoom (www.mybiozoom.com, 2021).

4.2.1. Messvorgang und Messparameter

Der Sensor wird mit einem Notebook verbunden und das Programm Biozoom® Scanner wird gestartet. Die Messung kann beginnen, sobald der Sensor blinkt. Nun wird der Daumenballen der rechten Hand auf den Sensor aufgelegt und den Anweisungen (Heben/Senken) des Daumenballens gefolgt. Es werden nacheinander fünf Messungen durchgeführt, die das Gerät automatisch speichert. Anschließend dauert es circa zwei Minuten, bis der nächste Proband gemessen werden kann.

Die Probandinnen (Verum- und Placebogruppe), die vor der Messung keine kosmetischen Produkte (z. B. Handcreme) anwenden durften, wurden zu Beginn, nach fünf Monaten und nach zehn Monaten gemessen, und bei jedem Besuch wurde die Messung drei Mal wiederholt. Für die Auswertung wurde der Mittelwert verwendet.

Die Daten wurden in willkürlichen Einheiten von 0 bis 10 dargestellt, wobei 0 Werten unterhalb des Schwellenwertes und 10 dem maximal beobachteten Wert entspricht, d. h. ca. 1 nmol Carotinoide/g menschlicher Haut. Die Messungen mit diesem Sensor wurden ausschließlich am Daumenballen durchgeführt.

4.3. Funktionsweise des CaroLED LMTB®

Der CaroLED Sensor dient der Erfassung und Quantifizierung von Carotinoiden in der menschlichen Haut und wurde für diese Messungen auf die Handinnenfläche kalibriert. Bei früheren Messungen mit RRS (Resonanz Raman Spektroskopie) und CaroLED an den gleichen Objekten wurde ein Kalibrierdatensatz gewonnen. Nach der Vorverarbeitung der Rohdaten wurde eine multivariante Kalibrierung basierend auf partieller Regression der kleinsten Quadrate durchgeführt. Diese Kalibrierung mit RRS als Referenzmethode ergibt den Carotinoidgehalt auf einer relativen Skala.

Die in der vorliegenden Studie gewonnenen Daten waren nicht Bestandteil des Kalibrierverfahrens. Das hier zugrunde liegende Messprinzip basiert auf SRRS (spatially resolved reflectance spectroscopy) (Andree et al., 2010; Arifler et al., 2006; Doornbos et al., 1999; Lisenko & Kugeiko, 2013).



Abbildung 12: CaroLED LMTB Sensor (Laser- und Medizintechnologie, Berlin, LMTB).

4.3.1. Messvorgang und Messparameter

Die Probandin legt, wie in Abbildung 12 dargestellt, ihren rechten Daumenballen auf den Sensor. Dieser Vorgang wird fünf Mal hintereinander wiederholt. Auch hier wurden die Probandinnen zuvor darauf hingewiesen, keine Hautpflegeprodukte aufzutragen. Der Sensor erfasst den Carotinoidgehalt der Haut, woraus anschließend ein Mittelwert gebildet wird.

Erneut wurden Daten in willkürlichen Einheiten von 0 bis 10 dargestellt, wobei 0 Werten unterhalb des Schwellenwertes und 10 dem maximal beobachteten Wert entspricht.

4.4. Funktionsweise des Resonanz-Raman-Spektrometers

Das Resonanz-Raman-Spektrometer dient der nicht invasiven Messung von Carotinoiden in der Haut. Es besteht aus einem Argon Laser (Laser 2000 GmbH), der gleichzeitig auf zwei Wellenlängen emittiert (488 nm und 514,5 nm), einem Spektrometer, einer CCD (charge coupled device) Kamera (eine Kamera mit einem lichtempfindlichen Sensor, der proportional zur eingestrahnten Lichtmenge ein elektrisches Signal ausgibt) und einem Computer. Abbildung 13 stellt den schematischen Aufbau dar.

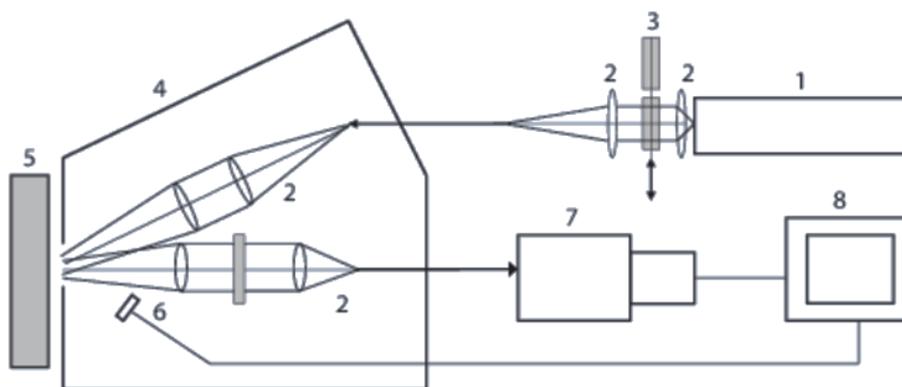


Abbildung 13: schematischer Aufbau eines Raman-Spektrometers (Lademann et al., 2016) (1-Laser, 2-optisches Abbildungssystem, 3-Filter, 4-Handstück, 5-Haut, 6-Hauttyperkennung, 7-Spektrometer mit Detektor, 8-Computer).

Die emittierte Laserstrahlung wird durch eine optische Quarzfaser zu einem Handstück geleitet, in dem das Licht gefiltert und auf die Haut projiziert wird. Anschließend wird das Raman-Signal durch ein zweites Abbildungssystem erfasst und als Faserbündel zu einem Spektroskop geleitet. Eine CCD-Kamera nimmt das entstandene Spektrum auf und leitet es an einen Computer weiter. Eine Messung dauert ca. 10 bis 15 Sekunden. Bei einer Wellenlänge von 488 und 514,5 nm beträgt die Eindringtiefe der Laserstrahlung ca. 150 – 200 μm . Aufgrund der geringen Eindringtiefe wird gewährleistet, dass am Handballen die Laserstrahlung nicht die Blutgefäße in der Dermis erreicht und somit die Carotinoide im Blut nicht die Messsignale beeinflussen. Darüber hinaus wird die anregende Laserstrahlung auf ein möglichst großes Hautareal projiziert (ca. 6,5 mm Durchmesser), um den Einfluss auf die Messergebnisse durch die Oberflächenstruktur der Haut, wie beispielsweise Pigmentation, zu minimieren.

4.4.1. Messvorgang

Vor Beginn der Messung setzen die Probandinnen eine Laserschutzbrille auf und legen dann die jeweils zu messende Hautstelle, hier einmal den Daumenballen der rechten Hand sowie im nächsten Messvorgang die linke Wange, an die Messstelle des Handstücks. Ein Shutter wird zunächst nach unten gedrückt, so dass kein Laserlicht durchkommt. Bei einer Wellenlänge von 488 nm ist blaues Licht zu sehen, womit hier zunächst Carotinoide gemessen werden. Es wurden je fünf Messungen unter blauem Anregungslicht durchgeführt. Danach wird auf grünes Anregungslicht, mit einer

Wellenlänge von 514,5 nm, umgestellt und somit Lycopin gemessen. Es erfolgt der bereits beschriebene Messvorgang. Auch hier wurden fünf Messwerte ermittelt. Im Anschluss an jede Probandin wurde der Messkopf mit einem entsprechenden Desinfektionsmittel gereinigt.

4.4.2. Messparameter

Bei jedem Versuchsdurchgang wurde sowohl fünf Mal an der Wange als auch am rechten Daumenballen gemessen. Aus den erhaltenen Werten wurde jeweils der Mittelwert gebildet. Die einzelnen Messungen fanden zu insgesamt fünf unterschiedlichen Zeitpunkten statt, erstmalig vor Einnahme der Grünkohlkapseln, anschließend in einem Intervall von 2,5 Monaten, bis nach zehn Monaten die Abschlussmessung durchgeführt wurde.

4.5. Funktionsweise des Cutometer® MPA 580

Das Cutometer® verfügt über vier verschiedenen Sondengrößen, wobei für diese Studie die gängigste mit einem Durchmesser von 2 mm benutzt wurde, s Abbildung 14. Im Rahmen des Messvorgangs wird durch die definierte Öffnung der Sonde die Haut mittels Unterdrucks für einige Millimeter angesogen, wobei der Unterdruck von 20-500 mbar variabel einstellbar ist.

Die Eindringtiefe der angesaugten Haut wird berührungslos über ein in der Sonde enthaltenes optisches Messsystem registriert. Dieses Messsystem besteht aus einem Lichtsender bzw. -empfänger und zwei Glasprismen, die sich gegenüber liegen. Diese leiten das Licht vom Sender zum Empfänger. Letztendlich wird das Lichtverhältnis gemessen, welches sich entsprechend der Hauteindringtiefe in die Sonde proportional verändert.

Mit zunehmendem Eindringen der Haut in die Sonde nimmt die Intensität des verwendeten infraroten Lichtstrahls ab. Diesen Effekt macht man sich hier zunutze.

Die Verformung der Haut während des Ansaugprozesses wird durch dieses System mit einer absoluten Genauigkeit von 0,01 mm erfasst (Barel et al., 1995). Die Sonde verfügt über eine Druckfeder, so dass während des Messvorganges ein konstanter Druck auf die zu messende Hautstelle gewährleistet ist.

Die Software des Gerätes ermöglicht die Speicherung der Patientendaten bzw. der Probandennummer, Untersuchungszeitpunkt, gemessenes Hautareal, die relative Luftfeuchtigkeit, Umgebungstemperatur, Messsondentyp, Modus der Messtechnik. Unter den verschiedenen Messmodi, die das Cutometer® bietet, wurden hier die vom Hersteller vorgegebenen Standardeinstellungen für Modus 1 gewählt, d. h. ein konstanter Unterdruck von 450 mbar, eine Ansaugzeit von fünf Sekunden und eine Relaxationszeit von drei Sekunden für drei Ansaugvorgänge (Information und Gebrauchsanweisung zum Cutometer® MPA 580, 2004). Zur genaueren statistischen Auswertbarkeit wurde jeder Messzyklus einmal wiederholt.



Abbildung 14: Cutometer MPA 580.

4.5.1. Messvorgang

Die Probandin sollte sich einige Minuten vor der Messung zunächst akklimatisieren, da körperliche Anstrengung und Transpiration das Messergebnis beeinflussen. Mittels Klimaanlage wurde die Temperatur des Untersuchungsraumes im Bereich von 21-22° C gehalten. Als Messstelle wurde die Haut der linken Wange 2 cm ab dem äußeren Augenwinkel auf einer Linie zum Tragus (Ohr) festgelegt. Am Untersuchungstag durften die Probandinnen weder kosmetische noch medizinische Produkte auf dem zu messenden Hautareal anwenden. Die Messungen erfolgten stets im Sitzen.

Nach Eingabe der Probandennummer und Auswahl des gewünschten Modus wurde der Messvorgang gestartet. Das Cutometer® wurde auf das zu messende Areal (linke

Wange) aufgesetzt. Ein Positioniererring wurde für eine exakte Messung mittels speziellem Kleberinge auf der Haut befestigt. Das Cutometer® muss senkrecht zur Hautoberfläche gehalten und die Druckfeder maximal eingedrückt werden, um einen konstanten Druck zu gewährleisten, s. Abbildung 15. Während des Untersuchungsvorganges sollte das Gerät ruhig gehalten und die Position nicht verändert werden. Die Probandin sollte daher entspannt sitzen und sich nicht bewegen. Nach Abschluss der Messung erhält man eine Messkurve mit den entsprechenden Messwerten, die sich in Datenverarbeitungsprogramme exportieren und abspeichern lassen. Sie erlauben die Berechnung unterschiedlicher Parameter zur Beschreibung der Hautfestigkeit und viskoelastischer Eigenschaften der Haut.



Abbildung 15: Messung der Hautelastizität mittels Cutometer (www.dermaviduals.de, 2020).

4.5.2. Messparameter

Die Messkurve, die man zu den erhobenen Messergebnissen erhält, ist in Abbildung 16 exemplarisch dargestellt.

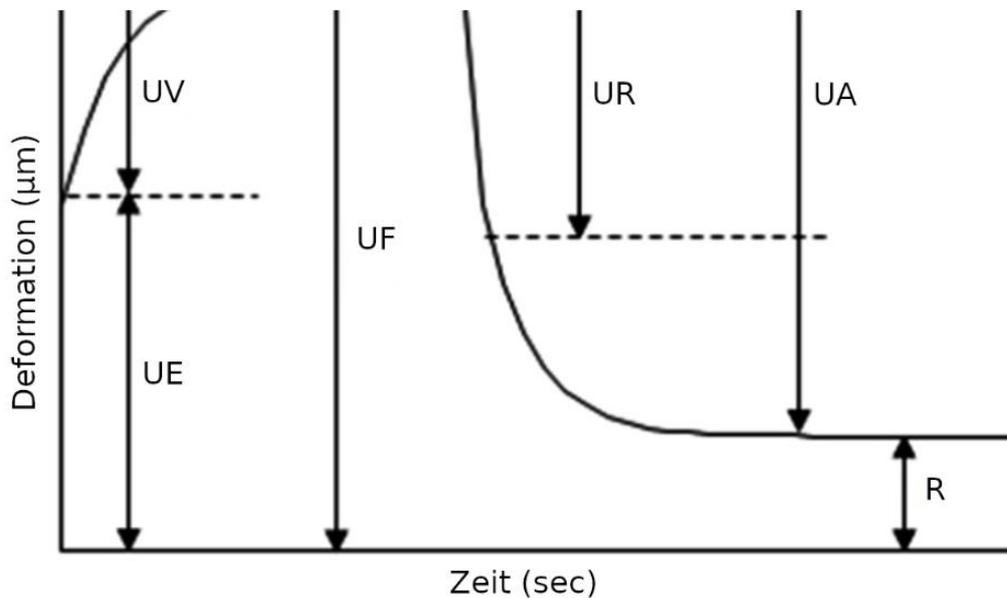


Abbildung 16: Messparameter des Cutometers (Modifiziert nach Spada et. al., 2019) y-Achse: Eindringtiefe der Haut, x-Achse: zeitlicher Verlauf des Messvorgangs.

Bei dem vorbeschriebenen Messprinzip werden verschiedene Messparameter erfasst. Zu Beginn der Untersuchung, d.h. während der Ansaugphase der Haut, gesamt als UF (maximale Hautdeformation) bezeichnet, unterscheidet man in zwei Unterphasen. Der erste Teil der Kurve, UE (sofortige elastische Deformation der Haut), stellt die sofortige elastische (lineare) Deformation der Haut dar und wird nach etwa 0,11 bis 0,15 Sekunden gemessen. Dieser Abschnitt repräsentiert die Längenausdehnung der Kollagenfasern durch das Ansaugen. Während der Dehnung erhöht sich die Reibung zwischen den Kollagenfaserbündeln und vermindert die Deformation der Haut. Diese Phase der verzögerten Deformation, UV (viskose Deformation der Haut), wird als visköses Verhalten der Haut beschrieben. Die gesamte viskoelastische Veränderung während des Messvorgangs, d.h. während des Ansaugens, wird als UF bezeichnet und über einen Zeitraum von fünf Sekunden gemessen. Betrachtet man den Zusammenhang zwischen der sofortigen elastischen Deformation und der viskosen Deformation der Haut, stellt man fest, dass je größer die elastischen Materialeigenschaften sind, desto kleiner ist der visköse Anteil/Phase an der Gesamtausdehnung. Sobald das Vakuum wegfällt, ist die Haut bestrebt, wieder ihren Ausgangszustand einzunehmen. Das sofortige elastische Rückstellvermögen der Haut wird mit UR beschrieben und 0,1 Sekunden nach Beendigung der Ansaugphase

gemessen, was das Zusammenziehen der Elastinfasern erfasst. Da die Haut ein viskoelastisches Verhalten aufweist, tritt nach Beendigung des Vakuums keine sofortige vollständige Erholung ein. Erst langsam nimmt die Haut wieder ihren Ausgangszustand an. Die verbleibende Deformation wird zehn Sekunden nach Ansaugbeginn gemessen. Dieser Parameter wird mit R bezeichnet. Das elastische Rückstellvermögen der Haut ist umso größer je kleiner der Wert R ist.

Mit dem Cutometer® werden absolute Werte gemessen, aus denen relative Parameter, wie zum Beispiel das viskoelastische Verhältnis, ermittelt werden. Hierzu setzt man den Anteil aus elastischer und visköser Deformation der Haut ins Verhältnis, UV/UE (viskoelastisches Verhältnis). Dies stellt den Anteil der Viskoelastizität am elastischen Teil der Kurve dar. Wie bereits erwähnt, zeigt sich, dass je kleiner der Wert, desto höher ist die Elastizität des gemessenen Materials.

Die Nettoelastizität der Haut, d.h. die sofortige elastische Erholung verglichen mit der sofortigen elastischen Ausdehnung, berechnet sich aus dem Quotienten UR/UE (elastische Funktion). Je mehr dieser Wert gegen 1 strebt, umso elastischer ist das Material. Die relative elastische Erholung der Haut ermittelt man aus dem Verhältnis von UR/UF . Die sofortige elastische Rückstellung wird in das Verhältnis mit der maximalen Deformation der Haut gebracht. Auch hier ist die Elastizität umso größer, je weiter sich UR (elastisches Rückstellvermögen der Haut) an UF (maximale Hautdeformation) annähert. Darüber hinaus lässt sich die biologische Elastizität ermitteln. Dabei setzt man die Hauthärte (R), respektive die verbleibende Deformation der Haut, ins Verhältnis zur Gesamtdeformation (UF), (R/UF) . Je höher der errechnete Quotient, desto größer ist die verbleibende Hautdeformation.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Parameter Hautfestigkeit und Hautelastizität sowie ihre Veränderungen durch die Einnahme von hochdosierten Carotinoiden, in Form von Grünkohlextrakt, untersucht. Hierzu wurden zwei der mit dem Cutometer® bestimmten Parameter evaluiert.

R0: Dieser Parameter gibt die maximale Hautdeformation oder Gesamtdeformation (UF) durch den angelegten Unterdruck in Millimeter an und stellt somit ein direktes Maß für die Hautfestigkeit an. Je fester die Haut ist, desto mehr Kraft besitzt sie, sich dem Ansaugen zu widersetzen. Eine Zunahme von R0 entspricht folglich einer Abnahme der Hautfestigkeit.

R2: Dieser Parameter ist das Verhältnis zwischen Ansaugen bzw. der maximalen Amplitude bei Auslenkung durch den Unterdruck und der maximalen Rückbildung der Haut nach Ablassen des Unterdrucks, auch Bruttoelastizität bezeichnet. Je größer dieser Quotient ist, desto vollständiger gelingt die Rückbildung und umso größer sind die elastischen Eigenschaften der Haut.

Die Messungen mit dem Cutometer® erfolgten zu Beginn der Studie, nach fünf und wiederum nach insgesamt zehn Monaten.

4.6. Funktionsweise des DermalInspect®

Bei dem hier verwendeten Multiphotonen-Tomographen, s. Abbildung 18, handelt es sich um ein Lasersystem, bei dem Anregungswellenlängen zwischen 700 und 1000 nm bei Pulsdauern <100 fs generiert werden können. Das System besteht aus piezogetriebenen Optiken, schnellen Photo-Multiplier-Tube-Detektormodulen und einer Kontrolleinheit über einen Femtosekundenlaser zur Fluoreszenzanregung und SHG-Induktion, wobei man die Anregungswellenlänge auf ± 1 nm genau einstellen kann. Einen schematischen Aufbau zeigt Abbildung 17. Das System entspricht, aufgrund der Schutz-Einhausung des Lasers, der Laserschutzklasse 1-M der europäischen Laserschutzverordnung.

Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchung wird der erzeugte Laserstrahl über das definierte Hautareal geführt und scannt dieses in der Focusebene ab. Die emittierten Lichtquanten werden durch einen Strahlenteiler getrennt und zur Analyse an die Detektormodule weitergeleitet, nachdem sie einen entsprechenden Bandpassfilter passiert haben. Anschließend werden die gemessenen Daten durch eine Analysesoftware zu einem Bild der Focusebene zusammengesetzt. Dadurch, dass man die Focusebene vertikal schrittweise bis in eine Tiefe von ca. 200 μm verschieben kann, erhält man durch die so erzielte Dreidimensionalität eine Biopsie. Es besteht die Möglichkeit, die einzelnen Schnitte mit einer entsprechenden Software zu einem Stapel zusammenzusetzen.

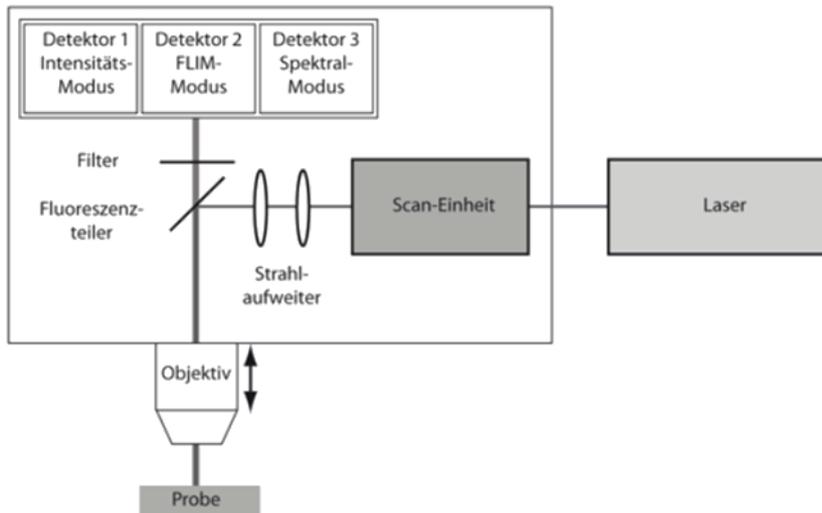


Abbildung 17: vereinfachter schematischer Aufbau des Lasers mit Scan-Detektor-Einheit (Kaatz & König, 2010).



Abbildung 18: Multiphotonentomograph DermalInspect®.

4.6.1. Messvorgang

Für die Untersuchungen wird der Multiphotonentomograph DermalInspect® verwendet, der mit einem Titanum-Saphir-Laser im Femtosekundenbereich ausgestattet ist (Mai Tai XF, Spectra Physics, USA). Abbildung 19 zeigt eine Ansicht der genannten Software.

Der Laser wird mit einer Anregungswellenlänge von 760 nm betrieben und erzeugt 100 fs-Impulse mit einer Wiederholungsfrequenz von 80 MHz.

Um die Struktur der Dermis in verschiedenen Hautschichten/-tiefen zu untersuchen, wurden hochempfindliche Photomultiplier verwendet.

Die Autofluoreszenzsignale (AF) werden durch die Photomultiplier im Bereich von 409-680 nm detektiert und die Second-Harmonic-Generation-Signale (SHG) in einem Bereich von 373-387 nm. Beides geschieht auf zwei Kanälen gleichzeitig. Das Gerät ist mit einer hochaperturigen Öl-Immersion-Linse 1° (Vergrößerung 40 fach; NA 1.3) ausgerüstet.

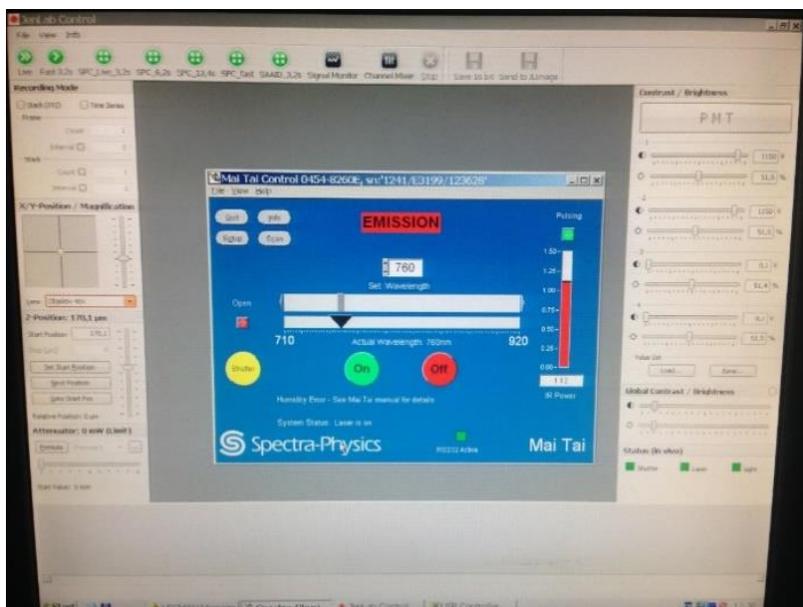


Abbildung 19: Ansicht der Mai Tai-Control Software.

Zur in vivo Messung der Haut wurde die Probandin zunächst auf einer elektrisch verstellbaren Untersuchungsfläche bequem platziert. Ein ferromagnetischer Kegerring mit einem 0,17 mm dicken Deckgläschen (Spezialglasfenster) wurde am jeweiligen Untersuchungsareal, einmal am ventralen Unterarm und in einer zweiten Messung an der Wange, mit einem zuvor angebrachten Klebering fixiert. Bei allen Probandinnen wurde der Bereich am ventralen Unterarm 30 cm proximal der Fingerspitze des Mittelfingers ausgewählt, so dass dieser bei den folgenden Messungen reproduzierbar war. Die Wahl des zweiten Messpunktes traf die Wange, da hier die beste Kopplungsmöglichkeit mit dem Messarm des Gerätes auf einer Linie zwischen Nase und Ohr bestand. Hier wurde der Messpunkt auf einer Linie zwischen äußerem Augenwinkel und apikalem Ohransatz gewählt.

Zum Angleich der Brechungsindices wurde mit einem Tropfen Wasser der Kontakt zwischen Deckglas und Haut und mit einem Tropfen Immersionsöl der Kontakt zwischen Deckgläschen und der Linse hergestellt. Die Probandin wurde anschließend in die entsprechende Untersuchungsposition gebracht und der am Untersuchungsareal befestigte Kegelring an den magnetischen in-vivo-Adapter der Linse gekoppelt.

Vor Beginn der Messungen wurde beachtet, dass im Untersuchungsraum eine Luftfeuchtigkeit von 40 und 60% besteht. Außerdem sollte die Raumtemperatur $21,0 \pm 2,5^\circ\text{C}$ betragen. Beides wurde in diesem Fall durch eine Klimaanlage gewährleistet. Zur Vermeidung von Fremdlichteinflüssen fanden die Messungen in einem abgedunkelten Raum statt. Eine Kalibrierung des Gerätes war nicht erforderlich. Diese kann nur vom Hersteller vorgenommen werden.

Damit sich das Messfeld nicht verschiebt, sollten sich die Probandinnen nicht bewegen. Außerdem wurden die Probandinnen darauf hingewiesen, dass sie vor Untersuchungsbeginn, d.h. mindestens 24 Stunden vorher, keine Kosmetika auf die zu untersuchenden Hautareale auftragen und mindestens vier Stunden vorher nicht mehr Baden oder Duschen.

Während der Messungen wurde der Laserfocus von der Hautoberfläche in $10 \mu\text{m}$ Schritten in tiefere Hautpartien bewegt, s. Abbildung 20 und 21. Die maximale Eindringtiefe in die Haut betrug $120 \mu\text{m}$. Die Strahlung, die aus unterschiedlichen Tiefen gesammelt wird, wurde über Schnitte von $132,3 \times 132,3 \mu\text{m}$ Größe gemittelt. Die Erfassungszeit für einen Schnitt betrug sieben Sekunden, so dass eine zufriedenstellende Messstabilität sowie eine stabile Bildqualität realisiert werden konnte. Die durchschnittliche Untersuchungsdauer betrug ca. 15 Minuten. Nach Beendigung der Messung wurden die verwendeten Edelstahl-Koppelstücke vom Einweg-Glasfenster getrennt und desinfiziert.

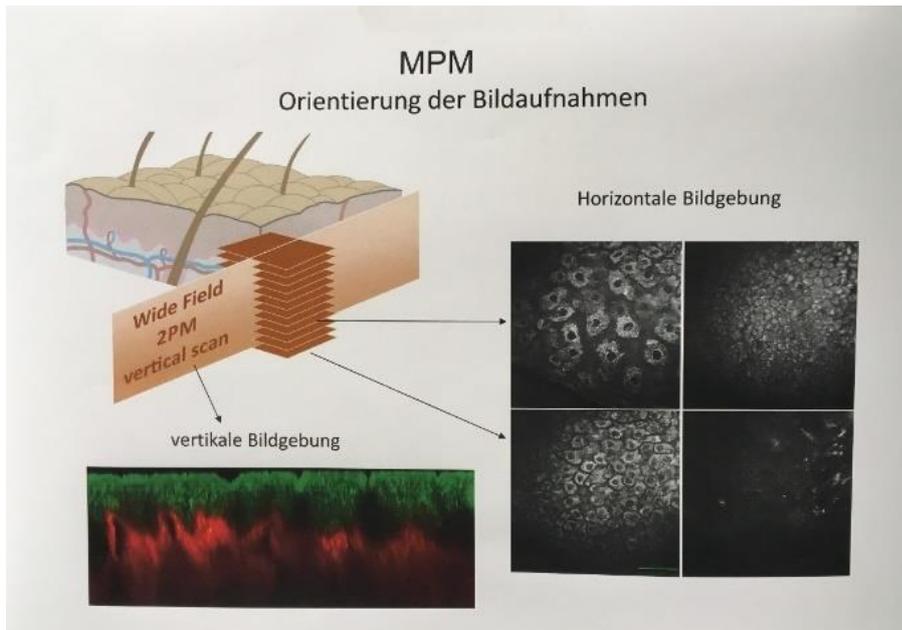


Abbildung 20: Orientierung der Bildaufnahmen mit dem Multiphotonentomographen (Darvin, 2017).

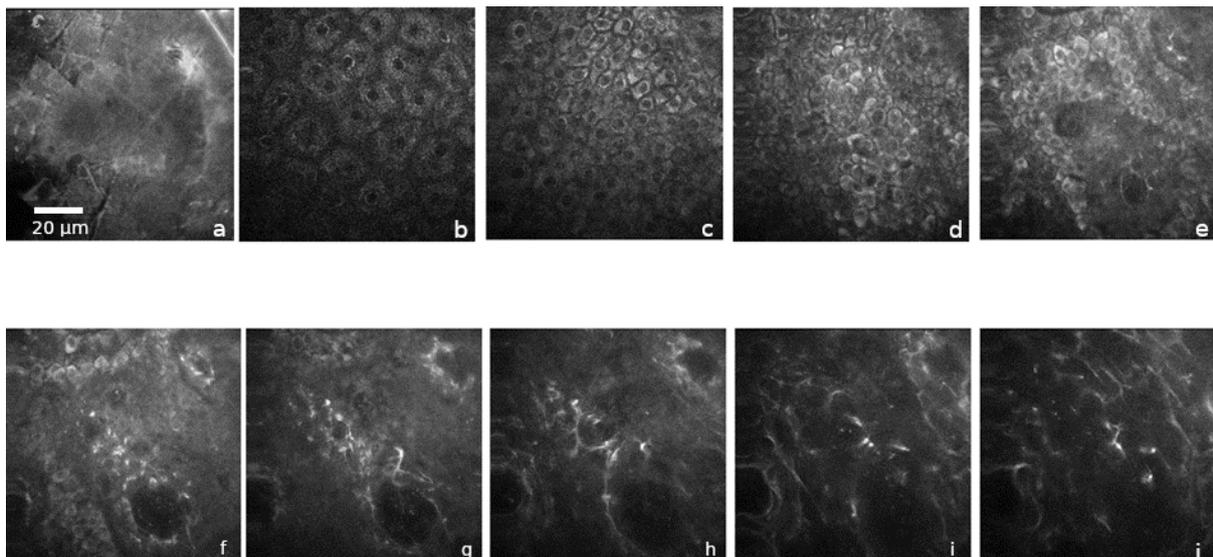


Abbildung 21: horizontale Bildgebung von der Hautoberfläche (Korneozyten, Bild a) bis in die Tiefe von 90 µm (Kollagenfasern, Bild j).

4.6.2. Messparameter

Durch die Wahl entsprechender Filtersysteme lassen sich mit Hilfe der MPT auch einzelne Faserqualitäten, zum Beispiel elastische und kollagene Fasern, unterscheiden. Dies erfolgt durch die Beurteilung der einzelnen Fasern in Bezug auf Autofluoreszenz (AF) und Frequenzverdopplung (SHG). Fibrilläres Kollagen, in dieser

Untersuchung Kollagen Typ I, erzeugt nur eine schwache Autofluoreszenz jedoch eine deutliche Frequenzverdopplung. Im Gegensatz dazu zeigen Elastinfasern nach Zweiphotonen-Fluoreszenzanregung eine starke Autofluoreszenz. Diesen Effekt kann man sich zur Unterscheidung der beiden Faserqualitäten zu Nutze machen. Die Quantifizierung von Elastin und Kollagen wurde mittels Evaluation der Graustufen des Messfeldes (ROI = region of interest) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit einer speziellen Software „FrameScan-Orion TechnoLab™“.

Der Kollagen I-/Elastinindex wurde hier für die Gesamttiefe berechnet und die Profile auf den Beginn des SHG-Signals normalisiert.

In dieser Nomenklatur nimmt der SAAID mit zunehmender Hautalterung ab und erreicht seinen niedrigsten Wert -1, wenn das Kollagen komplett durch elastische Fasern ersetzt ist.

Die Signalintensitäten der Autofluoreszenz (AF) und Frequenzverdopplung (SHG) zur Berechnung des Kollagen I-/Elastinindex wurden von je zwei Quadratflächen à 30 µm² pro Aufnahme analysiert. Die Areale waren in der oberen Dermis, von der Hautoberfläche (in 10 µm Schritten) bis in eine Tiefe von 100 µm, lokalisiert. Diese wurden sowohl im AF- und SHG-Bild an der gleichen Stelle verortet. In Abbildung 22 ist ein Profil des Kollagen I-/Elastinindex (SAAID-Profil) sowie Bilder der Autofluoreszenz und Frequenzverdopplung dargestellt.

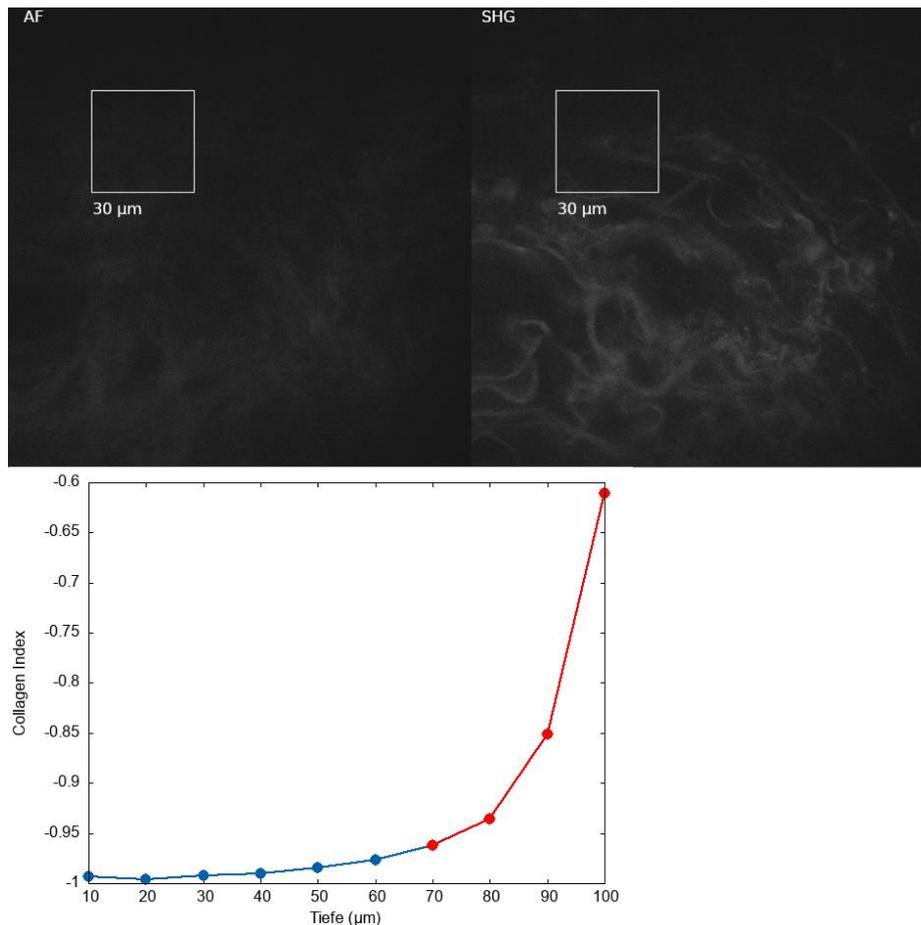


Abbildung 22: Aufnahme von AF und SHG mittels Multiphotonentomographie zur Bestimmung der Elastin- und Kollagengehalte und Berechnung der SAAID-Werte (Kollagen I-/Elastinindex) mit entsprechender SAAID-Kurve. In der Tiefe von 0 bis 70 µm überwiegt die AF (Elastin) und ab 70 µm setzt das SHG-Signal (Kollagen) ein (rot).

4.7. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Statistik-Software R Version 4.0.4 (2021-02-15) -- "Lost Library Book", Copyright (C) 2021 The R Foundation for Statistical Computing. Alle erhobenen Daten wurden mittels explorativer Datenanalyse auf Normalverteilung ausgewertet. Bei Normalverteilung wurde der ungepaarte t-Test angewendet, um Unterschiede in den Mittelwerten zwischen den Gruppen zu ermitteln (Verum versus Placebo) und der gepaarter t-Test für Veränderungen innerhalb einer Gruppe. Bei nicht normal verteilten Daten kam der Wilcoxon-Rangsummentest zur Anwendung. Der Pearson-Korrelationskoeffizient wurde berechnet, um eine Korrelation darzustellen. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Im weiteren Verlauf des Textes werden Signifikanzen wie folgt

abgekürzt: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; ns = nicht signifikant. Die Angabe aller Messwerte im Rahmen dieser Arbeit erfolgt als Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.7.1. Auswertung der Daten

Die mittels optischer Sensormethode erhobenen Daten wurden zunächst auf den Ausgangswert normalisiert, da die einzelnen Werte große Schwankungen aufwiesen. Für die Auswertung innerhalb einer Gruppe, d.h. innerhalb der Verum- bzw. Placebogruppe wurde der gepaarte t-Test durchgeführt. Zur Datenanalyse der Effekte zwischen der Verum- und Placebogruppe wurde der ungepaarte t-Test angewendet.

5. Ergebnisse

5.1. Messung der Carotinoide mittels optischer Sensormethoden CaroLED LMTB® und Biozoom®

Es zeigte sich, dass die gemessenen Carotinoidwerte der Verum-Gruppe, unter Supplementierung mit Grünkohlextrakt kapseln, nach fünf Monaten signifikant anstiegen ($p = 0,006$) und in den darauffolgenden fünf Monaten wieder leicht abfielen, wobei sie jedoch weiterhin deutlich über den initialen Werten zu Studienbeginn lagen ($p = 0,009$). Dies konnten für beide optische Messsensoren nachgewiesen werden.

Die Werte der Placebogruppe, die mit dem CaroLED gemessen wurden, wiesen nach fünf Monaten einen leichten Anstieg ($p = 0,178$) auf und fielen nach zehn Monaten leicht ab, wobei die Veränderungen keine Signifikanz ($p = 0,067$) zeigten.

Die Carotinoidkonzentration in der Placebo-Gruppe, die mit dem Sensor Biozoom® ermittelt wurde, blieb während der ersten fünf Monate unverändert ($p = 0,351$) und fiel nach zehn Monaten Supplementierung minimal ab. Auch hier waren die Veränderungen nicht signifikant ($p = 0,065$). Den Verlauf der, mit den optischen Sensoren erhobenen, Carotinoidwerte über den gesamten Zeitraum der Studie zeigt Abbildung 23.

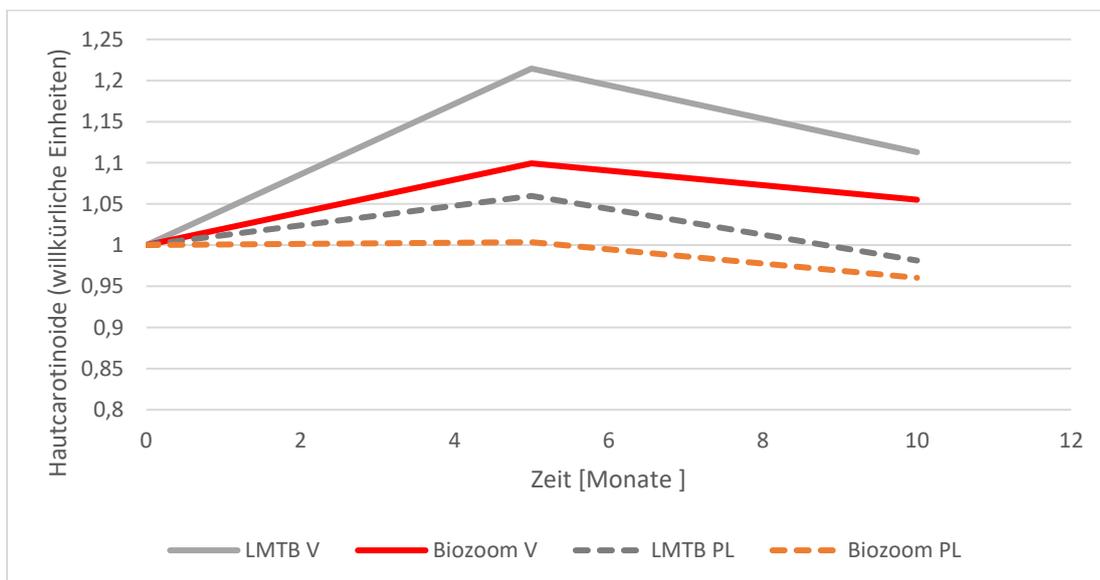


Abbildung 23: Verlauf der gemittelten kutanen Carotinoidkonzentration gemessen mit CaroLED LMTB und Biozoom, (V = Verum, PL = Placebo).

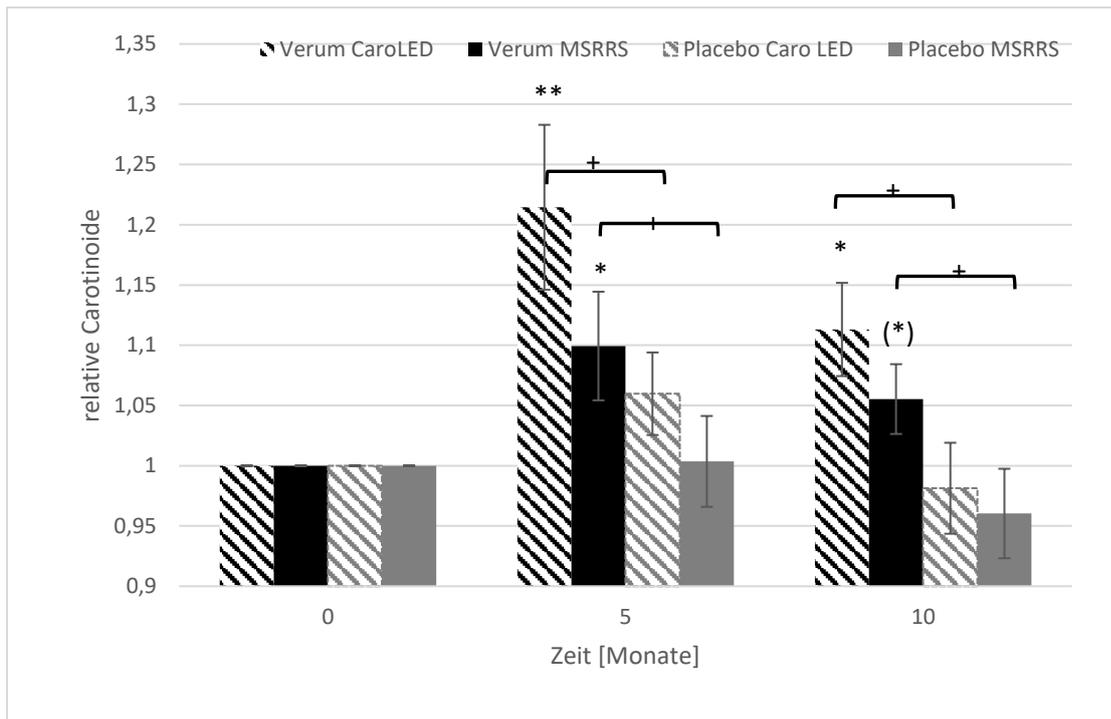


Abbildung 24: Verlauf der gemittelten kutanen Carotinoidkonzentration gemessen mit Caro LED LMTB u. Biozoom (MSRRS) am Daumenballen (MW \pm s). + $p < 0,05$ zwischen Placebo u. Verum; (*) $p < 0,1$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ zum Ausgangswert. N = 15 Placebo u. N = 14 Verum.

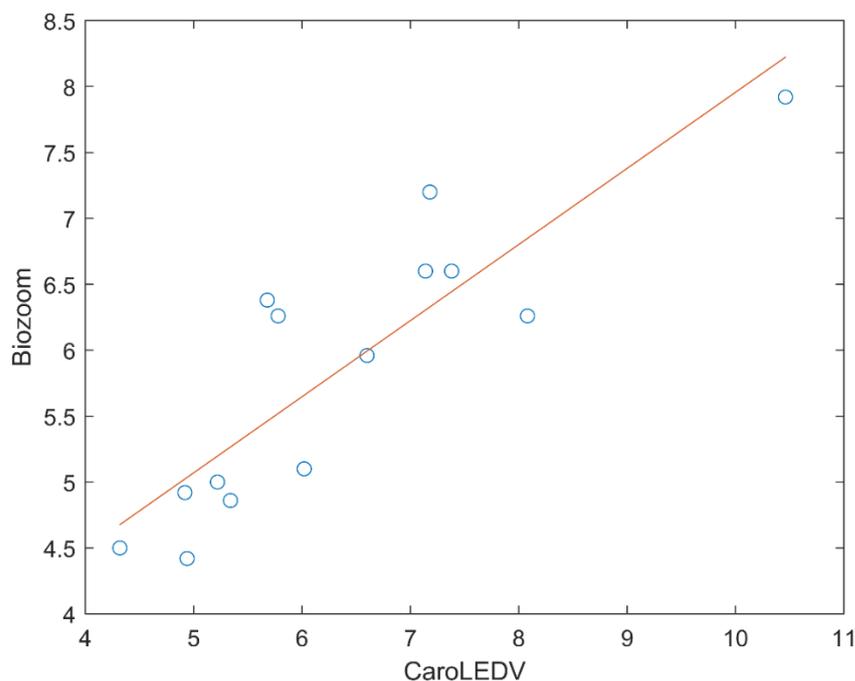


Abbildung 25: Korrelation zwischen der Verum-Gruppe Biozoom und CaroLED nach zehn Monaten am Daumenballen mit Regressionsgeraden, $p = 5,441 \text{ e-}05$, $R^2 = 0,8691223$.

Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, zeigt sich zwischen den beiden unterschiedlichen optischen Sensoren zur Messung der Hautcarotinoide eine hohe Korrelation der am Daumenballen ermittelten Carotinoidwerte.

5.2. Messung von Carotinoiden und Lycopin mittels Resonanz-Raman-Spektroskopie

Die Messungen aller Carotinoide und von Lycopin mit dem Raman-Spektrometer erfolgten an der Hand (Daumenballen) und im Gesicht (Wange). Hier zeigte sich in der Verum-Gruppe sowohl für Lycopin als auch für alle Carotinoide an beiden Messstellen ein signifikanter Anstieg nach fünf Monaten. Während die Werte für Lycopin, im Gesicht und an der Hand, nach zehn Monaten weiterhin signifikant anstiegen, fielen der Carotinoidgehalt in der Haut nach zehn Monaten im Gesicht und an der Hand ab, blieb aber noch deutlich höher im Vergleich zum Ausgangswert. Auch hier waren die Veränderungen signifikant.

In der Placebogruppe konnte nach fünf Monaten ein signifikanter Anstieg für alle Carotinoide im Gesicht und an der Hand nachgewiesen werden. Nach zehn Monaten stiegen die Werte der Carotinoide an der Hand weiter an, wobei im Gesicht kein weiterer Anstieg zu verzeichnen war. Die gemessenen Werte waren jedoch an beiden Messstellen nach zehn Monaten höher als zu Beginn der Messungen und signifikant. Für Lycopin konnte im Gesicht und an der Hand nach fünf Monaten nur ein diskreter Anstieg nachgewiesen werden, wobei die Veränderungen an der Hand nicht signifikant waren. Nach zehn Monaten kam es an beiden Messpunkten zu einem weiteren leichten Anstieg des Lycopingehalts. Hier waren die Veränderungen signifikant. Der Verlauf der Messwerte ist in Abbildung 26 und 27, getrennt für Placebo (A) und Verum (B), graphisch dargestellt.

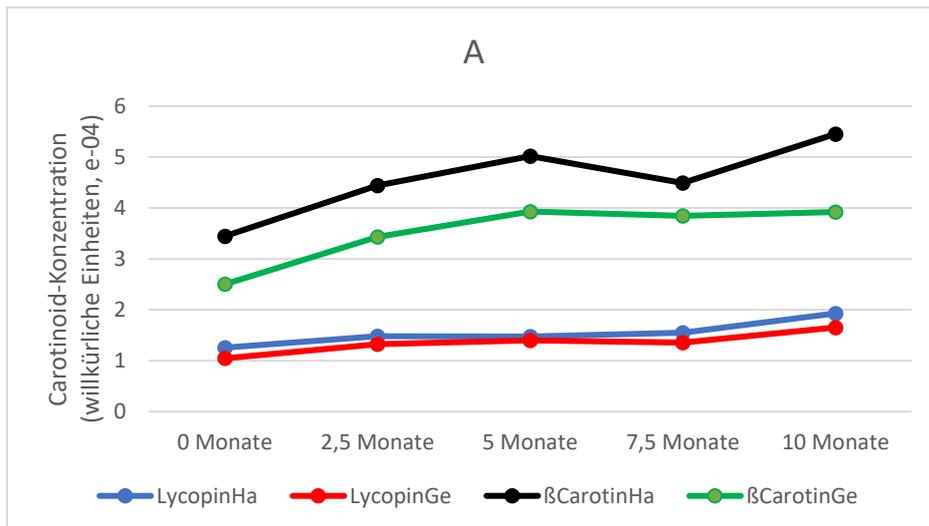


Abbildung 26: Verlauf der Raman-Messwerte in der Placebo-Gruppe (A) der Studie.

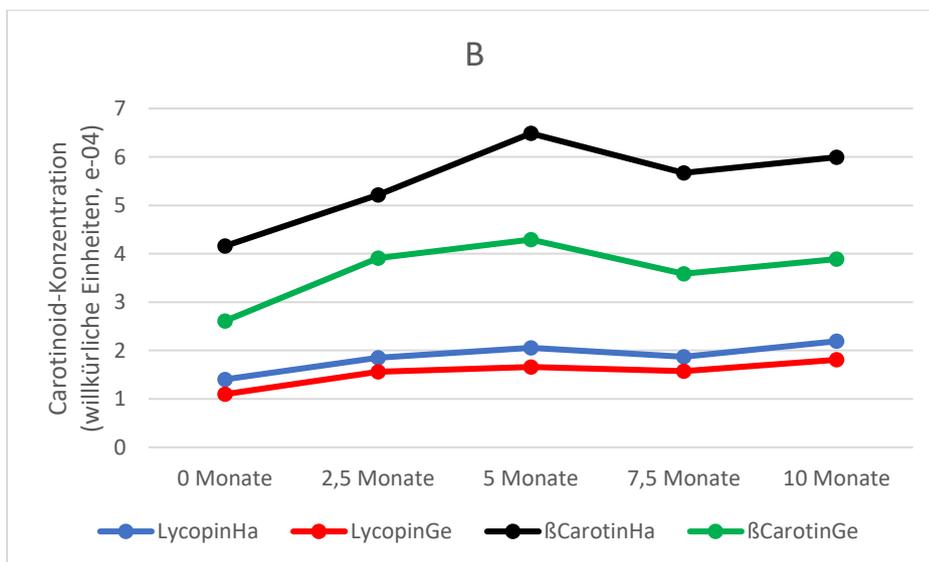


Abbildung 27: Verlauf der Raman-Messwerte in der Verum-Gruppe (B) der Studie.

Tabelle 2: Entwicklung der Raman-Messwerte (Lycopin und Carotinoide, willkürliche Einheiten) in der Placebo-Gruppe zu Studienbeginn (V01), nach fünf (V03) und zehn Monaten (V05), p-Wert gemäß gepaarter t-Test.

Placebo	V01	V03	p-Wert	V01	V05	p-Wert
Carotinoide Hand	3,4476 ±1,644	5,0182 ±1,635	< 0,001	3,4476 ±1,644	5,4537 ±1,507	< 0,001
Carotinoide Gesicht	2,5038 ±1,273	3,9308 ±1,654	< 0,001	2,5038 ±1,273	3,9232 ±1,629	< 0,001
Lycopin Hand	1,2579 ±0,7259	1,476 ±0,6074	0,1268	1,2579 ±0,7259	1,9302 ±0,9156	0,0055
Lycopin Gesicht	1,048 ±0,4684	1,40207 ±0,5928	0,0148	1,04803 ±0,4684	1,6544 ±0,7517	0,0038

Tabelle 3: Entwicklung der Raman-Messwerte (Lycopin und Carotinoide, willkürliche Einheiten) in der Verum-Gruppe zu Studienbeginn (V01), nach fünf (V03) und zehn Monaten (V05), p-Wert gemäß gepaarter t-Test.

Verum	V01	V03	p-Wert	V01	V05	p-Wert
Carotinoide Hand	4,1581 ±1,206	6,4848 ±1,4312	< 0,001	4,1581 ±1,206	5,9956 ±1,2591	< 0,001
Carotinoide Gesicht	2,6098 ±0,6442	4,2906 ±1,0644	< 0,001	2,6098 ±0,6442	3,8882 ±1,0888	< 0,001
Lycopin Hand	1,403 ±0,551	2,0571 ±0,449	< 0,001	1,403 ±0,551	2,1912 ±0,7483	< 0,001
Lycopin Gesicht	1,0973 ±0,4208	1,658 ±0,4609	0,003	1,097285 71 ±0,4208	1,8077 ±0,599	< 0,001

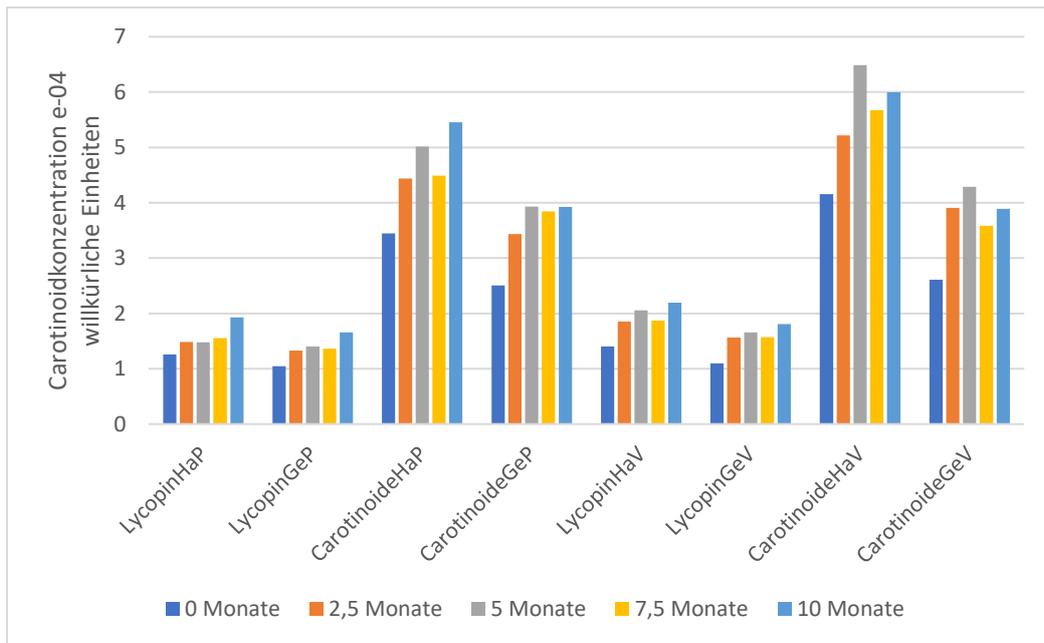


Abbildung 28: Ramanspektroskopie, Mittelwerte von Lycopin und aller Carotinoide über einen Zeitraum von zehn Monaten, getrennt nach Hand (Ha) und Gesicht (Ge) sowie Verum (V) und Placebo (P).

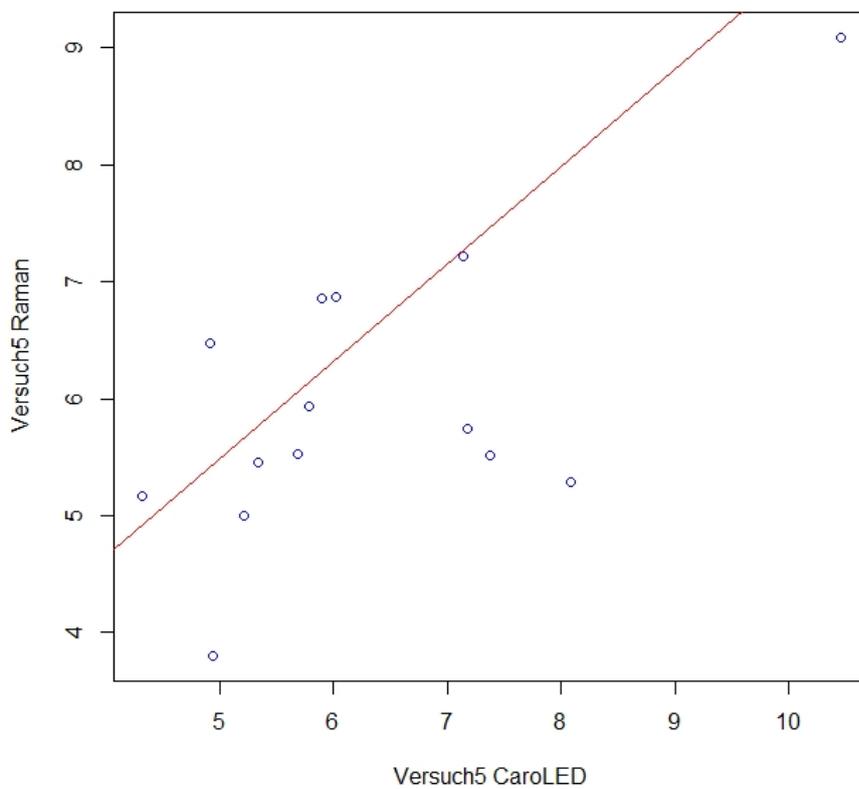


Abbildung 29: Korrelation zwischen der Verum-Gruppe CaroLED und Raman-Spektroskopie nach zehn Monaten am Daumenballen mit Regressionsgerade, $p = 0,01168$, $R^2 = 0,6509849$.

5.3. Messung der Hautfestigkeit und Bruttoelastizität mittels Cutometer®

R0: Dieser Parameter gibt die maximale Hautdeformation oder Gesamtdeformation (UF) durch den angelegten Unterdruck in Millimeter an und stellt somit ein direktes Maß für die Hautfestigkeit dar. Je fester die Haut ist, desto mehr Kraft besitzt sie, sich dem Ansaugen zu widersetzen. Eine Zunahme von R0 entspricht folglich einer Abnahme der Hautfestigkeit.

R2: Dieser Parameter ist das Verhältnis zwischen Ansaugen bzw. der maximalen Amplitude bei Auslenkung durch den Unterdruck und der maximalen Rückbildung der Haut nach Ablassen des Unterdrucks, auch Bruttoelastizität bezeichnet. Je größer dieser Quotient ist, desto vollständiger gelingt die Rückbildung und umso größer sind die elastischen Eigenschaften der Haut.

Die Messungen mit dem Cutometer erfolgten zu Beginn der Studie, nach fünf und wiederum nach insgesamt zehn Monaten. Mit Hilfe dieser Messmethode konnten unterschiedliche Beobachtungen zur Entwicklung von Hautfestigkeit und Hautelastizität gemacht werden, s. Tabelle 4.

Tabelle 4: Entwicklung der Cutometer Messwerte R0 und R2 für Verum- und Placebo-Gruppe. Absolute und prozentuale Entwicklung der Werte (R2 ist bereits ein prozentualer Wert, deshalb keine absolute Differenz), p-Wert gemäß gepaarter t-Test, zu Beginn (V01) und zu Studienende nach zehn Monaten (V05).

Messparameter	V01	V05	Δ abs.	Δ proz.	p-Wert
Verum					
R0 in mm	0,1856±0,0545	0,3005±0,0748	0,1149	+61,91%	0,00004
R2 in %	0,8361±0,08	0,697±0,081		-13,91%	0,00002
Placebo					
R0 in mm	0,1566±0,0949	0,2788±0,1072	0,1222	+78,03%	0,001
R2 in %	0,8473±0,073	0,7904±0,0995		-5,69%	0,01

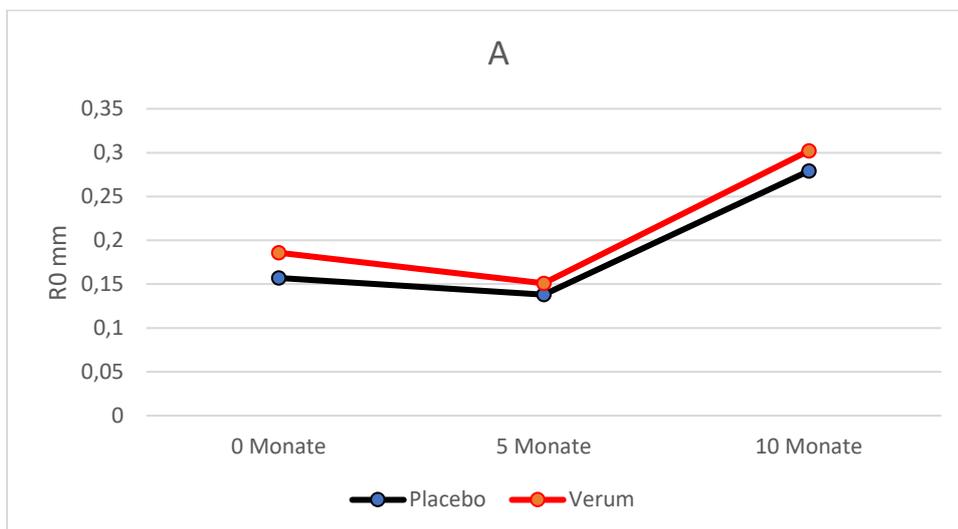
Die Hautfestigkeit (R0) der Verum-Gruppe wies zu Studienbeginn einen Messwert von 0,1856±0,0545 mm auf. Im Laufe der Untersuchungstermine entwickelte sich der Wert über 0,1513±0,0663 mm nach fünf Monaten hin zu 0,3005±0,0748 mm nach zehn Monaten. Dies entspricht einer Verminderung der Hautfestigkeit von ≈ 62 % über den

gesamten Beobachtungszeitraum. Die Messungen innerhalb der Placebogruppe zeigten zu Studienbeginn Werte von $0,1566 \pm 0,0949$ mm, nach fünf Monaten $0,1379 \pm 0,0819$ mm und nach zehn Monaten $0,2788 \pm 0,1072$ mm. Sowohl in der Verum- ($p < 0,001$) als auch Placebogruppe ($p = 0,001$) waren die Veränderungen signifikant.

Der Parameter R2, der die elastischen Eigenschaften der Haut widerspiegelt wies in der Verum-Gruppe zu Beginn der Studie einen Messwert von $0,8361 \pm 0,08$ und zu Studienende einen Wert von $0,697 \pm 0,081$ auf. Dies ist eine Abnahme von knapp 14% zum Ausgangswert. Auch in der Placebogruppe zeigte sich eine Abnahme, die jedoch mit knapp 6% nicht ganz so hoch ausfiel. Die Veränderung wiesen eine Signifikanz in der Placebo- ($p = 0,01$) und Verum-Gruppe ($p > 0,001$) auf.

Die Hautfestigkeit ($A = R0$) nimmt im Laufe des Untersuchungszeitraumes signifikant ab, sowohl in der Placebo- als auch Verum-Gruppe, wobei die Abnahme in der Placebogruppe etwas höher ausfällt.

Die Bruttoelastizität ($B = R2$) nimmt in beiden Gruppen signifikant ab, wobei sie in der Verum-Gruppe etwas stärker abnimmt als in der Placebogruppe. Der Verlauf der Hautfestigkeit ($A = R0$) und Bruttoelastizität ($B = R2$) ist graphisch in Abbildung 30 dargestellt.



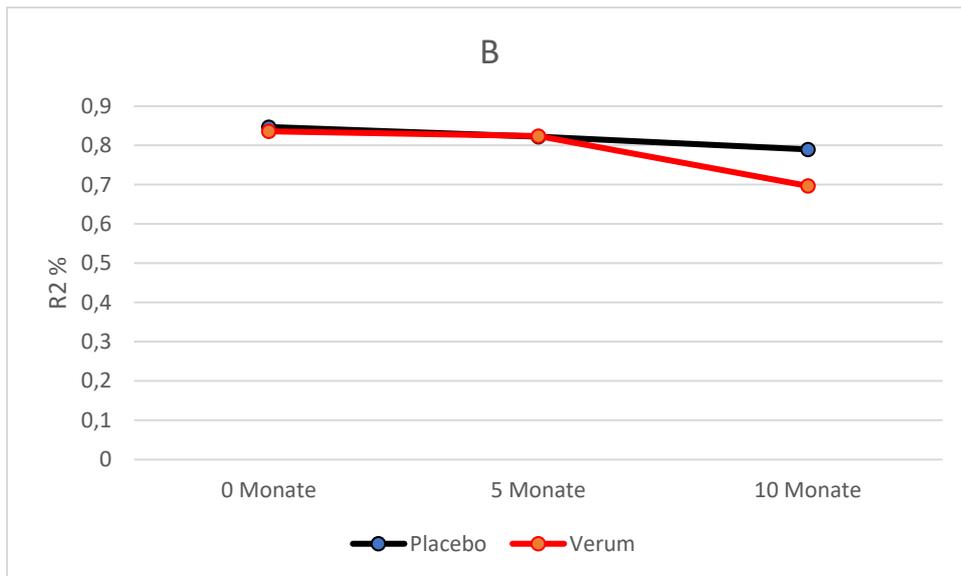


Abbildung 30: Verlauf der Cutometer-Messwerte in Verum- und Placebo-Gruppe für A = Hautfestigkeit (R0) und B = Bruttoelastizität (R2).

5.4. Messung des Kollagen I- / Elastinindex (SAAID) mittels Dermalinspect®

Der Kollagen I- / Elastinindex, SAAID, wurde am ventralen Unterarm und an der Wange gemessen. Die maximale Messtiefe in die Haut betrug 120 µm. Vor der statistischen Auswertung wurden alle Bilder qualitativen Mindestanforderungen unterzogen. Die Bildqualität wurde beispielsweise durch Bewegungsartefakte unruhiger Probandinnen beeinflusst, so dass sich aus diesen Gründen das statistisch analysierte Datenmaterial reduzierte. Der Kollagen I-/Elastinindex wurde für die Gesamttiefe berechnet und die Profile auf den Beginn des Signals der Frequenzverdopplung normalisiert. Es wurden vier Werte nach Einsetzen der Frequenzverdopplung innerhalb der Mittelwerte betrachtet. Dadurch war es möglich, Daten aus dem apikalen Bereich der papillären Dermis unterhalb des Stratum basale zu erhalten.

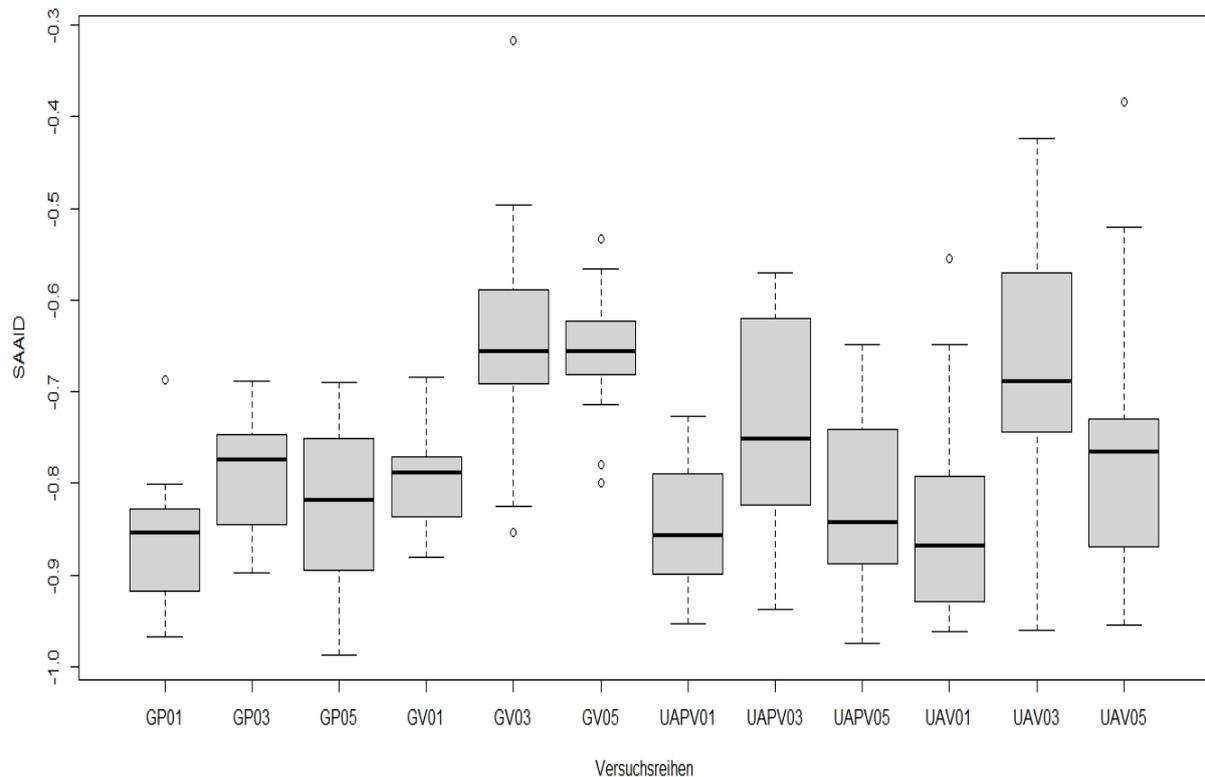


Abbildung 31: Gruppierter Boxplot des SAAID für die Verum-Gruppe an Unterarm (UA) und im Gesicht (G) sowie für die Placebo-Gruppe an Unterarm (UAP) und Gesicht (GP) zu Studienbeginn (V01), nach fünf Monaten (V03) und zu Studienende nach zehn Monaten (V05). Das untere Ende der Box beschreibt das erste Quartil und das obere Ende das dritte Quartil. Die Linie innerhalb der Box das zweite Quartil, den Median.

Fünf Monate nach Studienbeginn zeigte sich in der Placebo-Gruppe am Unterarm ($p < 0,001$) und im Gesicht ($p = 0,027$) ein signifikanter Anstieg der SAAID-Werte. Auch in der Verum-Gruppe konnte ein signifikanter Anstieg im Gesicht ($p < 0,001$) und am Unterarm ($p = 0,002$) gezeigt werden.

Nach zehn Monaten, d. h. zu Studienende, zeigte sich nur noch in der Verum-Gruppe, sowohl für die Messungen am Unterarm ($p = 0,013$) als auch für die Messungen an der Wange ($p < 0,001$) ein signifikanter Anstieg der SAAID-Werte. In der Placebo-Gruppe konnte dahingegen weder für die Messungen am Unterarm ($p = 0,266$) noch an der Wange ($p = 0,339$) ein signifikanter Anstieg nach zehn Monaten nachgewiesen werden.

Vergleicht man die Werte des Kollagen I-/Elastinindex des Gesichts der Placebo-Gruppe mit der Verum-Gruppe zu Studienende nach zehn Monaten, zeigte sich hier ein signifikanter Anstieg ($p < 0,001$).

Für die Gesamtheit der Messungen zeigten sich in der Verum-Gruppe durchgehend höhere Werte als in der Placebo-Gruppe, s. Abbildung 32.

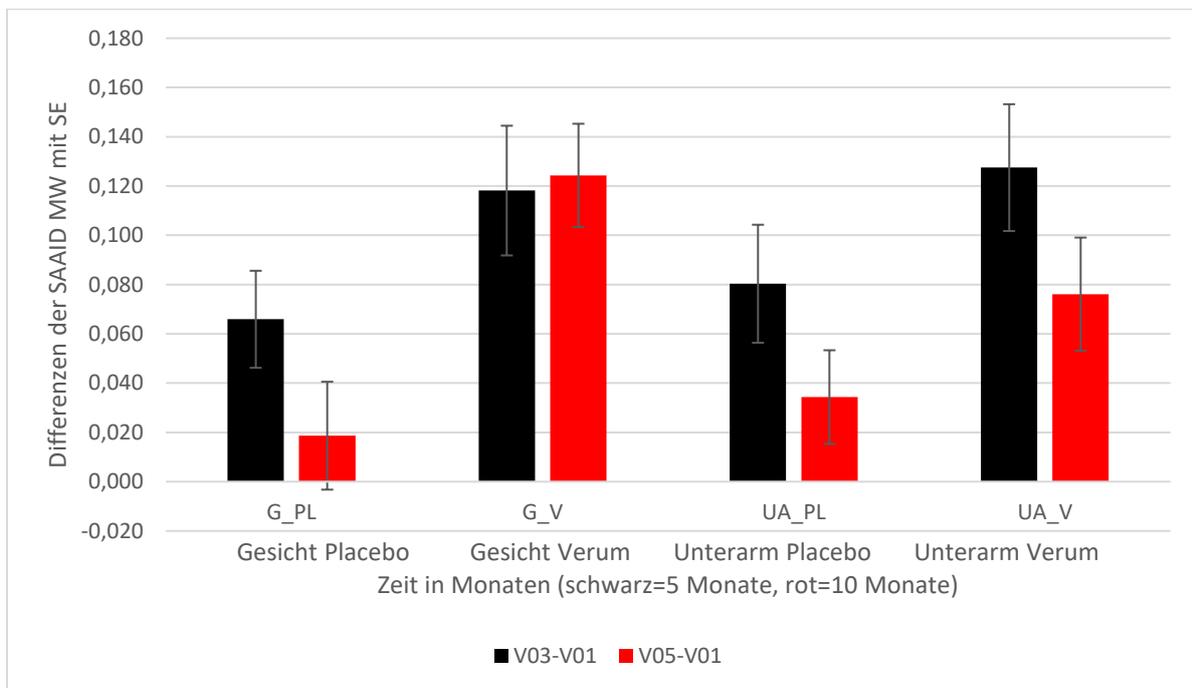


Abbildung 32: Verteilung der Differenzen der Mittelwerte des Kollagen I-/Elastinindex für den Zeitraum von fünf Monaten (schwarz) und den Gesamtzeitraum der Studie von zehn Monaten (rot) unterteilt nach Messbereich und Placebo-/Verum-Gruppe (G_PL = Gesicht Placebo, G_V = Gesicht Verum, UA_PL = Unterarm Placebo, UA_V = Unterarm Verum).

6. Diskussion

Umwelteinflüsse, wie UV-Strahlung, aber auch der Lebensstil oder Noxen, wie Rauchen, haben einen Einfluss auf das Hautbild. Durch Bildung freier Radikale kann es zu Schädigungen und Beschleunigung des Hautalterungsprozesses kommen. Antioxidantien, wie zum Beispiel Carotinoide, die in besonders hoher Konzentration in bestimmten Obst- und Gemüsesorten vorkommen, tragen dazu bei, diesen Prozess der Zellerstörung aufzuhalten. Daher hat auch die Ernährung jedes einzelnen entscheidenden Einfluss auf ein gesundes Hautbild. Die Auswahl der Nahrungsmittel unterliegt jedoch auch bei einem gesunden Lebensstil regionalen und saisonalen Schwankungen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Zunahme des kutanen Carotinoidgehaltes sowie die Veränderung des Kollagen I-/Elastinindex (SAAID) in der Haut unter Einnahme eines carotinoidreichen Nahrungsergänzungsmittels nicht invasiv nachzuweisen. Darüber hinaus sollten Veränderungen der biomechanischen Eigenschaften der Haut, wie Elastizität und Hautfestigkeit, beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein deutlicher Anstieg des Kollagen I-/Elastinindex, nach zehn Monaten Supplementierung mit einem carotinoidreichen Grünkohlextrakt, zu verzeichnen ist. Des Weiteren konnte mit drei weiteren nicht invasiven Messmethoden gezeigt werden, dass unter vermehrter oraler Zufuhr von Antioxidantien, der Carotinoidgehalt in der Haut steigt.

Da in dieser Studie alle Probandinnen den Hauttyp II (Fitzpatrick, 1988) hatten, kann der unterschiedliche Melaningehalt bei den einzelnen Hauttypen vernachlässigt werden. Inhomogenitäten der Hautoberfläche wurden dadurch minimiert, dass Hautstellen mit wenig Behaarung für die Untersuchungen gewählt wurden. Weiterhin wurden durch eine entsprechend große Laserauflagefläche im Rahmen der Untersuchungen mit dem Ramanspektrometer bzw. Multiphotonentomographen Inhomogenitäten reduziert.

Aus früheren Studien ist bekannt, dass der Carotinoidgehalt während der Sommer- und Herbstmonate im Organismus höher ist als während der Wintermonate, da dann naturgemäß das Angebot an frischem Obst und Gemüse größer ist (Darvin et al.,

2005). Die Messungen dieser Studien fanden an hautgesunden Probandinnen erstmalig im Oktober (europäischer Herbst) statt. Die zweite Messung erfolgte im Frühjahr und die dritte Messung (Studienabschluss) im Spätsommer bzw. erneut gegen Herbstanfang.

Carotinoide sind aufgrund ihrer zahlreichen Doppelbindungen stark Raman-aktiv. Dadurch eignen sie sich besonders gut zu diesem methodischen Nachweis. Ein weiterer Vorteil der Raman-Spektroskopie ist die hohe Sensitivität der Messmethode, so dass auch geringe Carotinoidkonzentrationen detektiert werden können. Nach Untersuchungen von Darvin et al. (2003, 2005) besteht u. a. eine starke Abhängigkeit zwischen Ernährung und der Carotinoid-Konzentration in der Haut. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit mit der genannten Messmethode nachgewiesen werden. Die Messungen wurden sowohl am Daumenballen als auch im Gesicht (Wange) durchgeführt. Die Probandinnen, die über den gesamten Zeitraum von zehn Monaten ihre Ernährung mit carotinoidreichen Grünkohlextrakt kapseln supplementierten, wiesen, im Vergleich zur Placebo-Gruppe, an beiden Messorten zu allen Untersuchungszeitpunkten höhere Carotinoid- und Lycopin-Konzentrationen in der Haut auf. Dies spricht, wie erwartet, für einen positiven Effekt des eingesetzten Nahrungsergänzungsmittels und bestätigt die von Darvin et al. (2003, 2005) beschriebenen Beobachtungen. Lediglich im Gesicht fiel gegen Ende der Studie (Zeitpunkt nach 7,5 und 10 Monaten) die Carotinoidkonzentration ab. Eine Ursache für diesen Abfall lässt sich durch die Wahl des Messortes begründen. Die Wange ist, verglichen mit dem Daumenballen, deutlich lichtexponierter und somit stärker schädlicher Sonnenstrahlung ausgesetzt. Durch diese Exposition werden freie Radikale induziert, die zu oxidativem Stress führen und durch Antioxidantien neutralisiert werden können. Der genannte Mechanismus könnte folglich eine Ursache für die Abnahme des Carotinoidgehalts im Bereich der Wange darstellen.

Der signifikante Anstieg der Carotinoidwerte in der Placebo-Gruppe im Gesicht und an der Hand nach fünf Monaten, erklärt sich vermutlich erneut durch den gesünderen Lebensstil der Probandinnen seit Studienbeginn, der sich unter regelmäßiger Beobachtung einstellte.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es in beiden Gruppen zu einem Anstieg der Carotinoidwerte über den Gesamtverlauf der Studie im Vergleich zu den Ausgangswerten kam, was, wie bereits erwähnt, höchstwahrscheinlich auf die gesündere Lebensweise während des Studienzeitraumes zurückzuführen ist.

Diese Beobachtung konnte auch mit den beiden optischen Sensormethoden, Biozoom® (MSRRS) und CaroLED LMTB®, gemacht werden, die zusätzlich zur Resonanz-Raman-Spektroskopie zum Einsatz kamen.

Hier zeigte sich eine hohe Korrelation der vorgenannten Messmethoden, was für eine valide Messung spricht. Die jeweils erhobenen Carotinoidwerte im Bereich des Daumenballens korrelieren sehr gut, wobei sich nur die absoluten Werte unterscheiden.

Gleiches gilt für die Messungen mit dem Resonanz-Raman-Spektroskop und dem optischen Sensor CaroLED. Auch hier konnte eine gute Korrelation beider Messmethoden bezüglich der Carotinoid-Detektion nachgewiesen werden. Obwohl die Raman-Spektroskopie die deutlich sensitivere Messmethode darstellt, zeigt sich, dass auch mit einem einfacher-aufgebauten optischen Sensor ein valides Messergebnis erhoben werden kann. Die Tatsache, dass die Rückstreusensoren gut mit der Resonanz-Raman-Spektroskopie korrelieren, bietet in der Praxis die schnelle und unkomplizierte Möglichkeit der Messung der Hautcarotinoide.

Wie bereits in den Untersuchungen mit dem Raman-Spektroskop nachgewiesen, sah man auch mit beiden optischen Sensoren eine signifikante Zunahme der Carotinoidkonzentration in der Verum-Gruppe, wobei der Anstieg nach fünf Monaten deutlich höher ausfiel. Nach zehn Monaten kam es zu einem vergleichbaren Abfall, wobei die Werte auch hier über den Ausgangswerten blieben. Die Werte in der Placebo-Gruppe stiegen, wie in der Verum-Gruppe, nach fünf Monaten an und fielen nach zehn Monaten wieder ab, wobei hier die Ausprägungen nicht so stark waren wie in der Verum-Gruppe.

Die erhobenen Veränderungen in der Placebogruppe sind, wie bereits beschrieben, möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Probandinnen während des Beobachtungszeitraumes stärker auf eine gesündere Ernährung als gewöhnlich achteten und das Bewusstsein dazu durch die Teilnahme an dieser Studie geweckt wurde.

Des Weiteren könnten auch die jahreszeitlichen Unterschiede eine Erklärung für den sinkenden Carotinoidgehalt sein. In den Herbst- und Wintermonaten kommt es beispielsweise häufiger zu Infekten der oberen Atemwege, was diesen Effekt mitbedingt (Darvin et al., 2005). Im Vergleich zu vorausgegangenen Studien (Meinke et al., 2010; Meinke et al., 2013) wurde in dieser Langzeitstudie insgesamt ein

niedrigerer Anstieg der Hautcarotinoide beobachtet, wobei jedoch auch die supplementierte Carotinoiddosis niedriger war, hier 1650 µg Carotinoide/Tag. Der in der Verum-Gruppe erwartete signifikante Anstieg im Vergleich zur Placebo-Gruppe von 10 bis 20% ist dennoch eingetreten.

Bereits in einer früher durchgeführten in vivo Studie konnte mittels paramagnetischer Elektronenresonanz-Spektroskopie (Meinke et al., 2013) nachgewiesen werden, dass orale verabreichte Carotinoide eine antioxidative Wirkung im Sinne von Radikalfängern haben. Demnach impliziert die in der Verum-Gruppe gemessene höhere Carotinoidkonzentration eine größere Radikalfänger-Aktivität. Wie erwähnt sind Antioxidantien Teil der Abwehrkette des Organismus in der Neutralisation freier Radikale. Beispielsweise kommt es durch Sonneneinstrahlung, d. h. UV-A und UV-B Strahlung, zur direkten Freisetzung freier Radikale in der Haut und zur Einwanderung von Entzündungszellen in das kutane Bindegewebe. Durch die Einwirkung der Strahlen werden antioxidativen Schutzmechanismen geschwächt, und es entwickelt sich eine Zellschädigung in der Haut durch Strahlen-induzierte Radikale (Darvin et al., 2014). Dieser Effekt wird als vorzeitige Hautalterung bezeichnet (Baillie et al., 2011; Proksch et al., 2014; Manickavasagam et al., 2014).

Folglich kann durch den in dieser Arbeit nachgewiesenen erhöhten Carotinoidgehalt in der Haut, ein Schutz gegenüber Strahlung aus dem Nahinfrarot- und sichtbaren Spektrum resultieren.

Als weitere nicht invasive Untersuchungsmethode zur Messung der biomechanischen Eigenschaften der Haut wurde das Cutometer® eingesetzt. Hiermit sollte die Hautfestigkeit und Bruttoelastizität gemessen werden.

Die mit dieser dermatologischen Diagnostikmethode erhobenen Parameter sind schwierig einzuordnen. R0, als Parameter für die Hautfestigkeit, sinkt zunächst nach fünf Monaten sowohl in der Verum- als auch Placebo-Gruppe. Dies spricht für die erwartete Zunahme der Hautfestigkeit. Allerdings steigt R0 nach zehn Monaten steil, sogar über das Ausgangsniveau, an, was für eine deutliche Abnahme der Hautfestigkeit spricht. Bezüglich der Hautelastizität, Messparameter R2, ist in beiden Gruppen ein diskreter Abfall der Messparameter während des Beobachtungszeitraumes nach fünf und zehn Monaten zu verzeichnen. Dies deutet insgesamt auf geringe Abnahme der Elastizität hin.

Die Bewertung der Hautfestigkeit und -elastizität mit dem Cutometer® ist allerdings auch nur punktuell möglich, da der Sondenöffnungsdurchmesser lediglich 2 mm beträgt und es daher schwierig ist, genau denselben Messort in der Wiederholungsmessung zu reproduzieren. Darüber hinaus unterliegt die Messqualität dem, durch den Untersucher, auf die Sonde ausgeübten Druck (Bonaparte et al., 2013). Die Auswertung bleibt daher sehr punktuell und es stellt sich die Frage, wie viele Einzelmessungen durchgeführt werden müssten, um eine adäquate Aussage bezüglich der Hautfestigkeit und Elastizität treffen zu können.

Für eine genauere Auswertung der Hautelastizität käme theoretisch noch eine histologische Auswertung einer Hautprobe, mit Evaluation der elastischen Faserdichte, in Betracht. Dies würde jedoch einen mehrmaligen invasiven Eingriff voraussetzen, der im Rahmen dieser Arbeit unverhältnismäßig gewesen wäre. Die erhobenen Hautparameter dieser Arbeit wurden alle nichtinvasiv in vivo gemessen. Zum Nachweis der Veränderungen des Kollagen I-/Elastinindex (SAAID) wurde der Multiphotonentomograph Dermainspect® eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein nichtinvasives bildgebendes Verfahren, mit dem hochaufgelöste Gewebeschnittbilder erzeugt werden können. Darüber hinaus können die Autofluoreszenz (AF) bzw. Frequenzverdopplung (SHG-second harmonic generation) der dermalen Proteine Elastin und Kollagen I gemessen werden. Aus diesen Messparametern wurde anschließend der Kollagen I-/Elastinindex berechnet.

Im Rahmen früherer Untersuchungen konnte eine Korrelation zwischen dem Kollagen I-/Elastinindex und dem kutanen Carotinoidgehalt nachgewiesen werden (Darvin et al., 2014). Diese Beobachtung wurde jedoch bisher nicht durch die Wirkung eines Nahrungsergänzungsmittel wie Grünkohlextrakt gemacht.

Während der Durchführung dieser Studie traten verschiedene verfahrenstechnische Schwierigkeiten auf. Zum einen erschwerte die Auswahl der Messregion an der Wange die korrekte Positionierung einzelner Probandinnen, da es ihnen nicht möglich war, in der erforderlichen Untersuchungsposition einige Zeit zu verweilen.

Zum anderen wiesen einige der Probandinnen im völlig abgedunkelten Untersuchungsraum Beklemmungsgefühle auf. Daher war es nicht allen möglich, in der notwendigen Position für den benötigten Untersuchungszeitraum nahezu

bewegungsfrei liegen zu bleiben. Es kam folglich zu Bewegungsartefakten, wodurch sich das statistisch analysierte Datenmaterial geringfügig reduzierte.

Die mit dieser Methode erhobenen Messgrößen zeigen, dass die Werte des Kollagen I-/Elastinindex nicht nur in der Verum-Gruppe, sondern auch in der Placebo-Gruppe an der Wange und am ventralen Unterarm angestiegen sind, wobei der Anstieg nur am Unterarm signifikant ist.

Insgesamt war der Anstieg des Kollagen I-/Elastinindex jedoch in der Verum-Gruppe nachweislich höher als in der Placebo-Gruppe. Dies spricht für eine Verbesserung in der extrazellulären Matrix im Vergleich zur Erstuntersuchung zu Studienbeginn im Herbst. Ursächlich hierfür könnte ein verminderter Abbau von elastischen Fasern in der Dermis oder die Bildung von neuen Kollagen I-Fasern sein, was einerseits auf die orale Supplementierung mit dem Grünkohlextrakt und andererseits auch auf die möglicherweise gesündere Ernährung der Probandinnen zurückgeführt werden kann. Beispielsweise regen hohe Konzentrationen von Vitamin C die Kollagensynthese in der Haut an und unterstützen den antioxidativen Schutz vor Sonnenstrahlung - induzierten Lichtschäden (Pullar et al., 2017). Auch die immer größere Bedeutungszunahme weiterer Nahrungsergänzungsmitteln während der letzten Jahre, was sich u. a. im Konsumverhalten der Verbraucher widerspiegelt, könnte ein weiterer einflussnehmender Faktor sein.

Im Rahmen der Anti-Aging-Forschung konnte in aktuellen Untersuchungen in vitro nachgewiesen werden, dass hydrolysiertes Kollagen, in Form von Trinkampullen, die Kollagen- und Elastinsynthese fördert (Lin et al., 2020). Hydrolysiertes Kollagen ist reich an Aminosäuren wie Glyzin und Prolin und reichert sich nach oraler Aufnahme in der Haut an, wo es zur Regeneration beiträgt und, teils in Kombination mit Hyaluronsäure oder Antioxidantien, die Hauttrockenheit und Faltentiefe reduziert (Lupu et al., 2020).

In dieser Studie konnte im Rahmen der Elastizitätsmessung mit dem Cutometer® keine verbessernde Auswirkung der beschriebenen Steigerung des Kollagen I-/Elastinindex auf die Elastizität der Haut nachgewiesen werden. Möglicherweise hängt dies einerseits damit zusammen, dass die Multiphotonentomographie zur Ermittlung des Kollagen I-/Elastinindex eine sensitivere Nachweismethode als die Elastizitätsmessung mit dem Cutometer® darstellt. Andererseits könnten die nachgewiesenen Änderungen in der papillären Dermis aber auch von zu geringer

Intensität sein, um eine effektive Auswirkung auf den untersuchten Parameter der Hautelastizität zu haben. Ferner wäre vorstellbar, dass ein noch längerer Beobachtungszeitraum sich positiv auf die Hautelastizität auswirken könnte.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass sowohl der Carotinoidgehalt als auch der Kollagen I-/Elastinindex in der Haut steigt, was auf einen Anti-Aging-Schutz des antioxidationhaltigen Nahrungsergänzungsmittels hinweist. Dieser Effekt spiegelt sich aber nicht in den Hautparametern (Bruttoelastizität und Hautfestigkeit) wider, so dass diesbezüglich weitere Untersuchungen notwendig sind.

Hinsichtlich der klinischen Relevanz stellt der nichtinvasive Nachweis der dermalen Strukturproteine Elastin und Kollagen I mittels Multiphotonentomographie eine Untersuchungsmethode dar, von der Patienten mit Hauterkrankungen, wie z. B. Psoriasis vulgaris, profitieren können, da hiermit auf subzellulärer Ebene betroffene Hautbereiche eindeutig identifiziert werden können (König K. B. et al., 2020).

Des Weiteren kommt diese Untersuchungsmethode auch Atopikern sowie Patienten mit Mastozytose zu Gute. In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass hiermit Mastzellen, die u. a. Heparin und Histamin speichern, sowie deren Aktivierungsstatus, in der humanen papillären Dermis visualisiert werden können (Kröger et al., 2020).

Aber auch für anderen Fachdisziplinen außerhalb der Dermatologie/Allergologie bietet diese Nachweismethode die Möglichkeit der Prognose von Krankheitsverläufen. Beispielsweise ist dies in der Kardiologie in Bezug auf Herzklappenerkrankungen denkbar, wie aktuell in experimentellen Untersuchungen beschrieben (Jannasch et al., 2021).

Letztlich zeigt sich, dass Anti-Aging-Effekte schwierig zu messen sind, da viele externe, teils nicht beeinflussbare Faktoren, wie Jahreszeit, Lebensstil, Nervosität etc. auf die Messwerte einwirken können. Da der Kollagen I-/Elastinindex (SAID) insgesamt weniger empfindlich auf temporäre äußere Einflüsse reagiert, könnte dieser als zuverlässiger Parameter bezüglich der Messung des Hautalterungsstatus dienen. Des Weiteren bietet insbesondere die Multiphotonentomographie die Möglichkeit, dynamische Prozesse nichtinvasiv und in vivo zu beobachten und aufgrund dessen, Behandlungspläne zu erstellen. Dank permanenter Forschung kann es gelingen, neue Untersuchungstechniken zu etablieren und die Patientenversorgung zu optimieren.

7. Literaturverzeichnis

- Adur, J., Carvalho, H. F., Cesar, C. L., & Casco, V. H. (2014). Nonlinear optical microscopy signal processing strategies in cancer. *Cancer Inform.*, 13, S. 67-76.
- Akhtar, N., Zaman, S. U., & Khan, B. A. (2011). Calendula extract: effects on mechanical parameters of human skin. *Acta Pol Pharm*, 68(5), S. 693-701.
- Aldini, G., Yeum, K. J., Russell, R. M., & Krinsky, N. (2001 Nov). A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radical Biology & Medicine*; 31(9), 1043-1050.
- Andree, S., Reble, C., Helfmann, J., Gersonde, I., & Illing, G. (2010). Evaluation of a novel noncontact spectrally and spatially resolved reflectance setup with continuously variable sourcedetector separation using silicone phantoms. *J. Biomed. Opt.* 15 (6).
- Andree, S., Reble, C., & Helfmann, J. (2013). Spectral in vivo signature of carotenoids in visible light diffuse reflectance from skin in comparison to ex vivo absorption spectra. *Photonics Laser Med.* 2(4), 3.
- Arifler, D., MacAulay, C., Follen, M., & Richards-Kortum, R. (2006). Spatially resolved reflectance spectroscopy for diagnosis of cervical precancer: Monte Carlo modeling and comparison to clinical measurements. *J. Biomed. Opt.* 11(6).
- Baillie, L., Askew, D., Douglas, N., & Soyer, H. P. (2011). Strategies for assessing the degree of photodamage to skin: A systematic review of the literature. *Br. J. Dermatol.*, 165, S. 735-742.
- Barel, A. O., Courage, W., & Clarys, P. (1995). Suction Method for Measurement of Skin Mechanical Properties: The Cutometer. In J. Serup, & G. B. Jemec, *Handbook of Non-Invasive Methods and the Skin*. (S. Kap. 14.3). London, Tokyo: CRC Press Boca Raton, Ann Arbor.
- Biesalski, H. K., Schrezenmaier, J., Weber, P., & Weiß, H. (1997). *Vitamine-Physiologie, Pathophysiologie, Therapie*. Stuttgart: Thieme.
- Bonaparte J. P., Ellis, D., & Chung, J. (Apr;37(3) 2013). The effect of probe to skin contact force on Cutometer MPA 580 measurements. *J Med Eng Technol.* 2013 Apr;37(3). *J Med Eng Technol.*, S. 208-212.
- Boss, N. (1993). *Roche Lexikon Medizin, 3. Auflage*. München: Urban & Schwarzenberg Verlag.
- Brandmüller, J., & Moser, H. (1962). *Einführung in die Ramanspektroskopie (Wissenschaftliche Forschungsberichte. Naturwissenschaftliche Reihe 70)*. Darmstadt: Steinkopff Verlag.
- Cicchi, R., Kapsokalyvas, D., De Giorgi, V., Maio, V., Van Wiechen, A., Massi, D., Lotti, T., & Pavone, F. S. (2010). Scoring of collagen organisation in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy. *J. Biophotonics*, 3, S. 34-43.
- courage-khazaka*. (2020). Von www.courage-khazaka.de/de/16-wissenschaftliche-produkte/alle-produkte/79-cutometer-d abgerufen
- Darvin, M. E. (2006). Non-invasive in vivo detection of the carotenoid antioxidant substance lycopene in the human skin using the resonance Raman spectroscopy. *Laser Physics Letters* 3(9), S. 360-363.

- Darvin, M. E., & Sterry, W. L. (2013). Optical methods for noninvasive determination of carotenoids in human and animal skin. *J. Biomed. Opt.*, *18*.
- Darvin, M. E., Gersonde, I., Albrecht, H., Jacobi, U., Sterry, W., & Lademann, J. (2003). Nicht-invasive Bestimmung von β -Carotin und Lycopin in der menschlichen Haut. *Laborwelt* *6*, 21-22.
- Darvin, M. E., Gersonde, I., Albrecht, H., Sterry, W., & Lademann, J. (2006). In vivo Raman Spectroscopic Analysis of the Influence of UV Radiation on Carotenoid Antioxidant Degradation of the Human Skin. *Laser Phys.* *16*(5), S. 833-837.
- Darvin, M. E., Gersonde, I., Ey, S., Brandt, N. N., Albrecht, H., Gonchukov, S. A., Sterry, W., & Lademann, J. (2004). Noninvasive Detection of β -Carotin and Lycopin in Human Skin using Raman Spectroscopy. *Laser Physics* *14*(2), S. 231-233.
- Darvin, M. E., Gersonde, I., Meinke, M. C., Sterry, W., & Lademann, J. (2005). Non-invasive in vivo Determination of the Carotenoids β -Carotin and Lycopin Concentrations in the Human Skin using the Raman Spectroscopic Method. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, *38*, S. 2696-2700.
- Darvin, M. E., Richter, H., Ahlberg, S., Haag, S. F., Meinke, M. C., Le Quintrec, D., Doucet, O., & Lademann, J. (2014). Influence of sun exposure on the cutaneous collagen/elastin fibers and carotenoids: Negative effects can be reduced by application of sunscreen. *J. Biophotonics*, *7*, S. 735-743.
- Darvin, M. E., Sterry, W., Lademann, J., & Patzelt, A. (2013). Alcohol consumption decreases the protection efficiency of the antioxidant network and increases the risk of sunburn in human skin. *Skin. Pharmacol. Physiol.*, *26*, S. 45-51.
- Darvin, M., Lademann, J., & Magnussen, B. K. (2016). Multiple Spatially Resolved Reflection Spectroscopy for non-invasive determination of carotenoids in human skin. S. 13.
- Darvin, M., Zastrow, L., & Sterry, W. L. (2006). Effect of supplemented and topically applied antioxidant substances on human tissue. *Skin Pharmacol. Physiol.*, *19*, S. 238-247.
- Denk, W., & Webb, J. S. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, *248* (4951), S. 73-76.
- Dias, I. H., Polidori, M. C., Li, L., Weber, D., Stahl, W., Nelles, G., Grune, T., & Griffiths, H. R. (2014). Plasma levels of HDL and carotenoids are lower in dementia patients with vascular comorbidities. *J. Alzheimer's Dis.*, *40*, S. 399-408.
- Dimitrow, E., Riemann, I., & Ehlers, A. (2009). Spectral fluorescence lifetime detection and selective melanin imaging by multiphoton laser tomography for melanoma diagnosis. *Exp Dermatol*, *18*, S. 509-515.
- Doornbos, R. M., Lang, R., Aalders, M. C., Cross, F. W., & Sterenborg, H. J. (1999). The determination of in vivo human tissue optical properties and absolute chromophore concentrations using spatially resolved steady-state diffuse reflectance spectroscopy. *Phys. Med. Biol.* *44*(4), S. 967-981.
- Ermakov, I. V., Ermakova, M. R., Gellermann, W., & Lademann, J. (2004). Noninvasive Selective Detection of Lycopin and β -Carotin in Human Skin using Raman Spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics* *9*(2), S. 332-338.
- Escoffier, C., De Rigal, J., Rochefort, A., Vasselet, R., Lévêque, J.-L., & Agache, P. (1989). Age-related mechanical properties of human skin: an in vivo study. *J Invest Dermatol*, *93*, S. 353.

- Fito, M., & Konstantinidou, V. (2016). Nutritional Genomics and the Mediterranean Diet's Effects on Human Cardiovascular Health. *Nutrients*, 8.
- Fitzpatrick, T. B. (1988). The validity and practicality of sun-reactive skin types I through IV. *Arch Dermatol*, 124, S. 869-871.
- Fluhr, J. W., Caspers, P., van der Pol, J. A., Richter, H., Sterry, W., Lademann, J., & Darvin, M. E. (2011). Kinetics of carotenoid distribution in human skin on vivo after exogenous stress: Disinfectant and wIRA-induced carotenoid depletion recovers from outside to inside. *J. Biomed. Opt.*, 16, 035002.
- Franken, P. A., Hill A. E., Peters, C. W., & Weinreich, G. (1961). Generation of optical harmonics. *Phys. Rev. Lett.*, (4), S. 118-120.
- Friedl, P., Wolf, K., von Adrian, U. H., & Harms, G. (2007). Biological second and third harmonic generation microscopy. *Curr Protoc Cell Biol Chapter 4*.
- Gellermann, W., & Bernstein, P. S. (2004). Noninvasive detection of macular pigments in the human eye. *J Biomed Opt* 9(1), 75-85.
- Gniadecka, M., & Serup, J. (1995). Suction chamber method for measurement of skin mechanical properties: The Dermaflex. In J. Serup, & G. (. Jemec, *Handbook of Non-invasive Methods and the Skin* (S. Kap. 14.2; 14.3). Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC Press.
- Gogly, B., Godeau, G., Gilbert, S., Legrand, J. M., Kut, C., Pellat, B., & Goldberg, M. (1997). Morphometric analysis of collagen and elastic fibers in normal skin and gingiva in relation to age. *Clin Oral Investig*, 1, S. 147-152.
- Göppert-Mayer, M. (9 1931). Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys.*, S. 273-294.
- Grahame, R., & Holt, P. J. (1969). The influence of aging on the in vivo elasticity of human skin. *Gerontology*, 15, S. 121-139.
- Grether-Beck, S., Marini, A., Jaenicke, T., & Krutmann, J. (2016). Maritime Pine Bark Extract (Pycnogenol(R)) Effects on Human Skin: Clinical and Molecular Evidence. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 29, S. 13-17.
- Haag, S. F., Taskoparan, B., Darvin, M. E., Groth, N., Lademann, J., & Sterry, W. M. (2011). Determination of the antioxidative capacity of the skin in vivo using resonance Raman and electron paramagnetic resonance spectroscopy. *John Wiley & Sons A/S, Experimental Dermatology*.
- Hartmann, D. m. (März 2021). www.osteopathie-in-lueneburg.de.
- Heinrich, U., Tronnier, H., Stahl, W., Bejot, M., & Maurette, J. M. (2016). Antioxidant supplements improve parameters related to skin structure in humans. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 16, S. 224-231.
- (2004). *Information und Gebrauchsanweisung zum Cutometer® MPA 580*. Köln: CK Electronic GmbH.
- Jannasch, A. S., Schnabel, C., Galli, R., Faak, S., Büttner, P., Dittfeld, C., Tugtekin, S. M., Koch, E., & Matschke, K. (March 2021). Optical coherence tomography and multiphoton microscopy offer new options for the quantification of fibrotic aortic valve disease in ApoE^{-/-} mice. *Scientific Reports*, S. 11(1), 5834.

- Jung, S., Darvin, M. E., Chung, H. S., Lee, S. H., Lenz, K., Chung, W. S., Yu, R. X., Patzelt, A., & Lee, B. N. (2014). Antioxidants in Asian-Korean and caucasian skin: The influence of nutrition and stress. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 27, S. 293-302.
- Kaatz, M., & König, K. (2010). Multiphotonenmikroskopie und In-vivo-Multiphotonentomographie in der dermatologischen Bildgebung. *Hautarzt* 61, S. 397-409.
- Kaiser, W., & Garrett, C. G. B. (1961). Two-photon excitation in CaF₂: Eu²⁺. *Phys. Rev. Lett.*, S. 229-231.
- Kandola, K., Bowman, A., & Birch-Machin, M. (2015). Oxidative stress - a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. *Int J Cosmet Sci*, 37 Suppl 2, S. 1-8.
- Karagas, M. R., Zens, M. S., Nelson, H. H., Mabuchi, K., Perry, A. E., Stukel, T. A., Mott, L. A., Andrew, A. S., Applebaum, K. M., & Linet, M. (2007). Measures of cumulative exposure from a standardized sun exposure history questionnaire: A comparison with histologic assessment of solar skin damage. *Am. J. Epidemiol.*, 165, S. 719-726.
- Khoubnasabjafari, M., Ansarin, K., & Jouyban, A. (2015). Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *Bioimpacts vol. 5,3*, S. 123-127.
- Klotz, L. O., Holbrook, N. J., & Sies, H. (2001). UVA and Singlet Oxygen as Inducers of Cutaneous Signaling Events. In J. Thiele, & P. Elsner, *Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology* (S. 95-113). Basel, Karger 29: Curr Probl Dermatol.
- Knott, A., Reuschlein, K., Lucius, R., Stab, F., Wenck, H., & Gallinat, S. (2009). Deregulation of versican and elastin binding protein in solar elastosis. *Biogerontology*, 10, S. 181-190.
- Koehler, M. J., König, K., Elsner, P. B., & Kaatz, M. (2006). In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. *Optic Letters* 31, S. 2879-2881.
- Koehler, M. J., Preller, A., Kindler, N., Elsner, P., König, K., Buckle, R., & Kaatz, M. (2009). Intrinsic solar and sunbed-induced skin aging measured in vivo by multiphoton laser tomography and biophysical methods. *Skin Res. Technol.*, 15, S. 357-363.
- König, K. (2000). Multiphoton microscopy in life sciences. *J. Microsc.*, 200, S. 83-104.
- König, K. (2008). Clinical multiphoton tomography. *J. Biophotonics*, 1, S. 13-23.
- König, K. B., Breuning, H. G., Batista, A., Schindele, A., Zieger, M., & Kaatz, M. (2020, 25(1)). Translation of two-photon microscopy to the clinic: multimodal multiphoton CARS tomography of in vivo human skin. *Journal of biomedical optics*, S. 1-12.
- König, K. R., Ehlers, A., Bückle, R., Dimitrow, E., Kaatz, M., Fluhr, J., & Elsner, P. (2006). In vivo multiphoton tomography of skin cancer. *Proc. of SPIE Vol. 6089*, pp, S. 118-124.
- König, K., & Riemann, I. (2003). High-resolution multiphoton tomography of human skin with sub cellular spatial resolution and picosecond time resolution. *Journal of Biomedical Optics* 8, S. 432-439.
- König, K., Ehlers, A., Stracke, F., & Riemann, I. (2006). In vivo Drug Screening in Human Skin Using Femtosecond Laser Multiphoton Tomography. *Skin Pharmacology and Physiology* 19, S. 78-88.
- Koningstein, J. A. (1971). *Introduction of the Theory of the Raman Effect*. Dordrecht: D. Reidel Publishing.

- Kröger, M., Scheffel, J., Nikolaev, V. V., Siebenhaar, F., Schleusener, J., Lademann, J., Maurer, M., & Darvin, M. E. (2020). In vivo non-invasive staining-free visualization of dermal mast cells in healthy, allergy and mastocytosis humans using two-photon fluorescence lifetime imaging. *Scientific Reports* 10: 14930.
- Lademann, J., Meinke, M. C., Patzelt, A., & Darvin, M. E. (2016). Raman-Spektroskopie in der Dermatologie. In J. Welzel, & E. Sattler, *Nichtinvasive physikalische Diagnostik in der Dermatologie* (S. 103-115). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Lambert, J. D., & Elias, R. J. (2010). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Arch. Biochem. Biophys.*, 501, S. 65-72.
- Langton, A. K., Halai, P., Griffiths, C. E., & Watson, R. E. (2016). The impact of intrinsic ageing on the protein composition of the dermal-epidermal junction. *Mech. Ageing Dev.*, 156, S. 14-16.
- Lansing Taylor, D., & Salmon, E. D. (1989). Basic fluorescence microscopy. In Y. L. Wang, *Methods in Cell Biology* (S. 207-237). Boston Academic Press.
- Leonhardt, H. (1985). *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, 7. Auflage*. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag.
- Li, S., Zhu, Y., Chavarro, J. E., Bao, W., Tobias, D. K., Ley, S. H., Foraman, J. P., Liu, A., Mills, J., & Bowers, K. (2016). Healthful Dietary Patterns and the Risk of Hypertension Among Women With a History of Gestational Diabetes Mellitus: A Prospective Cohort Study. *Hypertension*.
- Lin, P., Hua, N., Hsu, Y. C., Kan, K. W., Chen, J. H., Lin, Y. H., Lin, Y. H., & Kuan, C. M. (May 11 2020). Oral Collagen Drink for Antiaging: Antioxidation, Facilitation of the Increase of Collagen Synthesis, and Improvement of Protein Folding and DNA Repair in Human Skin Fibroblasts. . *Oxid Med Cell Longev*.
- Lisenko, S. A., & Kugeiko, M. M. (2013). Noninvasive diagnostics of skin microphysical parameters based on spatially resolved diffuse reflectance spectroscopy. *J. Appl. Spectrosc.* 79 (6), S. 934-943.
- Lupu, M.-A., Gradisteanu Pircalabioru, G., Chifiriuc, M.-C., Albulescu, R., & Tanase, C. (2020). Beneficial effects of food supplements based on hydrolyzed collagen for skin care (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20, S. 12-17.
- Maeter, H., Briese, V., Gerber, B., Darvin, M. E., Lademann, J., & Obertz, D. M. (2013). Case study: In vivo stress diagnostics by spectroscopic determination of the cutaneous carotenoid antioxidant concentration in midwives depending on shift work. *Laser Phys. Lett.*, 10, 105701.
- Manickavasagam, A., Hirvonen, L. M., Melita, L. N., Chong, E. Z., Cook, R. J., Bozecc, L., & Festy, F. (2014). Multimodal optical characterisation of collagen photodegradation by femtosecond infrared laser ablation. *Analyst*, 139, S. 6135-6143.
- Masters, B. R., So, P. T., & Gratton, E. (1997). Multiphoton excitation microscopy of in vivo human skin. *Ann, N. Y. Acad Sci* 838, S. 58-67.
- Meinke, M. C., Schanzer, S., Lohan, S. B., Shchatsinin, I., Darvin, M. E., Vollert, H., Magnussen, B., Köcher, W., Helfmann, J., & Lademann, J. (2016). Comparison of different cutaneous carotenoid sensors and influence of age, skin type, and kinetic changes subsequent to intake of a vegetable extract. *J Biomed Opt.*

- Meinke, M. C., Darvin, M. E., Vollert, H., & Lademann, J. (2010). Bioavailability of natural carotenoids in human skin compared to blood. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 76, S. 269-274.
- Meinke, M. C., Friedrich, A., Tscherch, K., Haag, S. F., Darvin, M. E., Vollert, H., Groth, N., Lademann, J. & Rohn, S. (2013). Influence of dietary carotenoids on radical scavenging capacity of the skin and skin lipids. *J. Pharm. Biopharm.*, 84, S. 365-373.
- Meinke, M. C., Nowbary, C. K., Schanzer, S., Vollert, H., Lademann, J., & Darvin, M. E. (19. Juli 2017). Influences of Orally Taken Carotenoid-Rich Curly Kale Extract on Collagen I/Elastin Index of the Skin. *Nutrients*.
- Meinke, M., Lohan, S., Köcher, W., Magnussen, B., Darvin, M., & Lademann, J. (Nov 2017). Multiple spatially resolved reflection spectroscopy to monitor cutaneous carotenoids during supplementation of fruit and vegetable extracts in vivo. *Skin Res Technol*, S. 459-462.
- Moll, I. (1998). Unsere Dynamische Haut. In Jung, E. G. *Duale Reihe Dermatologie, 4. Auflage* (S. 17,18, 27-30). Stuttgart: Thieme Verlag.
- Mons, U., Muscat, J. E., Modesto, J., Richie, J. P., & Brenner, H. (2016). Effect of smoking reduction and cessation on the plasma levels of the oxidative stress biomarker glutathione-Post-hoc analysis of data from a smoking cessation trial. *Free Radic. Biol. Med.*, 91, S. 172-177.
- Moretti, D., Del Bello, B., Allavena, G., Corti, A., Signorini, C., & Maellaro, E. (10 2015). Calpain-3 impairs cell proliferation and stimulates oxidative stress-mediated cell death in melanoma cells. *PLoS ONE*, S. e0117258.
- Ohshima, H., Kinoshita, S., & Oyobikawa, M., Futagawa, M., Takiwaki, H., Ishiko, A., & Kanto, H. (2013). Use of Cutometer area parameters in evaluating age-related changes in the skin elasticity of the cheek. *Skin Res Technol*, 19(1), S. 238-242.
- Palozza, P., & Krinsky, N. (1992). Antioxidant Effects of Carotenoids in Vivo and in Vitro: An Overview. *Methods in Enzymology*, 213, S. 403-420.
- Palozza, P., Serini, S., Ameruso, M., Verdecchia, S., & Krinsky, N. I. (Palozza P., Ser (2009) Modulation of Intracellular Signalling Pathways by Carotenoids. In: Britton G., Pfander H., Liaaen-Jensen S. (eds) Carotenoids. Carotenoids, vol 5. Birkhäuser Basel. 2009). Modulation of Intracellular Signalling Pathways by Carotenoids. In P. H.-J. Britton G., *Carotenoids. Carotenoids, vol 5*. Basel: Birkhäuser.
- Palozza, P., Serini, S., Nicuolo, F., Piccioni, E., & Calviello, G. (2003). Prooxidant effects of beta-carotene in cultured cells. *Mol. Asp. Med.*, 24, S. 353-362.
- Pfander, H. (1992). Carotenoids: An overview, *Methods in Enzymology*. Academic Press, Volume 213, ISBN 9780121821142.
- Proksch, E., Schunck, M., Zague, V., Segger, D., Degwert, J., & Oesser, S. (2014). Oral intake of specific bioactive collagen peptides reduces skin wrinkles and increases dermal matrix synthesis. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 27, S. 113-119.
- Pullar, J. M., Carr, A. C., & Vissers, M. C. (August 2017). The Roles of Vitamin C in Skin Health. *nutritiens*.
- Ricard-Blum, S. (Jan 2011). The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 3(1).

- Sanchez, W. Y., Obispo, C., Ryan, E., Grice, J. E., & Roberts, M. S. (2013). Changes in the redox state and endogenous fluorescence of in vivo human skin due to intrinsic and photo-aging, measured by multiphoton tomography with fluorescence lifetime imaging. *J. Biomed. Opt.*, *18*, 061217.
- Schempp, C. M., Ludtke, R., Winghofer, B., & Simon, J. C. (2000). Effect of topical application of *Hypericum perforatum* extract (St. John's wort) on skin sensitivity to solar simulated radiation. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, *16*, S. 125-128.
- Shirshin, E. A., Gurfinkel, Y. I., Priezzhev, A. V., Fadeev, V. V., Lademann, J., Darvin, M. E. (2017). Two photon autofluorescence lifetime imaging of human skin papillary dermis *in vivo*: assessment of blood capillaries and structural proteins localization. *Sci Rep* *7*,117.
- Sordillo, L. A., Pu, Y., Pratavieira, S., Budansky, Y., & R., A. R. (2014). Deep optical imaging of tissue using the second and third near-infrared spectral windows. *J Biomed Opt* *19*(5).
- Spada, F., Lui, A. H., & Barnes, T. M. (6. Juni 2019). Use of formulations for sensitive skin improves the visible signs of aging, including wrinkle size and elasticity. *Clin Cosmet Investig Dermatol.*, S. 415-425.
- Spiess, G., & Klapötke, T. M. (1999). *Eine einfache Einführung in die Raman-Spektroskopie*. München: LMU.
- Sugata, K., Osanai, O., Sano, T., Akiyama, M., Fujimoto, N., Tajima, S., & Takema, Y. (2015). Evaluation of unique elastic aggregates (elastic globes) in normal facial skin by multiphoton laser scanning tomography. *Eur. J. Dermatol.*, *25*, S. 138-144.
- Sun, Y., Li, Z., Li, J., & Li, Z. H. (2016). A Healthy Dietary Pattern Reduces Lung Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutritiens*, *8*.
- Thiele, J. J., Schroeter, C., Hsieh, S. N., Podda, M., & Packer, L. (2001). The antioxidant network of the stratum corneum. *Curr Probl Dermatol*, *29*, S. 26-42.
- van den Berg, F., & Cabri, J. (2003). *Angewandte Physiologie: Das Bindegewebe des Bewegungsapparates verstehen und beeinflussen. - 2. korrigierte Auflage*. Stuttgart: Thieme.
- Varadinova, M. G., Valcheva-Traykova, M. L., & Boyadjeva, N. I. (2015). Effect of Circadian Rhythm Disruption and Alcohol on the Oxidative Stress Level in Rat Brain. *Am. J. Ther.*, *23*, 6.
- Varga, Z., Gircz, Z., Liudet, L., Hasko, G., Ferdinandy, P., & Pacher, P. (2015). Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death an autophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta*, *1852*, S. 232-242.
- Vierck, H. B., Darvin, M. E., Lademann, J., Reissauer, A., Baack, A., Sterry, W., & Patzelt, A. (2012). The influence of endurance exercise on the antioxidative status of human skin. *Eur. J. App. Physiol.*, *12*, S. 3361-3367.
- Wenk, J., Brenneisen, P., & Meewes, C., Wlaschek, M., Peters, T., Blandschun, R., Ma, W., Kuhr, L., Schneider, L., & Scharffetter-Kochanek, K. (2001). UV-Induced Stress and Photoaging. In J. Thiele, & P. Elsner, *Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology* (S. 83-94). Basel, Karger 29: Curr Probl Dermatol.
- Williams, R. M., & Webb, W. R. (2001). Multiphoton microscopy in biological research. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, *5*, S. 603-608.

- Williams, R. M., Zipfel, W. R., & Webb, W. W. (2005). Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils. *Biophys J*, *88*(2), S. 1377-1386.
- www.dermaviduals.de. (Mai 2020).
- www.mybiozoom.com. (Februar 2021). Von Ernährungstracker Biozoom. abgerufen
- Xin, Y. J., Yuan, B., Yu, B., Wang, Y. Q., Wu, J. J., Zhou, W. H., & Qiu, Z. (2015). Tet1-mediated DNA demethylation regulates neuronal cell death induced by oxidative stress. *Sci. Rep.*, *5*, S. 7645.
- Yasui, T., Yonetsu, M., Tanaka, R., Tanaka, Y., Fukushima, S., Yamashita, T., Ogura, Y., Hirao, T., Murota, H. & Araki, T. (2013). In vivo observation of age-related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen-sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250-nm-mode-locked cr: Forsterite laser. *J Biomed Opt*, *18*, 31108.
- Yeum, K. J., & Russell, R. M. (4. Januar 2002). *Annu Rev Nutr*, *22*, S. 483-504.
- Yoshida, A., Shiotsu-Ogura, Y., Wada-Takahashi, S., Takahashi, S. S., Toyama, T., & Yoshino, F. (2015). Blue light irradiation-induced oxidative stress in vivo via ROS generation in rat gingival tissue. *J. Photochem. Photobiol. B*, *151*, S. 48-53.
- Zieger, M., Springer, S., Koehler, M. J., & Kaatz, M. (2016). Multiphotonentomographie. In J. Welzel, & S. E., *Nichtinvasive physikalische Diagnostik in der Dermatologie* (S. 63-81). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Zipfel, W. R., Williams, R. M., Christie, R., Nikitin, A. Y., & Hyman, B. T. (2003). Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphotonexcited native fluorescence and second harmonic generation. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, *100* (12), S. 7075-7080.
- Zoumi, A., Yeh, A., & Tromberg, B. J. (2002). Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA*, *99*(17), S. 11014-11019.

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ceylan Katrin Nowbary, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Einfluss von Carotinoiden auf den Kollagen I-/Elastinindex und Hautparameter – prospektiv placebokontrollierte Studie / Influence of carotenoids on collagen I-/elastin index and skin parameters – prospective placebo-controlled study* 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.

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

9. Anteilserklärung an der Publikation

Ceylan Katrin Nowbary hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Meinke, M. C.; Nowbary, C. K.; Schanzer, S.; Vollert, H.; Lademann, J.; Darvin, M. E.: Influence of orally taken carotenoid-rich curly kale extract on collagen I/elastin index of the skin. *Nutrients* 2017.

Im Rahmen oben genannter Publikation führte Frau Nowbary die gesamten Messungen durch und war teilweise für die Datenanalyse verantwortlich.

Ihr Beitrag im Einzelnen beinhaltete die Durchführung der Messung des Carotinoidgehalts in der Haut (Handballen) mittels beider Rückstreusensoren (Biozoom®, CaroLED LMTB®) sowie die Messung bzw. Bestimmung des Kollagen I-/Elastinindex (SAAID) mittels Multiphotonentomographie im Bereich des Unterarmes und der Wange.

Des Weiteren gehörten die Primärdatensicherung, die Aufnahme und Kodierung der Rohdaten für die statistische Auswertung sowie die Berechnung des SAAID zur Aufgabe von Frau Nowbary.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

10. Lebenslauf

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

11. Publikationsliste

Meinke, M. C.; Nowbary, C. K.; Schanzer, S.; Vollert, H.; Lademann, J.; Darvin, M. E.,
Influences of Orally Taken Carotenoid-Rich Curly Kale Extract on Collagen I/Elastin
Index of the Skin. *Nutrients*. 2017 Jul 19;9(7):775.

12. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Martina Meinke für die Überlassung des Themas sowie die ausgezeichnete fachliche Unterstützung und Betreuung bei dessen Ausarbeitung.

Des Weiteren danke ich Dr. rer. med. Maxim Darwin, der mich mit seiner fachlichen Kompetenz im Bereich der Multiphotonen-Tomographie und Raman-Spektroskopie sehr unterstützt hat, insbesondere bei der Beantwortung technischer Fragen.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. Jürgen Lademann und der gesamten AG Lademann sowie allen Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Bereich für Experimentelle und Angewandte Physiologie der Haut, für ihre Unterstützung.

Bei Sabine Schanzer bedanke ich mich für ihre große Hilfe bei der Durchführung unterschiedlichster Messungen.

Christian Hitzel danke ich für sein großartiges Engagement und seine Geduld.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre unermüdliche Unterstützung.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei allen Probandinnen, ohne deren freiwilliges Mitwirken diese Arbeit nicht hätte realisiert werden können.