

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

DISSERTATION

Einfluss von Zigarettenkonsum auf das antioxidative
Abwehrsystem des Körpers, sowie die Interaktion mit exogenen
Antioxidantien bei gleichzeitiger Untersuchung von
Genveränderungen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Karl Bühring
aus Berlin

Datum der Promotion: 03.12.2021

Aus den Daten dieser Dissertation ist folgende Publikation hervorgegangen:

S.B. Lohan, K. Buhring, A.C. Lauer, A. Friedrich, J. Lademann, A. Buss, R. Sabat, K. Wolk, M.C. Meinke, Analysis of the Status of the Cutaneous Endogenous and Exogenous Antioxidative System of Smokers and the Short-Term Effect of Defined Smoking Thereon, *Antioxidants (Basel)*, 9 (6), 537 (2020).

Inhaltsverzeichnis

Vorwort _____ 2

Inhaltsverzeichnis _____

3

Abbildungsverzeichnis _____

7

Tabellenverzeichnis _____

9

Abkürzungsverzeichnis _____

10

Zusammenfassung _____

12

Summary _____

13

1. Motivation _____

14

2. Einleitung: Stressfaktor Rauchen _____

16

3. Grundlagen _____

17

3.1 Haut als äußere Schutzbarriere _____

17

3.2 Oxidativer Stress _____

17

3. 3 Antioxidatives System	18
3.3.1 Stressoren	20
3.3.2 Exogene Antioxidantien: Carotinoide	20
3.3.3 Endogenes Antioxidans: Glutathion	21
3.4 Stressassoziierte Gene und deren Aktivierung	22
3.5 Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie	26
3.6 Resonanz Raman Spektroskopie	27
4. Zielstellung	30
5. Material und Methoden	32
5.1 Studiendesign	32
5.2 Bestimmung des gesamten antioxidativen Status in Haut	34
5.2.1 Elektronenspinresonanz-(ESR)-Spektroskopie	34
5.3 Bestimmung von Antioxidantien in Haut/ Blut	35
5.3.1 Carotinoide: Resonanz-Raman-Spektroskopie (RRS)	35

5.3.2 Glutathion (GSH) _____	
36	
5.3.2.1 Bestimmung des GSH-Levels in Blut _____	
36	
5.3.2.2 Bestimmung des GSH-Levels in Haut _____	
37	
5.4 Quantitative Realtime-PCR-Analyse (qRT-PCR) _____	
38	
5.4.1 Durchführung der qRT-PCR _____	
38	
5.5 Bestimmung des Proteinlevels von Interleukin 22 _____	
40	
5.6 Statistische Auswertung _____	
40	
6. Ergebnisse _____	
41	
6.1 Antioxidativer Grundstatus (0 h) _____	
41	
6.1.1 in Haut _____	
41	
6.1.2 in Blut _____	
43	
6.2 Antioxidativer Status nach definiertem Zigarettenkonsum bei starken Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern (Kontrollgruppe) _____	
44	
6.2.1 in Haut _____	
44	
6.2.2 in Blut _____	
45	

6.2.3 Untersuchung des Proteinlevels IL-22	_____
46	
6.2.4 Untersuchung der Genexpression von stressassoziierten Genen	_____
47	
7. Diskussion	_____
49	
8. Literatur	_____
56	
Eidesstattliche Versicherung	_____
61	
Anteilerklärung an erfolgten Publikationen	_____
62	
Lebenslauf	_____
63	
Publikationsliste	_____
64	
Danksagung	_____
65	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Abbildung der Auswirkung von exogenen Faktoren, wie z.B. Zigarettenkonsum auf den Zellmetabolismus.....	15
Abbildung 2: Umwandlung von oxidiertem GSH (GSSG) zu reduziertem GSH durch die Glutathionreduktase (GSR).....	18
Abbildung 3: Nrf2 Signalweg.....	20
Abbildung 4: Aufspaltung entarteter Energiezustände in einem von außen angelegten Magnetfeld (Zeeman Effekt).....	23
Abbildung 5: Anregung von β-Carotin und Lycopin in Humanhaut unter der Verwendung der Resonanten Raman Spektroskopie.....	25
Abbildung 6: Antioxidativer Grundstatus (Zeitpunkt: 0 h) in der Haut für Nichtraucher (nR, grün), mäßige Raucher (mR (gelb), 3-10 Zig./ Tag) und starke Raucher (sR (rot), > 10 Zig./ Tag).....	38
Abbildung 7: Antioxidativer Grundstatus (Zeitpunkt: 0 h) in der Haut für Nichtraucher (nR, grün, n = 57), mäßige Raucher (mR (gelb), 3-10 Zig./ Tag, n=18) und starke Raucher (sR (rot), > 10 Zig./ Tag, n=23) untersucht mittels RRS.....	38
Abbildung 8: Antioxidativer Grundstatus (Zeitpunkt: 0 h) in Blutplasma für GHS bei Nichtraucher (nR, grün, n = 10), und starke Raucher (sR (rot), > 10 Zig./ Tag, n=10) untersucht mittels eines fluoreszenz-basierten Assays.....	39
Abbildung 9: Antioxidativer Grundstatus (Zeitpunkt: 0 h) in Blutplasma für Carotinoide bei Nichtrauchern (nR, grün, n = 10), und starken Rauchern (sR (rot), > 10 Zig./ Tag, n=10) gemessen mittels RRS.....	40
Abbildung 10: Einfluss von definiertem Zigarettenkonsum auf den kutanen AO-Status.....	41
Abbildung 11: Einfluss von definiertem Zigarettenkonsum auf die Blutplasma-Konzentration der exogenen Antioxidantien β-Carotin und Lycopin, ermittelt mittels RRS.....	41
Abbildung 12: Einfluss von definiertem Zigarettenkonsum auf die Blutplasma-Konzentration des endogenen Antioxidanz Glutathion (GSH), ermittelt mit einem fluoreszenz-basierten Assays.....	42

[Abbildung 13: Einfluss von definiertem Zigarettenkonsum auf den IL-22-Blutplasmaspiegel](#) 43

[Abbildung 14: Vergleich des relativen Genexpressionsprofils \[au\] von oxidativen stress-assozierten Genen \(NRF2, TALDO1, SOD2, LCN2, AKR1C2\) durch qRT-PCR-Analyse von nR und sR jeweils vor \(0 h\) und nach \(4 h\) definiertem Zigaretten- / Luftkonsum in mononukleären Blutzellen.](#) 44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele von Antioxidantien (AO) endogenen und exogenen Ursprungs.	16
Tabelle 2: Stressassoziierten Gene und ihre Funktion.	21
Tabelle 3: Eingruppierung und analysierte Parameter der Probanden, die den verschiedenen Studien (A-D), zugeordnet sind; nR: Nichtraucher, mR: mittelstarke Raucher, sR: starke Raucher; die Ergebnisse der Teilstudie D stammen aus dem Nichtraucher- / Raucherkollektiv der Teilstudie C; n. a.: nicht analysiert.	29
Tabelle 4: Primersequenzen für die stressassoziierten Gene:	35

Abkürzungsverzeichnis

ADHS	Alkoholdehydrogenasen
AKR	Aldo-Keto-Reduktase
AKR1C2	aldo-keto reductase family 1, member C2
ALDHS	Aldehyddehydrogenasen
AO	Antioxidantien
AO-Homöostase	antioxidative Homöostase
AO-Status	antioxidativer Status
ARE	antioxidant response element
ATP	Adenosintriphosphat
CAT	Katalase
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung, chronic obstructive pulmonary disease
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
CXCL8	chemokine (C-X-C motif) ligand 8
DEGS1	Gesundheit Erwachsener in Deutschland, Studie 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat
ESR-Spektroskopie	Elektronenspinresonanz – Spektroskopie
GAM	GSH Assay Mixtur
GCL	Glutamin-Cystein-Ligase
GHz	Gigahertz
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GS	Glutathion-Synthase
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG	Glutathion-Disulfid (oxidierte Form)
GST	Glutathion-S-Transferase
H	hour
HO-1	Hämoxygenase-1
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IL-22	Interleukin 22
ISTD	interner Standard
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LCN2	Lipocalin 2
min	Minuten
mm	Millimeter
MMP-9	Matrix-Metallproteinase-9

Abkürzungsverzeichnis

mM	Millimolar
mR	mittelstarke Raucher
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAGL	Neutrophilengelatinase-assoziierte Lipocalin
NF-κB	nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
nm	Nanometer
NQO1	NAD(P)H: Chinonoxidoreduktase 1
nR	Nichtraucher
NRF2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
°C	Grad Celsius
O ₂ ⁻	Superoxidanionradikal
OH ⁻	Hydroxylradikale
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
PAHs	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	Polymerase Kettenreaktion, polymerase chain reaction
pH	lat.: potentia hydrogenii
qRT-PCR	Quantitative Realtime-PCR
RCS	reaktive Carbonylspezies
RNS	reaktive Stickstoff Species; reactive nitrogen species
ROS	reaktive Sauerstoffspezies; reactive oxygen species
RRS	Resonante Raman-Spektroskopie
s	Sekunden
SOD	Superoxiddismutase
SOD2	Superoxid Dismutase 2
sR	starke Raucher
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Taq	Thermus aquaticus
TGAM	Total GSH Assay Mixture
TALDO1	Transaldolase 1
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1
UV	Ultraviolett

Zusammenfassung

Oxidativer Stress äußert sich durch eine erhöhte Konzentration von freien Radikalen, die ein Ungleichgewicht zwischen dem körpereigenen antioxidativen (AO) Abwehrsystem und reaktiven Metaboliten fördert. Zigarettenrauchen ist eine weit verbreitete Angewohnheit, die pro Zug 10^{15} - 10^{17} freie Radikale induziert und durch diesen oxidativen Stress die Entstehung von Krankheiten begünstigt.

Um die Auswirkungen des Rauchens auf das kutane AO-System besser zu verstehen, wurden die Auswirkungen des Zigarettenkonsums bei moderaten (< 10 Zigaretten/Tag) und starken Rauchern (> 10 Zigaretten/Tag) untersucht. Nicht-Raucher dienten als Kontrollgruppe. Die kutanen AO-Ergebnisse wurden mit den Auswirkungen auf den Körper (Blut) verglichen.

Mit der Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie wurde der kutane AO-Status nicht-invasiv bestimmt (Bestimmung der Ratenkonstante), die resonante Raman-Spektroskopie erfasste die Konzentration der kutanen Carotinoide. Das Konzentrationslevel des endogenen AO-Glutathions wurde aus Klebestreifen analysiert. Parallel dazu wurden Blutproben entnommen und auf deren Carotinoide, GSH und die Expression ausgewählter Stress-assoziiierter Gene untersucht.

Das AO-System von Rauchern unterscheidet sich grundlegend von dem der Nichtraucher. Der Gehalt an exogenen AOs korreliert negativ mit dem Zigarettenkonsum. Im Gegensatz dazu korreliert der Gesamt-AO-Status bei Rauchern positiv, was durch eine deutliche Erhöhung der körpereigenen Schutzmechanismen (hier: GSH) erklärt werden kann. Mit der Nahrung zugeführte AOs werden aufgrund ihrer schnellen Verfügbarkeit im Blut bevorzugt zur Bekämpfung von freien Radikalen eingesetzt, die durch aktive Stresssituationen induziert werden. Der erhöhte körpereigene AO-Status in der Haut dient der Aufrechterhaltung der allgemeinen Redox-Homöostase und wirkt als "Puffersystem". Die Kombination von Ratenkonstanten-, Carotinoid- und GSH-Messungen zeigt erstmals, dass endogene AOs bei Verbrauch stimuliert werden.

Summary

Oxidative stress is expressed by an increased concentration of free radicals promoting an imbalance between the body's antioxidant (AO) defense system and reactive metabolites. Cigarette smoking is a widespread habit inducing 10^{15} – 10^{17} free radicals per puff, and enhancing oxidative stress related diseases.

To broaden the knowledge about the effects of smoking on the cutaneous anti-oxidative (AO) system, the basic and controlled impact of cigarette consumption was investigated on moderate (< 10 cigarettes/day) and strong smokers (> 10 cigarettes/day). Non-smokers served as control group. The results were compared with its impact on the body (blood).

With the electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy the cutaneous AO status was determined non-invasively (determination of the rate constant), resonant Raman spectroscopy recorded the concentration of cutaneous carotenoids. The level of the endogenous AO glutathione was analyzed from tape strips. In parallel, blood samples were taken and examined for their carotenoids, GSH, and expression of selected stress-associated genes.

The AO system of smokers is fundamentally different to that of nonsmokers. The level of exogenous AOs correlates negatively with the consumption of cigarettes. In contrast, the overall AO status in smokers correlates positively, which can be explained by a significant increase in the body's own protective mechanisms (here: GSH). AOs supplied with food are preferably used to combat free radicals induced by active stress situations because of their rapid availability in blood. The increased endogenous AO status in the skin serves to maintain the general redox homeostasis and acts as a "buffer system." The combination of rate constant, carotenoid and GSH measurements shows for the first time that endogenous AOs are stimulated when consumed.

1. Motivation

Die Haut ist die äußere Schutzbarriere unseres Körpers gegen verschiedenste Umwelteinflüsse. Die Einwirkung exogener Faktoren, wie z.B. UV-Strahlung, Luftverschmutzung (Pollution), aber auch Zigarettenrauch, oder psychischer Stress führt zur Entstehung von freien Radikalen. Eine Zunahme von freien Radikalen in der Haut/ dem Metabolismus führt zur Entstehung von oxidativem Stress und damit zu einem Ungleichgewicht zwischen dem antioxidativen Abwehrsystem des Körpers und den reaktiven Metaboliten. Bei übermäßiger Radikalbildung kann es zu einer verstärkten Oxidation von Zellbestandteilen kommen, was letztendlich zu Zell- und Gewebsschädigungen führt.

Der Körper besitzt ein Abwehrsystem aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien (AO), um freie Radikale unschädlich zu machen. Der Konsum von Zigaretten und anderen Tabakerzeugnissen induziert freie Radikale im gesamten Körper und ist mit vielen radikalinduzierten Hauterkrankungen verbunden. Tabakkonsum spielt eine Schlüsselrolle bei Krankheiten wie Akne, Dermatitis, verzögerter Wundheilung, Krebs sowie bei der Hautalterung

In Bezug auf das AO-System konnten unabhängige Studien zeigen, dass Zigarettenrauch das antioxidative System von Bronchialzellen beeinflusst. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Stoffwechsel auf Stress reagiert und versucht, ihn durch Selbstregulationsprozesse zu kompensieren. Im Allgemeinen kann davon ausgegangen werden, dass mäßiger Stress bestimmte Anpassungsmechanismen des Stoffwechsels aktiviert und dadurch das AO-System widerstandsfähiger gegen oxidativen Stress wird.

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich das exogene und endogene AO System der Haut/ des Körpers gegenseitig beeinflussen und auf exogenen Stress reagieren, um die AO-Homöostase aufrechtzuerhalten. Hierbei wurde aktives Zigarettenrauchen als Stressfaktor ausgewählt. Es wurden die Auswirkungen des Zigarettenkonsums bei moderaten (< 10 Zigaretten/Tag) und starken Rauchern (> 10 Zigaretten/Tag) vor nach dem aktiven Konsum von 2 Zigaretten untersucht, Nicht-Raucher dienten als Kontrollgruppe. Zur Untersuchung des AO-Systems der Haut wurden nicht-invasive Messmethoden verwendet. Systemische Reaktionen wurden anhand von Blutproben näher betrachtet.

Mittels der Resonanz-Raman-/ Reflexionsspektroskopie wurden die Karotinoide als Vertreter der exogenen Antioxidantien in Haut und Plasmaproben bestimmt. Die Methode der ESR-Spektroskopie diente zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität (radikalfangenden Eigenschaften) der Haut. Zur näheren Betrachtung des endogenen AO-Systems wurde das Glutathion aus der Haut sowie aus Plasmaproben bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression ausgewählter Stress-assoziiierter Gene untersucht.

Folgende Fragestellungen standen im Fokus dieser Arbeit:

- Unterscheidet sich das AO-System zwischen Rauchern und Nichtrauchern?
- Wie verhält sich das antioxidative Abwehrsystem der Haut nach der Exposition mit Zigarettenrauch im Vergleich zum antioxidativen System im Blut und was ist aussagekräftiger, um den Einfluss des Rauchens zu ermitteln?
- Inwiefern interagieren die körpereigenen (endogenen) AO mit exogenen AO?
- Unterscheidet sich der Grundstatus von Rauchern gegenüber dem Status nach definiertem Zigarettenkonsum?

2. Einleitung: Stressfaktor Rauchen

Zigaretten enthalten über 600 verschiedene Inhaltsstoffe. Zu den Inhaltsstoffen mit dem höchsten Potential, toxische Effekte im Körper auszulösen, gehören u.a., Arsen, Benzol, Blausäure, Schwermetalle wie Blei, Cadmium, Chrom, Formaldehyd, Kohlenmonoxyd, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen (PAHs) [1, 2]. Die chemische Zusammensetzung variiert je nach Tabakprodukt. Rund 90 Stoffe im Tabakrauch sind erwiesenermaßen krebserregend oder stehen im Verdacht, Krebs zu erregen. Tabakrauch inklusive Passivrauchen wurde als krebserregend deklariert [3].

Tabakrauch ist eine komplexe Mischung aus mehr als 7000 verschiedenen chemischen Komponenten, die entweder frei in der Gasphase oder partikelgebunden vorliegen. Pro Zigarettenzug entstehen ca. $10^{15} - 10^{17}$ Radikale [4]. Zigarettenrauch löst im Körper eine Vielzahl von Prozessen aus, die in der Summe zu einem erhöhten Risiko von Krebs, Entzündungsprozessen, kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen sowie vorzeitiger Zellalterung führen. Mit jedem Zigarettenzug wird nicht nur dem broncho-pulmonalen System, sondern über die Weiterleitung durch das Blutsystem auch anderen Organen Schäden zugefügt [5, 6].

In Deutschland hat sich der Konsum von Zigaretten im Vergleich zum Jahr 1991 zwar auf ca. 200 Millionen Zigaretten pro Tag halbiert. Laut DEGS1 (German Adult Health Interview Study) rauch in Deutschland aber immer noch etwa 30 Prozent der Erwachsenen, wobei der Anteil junger Menschen besonders hoch ist [7].

Hinsichtlich der Haut führt Zigarettenrauchen zu einer schnelleren Hautalterung. Diese zeigt sich in einer vermehrten Faltenbildung und Veränderung der Hautpigmentierung (Hautkolorit) [8, 9]. Diese Effekte werden durch verschiedene Regulationsmechanismen bedingt, wie beispielsweise dem Abbau von Kollagenen und elastischen Bindegewebsfasern [10]. Des Weiteren zeigen etliche Studien, dass ein Zusammenhang zwischen Zigarettenrauch und Hauterkrankungen besteht. So beeinflusst das Rauchen beispielsweise die Psoriasis therapie negativ, indem es in die drei wichtigsten pathologischen Schritte eingreift: 1. Die entzündliche Infiltration der Epidermis und Dermis; 2. Die Hyperproliferation der Epidermis; 3. Die pathologische Angiogenese [11-13].

3. Grundlagen

3.1 Haut als äußere Schutzbarriere

Die Haut, welches eines der größten Organe unseres Körpers darstellt, fungiert als Schutzbarriere gegen äußere Einflüsse. Unser Körper ist täglich physischem und psychischem Stress ausgesetzt. Die Haut wird hierbei insbesondere durch äußere Einflüsse (exogene Faktoren) wie z.B. UV-Strahlung und Luftverschmutzung belastet [14, 15]. Des Weiteren können Angewohnheiten, wie regelmäßiges Zigarettenrauchen und Alkoholkonsum zu einer weiteren Schädigung des Metabolismus und somit auch der Haut führen. Solche Einflussfaktoren können die Bildung von freien Radikalen in der Haut, wie etwa reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) fördern, wodurch die Entstehung von oxidativem Stress gefördert wird, der sich schädigend auf den gesamten Körper auswirken kann [16].

3.2 Oxidativer Stress

Generell äußert sich oxidativer Stress durch eine erhöhte Konzentration von freien Radikalen im Organismus und daraus resultierend in einem Ungleichgewicht zwischen dem antioxidativen Abwehrsystem des Körpers und reaktiven Metaboliten [17].

Prinzipiell ist die Entstehung von freien Radikalen ein normaler Prozess innerhalb des Körpers, der durch viele Stoffwechselfvorgänge und insbesondere dem Energiestoffwechsel bedingt wird. Kommt es aber zu einer übermäßigen Radikalbildung, kann es zu einer verstärkten Oxidation von Zellbestandteilen wie Membranen, Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren kommen, wodurch Zell- und Gewebsschädigungen begünstigt werden [17, 18]. Es gilt als erwiesen, dass freie Radikale an der Entstehung verschiedener chronischer Krankheitsbilder beteiligt sind, u.a. an Krebs-, Herz-Kreislauf- (Arteriosklerose) sowie an neurodegenerative Erkrankungen sowie Diabetes mellitus. Was im Speziellen die Physiologie der Haut betrifft, so sind eine vorzeitige Alterung der Haut und ein erhöhtes Krebsrisiko mögliche Folgen [18]. Eine durch freie Radikale vermittelte Oxidation von Enzymen der Bronchien (Störung des Enzymhaushaltes der Lunge) in Folge von Tabakkonsum kann beispielsweise die Entstehung eines Lungenemphysems begünstigen [19].

Bei den entstehenden freien Radikalen handelt es sich in den meisten Fällen um Sauerstoffradikale (reactive oxygen species, ROS). Hierzu zählen u.a. Superoxidanionradikale (O_2^-), Hydroxylradikale ($OH\cdot$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Singulett-Sauerstoff (1O_2). Aber auch reaktive Stickstoffspezies (reactive nitrogen species, RNS), die Lipidperoxidations-reaktionskaskaden fördern und zu Entzündungsreaktionen führen können, zählen dazu [20].

Oxidativer Stress ist ein wichtiger Entstehungsparameter für Entzündungen in der Lunge und für die Entstehung von chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease (COPD) verantwortlich. Bei Patienten mit COPD bleibt der Wert des oxidativen Stresses selbst nach einer Raucherentwöhnung hoch [21, 22].

3. 3 Antioxidatives System

Um schädigende Wirkungen der ROS, sowie anderer Radikalspezies zu reduzieren und die freien Radikale abzufangen und zu neutralisieren, weist der Körper ein antioxidatives System auf [23].

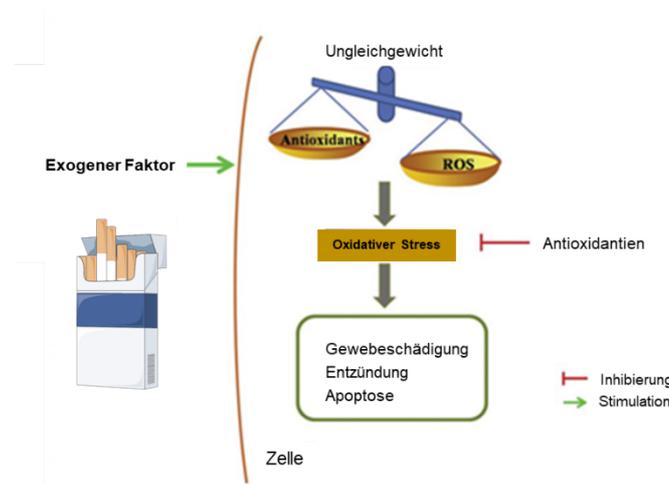


Abbildung 1: Schematische Abbildung der Auswirkung von exogenen Faktoren, wie z.B. Zigarettenkonsum auf den Zellmetabolismus. Oxidativer Stress entsteht in der Zelle durch eine Erhöhung an ROS Produktion, hervorgerufen durch den exogenen Faktor Zigarettenrauch. ROS können den Zellmetabolismus schwächen, Entzündungen oder Gewebeschädigungen hervorrufen oder sogar den Zelltod (Apoptose) induzieren (Abbildung verändert nach Liu M et al.[24])

Antioxidantien (AO) stellen einen wichtigen Parameter für die Gesundheit der Haut und des Körpers dar, um schädigende Oxidationen zelleigener Substanzen, wie der DNA, der Lipide und Proteine, zu verhindern und/ oder zu minimieren, wodurch sie sich positiv auf die Immunabwehr des Körpers auswirken. Man unterscheidet endogene (vom Körper produzierte) sowie exogene (mit der Nahrung aufgenommene) AO. Bei AO endogenen Ursprungs kann zusätzlich zwischen enzymatischen und nicht-enzymatischen Gruppen unterschieden werden. Prinzipiell können AO in lipophile und hydrophile Substanzen untergliedert werden (Tabelle 1) [25].

Tabelle 1: Beispiele von Antioxidantien (AO) endogenen und exogenen Ursprungs.

Endogene AO		Exogene AO
nicht enzymatisch	enzymatisch	
<ul style="list-style-type: none"> - Glutathion - Harnsäure - Liponsäure 	<ul style="list-style-type: none"> - Se-Glutathion-Peroxidase - Katalase - Superoxid-Dismutase 	<ul style="list-style-type: none"> - Vitamin C - Vitamin E (Tocopherole, Tocotrienole) - Carotinoide (Lycopin, Betacarotin, Lutein) - Vitamin K - Polyphenolische Antioxidantien (Resveratrol, Flavonoide)

AO weisen vielfältige Wirkmechanismen auf. Sie können freie Radikale entweder binden („einfangen“) oder reduzieren; des Weiteren können sie die Wirkungsweise anderer Antioxidantien unterstützen (synergistischer Effekt), hierdurch wird die antioxidative Wirkung gefördert und sogenannte Schutzketten ausgebildet, die den Körper vor einer vermehrten Radikalproduktion schützen [26]. Wird die Radikalneubildung durch die Synthese stabiler Radikale unterbrochen, so spricht man von einem sogenannten Radikalfänger, wozu u.a. Vitamin E oder das Coenzym Q10 zählen. Andere Antioxidantien schützen den Körper vor einer ungewollten Oxidation, indem sie sich selbst oxidieren lassen, parallel hierzu wird das Radikal reduziert, wodurch es in seiner Wirkungsweise unterbrochen wird. Zu diesen Reduktionsmitteln gehören z.B. Cystein oder Vitamin C [27].

Freie Radikale verbrauchen essentielle Antioxidantien. Somit kommt es zu einer starken Verminderung von Vitamin A, C, E, β -Carotin, Selen und Zink. Dieser Mangel an Antioxidantien verursacht, dass die schädigenden freien Radikale nicht ausreichend neutralisiert werden können, wodurch sich stetig neue freie Radikale als Stoffwechselzwischenprodukte aufgrund von Kettenreaktionen im Körper bilden. Unter den Reaktionsketten, die durch freie Radikale ausgelöst werden, ist der NF-kappaB (nuclear factor k-light-chain-enhancer of activated B cells) -Signalweg hierbei einer der wichtigsten intrazellulären Vorgänge [28].

Wie schnell und ab welchem Zeitpunkt der Körper versucht das Ungleichgewicht zwischen Antioxidantien und Oxidantien (freie Radikale) zu beheben und inwieweit sich der Metabolismus an dauerhaft einwirkende Noxen adaptieren kann, ist noch weitestgehend unbekannt.

3.3.1 Stressoren

Als Stressfaktoren (Stressoren) werden innere sowie äußere Reize bezeichnet, die die Entstehung von Stressreaktion im Körper auslösen können. Stressoren können positiven (Eustress), aber auch negativen Stress (Distress) hervorrufen. Eustress führt zu einer Mobilisierung der Körperfunktionen bei geringer Belastung; Distress entsteht bei Dauerbelastungen der Körperfunktionen mit möglicher körperlicher Schädigung. Zu den von außen zugeführten Stressoren gehören u. a. Alkohol- und Drogenkonsum, Schadstoffe und Umweltgifte, Hitze/ Kälte, Sonnenbestrahlung, Medikamente, Schlafmangel sowie das Rauchen [29].

Zigarettenrauch ist ein häufig untersuchter und reproduzierbarer Stressfaktor, welcher nachweislich Auswirkungen auf alle Systeme des Körpers hat. Die durch das Rauchen entstandenen Noxen gelangen in den Blutkreislauf. Die daraus resultierenden Auswirkungen sind nicht nur im Blutkreislauf, sondern auch in der Haut nachweisbar, was in diversen Studien festgestellt werden konnte [30-32]. Zigarettenrauch eignet sich demnach hervorragend als Stressor für wissenschaftliche Untersuchungen und kann hierbei als systemischer Parameter im Blut und in der Haut gut untersucht werden.

In dieser Studie wurden die Auswirkungen von Zigarettenrauchen auf den menschlichen Organismus näher untersucht, dessen Toxizität zum größten Teil im Zusammenhang mit oxidativem Stress steht [33, 34].

3.3.2 Exogene Antioxidantien: Carotinoide

Carotinoide, stellen Antioxidantien dar, die vom Körper durch die Nahrung aufgenommen werden müssen. Hierbei handelt es sich vornehmlich um membranassoziierte Antioxidantien, die vor allem die Zell- und Mitochondrienmembranen vor Oxidationsprozessen schützen sollen. Zu den wichtigsten Vertretern zählen u.a. Lutein, β -Carotin, Lycopin und Zeaxanthin. Kutane Carotinoide stellen lipophile Antioxidantien dar, die als Markersubstanz für die antioxidative Kapazität des Körpers angesehen werden können. Es gibt über 600 unterschiedliche Carotinoide; viele werden im Fettgewebe gespeichert; jedoch auch in Organen wie beispielsweise den Nebennieren (Lycopin). Carotinoide können den Organismus vor Krebs und Herz-Kreislauf-Erkrankungen schützen. Weiterhin wirken Sie sich positiv auf Entzündungen und das Immunsystem aus. Generell ist der Carotinoid-Gehalt bei einer vegetarischen Diät höher als bei einer gemischten Diät [35]. Mittels der resonanten Raman Spektroskopie ist es möglich, die Carotinoid-Konzentration *in vivo* nicht invasiv zu bestimmen [36, 37].

3.3.3 Endogenes Antioxidans: Glutathion

Glutathion (GSH) gehört mitunter zu den wichtigsten endogenen Antioxidantien und wird durch drei Aminosäuren synthetisiert. Aus Cystein und Glutaminsäure wird unter ATP-Verbrauch γ -Glutamylcystein gebildet, wobei anschließend durch die Glutathionsynthase Glycin addiert wird und das atypische Tripeptid Glutathion entsteht [38].

Durch dieses Antioxidans werden Körperzellen vor Schäden durch freie Radikale geschützt, da GSH reaktive Sauerstoffverbindungen reduziert, indem die Sulfhydrylgruppe des Cysteins mittels der Glutathion-Peroxidase oxidiert wird. Hierbei entsteht aus zwei oxidierten Glutathion-Molekülen ein Glutathion-Disulfid (GSSG) durch den Verbund mit Hilfe einer Disulfidbrücke. Eine weitere wichtige Funktion von GSH ist die Reduktion von Methämoglobin zu funktionsfähigem Hämoglobin, welches für den Sauerstofftransport in den Erythrozyten verantwortlich ist. Zur Regeneration von oxidiertem GSH ist NADPH notwendig, wodurch mit Hilfe der Glutathion-Reduktase (GSR) aus einem GSSG-Dimer wieder zwei reduzierte GSH hergestellt werden können (Abbildung 2) [39].

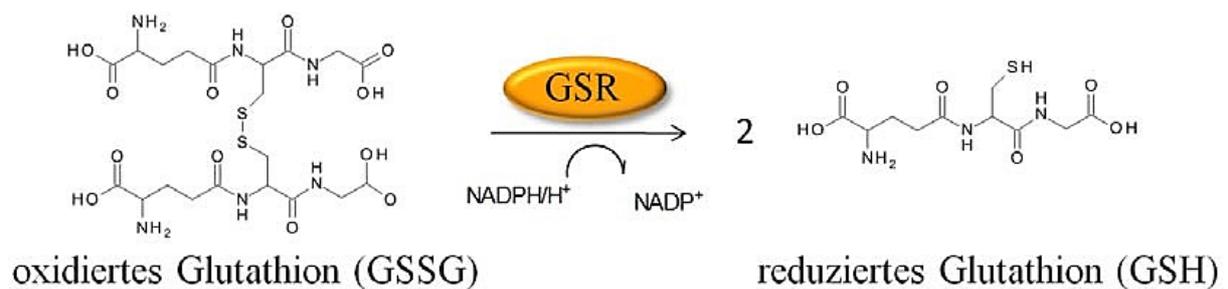


Abbildung 2: Umwandlung von oxidiertem GSH (GSSG) zu reduziertem GSH durch die Glutathionreduktase (GSR).
NADPH/H⁺: Nicotinsäureamidadenin-Dinukleotidphosphat (reduziert); NADP⁺: Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert) [40].

Die GSH-Biosynthese steht im Zusammenhang mit dem Nrf2-/ARE-Signalweg. NRF2 wird durch ein zu hohes Level an oxidativem Stress aktiviert, wodurch u.a. die Synthese von GSH induziert wird und somit ein größerer Schutz gegenüber oxidativem Stress erreicht werden kann [41, 42].

In dieser Arbeit wurde die Konzentration von Glutathion in Haut und Blut untersucht. Dabei wurden fluoreszenzbasierte Messmethoden verwendet.

3.4 Stressassoziierte Gene und deren Aktivierung

Ein Anstieg von oxidativem Stress steht in engem Zusammenhang mit der Veränderung von Genexpressionsmustern in verschiedenen Geweben [43].

Oxidativer Stress, der durch das Rauchen bedingt wird, fördert beispielsweise Entzündungen, Emphyse oder Atemwegsfibrosen; hierbei kommt es zu einer Aktivierung von entzündungsfördernden Genen, wie CXCL1 (C-X-C motif ligand 1)[44], CXCL8 (C-X-C motif ligand 8) [45], MMP-9 (Matrix-Metallproteinase-9) über den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- κ B (Nuclear Factor- κ B)[46].

Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2) ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von antioxidativen Genen reguliert, wodurch diesem Transkriptionsfaktor eine Schlüsselfunktion bei der Reduzierung von oxidativem Stress und somit der zellulären Stressantwort zugeteilt wird. Dieser Faktor induziert die Bildung von verschiedenen Genen, die am zellulären Redoxgleichgewicht beteiligt sind. Die Aktivität dieses Faktors führt zu einem Schutz des Körpers vor Schäden durch ROS [47, 48]. Im „Grundzustand“ liegt Nrf2 in einem Protein-Komplex mit u.a. Keap1-Cul3 im Cytoplasma vor. Das Pendeln von Nrf2 in und aus dem Zellkern wird durch den Redox-Status der Zelle reguliert. Nrf2 weist Kernlokalisierungssignale und Kernexportsignale auf. Die Kernexportsignale werden unter oxidativem Stress durch Modifikationen inaktiviert, wodurch es zu einer Akkumulation von Nrf2 im Zellkern kommt, wodurch die Genexpression von stressassoziierten Genen durch Bindung an das ARE-Element, gefördert wird (antioxidants-response elements) (cis-acting element) (Abbildung 3) [49].

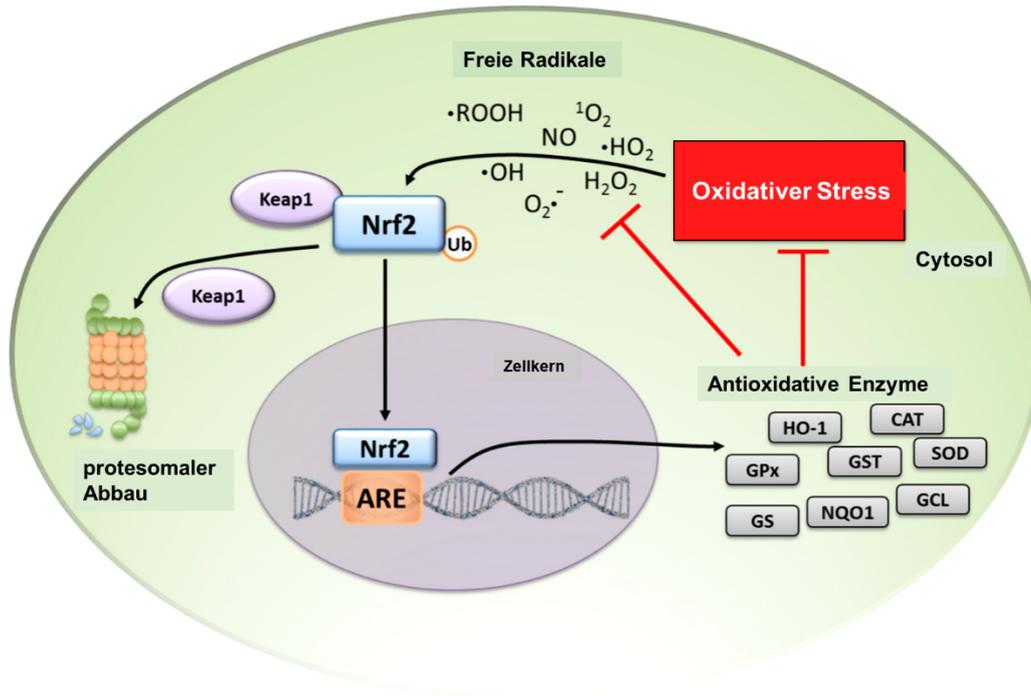


Abbildung 3: Nrf2 Signalweg.

In Zellen unter homöostatischen Bedingungen wird der cytosolische Transkriptionsfaktor Nrf2 durch proteasomalen Abbau, der durch den Keap1-Proteinkomplex ausgelöst wird, auf einem niedrigen Niveau gehalten. Wenn Zellen unter oxidativem Stress stehen, induzieren freie Radikale die Freisetzung von Nrf2 aus Keap1. Im Zellkern bindet Nrf2 an die ARE (antioxidant response elements) und startet die Transkription von antioxidativen Enzymen wie Hämoxxygenase-1 (HO-1), Glutathionperoxidase (GPx), Glutathion-S-Transferase (GST), Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase (CAT), Glutathionreduktase (GR), NAD(P)H: Chinonoxidoreduktase 1 (NQO1), Glutamin-Cystein-Ligase (GCL) und Glutathion-Synthetase (GS). Diese Enzyme reduzieren den oxidativen Stress der Zellen und die freien Radikale. Schwarze Pfeile zeigen die Aktivierung der Pfade an. Rote T-Balken zeigen Blockierungsprozesse an. (Abbildung abgewandelt nach Francisqueti-Ferron et al. [49])

Durch eine Erhöhung von Nrf2 können wichtige entgiftende Enzyme produziert werden, um schädlichen Wirkungen von z. B. Tabakrauch entgegenzuwirken. Durch diese Eigenregulation versucht der Körper auf Stress zu reagieren und diesen zu kompensieren [22]. Der genaue Zusammenhang zwischen Keap1 und Nrf2 ist noch unklar. Bestätigt werden konnte jedoch, dass Keap1 beispielsweise durch oxidativen Stress moduliert wird und anschließend die Aktivität von Nrf2 regulieren kann [50].

Eine vielversprechende Strategie für die Krebsvorsorge und den Hautschutz ist die Nrf2-Aktivierung. Ein möglicher therapeutischer Ansatz ist es, den Nrf2-Spiegel durch die Hemmung der Wirkung von Keap1 zu erhöhen. Dies wurde beispielsweise durch das starke indirekte Antioxidant Sulforaphan erreicht, welches in Brokkoli und Wasabi vorkommt [51]. Der Abbau von Nrf2 wird durch die Wechselwirkung von Keap1 und Isothiocyanaten unterbunden und kann ein Ansatz für die Entwicklung von Nrf2-Aktivatoren sein. In einer

Studie von Malhotra et al. (2008) konnte gezeigt werden, dass die antioxidative Genexpression in einer menschlichen bronchialen Epithelzelle durch Sulforaphan wiederhergestellt werden konnte [52]. Durch die Aktivierung des Nrf2/ARE- abhängigen Gens durch Lebensmittelinhaltsstoffe werden Phase II Entgiftungs- und Antioxidationsenzyme freigesetzt, welche einen wichtigen Abwehrmechanismus gegen oxidativen Stress darstellen. Der Signalweg der aus den drei Kernkomponenten Nrf2, ARE und Keap1 besteht kann somit einen chemopräventiven Beitrag leisten [53, 54].

In dieser Arbeit wurde die Expression stressassoziierter Gene mittels der qRT-PCR untersucht, die an der Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts beteiligt sind. Bei den Genen handelt es sich um folgende Auswahl: *NRF2 / NFE2L2* (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*), *SOD2* (*Superoxide Dismutase 2*), *TALDO1* (*Transaldolase 1*), und *LCN2* (*Lipocalin 2*), *AKR1C2* (*aldo-keto reductase family 1, member C2*) (Tabelle 2).

Tabelle 2: Stressassoziierte Gene und ihre Funktion.

NRF2 / NFE2L2 (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*), SOD2 (*Superoxide Dismutase 2*), TALDO1 (*Transaldolase 1*), LCN2 (*Lipocalin 2*), AKR1C2 (*aldo-keto reductase family 1, member C2*) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT).

Gen	Funktion
<i>NRF2</i>	<p>Nrf2 ist ein Schlüsselregulator für zellulären Stress, Hautschutz und Krebsvorbeugung.</p> <p>NRF2 ist in die Schutzmaßnahmen vor oxidativen Stress involviert [55]. Der Nrf2-Wert ist bei gesunden Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern signifikant geringer und bei Rauchern mit COPD im Vergleich zu gesunden Rauchern signifikant erhöht. Dieses Muster bestätigte sich ebenfalls bei einigen Genen, die von Nrf2 reguliert werden [56].</p> <p>Unter normalen Bedingungen hat Nrf2 keinen Einfluss auf die antioxidativen Gene. Bei Rauchern geht Nrf2 in den Zellkern und aktiviert verschieden antioxidative Gene, welche dem erhöhten oxidativen Stress entgegenwirken. Bei Rauchern mit COPD kann Nrf2 nicht in den Zellkern vordringen, sodass hier der oxidative Stress anhält [22].</p>
<i>SOD2</i>	<p>Es wandelt toxische Superoxide in Wasserstoffperoxid und zweiatomigen Sauerstoff um. Somit spielt es eine wichtige Rolle gegen oxidativen Stress, da es in der Lage ist mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu eliminieren [57].</p>
<i>TALDO1</i>	<p>TALDO1 ist ein Schlüsselenzym des nicht-oxidativen Pentosephosphatweges, welches dazu in der Lage ist, Glutathion in einem reduzierten Zustand zu halten und somit ein Schutz vor oxidativen Stress darstellt [58].</p>
<i>LCN2</i>	<p>Bei Entzündungen/ oxidativem Stress wird LCN2 durch Interleukin 1 stark hochreguliert [59].</p> <p>Zudem kodiert das <i>LCN2</i>-Gen das Neutrophilengelatinase-assoziierte Lipocalin (NGAL), welches an der unspezifischen Immunantwort beteiligt ist, indem es Eisen bindet und somit zur Einschränkung von Bakterienwachstums führt [60].</p>
<i>AKR1C2</i>	<p>ROS-ausgelöste Lipidperoxidationsreaktionen erzeugen eine Reihe reaktiver Carbonylspezies (RCS), und diese RCS verbreiten und verstärken ROS-bedingte Verletzungen. Um Gewebeverletzungen vorzubeugen, werden diese RCS von mehreren Oxidoreduktasen metabolisiert, darunter Mitglieder der Aldo-Keto-Reduktase (AKR) - Superfamilie, Aldehyddehydrogenasen (ALDHs) und Alkoholdehydrogenasen (ADHs). Der Metabolismus über diese Enzyme führt zur Inaktivierung und Entgiftung von RCS. Die metabolische Transformation und Entgiftung von RCS durch Oxidoreduktasen verhindert eine wahllose ROS-Toxizität und bewahrt gleichzeitig die ROS-Signalübertragung. Nrf2 fördert die Genexpression von AKR1C2 [61].</p>

3.5 Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie

Die Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie, ist eine Messmethode, die quantitative sowie qualitative Messungen von freien Radikalen u.a. in der Haut ermöglicht. Diese Methode ist nicht-invasiv und kann *in vivo* [62-65], aber auch *ex vivo* [66, 67] und *in vitro* [68-70] angewendet werden. Generell können mit dieser Technologie paramagnetische Substanzen, d.h. chemische Verbindung, die ein ungepaartes Elektron aufweisen, untersucht werden. Durch den Spin des freien Elektrons wird ein magnetisches Moment erzeugt, welches in Wechselwirkung mit dem Magnetfeld des ESR-Spektrometers steht. Hierdurch bedingt sich in einem starken externen Magnetfeld eine Aufspaltung in unterschiedliche Energieniveaus, welcher als Zeeman-Effekt beschrieben wird. Die Stärke der Aufspaltung der Elektronen in die zwei Energiezustände E- (Grundzustand des Elektrons) und E+ (aktivierter Zustand des Elektrons) verhält sich proportional zu der extern angelegten Magnetfeldstärke (Abbildung 4) [71].

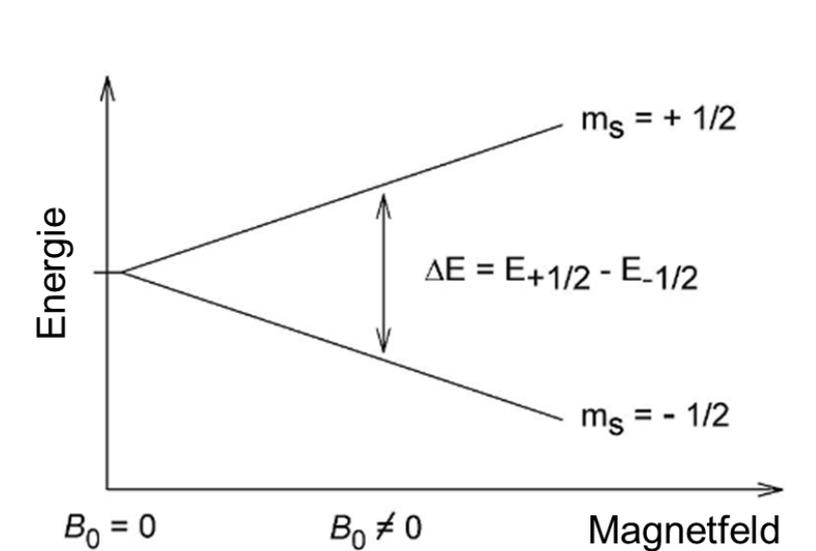


Abbildung 4: Aufspaltung entarteter Energiezustände in einem von außen angelegten Magnetfeld (Zeeman Effekt)

(Abbildung abgeändert nach [https://commons.wikimedia.org/wiki/File: EPR_splitting.svg#file](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EPR_splitting.svg#file))

Das System absorbiert dann Mikrowellenstrahlung, wenn die Resonanzbedingungen erfüllt sind. Diese sind dann erfüllt, wenn die Energiedifferenz bei einer bestimmten Magnetfeldstärke der Energie der eingestrahlten Mikrowellenfrequenz entspricht. Ist dies der Fall, wird der Spin in das energetisch höhere Energielevel gehoben. Die Absorption der angelegten Mikrowellenstrahlung wird von einer Photodiode registriert und in ein auswertbares Absorptionsspektrum umgewandelt. Die Mikrowelle in einem ESR-Spektrometer wird durch eine Gunn-Diode erzeugt, welche im Frequenzbereich von z.B. 1.5 GHz (L-Band) oder 9-10 GHz (X-Band) liegt. Diese wird in einen Hohlraum-Resonator

(„Cavity“) geleitet, in dem sich eine stehende Welle ausbildet. Die Mikrowellenfrequenz wird während der Messung konstant gehalten, während die Magnetfeldstärke verändert wird. Man unterscheidet verschiedene Frequenzbänder (Bsp. W-Band 95 GHz, X-Band 9-10 GHz, S-Band 2-3 GHz, L Band 1.5 GHz). Die Eindringtiefe der Mikrowellenstrahlung in eine Probe ist umso geringer, je höher die Frequenz ist. Prinzipiell sind Radikale sehr reaktionsfreudig und weisen eine sehr kurze Halbwertszeit auf, weshalb für ihre Detektion via ESR sogenannte Spinmarker eingesetzt werden müssen, die das Radikal stabilisieren, damit es im ESR-Spektrometer nachgewiesen werden kann [71]. Der Gebrauch solcher Spinmarker ermöglicht es, z. B. den antioxidativen Status *in vivo* zu untersuchen.

Unter der Verwendung des Spinmarkers TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1) kann der antioxidative Status in der Haut *in vivo* mit der ESR-Spektroskopie bestimmt werden [64]. Die Signalintensität des eingesetzten Testradikals TEMPO wird durch das ESR-Gerät über einen gewissen Zeitraum gemessen. Dieser Spinmarker ist lipophil und kann in die Haut und Hautzellen eindringen. Nach einer bestimmten Einwirkzeit dieses Testradikals kann dieses mit den in der Haut existenten Antioxidantien und Radikalen reagieren, wodurch dessen Intensität über den Messzeitraum nachlässt. Die hieraus folgende Neutralisierung des Radikals bedingt einen Konzentrationsabfall in der Haut, welcher durch die ESR-Spektroskopie gemessen werden kann und zur Bestimmung des antioxidativen Status der Haut dient.

In dieser Arbeit wurde der antioxidative Status in Haut vor und nach kontrollierter Stressapplikation (Rauch von 2 Zigaretten bzw. Nichtrauchen) mittels ESR und dem Spinmarker TEMPO näher untersucht.

3.6 Resonanz Raman Spektroskopie

Die Resonante Raman-Spektroskopie (RRS) zählt zu den Schwingungsspektroskopiearten und macht sich den Raman-Effekt in Kombination mit einem Laser als Lichtquelle zu nutze. Proben können hierbei nicht-invasiv untersucht und Informationen über physikalische und chemische Eigenschaften können gewonnen werden.

Die RRS beruht auf dem Raman-Effekt, welcher als erstes durch den indischen Physiker Chandrasekhara Raman experimentell nachgewiesen werden konnte. Wenn ein Photon auf ein Molekül trifft bestehen drei Möglichkeiten: 1. Das Licht wird von der Probe reflektiert oder durchdringt diese (größter Anteil); 2. Die Photonen werden in alle Richtungen gestreut, und zwar ohne Änderung der Energie (geringer Anteil) - dies entspricht der elastischen, Mie- oder Rayleigh-Streuung; 3. es geschieht eine inelastische Streuung (kleinster Anteil des eingestrahnten Lichts), wobei die gestreuten Photonen Energie an die Probe abgeben

(Stokes-Streuung) oder von dieser aufnehmen (Anti-Stokes-Streuung). Der Raman-Effekt bezieht sich auf die dritte Möglichkeit und umfasst somit sämtliche inelastische Streuung [72].

Die RRS konnte erfolgreich in zahlreichen *in vivo* Studien genutzt werden, um Carotinoide als Markersubstanz für die antioxidative Kapazität des Körpers nachweisen zu können [37, 73, 74]. Bei der Messung mit 514 nm regt man überwiegend Lycopine und bei 488 nm β -Carotin an (Abbildung 5)[36, 75] .

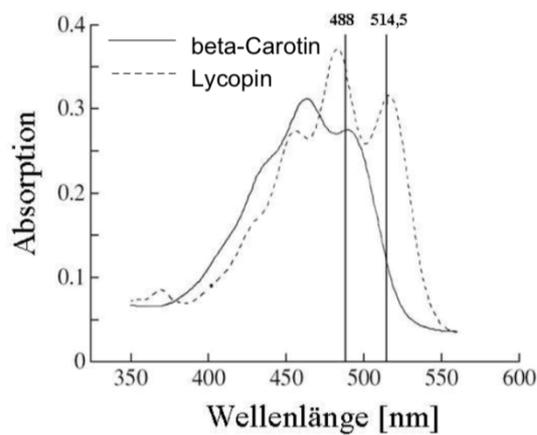


Abbildung 5: Anregung von β -Carotin und Lycopin in Humanhaut unter der Verwendung der Resonanten Raman Spektroskopie (Abbildung abgeändert nach Darwin et al., [75])

4. Zielstellung

Das Rauchen von Zigaretten fördert die Entstehung von freien Radikalen, die die Entstehung von oxidativem Stress im Körper fördern, wodurch metabolische Prozesse in ihrer Funktion beeinträchtigt werden können. Diesem Prozess steht das antioxidative System des Körpers gegenüber, das Radikale abfangen kann und somit für ein Gleichgewicht zwischen Antioxidantien (AO) und Radikalen verantwortlich ist. Dieses System gliedert sich in ein exogenes (AO, die mit der Nahrung aufgenommen werden müssen) und in ein endogenes (vom Körper selbst produzierte AO) Teil. Kommt es zu einer Beeinträchtigung des antioxidativen Status, versucht der Körper, unter der Mitwirkung des antioxidativen Systems, wieder ein Gleichgewicht zwischen Antioxidantien und freien Radikalen herzustellen (Homöostase). Ab welchem Zeitpunkt das Gleichgewicht zwischen ROS und AOs kippt und ab wann der Körper die Menge an ROS nicht mehr kompensieren kann, bleibt bisher jedoch ungeklärt.

In dieser Studie wurde die Auswirkung von Zigarettenrauch auf das kutane antioxidative System näher untersucht werden. Mittels nicht-invasiver Messmethoden wurde analysiert, inwiefern das endogene mit dem exogenen antioxidativen System in Wechselwirkung tritt, um der Entstehung von oxidativem Stress entgegenzuwirken.

Folgende Frage sollten geklärt werden:

Unterscheidet sich das AO-System zwischen Rauchern und Nichtrauchern?

Wie verhält sich das antioxidative Abwehrsystem der Haut nach der Exposition mit Zigarettenrauch im Vergleich zum antioxidativen System in Blut und was ist aussagekräftiger, um den Einfluss des Rauchens zu ermitteln?

Inwiefern interagieren die körpereigenen (endogenen) AO mit exogenen AO?

Unterscheidet sich der Grundstatus von Rauchern gegenüber dem Status nach definiertem Zigarettenkonsum?

Um diese Fragestellungen klären zu können, wurden Messmethoden angewendet, die das endogene, sowie exogene antioxidative Potential darstellen konnten. Durch die ESR-

Spektroskopie können endogene AO des Körpers in vivo nicht-invasiv gemessen werden (L-Band), indem die Ratenkonstante bestimmt wird. Mittels der resonanten Raman-Spektroskopie (RRS) wurde das Carotinoid-Level nicht-invasiv bestimmt, welches als Marker für den exogenen antioxidativen Status angesehen werden kann. Die β -Carotin und Lycopin-Bestimmungen wurden in vivo (am Handballen) und an Plasmaproben durchgeführt.

Mit diesen beiden Methoden (ESR, RRS) ist es möglich das Zusammenspiel zwischen exogenen und endogenen A nicht-invasiv zu untersuchen.

Da bei Rauchern eine Beeinträchtigung des Glutathionmetabolismus (endogenes AO) in früheren Studien nachgewiesen werden konnte, wurde der GSH-Haushalt zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe eines GSH/GSSG-fluoreszenzbasierten-Assays aus Blutseren sowie aus Klebefilmabrissen untersucht. Des Weiteren wurde eine quantitative real-time PCR (qRT-PCR) für ausgewählte stressassoziierte Gene durchgeführt, um die Genexpression jener vor und nach Zigarettenkonsum zu analysieren. Hier stellte sich die Frage, inwiefern die Expression bestimmter Gene zwischen Nichtrauchern und Rauchern beeinflusst wird. Hierfür wurden Nitrat-Blutproben verwendet, welche speziell aufgearbeitet wurden.

In dieser Studie wurden insgesamt 30 gesunde Probanden (jeweils 10 Nichtraucher, 10 mittelstarke Raucher und 10 starke Raucher) untersucht, um den Einfluss des Nikotinkonsums auf das antioxidative System zu untersuchen. Die erhaltenen Ergebnisse der Messungen wurden statistisch mittels SPSS analysiert, ausgewertet und miteinander korreliert.

5. Material und Methoden

5.1 Studiendesign

Alle in dieser Dissertation durchgeführten Studien wurden von der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin, in Übereinstimmung mit den im Jahr 2000 überarbeiteten Grundsätzen der Deklaration von Helsinki, begutachtet (Projektidentifikationscode: EA1 / 211/13).

Alle Probanden gaben ihre schriftliche Einwilligung und wurden vorab über das Forschungsprojekt und die Studie aufgeklärt.

In dieser Studie wurden insgesamt 30 Probanden untersucht, die in folgende Gruppen zu je 10 Probanden eingeteilt wurden:

a) Nichtraucher (nR)

b) mittelstarke Raucher (mR, Zigarettenkonsum 3 – 10 Zigaretten pro Tag)

c) starke Raucher (sR, Zigarettenkonsum > 10 Zigaretten pro Tag).

Für alle Probanden der Gruppen a - c erfolgte in einer identischen zeitlichen Abfolge die Untersuchung des antioxidativen Status folgendermaßen:

Um den antioxidativen Status der einzelnen Probanden in der Haut zu erfassen, wurde dieser mittels der ESR-Spektroskopie eingangs untersucht (5.2.1). Im Anschluss wurde die kutane Nährstoffversorgung durch die exogenen AOs β -Carotin und Lycopin mittels der RRS am Handballen erfasst (5.3.1). Um den antioxidativen Status der Haut mit dem antioxidativen Potential im Blut korrelieren zu können, wurde den Probanden Blut abgenommen (Abnahme 1). Die Probanden, welche zu den Rauchern gehörten (Gruppe b, c) durften mindestens zwei Stunden vor der ersten Untersuchung nicht geraucht haben.

Um den kontrollierten Einfluss von Zigarettenrauch auf das antioxidative System zu untersuchen, rauchten die Probanden der Gruppe b und c zwei Zigaretten am Stück

innerhalb von 15 Minuten an der frischen Luft; die Nichtraucher verbrachten ebenfalls 15 Minuten an der frischen Luft ohne jeglichen Zigarettenkonsum. Um zusätzliche Stressinduzierungen durch andere Parameter (sportliche Belastung etc.) weitestgehend ausschließen zu können, wurde der Weg an die frische Luft (hin- und rück) mittels eines Aufzuges getätigt. Bevor im Anschluss die Bestimmung des antioxidativen Status (Haut/ Blut) durchgeführt wurde, fand eine Akklimatisierung von 10 Minuten statt.

Es erfolgte eine erneute Messung des antioxidativen Status der Haut via ESR und RRS und Blutabnahmen 2 (Abnahme 2) beziehungsweise 4 Stunden (Abnahme 3) nach dem Zigarettenkonsum/ Luftexposition (Nichtraucher) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Eingruppierung und analysierte Parameter der Probanden, die den verschiedenen Studien (A-D), zugeordnet sind; nR: Nichtraucher, mR: mittelstarke Raucher, sR: starke Raucher; die Ergebnisse der Teilstudie D stammen aus dem Nichtraucher- / Raucherkollektiv der Teilstudie C; n. a.: nicht analysiert.

Teilstudie	<u>Raucher- Status</u>	Anzahl an Probanden	<u>Geschlecht:</u> weiblich/ männlich	Analysierte Parameter
A	nR	57	33/ 24	Grundlegender (0 h) AO-Status in der Haut, Ratenkonstante (ESR) und Carotinoide (RRS)
	mR	18	7/ 11	
	sR	23	9/ 14	
B	nR	13	9/ 4	Grundlegender Status GSH (0h) in Haut
	mR	0	n.a.	
	sR	13	5/ 8	
C	nR	10	5/ 5	AO Status 4 h nach definiertem Zigarettenkonsum im Vergleich zum Basisstatus (0h) in Haut und Blutplasma von sR (ESR, RRS, GSH und IL-22 (nur Blut))
	mR	0	n. a.	
	sR	10	5/ 5	
D	nSm#	5	4/ 1	Grundlegender Expressionsstatus von mit oxidativem Stress assoziierten Genen in Blutzellen und deren Vergleich mit dem Status 4 h nach definiertem Zigarettenkonsum in sR
	mSm	0	n. a.	
	sSm#	5	3/ 2	

Für den Zigarettenkonsum wurden Zigaretten der Marke „Gauloises Blondes rot“ (Imperial Tobacco; Inhaltsstoffe: Teer: 7mg; Nikotin: 0,6 mg; Kohlenmonoxid: 9 mg) verwendet, welche verblindet wurden. Die Zusammensetzung der verwendeten Zigarettenmarke ist vergleichbar mit der einer Referenzzigarette (1R6F, ISTD = interner Standard, <https://www.coresta.org/university-kentucky-reference-cigarette>). Die Blutabnahmen (Abnahme 1 – 3) erfolgte jeweils mit drei Röhrchen für Citrat, Serum und EDTA. Die EDTA Proben wurden für die RRS-

Messungen verwendet, die Serum Proben für die Bestimmung des GSH, die Nitrat Proben für die Real-time PCR-Analyse.

Da in Teilstudie A mR Messwerte lieferten, die zwischen den Messwerten für nR und sR lagen, wurden mR in den nachfolgend durchgeführten Pilotunterstudien B bis D nicht berücksichtigt. Das kutane Konzentrationslevel des endogenen AO-Glutathions aus Klebestreifen wurde bei sR und nR im Nachhinein analysiert, um Kausalitätszusammenhänge aufzuklären (Teilstudie C). Hier wurden insgesamt 26 Probanden (13 nR und 13 sR) untersucht.

Die Untersuchung der Expression von stressassoziierten Genen (Teilstudie D) wurde aus jeweils 5 nR und 5 sR (die willkürlich ausgewählt wurden) als Pilotstudie analysiert.

Um die Daten der Teilstudie A statistisch besser auswerten und korrelieren zu können, wurden Messwerte von früheren Studien miteinbezogen, sodass die Anzahl an Probanden für die Teilstudie A von der Anzahl von 10 Probanden final abweicht [65, 73, 76].

Alle Messungen wurden während der Wintermonate durchgeführt; es wurden Hautstellen zur Analyse ausgewählt, die gar nicht/ bis minimal eine UV-Exposition hatten.

5.2 Bestimmung des gesamten antioxidativen Status in Haut

5.2.1 Elektronenspinresonanz-(ESR)-Spektroskopie

Zur Bestimmung des antioxidativen Status in Haut wurde der Unterarm der Probanden aus den verschiedenen Gruppen (a, b, c, s. 5.1) mittels der ESR-Technologie in vivo mit einem L-Band (LBM MT 03, Magnetech Berlin, Deutschland) und unter der Verwendung des Spinmarkers TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl, 98%, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) untersucht.

TEMPO ist eines der wenigen Nitroxide, welches in vivo auf die Haut appliziert werden kann. Es ist amphiphil und dringt gut in die Haut ein. Für die durchgeführten ESR Untersuchungen wurde eine 30 mM TEMPO-Lösung (1:1 Wasser/ Ethanol) verwendet.

Mögliche Haare auf der Haut wurden zuvor vorsichtig mit einer Schere/ Einmalrasierer entfernt und die Haut in einem Areal von ca. 5 cm Durchmesser am rechten Unterarm mit Ethanol gereinigt. Anschließend wurde ein Filterpapier auf das Areal am rechten Unterarm aufgelegt. Hiernach wurden 50 µl TEMPO (30 mM) auf dieses Filterpapier (SmartPractice, Europe GmbH, Deutschland) gegeben und direkt mit der Finn-Chamber (SmartPractice, Europe GmbH, Deutschland) okklusiv verschlossen. Nach einer Einwirkzeit von 10 Minuten wurde die Finn-Chamber entfernt und die Haut vorsichtig 2x abgetupft. In die Mitte des

Areals wurde ein Markierungspunkt mit einem feinen wasserfesten Stift gesetzt. Der rechte Unterarm wurde zügig im ESR platziert, sodass die Mitte der Messspule mit dem zuvor gesetzten Referenzpunkt übereinstimmte. Für die ESR-Messungen wurden folgende magnetische Parameter verwendet: Mikrowellenfrequenz (1,3 GHz), zentrales Magnetfeld (46 mT), Sweep-Breite (8 mT), Sweep-Zeit (10 s) und Modulationsamplitude (0,15 mT). Es wurden zwei Messungen mit je einer Messzeit von 20 Minuten und 4 Scans/min. durchgeführt; zur Auswertung erfolgte eine Mittelung von jeweils 8 hintereinander gemessenen Scans. Alle Messwerte wurden auf den ersten Messwert der jeweiligen Messung normiert.

Die ESR-Messungen wurden pro Proband einmal vor dem Rauchkonsum/ der Luftexposition (Messung vor) und einmal nach dem Rauch von 2 Zigaretten innerhalb von 15 min bzw. nach einer 15 minütigen Luftexposition durchgeführt (Messung nach).

5.3 Bestimmung von Antioxidantien in Haut/ Blut

5.3.1 Carotinoide: Resonanz-Raman-Spektroskopie (RRS)

Die RRS-Messungen am Probanden zur Bestimmung von β -Carotin und Lycopin wurden am rechten Handballen vorgenommen. Hierbei wurden jeweils fünf Messungen an der gleichen Stelle des Handballens pro Durchgang durchgeführt und anschließend gemittelt. Die RRS Messungen wurden pro Proband 2 mal durchgeführt: einmal vor dem Zigarettenkonsum bzw. Luftexposition und danach (für Raucher 2 Zigaretten; für Nichtraucher 15 min. frische Luft).

Um eine Korrelation zwischen Haut und Blut tätigen zu können, wurde die β -Carotin und Lycopin Konzentration ebenfalls aus EDTA-Blut mittels RRS-Messungen bestimmt. Das Blutplasma wurde durch 15-minütige Zentrifugation bei 1.200 g von EDTA-Blut abgetrennt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Für die Carotinoid-Messungen wurden Quarzglasküvetten verwendet und jeweils drei Messungen pro Blutprobe durchgeführt und anschließend gemittelt. Pro Proband gab es jeweils drei Blutabnahmen: Abnahme 1 =Ausgangssituation, Abnahme 2/ 3= 2h bzw. 4 h. nach dem Zigarettenkonsum bzw. der Luftexposition.

5.3.2 Glutathion (GSH)

5.3.2.1 Bestimmung des GSH-Levels in Blut

Glutathion kann in zwei verschiedenen Formen im Körper vorkommen: als oxidiertes GSSG (Disulfid) und als reduziertes GSH (Sulfhydryl). Normalerweise überwiegt das reduzierte GSH zum GSSG.

Für die Bewertung des Redox- und Entgiftungsstatus von Zellen in Bezug auf die schützende Funktion von Glutathion gegen Zellschädigung durch freie Radikale ist die Kontrolle des GSH/GSSG- Verhältnisses und die Quantifizierung jener Thiole in biologischen Proben unabdingbar. Es gibt verschiedene Verfahren zur Bestimmung von GSH und GSSG in biologischen Proben.

Für diese Studie wurde der Amplite™ Fluorimetric Glutathione GSH/GSSG Ratio Assay Kit von AAT Bioquest (Inc., Sunnyvale, USA) verwendet. Dieser Kit enthält einen Farbstoff, der bei Reaktion mit Thiol stark fluoresziert, wodurch ein Fluoreszenz-Mikroplattenleser bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Detektionswellenlänge bei 520 nm das entstandene Signal detektieren kann.

Zunächst wurden die Blutplasmaproben unter Verwendung des ReadUse™ TCA Deproteinization Sample Preparation Kit (AAT Bioquest, Inc., Sunnyvale, USA) aufgereinigt. 10 µl TCA (Trichloressigsäure) wurde zu 100 µl Plasmaprobe gegeben, gut durchmischt und für 10 min auf Eis gelagert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 12 000 rpm für 5 min (UNIVERSAL 320R (Hettich AG, Bäch, Schweiz). Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die GSH-Bestimmung verwendet.

Für die GSH-Bestimmung mittels des Amplite™ Fluorimetric Glutathione GSH/GSSG Ratio Assay Kit wurde zunächst eine GSH Standard stock solution (GSH SSS), eine GSSG Standard stock solution (GSSG SSS) und eine 100 x Thiolite Green stock solution (TGSS) hergestellt, welche anschließend für die jeweiligen Verdünnungsreihen benutzt wurden. Am Ende wurden je 50 µl Lösung in eine 96-well Mikroplatte pipettiert und eine Doppelbestimmung der GSH- und GSSG- Standardkurve, sowie der zugehörigen Test-Proben (50 µl) durchgeführt, indem je 50 µl GSH Assay Mixtur (GAM) für den GSH Standard und 50 µl Total GSH Assay Mixture (TGAM) für den GSSG Standard hinzugegeben wurden und nach 30 minütigem inkubieren im Dunkeln bei Raumtemperatur die Messung der Fluoreszenz bei Ex/Em = 490/520 nm in einem Fluoreszenz-Mikroplattenleser (Enspire, Perkin Elmer, Rodgau Jügesheim, Deutschland) vorgenommen wurde.

Dieses Verfahren wurde mit den Blutplasmaproben die zu drei verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurden (Blutabnahme Nr.1 vor der Pause und Nr.2 und Nr.3 je 2h und 4h nach der Pause) durchgeführt.

5.3.2.2 Bestimmung des GSH-Levels in Haut

Zur GSH-Quantifizierung in der Haut wurden Klebefilmstreifenabrisse von der Innenseite des Unterarms genommen.

Aus der Innenseite des Unterarms wurden vier Klebefilmstreifen mit einem Durchmesser von 22 mm (3M, Blendederm™, 1525-2 Neuss, Deutschland) entnommen. Das Klebeband wurde unter der Verwendung eines Hautrollers gleichmäßig auf die Haut gedrückt, um die Hautoberfläche zu dehnen (10-mal). Der erste Klebefilm wurde verworfen, die drei folgenden Klebefilmstreifen wurden sofort mit flüssigem Stickstoff behandelt und dann bis zur weiteren Verarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das Hautmaterial wurde durch Ultraschall (Sonorex Super, BANDELIN Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) in $800\text{ }\mu\text{l}$ $0,05\text{ M}$ Kaliumphosphatpuffer (1 mM EDTA, pH 7,5-8,0) von den Klebebändern gelöst. 10 min Ultraschall bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro Klebefilm wurde angewendet. Nach der 1. Ultraschall-Behandlung wurde der Klebefilmstreifen vorsichtig aus dem Reaktionsgefäß entfernt und der nächste Klebefilmstreifen in die gleiche Pufferlösung gegeben, gefolgt von der nächsten Ultraschall-Behandlung. Dieses Verfahren wurde für den gesamten Klebefilm-Satz eines Probanden durchgeführt. Um unlösliches Material zu entfernen, wurde die erhaltene Lösung 5 Minuten bei 16.000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert (UNIVERSAL 320R (Hettich AG, Bäch, Schweiz). $120\text{ }\mu\text{l}$ der Probe wurden in eine ViewPlate-96 Black (Perkin Elmer LAS, Rodgau Jügesheim, Deutschland) überführt und mit $12,5\text{ }\mu\text{l}$ o-Phthalaldehyd/ Methanol-Lösung (P0532-50 ml, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) gemischt. Nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde GSH in einem Plattenlesegerät (Enspire, Perkin Elmer, Rodgau Jügesheim, Deutschland) unter Verwendung einer Anregungswellenlänge bei 350 nm und einer Detektionswellenlänge bei 420 nm gemessen.

Die GSH-Konzentration wurde mit dem Proteingehalt der jeweiligen Probe in Beziehung gesetzt. Die Bestimmung der Proteingehaltes der Proben wurde unter Verwendung eines Pierce Protein Reagent Assay BCA-Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA # 23227) getätigt.

Der BCA-(Bicinchoninsäure-) Assay basiert auf der Bildung von Cu^{2+} -Komplexen mit vorhandenen Proteinen, welche eine Reduktion des Cu^{2+} zu Cu^{+} zur Folge haben, Voraussetzung hierbei ist eine alkalische Umgebung. Die Menge des reduzierten Kupfers ist

proportional zur Menge des vorhandenen Proteins und kann durch Messung der optischen Dichte bei 560 nm nachgewiesen werden.

Es wurde eine BSA-Standardreihe hergestellt, wodurch eine Eichkurve erstellt werden konnte: 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml und 0,25 µg/ml. Jeweils 25 µl der Proteinproben (unverdünnt) und der Standardkonzentrationen wurden auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte aufgetragen und mit 200 µl BCA-Lösung (Reagenz A: Reagenz B = 50:1) versetzt. Jede Probe wurde dabei doppelt angesetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde die Protein-Bestimmung in einem ELISA-Reader durchgeführt. Dabei wurde die Extinktion bei 560 nm photometrisch gemessen und mit der Eichgeraden verglichen, um die Proteinkonzentration der einzelnen Proben abschätzen zu können. Die endgültige Proteinkonzentration ergab sich aus dem Mittelwert der Einzelmessungen.

5.4 Quantitative Realtime-PCR-Analyse (qRT-PCR)

Mittels der qRT-PCR ist es möglich, neben der Amplifikation auch die Quantifizierung der DNA zu tätigen. Die Quantifizierung wird durch kationische Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht, die in die doppelsträngige DNA-Moleküle interkalieren können; ein gängiges Beispiel stellt hierbei der Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green I dar. Während der Vervielfältigung der DNA (PCR-Zyklen) wird parallel die Fluoreszenz gemessen, die exponentiell mit der Amplifikatmenge ansteigt.

5.4.1 Durchführung der qRT-PCR

Dieses Verfahren wurde von der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Wolk (Institut für Medizinische Immunologie an der Charité-Universitätsmedizin Berlin) durchgeführt, weshalb die methodische Beschreibung auf das Wesentliche beschränkt ist.

Bei den Blutseren der Probanden handelte es sich um abgetrenntes Blut, das 30 Minuten lang durch 10-minütige Zentrifugation bei 1000 g gewonnen wurde und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert wurde. Periphere mononukleäre Blutzellen wurden aus Citratblut durch Dichtegradientenzentrifugation hergestellt, in Lyse-Lösung aus Invisorb RNA Kit II (Invitex / Stratad Molecular) resuspendiert und bis zur qRT-PCR-Analyse bei -80 ° C gelagert.

Die Isolierung der gesamten zellulären RNA aus frisch isolierten Blutzellen erfolgte mit TRizol® Reagent (Ambion / ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) gemäß dem Herstellerprotokoll und wurde mit dem RNA 6000 Nano LabChip Kit II unter Verwendung des Bioanalyzer 2100-Geräts (Agilent Technologies, Santa Clara (CA), USA) auf Quantität und Qualität überprüft. In den erhaltenen RNA-Proben wurde die enthaltene Messenger-RNA unter Verwendung von pd (T) 18-Primern revers in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert.

Anschließend wurde die cDNA-Quantifizierung durch qRT-PCR (TaqMan™, ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) unter Verwendung des StepOne plus-Instruments, des Maxima Probe/ROX qPCR-Master-Mix und gebrauchsfertiger Detektionstests (Applied Biosystems / ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Zusätzlich zu den PCR-Primern enthält dieser Nachweisassay eine Oligonukleotidsonde, bei der ein Fluorophor am 5'-Ende und ein Quencher am 3'-Ende angebracht sind, wodurch die vom angeregten Fluorophor emittierte Fluoreszenz gelöscht werden kann, solange die Sonde intakt ist. Wenn die Sonde während der PCR-basierten Amplifikationsschritte mit der Ziel-cDNA-Sequenz hybridisiert, spaltet die 5'-3'-Exonukleaseaktivität des DNA-synthetisierenden Enzyms (Taq-Polymerase) die Sonde, um eine fluorophorbasierte Quantifizierung der schrittweisen Amplifikation als Maß zu ermöglichen der anfänglichen cDNA-Konzentration in der Probe.

Die folgenden mit oxidativem Stress assoziierten Gene wurden für die qRT-PCR-Untersuchungen ausgewählt, da sie alle an der Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts beteiligt sind: *NRF2* / *NFE2L2* (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*), *SOD2* (*Superoxide Dismutase 2*), *TALDO1* (*Transaldolase 1*), und *LCN2* (*Lipocalin 2*), *AKR1C2* (*aldo-keto reductase family 1, member C2*).

Eine Analyse des House-keeping-Gens Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) wurde eingeschlossen, um die Gen-Expression darauf zu normalisieren. Nur Änderungen von > 1,5-fach wurden als relevant angesehen.

Tabelle 4: Primersequenzen für die stressassoziierten Gene:

NRF2 / *NFE2L2* (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*), *SOD2* (*Superoxide Dismutase 2*), *TALDO1* (*Transaldolase 1*), *LCN2* (*Lipocalin 2*), *AKR1C2* (*aldo-keto reductase family 1, member C2*) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT).

Gen	Assay	
<i>NRF2</i>	TaqMan® Gene Expression Assay; Assay-ID: Hs00975960_m1 (<i>NFE2L2</i>)	ThermoFisher Scientific/Applied Biosystems
<i>SOD2</i>	TaqMan® Gene Expression Assay; Assay-ID: Hs00167309_m1 (<i>SOD2</i>)	
<i>TALDO1</i>	TaqMan® Gene Expression Assay; Assay-ID: Hs00997203_m1 (<i>TALDO1</i>)	
<i>LCN2</i>		
<i>AKR1C2</i>	TaqMan® Gene Expression Assay; Assay-ID: Hs00366267_m1 (<i>AKR1C2</i>)	

<i>HPRT</i>	TaqMan® Gene Expression Assay; Assay-ID: Hs99999909_m1 (HPRT)	
-------------	--	--

5.5 Bestimmung des Proteinlevels von Interleukin 22

Dieses Verfahren wurde von der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Wolk (Institut für Medizinische Immunologie an der Charité-Universitätsmedizin Berlin) durchgeführt, weshalb die methodische Beschreibung auf das wesentliche beschränkt ist.

Das Proteinlevel des schützenden Interleukin-22 wurden im Blutserum durch Quantikine-ELISA von R & D Systems / Biotechne (Minneapolis, MN, USA) quantifiziert.

5.6 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit SPSS für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Zur Auswertung der Signifikanz zu einem Zeitpunkt erfolgte anhand des Mann-Whitney-U-Tests für nicht zusammenhängende Stichproben, wobei $p \leq 0,05$ als signifikant angesehen wurde.

6. Ergebnisse

Um die Auswirkung von Zigarettenkonsum auf das antioxidative System der Haut näher zu untersuchen, und die Interaktion zwischen dem endogenen AO-System und dem exogenen Stressfaktor Rauchen besser verstehen zu können, wurden mittelstarke (mR) und starke Raucher (sR) im Vergleich zu Nichtrauchern (nR) vor (Grundstatus) und nach einem definiertem Rauchkonsum (Raucher), bzw. nach vergleichbarem Luftkonsum (Nichtraucher) hinsichtlich ihres antioxidativen Status in Haut und Blut mittels ausgewählten Methoden charakterisiert.

6.1 Antioxidativer Grundstatus (0 h)

6.1.1 in Haut

Um den grundlegenden AO-Status (Zeitpunkt: 0 h) in der Haut für nR, mR und sR zu bestimmen, wurden verschiedene nicht-invasive spektroskopische Verfahren und molekularbiologische Methoden angewendet: Die Gesamtheit der antioxidativen Kapazität der Haut wurde mittels der ESR-Technologie, unter der Verwendung des Spinmarkers TEMPO bestimmt. Das endogene Antioxidans GSH wurde in der oberen Hautschicht (Stratum Corneum) unter Verwendung eines fluorimetrischen Assays quantifiziert. Die exogenen kutanen Carotinoide β -Carotin und Lycopin wurden durch RRS bestimmt.

In der Abbildung 6 A ist die Ratenkonstante in der Haut von nR, mR und sR abgebildet. Hierbei entspricht eine hohe Ratenkonstante einem hohen antioxidativen Status in der Haut. Im Grundstatus weisen Raucher (mR, sR) eine signifikant höhere Ratenkonstante im Vergleich zu nR auf. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Rauchergruppen (mR, sR) und konnten nicht festgestellt werden.

Die Analyse des GSH-Levels der Haut im Grundstatus (Abbildung 6 B) wies zwischen sR und nR signifikante Unterschiede auf. Im Durchschnitt zeigte sich bei den sR eine 1,5-fach erhöhte GSH-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Konzentration an Carotinoiden in der Haut wurde am rechten Handballen mittels RRS bestimmt (Abbildung 7).

Wie in Abbildung 7 gezeigt, zeigten beide Rauchergruppen, mR und sR, im Vergleich zu nR signifikant niedrigere β -Carotin-Werte (Abbildung 7 A); ein ähnliches Muster wurde für die Lycopin-Werte festgestellt (Abbildung 7 B).

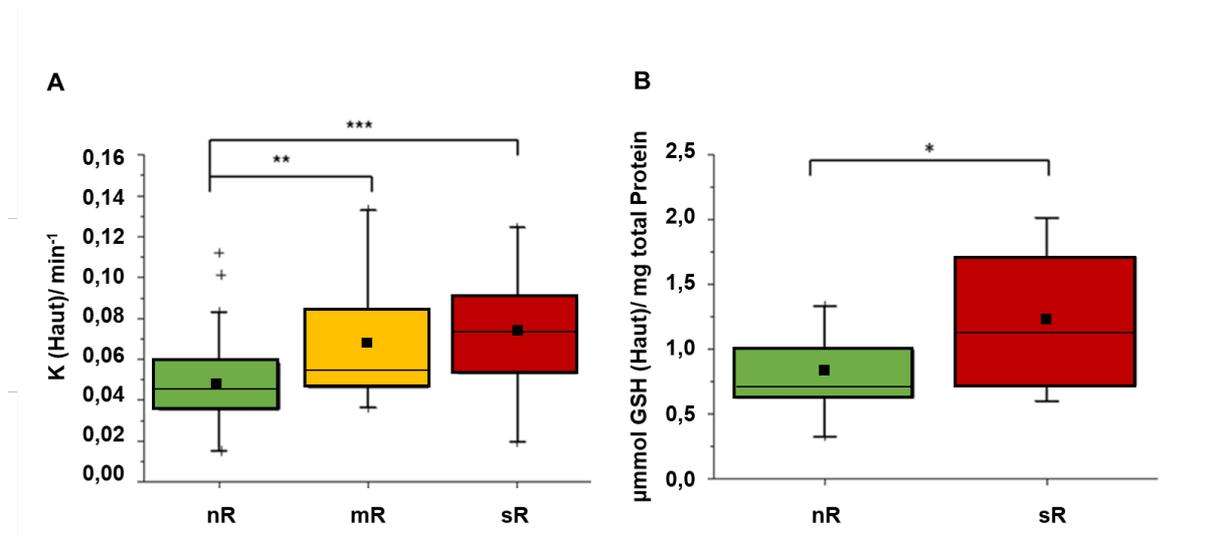


Abbildung 6: Antioxidativer Grundstatus (Zeitpunkt: 0 h) in der Haut für Nichtraucher (nR, grün), mäßige Raucher (mR (gelb), 3-10 Zig. / Tag) und starke Raucher (sR (rot), > 10 Zig./ Tag). A) Ratenkonstante der radikalfangenden Eigenschaften der Haut, ermittelt durch die ESR-Spektroskopie (nR, n = 57, mR, n=18, sR, n=23); B) GSH-Konzentration für nR (n = 13) und sR (n = 13), gemessen im Stratum Corneum mittels der Klebefimabrissmethode und fluorimetrischen Assay. Die Abbildung enthält die Ergebnisse der Studien A, B und C (Grundstatus (Zeitpunkt 0 h); Boxplot-Diagramm mit Perzentile 25, 75, Median (schwarze Linie), Mittelwert (schwarzes Quadrat) und Ausreißer (schwarzes Kreuz), * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

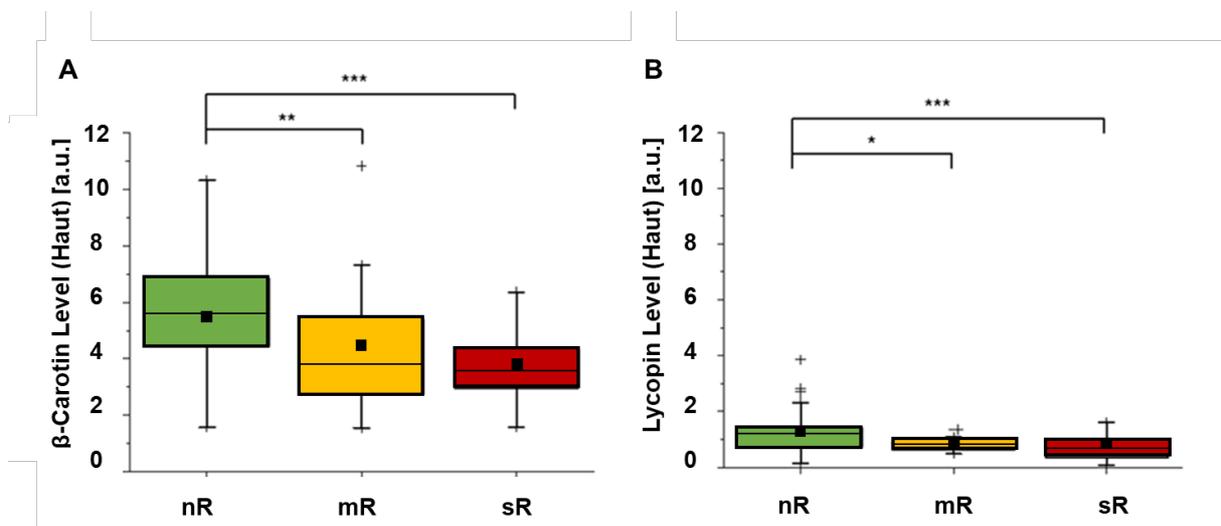


Abbildung 7: Antioxidativer Grundstatus (Zeitpunkt: 0 h) in der Haut für Nichtraucher (nR, grün, n = 57), mäßige Raucher (mR (gelb), 3-10 Zig. / Tag, n=18) und starke Raucher (sR (rot), > 10 Zig./ Tag, n=23) untersucht mittels RRS. A) β -Carotin-Gehalt [a.u.] B) Lycopin-Gehalt [a.u.]; Boxplot-Diagramm mit Perzentile 25,75, Median (schwarze Linie), Mittelwert (schwarzes Quadrat) und Ausreißer (schwarzes Kreuz), * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

6.1.2 in Blut

Um das kutane AO-System mit dem AO-System im Blut zu korrelieren, wurde das Blutplasma von nR und sR auf deren GSH-Grundlevel untersucht (Abbildung 8).

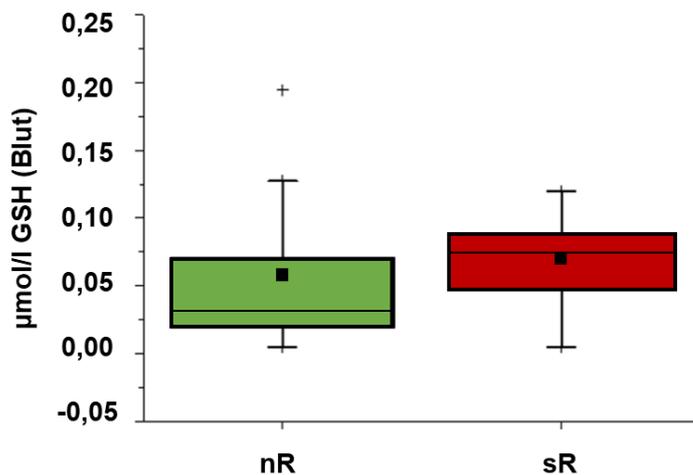


Abbildung 8: Antioxidativer Grundstatus (Zeitpunkt: 0 h) in Blutplasma für GSH bei Nichtraucher (nR, grün, $n = 10$), und starke Raucher (sR (rot), > 10 Zig./ Tag, $n=10$) untersucht mittels eines fluoreszenz-basierten Assays. Boxplot-Diagramm mit Perzentil 25, 75, Median (schwarze Linie), Mittelwert (schwarzes Quadrat) und Ausreißer (schwarzes Kreuz).

Im Blut war die GSH-Konzentration zwischen nR und sR vergleichbar (Abbildung 8). Zu Studienbeginn zeigten die Raucher (sR) keinen aktiven Verbrauch von GSH im Blut, was zu dem Schluss führt, dass kein akuter Rauchstress vorliegt und ihr Redoxsystem in einer Homöostase vorliegt.

Wie in Abbildung 9 A gezeigt, wurde ein ähnlicher Trend für den Grundstatus von β -Carotin im Blut gefunden. Das β -Carotin-Level ist bei sR im Vergleich zu der Kontrollgruppe (nR) im Grundstatus signifikant erniedrigt. Für den Lycopinspiegel im Blut konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 9 B). Im Allgemeinen war der Unterschied zwischen nR und sR für beide Carotinoid-Level im Blut gegenüber der Haut weniger stark ausgeprägt.

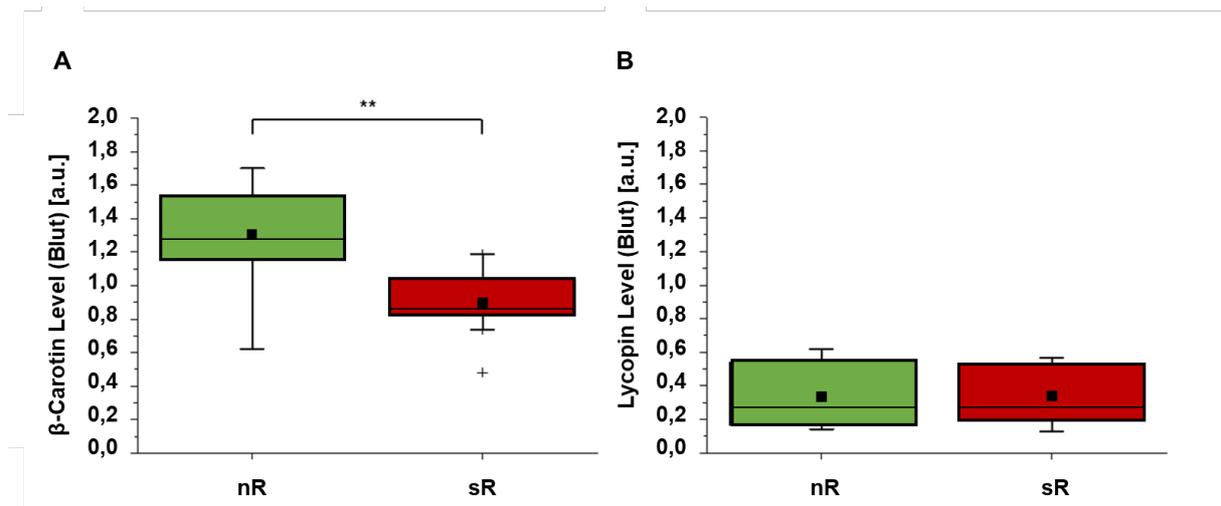


Abbildung 9: Antioxidativer Grundstatus (Zeitpunkt: 0 h) in Blutplasma für Carotinoide bei Nichtrauchern (nR, grün, n = 10), und starken Rauchern (sR (rot), > 10 Zig./ Tag, n=10) gemessen mittels RRS.

Boxplot-Diagramm mit Perzentile 25, 75, Median (schwarze Linie), Mittelwert (schwarzes Quadrat) und Ausreißer (schwarzes Kreuz), ** $p \leq 0,01$.

6.2 Antioxidativer Status nach definiertem Zigarettenkonsum bei starken Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern (Kontrollgruppe)

Anschließend wurde der direkte Einfluss von definiertem Zigarettenkonsum auf das AO-System von Rauchern (sR) im Vergleich zu Nichtrauchern (nR) untersucht. Hierfür rauchten sR zwei Zigaretten innerhalb von 15 min. an der frischen Luft. Die Kontrollgruppe (nR) verbrachte ebenfalls 15 min ohne Zigarettenkonsum an der frischen Luft. Der AO- Status wurde in der Haut und im Blut nach 4 h untersucht und mit dem Grundstatus zum Zeitpunkt 0 h verglichen.

6.2.1 in Haut

Untersuchungen von nR und sR 4 h nach dem Zigarettenkonsum / Frischluftexposition ergaben keine signifikanten Änderungen für die kutane Ratenkonstante k, den kutanen β-Carotinspiegel oder des Lycopin-Levels (Abbildung 10). Für alle Messparameter konnte ein ähnliches Verteilungsmuster wie für den Grundstatus (Zeitpunkt 0 h) zwischen den einzelnen Gruppen ermittelt werden.

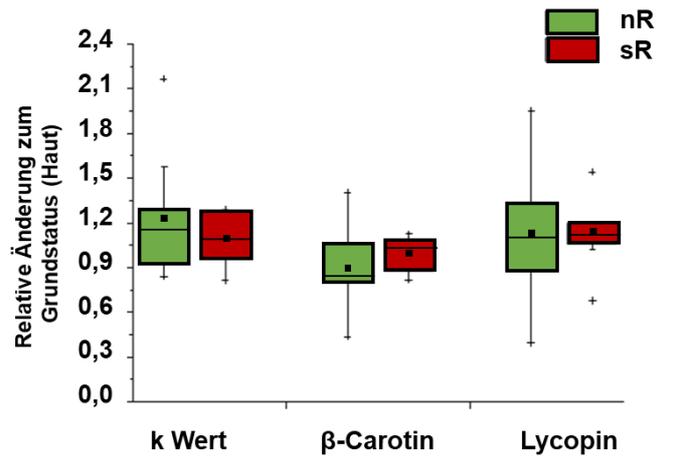


Abbildung 10: Einfluss von definiertem Zigarettenkonsum auf den kutanen AO-Status.

sR (n = 10) rauchten in einem Zeitintervall von 15 min 2 Zigaretten, während gleichzeitig nR (n = 10) 15 min an frischer Luft verbrachten. Bestimmung der radikalfangenden Eigenschaften (Ratenkonstante, k Wert) der Haut, durch die ESR-Spektroskopie; Messungen von β-Carotin und Lycopin in der Haut wurden mit der RRS durchgeführt.

6.2.2 in Blut

Die Analyse des Carotinoid-Levels von β-Carotin und Lycopin im Blutplasma von nR und sR zeigte eine signifikante Verringerung der Lycopinkonzentration für sR 4 h nach dem Zigarettenkonsum; für β-Carotin wurden keine Änderungen zum Grundstatus festgestellt (Abbildung 11).

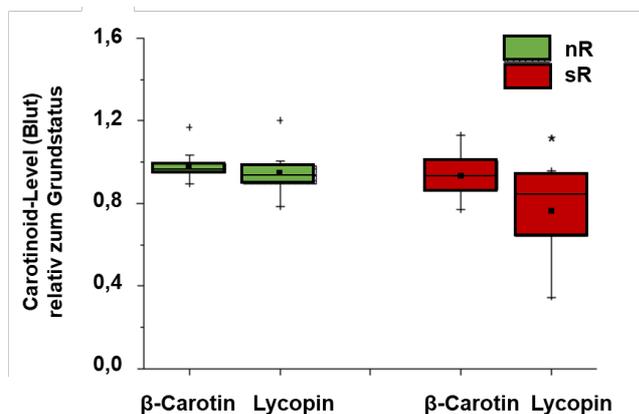


Abbildung 11: Einfluss von definiertem Zigarettenkonsum auf die Blutplasma-Konzentration der exogenen Antioxidantien β-Carotin und Lycopin, ermittelt mittels RRS.

sR (n = 10) rauchten in einem Zeitintervall von 15 min 2 Zigaretten, während gleichzeitig nR (n = 10) 15 min an frischer Luft verbrachten. Die Messungen wurden in Blutplasmaprobe durchgeführt, die 4 Stunden nach dem Zigaretten- (sR)/Luftkonsum (nR) entnommen wurden. Daten sind relativ zum antioxidativen Grundstatus (0 h) dargestellt. Boxplot-Diagramm mit Perzentilen 25 und 75, Median (schwarze Linie), Mittelwert (schwarzes Quadrat) und Ausreißern (schwarzes Kreuz), * p ≤ 0,05.

Während die GSH-Konzentration im Blutplasma 4 h nach Bestimmung des antioxidativen Grundstatus für nR stabil blieb, fiel die GSH-Konzentration von sR 4 h nach

Zigarettenkonsum um einen Faktor von ca. 10 signifikant zum Ausgangswert ab (Abbildung 12). Diese Daten zeigen einen aktiven Konsum des endogenen AO GSH, um dem durch den Tabakkonsum induzierten oxidativen Stress entgegenzuwirken.

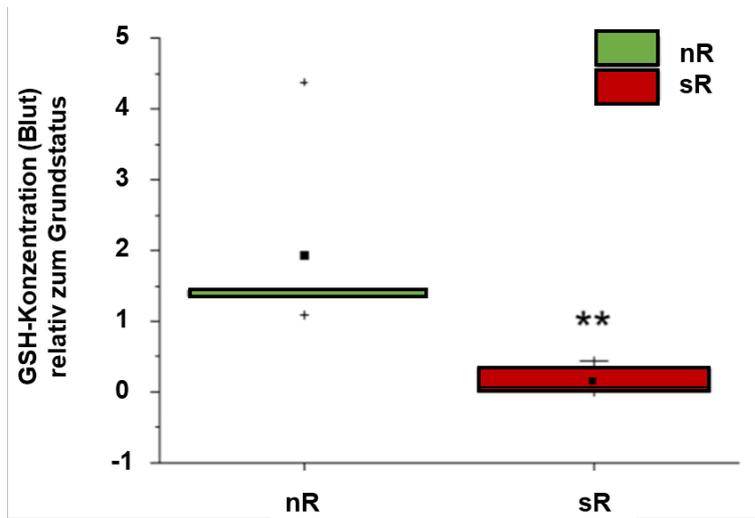


Abbildung 12: Einfluss von definiertem Zigarettenkonsum auf die Blutplasma-Konzentration des endogenen Antioxidans Glutathion (GSH), ermittelt mit einem fluoreszenz-basierten Assays. sR ($n = 10$) rauchten in einem Zeitintervall von 15 min 2 Zigaretten, während gleichzeitig nR ($n = 10$) 15 min an frischer Luft verbrachten. Die Messungen wurden in Blutplasmaproben durchgeführt, die 4 Stunden nach dem Zigaretten- (sR)/Luftkonsum (nR) entnommen wurden. Daten sind relativ zum antioxidativen Grundstatus (0 h) dargestellt. Boxplot-Diagramm mit Perzentilen 25 und 75, Median (schwarze Linie), Mittelwert (schwarzes Quadrat) und Ausreißern (schwarzes Kreuz), ** $p \leq 0,01$.

6.2.3 Untersuchung des Proteinlevels IL-22

Interleukin 22 gehört zur Klasse von hochwirksamen zellulären [Entzündungsmediatoren](#). Es initiiert insbesondere in [Epithelzellen](#) der [Atemwege](#) und des [Darms](#) die [angeborene Immunreaktion](#). IL-22 wurde ebenfalls 4 h nach der kontrollierten Rauchexposition (sR)/Luftexposition (nR) untersucht (Abbildung 13). Es zeigte sich bereits nach 4 h ein signifikanter Abfall zum IL-22 Grundstatus bei sR.

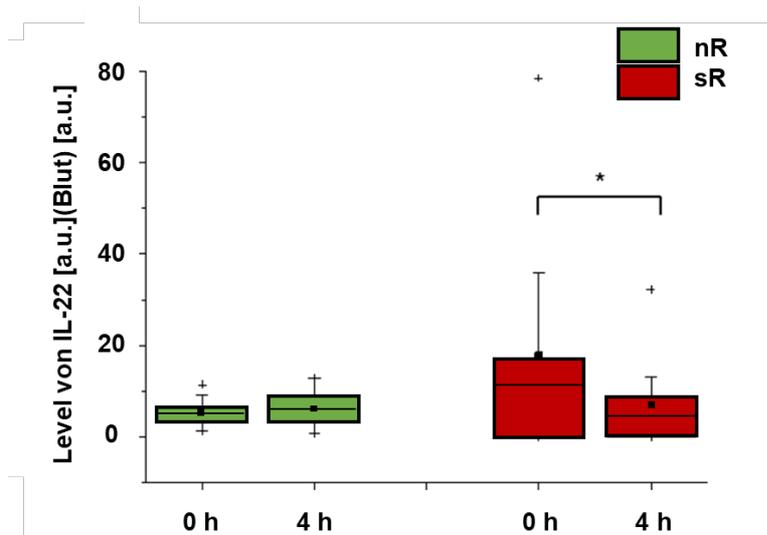


Abbildung 13: Einfluss von definiertem Zigarettenkonsum auf den IL-22-Blutplasmaspiegel. sR ($n = 10$) rauchten in einem Zeitintervall von 15 min 2 Zigaretten, während gleichzeitig nR ($n = 10$) 15 min an frischer Luft verbrachten. Die Messungen wurden in Blutserumproben durchgeführt, die vor (0 h) und 4 h nach dem Rauchen mittels ELISA ermittelt wurden. Boxplot-Diagramm mit Perzentilen 25 und 75, Median (schwarze Linie), Mittelwert (schwarzes Quadrat) und Ausreißern (schwarzes Kreuz), * $p \leq 0,05$.

6.2.4 Untersuchung der Genexpression von stressassoziierten Genen

In einer Pilotstudie wurde die Genexpression in periphere mononukleäre Blutzellen von stress-assoziierten Genen bei nR und sR untersucht. Hierbei war von Interesse, ob der exogene Faktor „Rauchen“ kurzfristige und langfristige Auswirkungen auf die Aktivierung von stressassoziierten Genen hat. Für diesen Zweck wurde der Grundstatus (0 h), sowie der Status 4 h nach definiertem Zigarettenkonsum/frischer Luft in einer Substudie mit je 5 Probanden aus den Gruppen der nR und sR analysiert.

Aus Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass die Gene NRF2, TALDO1 und SOD2 eine starke Genexpression aufweisen.

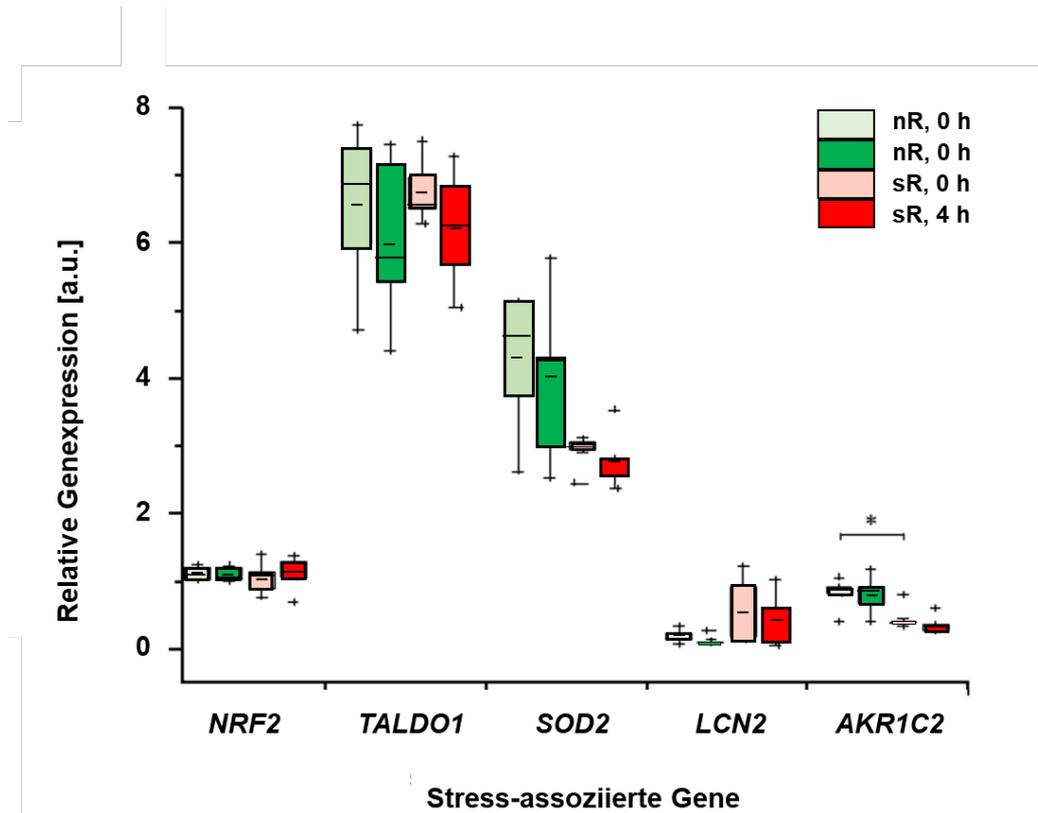


Abbildung 14: Vergleich des relativen Genexpressionsprofils [au] von oxidativen stress-assoziierten Genen (NRF2, TALDO1, SOD2, LCN2, AKR1C2) durch qRT-PCR-Analyse von nR und sR jeweils vor (0 h) und nach (4 h) definiertem Zigaretten- / Luftkonsum in mononukleären Blutzellen. Die Genexpressionsdaten sind relativ zum Housekeeping-Gen HPRT gezeigt. Boxplot-Diagramm mit Perzentilen 25 und 75, Median (schwarze Linie), Mittelwert (schwarzes Quadrat) und Ausreißern (schwarzes Kreuz), * $p \leq 0,05$.

Definierter Zigarettenkonsum hatte jedoch keine relevanten Auswirkungen auf die Genexpression. 4 h nach dem Zigarettenkonsum konnte lediglich für das Gen AKR1C2 ein signifikanter Rückgang der Genexpression für sR festgestellt werden. Das Gen LCN2 zeigte einen Trend zur Hochregulierung bei sR gegenüber nR, wobei hier keine Signifikanz zu verzeichnen war.

Wenn man alle Daten der Substudie miteinbezieht zeigt die Genexpression von AKR 1C2 einen Trend zur negativen Korrelation mit den Blutwerten von IL-22 (Spearman's correlation coefficient $r_s=0.63$, $p=0.062$).

7. Diskussion

Generell ist die Entstehung von freien Radikalen ein normaler Prozess im Körper, ausgelöst durch verschiedene Stoffwechselforgänge, insbesondere durch den Energiestoffwechsel. In einem physiologischen System ist normalerweise ein Gleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Prozessen vorhanden (Homöostase). Ein Ungleichgewicht zu Gunsten der pro-oxidativen Seite wird als oxidativer Stress bezeichnet, der durch verschiedene exogene und endogene Faktoren ausgelöst werden kann [19]. Zigarettenrauchen ist eine weit verbreitete Angewohnheit, durch welchen die Entstehung oxidativer Stress begünstigt wird [6, 9].

In dieser Arbeit wurde das AO-System zwischen Nichtrauchern und Rauchern unterschiedlichen Levels (mittelstarke und starke Raucher) miteinander im Allgemeinen (Grundstatus) und nach akuter Stressinduktion bei Rauchern verglichen.

Ein Vergleich des antioxidativen Grundstatus zwischen Nichtrauchern und Rauchern zeigt signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen (Abbildung 6, Abbildung 7, Abbildung 8, Abbildung 9). Die Untersuchungen mittels der Resonanz-Raman-Spektroskopie zeigen für Raucher niedrigere β -Carotin und Lycopin Werte (exogene Antioxidantien) gegenüber der Kontrollgruppe (Nichtraucher) in Haut (Abbildung 7). Die niedrigeren Carotinoidwerte bei Rauchern sind durch vorherige Studien bekannt und konnten ebenso in den Blutwerten der Probanden nachgewiesen werden (Abbildung 9). Rauchen fördert die Entstehung einer erhöhten Anzahl von freien Radikalen im Körper, die durch das AO-System reduziert werden [4]. Die niedrigen Carotinoid-Level für Raucher kommen durch den erhöhten Verbrauch dieser Antioxidantien zustande. Das exogene AO System korreliert negativ mit dem Zigarettenkonsum.

Frühere Studien konnten zeigen, dass kutane Carotinoide, welche zu der Gruppe der lipophilen Antioxidantien zählen, als Markersubstanz für die antioxidative Kapazität des Körpers angesehen werden können, unter der Voraussetzung das keine kurzfristigen Veränderungen des Lebensstils und eine ausgeglichene Ernährung vorhanden sind [77, 78].

Im Gegensatz zu den exogenen Antioxidantien, ist für das endogene Antioxidans Glutathion ein signifikanter Anstieg in der Haut bei Rauchern im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar (Abbildung 6B). GSH ist in den Zellen allgegenwärtig und stellt ein Antioxidans dar, welches initial zum Schutz gegenüber freien Radikalen zu Verfügung steht [79]. Die erhöhte GSH-Konzentration in der Haut von Rauchern verdeutlicht, dass die Haut sich an das gestiegene Aufkommen von freien Radikalen bei diesen Probanden anpasst. Dieses Phänomen konnte ebenfalls bei exponiertem Lungenepithel von Rauchern beobachtet werden [80, 81]. Dies lässt erste Rückschlüsse auf das endogene antioxidative System von

Rauchern zu und lässt vermuten, dass es eine körpereigene Anpassung bei Rauchern geben könnte. Des Weiteren lässt die gestiegene Radikalfängertätigkeit in der Haut (Ratenkonstante) bei Rauchern auf einen generell höheren antioxidativen Status der Haut schließen (Abbildung 6 A). Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, da dieses Verhalten bisher nur nach Zuführung von Antioxidantien festgestellt werden konnte [76]. In vorangegangenen Studien erhöhten sich die Carotinoid-Werte ebenfalls oder blieben auf dem gleichen Niveau, je nachdem wieviel Antioxidantien verabreicht wurden. Im Unterschied zu diesen Studien geben unsere Daten ein differenzierteres Bild bei Rauchern wieder, da das Level der kutanen Carotinoide (exogenes Antioxidans) und die Radikalfängertätigkeit (Ratenkonstante) durch das erhöhte GSH (endogenes Antioxidans) negativ miteinander korrelieren.

Die ESR-Spektroskopie, welche eine nicht invasive Methode darstellt, stellt eine effektive Methode dar, um den antioxidativen Status in der Haut (*in vivo/ ex vivo*) [62, 64, 66, 76] und in Zellkulturen [68-70] zu bestimmen. Die ESR Methode macht bestimmt die AO-Kapazität als Gesamtheit, obwohl die Empfindlichkeit zwischen verschiedenen Antioxidantien unterschiedlich ist. Das Tetraradikal TEMPO, welches in dieser Studie verwendet wurde, reagiert kaum mit Carotinoiden [82], jedoch sehr gut mit Vitamin C [65].

Die ESR-Ergebnisse zur Ratenkonstante lassen darauf schließen, dass das gestärkte antioxidative System (in unserer Studie durch GSH vertreten) die unerwartete hohe Ratenkonstante in der Haut bei Rauchern erklären könnte (Abbildung 6 A). Diese Annahme wurde durch die 1,5-fache Erhöhung der Ratenkonstante und des GSH-Levels in der Haut von Rauchern bestärkt. Die amphiphilen Eigenschaften von TEMPO ermöglichen es dem Tetraradikal in die Zelle einzudringen und hierdurch mit endogenen Antioxidantien zu reagieren [82]. Fuchs J et al. haben gezeigt, dass der TEMPO-Abfall in der Haut überwiegend mit der Reduktion durch AOs zusammenhängt, denn die Reoxidation mit dem Oxidationsmittel Kaliumferricyanid führte wieder zu einem 90%igen Anstieg des EPR-sichtbaren Nitroxids [83].

Die in dieser Studie erhaltenen Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass die Ratenkonstante in der Haut hauptsächlich durch lokale endogene Antioxidantien beeinflusst wird. Generell sollten somit immer zusätzliche Messungen von endogenen Antioxidantien bei kutanen Untersuchungen getätigt werden, um mögliche Diskrepanzen zwischen endogenen und exogenen Antioxidantien erklären zu können. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass TEMPO nicht nur mit Antioxidantien reagiert [84], d. h. eine Oxidation zum Oxoammonium-Kation ist möglich. Oxoammonium katalysiert Oxidationsreaktionen von organischen Verbindungen wie z. B. Alkoholen, was zur Bildung anderer stark oxidierender Substanzen

führt [85]. Bislang konnte eine solche Reaktion in der Haut jedoch nicht nachgewiesen werden.

Wie bereits oben erwähnt, lässt der Anstieg von kutanen endogenen Antioxidantien auf einen Adaptionsprozess bei Rauchern schließen. Diese Ergebnisse konnten in der Haut (Abbildung 6 B), jedoch nicht im Blut gezeigt werden (Abbildung 8), was sich durch die hohe Fluktuation der einzelnen Komponenten im Blut erklären lässt.

Bizon A et al. konnten zeigen, dass starke Raucher (>20 Zig./Tag) eine erhöhte GSH-Konzentration im Blut aufwiesen, während Nichtraucher und mittelstarke Raucher (<20 Zig./Tag) vergleichbare GSH-Konzentrationen zeigten [86]. Eine andere Studie unterstützte die Aussage der fehlenden Wirkung auf die GSH-Konzentration im Blut bei einem Zigarettenkonsum von unter 20 Zig./Tag [87].

Die Untersuchungen bezogen auf den Kurzzeiteffekt (4h) durch definierten Zigarettenkonsum bei Rauchern zeigten weder für die Carotin-Konzentrationen (Abbildung 10) noch für die Ratenkonstante in der Haut (Abbildung 10) Veränderungen zum Grundzustand. Dies stimmt mit den Ergebnissen früherer Studien überein, dass Supplementationen von Antioxidantien nicht zu einer sofortigen Änderung führen, sondern erst nach einer Zeit von etwa 2-8 Wochen eine kutane Veränderung im Carotinoid-Level bzw. in der Ratenkonstante messbar ist [65, 76].

Die Haut stellt eine Reservoirfunktion für Substanzen, die entweder topisch angewendet, systemisch zugeführt oder vom Körper selbst synthetisiert werden, dar [88, 89]. Im Gegensatz zur Haut, konnte im Blut ein signifikanter Rückgang der Lycopin- (Abbildung 11) und des-GSH-Levels (Abbildung 12) bei starken Rauchern 4h nach dem Zigarettenkonsum festgestellt werden. Im Unterschied zu dem Lycopin-Level im Blut, sank die β -Carotin-Konzentration (welche bereits bei starken Rauchern erniedrigt war) nicht weiter ab (Abbildung 11).

Unter den Carotinoiden ist Lycopin der effizienteste Fänger von Sauerstoffradikalen. Die Einfangrate ist zweimal so hoch wie die von β -Carotin und 10mal höher als von α -tocopherol (Vitamin E) [90]. Die Adaption der Haut an das Langzeitrauchen durch die Erhöhung des endogenen antioxidativen Levels könnte die schädlichen Effekte des Rauchens, wie vorzeitige Hautalterung, Hautkrebs, verringern.

Exogene Antioxidantien haben eine Vielzahl an Aufgaben im Körper und scheinen somit nicht ausreichend zu sein, um die komplette AO-Homöostase bei Rauchern aufrechtzuerhalten. Exogene Antioxidantien müssen kontinuierlich über die Nahrung aufgenommen werden. Der Transport bis in die Haut kann schnell erfolgen (Vitamin C durch aktiven Transport)[91] oder Stunden bis Tage dauern (für lipophile AO wie Carotinoide oder Vitamin E, die die Haut über Schweiß und Talg passieren) [92, 93]. Es sollte zudem beachtet werden, dass die lokale Erhöhung endogener Antioxidantien nicht die verfrühte Hautalterung

bei Rauchern verhindern kann [94, 95], aber eine gezielte Supplementation sich positiv auswirken kann.

Dennoch konnte in einer Krebspräventionsstudie gezeigt werden, dass eine übermäßige Dosierung von Vitaminen (exogene AOs) einen gegenteiligen Effekt auf den Stoffwechsel haben kann. Männliche Raucher, die mit hohen Dosen von Vitamin E und β -Carotin supplementiert wurden, zeigten keinen Schutz vor der Entwicklung von Lungenkrebs - im Gegenteil, die Tumorraten stiegen unerwartet an [96, 97]. Eine Übersichtsstudie von 2008 mit verschiedenen AOs ergab eine erhöhte Sterblichkeitsrate für Probanden, die Vitamin A supplementierten, während eine Vitamin-E-Supplementierung keinen Effekt hatte [98]. Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass eine Supplementierung mit AOs sowohl schädliche als auch nützliche Effekte auf den Metabolismus und die AO-Homöostase von Rauchern haben kann.

Bei der Beurteilung des Effektes des antioxidativen Status und des kontrollierten Zigarettenrauchens bei starken Rauchern bezogen auf die Genexpression von stressassoziierten Genen in Blutzellen, wiesen der Großteil der untersuchten Gene keine signifikanten Veränderungen auf (Abbildung 14). Der einzige signifikante Unterschied wurde für das Gen AKR 1C2 festgestellt, wobei der Grundstatus bei starken Rauchern interessanterweise sogar abgefallen war. Diese Daten schließen einen größeren systemischen oxidativen Stress bei starken Rauchern in Akutsituationen aus, unterstützen aber die langfristige kompensatorische Anpassung an permanentes Rauchen. AKR 1C2 gehört zur Familie der Aldo-Ketoreduktase 1 und wird bei akuter Aktivierung (durch oxidativen Stress) des Haupttranskriptionsfaktors NRF2 induziert. Die Aldo-Ketoreduktase Familie umfasst eine Gruppe von NAD(P)H-abhängiger Oxidoreduktasen die in dem Metabolismus von xenobiotischen Derivaten, wie beispielsweise in Tabak, der Entgiftung von reaktiven Lipidperoxiden und Aldehyden und in der Synthese von Antioxidantien sowie Zellschützender Substanzen wie Retinsäure involviert sind [61]. Im Unterschied zu Blutzellen werden AKR Gene, welche sich im exponierten Atemwegsepithel bei Rauchern befinden, hochreguliert [99]. Nach heutigen Kenntnissen existieren derzeit keine Daten über AKR 1C2 in Blutzellen bei Rauchern oder anderen Probandengruppen.

Ob die selektive Herunterregulierung der Immunzell-AKR1C2 Expression und ihre mögliche negative Korrelation mit dem IL-22-Level (Abbildung 13) nicht nur einen ausgeglichenen Langzeit-Oxidationszustand widerspiegelt, sondern die Eignung von AKR1C2 als Indikator für den AO-Status des Körpers, muss in weiteren, Studien untersucht werden, die auch Hautproben von Rauchern und Nichtrauchern einschließen sollten.

Interleukin-22 ist ein Mediator, der im Blut von Rauchern einen erhöhten Wert aufweist [100]. Dieser Trend konnte ebenfalls im Zusammenhang mit dem AKR 1C2 Level bei den untersuchten Probanden bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass definiertes Zigarettenrauchen zu einem zeitnahen (4h nach Zigarettenkonsum) Abfall von Interleukin-22 (Abbildung 13) führte. Interleukin-22 wird durch aktivierte spezifische T-Zellen und

lymphoiden Zellen des angeborenen Immunsystems im Gewebe produziert [101]. Die Funktion dieses protektiven Zytokins beinhaltet eine antimikrobielle, regenerative und antioxidative Wirkung auf das Epithel und die Leber [102-104]. Bisher sind die Regulationsmechanismen der Interleukinproduktion bei Rauchern nicht bekannt.

Man kann spekulieren, dass der kurzfristige Interleukin-22-Abfall durch rauchinduzierten akuten oxidativen Stress im Lungenepithelgewebe auf lokale Interleukin-22-Produzenten resultiert; dies muss jedoch in weiteren Studien untersucht werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden:

Das körpereigene AO-System der Haut passt sich bei starken Rauchern an und erfüllt eine Schutzfunktion, indem es sich auf mögliche negative Einflüsse durch die Noxe Zigarettenkonsum auf den Körper vorbereitet. Dieses wird in dieser Studie durch den signifikanten Anstieg des GSH-Levels gezeigt, welches das endogene AO-System repräsentiert. Die höhere Ratenkonstante bei Rauchern bestätigt, dass sich der Körper an die Noxe Zigarettenrauch anpasst und diesem entgegensteuert. Der Körper ist demnach bei starken Rauchern auf das erhöhte Stresslevel und die entstehenden Radikale vorbereitet und versucht diesen bestmöglich zu schützen. Dies heißt nicht, dass Rauchen dem Körper keinen Schaden zufügt; aber das die schädlichen Einflüsse so gut es geht minimiert werden. Diese Reaktion des Körpers beantwortet die Frage, ob sich das AO-System zwischen Rauchern und Nichtrauchern unterscheidet.

Bei der Beleuchtung des Unterschiedes zwischen dem Grundstatus von Rauchern und dem Status nach definiertem Zigarettenkonsum ergibt sich in der Haut kein signifikanter Unterschied. Im Blut hingegen ist eine signifikante Verringerung der Lycopin-konzentration (exogenes AO) und eine Verringerung der GSH-Konzentration (endogenes AO) im Vergleich zum Basiswert um den Faktor 10 zu erkennen. Hiermit wird das Entgegenwirken des Körpers gegenüber dem Stress und den freien Radikalen dargestellt. Um den direkten Einfluss des Rauchens zu ermitteln, ist somit das AO-System des Blutes aussagekräftiger als das der Haut.

Das endogene und exogene antioxidative Abwehrsystem bedingen sich gegenseitig und werden beide beim Abbau von oxidativem Stress beansprucht. Bei der Betrachtung dieser beiden Systeme wird deutlich, dass das Level der kutanen Carotinoide (exogenes AO) und die Radikalfängertätigkeit (Ratenkonstante) durch das erhöhte GSH (endogenes AO) negativ korrelieren. Das bedeutet, dass das endogene AO-System der Haut bei sR sich im Sinne einer Reservoirfunktion auf die ständig einwirkenden Noxen einstellt, während die exogenen AO welche schneller im Blut verfügbar sind verbraucht werden.

Bei dem Vergleich des Grundstatus von Rauchern gegenüber dem Status nach definiertem Rauchen zeigte sich in der Haut keinerlei Unterschied. Im Blut jedoch verringerte sich die Lycopinkonzentration signifikant. Die GSH-Konzentration verringerte sich sogar um den Faktor 10 im Vergleich zum Grundstatus. Somit wirkt das endogene sowie das exogene AO-System bei sR den entstehenden freien Radikalen nach definiertem Rauchen entgegen.

Um diese Anpassung und Schutzfunktion erfüllen zu können, benötigt der Körper Antioxidantien. Es konnte gezeigt werden, dass die Carotinoid-Werte in der Haut und im Blut in einem negativen Zusammenhang mit dem Rauchen von Zigaretten stehen und somit die exogen zugeführten Antioxidantien stark verbraucht werden. Da die zugeführten Antioxidantien über die Nahrung schneller im Blut verfügbar sind werden diese auch bevorzugt verbraucht. Dieses System funktioniert gut für den Körper, um kurzfristig und schnell auf schädliche Einflüsse zu reagieren.

Um eine dauerhafte Anpassung zu gewährleisten, unterscheidet sich wie oben bereits beschrieben das kutane AO System von Rauchern signifikant gegenüber dem von Nichtrauchern. Hierdurch zeigt sich die wichtige Rolle der Haut als AO-Reservoir. Dass das endogene AO- System stimuliert wird, wenn exogene Antioxidantien verbraucht werden, konnte in dieser Studie zum ersten Mal belegt werden.

Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass bei starken Rauchern eine Anpassung des endogenen AO- Systems besteht, um den Metabolismus vor oxidativen Stress besser schützen zu können. Hierbei spielt die Haut als Reservoir die eine wichtige Rolle.

Das endogene AO-System der starken Raucher ist gegenüber den Nichtrauchern stärker ausgeprägt und bis zu einem bestimmten Grad auf Stress vorprogrammiert, um diesen minimal zu halten. Dies bedeutet, dass bereits vor der Stresseinwirkung eine aktive Gegenregulierung zur Entstehung von oxidativem Stress durch eine erhöhte Grund-GSH-Konzentration bei starken Rauchern stattgefunden hat. Die erhöhte Ratenkonstante (ESR *in vivo*) bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern kann hierdurch erklärt werden. Dies bedeutet, dass Stress das endogene AO-Abwehrsystem des Körpers positiv beeinflussen kann.

Das wichtigste Ergebnis dieser Studie ist der Hinweis darauf, dass das endogene AO-Abwehrsystem des Körpers im Stande ist, sich gegenüber regelmäßig einwirkenden Noxen anzupassen.

Zukünftige Studien könnten sich mit der Fragestellung beschäftigen, bis zu welchem Grad sich das endogene AO-Abwehrsystem des Körpers positiv beeinflussen lassen kann und ab welcher Quantität sich dieses durch die regelmäßig zugeführte Noxe, hier Zigarettenrauch gegebenenfalls wieder negativ reguliert. Des Weiteren könnten weitere Studien mit einer größeren Probandenzahl die Ergebnisse dieser Studie untermauern.

Außerdem könnte erforscht werden, ob es einen Unterschied zwischen dem Rauchen von 2 Zigaretten oder beispielsweise 4 Zigaretten gibt. Weiterhin könnte der zeitliche Rahmen der Studie ausgedehnt werden und weitere Blutabnahmen in größeren Zeitabständen vorgenommen werden.

Die Analyse der Gene durch die Real-Time-PCR könnte bei einer größer angelegten Studie zu eindeutigeren und aufschlussreicheren Ergebnissen führen.

8. Literatur

- [1] G. Lofroth, Environmental tobacco smoke: overview of chemical composition and genotoxic components, *Mutat Res*, 222 (1989) 73-80.
- [2] Y. Inaba, K. Bekki, S. Uchiyama, N. Kunugita, Determination of harmful chemical compounds generated from heated tobacco products in Japan, *Tob Induc Dis*, 17 (2019) 27-28.
- [3] I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. Humans, Tobacco smoke and involuntary smoking, *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 83 (2004) 1-1438.
- [4] P.N. Kopa, R. Pawliczak, Effect of smoking on gene expression profile - overall mechanism, impact on respiratory system function, and reference to electronic cigarettes, *Toxicol Mech Method*, 28 (2018) 397-409.
- [5] I.O. Onor, D.L. Stirling, S.R. Williams, D. Bediako, A. Borghol, M.B. Harris, T.B. Darensburg, S.D. Clay, S.C. Okpechi, D.F. Sarpong, Clinical Effects of Cigarette Smoking: Epidemiologic Impact and Review of Pharmacotherapy Options, *Int J Environ Res Public Health*, 14 (2017).
- [6] S.P. Saha, D.K. Bhalla, T.F. Whyne, Jr., C. Gairola, Cigarette smoke and adverse health effects: An overview of research trends and future needs, *Int J Angiol*, 16 (2007) 77-83.
- [7] T. Lampert, E. von der Lippe, S. Muters, Prevalence of smoking in the adult population of Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1), *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 56 (2013) 802-808.
- [8] T. Yazdanparast, H. Hassanzadeh, S.A. Nasrollahi, S.M. Seyedmehdi, H. Jamaati, A. Naimian, M. Karimi, R. Roozbahani, A. Firooz, Cigarettes Smoking and Skin: A Comparison Study of the Biophysical Properties of Skin in Smokers and Non-Smokers, *Tanaffos*, 18 (2019) 163-168.
- [9] A. Ortiz, S.A. Grando, Smoking and the skin, *Int J Dermatol*, 51 (2012) 250-262.
- [10] A. Knuutinen, N. Kokkonen, J. Risteli, K. Vahakangas, M. Kallioinen, T. Salo, T. Sorsa, A. Oikarinen, Smoking affects collagen synthesis and extracellular matrix turnover in human skin, *Br J Dermatol*, 146 (2002) 588-594.
- [11] D. Model, Smoker's face: an underrated clinical sign?, *Br Med J (Clin Res Ed)*, 291 (1985) 1760-1762.
- [12] M.A. Gupta, A.K. Gupta, G.N. Watteel, Cigarette smoking in men may be a risk factor for increased severity of psoriasis of the extremities, *Brit J Dermatol*, 135 (1996) 859-860.
- [13] A. Nofal, I. Al-Makhzangy, E. Attwa, A. Nassar, A. Abdalmoati, Vascular endothelial growth factor in psoriasis: an indicator of disease severity and control, *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 23 (2009) 803-806.
- [14] C.M. Chuong, B.J. Nickoloff, P.M. Elias, L.A. Goldsmith, E. Macher, P.A. Maderson, J.P. Sundberg, H. Tagami, P.M. Plonka, K. Thestrup-Pederson, B.A. Bernard, J.M. Schroder, P. Dotto, C.M. Chang, M.L. Williams, K.R. Feingold, L.E. King, A.M. Kligman, J.L. Rees, E. Christophers, What is the 'true' function of skin?, *Exp Dermatol*, 11 (2002) 159-187.
- [15] R. Marks, The stratum corneum barrier: the final frontier, *J Nutr*, 134 (2004) 2017S-2021S.
- [16] A. A., S. N., G. P., M. S., R. V, Influence of Exogenous Factors on Skin Aging., In: Farage M., Miller K., Maibach H. (eds) *Textbook of Aging Skin*. Springer, Berlin, Heidelberg., (2017).
- [17] H. Sies, Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *Exp Physiol*, 82 (1997) 291-295.
- [18] I. Liguori, G. Russo, F. Curcio, G. Bulli, L. Aran, D. Della-Morte, G. Gargiulo, G. Testa, F. Cacciatore, D. Bonaduce, P. Abete, Oxidative stress, aging, and diseases, *Clin Interv Aging*, 13 (2018) 757-772.
- [19] G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta, G. Pallio, F. Mannino, V. Arcoraci, F. Squadrito, D. Altavilla, A. Bitto, Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health, *Oxid Med Cell Longev*, 2017 (2017) 8416763.
- [20] S. Di Meo, T.T. Reed, P. Venditti, V.M. Victor, Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions, *Oxid Med Cell Longev*, 2016 (2016) 1245049.
- [21] W. Domej, K. Oettl, W. Renner, Oxidative stress and free radicals in COPD--implications and relevance for treatment, *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 9 (2014) 1207-1224.

- [22] P.J. Barnes, Defective antioxidant gene regulation in COPD: a case for broccoli, *Am J Respir Crit Care Med*, 178 (2008) 552-554.
- [23] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, *Pharmacogn Rev*, 4 (2010) 118-126.
- [24] M. Liu, F. Chen, T. Liu, F. Chen, S. Liu, J. Yang, The role of oxidative stress in influenza virus infection, *Microbes Infect*, 19 (2017) 580-586.
- [25] S.B. Nimse, D. Pal, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms, *Rsc Adv*, 5 (2015) 27986-28006.
- [26] T.G. Truscott, Synergistic effects of antioxidant vitamins, *Bibl Nutr Dieta*, (2001) 68-79.
- [27] W.L. Stone, T. Pham, S.S. Mohiuddin, *Biochemistry, Antioxidants*, in: StatPearls, Treasure Island (FL), 2020.
- [28] A. Siomek, NF-kappaB signaling pathway and free radical impact, *Acta Biochim Pol*, 59 (2012) 323-331.
- [29] J. Bienertova-Vasku, P. Lenart, M. Scheringer, Eustress and Distress: Neither Good Nor Bad, but Rather the Same?, *Bioessays*, 42 (2020) e1900238.
- [30] A. Morita, Tobacco smoke causes premature skin aging, *J Dermatol Sci*, 48 (2007) 169-175.
- [31] U. Wollina, Smoking and the Skin, *Skinmed*, 15 (2017) 197-202.
- [32] S.F. Thomsen, L.T. Sorensen, Smoking and skin disease, *Skin Therapy Lett*, 15 (2010) 4-7.
- [33] M. Dietrich, G. Block, N.L. Benowitz, J.D. Morrow, M. Hudes, P. Jacob, 3rd, E.P. Norkus, L. Packer, Vitamin C supplementation decreases oxidative stress biomarker f2-isoprostanes in plasma of nonsmokers exposed to environmental tobacco smoke, *Nutr Cancer*, 45 (2003) 176-184.
- [34] C.K. Chow, Cigarette smoking and oxidative damage in the lung, *Ann N Y Acad Sci*, 686 (1993) 289-298.
- [35] M. Eggersdorfer, A. Wyss, Carotenoids in human nutrition and health, *Arch Biochem Biophys*, 652 (2018) 18-26.
- [36] M.E. Darvin, I. Gersonde, M. Meinke, W. Sterry, J. Lademann, Non-invasive in vivo determination of the carotenoids beta-carotene and lycopene concentrations in the human skin using the Raman spectroscopic method, *J Phys D Appl Phys*, 38 (2005) 2696-2700.
- [37] M.C. Meinke, S. Schanzer, S.B. Lohan, I. Shchatsinin, M.E. Darvin, H. Vollert, B. Magnussen, W. Kocher, J. Helfmann, J. Lademann, 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*, 21 (2016) 107002.
- [38] S.C. Lu, Glutathione synthesis, *Biochim Biophys Acta*, 1830 (2013) 3143-3153.
- [39] J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker, R. Deutzmann, *Duale Reihe Biochemie*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, (2008).
- [40] N. Volz, Beeinflussung ARE-regulierter Phase-II-Enzyme durch Kaffee und ausgewählte Inhaltsstoffe., *Dissertation*, (2010) 1-244.
- [41] C.J. Harvey, R.K. Thimmulappa, A. Singh, D.J. Blake, G. Ling, N. Wakabayashi, J. Fujii, A. Myers, S. Biswal, Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress, *Free Radic Biol Med*, 46 (2009) 443-453.
- [42] S. Vomund, A. Schafer, M.J. Parnham, B. Brune, A. von Knethen, Nrf2, the Master Regulator of Anti-Oxidative Responses, *Int J Mol Sci*, 18 (2017).
- [43] R.G. Allen, M. Tresini, Oxidative stress and gene regulation, *Free Radic Biol Med*, 28 (2000) 463-499.
- [44] B. Fazeli, H. Rafatpanah, H. Ravari, R.F. Hosseini, S.A. Rezaee, Investigation of the expression of mediators of neovascularization from mononuclear leukocytes in thromboangiitis obliterans, *Vascular*, 22 (2014) 174-180.
- [45] E. Mortaz, I.M. Adcock, K. Ito, A.D. Kraneveld, F.P. Nijkamp, G. Folkerts, Cigarette smoke induces CXCL8 production by human neutrophils via activation of TLR9 receptor, *Eur Respir J*, 36 (2010) 1143-1154.
- [46] Y. Liu, A. Li, X.L. Feng, X.Y. Jiang, X. Sun, W.Z. Huang, X.S. Zhu, Z.X. Zhao, L-Menthol alleviates cigarette smoke extract induced lung injury in rats by inhibiting oxidative stress and inflammation via nuclear factor kappa B, p38 MAPK and Nrf2 signalling pathways, *Rsc Adv*, 8 (2018) 9353-9363.

- [47] M. Schafer, S. Dutsch, U. auf dem Keller, F. Navid, A. Schwarz, D.A. Johnson, J.A. Johnson, S. Werner, Nrf2 establishes a glutathione-mediated gradient of UVB cytoprotection in the epidermis, *Genes Dev*, 24 (2010) 1045-1058.
- [48] M.S. Piao, J.J. Park, J.Y. Choi, D.H. Lee, S.J. Yun, J.B. Lee, S.C. Lee, Nrf2-dependent and Nrf2-independent induction of phase 2 detoxifying and antioxidant enzymes during keratinocyte differentiation, *Arch Dermatol Res*, 304 (2012) 387-395.
- [49] F.V. Francisqueti-Ferron, A.J.T. Ferron, J.L. Garcia, C. Silva, M.R. Costa, C.S. Gregolin, F. Moreto, A.L.A. Ferreira, I.O. Minatel, C.R. Correa, Basic Concepts on the Role of Nuclear Factor Erythroid-Derived 2-Like 2 (Nrf2) in Age-Related Diseases, *Int J Mol Sci*, 20 (2019).
- [50] M. McMahon, K. Itoh, M. Yamamoto, J.D. Hayes, Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression, *J Biol Chem*, 278 (2003) 21592-21600.
- [51] Y. Morimitsu, Y. Nakagawa, K. Hayashi, H. Fujii, T. Kumagai, Y. Nakamura, T. Osawa, F. Horio, K. Itoh, K. Iida, M. Yamamoto, K. Uchida, A sulforaphane analogue that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway, *J Biol Chem*, 277 (2002) 3456-3463.
- [52] D. Malhotra, R. Thimmulappa, A. Navas-Acien, A. Sandford, M. Elliott, A. Singh, L. Chen, X. Zhuang, J. Hogg, P. Pare, R.M. Tuder, S. Biswal, Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1, *Am J Respir Crit Care Med*, 178 (2008) 592-604.
- [53] T.W. Kensler, N. Wakabayashi, S. Biswal, Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47 (2007) 89-116.
- [54] W.S. Jeong, M. Jun, A.N. Kong, Nrf2: a potential molecular target for cancer chemoprevention by natural compounds, *Antioxid Redox Signal*, 8 (2006) 99-106.
- [55] Q. Ma, Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53 (2013) 401-426.
- [56] S. Pierrou, P. Broberg, R.A. O'Donnell, K. Pawlowski, R. Virtala, E. Lindqvist, A. Richter, S.J. Wilson, G. Angco, S. Moller, H. Bergstrand, W. Koopmann, E. Wieslander, P.E. Stromstedt, S.T. Holgate, D.E. Davies, J. Lund, R. Djukanovic, Expression of genes involved in oxidative stress responses in airway epithelial cells of smokers with chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med*, 175 (2007) 577-586.
- [57] L. Constantino, R.C. Goncalves, V.R. Giombelli, C.D. Tomasi, F. Vuolo, L.W. Kist, G.M. de Oliveira, M.A. Pasquali, M.R. Bogó, T. Mauad, A. Horn, Jr., K.V. Melo, C. Fernandes, J.C. Moreira, C. Ritter, F. Dal-Pizzol, Regulation of lung oxidative damage by endogenous superoxide dismutase in sepsis, *Intensive Care Med Exp*, 2 (2014) 17.
- [58] R.H. Hubner, J.D. Schwartz, B.P. De, B. Ferris, L. Omberg, J.G. Mezey, N.R. Hackett, R.G. Crystal, Coordinate Control of Expression of Nrf2-Modulated Genes in the Human Small Airway Epithelium Is Highly Responsive to Cigarette Smoking, *Mol Med*, 15 (2009) 203-219.
- [59] M.H. Roudkenar, Y. Kuwahara, T. Baba, A.M. Roushandeh, S. Ebishima, S. Abe, Y. Ohkubo, M. Fukumoto, Oxidative stress induced lipocalin 2 gene expression: addressing its expression under the harmful conditions, *J Radiat Res*, 48 (2007) 39-44.
- [60] V. Abella, M. Scotece, J. Conde, R. Gomez, A. Lois, J. Pino, J.J. Gomez-Reino, F. Lago, A. Mobasher, O. Gualillo, The potential of lipocalin-2/NGAL as biomarker for inflammatory and metabolic diseases, *Biomarkers*, 20 (2015) 565-571.
- [61] T.M. Penning, Aldo-Keto Reductase Regulation by the Nrf2 System: Implications for Stress Response, Chemotherapy Drug Resistance, and Carcinogenesis, *Chem Res Toxicol*, 30 (2017) 162-176.
- [62] S.B. Lohan, R. Muller, S. Albrecht, K. Mink, K. Tschersch, F. Ismaeel, J. Lademann, S. Rohn, M.C. Meinke, Free radicals induced by sunlight in different spectral regions - in vivo versus ex vivo study, *Exp Dermatol*, 25 (2016) 380-385.
- [63] S. Albrecht, S. Jung, R. Muller, J. Lademann, T. Zuberbier, L. Zastrow, C. Reble, I. Beckers, M.C. Meinke, Skin type differences in solar-simulated radiation-induced oxidative stress, *Br J Dermatol*, 180 (2019) 597-603.
- [64] I. Megow, M.E. Darvin, M.C. Meinke, J. Lademann, A Randomized Controlled Trial of Green Tea Beverages on the in vivo Radical Scavenging Activity in Human Skin, *Skin Pharmacol Physiol*, 30 (2017) 225-233.
- [65] A.C. Lauer, N. Groth, S.F. Haag, M.E. Darvin, J. Lademann, M.C. Meinke, Dose-dependent vitamin C uptake and radical scavenging activity in human skin measured with in

- vivo electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Skin Pharmacol Physiol*, 26 (2013) 147-154.
- [66] S.B. Lohan, D. Ivanov, N. Schuler, B. Berger, L. Zastrow, J. Lademann, M.C. Meinke, Switching from healthy to unhealthy oxidative stress - does the radical type can be used as an indicator?, *Free Radic Biol Med*, (2020).
- [67] C. Souza, P. Maia Campos, S. Schanzer, S. Albrecht, S.B. Lohan, J. Lademann, M.E. Darvin, M.C. Meinke, Radical-Scavenging Activity of a Sunscreen Enriched by Antioxidants Providing Protection in the Whole Solar Spectral Range, *Skin Pharmacol Physiol*, 30 (2017) 81-89.
- [68] S.B. Lohan, K. Vitt, P. Scholz, C.M. Keck, M.C. Meinke, ROS production and glutathione response in keratinocytes after application of beta-carotene and VIS/NIR irradiation, *Chem Biol Interact*, 280 (2018) 1-7.
- [69] S.B. Lohan, S. Bauersachs, S. Ahlberg, N. Baisaeng, C.M. Keck, R.H. Muller, E. Witte, K. Wolk, S. Hackbarth, B. Roder, J. Lademann, M.C. Meinke, Ultra-small lipid nanoparticles promote the penetration of coenzyme Q10 in skin cells and counteract oxidative stress, *Eur J Pharm Biopharm*, 89 (2015) 201-207.
- [70] S.B. Lohan, S. Ahlberg, A. Mensch, D. Hoppe, M. Giulbudagian, M. Calderon, S. Grether-Beck, J. Krutmann, J. Lademann, M.C. Meinke, EPR Technology as Sensitive Method for Oxidative Stress Detection in Primary and Secondary Keratinocytes Induced by Two Selected Nanoparticles, *Cell Biochem Biophys*, 75 (2017) 359-367.
- [71] G. Jeschke, Einführung in die ESR-Spektroskopie-, Vorlesungs-Skript, (2006) 1-245.
- [72] B. Robert, Resonance Raman spectroscopy, *Photosynth Res*, 101 (2009) 147-155.
- [73] M.C. Meinke, A. Friedrich, K. Tscherch, S.F. Haag, M.E. Darvin, H. Vollert, N. Groth, J. Lademann, S. Rohn, Influence of dietary carotenoids on radical scavenging capacity of the skin and skin lipids, *Eur J Pharm Biopharm*, 84 (2013) 365-373.
- [74] J. Lademann, S. Schanzer, M. Meinke, W. Sterry, M.E. Darvin, Interaction between Carotenoids and Free Radicals in Human Skin, *Skin Pharmacol Phys*, 24 (2011) 238-244.
- [75] M.E. Darvin, I. Gersonde, S. Ey, N.N. Brandt, H. Albrecht, S.A. Gonchukov, W. Sterry, J. Lademann, Noninvasive detection of beta-carotene and lycopene in human skin using Raman spectroscopy, *Laser Phys*, 14 (2004) 231-233.
- [76] A.C. Lauer, N. Groth, S.F. Haag, M.E. Darvin, J. Lademann, M.C. Meinke, Radical scavenging capacity in human skin before and after vitamin C uptake: an in vivo feasibility study using electron paramagnetic resonance spectroscopy, *J Invest Dermatol*, 133 (2013) 1102-1104.
- [77] M.C. Meinke, A.C. Lauer, B. Taskoparan, I. Gersonde, J. Lademann, M.E. Darvin, Influence on the Carotenoid Levels of Skin Arising from Age, Gender, Body Mass Index in Smoking/ Non-Smoking Individuals., *Free Radic. Antioi.*, 1 (2011) 15-20.
- [78] J. Lademann, W. Kocher, R. Yu, M.C. Meinke, B. Na Lee, S. Jung, W. Sterry, M.E. Darvin, Cutaneous carotenoids: the mirror of lifestyle?, *Skin Pharmacol Physiol*, 27 (2014) 201.
- [79] R. Franco, J.A. Cidlowski, Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant, *Cell Death Differ*, 16 (2009) 1303-1314.
- [80] D.E. Laaksonen, M. Atalay, L. Niskanen, M. Uusitupa, O. Hanninen, C.K. Sen, Blood glutathione homeostasis as a determinant of resting and exercise-induced oxidative stress in young men, *Redox Rep*, 4 (1999) 53-59.
- [81] A.S. Elokda, D.H. Nielsen, Effects of exercise training on the glutathione antioxidant system, *Eur J Cardiovasc Prev R*, 14 (2007) 630-637.
- [82] J. Fuchs, N. Groth, T. Herrling, G. Zimmer, Electron paramagnetic resonance studies on nitroxide radical 2,2,5,5-tetramethyl-4-piperidin-1-oxyl (TEMPO) redox reactions in human skin, *Free Radical Bio Med*, 22 (1997) 967-976.
- [83] J. Fuchs, H.J. Freisleben, M. Podda, G. Zimmer, R. Milbradt, L. Packer, Nitroxide Radical Biostability in Skin, *Free Radical Bio Med*, 15 (1993) 415-423.
- [84] G. Bacic, A. Pavicevic, F. Peyrot, In vivo evaluation of different alterations of redox status by studying pharmacokinetics of nitroxides using magnetic resonance techniques, *Redox Biol*, 8 (2016) 226-242.
- [85] J.E. Nutting, M. Rafiee, S.S. Stahl, Tetramethylpiperidine N-Oxyl (TEMPO), Phthalimide N-Oxyl (PINO), and Related N-Oxyl Species: Electrochemical Properties and Their Use in Electrocatalytic Reactions, *Chem Rev*, 118 (2018) 4834-4885.

- [86] A. Bizon, H. Milnerowicz, [Effect of tobacco smoking on glutathione concentration in the blood], *Przegl Lek*, 69 (2012) 809-811.
- [87] N. Garg, R. Singh, J. Dixit, A. Jain, V. Tewari, Levels of lipid peroxides and antioxidants in smokers and nonsmokers, *J Periodontal Res*, 41 (2006) 405-410.
- [88] A. Teichmann, U. Jacobi, H.J. Weigmann, W. Sterry, J. Lademann, Reservoir function of the stratum corneum: development of an in vivo method to quantitatively determine the stratum corneum reservoir for topically applied substances, *Skin Pharmacol Physiol*, 18 (2005) 75-80.
- [89] P.K. Farris, Y. Krol, Understanding the Factors that Deteriorate Human Skin and Clinical Efficacy of Topical Antioxidants in Treating Aging Skin., *Cosmetics*, 2 (2015) 355-367.
- [90] P. Di Mascio, S. Kaiser, H. Sies, Lycopene as the Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 274 (1989) 532-538.
- [91] J.X. Wilson, Regulation of vitamin C transport, *Annu Rev Nutr*, 25 (2005) 105-125.
- [92] M.J. Rein, M. Renouf, C. Cruz-Hernandez, L. Actis-Goretta, S.K. Thakkar, M. da Silva Pinto, Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy, *Br J Clin Pharmacol*, 75 (2013) 588-602.
- [93] M.E. Darvin, W. Sterry, J. Lademann, T. Vergou, The Role of Carotenoids in Human Skin, *Molecules*, 16 (2011) 10491-10506.
- [94] A. Vierkotter, J. Krutmann, Environmental influences on skin aging and ethnic-specific manifestations, *Dermatoendocrinol*, 4 (2012) 227-231.
- [95] A. Morita, K. Torii, A. Maeda, Y. Yamaguchi, Molecular basis of tobacco smoke-induced premature skin aging, *J Invest Dermatol Symp Proc*, 14 (2009) 53-55.
- [96] N. Malila, P.R. Taylor, M.J. Virtanen, P. Korhonen, J.K. Huttunen, D. Albanes, J. Virtamo, Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on gastric cancer incidence in male smokers (ATBC Study, Finland), *Cancer Causes Control*, 13 (2002) 617-623.
- [97] D. Albanes, O.P. Heinonen, P.R. Taylor, J. Virtamo, B.K. Edwards, M. Rautalahti, A.M. Hartman, J. Palmgren, L.S. Freedman, J. Haapakoski, M.J. Barrett, P. Pietinen, N. Malila, E. Tala, K. Liippo, E.R. Salomaa, J.A. Tangrea, L. Teppo, F.B. Askin, E. Taskinen, Y. Erozan, P. Greenwald, J.K. Huttunen, Alpha-Tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: effects of base-line characteristics and study compliance, *J Natl Cancer Inst*, 88 (1996) 1560-1570.
- [98] A. Bardia, I.M. Tleyjeh, J.R. Cerhan, A.K. Sood, P.J. Limburg, P.J. Erwin, V.M. Montori, Efficacy of antioxidant supplementation in reducing primary cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis, *Mayo Clin Proc*, 83 (2008) 23-34.
- [99] N.R. Hackett, A. Heguy, B.G. Harvey, T.P. O'Connor, K. Luettich, D.B. Flieder, R. Kaplan, R.G. Crystal, Variability of antioxidant-related gene expression in the airway epithelium of cigarette smokers, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 29 (2003) 331-343.
- [100] L. Zhang, Z. Cheng, W. Liu, K. Wu, Expression of interleukin (IL)-10, IL-17A and IL-22 in serum and sputum of stable chronic obstructive pulmonary disease patients, *COPD*, 10 (2013) 459-465.
- [101] R. Sabat, W. Ouyang, K. Wolk, Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system, *Nat Rev Drug Discov*, 13 (2014) 21-38.
- [102] K. Wolk, S. Kunz, E. Witte, M. Friedrich, K. Asadullah, R. Sabat, IL-22 increases the innate immunity of tissues, *Immunity*, 21 (2004) 241-254.
- [103] S. Radaeva, R. Sun, H.N. Pan, F. Hong, B. Gao, Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation, *Hepatology*, 39 (2004) 1332-1342.
- [104] S.H. Ki, O. Park, M. Zheng, O. Morales-Ibanez, J.K. Kolls, R. Bataller, B. Gao, Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3, *Hepatology*, 52 (2010) 1291-1300.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Karl Bühring, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss von Zigarettenkonsum auf das antioxidative Abwehrsystem des Körpers, sowie die Interaktion mit exogenen Antioxidantien bei gleichzeitiger Untersuchung von Genveränderungen“/ “Influence of cigarette consumption on the body's antioxidant defense system, and interaction with exogenous antioxidants with simultaneous study of gene alterations“ 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.“

09.04.2021

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Publikation 1:

S.B. Lohan, K. Buhning, A.C. Lauer, A. Friedrich, J. Lademann, A. Buss, R. Sabat, K. Wolk, M.C. Meinke, Analysis of the Status of the Cutaneous Endogenous and Exogenous Antioxidative System of Smokers and the Short-Term Effect of Defined Smoking Thereon, Antioxidants (Basel), 9 (6), 537 (2020).

Beitrag im Einzelnen: Probandenrekrutierung, praktische Durchführung der Testungen, vollständige Erhebung der Primärdaten bis auf die genetischen Analysen, digitale Datenerfassung, Vorbereitung der Datensätze für die Statistik und Unterstützung beim Schreiben des Manuskripts.

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Publikation

S.B. Lohan, K. Buhning, A.C. Lauer, A. Friedrich, J. Lademann, A. Buss, R. Sabat, K. Wolk, M.C. Meinke

Analysis of the Status of the Cutaneous Endogenous and Exogenous Antioxidative System of Smokers and the Short-Term Effect of Defined Smoking Thereon, *Antioxidants (Basel)*, 9 (6), 537 (2020)

Danksagung

Mein großer Dank gilt Frau Prof. Dr. Meinke für die Möglichkeit an der Charité in ihrer Fachabteilung promovieren zu dürfen und für die überaus nette Betreuung meiner Dissertation.

Herzlich danken möchte ich Frau Dr. Silke Lohan für Ihre tatkräftige Unterstützung während der gesamten Dauer meiner Arbeit. Ohne Ihre Expertise und psychologischen Support hätte ich diese Promotion nicht vollenden können.

Für die gute Betreuung und den unterstützenden Teamgeist möchte ich auch der kompletten Abteilung rund um Herrn Prof. Jürgen Lademann herzlich danken.

Weiterhin gilt mein Dank dem Team um Frau Prof. Wolk, welches wichtige Arbeit für den Inhalt meiner Dissertation auf sich genommen hat.

Meinen Eltern und Großeltern danke ich von ganzem Herzen für die Möglichkeit dieser Promotion. Sie haben den Grundstein dafür gelegt mir diese Arbeit zu ermöglichen und haben mich auf meinem gesamten Lebensweg mit viel Liebe und Fürsorge unterstützt.