Aus dem Institut für Veterinärpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
sowie der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Charité Universitätsmedizin Berlin

Beurteilung der Auswirkung äußerer Noxen auf das antioxidative Potential der Haut durch spektroskopische Messungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Anne Christina Bechtel
Tierärztin
aus Heidelberg

Berlin 2014
Journal-Nr. 3565

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. R. Rudolph
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Dr.-Ing. J. Lademann
Dritter Gutachter:	PD Dr. C. Gabler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
skin, radicals, cows, man, pigs, animal models, antioxidants, katalase, spectroscopy

Tag der Promotion: 04.05.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-635-7
Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2014
Dissertation, Freie Universität Berlin
D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.
Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.
No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved
© Mensch und Buch Verlag 2015
Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

1. EINLEITUNG 1

2. LITERATURÜBERSICHT 4

2.1. Das Integumentum commune 4
2.1.1. Die Funktion der Haut 4
2.1.2. Der Aufbau der Haut 4
2.1.2.1. Epidermis 5
2.1.2.2. Dermis 7
2.1.2.3. Subcutis 8
2.1.2.4. Haut des Rindes (Euter) 8
2.1.2.5. Haut des Schweins (Ohr) 9

2.2. Das antioxidative Potential der Haut des Menschen 9
2.2.1. Grundlagen 9
2.2.2. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativer Stress 10

2.3. Carotinoide 10
2.3.1. Generelle Stoffeigenschaften und Wirkungen 11
2.3.2. β-Carotin 13
2.3.3. Lycopin 14

2.4. Raman-spektroskopische Grundlagen 14
2.4.1. Physikalische Grundlagen der Raman-Spektroskopie 15
2.4.2. Absorptionsspektren der Carotinoide 20

2.5. Katalase 21

3. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT 23

4. MATERIAL UND METHODEN 24

4.1. Freiwillige ProbandInnen 24

4.2. Raman-Spektroskopie 25
4.2.1. Absorptionseigenschaften von Carotinoiden 25
4.2.2. Vorbereitung der Haut 26
4.2.2.1. Euterhaut 26
4.2.2.2. Haut des Menschen 26
4.2.3. Experimenteller Aufbau 27
4.2.4. UV-Bestrahlung 28
4.2.5. Ablauf der Messung 28

4.3. Katalase-Aktivität 28
4.3.1. Vorbereitung der Haut 28
4.3.1.1. Euterhaut 28
4.3.1.2. Schweineohrhaut 29
4.3.1.3. Haut des Menschen 29
4.3.2. Messung der Katalase-Aktivität mit Hilfe der Abrissmethode 29
4.3.2.1. Tape Strip-Abrisse 29
4.3.2.2. UV/VIS-Messungen 31
4.3.2.3. Bestimmung des Proteingehaltes 31
4.3.2.4. Messung der Katalase-Aktivität 31

4.4. Transkutane Sauerstoffmessung 33

4.4.1. Vorbereitung der Haut ... 33
4.4.2. Messprinzip und Ablauf der Messung ... 33

4.5. Statistikprogramme ... 34

5. ERGEBNISSE ... 35

5.1. Messungen der Carotinoide mittels Raman-Spektroskopie ... 35
5.1.1. Messungen am exzidierten Kuheuter ... 35
5.1.2. Messungen an der Haut des Menschen ... 38

5.2. Messungen der Katalase-Konzentration in der Haut ... 47
5.2.1. Messungen an der Haut des Menschen ... 47
5.2.2. Messungen am Kuheuter ... 54
5.2.3. Messungen am Schweineohr ... 57

5.3. Messungen des transkutanen Sauerstoffs ... 60

6. DISKUSSION ... 63

6.1. Raman-spektroskopische Messungen und der Nachweis der Carotinoide ... 63
6.1.1. Diskussion der Messergebnisse ... 65

6.2. Tape-Strip-Abrisse und der Nachweis des Enzyms Katalase ... 67
6.2.1. Untersuchungen an der Haut des Menschen ... 67
6.2.2. Untersuchungen an exzidiertem Kuheuter und Schweineohr ... 69

6.3. Messungen des Sauerstoffgehaltes in der Haut ... 69

6.4. Zusammenführung und Vergleich der unterschiedlichen Messungen ... 70

7. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE ... 72

8. SUMMARY ... 74

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ... 76

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS ... 78

III. TABELLENVERZEICHNIS ... 80

IV. LITERATURVERZEICHNIS ... 81

V. DANKSAGUNG ... 87

VI. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG ... 88

1. Einleitung

Der Organismus des Menschen hat im Laufe der Evolution mannigfaltige Abwehrmechanismen gegen Einflüsse aus der Umwelt entwickelt. Eine der wichtigsten Reaktionsketten dieser Art ist die Neutralisation freier Radikale (ROS/ reactive oxygen species). Diese hoch reaktiven Substanzen entstehen durch metabolische Prozesse, durch Umwelteinflüsse, im Zuge von Entzündungsprozessen und durch Bestrahlung mit energiereicher Strahlung im Körper des Menschen. Es handelt sich um Moleküle mit einem ungepaarten Elektron, was ihre hohe oxidative Kapazität erklärt. Diese Fähigkeit bewirkt eine sofortige Reaktion mit den umgebenden Strukturen, wie zum Beispiel DNA oder Lipiden in Zellmembranen. Der Metabolismus führt permanent zur Bildung von freien Radikalen in Mitochondrien. Diese freien Radikale sind wichtig für viele Signalprozesse im Organismus. In großen Mengen produziert können sie allerdings Ursache oxidativer Zellschädigungen, von Hautalterung und sogar Hauttumoren sein.

Um sich vor diesen schädlichen Wirkungen der ROS zu schützen, hat der Organismus des Menschen eine Reihe von Mechanismen entwickelt, die im komplexen Zusammenspiel eine Schutzwirkung erzielen. Grundlage ist hier die Wechselwirkung von Carotinoiden (β-Carotin, Lycopin, Lutein, Zeaxanthin), Vitaminen (Vitamin A, C, D, E) und Enzymen (Katalase, Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase) und anderer Antioxidantien (Flavonoide, Coenzym Q10 und viele andere). Dieses antioxidative Netzwerk ist in der Lage, schnell und effektiv freie Radikale zu neutralisieren (THIELE *et al.*, 2001). Die Carotinoide stellen hier die wichtigsten Markersubtanzen für die Bestimmung des antioxidativen Potentials dar.

Für eine optimale Verteidigungsleistung gegenüber äußeren Einflüssen muss sich das Verhältnis zwischen freien Radikalen und Antioxidantien in einem Gleichgewicht befinden. Oxidativer Stress entsteht, wenn sich das Verhältnis von Oxidantien zu Antioxidantien zugunsten der Oxidantien verschiebt. Antioxidantien, konfrontiert mit einer großen Menge freier Radikale, sind nicht mehr in der Lage, diese hochreaktiven Substanzen zu neutralisieren. Es kommt zu einer Kettenreaktion, in deren Folge das antioxidative Potential empfindlich gestört wird. Unkontrollierte Zellschädigungen durch nicht abgebaute ROS sind die Folge. Ursachen für diese Entwicklung können zum Beispiel übermäßige Exposition gegenüber UV-Licht, Rauchen, Alkoholkonsum oder auch Stresssituationen im Alltag sein.

Da Carotinoide Markersubstanzen des antioxidativen Systems im Organismus des Menschen sind, wurde bisher für die standardmäßige Detektion der Carotinoide in

Blut und Gewebe die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) verwendet. Diese Methode ist teuer, sehr aufwändig und erfordert bei Probenentahme teils großflächige Biopsien. Vorzugswürdig ist daher die Anwendung einer nicht invasiven Methode wie der Raman-Resonanz-Spektroskopie, mit der es möglich ist, unmittelbar die Kinetik bestimmter Carotinoide zu bestimmen.

Die Wechselwirkungen zwischen Antioxidantien und ROS stellen ein Gebiet intensiver Forschung dar, die bisher bekannten Untersuchungen wurden aber nur *in vivo* durchgeführt. Es gibt somit kein geeignetes Modell, um diese Wechselwirkung unter Einfluss von Stressfaktoren, welche unter *in vivo*-Bedingungen nicht getestet werden sollten, zu untersuchen. Für die Bestimmung des Lichtschutzfaktors von Sonnenschutzmitteln zum Beispiel wird immer noch die Erythemwirksamkeit als Kenngröße herangezogen. Hierbei werden Menschen einer UV-Exposition ausgesetzt, um die Wirksamkeit von Sonnenschutzmitteln zu testen. Idee und Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein passendes Tiermodell zu finden, um UV-Versuche am Menschen oder lebendigen Tieren künftig umgehen zu können.

Eine ebenfalls wichtige Rolle in der Radikalabwehr spielen die antioxidativen Enzyme. Erwähnt seien an dieser Stelle die Superoxid-Dismutase (SOD) und die Katalase, wobei im weiteren Verlauf der Fokus auf der Katalase liegen wird. In der Radikalabwehr initiiert die SOD die Reaktionskette durch die Umwandlung von zwei Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid. Die Katalase baut die durch die vorhergehende Reaktion entstandenen Moleküle zu Sauerstoff und Wasser ab (RHIE *et al.,* 2001). Katalase spielt eine wichtige Rolle in Prozessen der sonnenlichtbedingten vorzeitigen Hautalterung (RHIE *et al.,* 2001), aber auch als Faktor bei Entzündungen (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1984), Mutagenese (VUILLAME, 1987) und in der Stimulation eines weiten Spektrums von Tumoren (MIYAMOTO *et al.*,1996). Das Fehlen von Katalase führt zu Akatalasämie (Morbus Takahara), einer angeborenen Krankheit, die allerdings sehr selten vorkommt (OGATA, 1991). Es ist bekannt, dass es nach UVB-Bestrahlung ohne große Zeitverzögerung zum Aktivitätsverlust der Katalase kommt (SHINDO, HASHIMOTO, 1997). Da die Epidermis direkt den äußeren Einflüssen der Umwelt ausgesetzt ist, ist es schlüssig, dass das antioxidative Potential hier höher ist als in der Dermis. Dies gilt sowohl für Enzyme wie die Katalase als auch für Carotinoide (SHINDO *et al.*, 1994).

Um den Einfluss von Stressfaktoren, hier am Beispiel von UV-Bestrahlung, auch *in vitro* zu erforschen, wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit exzidierte Kuheuter einer UV-Exposition ausgesetzt, die Ergebnisse der Raman-spektroskopischen Messungen wurden mit den Werten realer Haut des Menschen *in vitro* und *in vivo* verglichen. Es ist bekannt, dass das Kuheuter, ähnlich wie die Haut des Menschen,

hohe Konzentrationen an Carotinoiden enthält (NIEDORF, 2001). Weiter wurde der Frage nachgegangen, inwiefern die Voraussetzungen für die Bildung freier Radikale am Menschen *in vivo* und *in vitro* differieren. Dafür wurde Singulett-Oxygen als Ausgangsstoff gewählt. Da für die Bildung dieses Radikals das Vorhandensein von Sauerstoff essentiell ist, wurde auch die Sauerstoff-Konzentration in verschiedenen Geweben gemessen. Zudem wurden die Aktivitäten des antioxidativen Enzyms Katalase an verschiedenen Hautmodellen verglichen, um auch hier Ähnlichkeiten und Unterschiede in der Kinetik verschiedener Spezies zu dokumentieren. Es gibt bisher recht wenige Studien über Aktivität und Kinetik der Katalase speziell am Menschen. Es wird auch hier eine nicht invasive Methode genutzt, um einen Vergleich an der Haut des Menschen *in vivo* und *in vitro* anzustellen.

2. Literaturübersicht

2.1. Das Integumentum commune

Das Integumentum commune umfasst die eigentliche Haut (Cutis) und die Hautanhangsgebilde (Annexorgane), also Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen.

2.1.1. Die Funktion der Haut

Die Haut stellt in Bezug auf die Oberfläche das zweitgrößte Organ des Organismus von Mensch und Tier dar. Als Grenzorgan zur Umwelt bietet sie Schutz gegenüber äußeren Einflüssen und erfüllt sowohl funktionelle als auch strukturelle Aufgaben. Diese Schutzfunktionen umfassen ein weites Gebiet: Im Vordergrund steht die Barrierefunktion, welche dem Schutz vor Austrocknung und dem Eindringen körperfremder Substanzen dient. Der strukturelle Aufbau der Haut schützt den Körper vor mechanischen Einflüssen, hier spielt das Unterhautfettgewebe eine entscheidende Rolle. Die Melaninpigmentierung schützt vor UV-Licht. Der Thermoregulation dienen das Haarkleid, das Fettpolster, der weit verzweigte Gefäßplexus und die Schweißdrüsen. Das trockene und saure Milieu der Hautoberfläche wirkt einerseits keimfeindlich gegenüber schädlichen Mikroorganismen, bietet aber andererseits einer symbiotischen Keimflora ideale Bedingungen. Ferner besitzt die Haut eigene antigen-präsentierende Zellen und spezielle Antikörper (IgA), die durch Drüsen abgegeben werden, sie wirkt also ebenfalls als immunologisches Organ. Außerdem spielen nicht zuletzt auch die Sinnesfunktionen der Haut eine entscheidende, schützende Rolle, hier seien beispielsweise Schmerz und Juckreiz genannt (FRITSCH, 2004).

2.1.2. Der Aufbau der Haut

Die Haut der Säugetiere ist, obgleich es zahlreiche spezifische Unterschiede gibt, nach dem immer gleichen Grundprinzip aufgebaut. Sie besteht von außen nach innen aus Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut, Corium) und der Subcutis (Unterhaut, Hypodermis).

2.1.2.1. Epidermis

Die Oberhaut bedeckt die gesamte Körperoberfläche, sie ist Produzent und Träger der undurchlässigen Hornschicht, welche die äußerste Grenzschicht der Haut bildet (MONTAGNA, 1962). Die Dicke der oberflächlichen Hornschicht beträgt beim Menschen ungefähr 10-20 µm, die des restlichen Teils der Epidermis zwischen 50 und 200 µm, an manchen Stellen bis zu 600 µm (SCHAEFER, REDELMEIER, 1996). Die Hautschicht geht aus dem Ektoderm hervor und besteht aus mehrschichtigem, verhorntem Plattenepithel, welches einer Basallamina aufliegt und überwiegend aus Keratinozyten aufgebaut ist. Weitere Zellen dieser Hautschicht sind Melanozyten, Langerhans- und Merkel-Zellen. Die Keratinozyten werden aus Stammzellen in der Basalschicht gebildet und durchlaufen in der Epidermis verschiedene Reifungsstadien, bis sie als verhorntes Terminalstadium die äußerste Schicht erreichen (FRITSCH, 2004; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2005).

Die Keratinozyten entstehen in der Basalschicht in Stammzellen, sie durchlaufen während der Wanderung durch die Epidermisschichten einen streng regulierten Differenzierungsvorgang. Ihre Funktion üben diese Zellen terminal differenziert im toten Zustand aus, sie bilden dann den Sitz der Barrierefunktion. Es handelt sich um eine sich kontinuierlich erneuernde Zellpopulation, die die Waage hält zwischen Zellgewinn in Form von Mitosen und Zellverlust durch terminale Zelldifferenzierung und Apoptose. Es besteht eine stete Abschilferung nach außen und Rekrutierung von unten. Die Keratinozyten sind so angeordnet, dass vier horizontale Zellschichten unterschieden werden können: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum (FRITSCH, 2004, Abb. 1).

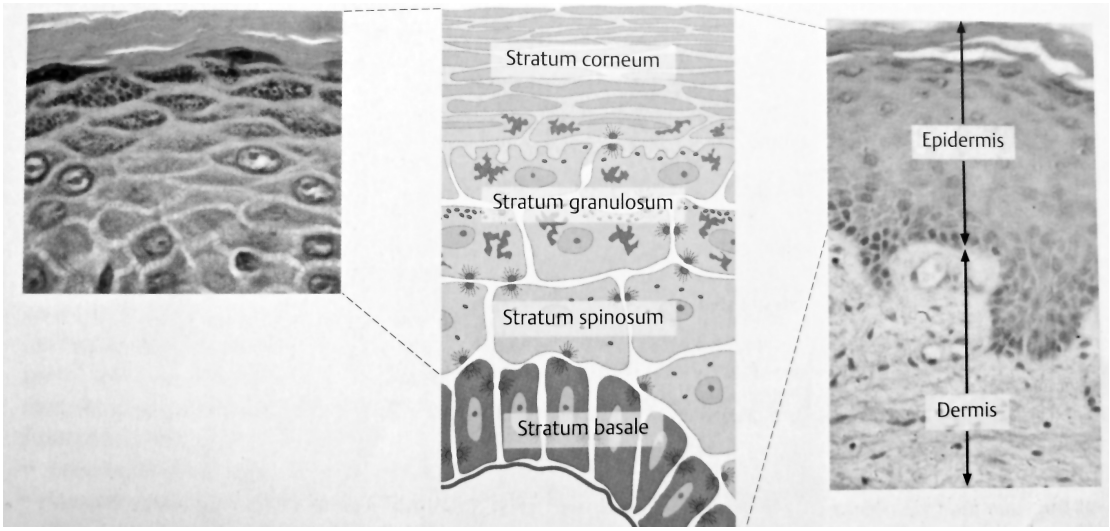


Abb. 1: Aufbau der Haut (STERRY et al., 2011)

Im **Stratum basale** liegt eine Schicht Korneozyten der Basallamina auf. Diese Zelllage enthält auch die Stammzellen (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2005). Mitosen finden im physiologischen Zustand nur in dieser Basallamina statt (FRITSCH, 2004).

Die auf das Stratum basale nach außen folgende Schicht der Epidermis ist das **Stratum spinosum**, welches aus zwei bis fünf Zelllagen besteht, in denen das Zellvolumen der Keratinozyten zunimmt. Hier finden Mitosen nur in besonderen Situationen statt, zum Beispiel im Zuge von Wundheilungen oder pathologisch bei der Schuppenflechte (Psoriasis). Die Stachelzellschicht ist an unbehaarter Haut wie den Fußsohlen dicker, an behaarter Haut dagegen dünner (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2005).

Das **Stratum granulosum** (Körnerschicht) besteht aus ein bis drei Lagen, es finden hier rapide Differenzierungsvorgänge statt. Die Zellen werden platter, Zellkerne und Zellorganellen verschwinden. In den Zellen kommt es zur Dehydratation, im Interzellularraum befindet sich eine zementartige Lipidschicht, histologisch sind basophile Keratinkörner als Vorläufer einer Keratinmatrix erkennbar. Schließlich kommt es zu einer Verhornung der Keratinozyten und damit zu einem abrupten Übergang ins **Stratum corneum.**

In der Hornschicht sitzen die Zellen des Körpers mit dem größten Durchmesser. Die Korneozyten messen hier bis zu 30 µm und erinnern in ihrer Anordnung an ineinander verzahnte Geldrollen. Sie sind in 10-20 Lagen plättchenartiger, kernloser hexagonaler Zellen eingereiht, welche die Keratinfilamente, eingebettet in eine amorphe lipidreiche Proteinmatrix, enthalten. Umhüllt werden die Zellen dieser Schicht von einem starren “cornified envelope“. Das Stratum corneum erinnert in Aussehen und Struktur an eine Plastikmembran, es ist durchscheinend, reißfest, für Wasser und polare Substanzen weitgehend undurchlässig. Es ist verhältnismäßig widerstandsfähig gegen physikalische (mechanisch, thermisch, aktinisch) und chemische (vor allem säurehaltige) Noxen. Aufgrund dieser Eigenschaften fungiert das Stratum corneum als Sitz der Barrierefunktion. Diese Schicht ist allerdings empfindlich gegenüber Lösungsmitteln und Detergentien, welche die Zellmembran zerstören können. Die Barrierefunktion wird auch eingeschränkt durch die stark hygroskopischen Eigenschaften der proteinhaltigen Hornzellen. Bei längerer Wasserexposition nimmt die Reißfestigkeit ab, die Plastizität allerdings zu. Umgekehrt schrumpft die Haut bei Austrocknung, wird irritabel, rissig und schuppig. Die Undurchlässigkeit ist rein physikalischer Natur, sie ist an der toten, isolierten Hornschicht genau so effektiv wie in situ. Die Penetration von außen wird allein bestimmt durch die Dicke, das Konzentrationsgefälle, die Temperatur und das

Löslichkeitsverhältnis zwischen Hornschicht und dem Vehikel der penetrierenden Substanz (Teilungskoeffizient). Nicht zu vergessen ist allerdings die Bedeutsamkeit physiologischer Lücken in dieser sehr effektiven Begrenzung nach außen: Minimal werden Flüssigkeiten und Stoffe ausgetauscht, wobei apolare Substanzen sehr viel besser penetrieren können als polare. Des Weiteren sind durch die Hautanhangsgebilde Öffnungen zur Außenwelt gegeben (FRITSCH, 2004).

In der Epidermis leben weitere Zellen in Symbiose mit den Keratinozyten. Zu nennen seien Melanozyten, welche die Eigenfarbe der Haut bestimmen und dadurch eine Rolle im Schutz vor UV-Licht spielen, außerdem immunologisch wichtige Langerhans-Zellen und Merkelzellen, welche Sinneszellen und Mechanorezeptoren darstellen, indem sie auf Vibrationsreize reagieren. Nicht zuletzt kommen auch in der Haut Lymphozyten vor.

Die Erneuerungszeit (Turnover) der Hornschicht beträgt ungefähr zwei Wochen, die Wanderung eines Keratinozyten vom Stratum corneum bis zur Abschilferung etwa einen Monat, wobei die Umwandlung lebender Hornzellen in die funktionstragende Hornschicht innerhalb von Stunden abgeschlossen ist (FRITSCH, 2004).

2.1.2.2. Dermis

Der Übergang von der Epidermis in die Dermis wird dermoepidermale Junktionszone genannt. Diese Grenzfläche an der Basalmembranzone vermittelt die Verbindung zwischen den beiden Hautschichten und wird daher mechanisch besonders beansprucht (FRITSCH, 2004). Die mechanische Festigkeit der Haut beruht hauptsächlich auf der Lederhaut (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2005) und wird vermittelt durch fibroelastisches Gewebe, welches eine hohe Reißfestigkeit und Elastizität aufweist. Die Dermis ist außerdem Träger der die Haut versorgenden Nerven und Gefäße.

Das weiter apikal gelegene Stratum papillare ist locker gewebt, die lose ineinander verwebten Kollagenfasern sind vor allem vertikal angeordnet und werden darum als Ankerfibrillen bezeichnet.

Im sich darunter befindlichen Stratum reticulare sind die Kollagenfasern horizontal vernetzt, durch viele elastische Fasern entsteht ein strafferes Bindegewebe.

Zwischen den elastischen- und Kollagenfasern befinden sich Fibroblasten, Mastzellen und weitere Gewebszellen, die in ihrer Gesamtheit eingebettet sind in eine gelartige Grundsubstanz aus Proteoglykanen (FRITSCH, 2004; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2005).

2.1.2.3. Subcutis

Die Unterhaut besteht aus locker gewebtem Bindegewebe, das die Haut mit den darunter liegenden Organen verbindet (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2005). Das enthaltene läppchenartige Fettgewebe wird durch Septen in einem straffen Grundgerüst gehalten. Das subkutane Fettgewebe liefert die Wärmeisolierung und dient als mechanisches Schutzpolster und Energiespeicher, es bedeckt außerdem die gegliederte Oberfläche der tiefer eingebetteten Organe und anderer Strukturen (FRITSCH, 2004).

2.1.2.4. Haut des Rindes (Euter)

Die Euterhaut entspricht in der Grundstruktur dem allgemeinen Aufbau der Haut des Menschen, wobei sich einige kleinere Unterschiede sehr wohl erkennen lassen (LUDEWIG *et al.*, 1996).

Die Dicke der **Epidermis** des Euters beträgt ungefähr 60-200 µm, wobei sie bei geringer werdender Behaarung zunimmt (LUDEWIG *et al.*, 1996). Der Verhornungsgrad zwischen Milchspiegel und Zitzenbasis ist gleich bleibend, es können keine bemerkenswerten Unterschiede festgestellt werden.

Das Stratum basale besteht aus hochprismatischen polymorphen Zellen, die vertikal ausgerichtet sind, das Stratum spinosum ist je nach Euterbereich unterschiedlich stark ausgeprägt. Das Stratum corneum wird wiederum in zwei Schichten aufgeteilt, wobei im Stratum conjunctum flache, verhornte Zellen vorhanden sind, welche kompakt zusammenhängen. Das Stratum disconjunctum liegt direkt oben auf, es besteht aus abgelösten, locker aufliegenden Hornlamellen (LUDEWIG *et al.*, 1996).

Die **Dermis** ist am Euter dick ausgebildet, sie entspricht damit der Haut anderer Körperbereiche. In der Lederhaut sind keine merklichen Unterschiede zur Haut des Menschen zu erwähnen, es sind viele Zellen enthalten, unter anderem Fibrozyten, Mastzellen, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen, in behaarten Bereichen gibt es Talg- und Schlauchdrüsen. In der Euterhaut kommen keine Schweißdrüsen vor (LUDEWIG *et al.*, 1996).

Die **Subcutis** wird charakterisiert durch ein weitmaschiges Netz von Bindegewebsfasern, die in direkter Verbindung zur bindegewebigen Kapsel des Euters stehen. Bemerkenswert sind zahlreiche Blutgefäße mit auffallend weitlumigen Venen und das Fehlen von Fettzellen in der Unterhaut (LUDEWIG *et al.*, 1996).

2.1.2.5. Haut des Schweins (Ohr)

Die Haut des Schweins erfüllt am ehesten die Anforderungen, die an ein Modell für die Haut des Menschen gestellt werden müssen.
Die Epidermis ist mit 70-140 µm relativ dick und wenig pigmentiert, sie gleicht der des Menschen in allen Grundzügen, es sind keine nennenswerten Unterschiede vorhanden (MEYER *et al.* , 1978).
In der Dermis zeigt sich ein ausgeprägtes Stratum reticulare mit vielen sehr feinen Kollagenfasern. Das Stratum reticulare weist weniger elastische Fasern auf als das des Menschen, allerdings mehr als das anderer Haussäugetiere (MEYER *et al.*, 1978).
Vor allem in der Subcutis zeigen sich geschlechtsspezifische Parallelen zum Menschen, zum Beispiel sind die Fettkammern beim weiblichen Tier übergroß entwickelt. Aber auch beim männlichen Schwein ist hier reichlich Fettgewebe vorhanden. Die Unterhaut weist die am deutlichsten ausgeprägten Unterschiede auf in Bezug auf Region, Geschlecht und Alter (MEYER *et al.*, 1978).

2.2. Das antioxidative Potential der Haut des Menschen

2.2.1. Grundlagen

Das Stratum corneum als äußerste Schicht der Haut ist ständig Einflüssen aus der Umwelt ausgesetzt, darunter natürlich auch schädlichen Faktoren, wie zum Beispiel Schadstoffen aus der Luft, UV-Licht, chemischen Reizen, Mikroorganismen, um nur einige der Wichtigsten zu nennen. Um den Körper vor diesen Noxen zu schützen, hat der Organismus ein effektives Abwehrsystem geschaffen, welches sich aus einem Netzwerk von enzymatischen und nicht enzymatischen Antioxidantien zusammensetzt (THIELE *et al.,* 2001). Diese biologischen Antioxidantien sind Verbindungen, die biologische Systeme gegen potentiell schädliche Effekte schützen, welche im Laufe bestimmter Reaktionen auftreten und exzessive Oxidationsprozesse auslösen können (PALOZZA, KRINSKY, 1992). Die Schutzwirkung dieses Abwehrsystems besteht in der Wechselwirkung verschiedener antioxidativer Moleküle, die unterschiedlichen Stoffgruppen angehören. In dieser Arbeit wird der

Fokus auf die Gruppe der Carotinoide gelegt, deren hohe antioxidative Aktivität auf eine Vielzahl von konjugierten Doppelbindungen zurückzuführen ist.

2.2.2. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind Atome oder Moleküle, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen. Sie entstehen natürlicherweise im Organismus, erst übermäßige Produktion ist gefährlich und kann zu Zellschädigungen, Hautalterung und sogar zu Hautkrebs führen (WENK *et al.*, 2001). Singulett-Sauerstoff ist eines der reaktivsten freien Radikalen, die im Organismus entstehen können. Es handelt sich um elektrisch angeregten molekularen Sauerstoff. Er kann auf photochemischem Wege entstehen, wenn bestimmte Moleküle Lichtenergie auf molekularen Sauerstoff übertragen und diesen damit in den sehr reaktiven Singulett-Zustand übergehen lassen. Eine weitere Möglichkeit der Entstehung geschieht auf metabolischem Wege in stimulierten neutrophilen Granulozyten zur Abwehr körperfremder Stoffe oder auch im Zuge der Lipidperoxidation (KLOTZ *et al.*, 2001). In biologischen Systemen sind Carotinoide, vor allem Lycopin, sehr effektive Singulett-Sauerstoff-Quencher (KLOTZ *et al.*, 2001; DI MASCIO *et al.*, 1989).
Untersuchungen an vom Menschen entnommenen Hautbiopsien zeigten, dass freie Radikale in Folge von Sonneneinstrahlung nicht nur im Bereich des UV-Lichts, sondern auch im Bereich des sichtbaren und Infrarot-Lichtes entstehen. Das ist eine überraschende Erkenntnis, da bisher angenommen wurde, die Entstehung freier Radikale spiele nur bei UV-Exposition eine Rolle. Die Bildung von Radikalen ist demnach im gesamten Sonnenspektrum von wesentlicher Bedeutung (ZASTROW *et al.*, 2008).

2.3. Carotinoide

Carotinoide sind in der Natur weit verbreitete Pigmente mit vielen verschiedenen Aufgaben, sie gehören zu den Hauptbestandteilen des antioxidativen Systems bei Mensch und Tier. Biologische Antioxidantien sind Verbindungen, die biologische Systeme gegen potentiell schädliche Effekte schützen, welche im Laufe bestimmter Reaktionen auftreten und exzessive Oxidationsprozesse auslösen können (PALOZZA, KRINSKY, 1992).

2.3.1. Generelle Stoffeigenschaften und Wirkungen

Carotinoide gehören zu den wichtigsten und am häufigsten in der Natur vorkommenden Pigmenten, insbesondere bezogen auf die Vielzahl ihrer Funktionen (PFANDER, 1992). Bis heute sind 600 in der Natur isoliert, etwa zehn Prozent davon besitzen Provitamin A-Aktivität. Die Struktur dieser Stoffe ist teilweise noch unklar (YEUM, RUSSELL, 2002). Ungefähr 100 der derzeit entdeckten Carotinoide kommen in Nahrungsmitteln vor, die von Menschen verzehrt werden (BLACK, LAMBERT, 2001). Sie werden unterschieden in Carotine, die nur aus Kohlenstoff und Wasserstoff aufgebaut sind und Xanthophylle, den sauerstoffhaltigen Derivaten der Carotine. Die Carotine (zum Beispiel β-Carotin, Lycopin) kommen vor allem in gelbem und orangefarbenem Gemüse vor, sie schützen unter anderem vor Krebs und Herzerkrankungen. Die Xanthophylle (zum Beispiel Lutein, Zeaxanthin) findet man in grünblättrigem Gemüse, sie haben ophthalmologische Schutzwirkungen. Carotinoide sind außerdem verantwortlich für die Farbgebung vieler Tiere, wie zum Beispiel Kanarienvögel und Flamingos. Synthetisch hergestellt werden sie als Pigmente zur Farbgebung einiger Nahrungsmittel eingesetzt (Eigelb, Zuchtlachs, Käse) (PFANDER, 1992; BLACK, LAMBERT, 2001). Carotinoide sind für den Menschen essentielle Elemente, das heißt, sie müssen mit der Nahrung aufgenommen werden, können im Organismus zwar metabolisiert, aber nicht synthetisiert werden. Die natürliche Synthese erfolgt durch Pflanzen und Mikroorganismen (BIESALSKI, 1997).
Carotinoide sind Polyprene mit jeweils einer Ringstruktur an beiden Enden, die durch eine Isoprenoidkette mit unterschiedlicher Anzahl an Doppelbindungen gekoppelt sind (Abb. 2a). Ausnahme bildet hier Lycopin (Abb. 2b), welches keine Ringstruktur besitzt (BIESALSKI, 1997). Die Menge und Lage der Doppelbindungen im Molekül sind unter anderem verantwortlich für die Farbe der Carotinoide (SIES, STAHL, 2004).

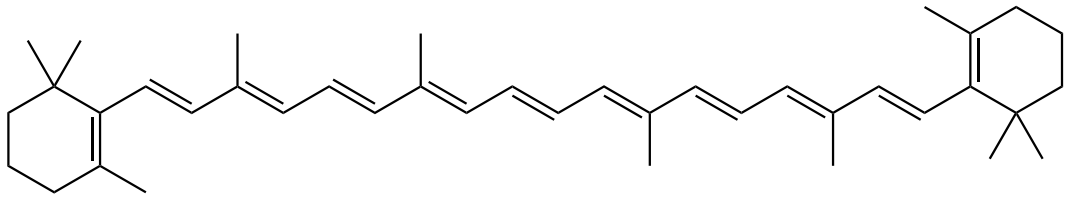


Abb. 2a: β-Carotin

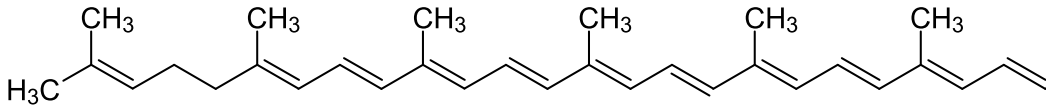


Abb. 2b: Lycopin

Die Schutzwirkung der Carotinoide wird entweder durch direkte antioxidative Aktivität oder durch Modulation ihrer zellulären antioxidativen Konzentration gewährleistet. Die antioxidative Wirkung ist hierbei abhängig von der chemischen Struktur des jeweiligen Elementes (PALOZZA, KRINSKY, 1992). Je mehr Doppelbindungen enthalten sind, desto besser ist die antioxidative Wirkung. Carotinoide mit nur sieben oder weniger Doppelbindungen sind als Radikalfänger nicht mehr geeignet, da sie keine Energie von freien Radikalen aufnehmen können (MIN, BOFF, 2002).
Die Basis der Schutzwirkung von Carotinoiden liegt in der Fähigkeit, angeregten Singulett-Sauerstoff und andere freie Radikale durch Energie-Transfer in den Grundzustand zurück zu versetzen. Wenn keine Neutralisation dieser ROS erfolgt, kommt es zu radikalinduzierten Schäden. Diese Reaktion erfolgt nach folgender Formel (der Triplettzustand wird durch eine hochgestellte 1 vor dem betroffenen Molekül gekennzeichnet):

$$^{1}O_2 + car \rightarrow O_2 + {}^{1}car$$
$$^{1}car \rightarrow car + Wärme$$

Durch die Reaktion mit Singulettsauerstoff wird der Triplettzustand des Carotinoid-Moleküls wieder in den Grundzustand versetzt, wobei Wärme freigesetzt wird. Die Fähigkeit des Quenching bewirkt einen effektiven Schutz vor der zellzerstörenden Wirkung photooxidativer Prozesse. Die Reaktion findet umso effektiver statt, je niedriger der Sauerstoffpartialdruck ist und je mehr konjugierte Doppelbindungen das reagierende Molekül in seiner Struktur enthält. Bei einer kritischen Konzentration freier Radikale kann sich diese Reaktion einige Male abspielen, bevor das antioxidative Molekül zugrunde geht. Es kommt dann zu den erwähnten zellschädigenden Prozessen.
Die Resorption dieser Stoffe erfolgt im Dünndarm, die Speicherung vorwiegend in Fettgewebe und in der Leber. Die höchsten Konzentrationen findet man in der Epidermis und Subcutis. Beim Menschen befinden sich die Werte abhängig von

Ernährung, UV-Exposition etc. zwischen 0,33 und 0,44 nmol/g (DARVIN *et al., 2005 a)*.

Die Absorption der Carotinoide ist maßgeblich erhöht, wenn die Moleküle als Teil einer fettreichen Mahlzeit eingenommen werden. Nahrungscarotinoide werden nach der Absorption durch Mucosazellen im Dünndarm in Chylomikronen aufgenommen, welche in Lymphe und Blut gelangen. Die Chylomikronen werden im Kreislauf sehr schnell durch das Enzym Lipoproteinlipase abgebaut, woraufhin die frei gewordenen Carotinoide durch VLDL ("very low density lipoproteins") weiter transportiert und im Plasma zum Großteil von LDL ("low density lipoproteins") übernommen werden. Einige Moleküle sind auch in HDL ("high density lipoproteins") nachweisbar (OLSON, 1994).

Die Metabolisierung der Carotinoide ist stark speziesabhängig, viele Mechanismen sind nach wie vor unklar. Am besten erforscht ist die Umwandlung von β-Carotin und anderer Stoffe mit Provitamin A-Aktivität zu Vitamin A. Die Ausscheidung nicht absorbierter Carotinoide erfolgt über die Faeces, in der Haut gespeicherte Moleküle gehen durch die Abschilferung der Hornschicht verloren. Im Schweiß aus der Haut ausgetretene Carotinoide gehen partiell verloren, teilweise werden sie dem Kreislauf durch Resorption wieder zugeführt (OLSON, 1994).

Im Folgenden werden beispielhaft die Carotinoide β-Carotin und Lycopin genauer vorgestellt.

2.3.2. β-Carotin

β-Carotin ist das in Nahrungsmitteln am weitesten verbreitete Carotinoid. Es besteht aus einer Kohlenstoffkette mit jeweils einer Ringstruktur an beiden Enden, die wiederum durch eine Isoprenoidkette verbunden sind. Das gesamte Molekül enthält 9 konjugierte Doppelbindungen mit 4 Methylgruppen als Seitengruppen und ist eine kristalline, in apolaren Lösungsmitteln lösliche Verbindung. Das Molekulargewicht beträgt 536,9 g/mol. β-Carotin kommt sowohl in *trans*- als auch in *cis*-Isomerisierung vor, wobei in der Natur vor allem die *trans*-Form zu finden ist. Diese ist sehr stabil, erst Hitzebehandlung führt zu Umwandlung in die *cis*-Form und damit zu Aktivitätsverlust. β-Carotin ist empfindlich gegenüber Licht, Sauerstoff, Säure und hohen Temperaturen (PFANDER, 1992).

β-Carotin besitzt eine sehr hohe Quenching-Aktivität, das heißt, es ist in der Lage, aktivierte O_2-Verbindungen zu inaktivieren sowie den Triplettzustand zu absorbieren (BIESALSKI, 1997; PALOZZA, KRINSKY, 1992). Des Weiteren fungiert β-Carotin effektiv

als Radikalfänger, indem es durch Autoxidation die Oxidation anderer Substanzen, wie zum Beispiel Lipiden, verhindert. Nicht zuletzt schützt das Molekül durch Anreicherung im Unterhautfettgewebe und Stratum corneum. Durch die Verfärbung der Haut wird Licht besser absorbiert (BIESALSKI, 1997).
Bemerkenswert ist die Umkehrung der antioxidativen zu einer prooxidativen Wirkung, die in *in vitro*-Versuchen festgestellt wurde. Dies kann bei sehr hohen Carotinoid-Konzentrationen (KRINSKY, 2001) oder auch bei hohem Sauerstoffpartialdruck vorkommen (EDGE *et al.*, 1997).

2.3.3. Lycopin

Lycopin ist ein linear aufgebautes Polypren, besitzt aber im Gegensatz zu β-Carotin keine Ringstruktur. Das Molekül enthält 11 konjugierte Doppelbindungen und damit zwei mehr als β-Carotin, wodurch seine Quenching-Aktivität wesentlich effektiver ist. Es fängt doppelt so viel Singulett-Sauerstoff ab und ist damit der wirkungsvollste Sauerstoff-Quencher. Lycopin wird in der all-*trans*-Form aus der Nahrung aufgenommen, wobei sich in Blut und Gewebe zu mehr als 50% *cis*-Isomere finden. Grund dafür ist aller Wahrscheinlichkeit nach die bessere Resorption der *cis*-Form aus dem Dünndarm. Aufgrund der fehlenden Ringstruktur besitzt Lycopin keine Provitamin A-Aktivität (YEUM, RUSSELL, 2002).

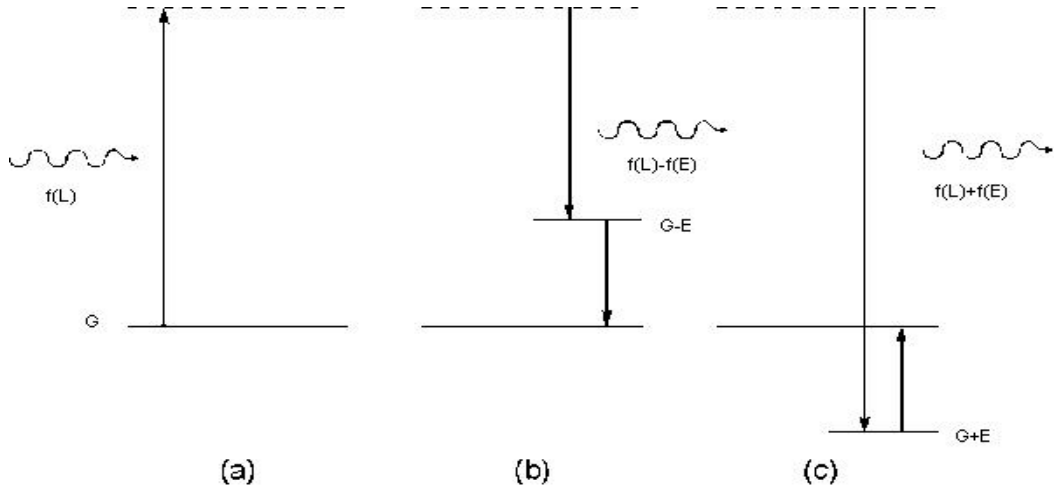
2.4. Raman-spektroskopische Grundlagen

Erfinder der Raman-Spektroskopie ist C.V. Raman, ein indischer Physiker (1888-1970), der 1930 den Nobelpreis für Physik “für seine Arbeiten über die Diffusion des Lichtes und die Entdeckung des nach ihm benannten Effektes“ erhielt (BRANDMÜLLER, MOSER, 1962). Im Jahre 2000 wurde von HATA *et al.* die Möglichkeit beschrieben mit Hilfe der Raman-Spektroskopie Carotinoide in der Haut zu detektieren. Durch ERMAKOV *et al.* (2004) wurde dann erstmals die Unterscheidung der verschiedenen Carotinoide durch eine Anregung auf zwei unterschiedlichen Wellenlängen angeboten. Diese Methode wurde seither durch DARVIN *et al.* weiter entwickelt. Bisher war die HPLC-Chromatographie (high performance liquid chromatography) die Methode der Wahl gewesen, um diese Moleküle der Haut zu bestimmen. Nachteil gegenüber der Raman-Spektroskopie ist die Invasivität der Methode, da große Gewebeproben benötigt werden (DARVIN *et al.*, 2003). Da

nachweislich eine starke Korrelation zwischen der HPLC-Chromatographie und der Raman-Spektroskopie besteht, gibt uns letztere demzufolge die Möglichkeit, Carotinoide der Haut nicht invasiv und unmittelbar zu messen (ERMAKOV *et al.*, 2004, DARVIN *et al.*, 2005 b).

2.4.1. Physikalische Grundlagen der Raman-Spektroskopie

Da die Raman-Spektroskopie eine laserspektroskopische Methode ist, die charakteristischen Energieniveaus eines Moleküls zu detektieren, liefert sie Informationen über Schwingungs- und Rotationszustände. Der Raman-Effekt entsteht durch die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung und der Elektronenhülle des Moleküls und ist praktisch unabhängig von der Wellenlänge der Erregerstrahlung. Wenig polare Bindungen und Moleküle mit leicht deformierbaren Elektronenhüllen sind Raman-aktiv. Bei der Methode wird eine Probe durch intensive monochromatische Strahlung (grüne und blaue Spektralfarbe) angeregt. Der Großteil der Strahlung durchstrahlt die Probe (99,99%), ein sehr geringer Teil wird elastisch in alle Raumrichtungen gestreut. Diese elastische Streuung wird Rayleigh-Strahlung genannt, ihre Frequenz entspricht derjenigen der Laserstrahlung. Ein noch kleinerer Teil (10^{-6} %) wird unelastisch gestreut. Diese so genannte Raman-Strahlung ist charakteristisch für das jeweilige beprobte Molekül. Verantwortlich für die Raman-Streuung ist die Deformierbarkeit der Elektronenhülle des Moleküls während des Schwingungsvorgangs. Hierbei werden die Bindungselektronen im Molekül periodisch verschoben und dabei das Grundgerüst in Schwingung versetzt (Abb. 3, SPIESS, KLAPÖTKE, 1999).



(a) Die Probe wird durch die Photonen der Laserstrahlung f(L) in einen energetisch angeregten Zustand gebracht (gestrichelte Linie).

(b) Die angeregte Probe emittiert Photonen und geht dabei in einen energetischen Endzustand (G-E) über, der etwas über dem Ausgangszustand (G) liegt (bei der Rayleigh-Streuung Übergang in den Grundzustand (G)). Der Rest der Energie ist der Betrag, den z.B. die Molekülgruppen zur mechanischen Schwingungsanregung benötigen. Die abgestrahlten Photonen haben daher eine längere Wellenlänge (f(L)-f(E), Stokes-Streuung).

(c) Andererseits kann durch thermisch angeregte Moleküle (G+E) zusätzlich die Schwingungsenergie der Molekülgruppen an die Photonen abgegeben werden (f(L)+f(E), Anti-Stokes-Streuung, Abstrahlung kürzerer Wellenlängen)

Abb. 3: Schematische Darstellung Raman-, Rayleigh-Streuung (aus SPIESS, KLAPÖTKE, 1999)

Den in Abb. 3 beschriebenen Effekt der Frequenzverschiebungen nennt man Raman-Shift. Die Frequenzverschiebungen werden in der Regel in Wellenzahlen (cm^{-1}) relativ zur Laserfrequenz angegeben. Die eingestrahlte Wellenlänge des Lasers wird in diesem Fall gleich Null gesetzt. Stokes- und Anti-Stokes-Strahlung haben den gleichen Shift, allerdings mit umgekehrten Vorzeichen. Im Folgenden wird daher nur noch die Stokes-Streuung dargestellt (SPIESS, KLAPÖTKE, 1999). Die Raman-Spektroskopie liefert uns eine Art spektralen Fingerabdruck eines Moleküls mit Raman-aktiven Doppelbindungen. Die Intensität des Raman-Peaks ist direkt proportional zur Konzentration der Moleküle (KONINGSTEIN, 1971). Aufgrund der Art ihrer Doppelbindungen sind Carotinoide stark Raman-aktive Substanzen, weshalb die Raman-Streuung besonders geeignet ist, diese nicht invasiv zu beurteilen (DARVIN *et al.*, 2004).

Die folgenden Abbildungen zeigen Absorptionsspektren der Haut des Menschen angeregt bei einer Wellenlänge von 514,5 nm. Typische Raman-Signale der Haut bestehen aus sehr kleinen Signalen mit großem Fluoreszenzuntergrund (Abb. 4). Sie sind charakterisiert durch zwei deutliche Stokes-Linien bei 1156 cm^{-1} und bei 1523 cm^{-1}, welche fast identische Intensitäten haben. Diese Raman-Signale ergeben sich aus den Schwingungen der Kohlenstoff-Einfachbindungen sowie der konjugierten Kohlenstoff-Doppelbindungen. In Abb. 5 ist die Stokes-Streuung nach Abzug der Untergrundfluoreszenz skizziert. Carotinoide sind aufgrund ihrer leicht deformierbaren Elektronenhüllen (C-C, C=C) stark Raman-aktiv. Das Spektrum der Haut stellt sich bei einer Anregung von 488 nm weitgehend übereinstimmend dar (ERMAKOV *et al.,* 2004).

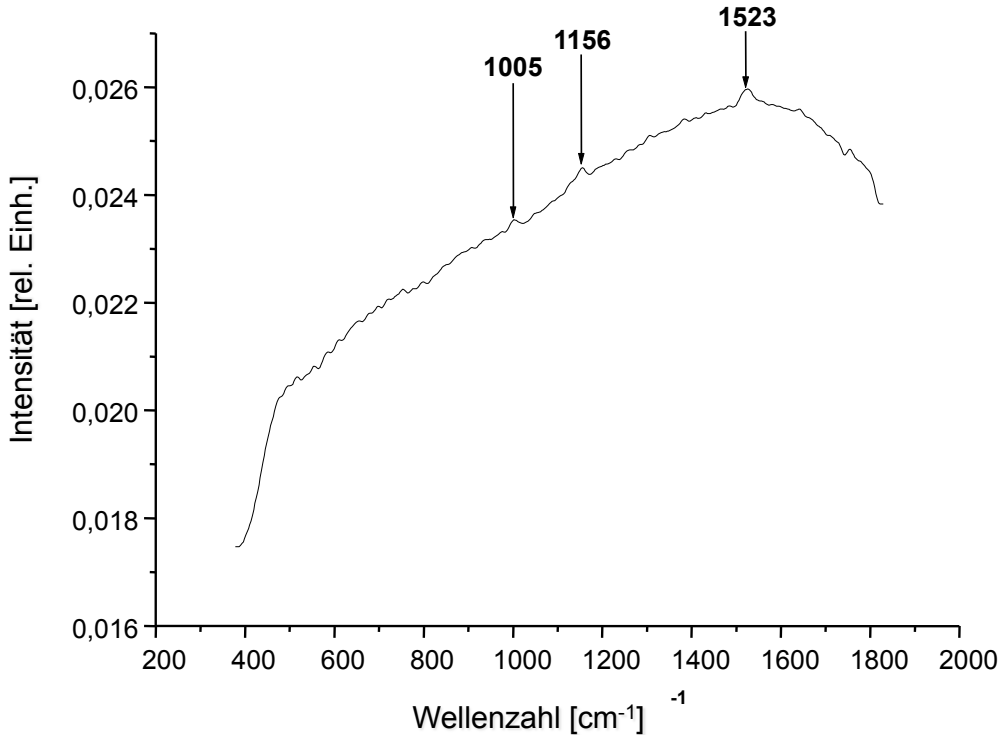


Abb. 4: Raman-Spektrum der Haut unter Anregung durch Argon-Laser bei 514,5 nm (DARVIN et al., 2004)

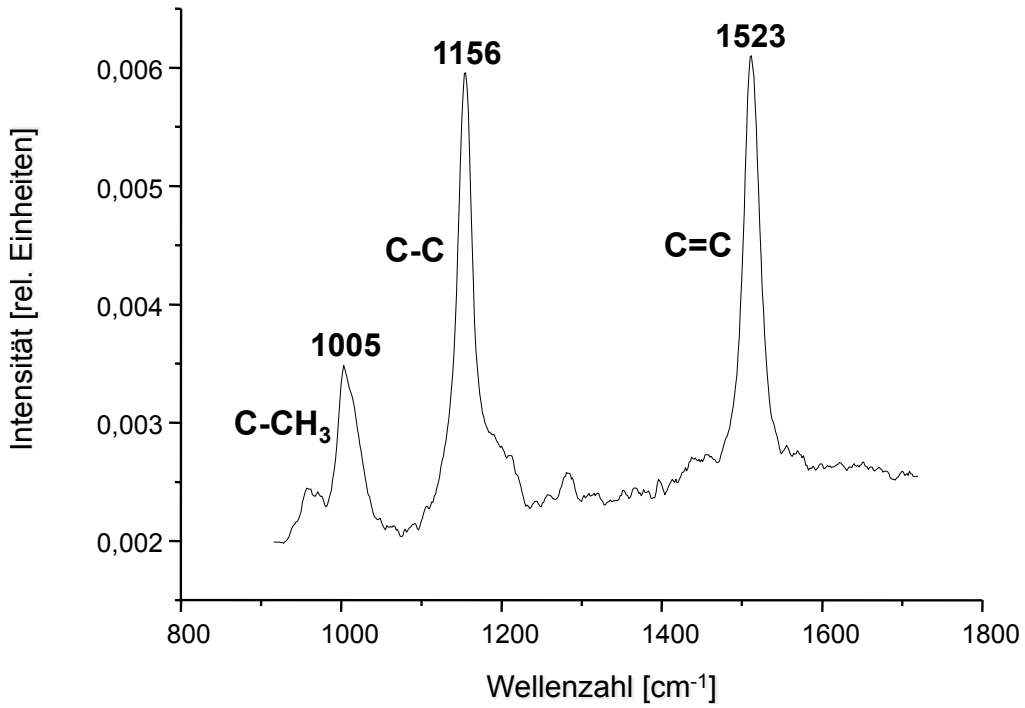


Abb. 5: Raman-Spektrum der Haut nach Abzug des Untergrundes unter Anregung durch Argon-Laser bei 514,5 nm (DARVIN et al., 2004)

Im Entwicklungszeitraum der Raman-spektroskopischen Methode mit der Anregung auf zwei Wellenlängen wurde das Gerät anhand von bekannten HPLC-Messergebnissen geeicht. Die Resultate der beiden Methoden korrelieren. Hierbei wurden auch absolute Carotinoid-Werte detektiert und gemessen. Die relativen Werte wurden durch Umrechnung ermittelt.

Die bei der Wellenzahl 1523 cm^{-1} und Anregungswellenlängen 488 nm und 514,5 nm gemessene Intensitäten der Raman-Linien (I^{488}/I^{514}) können durch folgende Proportionalitäten dargestellt werden:

$$I^{488} \sim P^{488}\left(\sigma_{bC}^{488}N_{bC} + \sigma_{L}^{488}N_{L}\right) \qquad (1)$$

$$I^{514} \sim P^{514}\left(\sigma_{bC}^{514}N_{bC} + \sigma_{L}^{514}N_{L}\right). \qquad (2)$$

N_{bC} und N_L sind hierbei die relativen Konzentrationen von β-Carotin und Lycopin, P^{488} und P^{514} die Leistung der Laser-Anregunglinien, $\sigma_{bC}{}^{488}$, $\sigma_L{}^{488}$, $\sigma_{bC}{}^{514}$, $\sigma_L{}^{514}$ sind die Raman-Resonanz Streuquerschnitte für β-Carotin und Lycopin. Durch Division mit der Laser-Leistung erhält man aus den oben genannten Proportionalitäten:

$$I_n^{488} \sim \left(\sigma_{bC}^{488}N_{bC} + \sigma_{L}^{488}N_{L}\right) \qquad (3)$$

$$I_n^{514} \sim \left(\sigma_{bC}^{514} N_{bC} + \sigma_L^{514} N_L\right) \qquad (4)$$

wobei $I_n^{488(514)} = I^{488(514)}/P^{488(514)}$ als Messparameter fungiert.

Durch Zusammenfügen der Formeln (3) und (4) wird eine Darstellung des Verhältnisses der relativen Konzentrationen von β-Carotin und Lycopin zueinander möglich:

$$\frac{N_{bC}}{N_L} = \frac{\sigma_L^{488} - \sigma_L^{514} r}{\sigma_{bC}^{514} r - \sigma_{bC}^{488}} \qquad (5)$$

mit $r = I_n^{488} / I_n^{514}$ als Messparameter.

Die Raman-Resonanz Streuquerschnitte von β-Carotin, σ_{bC}, und Lycopin, σ_L, können aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften in Ethanol gelöst gemessen werden.

Die durch Messungen ermittelten Werte für σ können in Formel (5) eingesetzt werden:

$$\frac{N_{bC}}{N_L} = \frac{0{,}95 - 0{,}44r}{0{,}06r - 1} \qquad (6)$$

Durch Kombination von (3) und (6), ist es möglich die relativen Konzentrationen von β-Carotin und Lycopin darzustellen:

$$N_{bC} \sim \frac{I_n^{488} N_{bC} / N_L}{N_{bC} / N_L + 0{,}95} \qquad (7)$$

$$N_L \sim \frac{I_n^{488}}{N_{bC} / N_L + 0{,}95} \qquad (8)$$

Für die Kalibration wurden Proben von Humanhaut verwendet, die sowohl mit HPLC als auch mit Raman-Spektroskopie analysiert wurden. Die aus der HPLC-Messung erhaltenen absoluten Werte von β-Carotin und Lycopin wurden durch Einsetzen in die Formeln (7) und (8) zu relativen Konzentrationen umgerechnet:

$$N_{bC(L)} = K N_{bC(L)}^{abs} \,. \qquad (9)$$

$N_{bC(L)}^{abs}$ (nmol g^{-1}) ist die absolute Konzentration von β-Carotin bzw. Lycopin, K ist die durch die Kalibration erhaltene Proportionalitätskonstante. Diese entspricht 2000^{-1} (g s^{-1} mW^{-1} $nmol^{-1}$).

Formeln (7) und (8) können somit folgendermaßen dargestellt werden:

$$N_{bC}^{abs} = \frac{2000 I_n^{488} N_{bC} / N_L}{N_{bC} / N_L + 0{,}95} \qquad (10)$$

$$N_L^{abs} = \frac{2000 I_n^{488}}{N_{bC} / N_L + 0{,}95} \qquad (11)$$

(DARVIN *et al.,* 2005 b)

Für die vorliegende Recherche sind absolute Werte aber nicht relevant, da Methoden verglichen und Wertänderungen und -abnahmen bewertet werden. Für diese Messungen sind relative Werte ausreichend, da eine Proportionalität zwischen absoluten und relativen Werten besteht.

Der experimentelle Aufbau des Raman-Resonanz-Spektroskopes wird im Teil "Material und Methoden" dargestellt (s. S. 27).

2.4.2. Absorptionsspektren der Carotinoide

Die Effizienz der Raman-Strahlung hängt entscheidend ab von der Wellenlänge, mit der die Probe angeregt wird, und vom Absorptionsspektrum der beprobten Substanz. Die nachfolgend in der Abbildung (Abb. 6) aufgeführten Absorptionsspektren von β-Carotin und Lycopin weisen jeweils differierende Absorptionswerte bei 488 nm und 514 nm auf. Die Carotinoide α-, β-, γ-Carotin, Lutein, Zeaxanthin und Lycopin haben im blauen Spektralbereich bei 488 nm ungefähr die gleichen Absorptionswerte. Im grünen Bereich bei 514,5 nm zeigt Lycopin allerdings eine sechsmal höhere Absorption im Vergleich zu den anderen oben genannten Carotinoiden. Das führt bei einer gleichzeitigen Anregung von 488 nm und 514 nm zu unterschiedlichen Streuungsparametern der detektierten Carotinoide. Der Vorteil der Raman-Resonanz-Spektroskopie ist die höhere Nachweisempfindlichkeit durch die Arbeit in den Absorptionsspektren (DARVIN *et al.,* 2005 b, 2006 b).

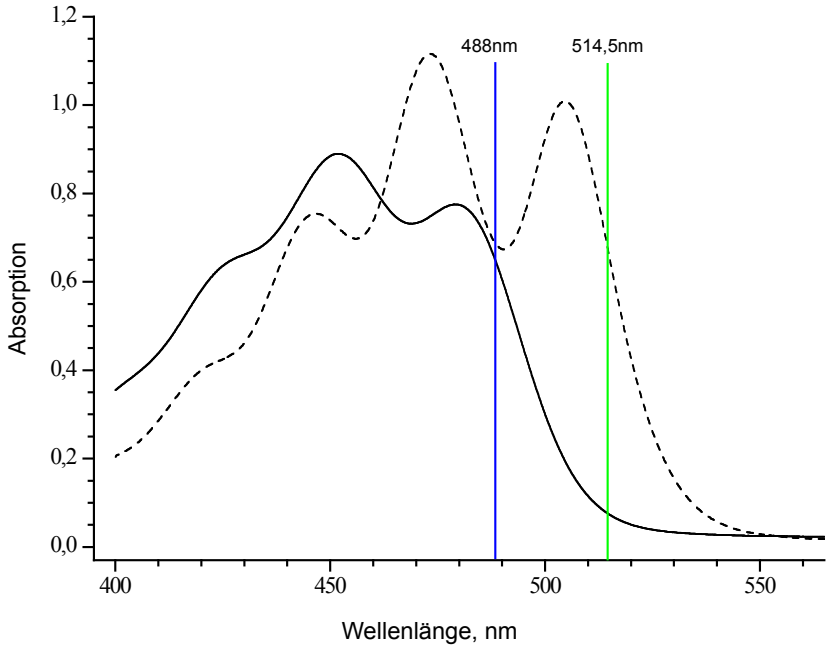


Abb. 6: Absorptionsspektren von β-Carotin (—) und Lycopin (---) in Ethanol (DARVIN et al., 2006 b)

β-Carotin und Lycopin machen ungefähr 70% der Carotinoide der Haut aus, weitere Carotinoide können aufgrund der sehr ähnlichen Absorptionsmaxima jedoch ebenso einen Einfluss auf die Raman-Messungen ausüben.
Neuere Erkenntnisse weisen außerdem darauf hin, dass Carotinoide generell als Markersubstanzen für das gesamte antioxidative System gelten können. Die Antioxidantien bilden im Gewebe Schutzketten und können sich dadurch gegenseitig vor der zerstörerischen Wirkung der freien Radikale schützen (HAAG *et al.*, 2010).

2.5. Katalase

In Dermis und vor allem Epidermis herrscht ein enges Zusammenspiel zweier Hauptabwehrsysteme im effizienten Kampf gegen freie Radikale. Die antioxidativen Enzyme repräsentieren die erste Verteidigungslinie, während die kleineren antioxidativen Moleküle die zweite Linie bilden. Das initiativ radikalfangende Enzym in dieser Kette antioxidativer Abwehrmechanismen stellt die Superoxid-Dismutase (SOD) dar, welche 2 Moleküle des Superoxid-Anions zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umwandelt. Das entstandene H_2O_2 wird in der nachfolgenden Reaktion

von der Katalase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut (RHIE *et al.,* 2001). Diese beiden Enzyme werden als die beiden wichtigsten Enzyme des Stratum corneum erachtet, wobei nur die Katalase in der nachfolgenden Arbeit bestimmt wird.
Katalase ist ein tetramerisches, Häm-enthaltendes Redox-Enzym (HELLEMANS *et al.*, 2002). Es besteht aus 4 Untereinheiten, von denen jede ein Fe(III)-Häm im aktiven Zentrum und jeweils 1 NADPH-Molekül gebunden hat. Das Molekül besitzt eine β-Faltblatt-Struktur, die stellenweise von einem helikalen Gefüge unterbrochen wird. Dissoziation in seine Untereinheiten bringt Aktivitätsverlust mit sich, was durch unprofessionelle Lagerung, Austrocknung beim Einfrieren, Exposition mit Säuren oder Basen geschehen kann. Die Katalase gehört zu den wasserlöslichen Enzymen (FUCHS *et al.,* 1989). Eine besondere Eigenschaft ist die Doppelfunktion, die das Enzym in seinen Katalysereaktionen ausübt. Es besteht einerseits die katalytische Funktion, die den Abbau von H_2O_2 bewirkt, andererseits ist auch eine peroxidative Aktivität bekannt, bei der andere Wasserstoffdonoren oxidiert werden. Die Art der Reaktion ist abhängig von der Konzentration der H-Donoren sowie von der steady-state Produktionsrate von H_2O_2 im System. Ein H_2O_2-Komplex wird nach Möglichkeit immer zuerst gebildet, da die katalytische Reaktion sehr viel schneller als die peroxidative ist (AEBI, 1984). Bei geringeren H_2O_2-Konzentrationen kommt die peroxidative Aktivität zum Tragen, dabei können verschiedene H-Donoren als Substrat dienen, besonders reaktiv sind niedrige Alkohole wie Methanol und Ethanol. Aliphatische Alkohole sind für Katalase spezifische Substrate, sie werden von anderen Enzymen nicht verwendet (JOHANSSON, BORG, 1988). Bei beiden Reaktionen wird ein Zwischenprodukt gebildet (compound I):

$$\text{Katalase-Fe(III)} + H_2O_2 \rightarrow \text{Komplex I} + H_2O$$
$$\text{Komplex I} + H_2O_2 \rightarrow \text{Katalase-Fe(III)} + H_2O + O_2$$

Katalase nimmt hier eine Sonderstellung ein, da es einerseits nicht möglich ist, das Enzym mit Substrat zu sättigen. Andererseits wird es bei hohen H_2O_2-Konzentrationen über 0,1 M schnell inaktiviert, der aktive Komplex I wird dann in einen inaktiven Komplex II oder III umgewandelt (AEBI, 1984).
Die Katalase-Aktivität ist in der Epidermis um ein Vielfaches höher als in der Dermis. Das bezieht sich generell auf die größere antioxidative Kapazität in der obersten Hautschicht, da diese die erste Barriere gegenüber oxidativen Noxen von außen darstellt und zudem die äußeren zehn Prozent der Gesamtheit der Haut ausmacht (SHINDO *et al.,* 1994).

3. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Haut stellt die äußere Barriere unseres Organismus zur Außenwelt dar. Sie ist somit auch die erste Grenze für Noxen aus der Umwelt, die den Körper schädigen könnten. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vor allem mit der schädigenden Wirkung freier Radikale, die durch energiereiche Strahlung entstehen, z.B. durch UV-Strahlung. Die Idee für die Dissertation entstand durch die Tatsache, dass der Lichtschutzfaktor der gängigen Sonnenschutzmittel noch immer an Menschen über das Erythem, also die Rötung der Haut, bestimmt wird. Ziel der Arbeit ist es folglich, ein Hautmodell als Gewebemodell für Stressfaktoren auf der Haut zu etablieren. Als Messverfahren wurde die Raman-Resonanz-Spektroskopie gewählt. Diese Methode ermöglicht es, nicht invasiv und unmittelbar die Kinetik der Carotinoide zu ermitteln. In Untersuchungen der Forschungsgruppe für Hautphysiologie der Charité Berlin wurde festgestellt, dass das Schweineohr als Modell ungeeignet ist, da *ex vivo* keine Carotinoide mehr messbar sind. Alternativ scheint das Kuheuter ein gutes Studienobjekt zu sein, da sein Gehalt an Antioxidantien, Epidermisdicke, Oberflächenbeschaffenheit, Behaarung und Faltung den Gegebenheiten der Haut des Menschen ähnlich sind. Untersuchungen wurden unter standardisierten Stressbedingungen durchgeführt. Als Stressfaktor wurde UV-Strahlung gewählt. Dieses Modell konnte im zweiten Teil der Studie der *in vivo*-Situation am Menschen gegenübergestellt werden. Um einen weiteren Vergleich zu schaffen, wurden zudem Untersuchungen an Patienten der Humanmedizin *in vivo* und *in vitro* durchgeführt. Diese dienten der Erfassung von Hautparametern, welche die Bildung von ROS mitbestimmen. In die Arbeit integriert wurden die Vergleiche des Sauerstoffgehaltes der Haut des Menschen *in vivo* und *ex vivo*. Außerdem wurde die Detektion eines der wichtigsten antioxidativen Enzyme der Haut, der Katalase, in die Abhandlung mit aufgenommen. Diese Bestimmungen wurden an der Haut des Menschen *in vivo* und *ex vivo*, an der Euterhaut des Rindes und am exzidierten Schweineohr durchgeführt.

4. Material und Methoden

4.1. Freiwillige ProbandInnen

Studienteilnehmer waren 2 gesunde Männer (P1, P7) und 5 gesunde Frauen (P 2-6) im Alter von 23-53 Jahren (n=7), die im Rahmen einer Abdominalplastik (Bauchdeckenstraffung) operiert wurden. Die Versuche wurden am Tag vor und unmittelbar im Anschluss an die Operation nach dem jeweils gleichen Protokoll durchgeführt.

Um das antioxidative Potential zu bestimmen, wurde eine Raman-spektroskopische Messung nach dem oben beschriebenen Schema durchgeführt, um die Carotinoide der Haut zu detektieren. Die Messung erfolgte prae- und postoperativ vor UV-Bestrahlung und im Anschluss 30, 60 und 90 Minuten nach UV-Bestrahlung. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um die Kinetik des antioxidativen Potentials festzuhalten und zu vergleichen.

Die Messungen des antioxidativen Potentials konnten nur an sechs der sieben ProbandInnen durchgeführt werden, da bei Proband 1 keine Carotinoide nachweisbar waren. Denkbare Gründe hierfür werden in der Diskussion erörtert (s. S. 65).

Zur Messung der Katalase-Aktivität wurden am Tag vor und am Tag der Operation jeweils 20 aufeinander folgende Tape Strips an einer vorher markierten Stelle am Bauch genommen. Diese Messungen erfolgten an allen ProbandInnen.

Die transkutane Sauerstoffmessung erfolgte ebenfalls prae- und postoperativ. Die Messungen erfolgten an sechs ProbandInnen. Proband 7 nahm an dieser Messung aus organisatorischen Gründen nicht teil.

Alle *in vitro*-Messungen erfolgten an Bauchhaut, die im Rahmen der Operation exzidiert worden war.

Für die Untersuchungen lag die Genehmigung der Ethik-Kommission der Charité vor.

4.2. Raman-Spektroskopie

4.2.1. Absorptionseigenschaften von Carotinoiden

Die Absorptionsspektren von β-Carotin und Lycopin haben differierende Absorptionsmaxima, wodurch die Streuungsstärke bei einer gleichzeitigen Anregung von 488 nm und 514,5 nm unterschiedlich ist. Lycopin absorbiert bei 514,5 nm bis zu sechsmal stärker als β-Carotin. Jedoch können aufgrund der sehr ähnlichen Absorptionsmaxima andere Carotinoide ebenso einen Einfluss auf die Raman-Messungen ausüben.

Unter anderem auf Grundlage der Veröffentlichung von DARVIN *et al.* (2006 b) wurden die Versuche der vorliegenden Arbeit aufgebaut.

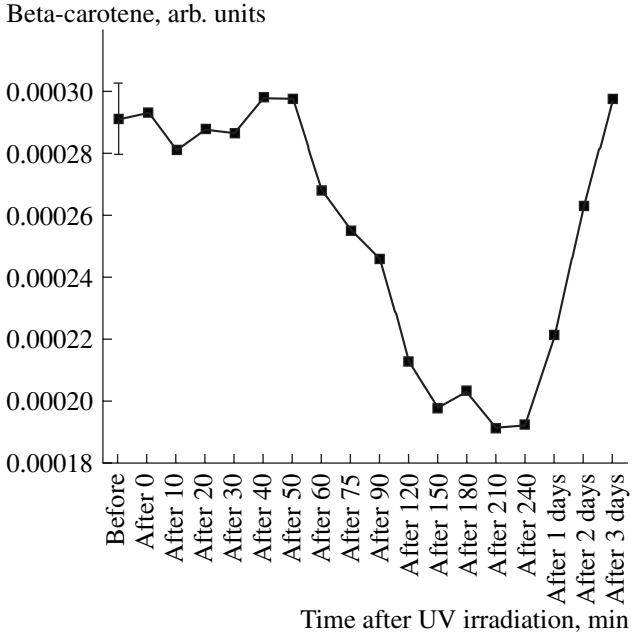


Abb. 7: Abbau und Regeneration von β-Carotin nach UV-Exposition der Haut am Menschen (DARVIN et al., 2006 b)

In den in Abbildung 7 umrissenen Messungen am Menschen *in vivo* wird deutlich, dass die Abnahme der Aktivität von β-Carotin nicht unmittelbar nach UV-Exposition beginnt. Das Gewebe benötigt einen gewisse Zeit, um auf die Noxen zu antworten. Diese Zeitspanne beträgt in den zitierten Versuchen 30-90 Minuten. Nach ungefähr einem Tag beginnt die Haut, sich zu regenerieren.

4.2.2. Vorbereitung der Haut

4.2.2.1. Euterhaut

Die Haut von 14 untersuchten Eutern wurde direkt nach der Schlachtung vom Schlachthof (Fleischerei Staske, Berlin Altglienicke) abgeholt und unter Kühlung zum Labor transportiert. Informationen über Art und Länge des Transportes zum Schlachthof, Laktationszustand, Alter und Haltung der Tiere waren nicht erhältlich. Zwischen dem Tod des Tieres und dem Beginn der Untersuchungen vergingen 2-4 Stunden. Die Haut des Euters wurde unter lauwarmem Wasser gesäubert, anschließend wurden ungefähr 10x10 cm große Areale unpigmentierter Haut zu Versuchzwecken herausgetrennt. Das Unterhautfettgewebe wurde mit einem Skalpell abgeschnitten. Damit wurde eine bessere Auflagefläche für das Handstück des Raman-Lasers geschaffen und so die Untergrund-Fluoreszenz der Haut deutlich verringert. Die Haare wurden mit einem Einmalrasierer bis auf die in der Haut verbliebenen Haarwurzeln entfernt, da eine Ablenkung des Laserstrahls Messfehler verursacht hätte. Nach weitgehender Entfettung durch lauwarmes Wasser und Rasur wurden die Hautstücke noch einmal unter fließendem Wasser abgespült. Eine Desinfektion erfolgte nicht. Während des Messzeitraumes, der im Durchschnitt weitere 2 Stunden dauerte, wurden die Hautstücke in einem dunklen, kühlen Raum bei ungefähr 17°C gelagert.
Für die Untersuchungen lag die Genehmigung des Veterinäramtes Treptow (Berlin) vor.

4.2.2.2. Haut des Menschen

Bei den prae-operativen Untersuchungen wurden Untersuchungsareale am Mittelbauch gewählt, an denen nur spärlicher Haarwuchs vorhanden war und welche im Laufe der nachfolgenden Operation entfernt wurden. Die Areale wurden vor der Messung mit einem feuchten Tuch und Sprühdesinfektion gereinigt.
Die Haut für die post-operativen Versuche wurde direkt aus dem Operationssaal in das Versuchslabor transportiert. Zwischen Exzision und Beginn der Untersuchungen vergingen ungefähr 30 Minuten. Im Labor wurde die Haut sorgfältig unter fließendem lauwarmem Wasser gereinigt, das Unterhautfett wurde entfernt. Während des Messzeitraumes wurden die Hautstücke in einem dunklen, kühlen Raum bei ungefähr 17°C gelagert.

Auch für diese Untersuchungen lag die Genehmigung der Ethik-Kommission der Charité vor.

4.2.3. Experimenteller Aufbau

Die simultane Anregung der Carotinoide erfolgt durch einen Argonlaser (Laser 2000 GmbH), welcher gleichzeitig auf zwei Wellenlängen (488 nm und 514,5 nm) emittiert. Die Strahlung wird durch eine optische Quarzfaser zu einem Handstück geleitet. In diesem wird das Licht gefiltert und auf die Haut projiziert. Das Raman-Signal wird von hier durch ein zweites Abbildungssystem erfasst und in ein Bündel aus sechs optischen Fasern zu einem Spektroskop (Horiba Jobin Yvon Frankreich, MSL TNA 2) geleitet. Das entstandene Spektrum wird von einer CCD-Kamera (elektronische Kamera mit CCD-Chips, Stresing GmbH, Berlin S7031-0908) aufgenommen und auf einen PC exportiert (Abb. 8). Die Messzeit beträgt 10-15 Sekunden.
Die Eindringtiefe des Laserstrahls beträgt 150 µm. Durch die geringe Tiefe wird gewährleistet, dass die Antioxidantien in den Blutgefäßen der Dermis von der Messung ausgeschlossen werden. Um den Einfluss von Inhomogenitäten und Pigmentation der Haut zu minimieren, ist die Grundfläche des Lasers, die auf der Haut aufliegt, auf 6,5 mm ausgelegt.

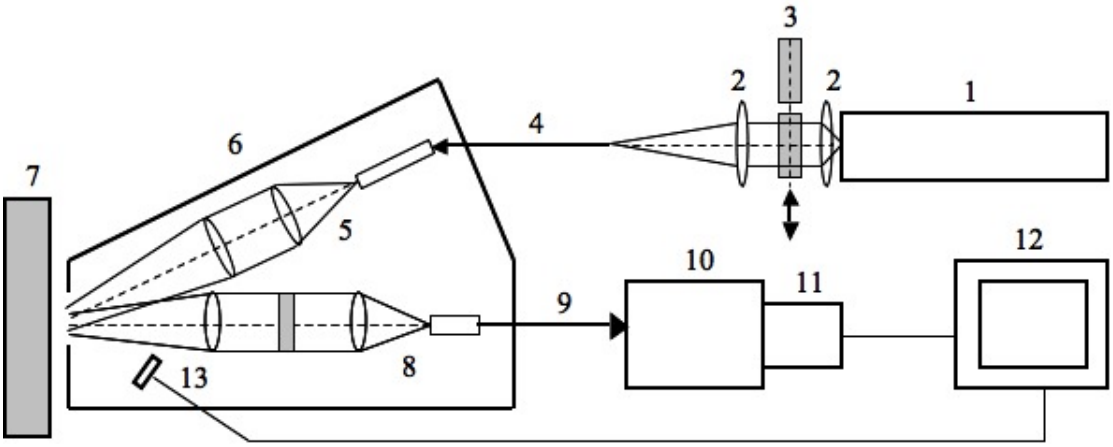


Abb. 8: Raman-spektroskopischer Messaufbau: (1) Ar-Laser, (2) Linsen, (3) Filter (4,9) optische Fasern, (5) Anregungskanal, (6) optisches Bildsystem, Beleuchtungseinheit, (7) Messobjekt (Haut), (8) Einheit zum Empfangen optischer Signale, (10) Spektroskop, (11) CCD-Kamera, (12) Computer, (13) Photodetektor (DARVIN et al., 2013)

4.2.4. UV-Bestrahlung

Die UV-Bestrahlung erfolgte mit einem UVB-Strahler (dermalight® Erythemtester, Dr. Hönle Medizintechnik). Die Haut wurde abhängig vom Hauttyp mit einer Dosis von ungefähr 30 mJ/cm^2 bestrahlt, die Bestrahlungszeit betrug bei ProbandInnen des Hauttyps II 100 Sekunden. Diese Zeit reichte aus, um ein leichtes Erythem zu erzeugen.

4.2.5. Ablauf der Messung

Nach Entfernen des Unterhautgewebes der exzidierten Haut und Entfetten des Gewebes wurde das Handstück des Raman-Lasers auf die Messstelle aufgesetzt und mit einem wasserlöslichen Filzstift markiert. Bei jedem Versuchsdurchgang erfolgten 3 Messungen, aus denen jeweils der Mittelwert gebildet wurde. Dieser Mittelwert diente als Grundlage für die weitere Auswertung.

4.3. Katalase-Aktivität

4.3.1. Vorbereitung der Haut

4.3.1.1. Euterhaut

Die Messung der Katalase-Aktivität erfolgte an 6 Eutern, da diese Messungen zu einem späteren Zeitpunkt in die Arbeit aufgenommen wurden. Anamnestische Daten waren nicht erhältlich (s. 4.2.2.1.). Die Zeit von Schlachtung und Transport bis zur Verarbeitung des Probenmaterials entsprach der Beschreibung in Kapitel 4.2.2.1. Im Untersuchungslabor wurde auch bei diesen Versuchen die Haut der Euter unter lauwarmem Wasser gereinigt, dann eine Gewebeprobe von circa 10x10 cm herausgeschnitten. Im Anschluss wurden die Haare mit einer Schere auf ungefähr 1 mm gekürzt. Eine Entfettung oder Desinfektion fand nicht statt. Während des

Messzeitraumes wurden die Hautstücke in einem dunklen, kühlen Raum bei ungefähr 17°C gelagert.

4.3.1.2. Schweineohrhaut

Die Ohren (n=6) wurden auf dem Schlachthof unmittelbar nach dem Entbluten, aber vor dem Brühen abgetrennt und gekühlt zum Labor transportiert. Auch hier standen keine Daten über Transport, Rasse, Alter und Haltung der Tiere zur Verfügung. Das Probenmaterial wurde innerhalb 3-5 Stunden für die Versuche weiter verwendet. Die weitere Verarbeitung entsprach derjenigen der Kuheuter.

4.3.1.3. Haut des Menschen

Für die Messungen an der Probandin/am Probanden selbst wurde die Haut mit einem feuchten Tuch gereinigt. Die Abrisse wurden an einer Stelle des Bauches mit möglichst spärlicher Behaarung entnommen.
Post-operativ wurde die gleiche Haut wie für die Detektion der Antioxidantien verwendet. Auch hier vergingen also ungefähr 30 Minuten zwischen Exzision und Weiterverarbeitung der Haut. Ebenso wurden Hautareale von 10x10 cm Durchmesser entnommen, die unter fließendem Wasser gereinigt wurden. Die Lagerung während der Messungen entsprach den oben genannten Bedingungen.

4.3.2. Messung der Katalase-Aktivität mit Hilfe der Abrissmethode

Die Methode basiert auf der Fähigkeit der Katalase, Methanol als Wasserstoffdonor zu nutzen. In Folge dieser Reaktion wird Formaldehyd gebildet (JOHANSSON, BORG, 1988). Die hier aufgeführte Arbeitsweise ist angelehnt an den Nachweis von Katalase in Tape Strippings des Stratum Corneums (SC), wie beschrieben in HELLEMANNS *et al.* (2003).

4.3.2.1. Tape Strip-Abrisse

Bei jeder Probandin/jedem Probanden wurden sowohl prae- (am Abend vor der Operation) als auch post-operativ (innerhalb einer Stunde nach der Operation)

jeweils 20 aufeinander folgende Tape Strip-Abrisse (D-Squame®, CuDerm, Dallas, TX, USA) an einer immer gleichen, definierten Stelle am Bauch entnommen. Die runden, im Durchmesser 14 mm großen Strips wurden auf das gereinigte Areal der Haut geklebt. Die definierte Stelle wurde mit Punkten, auf der Haut am Rande des Tapes aufgetragen, markiert (Abb. 9). Die Tapes wurden an immer derselben Stelle nacheinander abgezogen, um mit jedem Abriss tiefere Schichten des Stratum corneum zu erreichen. Um eine bessere Haftung zu erzielen, wurde bei jeder Versuchsanordnung eine Gummirolle mit einem Metallkern von derselben Person 10mal auf dem Tape hin- und hergerollt. Das Tape wurde mit einer Pinzette von der Haut abgerissen und auf einen Metallring (Innendurchmesser 14 mm) geklebt.
Bei Kuheuter und Schweineohr wurden nur am toten Gewebe Proben entnommen. Dies erfolgte nach dem gleichen Schema wie oben für die Haut des Menschen beschrieben.

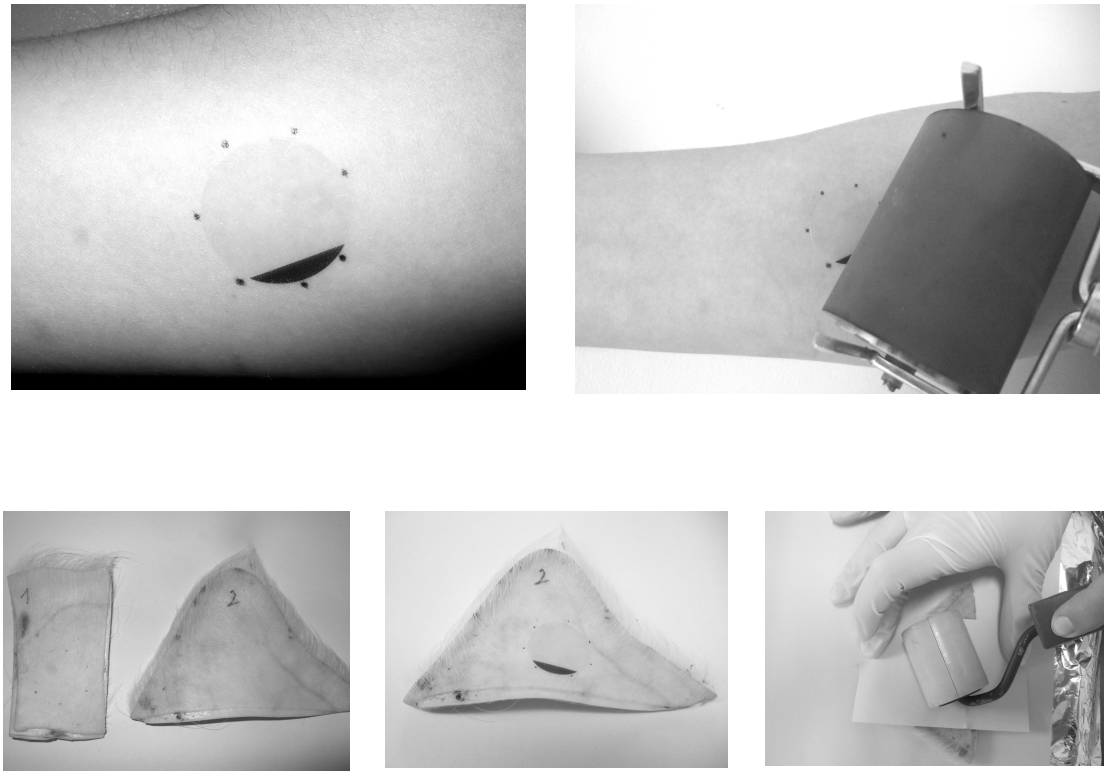


Abb. 9: Bildliche Darstellung der Tape Strip-Abrissmethode an der Haut des Menschen (oben) und des Tieres (unten, Schweineohr)

4.3.2.2. UV/VIS-Messungen

Um mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie (ultraviolettes/sichtbares Licht) die Pseudoabsorption der Korneozyten zu bestimmen, wurden die Tape Strips auf Metallringe (innerer Durchmesser 14 mm) geklebt. Die Messungen wurden mit einem Referenzstrahl-Spektrometer (Lambda 20, PerkinElmer, Überlingen, Deutschland) bei 500 nm durchgeführt.

4.3.2.3. Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinkonzentration auf den Tape Strips wurde mit dem SquameScan 850 (Heiland Electronic GmbH, Wetzlar, Germany) bestimmt. Aufgrund einer guten Korrelation mit der gemessenen Pseudoabsorption der Korneozyten (Abb. 10), konnte der Proteingehalt im weiteren Verlauf der Messungen kalkuliert werden.

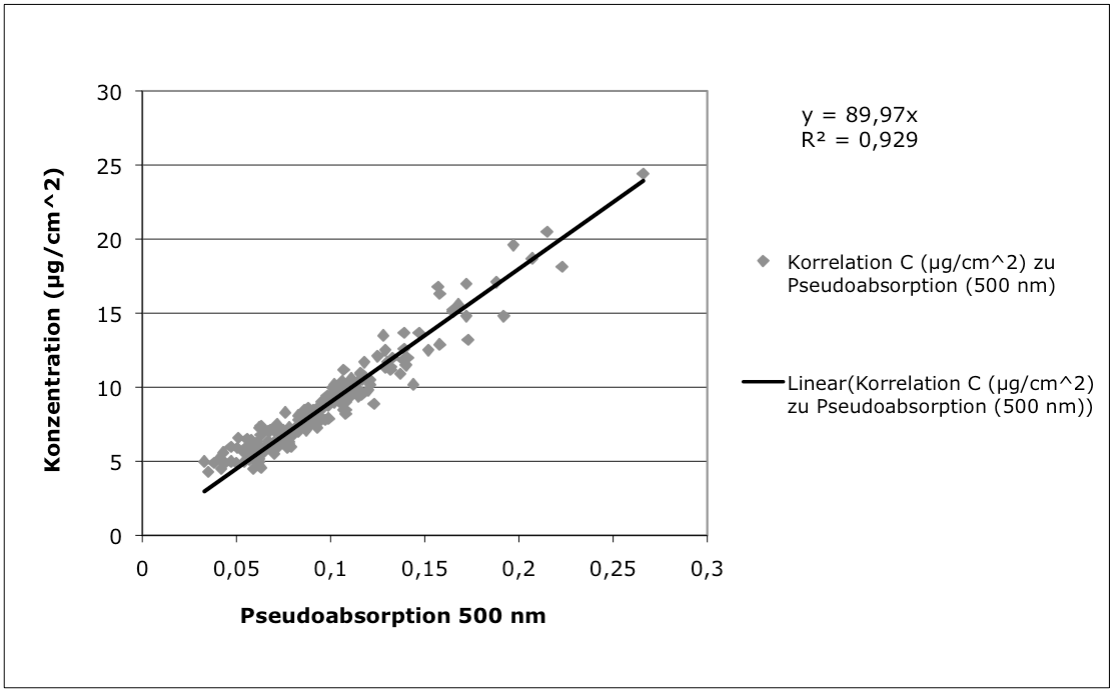


Abb. 10: Korrelation der Proteinkonzentration und der Pseudoabsorption auf Tape Strips

4.3.2.4. Messung der Katalase-Aktivität

Die D-Squame®-Tape Strips werden auf die Öffnungen einer 24-Mikrotiterplatte geklebt, die eine Lösung aus PBS-Puffer (pH 7, Dulbecco's PBS, PAA Company), Methanol (5,9 mol/l, Merck, Darmstadt, Deutschland) und Wasserstoffperoxid (4,2

mmol/l, Fluka) enthält. Die Tapes werden zusätzlich durch einen Deckel fest fixiert und auf dem Kopf stehend unter Schütteln während 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird die Reaktion durch Kaliumhydroxid (7,8 mol/l, Fluka Pellets) beendet. Um das entstandene Formaldehyd sichtbar zu machen, wird 4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) als Chromogen genutzt. Diese Verbindung bildet mit Formaldhyd farblose Komplexe. Die Inkubation mit Purpald erfolgt während 10 Minuten, in denen die Reaktion gänzlich abgeschlossen werden kann (JOHANSSON, BORG, 1988). Bei der folgenden Oxidation mit Kaliumperiodat (Sigma-Aldrich) färben sich die entstandenen Komplexe lila. Das komplette Absorptionsvermögen wird nahezu unmittelbar erreicht (JOHANSSON, BORG, 1988). Die Lösungen werden direkt im Anschluss in eine 96-Mikrotiterplatte umpipettiert und bei 530 nm im ELISA Reader (MRX-Revelation, Dynex Technologies, Berlin, Deutschland) spektroskopisch quantifiziert. Eine Katalase-Einheit (U) ist definiert als die Menge Enzym, durch die 200 µmol/l Formaldehyd unter den oben genannten Bedingungen katalysiert werden (HELLEMANS *et al.,* 2003).

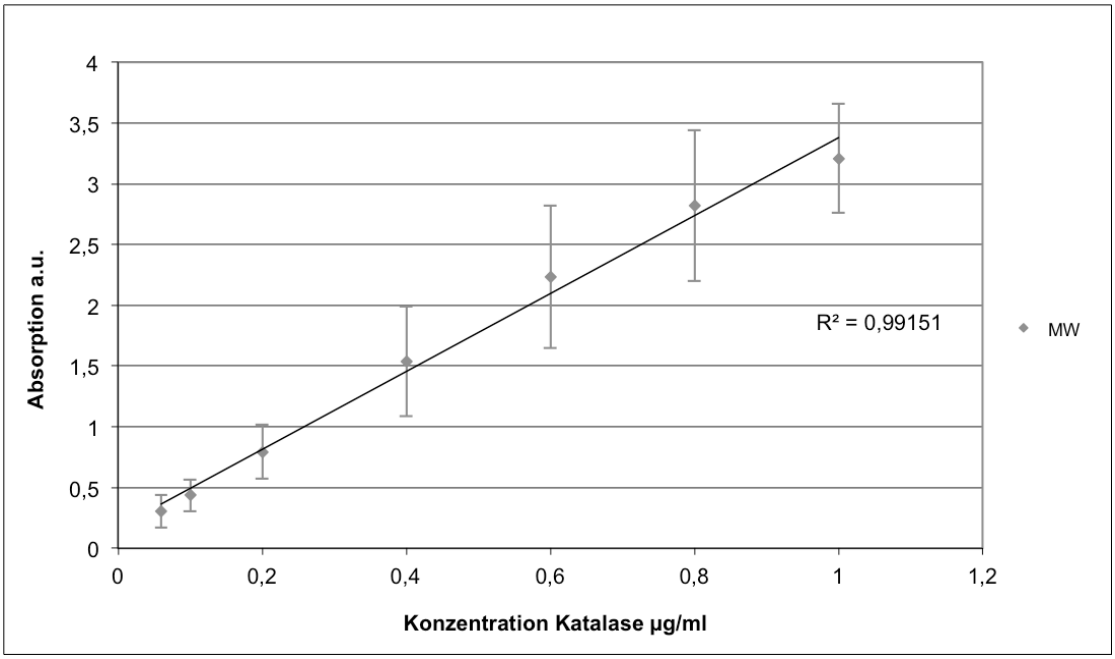


Abb. 11: Katalase in verschiedenen Konzentrationsstufen im Verhältnis zur Absorption als Standardreihe

Für die Standardreihe wurde Katalase in unterschiedlichen Konzentrationen in Pufferlösung inkubiert und anschließend spektroskopisch bei 530 nm quantifiziert. Abb. 11 skizziert die Korrelation der Absorption zur Konzentration. Die Kontrollen

wurden zur Sicherung der Werte zehnmal durchgeführt. Weitere 12 Messungen wurden mit der Konzentrationslösung von 0,4 µg/mol als Kontrollwert vorgenommen, um eine Qualitätssicherung zu garantieren. Die Ergebnisse liegen alle im 2fachen Bereich der Standardabweichung der Standardreihe (Abb. 12).

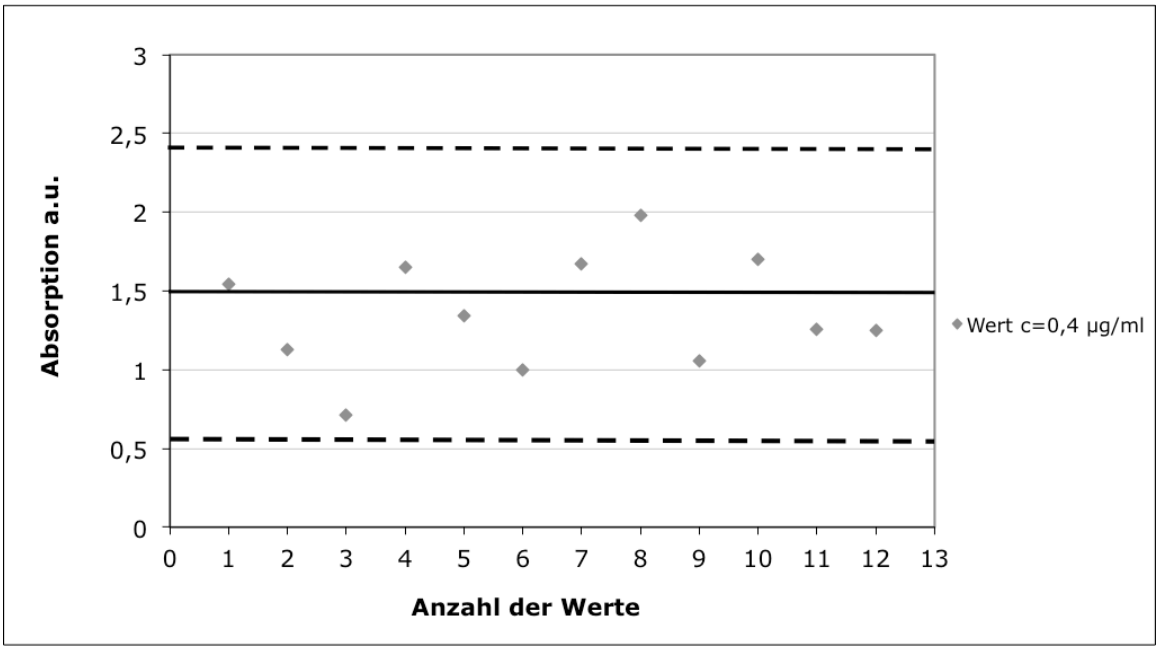


Abb. 12: Kontrollmessungen bei c=0,4 µg/ml, die gestrichelten Linien liegen bei 2xSTDEV, gemessen vom Mittelwert

4.4. Transkutane Sauerstoffmessung

4.4.1. Vorbereitung der Haut

Die Sauerstoffmessungen wurden an der Haut des Menschen vorgenommen. Es wurde eine Stelle des Bauches gewählt, die annähernd haarlos ist. Diese wurde mit einem feuchten Tuch und nicht rückfettender Sprühdesinfektionslösung entfettet und gereinigt.

4.4.2. Messprinzip und Ablauf der Messung

Die transkutane Sauerstoffmessung erfolgte mit einem transkutanen Messgerät (TCM 4 Series, Radiometer GmbH, Willich, Deutschland, Abb. 13). Die Elektrode wird hierbei hermetisch abgeschlossen auf die entfettete Haut geklebt. Bei der

Messung wird O_2 verbraucht, sie dauert so lange, bis kein Sauerstoff mehr im Messbereich nachweisbar ist. Die Messtemperatur beträgt 42°C. Durch die hohe Temperatur werden Barrieremembranen der Haut zerstört und dadurch porös. Im durchbluteten Gewebe diffundiert O_2 aus den tieferen Hautschichten an die Oberfläche. Dieser kann im System wieder gemessen werden. In Geweben, in denen kein Blutfluss mehr stattfindet, also kein Sauerstoff mehr vorhanden ist, ist eine dementsprechende Diffusion nicht zu erwarten. Im System sollte den Erwartungen zufolge also kein Wiederanstieg der mmHg gemessen werden.

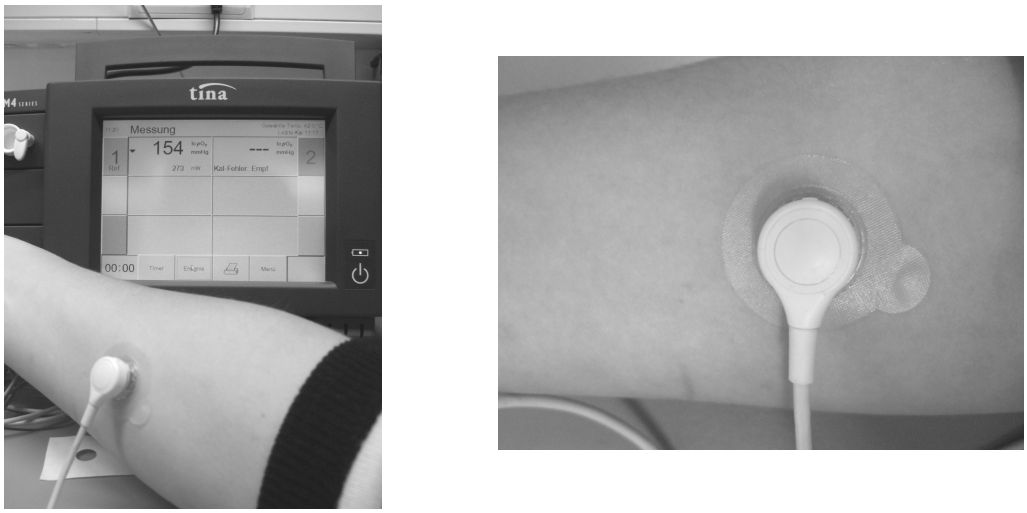


Abb. 13: Messaufbau der transkutanen O_2-Messung, links im Bild das transkutane Messgerät, auf dem Bildschirm die momentane O_2-Konzentration in mmHg, rechts die auf die Haut aufgeklebte Mess-Elektrode

4.5. Statistikprogramme

Die Gesamtheit der Messungen wurde verbunden und nicht normalverteilt (nicht parametrisch) nach “Friedman“ prae-op und post-op getestet. Die statistische Signifikanz der Einzelparameter wurde mit dem “Wilcoxon-Rangsummentest“ durchgeführt.

Die Korrelation der Carotinoid-Konzentration prae-op und post-op wurde nach “Pearson“ getestet.

5. Ergebnisse

5.1. Messungen der Carotinoide mittels Raman-Spektroskopie

5.1.1. Messungen am exzidierten Kuheuter

Im ersten Teil der Studie wurden Raman-spektroskopische Messungen am exzidierten Kuheuter vor und nach UV-Exposition vorgenommen. Diese Untersuchungen erfolgten an 14 Eutern. Nach drei Minuten Bestrahlung mit UV-Licht wurden jeweils im Abstand von 30, 60, 120 Minuten Messungen der relativen Carotinoid-Konzentration vorgenommen. In Abb. 14 sind die Verlaufskurven aller Euter gegen eine Zeitachse aufgetragen. Die Ausgangswerte (T0) vor Bestrahlung zeigen eine Bandbreite von 0,00078 bis 0,0021, wobei sich die Kurvenverläufe im Laufe von 120 Minuten sehr einheitlich darstellen. Es ist kein wesentlicher Abfall des antioxidativen Potentials festzustellen (0,98%).

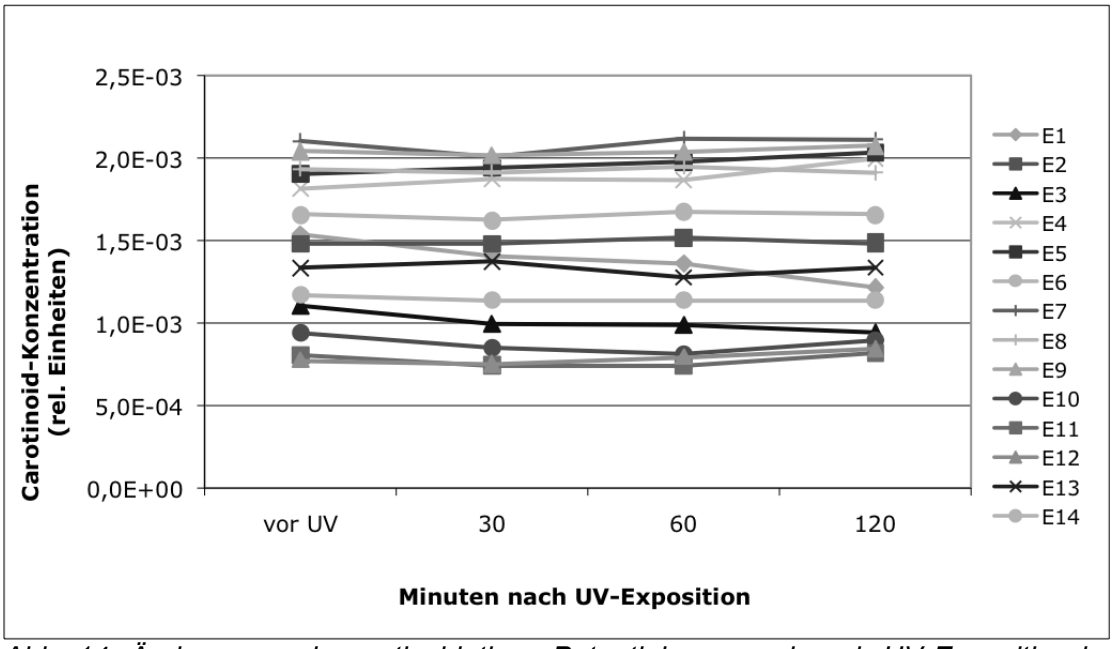


Abb. 14: Änderungen des antioxidativen Potentials vor und nach UV-Exposition im Verlauf von 30, 60, 120 Minuten

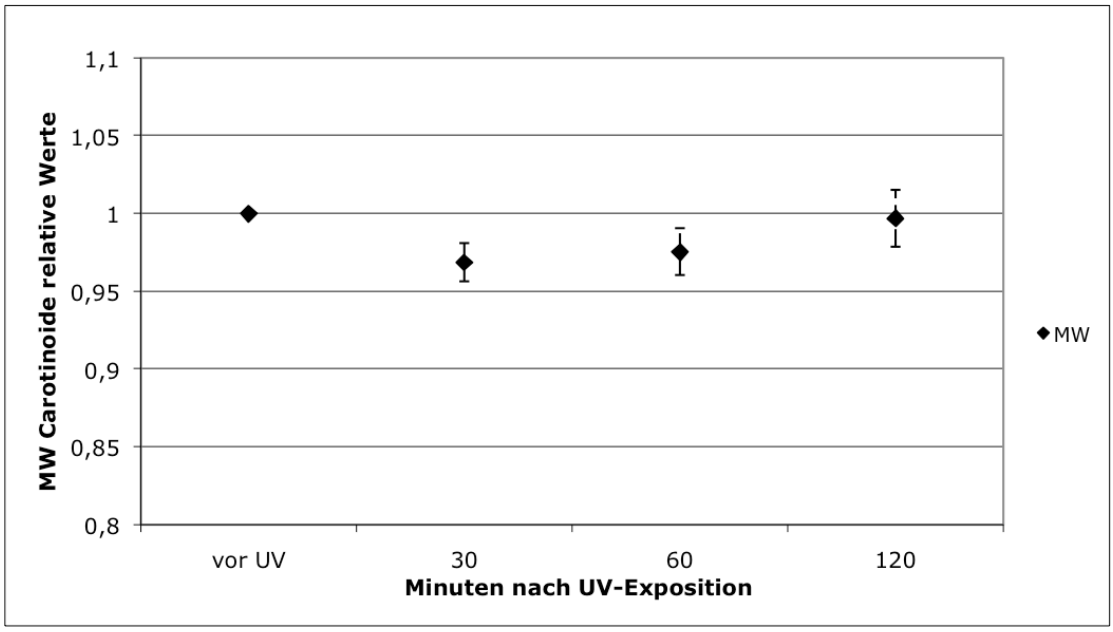


Abb. 15: Mittelwerte mit Standardfehlern aller 14 Kuheuter mit den Änderungen des antioxidativen Potentials vor und nach UV-Exposition im Verlauf von 30, 60, 120 Minuten bezogen auf den Ausgangswert vor Bestrahlung mit UV-Licht.

In Abb. 15 sind die Mittelwerte aller Kuheuter gegen die Zeitachse vor UV-Exposition bis 120 Minuten nach Bestrahlung mit den dazugehörigen Standardfehlern aufgetragen. Als Standardfehler (SE) wird der mittlere Fehler des Mittelwertes bezeichnet. Hier wird noch einmal verdeutlicht, dass am exzidierten Kuheuter nach UV-Bestrahlung kein Abfall des antioxidativen Potentials zu vermerken ist. Die Balken der Standardfehler auf der y-Achse zeigen das Spektrum der Carotinoid-Konzentration bei den 14 verschiedenen Proben.

Tabelle 1 skizziert exemplarisch die Einzeldaten der Messungen an den 14 verschiedenen Kuheutern vor UV-Exposition, um so die Abweichungen der Werte an derselben Hautstelle aufzuführen. Die prozentuale Standardabweichung beträgt hier höchstens 1,33%. Die Messungen von Proben an gleicher Stelle nach Bestrahlung stimmen überein.

Messung	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
M1	0,001541	0,001495	0,001100	0,001798	0,001907	0,001659	0,002092
M2	0,001536	0,001485	0,001099	0,001806	0,001910	0,001656	0,002116
M3	0,001534	0,001466	0,001116	0,001838	0,001892	0,001660	0,002096
MW	0,001537	0,001482	0,001105	0,001814	0,001903	0,001658	0,002101
STDEV	**0,000004**	**0,000015**	**0,000010**	**0,000021**	**0,000010**	**0,000002**	**0,000013**
STDEV %	**0,23**	**0,99**	**0,86**	**1,17**	**0,51**	**0,13**	**0,61**
Messung	**E8**	**E9**	**E10**	**E11**	**E12**	**E13**	**E14**
M1	0,001925	0,002041	0,000954	0,000802	0,000779	0,001331	0,001164
M2	0,001936	0,002045	0,000932	0,000807	0,000764	0,001335	0,001164
M3	0,001932	0,002042	0,000932	0,000810	0,000783	0,001338	0,001179
MW	0,001931	0,002043	0,000939	0,000806	0,000776	0,001335	0,001169
STDEV	**0,000006**	**0,000002**	**0,000012**	**0,000004**	**0,000010**	**0,000004**	**0,000009**
STDEV %	**0,29**	**0,10**	**1,33**	**0,51**	**1,28**	**0,26**	**0,74**

Tab. 1: Werte der Einzelmessungen an derselben Hautstelle an 14 Eutern, zusätzlich der MW, STDEV und STDEV in %

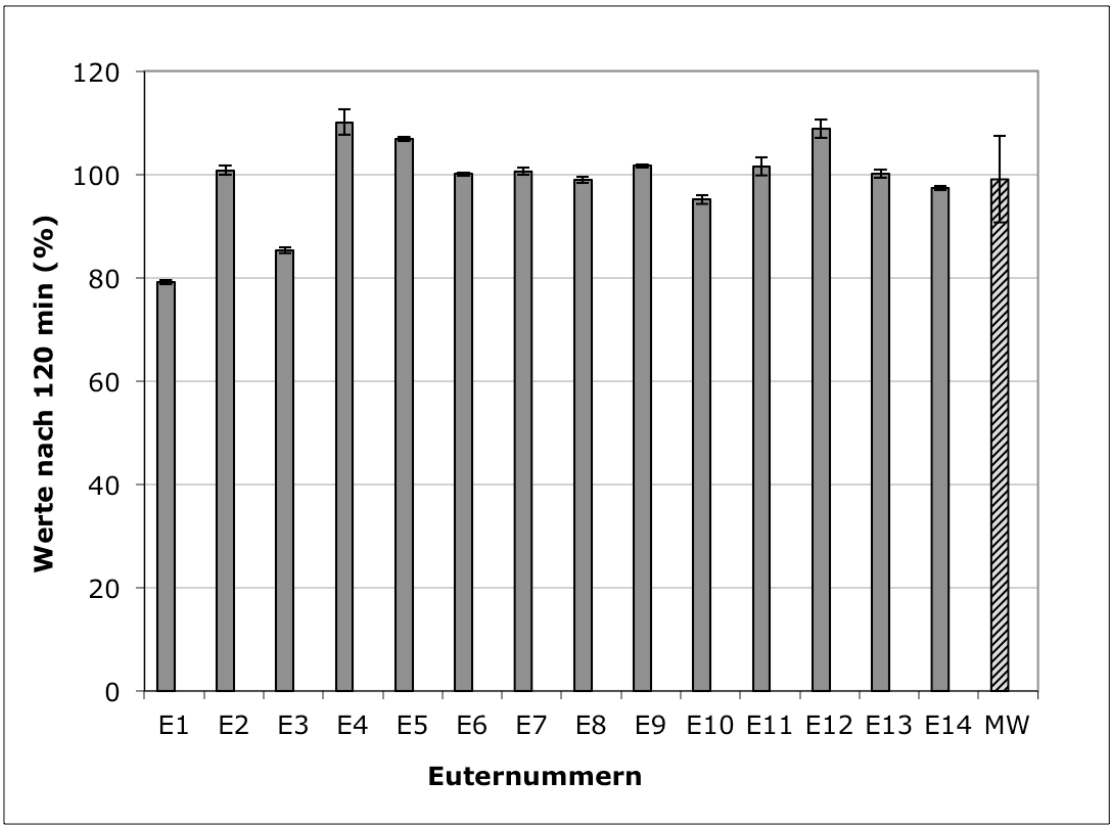


Abb. 16: Carotinoid-Abfall an 14 Eutern innerhalb 120 min nach UV-Exposition, 100% entspricht der Konzentration vor Bestrahlung (T0)

Abb. 16 stellt den Verlust des antioxidativen Potentials in Prozent innerhalb 120 Minuten nach Aussetzen der Probe mit UV-Licht dar. Der Wert 100% stellt den Wert der Carotinoid-Konzentration vor Schädigung des Potentials durch die Noxe dar. Die Balken weisen den Wert 120 Minuten nach Bestrahlung in Prozent auf, die Spanne

zwischen Linie und Balken zeigt den Abfall des Carotinoid-Gehaltes im Stratum corneum. Die Fehlerbalken der y-Achse zeigen die Abweichungen an einer Hautstelle bei 3 Messungen aus denen ein Mittelwert gebildet wurde. Diese Abweichungen sind exemplarisch aus Gründen der Übersichtlichkeit in Tabelle 1 als Rohdaten zusammengefasst.

5.1.2. Messungen an der Haut des Menschen

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Situation bezüglich der Änderungen des antioxidativen Potentials am Menschen *in vivo* und *in vitro* untersucht. Hiermit sollte ein besserer Bezug zu den Gegebenheiten am Euter hergestellt werden. Ziel dieser Experimente war es, einerseits die *in vitro*-Modelle Mensch/Euter, andererseits das Modell Mensch *in vivo* und *in vitro* zu vergleichen.

Die Versuche wurden an 7 ProbandInnen durchgeführt, die im Rahmen einer Abdominalplastik operiert wurden. Proband 1 wurde aus den weiteren Messungen bezüglich des Carotinoid-Nachweises ausgeschlossen, da deren Nachweis in dessen Haut nicht möglich war (s. Diskussion s. 65). Die Messungen der anderen ProbandInnen wurden jeweils prae-op und post-op an Bauchhaut vorgenommen. Die Ergebnisse fielen sehr unterschiedlich aus, wie die folgenden Grafiken und Tabellen verdeutlichen werden.

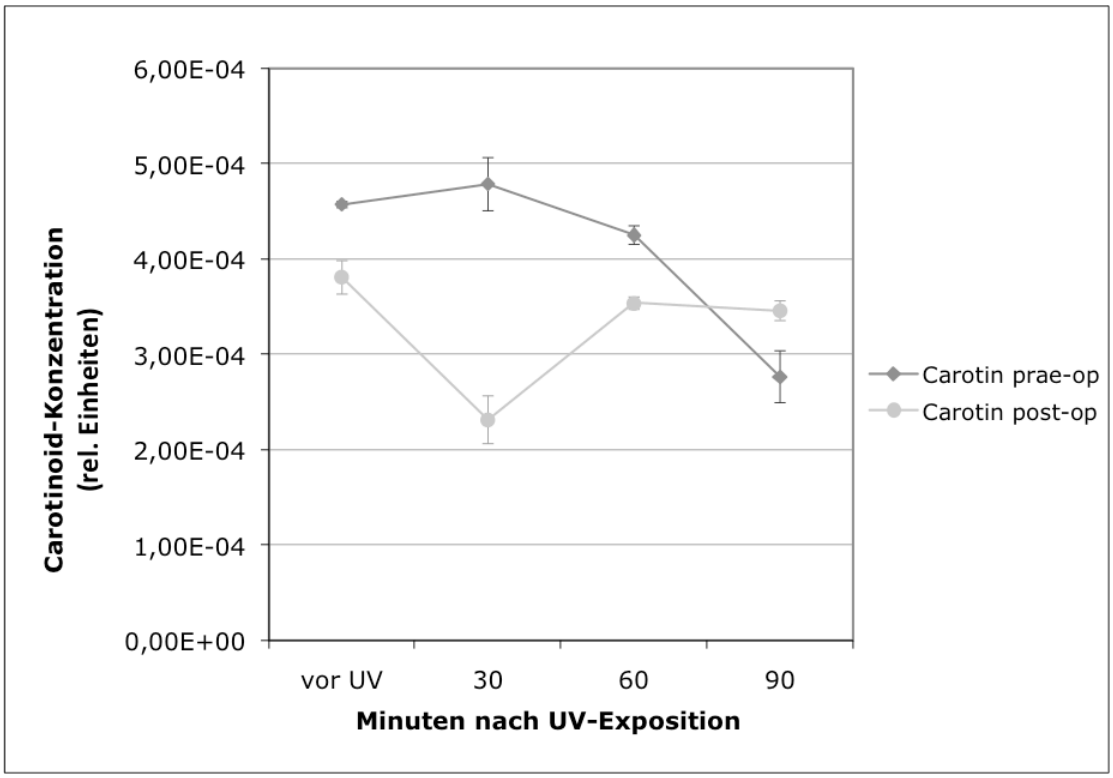


Abb. 17: P2 Vergleich Kurven vor und nach UV-Exposition Carotinoide prae- und post-op

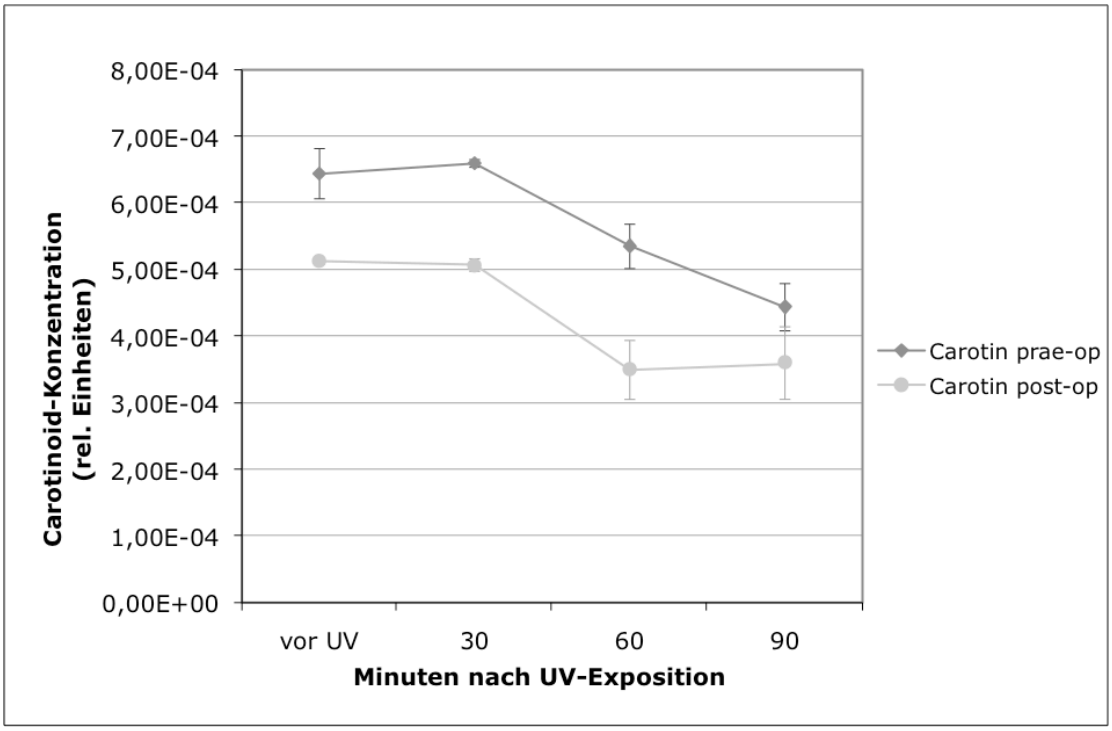


Abb. 18: P3 Vergleich Kurven vor und nach UV-Exposition Carotinoide prae- und post-op

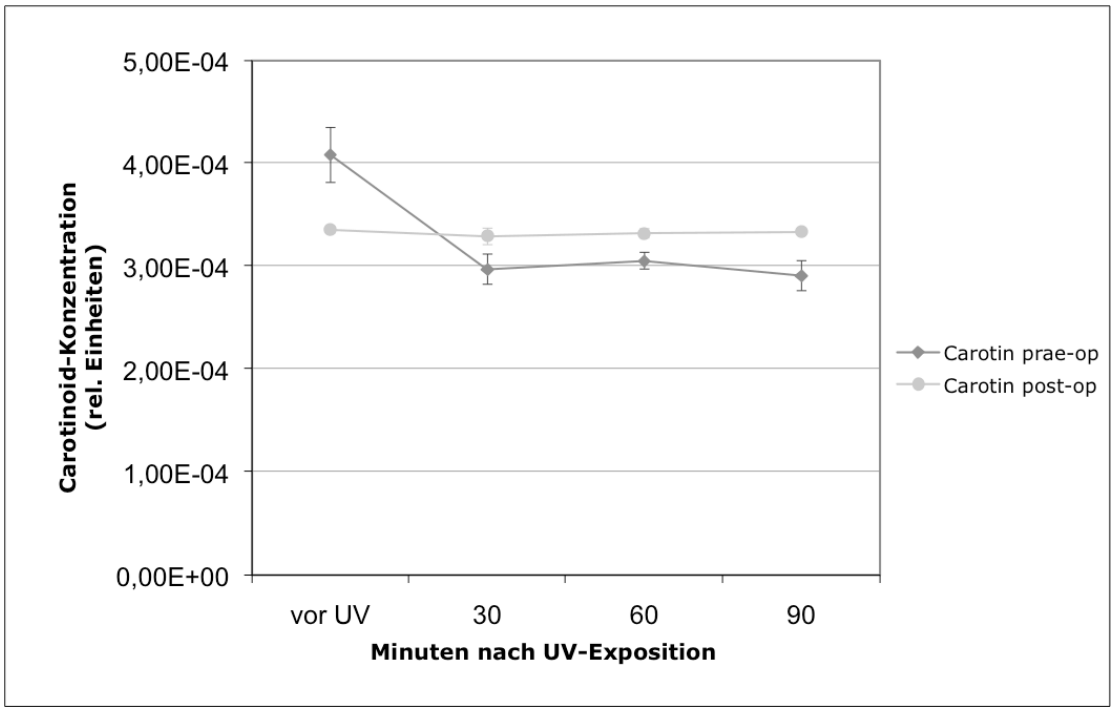


Abb. 19: P4 Vergleich Kurven vor und nach UV-Exposition Carotinoide prae- und post-op

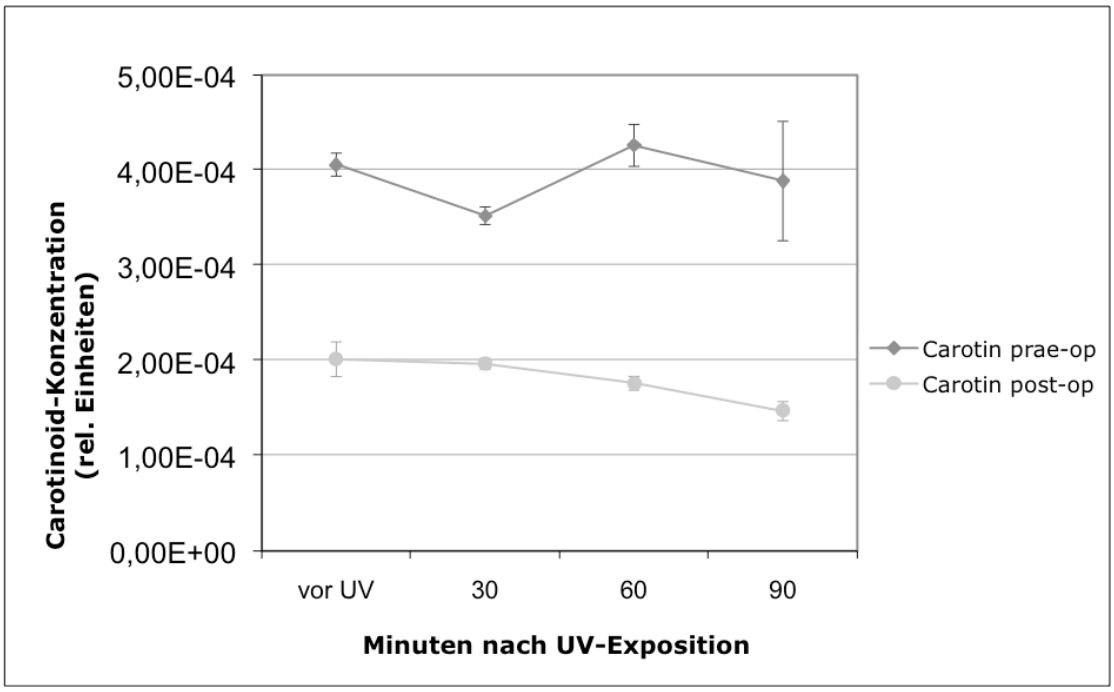


Abb. 20: P5 Vergleich Kurven vor und nach UV-Exposition Carotinoide prae- und post-op

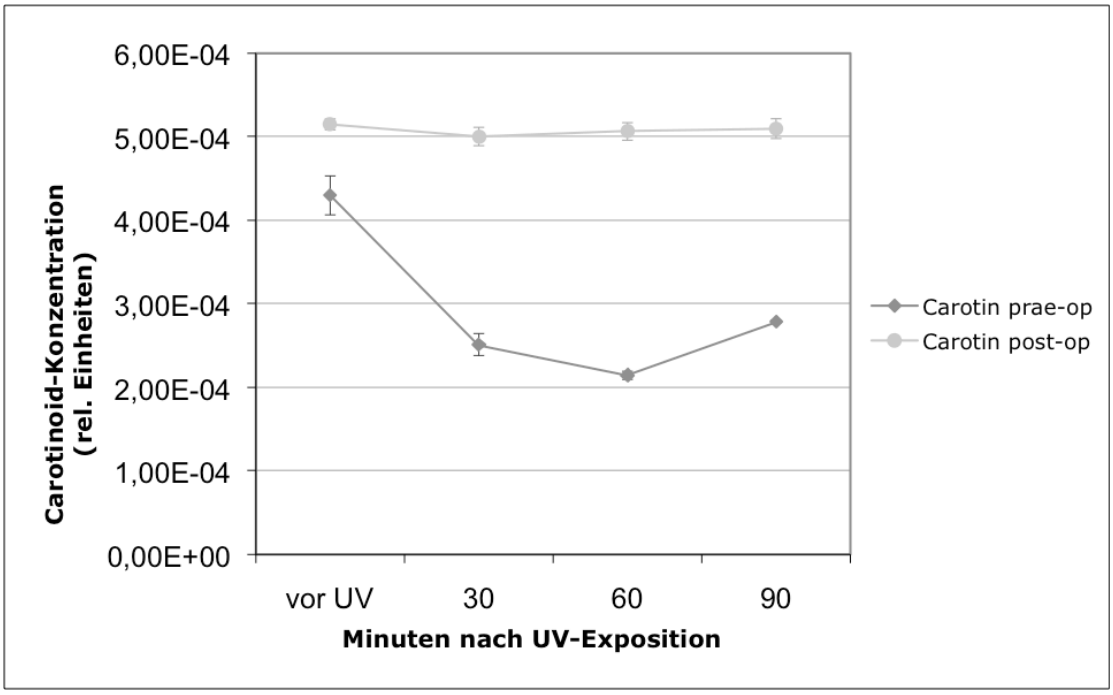


Abb. 21: P6 Vergleich Kurven vor und nach UV-Exposition Carotinoide prae- und post-op

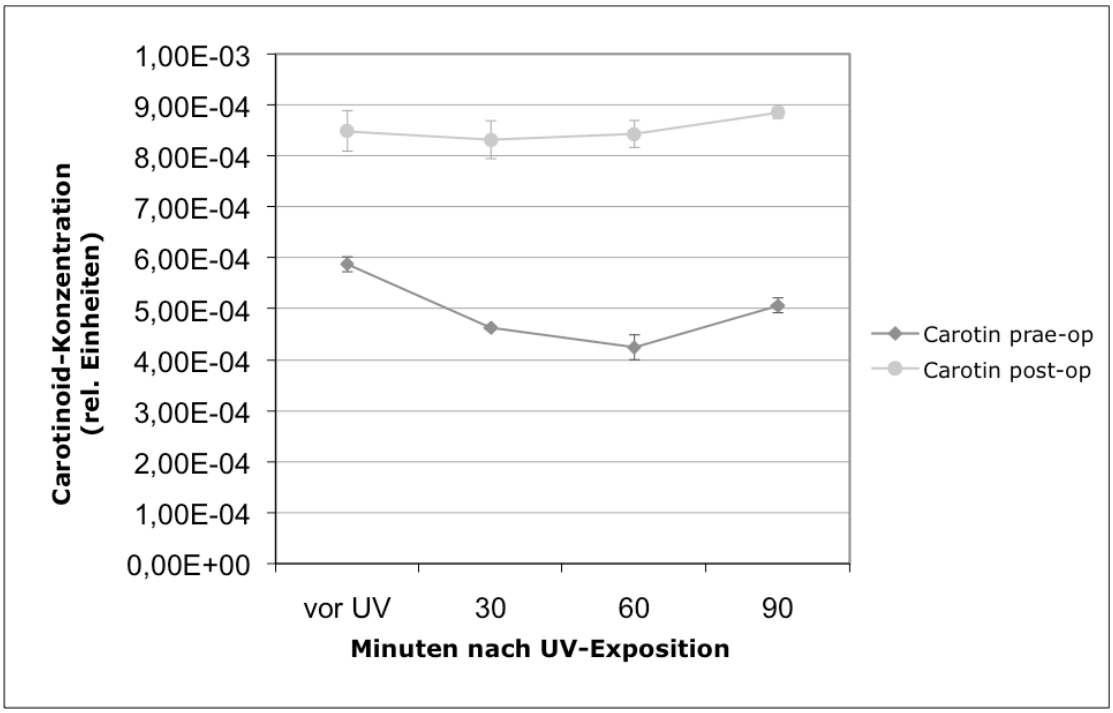


Abb. 22: P7 Vergleich Kurven vor und nach UV-Exposition Carotinoide prae- und post-op

Abb. 17-22: Abfall des AP bei Probanden 2-7, Messungen vor UV-Exposition und danach im Verlauf von 30, 60 und 90 min. Vergleich prae-op und post-op.

Bei P2 ist das Absinken des AP prae-op sehr deutlich, nach 90 min lässt sich in Abb. 17 ein Abfall von 39% erkennen, post-op hingegen ist der Abstieg des AP geringer (9,2%). Auch der Ausgangswert (T0) der Messung vor UV-Exposition ist prae-op höher (T0 prae-op 0,00046, post-op 0,00038). Bei P3 ist der Unterschied der Messungen prae-op und post-op weniger evident (Abb. 18), sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ist ein ähnlich offensichtlicher Abstieg des AP zu verzeichnen (prae-op 31,1%, post-op 29,9%). Rein optisch unterscheiden sich die Kurven kaum, die Werte der Messung an der toten Haut sind etwas geringer (T0 prae-op 0,00064, post-op 0,00051). P4 zeigt *in vivo* eine klare Tendenz nach unten, wobei sich diese in den ersten 30 min nach Bestrahlung vollzieht, danach stagnieren die Werte. Insgesamt zeigt sich dennoch ein Abstieg von 28,7%. *In vitro* sinkt das AP bei diesem Probanden hingegen nur um 0,54 %, ist also zu vernachlässigen. Der Ausgangswert liegt niedriger als prae-op, T 90 hingegen höher (Abb. 19). P5 (Abb. 20) weist eine Kurve auf, die zuerst abfällt, dann aber wieder deutlich ansteigt. Prae-op sinkt das AP nach 30 min ab, steigt nach 60 min an, woraufhin es im weiteren Verlauf der Messung wieder nach unten tendiert. In der gesamten Ansicht beträgt der Abfall letztendlich 4,3%, wobei in den ersten 30 min ein Absinken um 13,2% zu vermerken ist. Post-op sind die Werte niedriger. Der Ausgangswert beträgt hier 0,0002 (T0 prae-op 0,00041), es zeigt sich auf den ersten Blick nur eine leichte Kurve nach unten, prozentual beträgt der Abfall der Kurve jedoch 27,1%. Der Verlust des AP ist post-op höher als prae-op. Bei P6 sind die Werte *in vivo* sehr viel niedriger als *in vitro* (T0 prae-op 0,00043, post-op 0,00051), die Kurve fällt in den ersten 60 min deutlich ab, steigt dann aber wieder an (Abb. 21). Insgesamt gesehen ist aber ein Absinken des AP *in vivo* um 35,2% sehr deutlich, ganz im Gegensatz zu der Messung *in vitro.* Auch beim letzten Probanden (P7) wurde post-op ein höheres AP gemessen als prae-op (T0 prae-op 0,00059, post-op 0,00085). Die Messung an der Bauchhaut in situ zeigt wiederum bis T60 einen Abfall, in den letzten 30 min allerdings einen leichten Anstieg. Letztendlich sinkt das AP bei diesem Patienten im Verlauf der Messungen prae-op um insgesamt 13,7% und steigt post-op sogar leicht um 4,2% an (Abb. 22).

Die Fehlerbalken in den Abb. 17-22 skizzieren die 3 Einzelwerte der Messungen, die gemittelt für die Messpunkte verwendet wurden. Die Messungen wurden jeweils an einer Hautstelle vorgenommen. Die Abweichungen der einzelnen Messungen betragen bis auf zwei Ausnahmen nicht mehr als 10% und stimmen damit mit der Stabilität der Messergebnisse der Arbeitsgruppe überein.

In Abb. 23 sind die Mittelwerte aller ProbandInnen im Vergleich prae-op und post-op gegeneinander aufgetragen. Die Ausgangswerte liegen *in vivo* und *in vitro* im

gleichen Konzentrationsbereich (MW T0 prae-op 0,00048, post-op 0,00047), das Absinken des AP ist im Durchschnitt aber am lebenden Gewebe eindeutig höher als an der exzidierten Haut (prae-op 24,7%, post-op 10,6%). Der Standardfehler ist in den Fehlerbalken der y-Achse aufgetragen.

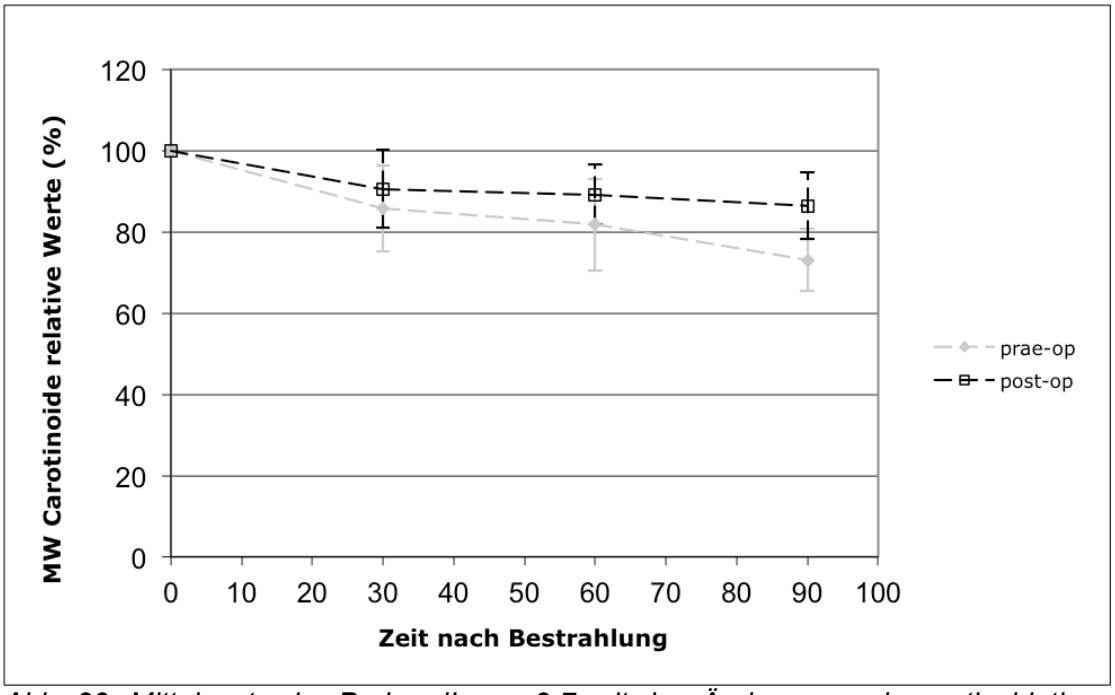


Abb. 23: Mittelwerte der ProbandInnen 2-7 mit den Änderungen des antioxidativen Potentials vor und nach UV-Exposition im Verlauf von 30, 60, 90 Minuten bezogen auf den Ausgangswert vor der Bestrahlung mit UV-Licht, SE sind in das Schaubild integriert

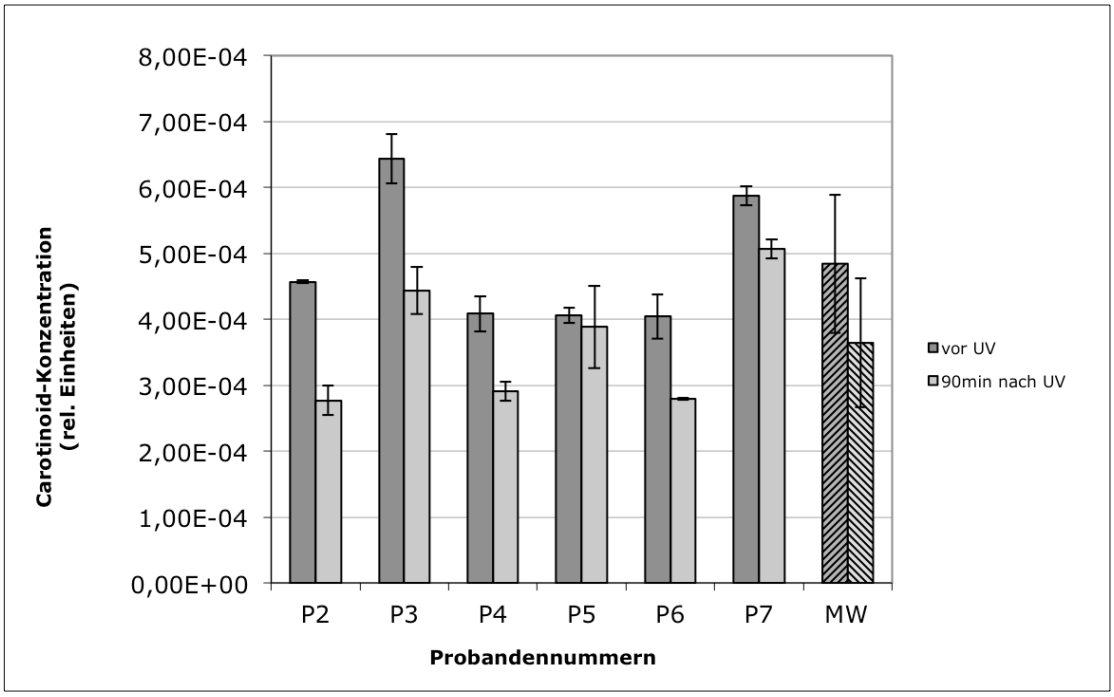


Abb. 24: prae-op T0 und T90 der ProbandInnen 2-7, zusätzlich der Mittelwerte, gegeneinander aufgetragen

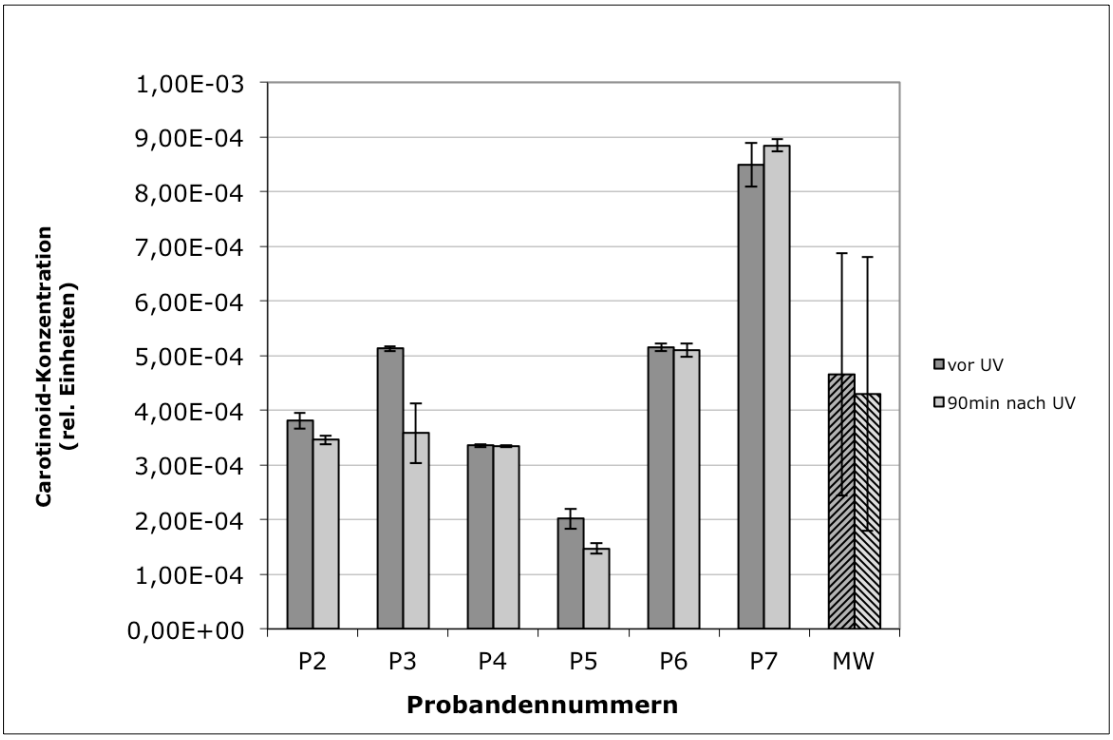


Abb. 25: post-op T0 und T90 der ProbandInnen 2-7, zusätzlich der Mittelwerte, gegeneinander aufgetragen

Abb. 24 verdeutlicht zusammenfassend, dass *in vivo* die Carotinoid-Konzentration vor der UV-Exposition eindeutig höher ist als 90 Minuten nach Einwirken der Noxe. Es kommt also innerhalb von eineinhalb Stunden grundsätzlich zu einer Zerstörung des antioxidativen Potentials. Im Mittel beträgt eben jener Abfall 24,7%, wie schon

oben erwähnt. Die Höhe der jeweiligen Carotinoid-Konzentration der Probanden schwankt aber erheblich, sowohl im Ausgangswert als auch im weiteren Verlauf der Messungen. Auch sinkt das AP unterschiedlich stark im Verlauf der Zeitachse ab.
Die Schwankungen der Ausgangswerte post-op und auch der Werte im Verlauf der Messungen an der exzidierten Haut stellen sich sehr viel unregelmäßiger dar (Abb. 25). T0 schwankt zwischen 0,0002 bei P5 und 0,00085 bei P7, wobei die Messungen bei P7 deutlich abweichen. Bei drei der ProbandInnen wird das AP durch die UV-Exposition nur sehr leicht beeinflusst, bei zwei anderen sinkt es hingegen deutlich ab. Bei P7 ist sogar ein leichter Anstieg der Carotinoide nach Bestrahlung zu verzeichnen. Im Durchschnitt wird das antioxidative Potential post-operativ aber deutlich weniger durch UV-Strahlung beeinträchtigt als prae-operativ, nämlich 10,6%. Bei 90 Minuten ist das Absinken des antioxidativen Potentials bezogen auf den Ausgangswert vor UV-Exposition sowohl prae-op als auch post-op statistisch signifikant.

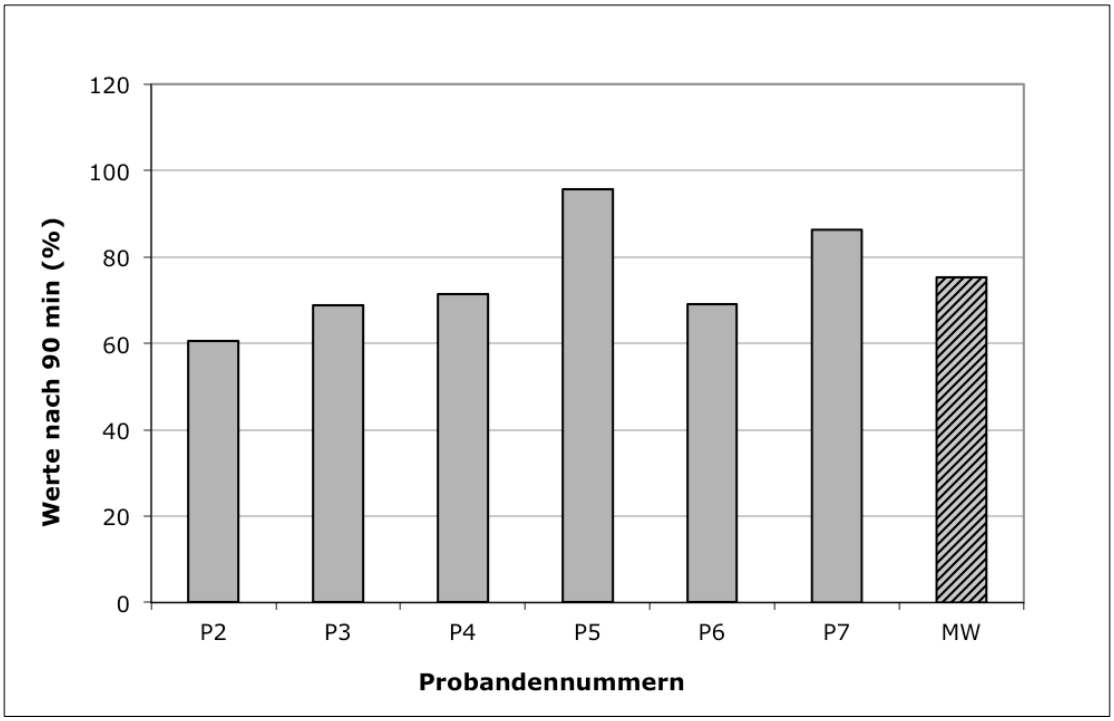


Abb. 26: Carotinoid-Abfall prae-op innerhalb 90 min nach UV-Exposition, 100% entspricht der Konzentration vor Bestrahlung (T0)

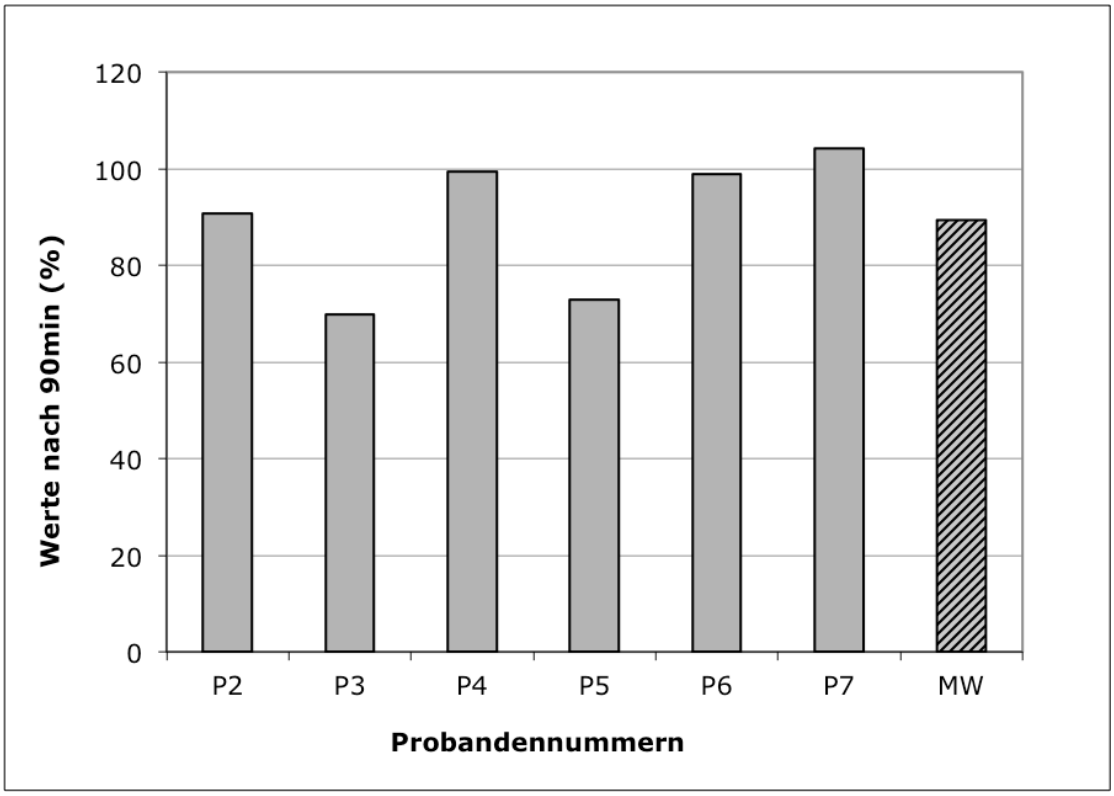


Abb. 27: Carotinoid-Abfall post-op innerhalb 90 min nach UV-Exposition, 100% entspricht der Konzentration vor Bestrahlung (T0)

Abb. 26 und 27 stellen den Verlust des antioxidativen Potentials in Prozent innerhalb von 90 Minuten nach Aussetzen der Probanden bzw. der Probe mit UV-Licht dar. Die Linie bei 100% stellt den Wert der Carotinoid-Konzentration vor Schädigung des Potentials durch die Noxe dar. Die Balken weisen den Wert 90 Minuten nach Bestrahlung in Prozent auf, die Spanne dazwischen skizziert den Abfall des Carotinoid-Gehaltes im Stratum corneum.

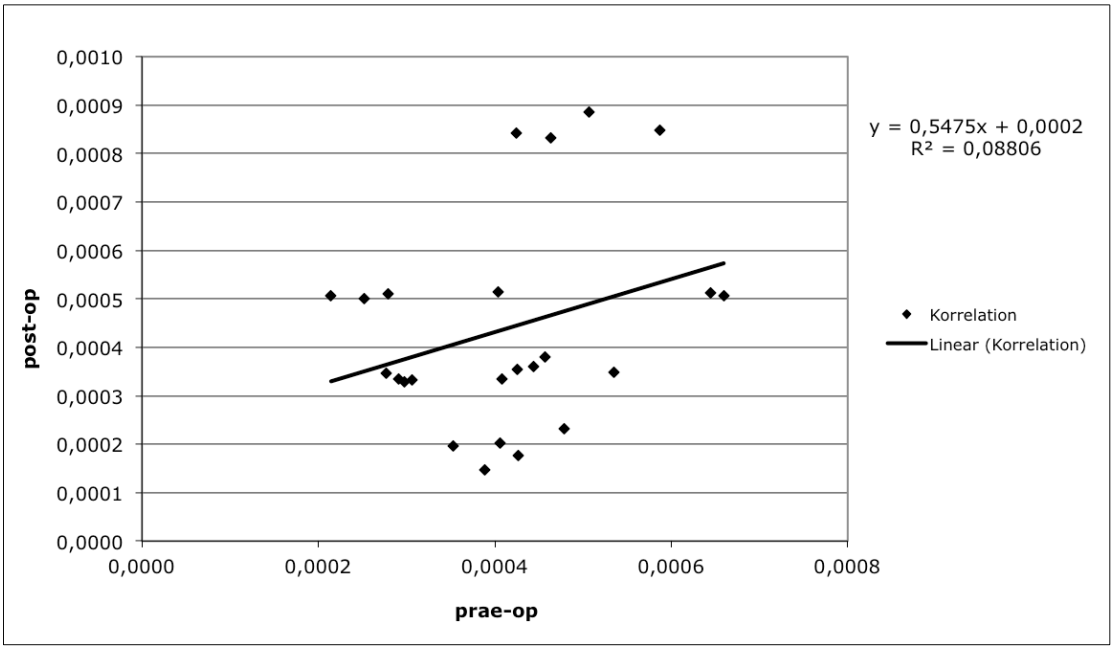


Abb. 28: Korrelation der Carotinoid-Konzentration prae-op und post-op mit Regressionsgerade

Für die Übertragbarkeit eines *in vivo*-Modells auf ein *in vitro*-Modell ist die Korrelation der Messergebnisse von entscheidender Bedeutung. Bei den Messungen der Carotinoid-Konzentration lässt sich *in vitro* keine Korrelation (R^2= 0,0881) zu der Situation *in vivo* nachweisen (Abb. 28).

5.2. Messungen der Katalase-Konzentration in der Haut

5.2.1. Messungen an der Haut des Menschen

Im dritten Teil der Studie wurden das Vorkommen und die Konzentration des antioxidativen Enzyms Katalase an der Haut des Menschen *in vivo* und *in vitro* studiert. Im Vergleich hierzu wurde die Situation am exzidierten Kuheuter und Schweineohr untersucht.

Die ersten Messungen fanden an der Haut von 7 Probanden statt, die im Rahmen einer Abdominalplastik (Bauchdeckenstraffung) operiert wurden. Proben wurden aus Bauchhaut vor der Operation in vivo und nach dem gleichen Schema post-operativ an der exzidierten Haut, also in vitro, entnommen.

Die folgenden Schaubilder zeigen die Katalase-Aktivität in der Haut der 7 Studienteilnehmer im Vergleich prae- und post-operationem an 20 aufeinander folgenden Tape-Strips, die von der Haut abgezogen wurden.

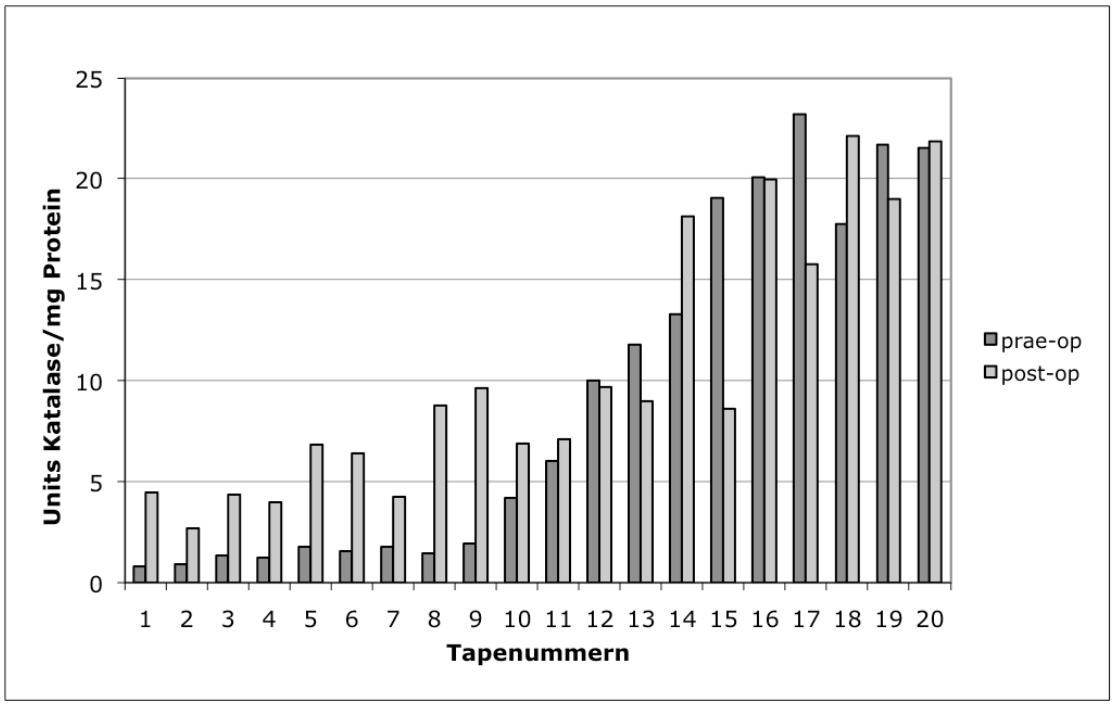


Abb. 29: P1 Katalase-Konzentration im Vergleich prae- und post-op

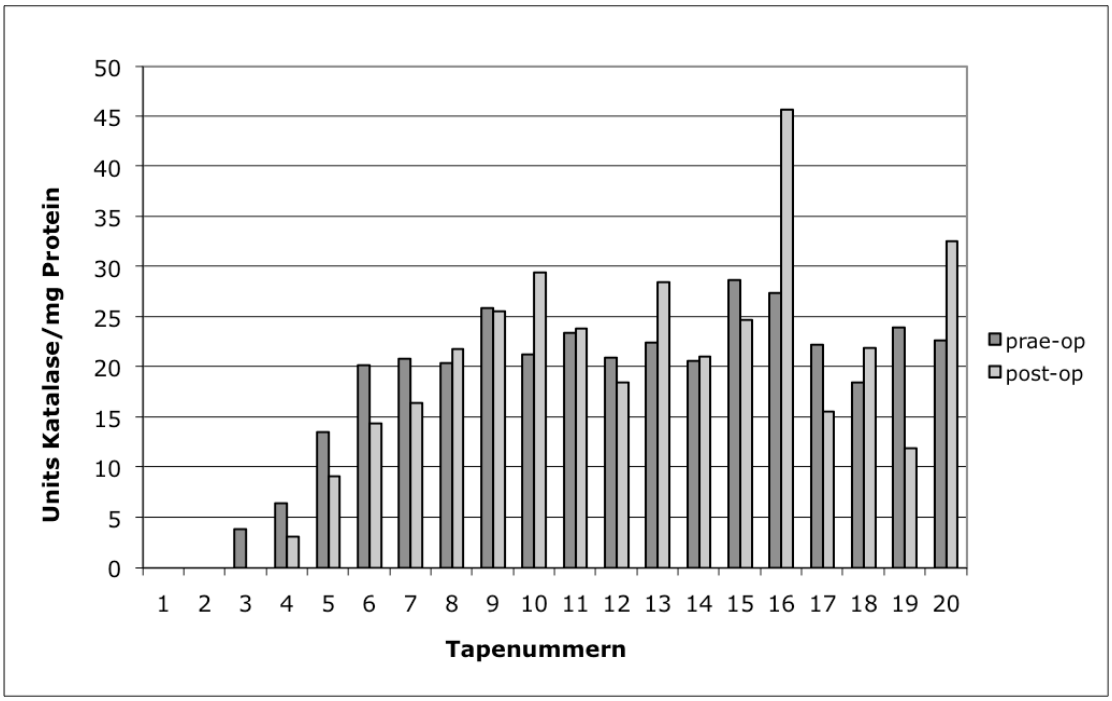


Abb. 30: P2 Katalase-Konzentration im Vergleich prae- und post-op

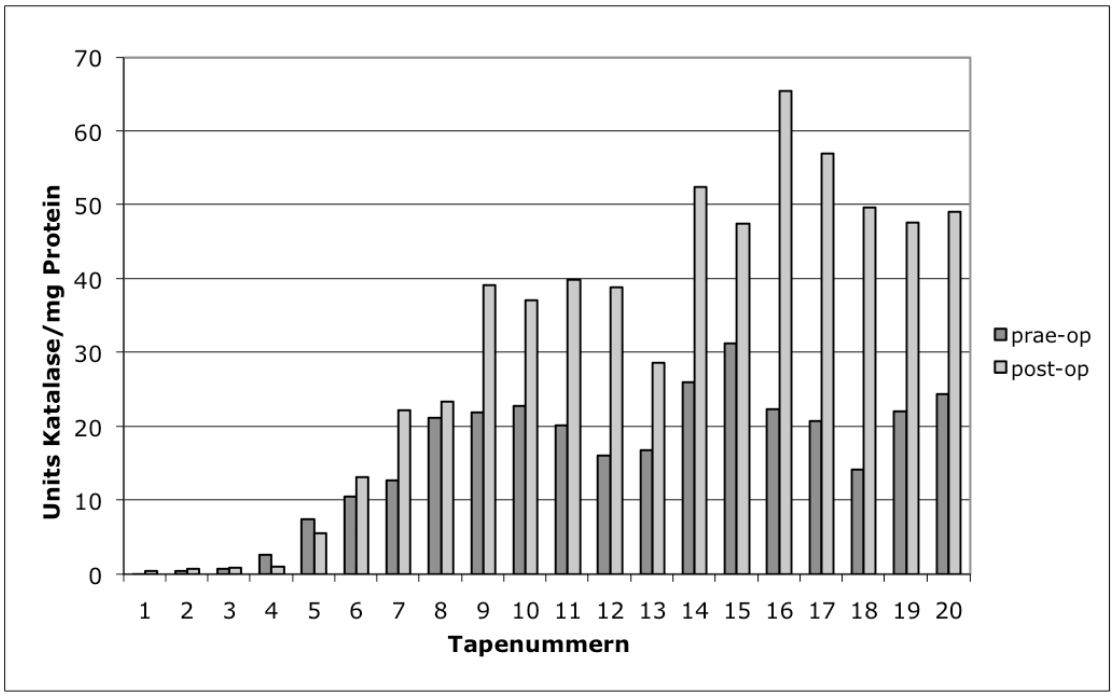


Abb. 31: P3 Katalase-Konzentration im Vergleich prae- und post-op

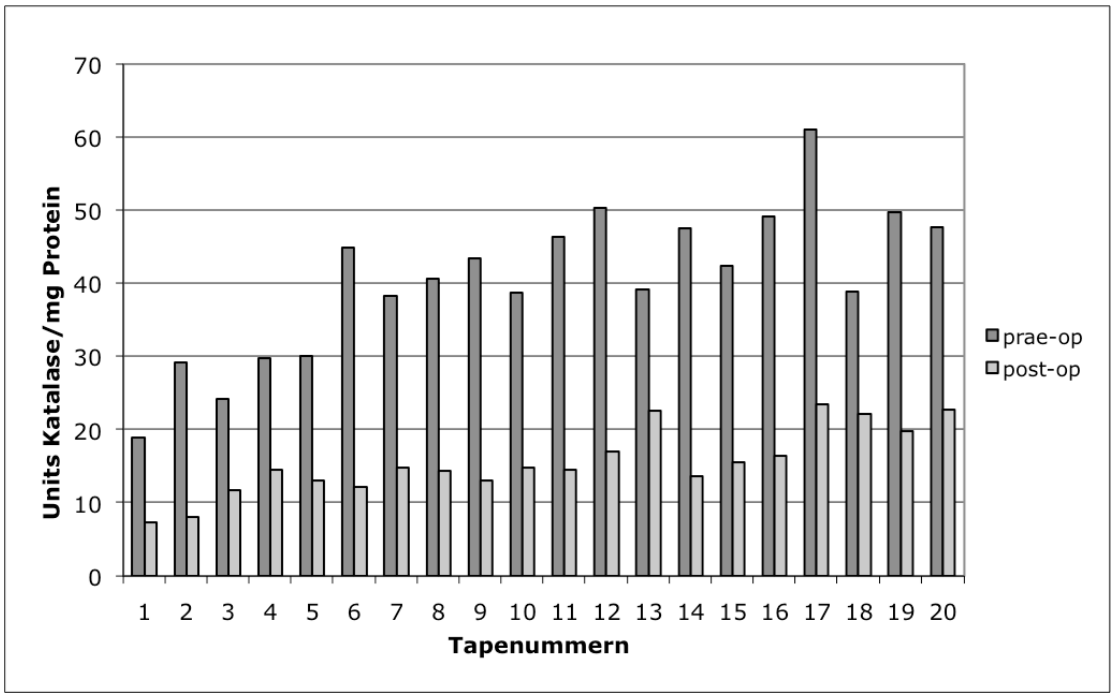


Abb. 32: P4 Katalase-Konzentration im Vergleich prae- und post-op

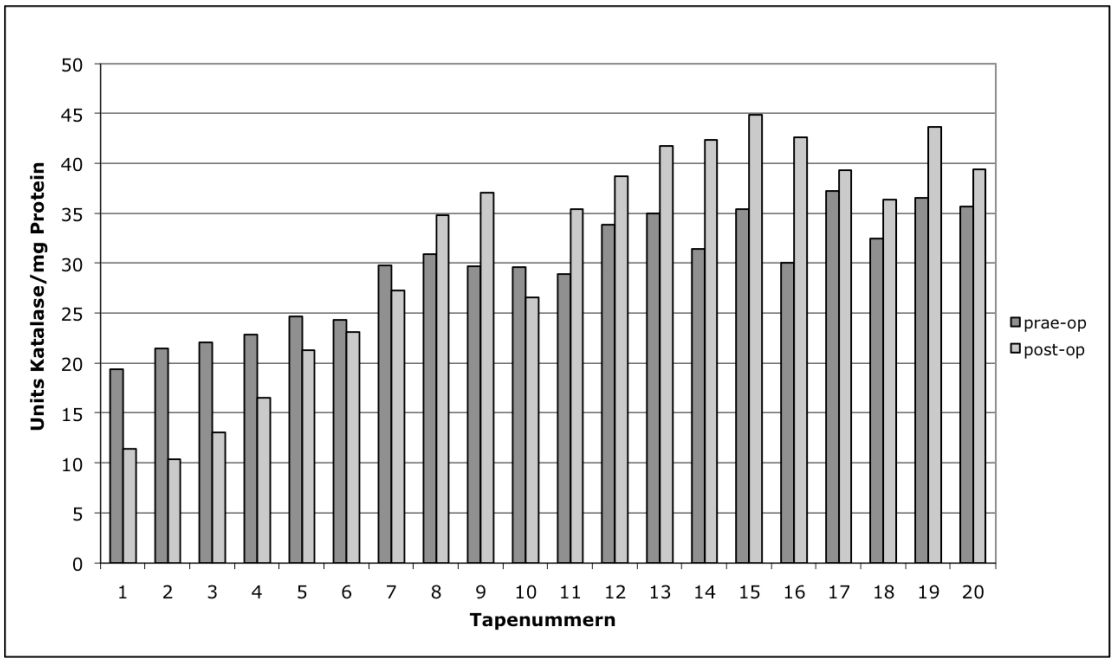


Abb. 33: P5 Katalase-Konzentration im Vergleich prae- und post-op

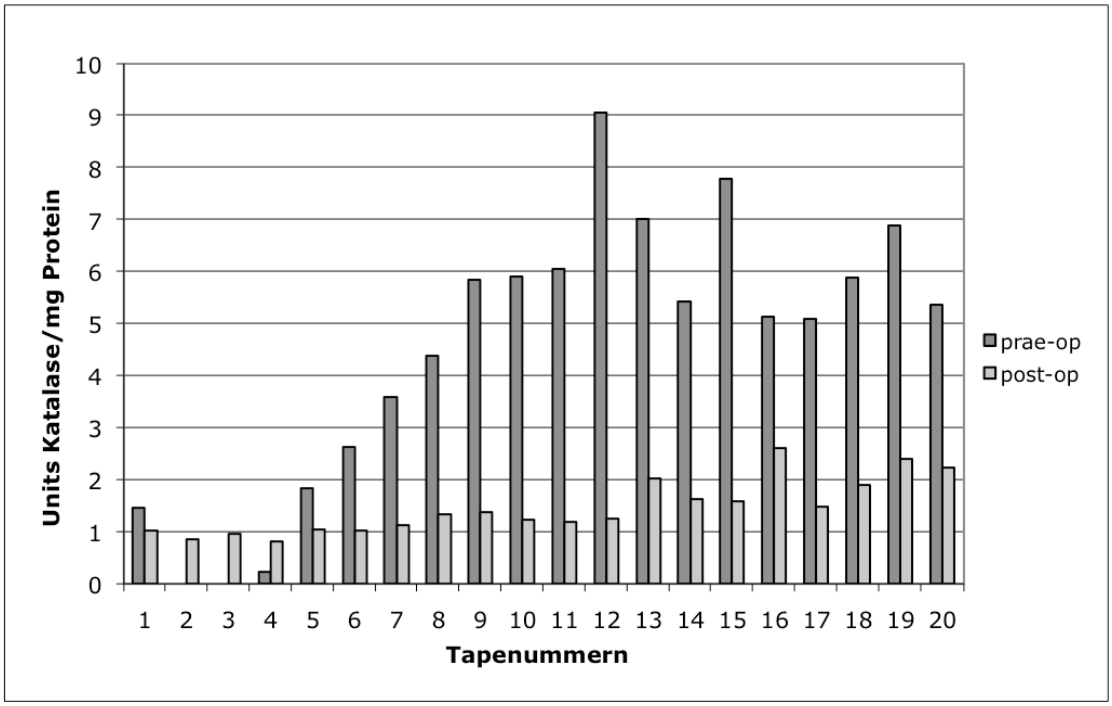


Abb. 34: P6 Katalase-Konzentration im Vergleich prae- und post-op

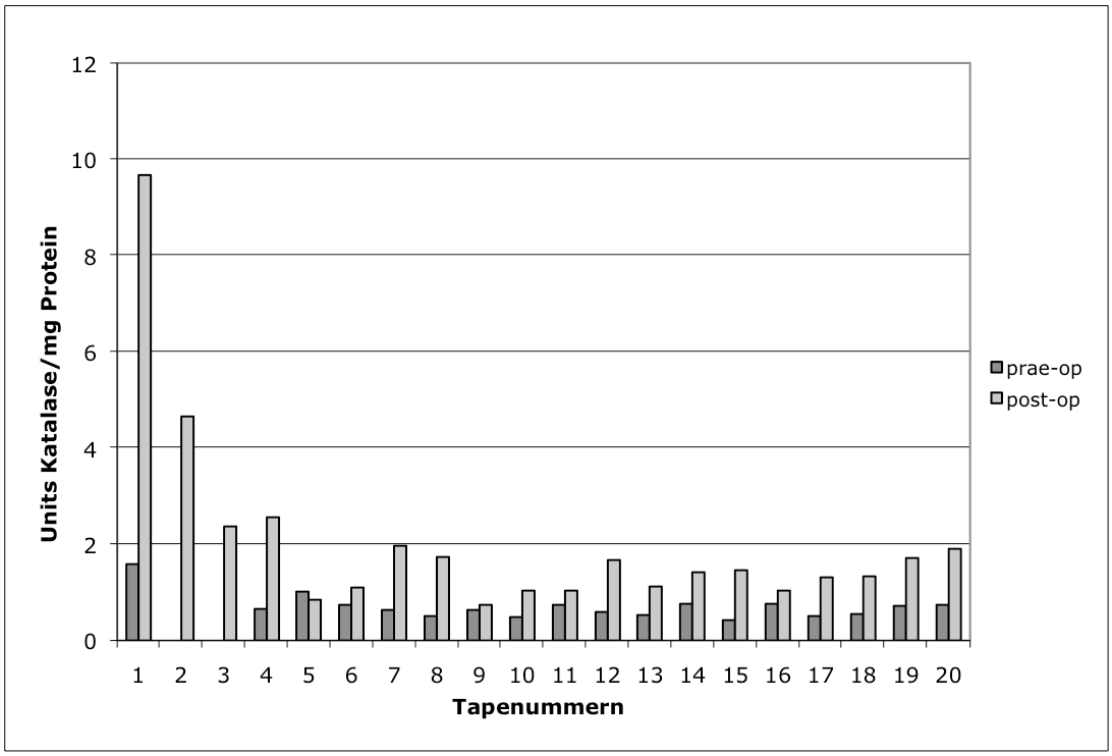


Abb. 35: P7 Katalase-Konzentration im Vergleich prae- und post-op

Abb. 29-35: Katalase-Aktivität in Units Katalase/mg Protein an 20 aufeinanderfolgenden Tape Strips im Vergleich an allen Probanden prae- und post-operativ

Die Messungen des Enzyms Katalase sind insgesamt sehr schwankend. Es zeigen sich prae-op und post-op große Variationen der Werte, was vermutlich dem Umstand geschuldet ist, dass die Messungen nur schwer standardisierbar waren. Auch die Heterogenität der Probandengruppe kann zu deutlichen Abweichungen der Messwerte geführt haben. Der Studie zufolge, an der sich die vorliegende Arbeit in Bezug auf die Enzym-Messungen anlehnt (HELLEMANNS *et al.*, 2003), sollte die Katalase-Konzentration bis zum 14. Tape konstant ansteigen und dann bis zum 20. Tape Strip ein Plateau erreichen, auf dem sich der Enzym-Gehalt auf einem mehr oder weniger gleich bleibenden Niveau einpendelt. Diese „Ideal"-Kurve kommt bei unseren Messungen nur vereinzelt und annähernd vor.

Beim ersten Probanden (P1) ist die Konzentration bis TS 11 post-op höher, ab TS 12 sind die Balken prae-op höher, hier ist ein starker Anstieg bis TS 17 zu erkennen, dann bleiben die Werte zwar schwankend, aber dennoch annäherungsweise auf einem Level. Letztendlich ist prae-op der Mittelwert etwas höher als post-op (Abb. 29, 37). Auch bei P2 (Abb. 30) fällt TS 16 bei der postoperativen Messung aus der Reihe, dieser Wert ist viel höher als die anderen. Lässt man diesen Wert bei der Bildung des Mittelwertes außen vor, scheint prae-op etwas mehr Katalase im

Gewebe vorzuliegen als nach der Operation (prae-op 24,4 Units Katalase/ mg Protein, post-op 21,3 Units Katalase/ mg Protein). Der Enzym-Gehalt ist ab TS 14 im etwa gleichen Bereich, wobei auch hier die Standardabweichung prae-op bei 15,5% und post-op bei 33,8% (ohne TS 16) liegt. P3 und P7 zeigen zu den anderen Probanden abweichende Werte. Bei P3 ist die Katalase-Konzentration *in vitro* in der Regel höher als *in vivo* (Abb. 31, 35). P7 hat im Gegensatz zu den meisten anderen Probanden sehr geringe Werte, es wurden auch hier *in vitro* höhere Konzentrationen gemessen. Das Gewebe von P4 zeigt prae-op entscheidend höhere Enzym-Konzentrationen als post-op. Es ist kaum ein Anstieg von TS 1-14 zu erkennen. Post-op kommt es zu keinem augenscheinlichen Anstieg, hier ist der Gehalt an Katalase vom ersten Tape an auf einem mehr oder weniger gleich bleibenden Niveau (Abb. 32). Die Kurve des 5. Probanden entspricht nach der Operation noch am ehesten der im oben genannten Paper beschriebenen „Ideal"-Kurve, es kommt zu einem Anstieg der Katalase-Konzentration bis TS 14, die dann bis TS 20 ein Plateau erreicht (STDEV TS 14-20 7,2%) (Abb. 33, 36). Auch P6 (Abb. 34) zeigt prae-op eine Kurve mit niedrigen Werten, die allerdings im Verlauf deutlich abfallen, post-op sind die Messergebnisse noch geringer. Der Mittelwert TS 14-20 beträgt *in vivo* 5,6 Units Katalase/mg Protein, *in vitro* 1,2 Units Katalase/mg Protein (Abb. 37).

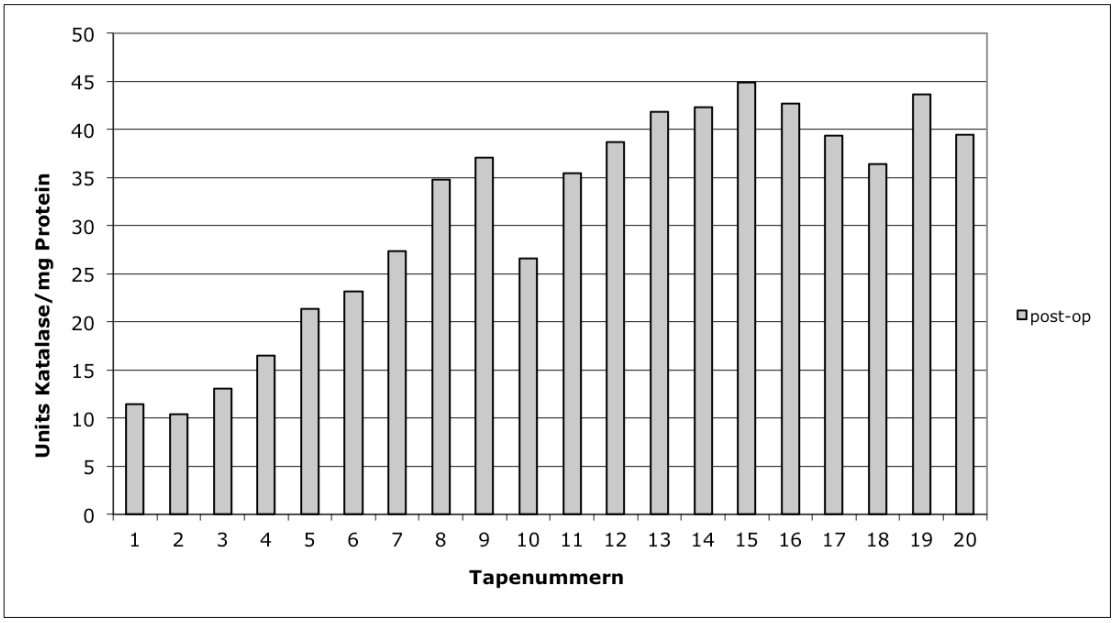


Abb. 36: Katalase-Aktivität in Units Katalase/mg Protein an 20 aufeinanderfolgenden Tape-Strips bei P5 post-op

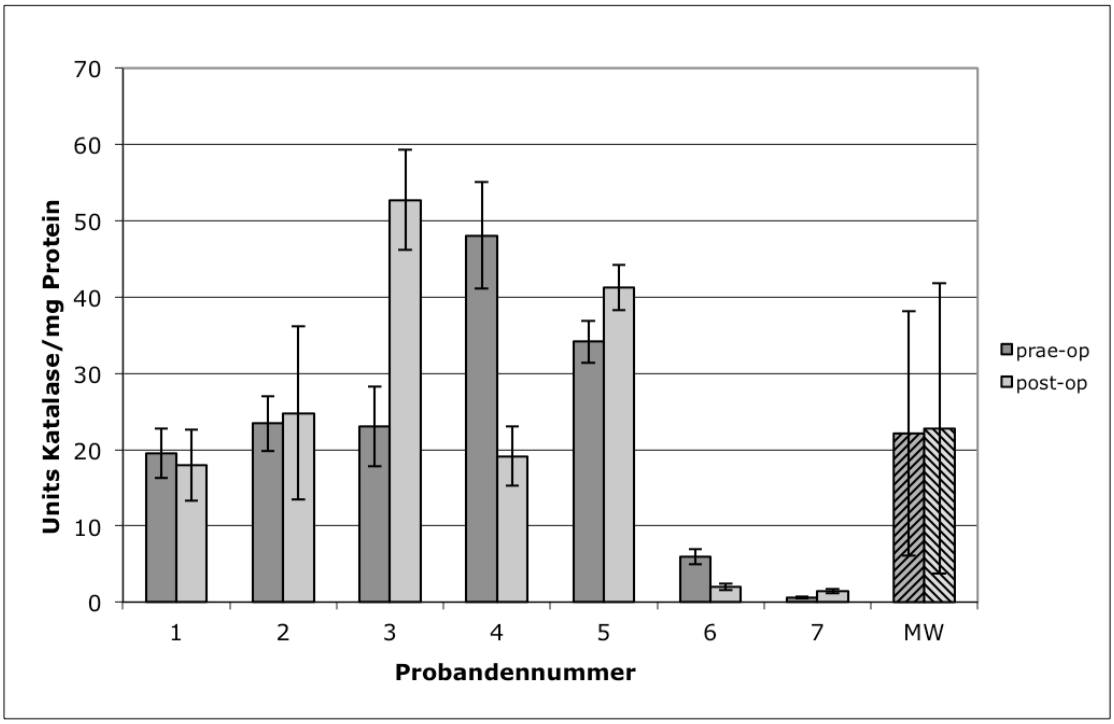


Abb. 37: Mittelwerte TS 14-20 der Katalase-Konzentration der Probanden prae-op und post-op im Direktvergleich, ganz rechts im Schaubild Mittelwerte TS 14-20 aller Probanden in jeweils einem Balken zusammengefasst

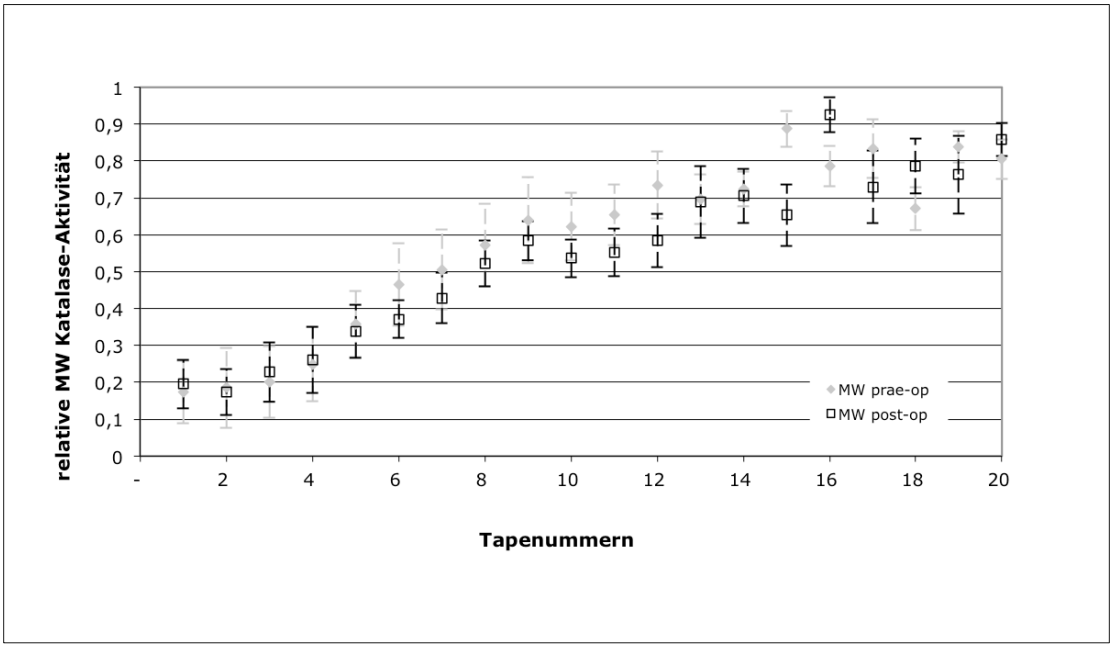


Abb. 38: relative MW der Katalase-Aktivität bezogen auf den höchsten Wert der Messungen mit Standardfehlern

In Anlehnung an die Studie von HELLEMANNS *et al.,* 2003 wurden bei der Bildung von Mittelwerten nur die Tape-Strips 14-20 berücksichtigt, da sich eben bei diesen ein

Plateau bildet, die Konzentration der Katalase sich auf einem Niveau einpendeln sollte. Diesen Erkenntnissen folgend erscheint es am sinnvollsten, aus eben jenen Werten den Mittelwert des tatsächlichen Enzym-Gehaltes im Stratum corneum zu bilden. In Abb. 37 wird also dargelegt, wie viel Katalase in den unteren Schichten des SC im Durchschnitt vorhanden ist, aufgezeichnet sind nebeneinander die Balken der Messungen *in vivo* und *in vitro.* Werden nun von allen Probanden noch einmal Mittelwerte gebildet, zeigt sich, dass letztendlich die Konzentration im toten Gewebe minimal höher zu sein scheint als an der Bauchhaut in situ (prae-op 22,1 Units Katalase/ mg Protein, post-op 22,8 Units Katalase/ mg Protein). Ohne P3 allerdings, bei welchem entscheidend höhere Werte gemessen wurden als bei den übrigen Studienteilnehmern, betrüge der MW post-op nur 17,76 Units Katalase/ mg Protein.
Abb. 38 zeigt die relativen Mittelwerte der Katalase-Aktivität. Als Bezugswert wurde der höchste Wert der Messungen gewählt, welcher gleich 1 gesetzt wurde. Die Fehlerbalken der y-Achse beschreiben den Standardfehler. Die Abweichungen der Messungen prae-op und post-op sind statistisch nicht signifikant.
Die vorliegenden Untersuchungen weisen keine Korrelation zwischen dem Alter der ProbandInnen und der Katalase-Konzentration auf (s. Tab. 2).

Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung (in Jahren)	MW prae-op	MW post-op	Probandennummer
23	6	2	P6
27	0,6	1,4	P7
28	23,4	21,3	P2
37	48,1	19,1	P4
39	23	52,7	P3
47	19,5	17,9	P1
53	34,2	41,3	P5

Tab. 2: MW der Katalase-Konzentration aller Probanden prae-op und post-op im Vergleich im Hinblick auf eine mögliche Altersabhängigkeit

5.2.2. Messungen am Kuheuter

Die Katalase-Konzentration wurde zum Vergleich ebenfalls am exzidierten Kuheuter gemessen. Auch hier wird deutlich, wie sehr der Enzym-Gehalt in der Haut der unterschiedlichen Tiere zu schwanken scheint (Abb. 39). Die Werte bewegen sich im Bereich von 1,4 Units Katalase/ mg Protein bei E1 bis 17,3 Units Katalase/ mg Protein bei E6. Die mittlere Standardabweichung beträgt 67,7%. Auch bei diesen

Versuchen wurden für die Mittelwerte jeweils nur die Tape Strips 14-20 ausgewertet, da sich ungefähr ab dem 14. Tape das schon oben erwähnte Plateau einstellen sollte.

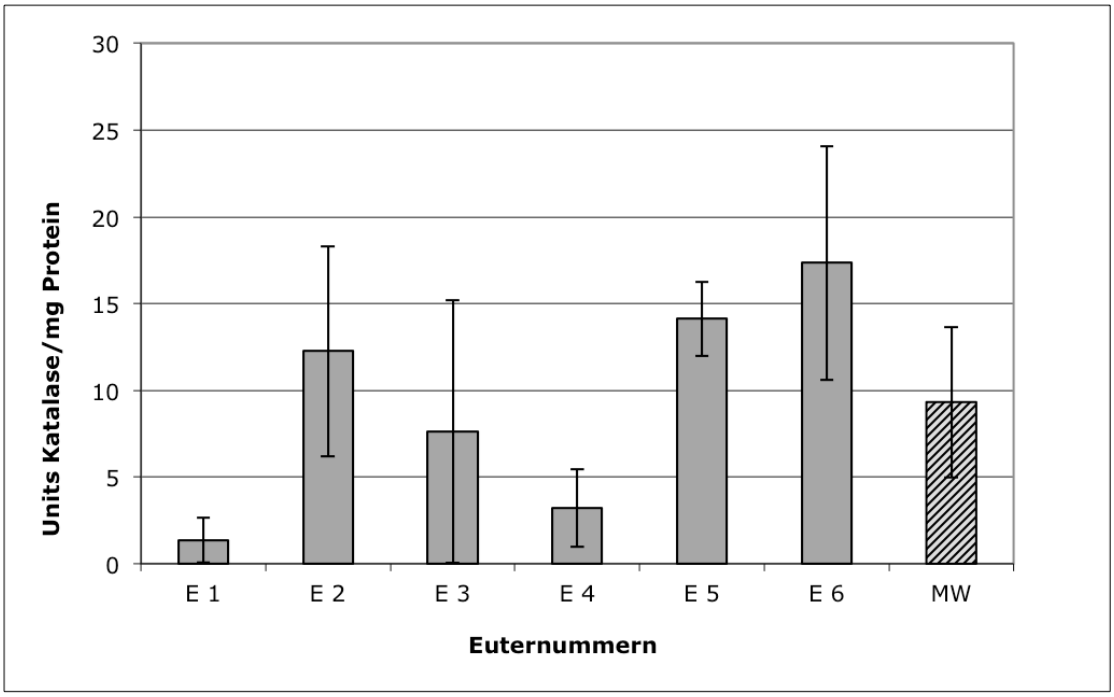


Abb. 39: Mittelwerte TS 14-20 der Katalase-Konzentration der einzelnen Kuheuter im Direktvergleich, ganz rechts im Schaubild Mittelwerte TS 14-20 aller Euter in einem Balken zusammengefasst

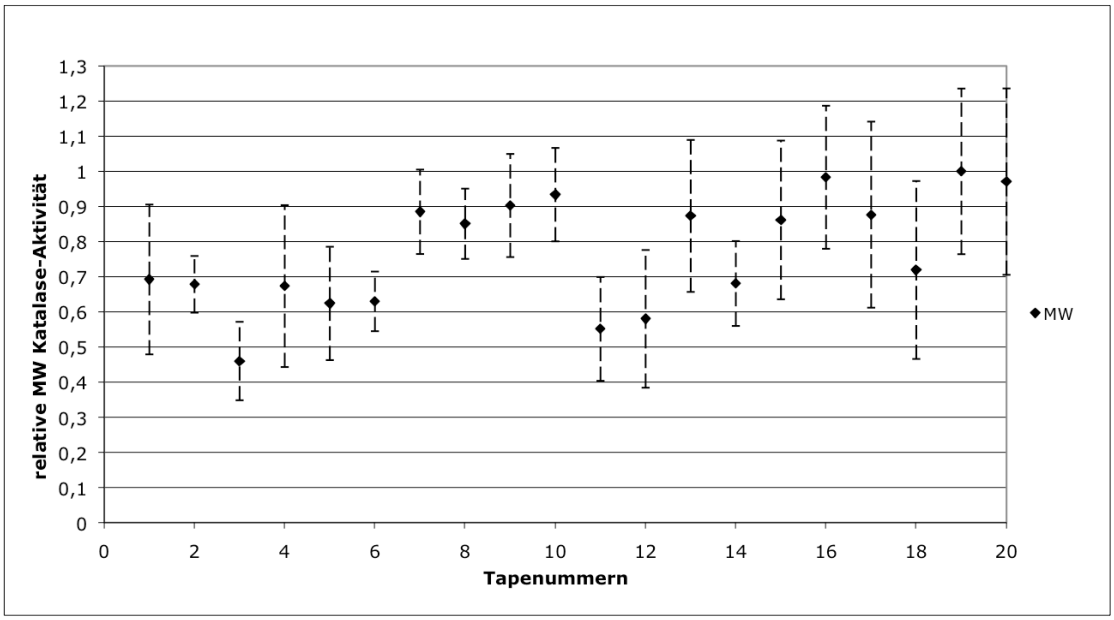


Abb. 40: relative MW der Katalase-Aktivität am Kuheuter bezogen auf den höchsten Wert der Messungen mit Standardfehlern

Abb. 40 zeigt die relativen Mittelwerte der Katalase-Aktivität am Kuheuter wiederum bezogen auf den höchsten Wert der vorgenommenen Messungen. Der Standardfehler wurde ebenfalls in das Schaubild mit aufgenommen.

Wie in Abb. 41 und Abb. 42 beispielhaft zu sehen ist, stellt sich die „Ideal"-Kurve beim exzidierten Kuheuter noch weniger ein als bei der Haut des Menschen. Die Konzentrationen hinsichtlich der Tapes 14-20 sind sehr unterschiedlich, schwanken bei diesen beiden Proben zwischen 1,1 und 26,5 Units Katalase/ mg Protein. Der in HELLEMANNS *et al.,* 2003 beschriebene Anstieg der Konzentrationen, der ab TS 14 in ein Plateau übergeht, ist hier nicht zu erkennen. Die Werte steigen etwas an, es kommt aber immer wieder zu Ausreißern, bei denen die Enzym-Konzentration wesentlich höher oder auch niedriger zu sein scheint.

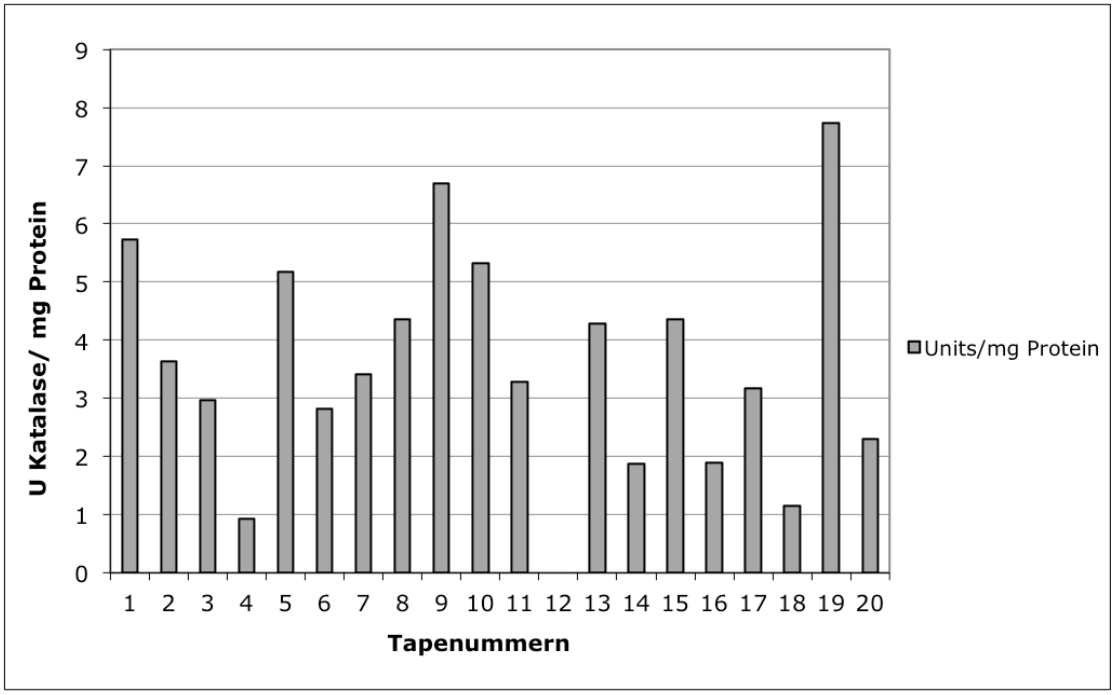


Abb. 41: Katalase-Aktivität in Units Katalase/mg Protein an 20 aufeinanderfolgenden Tape-Strips bei E4

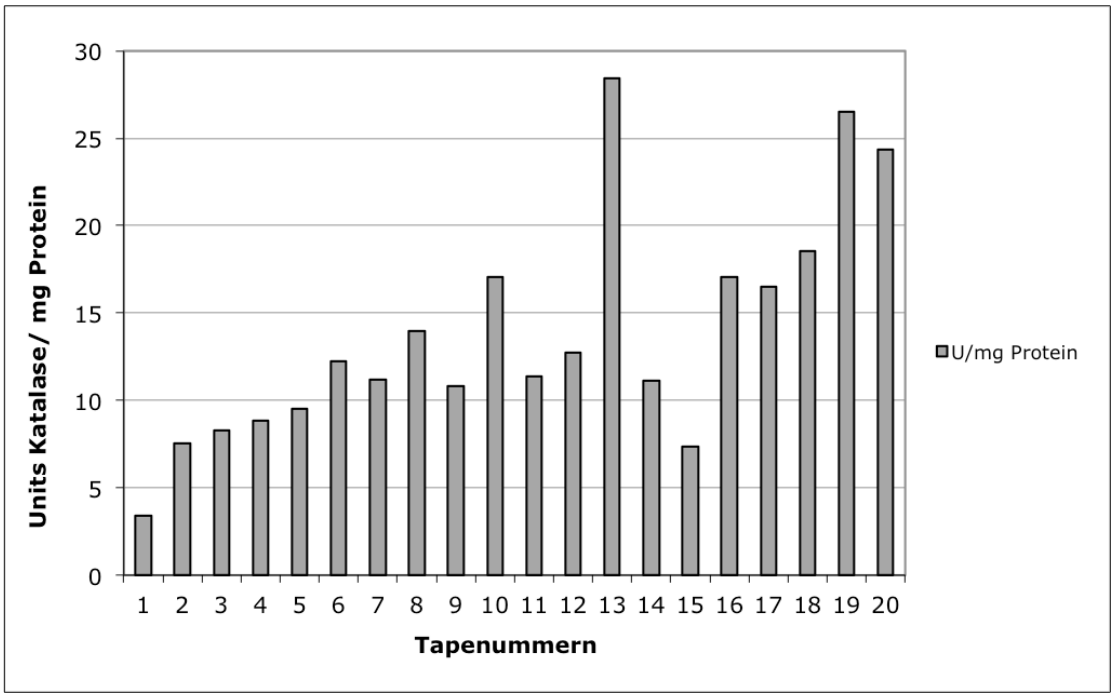


Abb. 42: Katalase-Aktivität in Units Katalase/mg Protein an 20 aufeinanderfolgenden Tape-Strips bei E6

5.2.3. Messungen am Schweineohr

Die Messungen am exzidierten Schweineohr stellen sich ähnlich denjenigen am Kuheuter dar. Auch hier seien beispielhaft die Abb. 45 und Abb. 46 gezeigt, zudem die Mittelwerte aller Proben (Abb. 43, 44).

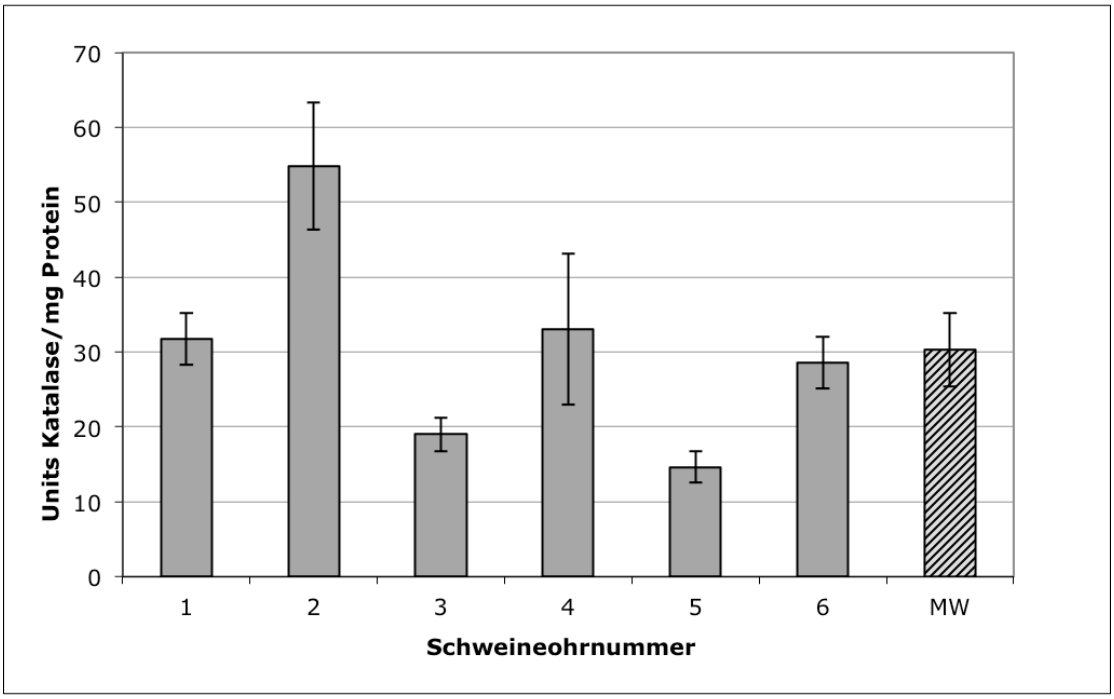


Abb. 43: Mittelwerte TS 14-20 der Katalase-Konzentration der einzelnen Schweineohren im Direktvergleich, ganz rechts im Schaubild Mittelwerte TS 14-20 aller Ohren in einem Balken zusammengefasst

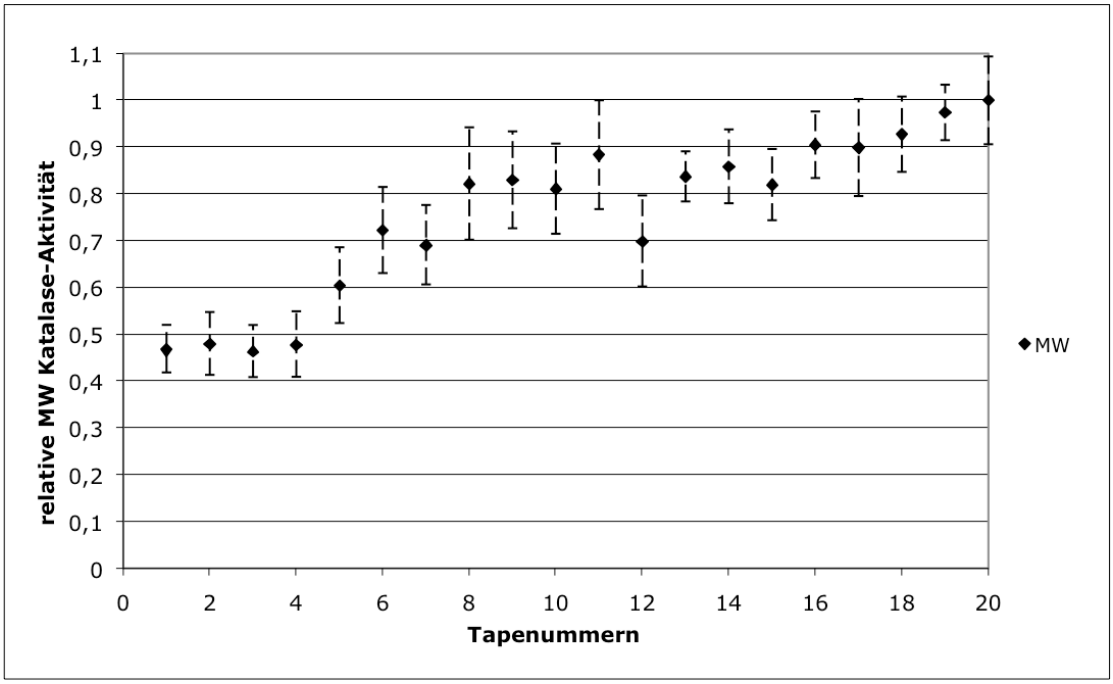


Abb. 44: relative MW der Katalase-Aktivität bezogen auf den höchsten Wert der Messungen mit Standardfehlern

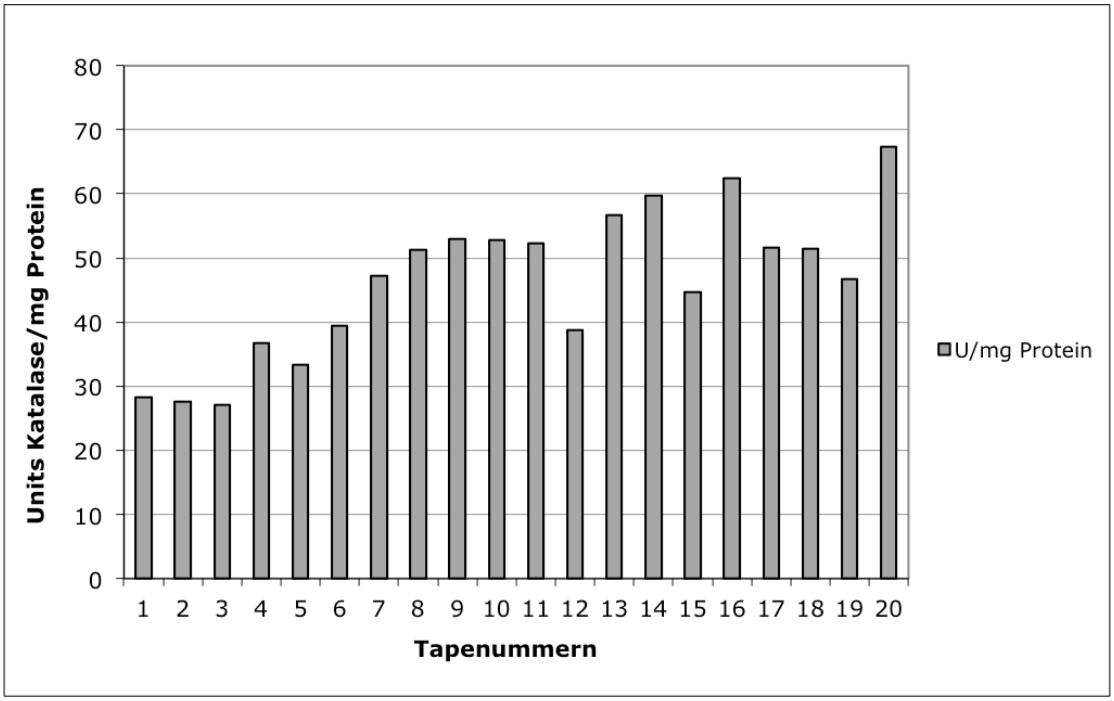


Abb. 45: Katalase-Aktivität in Units Katalase/mg Protein an 20 aufeinanderfolgenden Tape-Strips bei SwO2

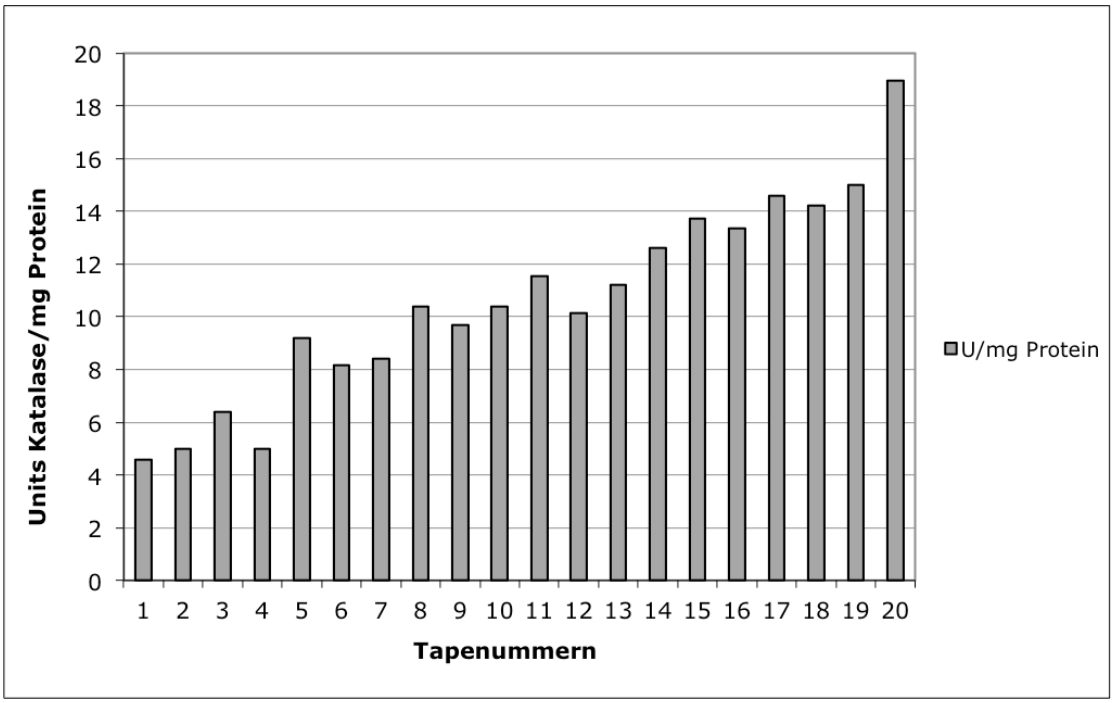


Abb. 46: Katalase-Aktivität in Units Katalase/mg Protein an 20 aufeinanderfolgenden Tape-Strips bei SwO5

Auch hier schwankt der Enzym-Gehalt zwischen 4,6 und 67,4 Units Katalase/mg Protein. Die Werte zeigen zwar einen Anstieg im Verlauf der TS 1-20, ein

Konzentrations-Plateau ist allerdings nicht ersichtlich. Der Mittelwert der Messungen am Schweineohr liegt wesentlich höher als am Kuheuter.

5.3. Messungen des transkutanen Sauerstoffs

Die Messungen des transkutanen Sauerstoffes wurden an 6 ProbandInnen prae- und post-op vorgenommen. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen aufgeführt (Abb. 47-49).

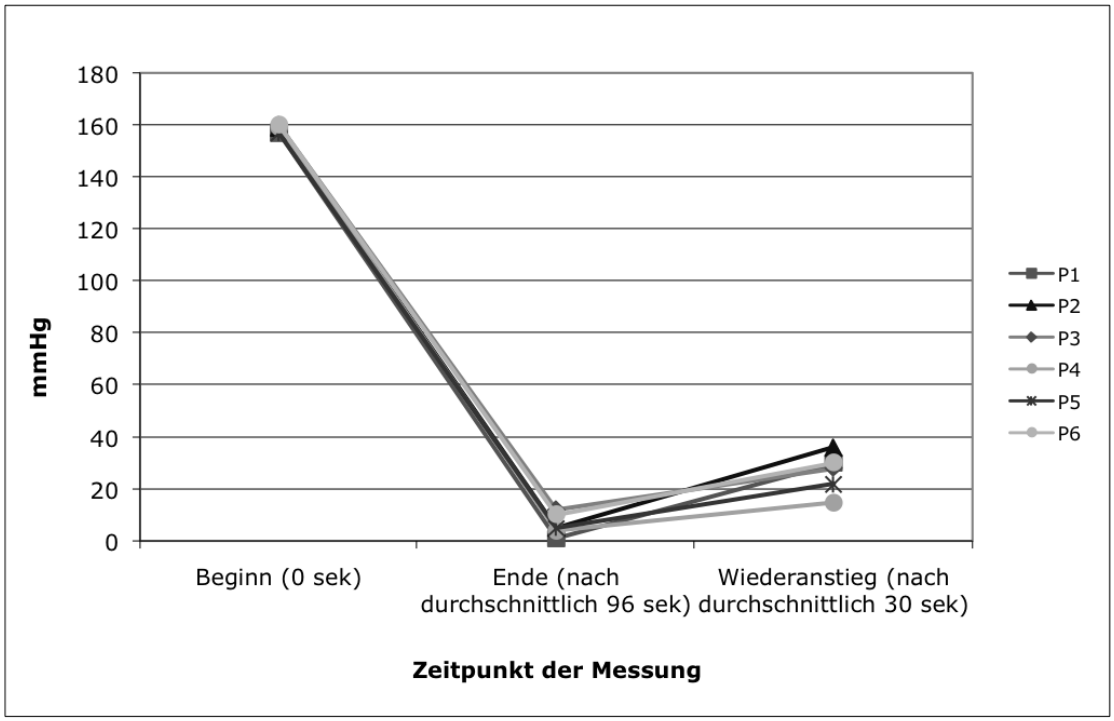


Abb. 47: Transkutane O_2-Messung in mmHg an 6 ProbandInnen prae-op im Vergleich

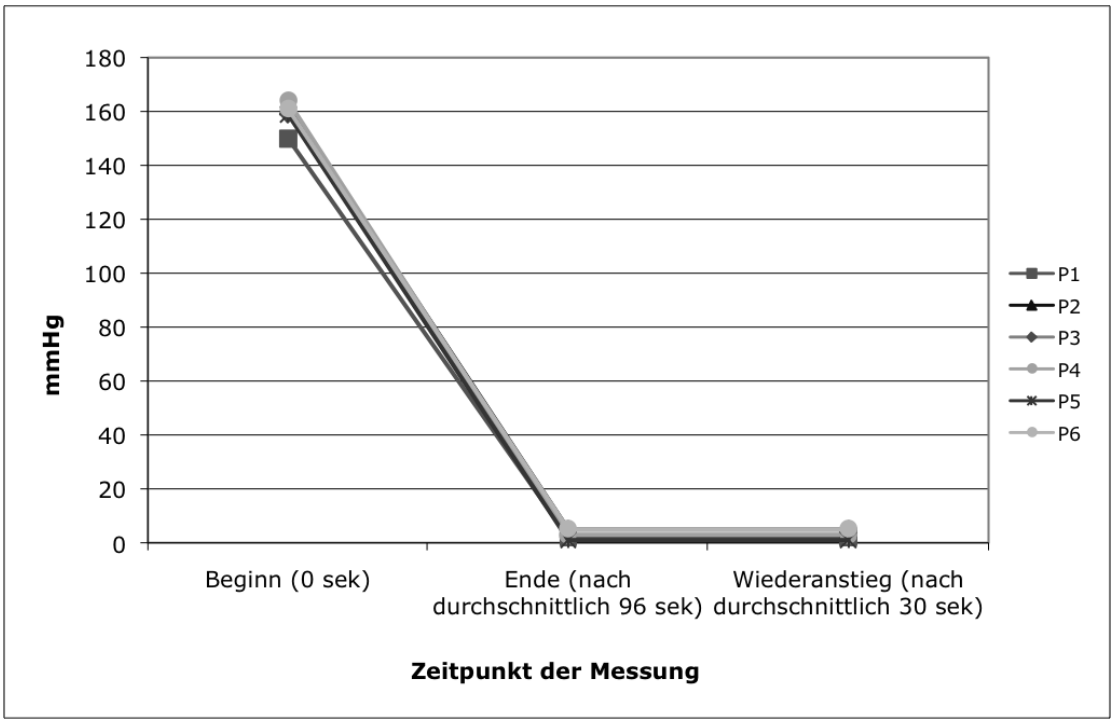


Abb. 48: Transkutane O_2-Messung in mmHg an 6 ProbandInnen post-op im Vergleich

In Abb. 47 und 48 werden die Messverläufe aller Probanden prae-op bzw. post-op aufgeführt. Im Messfeld begann am Probanden vor der Operation die Messung im Bereich von 160 mmHg und fiel dann im Durchschnitt innerhalb von 1:36 Minuten auf annähernd Null ab. Bei der Bauchhaut in situ kam es im Durchschnitt nach weiteren 30 Sekunden zum Wiederanstieg der Sauerstoff-Konzentration auf ungefähr 30 mmHg. Bei der Messung an exzidierter Haut begann die Messung im gleichen Bereich wie prae-op, fiel dann auch fast bis zum Nullpunkt ab, es kam aber im Gegensatz zur lebendigen Haut nicht zum Wiederanstieg des O_2-Gehaltes im hermetisch abgeriegelten Messfeld der Elektrode.

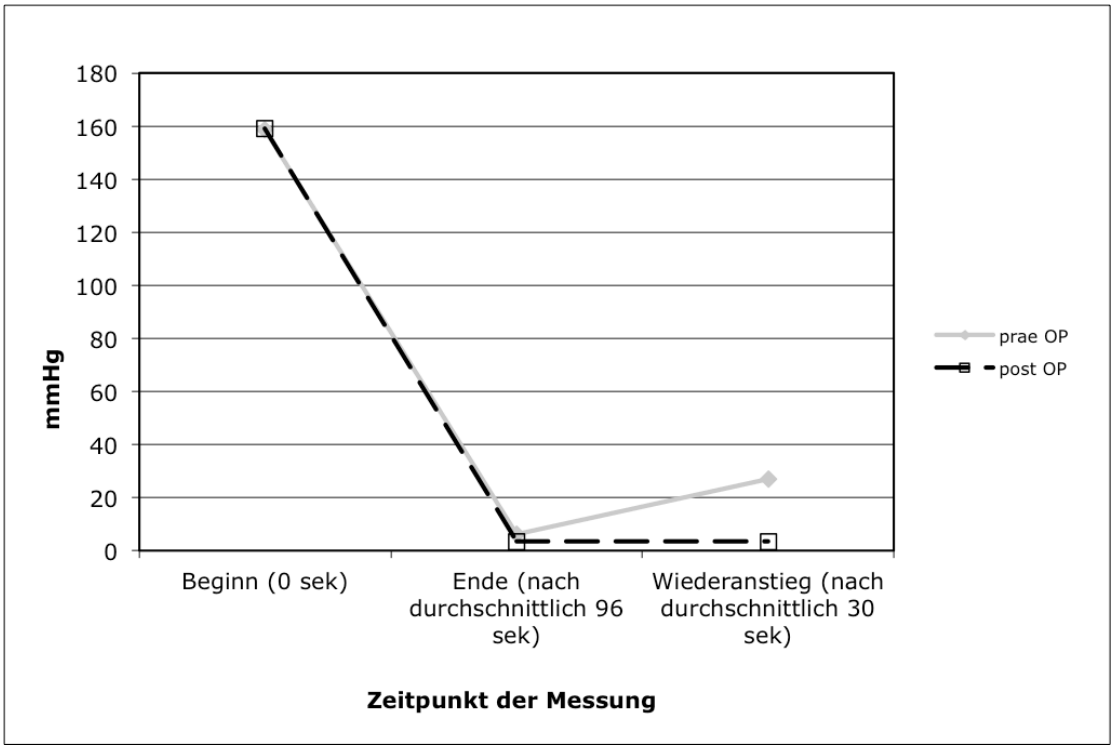


Abb. 49: MW der transkutanen O_2-Messung aller ProbandInnen in mmHg, Vergleich prae-op und post-op

Abb. 49 fasst die Messungen an allen StudienteilnehmerInnen in Mittelwerten prae-op und post-op zusammen. Sowohl vor als auch nach der Operation begann die Messung im Durchschnitt bei 159 mmHg, vor der Operation fiel der Sauerstoffdruck dann innerhalb von durchschnittlich 1:36 Minuten auf 6 mmHg ab (ex vivo auf 4 mmHg). Innerhalb weiterer 29 Sekunden stieg die O_2-Konzentration an der lebendigen Haut wieder auf 27 mmHg an, wobei dieser Anstieg an der exzidierten Haut vollständig ausblieb, hier verharrte der Wert bei 4 mmHg. Alle Werte sind Mittelwerte, die sich aus den Messergebnissen der ProbandInnen prae-op und post-op ergeben.

6. Diskussion

UV-Exposition der Haut führt bekanntermaßen zur Bildung von freien Radikalen, welche sofort mit lebendigen Zellen interagieren. Dies kann zu Zellzerstörungen führen und damit zu Schädigungen der Haut. Der Organismus hat ein effektives Abwehrsystem entwickelt, welches auf dem komplexen Zusammenspiel verschiedener Antioxidantien, wie zum Beispiel Carotinoiden, Enzymen, Vitaminen und vieler anderer Stoffe, beruht.

6.1. Raman-spektroskopische Messungen und der Nachweis der Carotinoide

Obgleich ein relativ neues Verfahren auf diesem Gebiet, wird der Nachweis von Carotinoiden mit der Raman-Resonanz-Spektroskopie in der Literatur beschrieben. Diese Methode gibt uns die Möglichkeit, im Gegensatz zur bisher verwendeten HPLC-Chromatographie, Carotinoide nicht invasiv und unmittelbar zu messen (HATA *et al.,* 2000, ERMAKOV *et al.*, 2004, DARVIN *et al.*, 2005 b). Es handelt sich um ein laserspektroskopisches System, mit dem die charakteristischen Energieniveaus eines Moleküls gemessen werden können. Aufgrund vieler Doppelbindungen sind die Carotinoide, insbesondere β-Carotin und Lycopin, stark Raman-aktiv und somit sehr gut für diese Art des Nachweises geeignet. Es ist bekannt, dass der Carotinoid-Gehalt der Haut nach UV-Exposition innerhalb von 30-90 Minuten stark abfällt (DARVIN *et al.*, 2006 b). Dies ist durch die Interaktion der Carotinoide mit entstandenen freien Radikalen zu erklären. Hierbei reagieren die Moleküle mit zum Beispiel Singulett-Sauerstoff, wobei die Carotinoide in einen angeregten Triplettzustand versetzt werden. Der Grundzustand wird durch Wärmeabgabe wieder erreicht. Bei einer hohen Konzentration freier Radikale läuft diese Reaktion immer wieder ab, wodurch die antioxidativ wirksamen Moleküle letztendlich zerstört werden. Bisher wurden vor allem Untersuchungen an der Haut des Menschen *in vivo* und *in situ* veröffentlicht. Eine Publikation von DARVIN *et al.* (2006 b) zeigt den Abbau des antioxidativen Potentials der Haut des Menschen nach UV-Bestrahlung. Das Minimum des β-Carotin-Gehaltes ist nach 210 Minuten erreicht, danach kommt es zur Regeneration des Potentials, der ursprüngliche Wert ist aber erst nach 3 Tagen (im Mittel nach 2-4 Tagen) wieder erreicht. Es handelt sich hierbei um die “Normal“- oder “Ideal“-Kurve der Dynamik von β-Carotin nach Exposition mit UV-Licht.

Auf Grundlage dieser Kenntnisse wurde die vorliegende Arbeit aufgebaut. Auf der Suche nach einem geeigneten *in vitro*-Tiermodell wurden im ersten Teil Versuche am exzidierten Kuheuter vorgenommen. Durch Umlagerung der Versuche von *in vivo* zu *in vitro* ließen sich Untersuchungen an der Haut des Menschen *in vivo* vermeiden.

An diesem Punkt sollte wieder Bezug genommen werden auf die Untersuchungen von ZASTROW *et al.* (2008). Diese Publikation weist darauf hin, dass 50% der gesamten Radikale, die bei Exposition mit Sonnenlicht gebildet werden, im Bereich des sichtbaren Spektrums entstehen und nicht, wie vermutet, nur im Bereich des UV-Lichtes. Da die erwähnten Messungen *ex vivo* an Biopsien der Haut des Menschen vorgenommen wurden, sind bei Untersuchungen *in vivo* noch deutlichere Ergebnisse bezüglich der Bildung freier Radikale zu erwarten.

Eine Schwachstelle der Dissertationsarbeit ist die fehlende Diversität der vorhandenen Literatur. Es haben sich zwar schon einige Forschungsgruppen mit der Raman-Spektroskopie als solcher beschäftigt, die duale Anregung mit einem Argonlaser bei 488/514,5 nm wurde allerdings von der Forschungsgruppe für Hautphysiologie der Charité unter Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Lademann maßgeblich entwickelt und wird in dieser Form auch hauptsächlich dort verwendet.

Weitere Kritikpunkte, die von Seiten zweier Veröffentlichungen aus den Jahren 2004/2005 von HAMMOND und WOOTEN aufgebracht wurden, müssen ebenfalls diskutiert werden. Zum einen wird bemängelt, dass das blutlose *ex vivo*-Hautmodell nicht zu vergleichen sei mit menschlicher Haut *in vivo.* Da die Eindringtiefe des Lasers bei dem hier verwendeten Gerät nur 150 µm beträgt, kann dieser Einwand verworfen werden. Auch verschiedene Chromophore in der Haut werden bei unseren Messungen mit der Untergrundfluoreszenz aus den Ergebnissen abgezogen. Dadurch wird auch die Messung eventueller Artefakte vermieden. Unterschiedliche Gehalte von Melanin bei verschiedenen Hauttypen können vernachlässigt werden, da alle Probanden dem Hauttyp II entsprachen, auch unpigmentierte Euter- und Schweineohrhaut entspricht ungefähr diesem Hauttyp. Inhomogenitäten der Hautoberfläche werden durch eine entsprechend große Laserauflagefläche minimiert. Da bei einem Probanden im Laufe der Raman-Messungen keine Mess-Signale festgestellt wurden, somit auch keine Carotinoide nachgewiesen werden konnten, können Artefakte, die zu verfälschten Messwerten führen könnten, ausgeschlossen werden.

Der große Vorteil der Raman-Spektroskopie ist die hohe Sensitivität der Messungen. Es können in sehr engen Messbereichen geringe Carotinoid-Konzentrationen detektiert werden.
Der limitierende Faktor dieser Messtechnik hingegen ist, dass keine sichere Selektivität von β-Carotin und Lycopin gegeben ist. Andere Carotinoide, wie zum Beispiel Lutein, Zeaxanthin, α-, β-, γ-, σ-Carotinoide können die Messergebnisse aufgrund ähnlicher Absorptionsspektren beeinflussen.

6.1.1. Diskussion der Messergebnisse

Die relativen Messwerte liegen beim Kuheuter deutlich höher als beim Menschen sowohl prae-op als auch post-op. Dies könnte in der unterschiedlichen Ernährung begründet liegen. Kühe in der Massentierhaltung bekommen als Futter hauptsächlich Gras und unterschiedliche Arten der Silage. Das ist einerseits wenig abwechslungsreich, zum anderen nehmen sie hauptsächlich Grünfutter auf, in dem der Carotin-Gehalt verhältnismäßig hoch ist. Die menschliche Ernährung ist demgegenüber vielseitiger. Als Beispiel sei Proband 1 genannt, der aus der Statistik herausgenommen werden musste, da keinerlei Carotinoide nachweisbar waren. Dieser Proband vertrug nach einer Magenverkleinerung keinerlei Gemüse und Obst mehr, seine Nahrung war also frei von diesen Ernährungsgrundlagen, somit nahm er auch kaum β-Carotin auf. Nach Untersuchungen von DARVIN *et al.* (2003, 2005 b) ist die β-Carotin-Konzentration aber stark abhängig von Faktoren wie Gesundheit, Ernährung, Hauttyp, Hautstelle, an der gemessen wird, und Außeneinflüssen, wie Umwelteinflüssen, Sonneneinstrahlung etc.
Ebenfalls in der Literatur wird beschrieben, dass eine strenge Korrelation zwischen dem Gehalt an Antioxidantien bei den jeweiligen ProbandInnen und dem Ausmaß der Zerstörung der Carotinoide in der Haut besteht, und dass, um die Aussage zu präzisieren, bei höherem Carotin-Ausgangswert die prozentuale Zerstörung geringer ausfällt (DARVIN *et al.,* 2006 b). Diese Erkenntnis ließ sich bei den in diesem Rahmen erfolgten Messungen nicht verifizieren. Die größte Reduktion des antioxidativen Potentials lässt sich bei Probandin 2 vermerken. Bei dieser wurde T0 0,00046 gemessen, es ergab sich somit ein Abfall von 40%. Der Ausgangswert hingegen lag im mittleren Bereich. Die geringste Zerstörung war bei P7 zu sehen, hier wurde ein prozentualer Abfall von 14% gemessen, wobei T0 bei 0,00058 lag. Bei P3, dem Probanden mit dem höchsten T0, war auch der Abfall des antioxidativen Potentials mit 31% vergleichsweise hoch.

Bei zwei der sechs ProbandInnen (P5, P6) wurde ein Wiederanstieg des antioxidativen Potentials beobachtet. Bei P5 fiel die Kurve in den ersten 30 min ab, stieg dann aber bis T90 wieder konstant an. Auch bei P6 war ein deutlicher Anstieg der Kurve in den letzten 30 Minuten der Messung zu vermerken. Erklären lässt sich dieses auf den ersten Blick befremdliche Phänomen mit dem Gemütszustand der beiden Probandinnen. Es ist bekannt, dass im Schweiß sehr viele Antioxidantien enthalten sind. Vermutlich wurden bei diesen beiden Probandinnen, die beide sehr aufgeregt waren und deswegen eine starke Schweißbildung zeigten, mit der Transpiration nochmals Carotinoide an die Hautoberfläche geschwemmt.

Aus dem Rahmen fiel auch Probandin 4, hier war der tiefste Punkt der Kurve schon 30 Minuten nach UV-Exposition erreicht, ebenso verhielt sich die Dynamik des Carotinoid-Gehaltes bei P5. Das ist durchaus ungewöhnlich. DARVIN *et al.* beschreiben 2004, dass β-Carotin erst nach 30-90 Minuten überhaupt durch UV-Licht geschädigt und abgebaut wird. Lycopin hingegen reagiert schon nach 0-30 Minuten. Diese Tatsache ist darauf zurückzuführen, dass Lycopin aufgrund von deutlich mehr Doppelbindungen ein wesentlich effektiverer Radikalfänger ist. In der Abwehrkette, die in Gang gesetzt wird, wenn Stressfaktoren auf die Haut einwirken, steht Lycopin folglich an erster Stelle, erst danach reagieren die trägeren übrigen Antioxidantien. Bei diesen beiden Probandinnen erfolgte der Abfall demnach auffallend schnell, auch im Vergleich zu den übrigen im Rahmen dieser Studie untersuchten PatientInnen, bei denen der tiefste Punkt des Gehaltes der Carotinoide bei 60 bzw. 90 Minuten post-expositionem erreicht war. Die Geschwindigkeit, mit der das antioxidative Potential zugrunde geht, ist abhängig vom jeweiligen Carotinoid, der Probandin bzw. dem Probanden, dem ursprünglichen Niveau des Potentials und der Bestrahlungsdosis (DARVIN *et al.*, 2004). Da bei den Messungen im Rahmen dieser Arbeit keine Abhängigkeit zum ursprünglichen Niveau festzustellen war und die anderen Faktoren bei allen ProbandInnen die gleichen waren, scheinen hier die individuellen Unterschiede der Studienteilnehmer ausschlaggebend für den schnellen Zerfall der Carotinoide zu sein.

Alle Teilnehmer der Untersuchungen haben ausgesagt, im Monat vor der Messung mit den untersuchten Körperstellen, in diesem Fall ihrem Bauch, nicht in der Sonne gewesen zu sein. Es ist bei den 6 ProbandInnen, die in die Dissertation aufgenommen wurden, tatsächlich keine Saisonabhängigkeit des Gehaltes an Carotinoiden zu erkennen. Die Messungen bei P3 und P4 wurden im September vorgenommen, die Ausgangswerte dieser beiden divergierten stark, P3 hatte hier den höchsten Wert, wobei P4 im unteren Bereich anzusiedeln ist. Hier liegen auch P5 und P6, obwohl diese im November bzw. Februar operiert wurden.

Proband 7 zeigte post-op sehr hohe Carotinoid-Werte, sie sind fast so hoch wie diejenigen der Messungen am exzidierten Kuheuter und fast doppelt so hoch wie diejenigen der übrigen ProbandInnen. Besonders auffällig ist allerdings, dass die Konzentration post-op sehr viel höher ist als prae-op und es im Verlauf von 90 Minuten nach UV-Exposition sogar zu einem geringgradigen Anstieg der Kurve kommt. Hier wird ein Messfehler vermutet, der allerdings nicht zu detektieren ist, da die Messbedingungen in jeglicher Hinsicht denen entsprachen, die auch bei den Untersuchungen der restlichen ProbandInnen zum Tragen kamen. Auch eine topische Applikation von Carotinoid-haltigen Substanzen kann nicht sicher ausgeschlossen werden.

Im Hinblick auf die Untersuchungen bezüglich der Carotinoid-Konzentration verschiedener Gewebe wird deutlich, dass die Ergebnisse, die sich prae-op an der Haut des Menschen ergeben haben, im Wesentlichen denen gleichen, die von DARVIN *et al.* (2003, 2004, 2005 a, b, 2006 a, b, c, 2013) schon beschrieben sind. *In vitro* lässt sich jedoch keine Korrelation (R^2= 0,0881) zu der Situation *in vivo* erkennen (Abb. 28), es kommt nach UV-Exposition der Gewebe zu keinem wesentlichen Abfall des Carotinoid-Gehaltes. Mit dieser Erkenntnis ist eine Übertragbarkeit des *in vivo*-Modells auf ein *in vitro*-Modell hinsichtlich des antioxidativen Potentials zum derzeitigen Moment nicht möglich.

6.2. Tape-Strip-Abrisse und der Nachweis des Enzyms Katalase

Es ist bekannt, dass in der Abwehrkette, die bei der Neutralisation freier Radikale in Kraft gesetzt wird, Katalase eine entscheidende Rolle spielt. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion des Abbaus von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser und steht damit nach der Superoxid-Dismutase an zweiter Stelle in der Kette der Radikalabwehr. Die in der Arbeit gewählte Methode ist eine nicht invasive, die auf der spektroskopischen Messung des Proteins auf Tape Strips beruht.

6.2.1. Untersuchungen an der Haut des Menschen

Die Messungen wurden an 7 ProbandInnen durchgeführt, die im Rahmen einer Abdominalplastik (Bauchdeckenstraffung) operiert wurden. Es handelt sich bei dieser Operation um einen plastischen Eingriff, insofern kann davon ausgegangen werden, dass die Haut, die im Rahmen der Untersuchungen benutzt wurde, gesund war. Als

Vorlage für die Versuche dieser Arbeit diente vornehmlich eine Publikation von HELLEMANS *et al.* aus dem Jahre 2003.

In der zitierten Arbeit wird klar nachgewiesen, dass die Katalase-Aktivität ab der zehnten Tape Strip-Schicht ein Plateau erreicht. Die enzymatische Aktivität wurde in der Arbeitsgruppe, welche die erwähnte Studie vorgenommen hat, demnach grundsätzlich ab dem 14. Tape Strip oder in tieferen Schichten gemessen. In Abbildungen wird wieder eine sogenannte "Ideal-Kurve" gezeigt, in deren Anlehnung die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gestaltet wurden (*HELLEMANS et al.,* 2003*)*. Diese Kurve wurde jedoch bei den Messungen im Rahmen unserer Studie nur bei einzelnen ProbandInnen gefunden.

Die gewählte Methode der Tape-Strip-Abrisse ist nur schwer zu standardisieren. Die Tapes wurden an einer definierten Stelle aufeinanderfolgend auf die Haut aufgeklebt. Dann wurde jedes Tape mit einem Roller, der zehn Mal über das Tape gerollt wurde, gut fixiert und danach abgezogen. Dieser Vorgang wurde zwar von immer der gleichen Person mit konstantem Druck abgewickelt, um Abweichungen zu vermeiden und den Ablauf möglichst genau zu standardisieren. Doch hier liegt das Problem der Methode: Denn selbst wenn immer die gleiche Person die Tapes fixiert und abzieht, birgt der Vorgang Fehlerquellen, da nicht gewährleistet werden kann, dass stets mit dem gleichen Druck und der gleichen Intensität gerollt wird. Auch die Geschwindigkeit, mit der das Tape von der Haut abgerissen wird, variiert, wenn eine Hand des Menschen am Werk ist.

Die am nächsten an der von HELLEMANS *et al.* vorgegebenen Kurve liegende ist die des Probanden 5 post-operationem. Hier lässt sich tatsächlich ein Anstieg der Katalase-Konzentration bis TS 14 feststellen, dann zeigt sich ein vergleichsweise gleichmäßiges Plateau bis TS 20.

Es ist bekannt, dass UVA-Exposition das antioxidative Potential der Katalase zerstört und zwar proportional zur Dosis der Bestrahlungsdosis. Es kommt nach Bestrahlung mit UVA-Licht zum sofortigen Abfall des Katalase-Gehaltes in der Haut. Eine komplette Regeneration erfolgt langsam im Laufe von ungefähr vier Wochen (HELLEMANS *et al.,* 2003). Diese Zeitspanne korreliert mit der Erneuerung des gesamten Stratum corneum im normalen Stoffwechselgeschehen. Die Zerstörung der Katalase durch UVA scheint also reversibel zu sein. Die in die Studie aufgenommenen TeilnehmerInnen haben ausgesagt, im Monat vor den Untersuchungen nicht in der Sonne gewesen zu sein. Dennoch ist bei 2 ProbandInnen (P6, P7) kaum Katalase-Aktivität im Stratum corneum nachzuweisen.

Im Mittel liegen die Konzentrationswerte sowohl prae-op als auch post-op bei ungefähr 22 U Katalase/mg Protein. Bei den beiden oben erwähnten ProbandInnen

beträgt der Gehalt dieses antioxidativen Enzyms nur 0,63 bis 5,95 U Katalase/mg Protein. Dies könnte eben jenem Problem der Standardisierbarkeit der Messung geschuldet sein. Es wird in der Literatur auch über eine Saisonabhängigkeit der Katalase-Konzentration berichtet, die begründet liegt in der UVA-Sensibilität des Enzyms. Jedoch ist auch diese bei den Untersuchungen im Rahmen der Dissertation nicht zu erkennen, was wiederum daran liegen könnte, dass die ProbandInnen eigener Aussage zufolge nicht in der Sonne waren. Eine Altersabhängigkeit der Katalase-Konzentration ist in den Studien im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zu erkennen (Tab. 2).

6.2.2. Untersuchungen an exzidiertem Kuheuter und Schweineohr

Der Vollständigkeit halber wurden auch bezüglich des antioxidativen Enzyms Katalase-Untersuchungen an Kuheuter und Schweineohr vorgenommen. Es wird sehr schnell klar, dass die Messergebnisse ebenso unklar sind, wie schon in den Messungen zuvor an der Haut des Menschen.
Am Kuheuter stellen sich die Enzymkonzentrationen sehr unterschiedlich und schwankend dar, es kommt nicht zu der erwünschten Plateaubildung. Das Schweineohr zeigt gleichmäßigere Kurvenverläufe, allerdings ist auch hier keine Gleichmäßigkeit der Konzentration zu erkennen. Der Mittelwert der Katalase-Konzentration liegt beim Schweineohr deutlich höher als beim Kuheuter.
Obwohl es bei den in der Arbeit verwendeten Tiermodellen weder Angaben zu Tieralter noch über die Jahreszeit der jeweiligen Untersuchung gibt, wird die Schwierigkeit der Standardisierung der Messungen als Hauptproblem in den Vordergrund gestellt.

6.3. Messungen des Sauerstoffgehaltes in der Haut

Die Ergebnisse der transkutanen Sauerstoffmessung stellen sich sehr eindeutig dar. Nachdem der Sauerstoff im hermetisch abgeschlossenen Messfeld verbraucht ist, kommt es an der Haut des Menschen in situ zum Wiederanstieg des Sauerstoff-Partialdruckes, bei der exzidierten Haut bleibt dieser Wiederanstieg aus. Die Erklärung liegt in der Durchblutung des Gewebes *in vivo*. Am Menschen prae-op ist die Haut gut durchblutet, durch die hohe Temperatur im Verlauf der Messung werden Hautschichten und Membranen zerstört. Sauerstoff aus den tiefer liegenden

Gewebeschichten diffundiert an die Hautoberfläche und wird im Messfeld registriert. Im nicht mehr durchbluteten *in vitro*-Gewebe fehlt diese Nachdiffusion, da kein Blut mehr im Gewebe zirkuliert, folglich auch kein Sauerstoff mehr transportiert wird. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen der Studie nur an den Menschen vorgenommen.

6.4. Zusammenführung und Vergleich der unterschiedlichen Messungen

Es sind zwei grundsätzliche Unterschiede zwischen den Untersuchungen am Menschen *in vivo* und dem Tiermodell hervorzuheben. Zum einen wurden die Messungen *in vivo* und im Vergleich dazu *in vitro* vorgenommen. Ebenso wichtig ist, dass es sich einmal um Humanhaut, zum anderen um ein Tiermodell handelte. Um diese Einflussfaktoren im Einzelnen zu analysieren, wurde eine kausale Kette von Untersuchungen durchgeführt. In Weiterführung der bekannten Publikationen über Raman-spektroskopische Messungen am Menschen (HATA *et al.,* 2000, ERMAKOV *et al.,* 2004, DARVIN *et al.*, 2003, 2004, 2005 a, b, 2006 a, b, c) wurde auf der Suche nach einem möglichen Tiermodell mit Untersuchungen am exzidierten Kuheuter begonnen. Zweck dieser Versuche war es, ein Modell zu finden, um Analysen zum Thema UV-Strahlung an der Haut des Menschen umgehen zu können.

Nachdem klar wurde, dass sich die *in vivo*-Verhältnisse des Menschen offensichtlich von denen am Tiermodell deutlich unterscheiden, wurde eine zweite Versuchsreihe in Angriff genommen. Untersuchungen am Menschen *in vivo* und *in vitro* wurden hinzugezogen, um Vergleiche zu schaffen zwischen ebenjener Situation des Menschen *in vivo* und *in vitro*, außerdem der *in vitro*-Situation des Menschen und derjenigen *in vitro* am Tiermodell.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an Humanhaut zeigen *in vivo* und *in vitro* erhebliche Unterschiede, insofern wurden noch Untersuchungen zum Sauerstoff-Gehalt der Haut in die Abhandlung aufgenommen. Diese Messungen sollten den Beweis schaffen, dass unter *in vitro*-Bedingungen die Haut nicht mehr mit Sauerstoff versorgt wird. Die Durchblutung ist im toten Gewebe nicht mehr gewährleistet, was dazu führt, dass die O_2-Konzentration drastisch abfällt.

Obwohl das antioxidative System inklusive der Katalase weiterhin auch *in vitro* intakt ist, können die wenigen freien Radikale, die gebildet werden, obwohl der Sauerstoff-Partialdruck sehr gering ist, neutralisiert werden. Das antioxidative Potential wird

hierbei nicht beeinträchtigt. Diese Situation stellt sich beim Menschen *in vitro* wie auch am Tiermodell identisch dar.

Unabhängig von den Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit konnte in der Literatur von ZASTROW *et al.* (2008) etwa zeitgleich gezeigt werden, dass nach UV-Exposition exzidierter Haut geringe Radikalbildung nachweisbar ist. Diese Menge an Radikalen ist jedoch so gering, dass noch keine Zerstörung des antioxidativen Potentials bedingt wird, sondern eine Neutralisation der freien Radikale durch die Abwehrkette der Antioxidantien möglich ist. Eine niedrige Konzentration von Radikalen ermöglicht den Antioxidantien sich wieder zu regenerieren. Wenn bei hohen Radikalkonzentrationen ein kritischer Wert überschritten ist, werden Antioxidantien zerstört und stehen für Neutralisationsprozesse nicht mehr zur Verfügung. Die Ergebnisse dieser Publikation liegen demnach ganz auf einer Linie mit den im Rahmen der Dissertation gewonnenen Erkenntnissen. Diese Feststellungen von unterschiedlichen Seiten weisen offensichtlich darauf hin, dass die Menge an ROS, die *in vivo* gebildet wird, um ein Vielfaches höher sein muss als die, welche unter *in vitro*-Bedingungen entsteht. Die gegenwärtig veröffentlichten Forschungsergebnisse stellen folglich eine deutliche Unterbewertung des Prozesses der Radikalbildung dar. Es wurden bisher noch keine Vergleichsversuche gemacht, die in einem Zuge die Situation der Haut *in vivo* und *in vitro* bewerten. Zusammengenommen zeigen die in den oberen Abschnitten besprochenen Feststellungen, dass die reale Schädigung durch Sonneneinstrahlung unter *in vivo*-Bedingungen noch erheblich höher ist als von ZASTROW *et al.* (2008) gezeigt werden konnte.

Schlussfolgernd lässt sich also sagen, dass Untersuchungen zur Kinetik von Antioxidantien weder an exzidierter Humanhaut noch am Tiermodell unter *in vitro*-Bedingungen durchgeführt werden können. Um Untersuchungen an der Haut des Menschen in situ zu umgehen, scheint bisher die einzige Möglichkeit der direkte Nachweis der Bildung freier Radikale zu sein. Hierzu müssen allerdings andere Methoden in Betracht gezogen werden. Ein Ansatzpunkt ist die Elektronen-Spin-Resonanz (ESR), wobei auch hier erste Versuche zeigen, dass eine direkte Übertragung der *in vitro*-Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation am Menschen sehr schwierig zu sein scheint (HAAG *et al.,* 2011).

7. Zusammenfassung der Ergebnisse

Freie Radikale werden gebildet, wenn äußere Noxen auf die Haut einwirken. In der Radikalabwehr bilden Antioxidantien eine Schutzkette, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) abbaut und so Schädigungen entgegenwirkt. In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden an der Bauchhaut von 7 Menschen, der Haut von 14 Eutern und 6 Schweineohren verschiedene Messungen zur Detektierung der Carotinoide, der Katalase-Enzymaktivität und zum Sauerstoffgehalt in der Haut durchgeführt. Die Untersuchungen wurden am Menschen *in vivo* und *in vitro*, an der Haut der Tiere ausschließlich *in vitro* vorgenommen. Es ist im Rahmen dieser Studien gelungen nachzuweisen, dass die Radikalbildung unter gleichen Stresseinwirkungen *in vitro* deutlich reduziert ist im Vergleich zur Situation *in vivo*. Eine weitere bedeutsame Erkenntnis ist, dass *in vitro*-Untersuchungen nicht geeignet sind, um die Kinetik der Antioxidantien in der Haut des Menschen oder im Tiermodell zu analysieren. Bereits publizierte Literaturergebnisse zum Einfluss von äußeren Stressfaktoren wie UV-Strahlung beziehen sich in der Regel auf Untersuchungen an exzidierter Humanhaut. Die in diesen Versuchsreihen gewonnenen Einsichten scheinen nur die „Spitze des Eisberges“ darzustellen, da unter *in vivo*-Bedingungen eine eklatant höhere Radikalbildung zu erwarten ist. Diese Erkenntnis, die sich im Zuge der vorliegenden Untersuchungen ergab, sollte zu weitreichenden Konsequenzen im Bereich der Entwicklung von Schutzstrategien gegen UV-Strahlung führen. Nicht zuletzt zeigen die zurückliegenden Studienreihen im Rahmen dieser Arbeit, dass Stressfaktoren, die *in vivo* am Menschen nicht getestet werden sollten, durchaus am Tiermodell untersucht werden können. Ein Beispiel hierfür könnte die Evaluierung des Lichtschutzfaktors bei Sonnenschutzmitteln sein, für welche bisher Menschen einer UV-Exposition ausgesetzt werden, um die Erythemwirksamkeit zu bestimmen. Für diese Tests sollte jedoch weniger die Kinetik der Antioxidantien durch Messungen mit der Raman-Resonanz-Spektroskopie in den Mittelpunkt gerückt werden, da hier keine Korrelation zwischen den Messungen *in vivo* und *in vitro* festgestellt werden konnte. Vielmehr sollte in diesem Fall die Bildung der freien Radikale direkt mit einer hochempfindlichen Messtechnik, zum Beispiel der Elektronen-Spin-Resonanz-Technik (ESR), nachgewiesen werden.

Zusammenfassend bildet diese Dissertation eine gute Grundlage für die Entwicklung weiterer Forschungswege, um Stressfaktoren, die unter *in vivo*-Bedingungen nicht getestet werden können, am Tiermodell *in vitro* zu untersuchen. Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Grundlagen-Untersuchungen zur Wechselwirkung von

Antioxidantien und freien Radikalen am Humansystem *in vivo* und *in vitro* und am Tiermodell *in vitro* geben einen Ausblick, dass mit einer sensibleren Technik wie der ESR relevante Einsichten bezüglich der Radikalbildung unter *in vivo*-Bedingungen gewonnen werden können (HAAG *et al.*, 2011). Aus den erzielten Erkenntnissen ergeben sich neue, verschärfte Anforderungen an die Entwicklung von Schutzmechanismen für die Neutralisation von freien Radikalen, die durch verschiedene Stressfaktoren in der Haut *in vivo* erzeugt werden.

8. Summary

“Evaluation of the effects of exogenous noxae on the antioxidative potential of the skin using spectroscopic methods“

Free radicals are created when exogenous noxae act on the skin. In the defence against radicals, antioxidants form a safety chain which decomposes ROS and prevents injuries. In this study measurements have been taken on the abdominal skin of 6 human beings, the skin of 14 cow’s udders and the skin of 6 pig’s ears to detect β-carotine, catalase enzyme activity and oxygen levels in the skin. This study demonstrates that subsequent to the influence of the same stresses, the formation of radicals is significantly reduced *in vitro* compared to the situation in vivo. Another important finding is that the *in vitro* examination is not suited to analyze the kinetics of antioxidants in the human skin or in animal models. Previously published results regarding the influence of exogenous stress factors such as UV-radiation pertain to studies using excised human skin. Insight obtained through these series of tests seem to only be the „tip of the iceberg“, because under *in vivo* condition, the formation of radicals can be expected to be dramatically higher. The insight gained during the course of the examinations should lead to wide-ranging consequences for the development of protection strategies against UV-radiation. Additionally, the conducted test series show that stress factors which are unsuitable for in vivo testing on human subjects, can indeed be tested on an animal model (e.g. cow’s udder). to To evaluate the sun protection factor in sunscreen for example, humans are up to now exposed to UV radiation to determine erythema effectivity. The focus however should not lie on measuring the kinetics of antioxidants using raman-resonance-spectroscopy because no correlation between the measurements *in vivo* and *in vitro* could be detected. The formation of free radicals should rather be verified directly with highly sensitive measuring technology, e.g. ESR.

In summary, this thesis demonstrates how to examine stress factors *in vitro* in an animal model, which are unsuitable for testing *in vivo*. Research on the interactions between antioxidants and free radicals in the human system *in vivo* and *in vitro* and in the animal model *in vitro* conducted through the course of this thesis allows to conclude that relevant understanding of the formation of radicals under *in vivo* conditions could be gained with more sensible technology like ESR. The results indicate the need for new and stricter standards for the development of protection

mechanisms for the neutralisation of free radicals created through various stress factors in the skin *in vivo*.

I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AP	antioxidatives Potential
Ar	Argon
β	beta
bzw.	beziehungsweise
CCD	Charge Coupled Device (Kamera)
cm^2	Quadratzentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Euter
ESR	*engl: electron spin resonance,* Elektronen-Spin-Resonanz
et al.	*lat: et alteri*, und andere
Fe	*lat: ferrum,* Eisen
g/mol	Gramm pro Mol
H	Wasserstoff
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HDL	High Density Lipoproteins
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	Infrarot
IU	*engl: international units,* internationale Einheiten
LDL	Low Density Lipoproteins
M	Molar
min	Minuten
mJ	Millijoule
ml, l	Milliliter, Liter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (Druckeinheit)
µg, mg	Mikrogramm, Milligramm
µmol/l	Mikromol pro Liter
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Proben/ProbandInnen
nm, µm, mm, cm	Nanometer, Mikrometer, Millimeter, Zentimeter
P	ProbandIn
$^1O_2$	Singulett-Sauerstoff

O_2	Sauerstoff
ROS	*engl: reactive oxygen species*, reaktive Sauerstoffspezies
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
post-op	post-operationem (nach der Operation)
prae-op	prae-operationem (vor der Operation)
ProbandInnen	Probandinnen und Probanden
s.	siehe
SC	Stratum corneum
SE	*engl: standard error,* Standardfehler
SPF	*engl: sun protection factor,* Lichtschutzfaktor
SOD	Superoxid-Dismutase
STDEV	*engl: standard deviation*, Standardabweichung
SwO	Schweineohr
T 0, 30, 60, 90, 120	Zeitpunkt der Messung vor UV-Exposition, bzw. 30, 60, 90, 120 Minuten danach
Tab.	Tabelle
TS	Tape-Strip
U	*engl: unit*, Einheit
UV	ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
VIS	*engl: visible,* sichtbar
VLDL	Very Low Density Lipoproteins

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Haut 5
Abbildung 2a: β-Carotin 11
Abbildung 2b: Lycopin 12
Abbildung 3: Darstellung Raman-, Rayleigh-Streuung 16
Abbildung 4: Raman-Spektrum der Haut bei 514,5 nm 17
Abbildung 5: Raman Spektrum der Haut nach Abzug Untergrund 18
Abbildung 6: Absorptionsspektren β-Carotin, Lycopin 21
Abbildung 7: Abbau und Regeneration β-Carotin nach UV-Exposition der Haut am Menschen 25
Abbildung 8: Raman-spektroskopischer Messaufbau 27
Abbildung 9: Bildliche Darstellung der Tape Strip-Abrissmethode.....30
Abbildung 10: Korrelation der Proteinkonzentration und der Pseudoabsorption auf Tape Strips..... 31
Abbildung 11: Katalase Standardreihe 32
Abbildung 12: Qualitätssicherung der Katalase Standardreihe 33
Abbildung 13: Messaufbau der transkutanen O_2-Messung.....34
Abbildung 14: Änderungen des AP vor und nach UV-Exposition 35
Abbildung 15: MW Kuheuter Carotinoide vor und nach UV-Exposition bezogen auf den Ausgangswert.....36
Abbildung 16: Abfall des AP 120 min nach UV-Exposition 37
Abbildung 17: P2 Vergleich Kurven nach UV-Exposition Carotinoide prae-op und post-op 39
Abbildung 18: P3 Vergleich Kurven nach UV-Exposition Carotinoide prae-op und post-op 39
Abbildung 19: P4 Vergleich Kurven nach UV-Exposition Carotinoide prae-op und post-op 40
Abbildung 20: P5 Vergleich Kurven nach UV-Exposition Carotinoide prae-op und post-op 40
Abbildung 21: P6 Vergleich Kurven nach UV-Exposition Carotinoide prae-op und post-op 41
Abbildung 22: P7 Vergleich Kurven nach UV-Exposition Carotinoide prae-op und post-op 41
Abbildung 23: MW Probanden Carotinoide vor und nach UV-Exposition bezogen auf den Ausgangswert.....43

Abbildung 24: Carotinoide prae-op T0 und T90 aller Probanden.....44
Abbildung 25: Carotinoide post-op T0 und T90 aller Probanden.....44
Abbildung 26: Carotinoid-Abfall prae-op innerhalb 90 min nach UV-Exposition.....45
Abbildung 27: Carotinoid-Abfall post-op innerhalb 90 min nach UV-Exposition.....46
Abbildung 28: Korrelation Carotinoid-Konzentration prae-op und post-op mit Regressionsgerade.....47
Abbildung 29: P1 Katalase-Konzentration Vergleich prae-op und post-op 48
Abbildung 30: P2 Katalase-Konzentration Vergleich prae-op und post-op 48
Abbildung 31: P3 Katalase-Konzentration Vergleich prae-op und post-op 49
Abbildung 32: P4 Katalase-Konzentration Vergleich prae-op und post-op 49
Abbildung 33: P5 Katalase-Konzentration Vergleich prae-op und post-op 50
Abbildung 34: P6 Katalase-Konzentration Vergleich prae-op und post-op 50
Abbildung 35: P7 Katalase-Konzentration Vergleich prae-op und post-op 51
Abbildung 36: Katalase-Aktivität an Tape Strips bei P5 post-op.....52
Abbildung 37: MW Katalase-Konzentration Probanden prae-op und post-op im Vergleich.....53
Abbildung 38: relative MW der Katalase-Aktivität bezogen auf höchsten Wert der Messungen.....53
Abbildung 39: MW Katalase-Konzentration Kuheuter im Vergleich.....55
Abbildung 40: relative MW der Katalase-Aktivität bezogen auf höchsten Wert der Messungen.....56
Abbildung 41: Katalase-Aktivität an Tape Strips bei E4.....57
Abbildung 42: Katalase-Aktivität an Tape Strips bei E6.....57
Abbildung 43: MW Katalase-Konzentration Schweineohr im Vergleich.....58
Abbildung 44: relative MW Katalase-Konzentration bezogen auf höchsten Wert der Messungen.....59
Abbildung 45: Katalase-Aktivität an Tape Strips bei SwO2.....59
Abbildung 46: Katalase-Aktivität an Tape Strips bei SwO5.....60
Abbildung 47: transkutane O_2-Messung der Probanden prae-op.....61
Abbildung 48: transkutane O_2-Messung der Probanden post-op.....61
Abbildung 49: MW der transkutanen O_2-Messungen der Probanden im Vergleich prae-op und post-op.....62

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einzelmessungen an gleicher Hautstelle an 14 Eutern, MW, STDEV und STDEV in % 37

Tabelle 2: MW Katalase-Konzentration aller Probanden prae-op und post-op bezüglich Altersabhängigkeit..... 54

IV. Literaturverzeichnis

AEBI H. (1984): “Catalase *in vitro*“, *Methods in Enzymology, Academic Press*, 105: 121-126

ASTLEY S.B., ELLIOTT R.M., ARCHER D.B., SOUTHON S. (2002): “Increased Cellular Carotenoid Levels reduce the Persistence of DNA Single-Strand Breaks after Oxidative Challenge“, *Nutrition and Cancer* 43(2), 202-213

BIESALSKI H.K. (1997): “Betacarotin“; in: Biesalski, K.H.; Schrezenmeir, J.; Weber, P.; Weiß, H.: Vitamine, Physiologie, Pathophysiologie, Therapie; Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 20-33

BLACK H.S, LAMBERT C.R. (2001): “Radical Reactions of Carotenoids and Potential Influence on UV Carcinogenesis“; in: Thiele J., Elsner P.: Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology; *Curr Probl Dermatol. Basel, Karger* 29, 140-156

BRANDMÜLLER J., MOSER H. (1962): “Einführung in die Ramanspektroskopie“, Dr. Dietrich Steinkopf Verlag, Darmstadt

DARVIN M.E., GERSONDE I., ALBRECHT H., JACOBI U., STERRY W., LADEMANN J. (2003): “Nicht-invasive Bestimmung von β-Carotin und Lycopin in der menschlichen Haut“, *Laborwelt* 6, 21-22

DARVIN M.E., GERSONDE I., EY S., BRANDT N.N., ALBRECHT H., GONCHUKOV S.A., STERRY W., LADEMANN J. (2004): “Noninvasive Detection of β-Carotin and Lycopin in Human Skin using Raman Spektroskopy“, *Laser Physics* 14 (2), 231-233

DARVIN M.E., GERSONDE, I., ALBRECHT H., GONCHUKOV S.A., STERRY W., LADEMANN J. (2005 a): “Determination of Beta-Carotin And Lycopene Concentrations in Human Skin Using Resonance Raman Spectroscopy“, *Laser Physics* 15 (2), 295-299

DARVIN M.E., GERSONDE I., MEINKE M., STERRY W., LADEMANN J. (2005 b): "Non-Invasive *in vivo* Determination of the Carotenoids β-Carotin and Lycopin Concentrations in the Human Skin using the Raman Spectroscopic Method", *J. Phys. D: Appl. Phys.* 28, 2696-2700

DARVIN M.E., SCHANZER S., TEICHMANN A., BLUME-PEYTAVI U., STERRY W., LADEMANN J. (2006 a): "Functional Food und Bioverfügbarkeit im Zielorgan Haut", *Hautarzt* 57, 286-290

DARVIN M.E., GERSONDE I., ALBRECHT H., STERRY W., LADEMANN J. (2006 b): "In vivo Raman Spectroscopic Analysis of the Influence of UV Radiation on Carotenoid Antioxidant Degradation of the Human Skin", *Laser Phys.* 16 (5), 833-837

DARVIN M.E., GERSONDE I., ALBRECHT H., MEINKE M., STERRY W., LADEMANN J. (2006 c): "Non-Invasive *in vivo* Detection of the Carotenoid Antioxidant Substance Lycopin in the Human Skin using the Resonance Raman Spectroscopy", *Laser Phys. Lett.* 3 (9), 460-463

DARVIN M.E., MEINKE M.C., STERRY W., LADEMANN J. (2013): "Optical methods for noninvasive determination of carotenoids in human and animal skin", *Journal of Biomedical Optics* 18 (6), 061230

DI MASCIO P., KAISER S., SIES H. (1989): "Lycopene as the Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher", *Archives of Biochemistry and Biophysics* 274 (2), 532-538

EDGE R., MCGARVEY D.J., TRUSCOTT T.G. (1997): "The Carotenoids as Anti-Oxidants – a Review", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 41, 189-200

ERMAKOV I.V., ERMAKOVA M.R., GELLERMANN W., LADEMANN J. (2004): "Noninvasive Selective Detection of Lycopin and β-Carotin in Human Skin using Raman Spectroskopy", *Journal of Biomedical Optics* 9 (2), 332-338

FRITSCH P. (2004): “Aufbau und Funktionen der Haut“ In: Fritsch P. (ed): Dermatologie und Venerologie, Lehrbuch und Atlas, Springer Verlag, 3-42

FUCHS J., HUFLEJT M., ROTHFUSS L. M., WILSON D. S., CARCAMO G., PACKER L. (1989): “Impairment of Enzymic and Non-Enzymic Antioxidants in Skin by UVB Irradiation“, *J Invest Dermatol* 93: 769-773

HAAG S.F., TASKOPARAN B., DARWIN M.E., GROTH N., LADEMANN J., STERRY W., MEINKE M.C. (2011): “Determination of the antioxidative capacity of the skin *in vivo* using resonance Raman and electron paramagnetic resonance spectroscopy“, John Wiley & Sons A/S, *Experimental Dermatology*

HAMMOND B.R., WOOTEN B.R. (2004): “Validity Issues with the *In Vivo* Measurement of Skin Carotenoids Using Raman Spectroskopy“, *J Invest Dermatology* 122, 544-546

HAMMOND B.R., WOOTEN B.R. (2005): “Resonance Raman spectroscopic measurement of carotenoids in the skin and retina“, *J Biomed Opt* 10 (5), 054002-1/12

HATA T.R., SCHOLZ T.A., ERMAKOV I.V., MCCLANE R.W., KHACHIK F. GELLERMANN W., PERSHING L.K. (2000): “Non-Invasive Raman Spectroscopic Detection of Carotenoids in Human Skin“, *J Invest Dermatology* 115, 441-448

HELLEMANS L., CORSTJENS H., NEVEN A., DECLERCQ L., MAES D. (2003): “Antioxidant Enzyme Activity in Human Stratum Corneum Shows Seasonal Variation with an Age-Dependent Recovery“, *J Invest Dermatol* 120: 434-439

JOHANSSON L.H., BORG H. (1988): “A Spectrophotometric Method for Determination of Catalase Activity in Small Tissue Samples“, *Anal Biochem* 174: 331-336

JUNQUEIRA L.C.U., CARNEIRO J. (2005): “Haut“ In: Gratzl M. (Hrsg.): Histologie, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 305-313

KLOTZ L.-O., HOLBROOK N.J., SIES H. (2001): “UVA and Singlet Oxygen as Inducers of Cutaneous Signaling Events“; in: Thiele J., Elsner P.: Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology; *Curr Probl Dermatol. Basel, Karger* 29, 95-113

KONINGSTEIN J.A. (1971): “Introduction of the Theory of the Raman Effect“, Dordrecht: D. Reidel Publishing

LUDEWIG T., MICHEL G., GUTTE G. (1996): “Histologisch-histochemische Untersuchung zum Bau der Euterhaut des Rindes unter besonderer Berücksichtigung der Veränderungen durch die Perfusion im Rahmen des Eutermodells“, *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 103, 501-505

MEYER W., SCHWARZ R., NEURAND K. (1987): “Die Haut der Haussäugetiere (1). Ihre Bedeutung für die dermatologische Forschung. Grundzüge der vergleichenden Morphologie“, *Tierärztl. Prax.* 6, 153-162

MIN D.B., BOFF J.M. (2002): “Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen“, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1, 58-72

MONTAGNA W. (1962): “The structure and function of skin“, 2. Aufl., Academic Press New York and London

NIEDORF F. (2001): “Entwicklung eines Verfahrens zur quantitativen Auswertung nicht-invasiver reflektionsspektroskopischer Messungen von Beta-Carotin in der Haut“, *Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover*

OLSON J.A. (1994): “Absorption, Transport and Metabolism of Carotenoids in Humans“, *Pure & Appl. Chem.,* 66 (5), 1011-1016

PALOZZA P., KRINSKY N.I. (1992): “Antioxidant Effects of Carotenoids in Vivo and in Vitro: An Overview“, *Methods in Enzymology*, 213, 403- 420

PARKER R.S. (1996): “Absorption, Metabolism and Transport of Carotenoids“, *Faseb J.* 10, 542-551

PFANDER H. (1992): “Carotenoids: An Overview“, *Methods in Enzymology*, 213, 3-13

RHIE G., SEO J. Y., CHUNG J. H. (2001): “Modulation of Catalase in Human Skin *In Vivo* by Acute and Chronic UV Radiation“, *Mol. Cells* 11 (3), 399-404

RHIE G., SHIN M. H., SEO J.Y., CHOI W. W., CHO K. H., KIM K. H., PARK K. C., EUN H. C., CHUNG J. H. (2001): “Aging- and Photoaging-Dependent Changes of Enzymic and Nonenzymic Antioxidants in the Epidermis and Dermis of Human Skin In Vivo“, *J Invest Dermatol* 117, 1212-1217

SCHAEFER, H., REDELMEIER T.E. (1996): “Structure and Dynamics of the Skin Barrier“ In: Skin Barrier, Principles of Percutaneous Absorption, Karger, 2-3

SIES H., STAHL W. (2004): “Carotenoids and UV Protection“, *Photochem. Photobiolog. Sci.* 3, 749-752

SHINDO Y., HASHIMOTO T. (1997): Time course of changes in antioxidant enzymes in human skin fibroblasts after UVA irradiation“, *J Dermatol Sci* 14: 225-232

SHINDO Y., WITT E., HAN D., EPSTEIN W., PACKER L. (1994): “Enzymic and Non-Enzymic Antioxidants in Epidermis of Human Skin“, *J Invest Dermatol* 102: 122-124

SPIESS G., KLAPÖTKE T.M. (1999): “Eine einfache Einführung in die Raman-Spektroskopie“, LMU München

STERRY, W. (2011): “Kurzlehrbuch Dermatologie“, Thieme Verlag, 5

THIELE JJ, SCHROETER C, HSIEH SN, PODDA M, PACKER L (2001): “The antioxidant network of the stratum corneum“, *Curr Probl Dermatol* 29: 26–42.

WENK J., BRENNEISEN P., MEEWES C. et al. (2001): “UV-Induced Oxidative Stress and Photoagíng"; in: Thiele J., Elsner P.: Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology; *Curr Probl Dermatol. Basel, Karger* 29, 83-94

YEUM K-J., RUSSELL R.M. (2002): “Carotenoid Bioavailability and Bioconversion“, *Annu. Rev. Nutr.*, 22: 483-504

ZASTROW L., GROTH N., KLEIN F., KOCKOTT D., LADEMANN J., FERRERO L. (2008): “Detection and Identification of Free Radicals Generated by UV and Visible Light in *Ex Vivo* Human Skin“, *IFSCC Magazine* 11 (3): 207-215

V. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. Roland Rudolph für die Betreuung meiner Dissertation und die immer interessanten Vorlesungen der Tierpathologie während meines Studiums danken.
Tiefer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. Jürgen Lademann, der mit wichtigen Fragen und Hilfestellungen zum richtigen Zeitpunkt sowie unermüdlicher Geduld die Realisierung dieser Arbeit ermöglicht hat.
Ebenso bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Gabler für die ausführliche und hilfreiche Korrektur.
Danken möchte ich auch Frau Dr. rer. nat. Martina Meinke, die mir vor allem auf dem Gebiet der Katalase-Messungen, bei mathematischen und statistischen Fragen eine unersetzliche Hilfe war.
Des Weiteren danke ich Dr. Maxim Darvin, der mich im Bereich der Raman-Spektroskopie sehr unterstützt hat.
Bei Sabine Schanzer möchte ich mich bedanken für die Hilfe bei der Durchführung vieler Messungen, bei Fanny Knorr für Redigieren und Übersetzung, außerdem bei Stefan Haag und allen Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Bereich für Experimentelle und Angewandte Physiologie der Haut. Die Arbeit mit Euch hat viel Spaß gemacht.
Der Fleischerei Staske danke ich für die Belieferung der für die Messungen nötigen Kuheuter.
Besonderer Dank gilt auch Philine Endres, Lena Albrecht, Fanny Knorr und Moritz Hartmann, die mit Geduld an meiner Seite standen und in vielen Momenten die notwendige Abwechslung und Ablenkung gewährleisteten. Schließlich danke ich Gabriel von Machui, der mit Geduld, Zuversicht und Humor an meiner Seite steht und das Leben immer noch ein bisschen schöner macht.
Mein innigster Dank aber gilt meinen Eltern Barbara und Robert Bechtel. Ihr habt es mir durch Eure Unterstützung und die oft notwendigen Freiräume ermöglicht, mein Studium, meine Promotion und meinen Beruf als Tierärztin zu verwirklichen. Ich danke Euch von Herzen.

VI. Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 05.05.2015