

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

DISSERTATION

In vivo- und ex vivo-Bestimmung der kutanen radikalfangenden
Eigenschaften einer hyperforinhaltigen Hautcreme mittels eines
L-Band Elektronen-Spin-Resonanz-Spektrometers und
Messung der Cremewirkung auf die extrazelluläre Lipidmatrix

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Sophia Arndt
aus Rathenow

Datum der Promotion: 02.03.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
Abstrakt (deutsch)	8
Abstract (english)	10
1. Einleitung	12
1.1. Motivation.....	12
1.2. Aufbau und Funktion der Haut.....	14
1.2.1. Lipide des Stratum corneums.....	16
1.3. Elektronen-Spin-Resonanz (ESR)-Spektroskopie	19
1.3.1. Physikalische Grundlagen	19
1.3.2. Radikalbestimmung mit Hilfe des ESR-Spektrometers und von Spin-Markern	20
1.4. Zielstellung	21
2. Material und Methodik	23
2.1. Material	23
2.1.1. Studienpräparat.....	23
2.1.2. Materialliste	23
2.1.3. <i>Ex vivo</i> Hautmodelle	24
2.1.4. Probanden	24
2.2. Methodik	24
2.2.1. Studiendesign	24
2.2.2. Ein- und Ausschlusskriterien der Studie	25
2.2.3. Fragebogen.....	26
2.2.4. Elektronen-Spin-Resonanz (ESR)-Spektrometer.....	27
2.2.5. <i>In vivo</i> ESR-Messungen.....	28
2.2.6. <i>Ex vivo</i> ESR-Messungen.....	32
2.2.7. Auswertung der ESR-Spektren	34
2.2.8. Optische Messung der Absorptions- und Streueigenschaften der Cremes	36
2.2.9. Hautlipidanalyse.....	37
3. Ergebnisse	40
3.1. Datenanalyse und statistische Auswertung	40
3.2. Fragebogen.....	40
3.3. ESR-Messungen	41
3.3.1. <i>In vivo</i> ESR-Messungen.....	41
3.3.2. <i>Ex vivo</i> ESR-Messungen an Schweineohrhaut.....	49

3.4.	Optische Messung der Absorptions- und Streueigenschaften	53
3.5.	Lipide	55
4.	Diskussion	62
4.1.	Bildung freier Radikale in der Haut unter Stressinduktion durch VIS-/NIR-Bestrahlung und antioxidative Wirkung der 1,5% hyperforinhaltigen Testcreme	62
4.1.1.	Bildung freier Radikale in der Haut unter VIS-/NIR-Bestrahlung ohne topische Applikationen	62
4.1.2.	Radikalschutzwirkung <i>in vivo</i> nach einmaliger Cremeapplikation und optische Eigenschaften der Cremes	65
4.1.3.	<i>In vivo</i> Langzeitwirkung der applizierten Testcremes auf den Radikalschutz.....	67
4.1.4.	Vergleich der Radikalschutzwirkung der Testcremes <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i>	68
4.2.	Lipidextraktion	70
4.3.	Klinische Relevanz	74
5.	Zusammenfassung.....	79
6.	Literaturverzeichnis	81
7.	Eidesstattliche Versicherung.....	92
8.	Lebenslauf	93
9.	Publikationsliste.....	94
10.	Danksagung.....	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau der Haut, palmare/plantare Hautbiopsie (modifiziert nach Meyer-Hoffert et al. 2009: 6, Abbildung 5 LEKTI-2 is expressed at palmar and plantar sites).....	14
Abbildung 2 Strukturformel von 3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy (PCA) (Sigma-Aldrich)	21
Abbildung 3 L-Band ESR-Spektrometer mit Sonnensimulator und Lichtleitfaser sowie <i>ex vivo</i> Schweineohrhautprobe	27
Abbildung 4 Markierung der Cremeareale, Auflegen des Filterpapiers, Einwirken des PCA-Markers unter einem Epikutantestpflaster	28
Abbildung 5 Auftragen der Testcreme (2mg/cm ²) mit einer Einwegspritze auf das zuvor markierte Hautareal	29
Abbildung 6 Gleichmäßige Verteilung der Creme auf dem markierten Hautareal mit einem in der Creme gesättigtem Fingerling	29
Abbildung 7 <i>In vivo</i> ESR-Messung der Probanden mit <i>in situ</i> VIS-/NIR-Bestrahlung	30
Abbildung 8 <i>In vivo</i> Probenhalterung der ESR-Apparatur mit Lichtleitfaser zur <i>in situ</i> VIS-/NIR-Bestrahlung	30
Abbildung 9 Schema der einzucremenden Hautareale	31
Abbildung 10 ESR-Probenhalterung zur <i>ex vivo</i> Messung mit Lichtleitfaser zur VIS-/NIR-Bestrahlung	33
Abbildung 11 Beispiel eines einzelnen ESR-Spektrums von PCA nach Penetration in die humane Haut.....	34
Abbildung 12 Beispiel eines akkumulierten ESR-Spektrums von PCA nach Penetration in die humane Haut	34
Abbildung 13 Mittelwerte relativ zum Ausgangswert der ESR-Intensität ohne VIS-/NIR-Bestrahlung und mit VIS-/NIR-Bestrahlung	35
Abbildung 14 Differenz der relativen Mittelwerte der ESR-Intensität mit und ohne	36
Abbildung 15 Hautlipidextraktion am Unterarm an einem unbehandelten Hautareal mittels eines sich im Zentrifugenröhrchen befindenden Ethanol-Cyclohexan-Lösungsmittels.....	38
Abbildung 16 Kummulative Radikalbildung in Visite 1, dargestellt als Mittelwerte der Differenzen aus der ESR-Signalintensität der unbestrahlten und bestrahlten Messungen \pm mittlerer Standardfehler, n= 11, ** p< 0,01, * p< 0,05.	42
Abbildung 17 Radikalanstieg <i>in vivo</i> Visite 1 in relativer Einheit pro 2 min, n=11, Daten entsprechen der 1. Ableitung der in Abbildung 16 dargestellten gefitteten Kurven	43
Abbildung 18 kummulative Radiaklproduktion nach fünfstündiger Cremeinwirkzeit, dargestellt als Mittelwerte der Differenzen aus der ESR-Signalintensität der unbestrahlten und bestrahlten Messungen \pm mittlerer Standardfehler, n= 3	45
Abbildung 19 kummulative Radiaklprodukttion nach 14-stündiger Cremeinwirkzeit, dargestellt als Mittelwerte der Differenzen aus der ESR-Signalintensität der unbestrahlten und bestrahlten Messungen \pm mittlerer Standardfehler, n= 3	45
Abbildung 20 Kummulative Radiakalproduktion in Visite 2, dargestellt als Mittelwerte der Differenzen der ESR-Signale der unbestrahlten und bestrahlten Messungen \pm mittlerer Standardfehler, n= 11, *** p< 0,001, ** p< 0,01.	46
Abbildung 21 Radikalanstieg <i>in vivo</i> Visite 2 in relativer Einheit pro 2 min, n=11, Daten entsprechen der 1. Ableitung der in Abbildung 20 dargestellten gefitteten Kurven	47
Abbildung 22 Kummulative Radikalbildung <i>ex vivo</i> , dargestellt als Mittelwerte der Differenzen der ESR-Signale der unbestrahlten und bestrahlten Messungen \pm mittlerer Standardfehler, n= 9,*** p< 0,001, * p< 0,05.	50
Abbildung 23 Radikalanstieg <i>ex vivo</i> in relativer Einheit \pm Standardabweichung, n=9, Daten entsprechen der 1. Ableitung der in Abbildung 22 dargestellten gefitteten Kurven	50
Abbildung 24 Vergleich der absoluten kummulativen Radikalbildung zwischen <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i> Visite 2, Darstellung der Mittelwerte der Differenzen \pm mittlerer Standardfehler, <i>in vivo</i> n= 11, <i>ex vivo</i> n= 9, * p< 0,05.	52

Abbildung 25 Vergleich der prozentualen Radikalbildung zwischen <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i> Visite 2 Messungen nach 10 min, <i>in vivo</i> n= 11 Darstellung der Mittelwerte der Differenzen bezogen auf die Messwerte ohne Behandlung \pm mittlerer Standardfehler, <i>in vivo</i> n= 11, <i>ex vivo</i> n= 9...	53
Abbildung 26 Vergleich der Streu- (μ_s') und Absorptionskoeffizienten (μ_a) der Placebo- und Verumcreme zwischen 400-2000 nm, dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung, n= 3	54
Abbildung 27 Vergleich der Streu- (μ_s') und Absorptionskoeffizienten (μ_a) porciner Spalthaut mit Placebo-, Verumcreme und ohne Creme zwischen 400-2000 nm, dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=3	55
Abbildung 28 HPTLC-Platte nach der Derivatisierung, (1) Standardlipidlösung, (2, 3) Hautlipidextrakt, (4) Placebocremeextrakt, (5) Verumcremeextrakt (Haag et al. 2014: 227-233)	56
Abbildung 29 Relative Lipidkonzentration in Visite 1 nach der Bestrahlung, bezogen auf die Werte ohne Bestrahlung, dargestellt als Mittelwerte \pm mittlerer Standardfehler (n= 6 mit Ausnahme von: Lecithin/Sphingomyelin: unbehandelt n=4, Verumcreme n=5; [NP]/[NS]: Placebo- und Verumcreme n=2; Ölsäure: unbehandelt und Verumcreme n=5)	57
Abbildung 30 Relative Lipidkonzentration in Visite 2 nach der Bestrahlung, bezogen auf die Werte ohne Bestrahlung, dargestellt als Mittelwerte \pm mittlerer Standardfehler (n= 11 mit Ausnahme von: Lecithin/Sphingomyelin: unbehandelt n= 8, Verum n= 10, Placebo n= 8; Ölsäure: unbehandelt und Verum n= 9, Placebo n= 7); statistische Auswertung der absoluten Lipidkonzentrationen vor und nach Bestrahlung (nicht abgebildet), * p< 0,05, (*) p< 0,10.....	58
Abbildung 31 Relative Lipidkonzentration Visite 1 ohne Bestrahlung, normiert auf die Werte ohne Behandlung, dargestellt als Mittelwerte \pm mittlerer Standardfehler (n=11, mit Ausnahme von: Lecithin/Sphingomyelin: n=7; Ceramid [NP]/[NS]: Verum n=5, Placebo n=6; Ölsäure: n=10), statistische Auswertung erfolgte anhand der Werte der absoluten Lipidkonzentrationen (nicht abgebildet), ** p< 0,01, * p< 0,05, (*) p< 0,10.	59
Abbildung 32 Relative Lipidkonzentration Visite 2 ohne Bestrahlung, normiert auf die Werte ohne Behandlung, dargestellt als Mittelwerte \pm mittlerer Standardfehler (n=11 mit Ausnahme von: Lecithin/Sphingomyelin: n=8; Ölsäure: unbehandelt, Verum n=10, Placebo n=8), statistische Auswertung erfolgte anhand der Werte der absoluten Lipidkonzentrationen (nicht abgebildet) (*) p< 0,10.	60
Abbildung 33 Absolute Lipidkonzentration Visite 1 und 2, dargestellt als Mittelwerte \pm mittlerer Standardfehler (n=11, mit Ausnahme von Lecithin/Sphingomyelin: Visite 1 unbehandelt und Verum, Visite 2 Verum und Placebo n=10, Visite 2 unbehandelt n=9).....	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Klassifikation der Ceramide in Anlehnung an Motta (Motta et al. 1993: 147-151).....	17
Tabelle 2 Materialliste	23
Tabelle 3 Einschluss-, Ausschluss- und Abbruchkriterien der Studie	26
Tabelle 4 Relative Radikalbildung in % bezogen auf die kummulative Radialbildung der unbehandelten Messareale nach 2,10 und 18 min Messdauer, \pm mittlerer Standardfehler in %, n=11, Visite 1	44
Tabelle 5 Relative Radikalbildung in % bezogen auf die unbehandelten Messareale nach 2 und 10 min Messdauer, \pm mittlerer Standardfehler in %, n=11, Visite 2.....	48
Tabelle 6 Relative Radikalbildung in % bezogen auf die unbehandelten Messareale nach 2 min,10 min und 18 min Messdauer, \pm mittlerer Standardfehler in %, n=9.....	51

Abkürzungsverzeichnis

AMD-HPTLC	automatisierte mehrstufige Hochleistungsdünnschichtchromatographie
bzw.	beziehungsweise
CERT	Ceramid-Transport-Protein
ESR-Spektroskopie/-Spektrometer	Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie/-Spektrometer
FFS	freie Fettsäure
HMPC	Committee for Herbal Medical Products
HP	Hypericum perforatum
IFN- γ	Interferon- γ
IR	Infrarotlicht
LPP	long periodicity phase der SC-Lipidlamellen
m ²	Quadratmeter
μ m	Mikrometer
NIR	infrarotnahes Licht
o.g.	oben genannt
PCA	3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl
PLA 2	Phospholipase A2
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SC	Stratum corneum
SWO	Schweineohr
SPP	short periodicity phase der SC-Lipidlamellen
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-oxyl
TEWL	transepidermaler Wasserverlust
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolettes Licht
VIS	sichtbares Licht
wIR	wassergefiltertes Infrarotlicht
z.B.	zum Beispiel

Abstrakt (deutsch)

Freie Radikale sind ein wichtiger Bestandteil multipler Stoffwechselreaktionen, die in Wechselwirkung mit dem antioxidativen Netzwerk stehen. Bei Homöostasestörungen zu Gunsten der freien Radikale besteht jedoch ein erhöhtes Risiko für Zell- und Molekülschädigungen mit beispielsweise daraus resultierender vorzeitiger Hautalterung und maligner Zellentartung.

Ziel dieser Arbeit war es, die kutane radikalprotektive Wirkung einer hyperforinhaltigen Hautcreme im Vergleich zur Placebocreme und der unbehandelten Haut unter Stressinduktion durch *in situ* VIS-/NIR-Bestrahlung zu untersuchen und eine reproduzierbare nicht-invasive Messmethodik zu entwickeln.

Als Messinstrument diente das L-Band-ESR-Spektrometer. Die Studiendurchführung erfolgte *ex vivo* an Schweineohrhaut (n=9) und erstmalig *in vivo* an humaner Haut (n=11) jeweils unter Messung des Cremesoforteffektes und der *in vivo* Langzeitwirkung nach 4 Wochen Cremeapplikation.

Außerdem erfolgte eine optische Messung der Absorptions- und Streueigenschaften der Testcremes mit Hilfe eines Zweistrahlenspektrometers mit einer Ulbrichtkugel.

Zur Untersuchung des Einflusses der VIS-/NIR-Bestrahlung und der hyperforinhaltigen Hautcreme auf die Lipidzusammensetzung des Stratum corneums wurde bei den *in vivo* Messungen vor und nach der Bestrahlung eine Extraktion und anschließende externe Analyse der Lipide durchgeführt.

Nach einmaliger Cremeapplikation zeigte sich *in vivo* eine signifikant niedrigere Radikalbildung in den mit den Testcremes behandelten Hautarealen im Vergleich zur unbehandelten Haut. Zwischen den mit Placebo- und Verumcreme behandelten Hautarealen war kein signifikanter Unterschied erruierbar. Es wird vermutet, dass der radikalprotektive Soforteffekt am ehesten durch die hohe Streuungseigenschaft der Testcremes bedingt ist.

Bei den *ex vivo* Messungen und nach der *in vivo* Langzeitanwendung der Cremes, wurde in der verumbehandelten Haut sowie weniger stark ausgeprägt auch in der placebobehandelten Haut eine signifikant niedrigere Radikalbildung als in der unbehandelten Haut gemessen. Die Radikalbildung war *in vivo* höher als *ex vivo* und die Kinetik unterschiedlich.

Auf den mit Creme behandelten Hautarealen war vor allem nach einmaliger Cremeapplikation, aber auch nach Langzeitcremeanwendung, im Vergleich zur unbehandelten Haut eine Erhöhung der Lipidkonzentration der meisten getesteten

Hautlipiden zu beobachten, jedoch nur in wenigen Fällen signifikant. Zwischen den mit Verum- und Placebocreme behandelten Arealen zeigte sich dabei kein signifikanter Unterschied.

Eine Reduktion der Lipidkonzentration wurde bei der Lipidvorstufe Squalen in der Verumcreme- und Placebocreme-Gruppe nach der Langzeitcremeanwendung gemessen.

Nach VIS-/NIR-Bestrahlung waren nur in Visite 2 wenige signifikante Änderungen der Lipidkonzentrationen erruierbar.

Demnach zeigten beide Testcremes einen positiven Effekt auf die extrazelluläre Lipidkonzentration und damit auf den Hautbarriereschutz, wobei der Wirkstoff Hyperforin von geringerer Relevanz zu sein scheint.

Bezüglich der radikalprotektiven Eigenschaften weisen beide Testcremes einen guten Soforteffekt auf und insbesondere die hyperforinhaltige Verumcreme auch nach Langzeitanwendung einen deutlichen Radikalschutz.

Abstract (english)

It is well known that an excess of free radicals involves an increased risk of cellular and molecular damage, which can, *inter alia*, result in premature skin aging or even cancer. The aim of this work was to study the cutaneous radical protective effect of a hyperforin-rich cream in comparison to a placebo cream and to untreated skin by using an L-Band-EPR spectrometer and to develop a *non-invasive* method. The free radicals were induced by *in situ* VIS-/NIR-irradiation. The measurements were conducted *ex vivo* on excised porcine skin (n=9), and for the first time *in vivo* on human skin (n=11) by examining the immediate effect of the creams *in vivo* and *ex vivo* as well as their long-term effect after 4 weeks of application *in vivo*.

Furthermore, the optical properties of the creams were determined.

In addition, lipid was extracted from the SC prior and subsequent to irradiation during the *in vivo* tests. Afterwards, the lipid was analyzed by AMD-HPTLC.

The *in vivo* measurements following a single application of the test creams showed a significantly lower radical production in the cream-treated skin than in the untreated skin. As no significant difference between the radical production in the placebo cream and verum cream-treated skin could be detected, the immediate radical protective effect is supposed to have been caused by the optical properties of the creams.

The results of the long-term *in vivo* measurements and the *ex vivo* tests disclosed in the verum cream-treated skin and, although less pronounced, in the placebo cream-treated skin a significantly reduced radical production in comparison to the untreated skin. The radical production was *in vivo* higher than *ex vivo* and the kinetics differed.

In the case of the cream treated skin areas, an increased lipid concentration was measurable for the majority of the tested skin lipids in comparison to the untreated skin, although stronger after a single cream application than after long-term cream application. However, only a few significant differences were detected.

No significant differences were found between the placebo cream and verum cream-treated skin.

After the VIS-/NIR-irradiation, only at visit 2 significant differences were measurable.

To conclude, both test creams showed a positive effect on the extracellular lipids and thus also on the skin barrier protection, with hyperforin obviously being of minor relevance in this respect.

Both test creams showed an immediate radical-protective effect, with specifically the hyperforin-rich verum cream proving to efficiently reducing radicals also after long-term application.

1. Einleitung

1.1. Motivation

Diese Arbeit untersucht die radikalprotektive Wirkung einer hyperforinhaltigen Hautcreme und einer hyperforinfreien Testcreme unter Stressinduktion durch VIS-/NIR-Bestrahlung am *in vivo* und *ex vivo* Hautmodell sowie den Einfluss der Testcreme auf die *in vivo* Lipidzusammensetzung der Haut. Mit Hilfe einer reproduzierbaren Methode sollte erstmals *in vivo* die Radikalschutzwirkung einer kosmetischen hyperforinhaltigen Hautcreme mittels ESR-Spektroskopie und *in situ* Bestrahlung untersucht werden. Freie Radikale sind vorrangig sehr reaktive und kurzlebige Moleküle oder Atome mit mindestens einem ungepaarten Elektron. Sie spielen eine wichtige Rolle für den Organismus in Hinsicht auf die Abwehr von Erregern (Akaike 2001: 87-101) sowie in Signalkaskaden. Physiologisch ist eine Homöostase der Redoxsysteme vorzufinden. Ist diese zugunsten der oxidativen Reaktionen gestört, kann es zu oxidativem Stress kommen. In der Haut können Radikale durch endogene und exogene Prozesse, wie Stoffwechselreaktionen (Iannone et al. 1993: 59-63), Entzündungen (Maeda et al. 1998: 854-865), Umweltfaktoren (Burke und Wei 2009: 219-224), Genussmittel (Alkohol, Nikotin) und Strahlung im UV- (Black 1987: 213-221, Haag et al. 2010: 306-312), IR- (Darvin et al. 2010a: 40-46, Meinke et al. 2013a: 365-373) und sichtbarem Bereich (Zastrow et al. 2009: 31-44, Meinke et al. 2013a: 365-373) entstehen. Oxidativer Stress begünstigt die Schädigung von z.B. Lipiden, Proteinen und Nukleinsäurebasen (Klotz et al. 2001: 95-113) und fördert dadurch die Entstehung von Faltenbildung, Barrierschädigungen, und multiplen chronischen Erkrankungen, wie atopische Dermatitis, Psoriasis, Diabetes mellitus, Arteriosklerose, Alzheimer, Parkinson und Krebs.

Im menschlichen Organismus existiert ein Netzwerk von synergistisch wirkenden und sich gegenseitig schützenden Antioxidantien zur Abwehr der freien Radikale (Offord et al. 2002: 1293-1303, Wrona et al. 2003: 1319-1329). Zu diesen Antioxidantien zählen beispielsweise Enzyme, wie Katalase, Gluthationperoxidase und -reduktase, Hydroxyperoxidase, Superoxiddismutase, sowie auch nicht-enzymatische Substanzen, wie Vitamin A, C und E, Karotinoide und sekundäre Pflanzenstoffe (z.B. Flavonoide, Polyphenole).

Hyperforin ist ein Hauptwirkstoff des Johanniskrauts, eine seit vielen Jahren bekannte und vielfach untersuchte Heilpflanze. Es wird unter anderem topisch zur Behandlung leichter Wunden, Verbrennungen und Myalgien verwendet. In Studien konnte bereits eine

antibakterielle (Schempp et al. 1999: 2129), antitumoröse (Schempp et al. 2002: 1242-1250) und antiinflammatorische Wirkung (Schempp et al. 2000: 979-984) des topisch applizierten Hyperforins nachgewiesen werden. Desweiteren konnte ein wachstums- und differenzierungsfördernder Effekt auf Keratinozyten gezeigt werden (Müller et al. 2008: 33942-33954). 2009 wurde von dem „Committee for herbal medical products (HMPC)“ eine EU-Gemeinschaftsmonographie zu *Hypericum perforatum* verabschiedet, in der Johanniskraut in der kutanen traditionellen Anwendung zur symptomatischen Therapie kleiner Entzündungen und Wunden aufgenommen wurde (European Medicines Agency 2009: 3). Des Weiteren konnte in mehreren *ex vivo* Studien eine zusätzliche antioxidative Wirkung von Hyperforin nachgewiesen werden (Heilmann et al. 2003: 202-206, Meinke et al. 2012: 346-350). In der verwendeten hyperforinreichen Testcreme wurde ein hohes radikalprotektives Potential gemessen. Der mittels ESR-Spektroskopie ermittelte Radikalschutzfaktor beträgt $425 \cdot 10^{14}$ Radikale/mg (Meinke et al. 2012: 346-350). Bezüglich der antioxidativen Wirkung von Hyperforin in der Haut lagen vor der Veröffentlichung der Ergebnisse dieser Arbeit keine *in vivo* Studien vor. *In vivo* Analysen könnten einen wichtigen therapeutischen Ansatzpunkt hinsichtlich der Behandlung von Hauterkrankungen, wie Psoriasis und atopischer Dermatitis mit Barrierschäden und erhöhter Radikalproduktion darstellen bzw. generell zur Hautpflege und dem Schutz vor Hautbarrierschäden beitragen.

Daher ist es von großem Interesse, einerseits die kutane radikalprotektive Wirkung von Hyperforin *in vivo* zu untersuchen und andererseits die *in vivo*- und *ex vivo*-Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu prüfen.

Ein bekannter Hauptbestandteil des Hautbarriereschutzes stellen die extrazellulären Lipide des Stratum corneums dar (Feingold 2007: 2531-2546). Änderungen des Lipidprofils, beispielsweise durch eine Verminderung der Ceramide, wie sie in Studien bei der atopischen Dermatitis nachgewiesen wurde (Imokawa et al. 1991b: 845-851, Arikawa et al. 2002: 433-439), resultieren in einer Barriestörung. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Basiscremepflege bei Hauterkrankungen mit Barrierebeeinträchtigungen wichtig ist (Schempp et al. 2003: 248-253, Patzelt-Wenczler und Ponce-Pöschel 2000: 171-175). Es ist somit sehr interessant, den Einfluss der Testcremes nach einmaliger Anwendung sowie langandauernder Cremeapplikation auf die Zusammensetzung der extrazellulären Lipidmatrix des Stratum corneums zu untersuchen.

1.2. Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut stellt mit einer Fläche von ca. 1,6-2 m² eines der größten Organe im menschlichen Körper dar und fungiert gleichzeitig als äußere Grenze zur Umwelt (Lüllmann-Rauch 2006: 519, Welsch 2006: 549, Rassner 2002: 5-9).

Ihre Hauptfunktion liegt neben einigen Sinnesfunktionen (Lüllmann-Rauch 2006: 519, Welsch 2006: 549) insbesondere im Barrierschutz des Organismus gegen äußere Einflüsse chemischer, physikalischer und mechanischer Art sowie gegen das Eindringen pathogener Mikroorganismen. Desweiteren schützt sie den Körper vor Elektrolyt- und transepidermale Wasserverlust (TEWL) (Feingold 2007: 2531-2546, Welsch 2006: 549, Lüllmann-Rauch 2006: 519, 523) und Absorption von Strahlung (Lüllmann-Rauch 2006: 524, Welsch 2006: 549). Die Temperaturregulation (Lüllmann-Rauch 2006: 519, Welsch 2006: 549) sowie auch die Bildung von Vitamin D unter Sonnenlichteinfluss (Welsch 2006: 549) sind weitere wichtige Funktionen der Haut.

Die menschliche Haut gliedert sich von außen nach innen in drei Schichten: Epidermis (Oberhaut) und Dermis (Lederhaut), die zusammen die Kutis bilden, sowie Subkutis (Unterhaut).

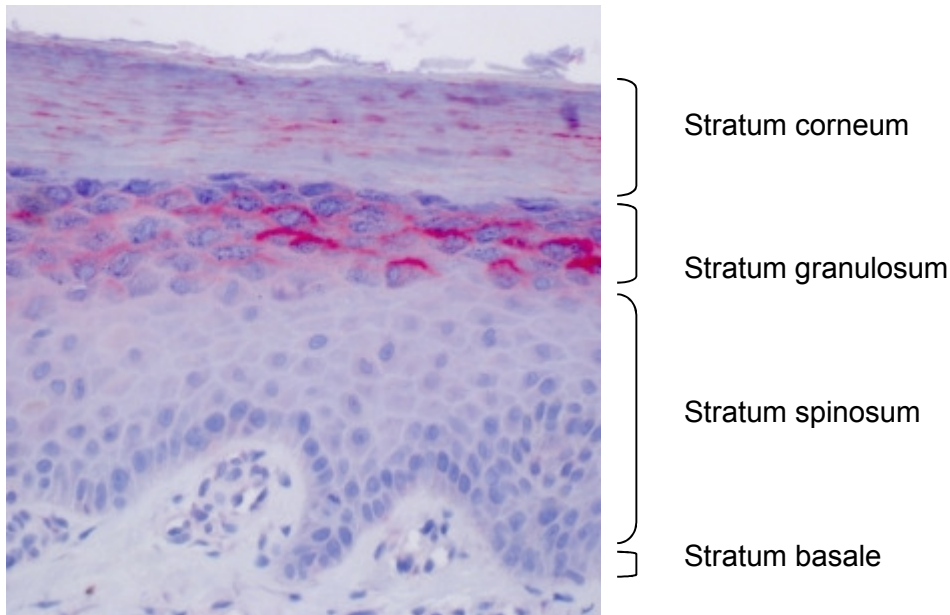


Abbildung 1 Aufbau der Haut, palmare/plantare Hautbiopsie (modifiziert nach Meyer-Hoffert et al. 2009: 6, Abbildung 5 LEKTI-2 is expressed at palmar and plantar sites)

Die Epidermis weist je nach Lokalisation eine Dicke von 50-1000 µm auf, besteht aus verhorntem mehrschichtigem Plattenepithel und ist in 4 bis 5 Etagen unterteilt. Die unterste Schicht bildet das der Basalmembran aufliegende einreihige Stratum basale, das die kutanen Stammzellen und einige pigmentbildende Melanozyten und Merkelzellen (periphere Nervenzellen zur Tast- und Druckempfindung) enthält. Im Anschluss folgen das Stratum spinosum, das dendritische Zellen des Immunsystems beinhaltet (Langerhans-Zellen) (Lüllmann-Rauch 2006: 522ff), und das Stratum granulosum. In diesen Schichten erfolgt die Differenzierung der Keratinozyten zu kernlosen, flachen, dickwandigen, apoptotischen Korneozyten (Hornzellen), welche in eine extrazelluläre Lipidmatrix eingebettet sind. Diese bilden das mehrschichtige Stratum corneum, das als äußerste Hautschicht besonders wichtig in der kutanen Barrierewirkung ist und je nach Lokalisation eine durchschnittliche Dicke von 25-100 Zelllagen aufweist (Lüllmann-Rauch 2006: 522ff, Welsch 2006: 554). Diese Korneozyten werden im Rahmen der Hautschuppung (Desquamation) (Elias et al. 2008: 697-714) einzeln abgeworfen und durch darunter liegende Zellen ersetzt. Die Zeitspanne zwischen Bildung der Keratinozyten und Abschilferung der Korneozyten, die zusammen den Hauptanteil der epidermalen Zellen darstellen, beträgt etwa vier Wochen, wobei der Prozess im Stratum corneum etwa 2 Wochen dauert.

In der Leistenhaut befindet sich zwischen dem Stratum granulosum und Stratum corneum ein dünnes Stratum lucidum mit Übergangsstadien zwischen Keratino- und Korneozyten. Unterhalb der Epidermis ist die bindegewebige Dermis lokalisiert, mit der sie verankert ist (Lüllmann-Rauch 2006: 522ff).

Die Dermis besteht aus fibroelastischem Gewebe und beinhaltet Gefäße und Nerven, welche der Nährstoffversorgung der gefäßfreien Epidermis, der Temperaturregulation (Lüllmann-Rauch 2006: 526f, Welsch 2006: 557) und Wasserspeicherung dienen (Welsch 2006: 557). Sie ragt papillenförmig in die Epidermis hinein, sodass eine große Austauschfläche vorliegt (Lüllmann-Rauch 2006: 526). Die Dermis beinhaltet weiterhin dendritische Zellen, Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen (Prost-Squarcioni 2006:131-137, Welsch 2006: 557).

Außerdem befinden sich in der unteren Dermis die Hautanhangsgebilde, wie Haarfollikel, Nägel, Schweiß- und Talgdrüsen, Lymphgefäße und Mechanorezeptoren.

Die Subkutis besteht aus Fettgewebe, das von einem großmaschigen Bindegewebsnetz durchsetzt ist, und Gefäß- und Nervenbahnen. Außerdem beinhaltet sie Mechanorezeptoren (Lüllmann-Rauch 2006: 527f, Welsch 2006: 558) und die Follikel

der Terminalhaare (Welsch 2006: 558). Sie dient als Druckpolster und Verschiebeschicht und verankert die Kutis mittels Bindegewebszügen an tiefer liegenden Strukturen. Überdies fungiert das Fettgewebe als Wärmeisolator und Energiespeicher (Lüllmann-Rauch 2006: 527, Welsch 2006: 558).

1.2.1. Lipide des Stratum corneums

Es existieren intra- und extrazelluläre Lipide im Stratum corneum. Im Rahmen dieser Arbeit soll jedoch nur auf die extrazellulären Lipide näher eingegangen werden.

Extrazelluläre Lipidmatrix des Stratum corneums

Das Stratum corneum hat die größte Bedeutung im Hautbarriereschutz, insbesondere im Schutz vor TEWL und mikrobiellen Störungen (Feingold 2009: 417-422). Die Korneozyten des Stratum corneums sind über Desmosomen miteinander verbunden und von einer extrazellulären Lipidmatrix (Welsch 2006: 554-555) umgeben, die eine parazelluläre Diffusionsbarriere für hydrophile Stoffe bildet (Benninghoff Drenckhahn 2008: 97-98). Die extrazelluläre Lipidschicht besteht hauptsächlich aus Ceramiden (53,1-60%), Cholesterol (17,0- 18%) und freien Fettsäuren (FFS) (22- 30%) (Farwanah et al. 2005: 514-521, Weerheim et al. 2001: 191-199) sowie auch kleinen Mengen anderer Lipide, wie beispielsweise Cholesterolsulfat, Glycosylceramide und Cholesterinester (Bouwstra et al. 2002: 606-617, Lampe et al. 1983: 120-130).

Die Korneozyten sind zusätzlich von einer verhornten Zellhülle (cornified envelope), bestehend aus dicht vernetzten Proteinen wie Filaggrin, Involucrin und Involucrin, umgeben (van Smeden und Bouwstra 2016: 9, Steinert und Marekov 1995: 17702-17711).

Im Gegensatz zu den meisten anderen Membranen im menschlichen Körper beinhaltet die extrazelluläre Lipidmatrix des SC kaum Phospholipide und ist einzigartig in der Zusammensetzung (Feingold 2007: 2531-2546, Elias 2005: 183-200). Die Lipidvorstufen, wie Phospholipide, Glycosylceramide, Cholesterol und Sphingomyelin, werden in den Lamellenkörpern (Odland-Körperchen) der Keratinozyten gebildet und gespeichert. Die Lamellenkörperchen kommen ausschließlich in der Epidermis vor und beinhalten zusätzlich hydrolytische und proteolytische Enzyme, wie Phospholipase A2 (PLA 2), β -Glucocerebrosidase und saure Sphingomyelinase (Feingold 2009: 417- 422). Die Freisetzung in den Extrazellularraum erfolgt durch Exozytose (Lüllmann-Rauch 2006:

523). Anschließend werden die Lipidvorstufen im Stratum corneum durch die o.g. hydrolytischen Enzyme zu Cholesterol, Ceramiden, freien Fettsäuren und Glycerol metabolisiert.

Die FFS bestehen aus 1 Carbonkette mit unterschiedlicher Kettenlänge (C14-C34), mehrheitlich jedoch zwischen 24-26 C-Atome. Im humanen Stratum Corneum befinden sich in der extrazelulären Lipidmatrix vor allem gesättigte FFS sowie auch in geringeren Anteilen Hydroxy-FFS, einfach ungesättigte FFS und außerdem eine geringe Menge an mehrfach ungesättigten FFS (van Smeden und Bouwstra 2016: 8-26). In der hiesigen Studie wurde die einfach ungesättigte FFS Ölsäure (C18) untersucht.

Die Zusammensetzung der Ceramide im humanen SC ist wesentlich umfassender. Ein Ceramid besteht aus einer Fettsäurekette, die mit einer Sphingosinbase über eine Amidbindung verknüpft ist (van Smeden und Bouwstra 2016: 8-26). Hierbei gibt es folgende Kombinationsmöglichkeiten (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1 Klassifikation der Ceramide in Anlehnung an Motta (Motta et al. 1993: 147-151)

Sphingoidbase	Fettsäure
Sphingosin (S)	Nonhydroxyfettsäure (N)
Phytosphingosin (P)	Omegahydroxyfettsäure mit Esterbindung einer weiteren Fettsäure an der Omegahydroxygruppe (O)
6-Hydroxy-Sphingosin (H)	Alpha-Hydroxyfettsäure (A)
Dihydro-Sphingoson (DS)	

Den mengenmäßig größten Anteil an den humanen SC-Ceramiden stellen die Ceramide mit einer Nonhydroxyfettsäure dar, insbesondere CER[NP], gefolgt von den Alpha-Hydroxyfettsäure-haltigen Ceramiden. Die mengenmäßig kleinste Gruppe bilden die ω -Acylceramide (Cer[EO...]) (van Smeden und Bouwstra 2016: 8-26).

Die Kettenlänge der SC-Ceramide beträgt zwischen C32-C52, bzw. bei den ω -Acylceramiden zwischen C64-C78 (van Smeden und Bouwstra 2016: 8-26).

Der epidermale Lipidmetabolismus ist jedoch von einigen Faktoren abhängig. Durch Änderungen der physiologischen Homöostase der Lipidzusammensetzung und Lipidorganisation kann es zu einer Barrierestörung der Haut (van Smeden und Bouwstra 2016: 8-26) bis hin zum Tod kommen. Hierbei seien exemplarisch ursächliche Enzymstörungen genannt, wie beispielsweise die Hemmung der PLA 2-Aktivität, das

Fehlen der sauren Sphingomyelinase (M. Niemann Pick) oder der β -Glucocerebrosidase (M. Gaucher) (Feingold 2007: 2531-2546).

Es führen beispielsweise Inflammationen zu Änderungen der Lipidbiosynthese. In einer Studie an humanen Keratinozyten und Epidermis-Modell wurde durch Zugabe von Zytokinen (TNF- α und IFN- γ) eine Erniedrigung der Ceramidmenge in der Epidermis gemessen sowie auch eine Reduktion der mRNA der sauren Sphingomyelinase und Glucocerebrosidase. Weiterhin führte IFN- γ zu einer Reduktion der mRNA Expression der Ceramid-Synthase3, die an der Vernetzung langkettiger FSS-Ketten mit einer Sphingoidbase beteiligt ist, und der Elongasen, die zur Verlängerung der Fettsäuren beitragen. TNF- α führte außerdem zu einer Veränderung der Lipidorganisation (van Smeden und Bouwstra 2016: 8-26, Tawada et al. 2014: 712-718, Danso et al. 2014: 1941-1950). Entzündungsprozesse spielen beispielsweise bei Hauterkrankungen, wie der atopischen Dermatitis, eine wichtige Rolle (van Smeden und Bouwstra 2016: 8-26). Die extrazellulären Lipide des SC sind lamellär in einer Lipiddoppelschicht angeordnet und können in 2 lamälleren Phasen vorliegen: der SPP (short periodicity phase) und der LPP (long periodicity phase). Außerdem wird die laterale Anordnung der SC-Lipide unterschieden in: orthorhombisch (dicht gepackte Anordnung), hexagonal (weniger dichte Anordnung), flüssig (ungeordnet). Eine gesteigerte hexagonale Anordnung der SC-Lipide zu Lasten der orthorhombischen Anordnung wird mit einer geschädigten Hautbarrierefunktion und erhöhten Permeabilität assoziiert (van Smeden und Bouwstra 2016: 8-26).

Außerdem hat eine Verletzung der Permeabilitätsbarriere der Haut u.a. eine Steigerung der Sekretion und Synthese der Odland-Körperchen über einen Calciumgradienten zur Folge. Desweiteren kommt es zu einer Erhöhung der β -Glucocerebrosidase- (Feingold 2007: 2531-2546), der sauren Sphingomyelinase-Aktivität (Jensen et al. 1999: 1761-1770) und anderer Lipidsynthesebausteine (Feingold 2007: 2531-2546).

Die Steigerung der Ceramidsynthese beginnt jedoch im Gegensatz zu den anderen Lipiden erst sechs Stunden nach der Barrierestörung, sodass Ceramide eher eine Schlüsselrolle in der späten Reparaturphase haben (Feingold 2007: 2531-2546).

Bezüglich der antimikrobiellen Schutzfunktion der Haut sind neben einem relativ niedrigen physiologischen pH-Wert von 5,5 (Feingold 2007: 2531-2546) und Monoglyceriden auch Lipide, wie freie Fettsäuren, freie Sphingoidbasen (Drake et al. 2008: 4-11, Gallo et al. 2002: 823-831, Bibel et al. 1995: 395-400, Bibel et al. 1992:269-

273) und teilweise Phospholipide und Glycosylceramide (Feingold 2009: 417- 422) relevant.

1.3. Elektronen-Spin-Resonanz (ESR)-Spektroskopie

1.3.1. Physikalische Grundlagen

Ungepaarte Elektronen weisen aufgrund ihres Eigendrehimpulses, welcher auch Spin genannt wird, ein magnetisches Moment auf (Baltes et al. 2004: 251-256). Bei der ESR-Spektroskopie wird durch ein ungepaartes Elektron im magnetischen Feld Mikrowellenenergie absorbiert. In einem äußeren Magnetfeld existieren zwei mögliche Ausrichtungsformen der ungepaarten Elektronen. Entweder ist es im Grundzustand entsprechend der Magnetfeldorientierung (parallel) ausgerichtet ($m_s = -\frac{1}{2}$) oder im angeregten Zustand antiparallel im Magnetfeld ($m_s = +\frac{1}{2}$). Diese Aufspaltung in zwei Energieniveaus entspricht dem Zeemann-Effekt. Die Energie der antiparallel ausgerichteten Elektronen ist höher, als die der parallel ausgerichteten. Es besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen der äußeren Magnetfeldstärke (H_0) und der Differenz der beiden Energieniveaus (ΔE).

$$(1) \Delta E = E(m_s = +\frac{1}{2}) - E(m_s = -\frac{1}{2}) = g \cdot \mu_B \cdot H_0 \quad (\text{Lund, Shiotani, Shimada 2011: 6-7})$$

ΔE : Differenz der beiden Energieniveaus

m_s : magnetische Spinquantenzahl

g : Landé-Faktor (g-Wert), in Abhängigkeit von der Elektronumgebung und den Wechselwirkungen zu anderen Spins

μ_B : Bohr'sches Magneton = $0,92740154 \cdot 10^{-23} \text{ J T}^{-1}$

H_0 : äußere Magnetfeldstärke [T (Tesla)]

Die Resonanzbedingung der ESR- Spektroskopie lautet:

$$(2) \Delta E = h \cdot \nu = g \cdot \mu_B \cdot H_0$$

h : Plancksches Wirkungsquantum = $6,6260755 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$

ν : Frequenz der Mikrowellenstrahlung [s^{-1}]

Aus dieser Gleichung ergibt sich auch, dass entweder bei konstanter Magnetfeldstärke und variierender Mikrowellenfrequenz gemessen werden kann oder umgekehrt (Baltes et al. 2004: 251- 256). Das verwendete L-Band-ESR-Spektrometer misst bei konstanter Mikrowellenfrequenz von 1,3 GHz.

Die Differenz der beiden Energieniveaus eines ungepaarten Elektrons im Magnetfeld entspricht der Energie der Mikrowellenfrequenz im Falle von Resonanz und führt dann zur Resonanzabsorption von Energie aus dem Feld.

Das ESR-Spektrum der ersten Ableitung des Absorptionsspektrums entspricht der Mikrowellenfrequenz in Abhängigkeit von der Magnetfeldstärke und zeigt die Signalintensität in Abhängigkeit von der Magnetfeldstärke (Baltes et al. 2004: 251- 256).

1.3.2. Radikalbestimmung mit Hilfe des ESR-Spektrometers und von Spin-Markern

Mit Hilfe der ESR-Spektroskopie kann das antioxidative Potenzial von Cremes sowie deren antioxidative Wirkung *in vivo* und an exzidierte Haut von Probanden nicht-invasiv gemessen werden.

Das in dieser Studie verwendete L-Band-ESR-Spektrometer weist ein variables Magnetfeld bei konstanter Mikrowellenfrequenz (1,3 GHz) auf und ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung chemischer Verbindungen mit freien Elektronen, wie die freien Radikale. Da die meisten freien Radikale eine sehr kurze Halbwertszeit aufweisen, ist der direkte Nachweis kaum möglich (Baltes et al. 2004: 251- 256), sodass man einen Spin-Marker bzw. ein Testradikal verwendet.

Aus gesundheitsprotektiven Gründen können nur wenige Testradikale *in vivo* verwendet werden. Eines dieser etablierten Testradikale ist 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO), ein semistabiles lipophiles Nitroxidradikal, das gut in die Haut penetriert (Fuchs et al. 1997: 967-976). TEMPO reagiert direkt mit den Antioxidantien in der Haut. Über den TEMPO-Abfall in der ESR-Spektroskopie kann das antioxidative Potential der Haut bestimmt werden.

Das in dieser Studie als Spin-Marker verwendete Nitroxidradikal 3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy (PCA) ist etwas stabiler und hydrophiler als TEMPO. PCA reagiert im Gegensatz zu TEMPO nicht direkt mit den Antioxidantien, sondern mit den kurzlebigen freien Radikalen in der Haut (Herrling et al. 2003: 59-67), die zum Beispiel durch VIS-/NIR-Bestrahlung entstehen könnten. Daher ist PCA besonders gut als Spin-

Marker zur Bestimmung der radikalprotektiven Eigenschaften der in dieser Studie verwendeten Testcremes unter Stressinduktion in Form von VIS-/NIR-Bestrahlung geeignet. Die Reaktion des Spin-Markers PCA mit freien Radikalen führt zur Reduktion von PCA zum ESR-unsichtbaren Hydroxylamin (Herrling et al. 2003: 59-67) und folglich zum Abfall der ESR-Signalintensität von PCA.

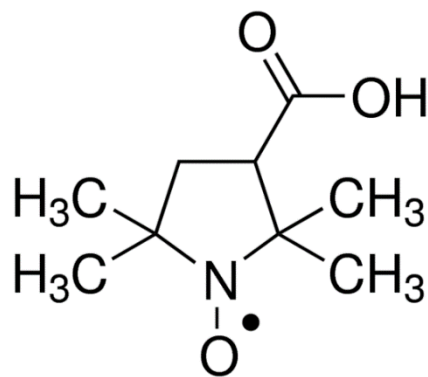


Abbildung 2 Strukturformel von 3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy (PCA) (Sigma-Aldrich)

Aufgrund der hohen Proben-Eindringtiefe von ca. 1-1,5 cm durch die niedrige Mikrowellenfrequenz stellt das L-Band-ESR-Spektrometer für die in dieser Studie durchzuführenden *in vivo* und *ex vivo* Messungen ein opportunes Messgerät dar, wie schon in vorherigen Studien gezeigt werden konnte (Herrling et al. 2003: 59-67, Haag et al. 2010: 306-312, Lauer et al. 2013: 1102-1104, Meinke et al. 2013a: 365-73).

Für die Stressinduktion zur Hautradikalbildung eignet sich eine *in situ* Bestrahlung mittels eines am ESR-Spektrometer integrierten Sonnensimulators, sodass die dabei entstehenden Radikale simultan gemessen werden können.

1.4. Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit war zum einen die Evaluation der Radikalschutzfunktion einer Hautcreme mit dem 1,5 prozentigen Wirkstoff Hyperforin nach einmaliger und Langzeit-Anwendung im Vergleich zu einer hyperforinfreien Placebocreme. Hierfür musste eine geeignete *in vivo* Methode mittels der Elektron-Spin-Resonanz (ESR)-Spektroskopie entwickelt werden. Die Untersuchungen erfolgten *in vivo* am Probandenunterarm sowie

an exzidierte porciner Haut nach Einfluss von äußerem Stress in Form von *in situ* VIS-/NIR-Bestrahlung.

Desweiteren sollte untersucht werden, ob eine Änderung der Lipidzusammensetzung des Stratum corneums der Haut nach Stressinduktion (VIS-/NIR-Bestrahlung) beziehungsweise Langzeitanwendung der Testcremes im Vergleich zum Ausgangswert zu messen ist. Die Lipidextraktion erfolgt hierbei ebenfalls nicht-invasiv, gefolgt von extern durchgeführter automatisierter mehrstufiger Dünnschichtchromatographie (AMD HPTLC).

2. Material und Methodik

2.1. Material

2.1.1. Studienpräparat

Als Testpräparat wurde eine Hautcreme des Unternehmens Klosterfrau Vertriebs GmbH verwendet. Diese enthält den hyperforinreichen Hypericum perforatum Extrakt (1,5 %) ohne Hypericin und Flavonoide sowie folgende weitere Bestandteile (INCI): Aqua, Petrolatum, Propylene Glycol, Caprylic/Capric Triglyceride, PEG-20 Glyceryl Stearate, Cetyl Alcohol, Glyceryl Stearate, Panthenol, Phenoxyethanol, Tocopherol, Tocopheryl Acetate, Allantoin.

Als Placebo wurde die Grundlagencreme ohne Hypericum perforatum Extrakt verwendet.

2.1.2. Materialliste

Es wurden außerdem die in Tabelle 2 aufgeführten Materialien und Chemikalien für die Versuchsdurchführung verwendet.

Tabelle 2 Materialliste

Materialien
3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (PCA), Sigma-Aldrich, Steinheim
Cyclohexan, Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, Merck KGaA, Darmstadt
Edding 404 Permanentmarker
Filterpapierscheiben, Epitest Ltd Oy, Tuusula, Finland
Epikutantestpflaster/ Finn Chamber, Finn Chamber Epitest Ltd Oy
Deckglas 24x36 mm
Einwegspritze
Zentrifugenröhrchen, 7,3 cm Durchmesser
Fingerling, hergestellt aus Einweghandschuh
Probenstanze, kreisförmig, 19 mm Durchmesser
Glasobjektträger
Einwegsrasierer
Einwegskalpell

2.1.3. Ex vivo Hautmodelle

In dieser Studie wurde exzidierte Schweineohrhaut verwendet, da sich diese in vorherigen Versuchen als geeignetes Hautmodell erwiesen hat (Benech-Kieffer et al. 2000: 324-335, Haag et al. 2010: 306-312, Meinke et al. 2012: 346- 350, Herrling et al. 2002: 1337- 1344).

Die Schweineohren (ESR-Messung: n=9, optische Messung der Absorptions- und Streuungseigenschaften der Cremes: n=2) wurden frisch von einer regionalen Schlachtereier (Fleischermeister Gerald Nusche, Niederlehme, Deutschland) geliefert und stammen ausschließlich von Schweinen, die für die Fleischproduktion vorgesehen waren. Die Messungen wurden jeweils binnen 34 Stunden nach der Schlachtung durchgeführt. Vor Messungsbeginn wurden die Proben bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die Genehmigung für die Messungen an Schweineohrhaut wurde vorab vom Veterinär- und Lebensmittelaufsichtsamt Berlin-Treptow (28.12.2006, Aktenzeichen VET LEB 12-5854/T373/06) erteilt. Außerdem liegt die Zustimmung der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin von 2011 (EA1/189/11) zur Versuchsdurchführung vor.

2.1.4. Probanden

In die Studie wurden 11 gesunde Probanden (7 Frauen, 4 Männer; 8 Nichtraucher, 3 Raucher, Hauttyp II (Fitzpatrick 1988: 869-871)) im Alter von 21-42 Jahren (mittleres Alter: 25 Jahre) nach den in der Tabelle 3 im Abschnitt 2.2.2 aufgeführten Ein- und Ausschlusskriterien eingeschlossen und gebeten, ihren Lebens- und Ernährungsstil während der Studienteilnahme nicht zu ändern. Alle Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin geprüft (EA1/189/11). Weiterhin erfolgte die Versuchsdurchführung im Einklang mit der „Erklärung von Helsinki“ von 1983.

2.2. Methodik

2.2.1. Studiendesign

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* Messungen durchgeführt. Die *in vivo* Bestimmungen erfolgten im Rahmen einer experimentellen, placebokontrollierten Pilotstudie an 11 gesunden Probanden. Pro Proband fanden zwei Visiten statt.

Zu jeder Visite wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Ausfüllen eines Fragebogens zur Evaluation der Beibehaltung des Lebensstils und Vermeidung topischer Applikation von Cremes während des Studienzeitraums
- Bestimmung der kutanen Radikalproduktion mittels ESR-Spektroskopie in unbehandelter und mit den Testcremes behandelter Haut sowie unter Einfluss eines äußeren oxidativen Stressors in Form von VIS-/NIR-Bestrahlung
- Bestimmung der extrazellulären Hautlipide des Stratum corneums

Die Messungen erfolgten an den Unterarminnenseiten der Probanden. Die entsprechende Studienmethodik wurde zuvor an 3 Probanden entwickelt.

Außerdem wurden *ex vivo* ESR-Messungen an exzidiierter Schweineohrhaut (n=9) zur Bestimmung der Radikalproduktion unter dem Einfluss der Testcremes sowie auch eines äußeren oxidativen Stressors in Form von VIS-/NIR-Bestrahlung durchgeführt.

Desweiteren wurden die Absorptions- und Streueigenschaften der Testcremes untersucht.

Die unterschiedlichen Messmethoden werden in den Kapiteln (2.2.3 bis 2.2.9) detaillierter beschrieben.

2.2.2. Ein- und Ausschlusskriterien der Studie

Die entsprechenden Ein- und Ausschlusskriterien sowie Abbruchkriterien sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3 Einschluss-, Ausschluss- und Abbruchkriterien der Studie

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien	Abbruchkriterien
Aufklärung der Probanden über die Ziele der Studie und das Wesen der Untersuchungen	bekannte Allergien oder Unverträglichkeiten auf Kosmetika und Nahrungsmittel	Nebenwirkungen nach Anwendung der Prüfprodukte
gesunde Probanden	Kinder	
Alter zwischen 20-60 Jahre	Schwangere, Stillende	
schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme	Studierende der Charité im Prüfungssemester	
	Hauterkrankungen, Störungen der Barrierefunktion der Haut	
	Personen, die nicht eigenverantwortlich Entscheidungen treffen können	
	Personen, die metallische Implantate im Bereich der Unterarme tragen	

2.2.3. Fragebogen

Der verwendete Fragebogen wurde von Frau Dr. med. A.-C. Lauer im Rahmen ihrer Promotionsarbeit entwickelt (Lauer 2015: 10-11) und für diese Arbeit in modifizierter Form verwendet.

Er beinhaltet Aussagen zu: Alter, Geschlecht, Sonnenlichtexposition, Anwenden von Sonnenschutzcremes und antioxidantienhaltigen Bodylotions, Stress, körperliche Aktivitäten, Häufigkeit und Schweregrad von Infektionen, Alkohol- und Nikotinkonsum, Ernährung und Lebensstilveränderungen der letzten 5 Jahre. Bezüglich des Obst- und Gemüsekonsums wurde in zwei Tabellen mit jeweils 13 verschiedenen herkömmlichen Obst- bzw. Gemüsesorten die entsprechende Häufigkeit des Verzehrs (selten, \geq einmal pro Monat, \geq einmal pro Woche, \geq viermal pro Woche) erfragt.

2.2.4. Elektronen-Spin-Resonanz (ESR)-Spektrometer

Die nicht-invasive Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie basiert auf der resonanten Mikrowellenabsorption einer Probe mit ungepaarten Elektronen in einem äußeren magnetischen Feld. Für die *in vivo* und *ex vivo* Messungen wurde das L-Band-ESR-Spektrometer LBM MT 03 (Magnettech, Berlin, Deutschland) verwendet (siehe Abbildung 3) und folgende Einstellungen genutzt: Mikrowellenfrequenz (1.3 GHz); mittlere Magnetfeldstärke (46 mT); Feldsweep (8 mT); Sweep Zeit (10 s); Modulationsamplitude (0.15 mT); Gain *in* und *ex vivo* (1000), Gain bei flüssiger PCA-Lösung (200); Attenuation *in vivo* (2), Attenuation *ex vivo* und bei flüssiger PCA-Lösung (4).

Als ESR-sichtbarer Marker (Spinmarker) diente, wie bereits im Absatz 1.3.2 beschrieben, das Nitroxid PCA (3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl), das mit den freien Radikalen in der Haut reagiert, wodurch mit voranschreitender Zeit eine Abnahme der Signalintensität verzeichnet werden kann.

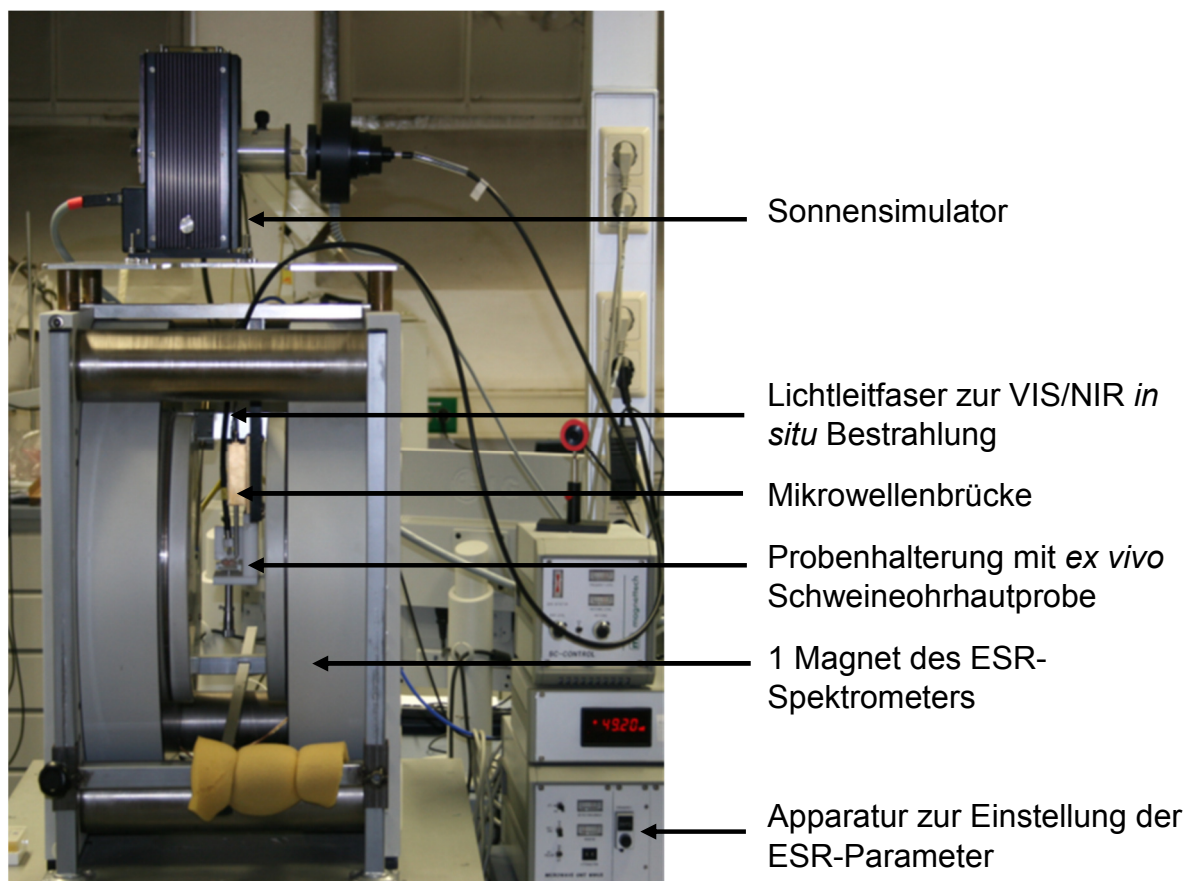


Abbildung 3 L-Band ESR-Spektrometer mit Sonnensimulator und Lichtleitfaser sowie *ex vivo* Schweineohrhautprobe

2.2.5. *In vivo* ESR-Messungen

In **Visite 1** wurden Ausgangs-ESR-Messungen an beiden Unterarminnenseiten an un behandelter Haut sowie nach einer Stunde Einwirkzeit der jeweiligen Testcreme durchgeführt. Dies erfolgte einfach verblindet.

Vorbereitend wurde zunächst die Unterarmhaut zur besseren Penetration des hydrophoben Spinmarkers PCA mit einem ethanolgetränkten Papiertuch gereinigt und sichtbare vorhandene Haare entfernt. Anschließend wurden folgende Messareale randomisiert auf beiden Unterarmen markiert:

- zwei benachbarte Messareale für die Placebocreme ellbogennah an einem Unterarm (UA)
- zwei benachbarte Messareale für die Verumcreme ellbogennah am anderen UA
- zwei benachbarte handgelenksnahe Areale ohne Creme am rechten UA.

Auf jedem Messareal wurden auf 2 übereinander liegenden Filterpapieren 100 µl einer 0,8%-PCA-Lösung (3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl; in Ethanol/Wasser im Verhältnis 1:1 gelöst (v/v)) pipettiert, die unter einem Epikutantestpflaster 40 min in die Haut penetrierte (Abbildung 4).

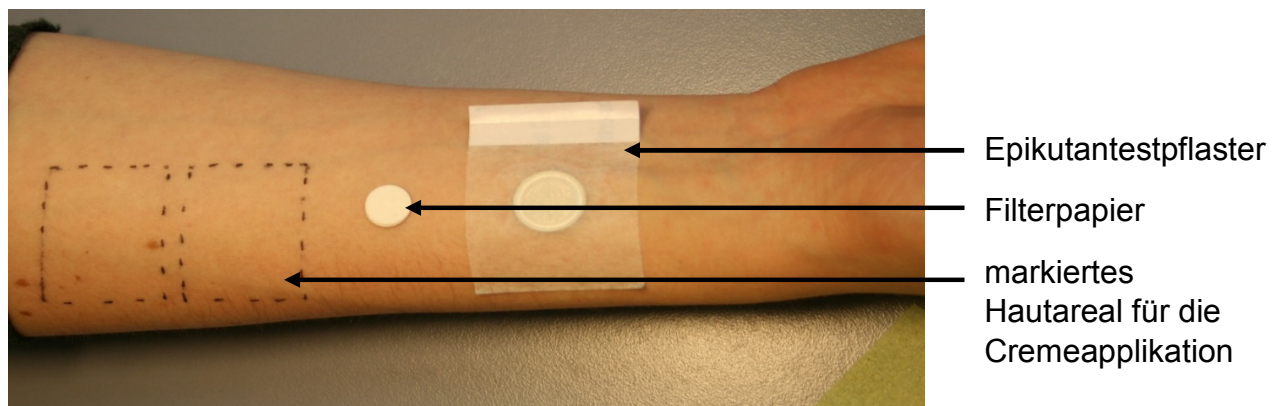


Abbildung 4 Markierung der Cremeareale, Auflegen des Filterpapiers, Einwirken des PCA-Markers unter einem Epikutantestpflaster

Auf den Hautarealen für die Placebo- bzw. Verumcrememessung wurden anschließend, entsprechend dem Colipa-Standard, jeweils 2 mg/cm² Creme mittels eines in der jeweiligen Testcreme gesättigten Fingerlings aufgetragen (Abbildung 5, Abbildung 6). Nach einer Creme-Einwirkzeit von 1 Stunde erfolgte die *in vivo* Messung am Unterarm

im ESR-Spektrometer (Abbildung 7, Abbildung 8). An den ungecremten Hautarealen wurde die ESR-Messung unmittelbar nach der Einwirkzeit der PCA-Lösung durchgeführt.



Abbildung 5 Auftragen der Testcreme ($2\text{mg}/\text{cm}^2$) mit einer Einwegspritze auf das zuvor markierte Hautareal



Abbildung 6 Gleichmäßige Verteilung der Creme auf dem markierten Hautareal mit einem in der Creme gesättigten Fingerling



Abbildung 7 *In vivo* ESR-Messung der Probanden mit *in situ* VIS-/NIR-Bestrahlung

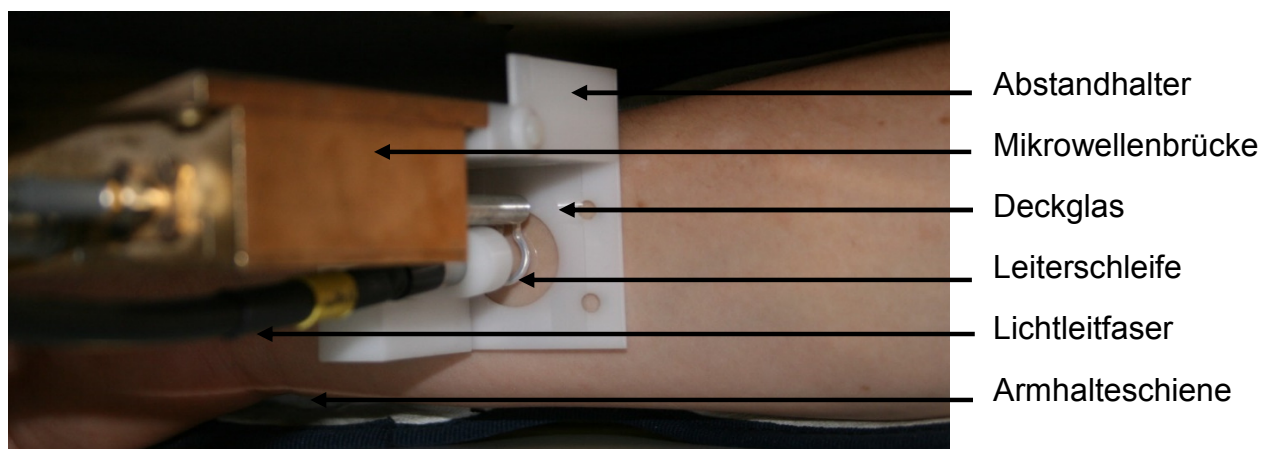


Abbildung 8 *In vivo* Probenhalterung der ESR-Apparatur mit Lichtleitfaser zur *in situ* VIS-/NIR-Bestrahlung

In **Visite 2** wurden die Messungen doppelt verblindet an beiden UA-Innenseiten nach vierwöchigem, zweimal täglichem Eincremen des einen UA mit Verumcreme und 2/3 des anderen UA mit Placebocreme (Auftragung der Creme und Bestimmung der Crememenge durch den Probanden) an folgenden Messarealen durchgeführt:

- zwei benachbarte Areale ohne Creme am ungecremten 1/3 des einen UA

- zwei benachbarte Messareale nach Placebobehandlung an einem UA
- zwei benachbarte Messareale nach Verumbehandlung am anderen UA (siehe Abbildung 9).

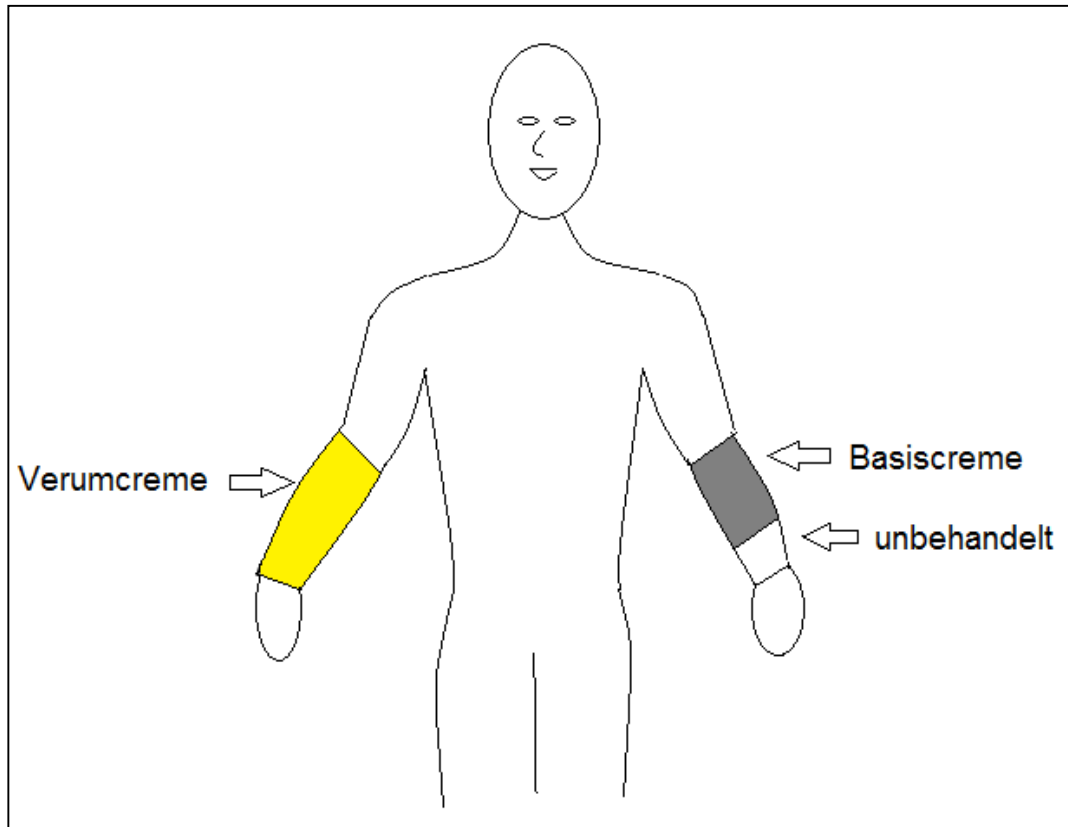


Abbildung 9 Schema der einzucremenden Hautareale

Die Testcremes wurden in einer Zeitspanne von 5-12 Stunden (durchschnittlich 8,5 Stunden) vor dem Messbeginn das letzte Mal aufgetragen.

Vor der ESR-Messung wurde die Haut mit einem ethanolgetränktem Papiertuch gereinigt, erneut sichtbare UA-Haare in den Messarealen entfernt und PCA nach der gleichen Methodik wie in Visite 1 aufgetragen und einwirken lassen.

Anschließend erfolgte die ESR-Messung.

Es wurde weiterhin an einer ausgewählten Anzahl von Probanden geprüft, ob nach einmaliger Cremeapplikation und anschließender 5 bzw. 14 Stunden Cremeinwirkzeit ein Effekt bezüglich der Radikalbildung vor und nach VIS-/NIR-Bestrahlung bei

behandelter Haut im Vergleich zu unbehandelter Haut besteht (n=3). Da dies jedoch nicht der Fall war, wurde dieser Messdurchgang nicht an weiteren Probanden durchgeführt.

In Visite 2 und bei den Messungen nach 5 bzw. 14 Stunden Creme-Einwirkzeit wurde im Unterschied zu Visite 1 nach der PCA-Einwirkphase direkt die ESR-Messung durchgeführt ohne erneutes Auftragen der Testcremes auf die Haut.

Die ESR-Messung erfolgte zunächst ohne Bestrahlung (Visite1: t=20min; Visite 2: t=12min) und anschließend auf demselben Messareal mit *in situ* VIS-/NIR-Bestrahlung (Visite1: t=20min; Visite 2: t=12min) mit einer Leistung von 120 mW/cm².

Vor den *in vivo* Messungen wurde ein Deckglas (24x36 mm) unter die Leiterschleife gelegt (siehe Abbildung 8), um einen direkten Kontakt und ein damit verbundenes Beschädigungsrisiko der Leiterschleife zu vermeiden.

Zur *in situ* Bestrahlung wurde ein fasergekoppelter Sonnensimulator (Low Cost Solar Simulator LS 01104, Wellenlänge: 450-2000nm, LOT Oriel Gruppe Europa) verwendet (Abbildung 3, Abbildung 7). Der Abstand zwischen Lichtfaserkabel und Leiterschleife betrug 1 cm (Abbildung 8).

Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden Doppelmessungen durchgeführt. Es wurden nur Messwerte mit einem Fehlerquotienten unter 30% in die Auswertung eingeschlossen.

2.2.6. Ex vivo ESR-Messungen

Vergleichbar mit den *in vivo* Messungen wurden von je einem Schweineohr folgende Messproben angefertigt:

- zwei Proben ohne Cremebehandlung
- zwei Proben mit Placebocreame
- zwei Proben mit Verumcreme.

Zu Beginn wurden die Schweineohren (SWO) unter fließendem Wasser gewaschen und rasiert. Danach erfolgte eine Reinigung der Haut mit einem ethanolgetränkten Papiertuch und das Ausstanzen von Proben (19 mm), bei denen die Haut vom Knorpel sowie Unterhautfettgewebe abpräpariert und auf Glasobjektträger fixiert wurde.

Anschließend wurden auf je 1 Filterpapier 50 μl der 0,8 %igen PCA-Lösung auf die Hautprobe pipettiert, die mit einem Epikutantestpflaster für 40 min zur Penetration abgeklebt wurde. Daraufhin erfolgte gegebenenfalls das Auftragen der Creme (2 mg/cm^2) und nach entsprechender Einwirkzeit von 60 min die Messung im ESR-Spektrometer (siehe Abbildung 3, Abbildung 10).

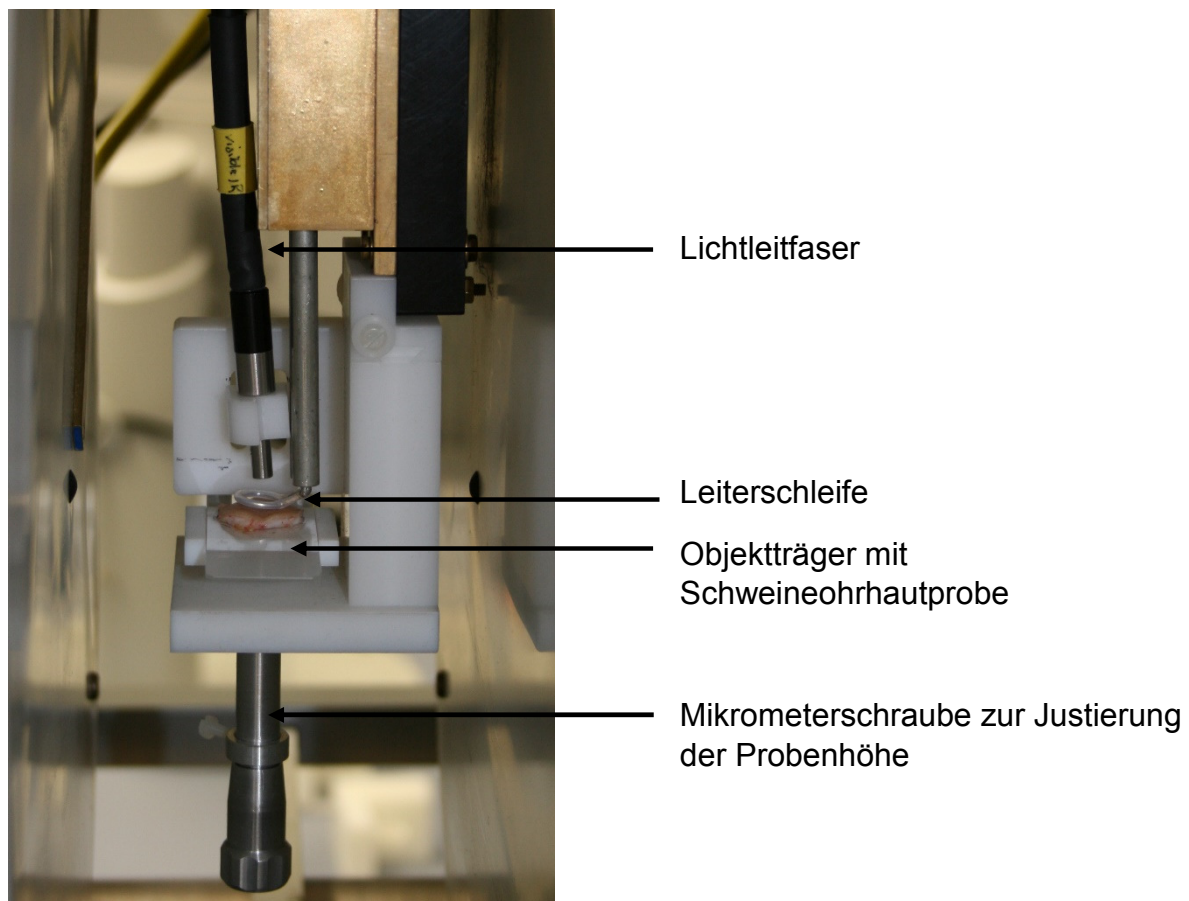


Abbildung 10 ESR-Probenhalterung zur *ex vivo* Messung mit Lichtleitfaser zur VIS-/NIR-Bestrahlung

Die Messdurchführung am ESR-Spektrometer entspricht der *in vivo* Messung. Es wurde jedoch kein Deckglas auf die Probe bzw. unter die Leierschleife gelegt, da im Gegensatz zu den *in vivo* Messungen ein direkter Kontakt mit der Leierschleife durch manuelle Feinjustierung mit der Mikrometerschraube verhindert werden konnte (siehe Abbildung 10). Der Abstand zwischen der Probe und Leierschleife betrug 1 mm.

Analog zu den *in vivo* Messungen wurde jede Probe zunächst 20 min ohne Bestrahlung und anschließend 20 min mit VIS-/NIR-Bestrahlung (120 W/cm^2) gemessen. Es wurden auch bei der *ex vivo* Versuchsdurchführung immer Doppelbestimmungen durchgeführt.

Vor und nach jeder Messung wurde außerdem die Temperatur der Hautprobe mittels Nonkontakt-Thermometer (Rytek Schlender Messtechnik, Deutschland) dokumentiert.

2.2.7. Auswertung der ESR-Spektren

Pro Minute wurden 4 ESR-Spektren aufgezeichnet (Abbildung 11). Jeweils 8 Spektren wurden anschließend zur Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses zu einem Spektrum akkumuliert (Beispiel siehe Abbildung 12).

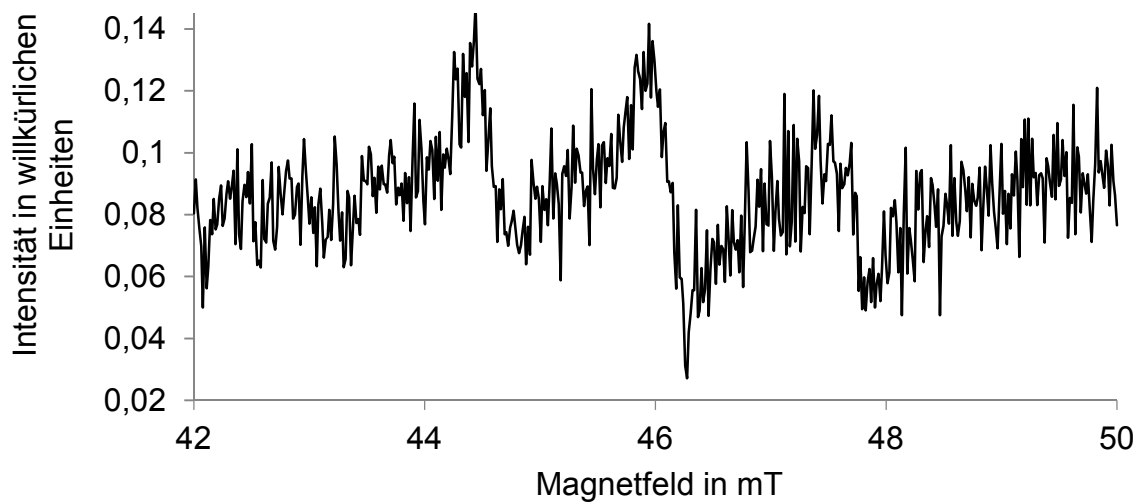


Abbildung 11 Beispiel eines einzelnen ESR-Spektrums von PCA nach Penetration in die humane Haut

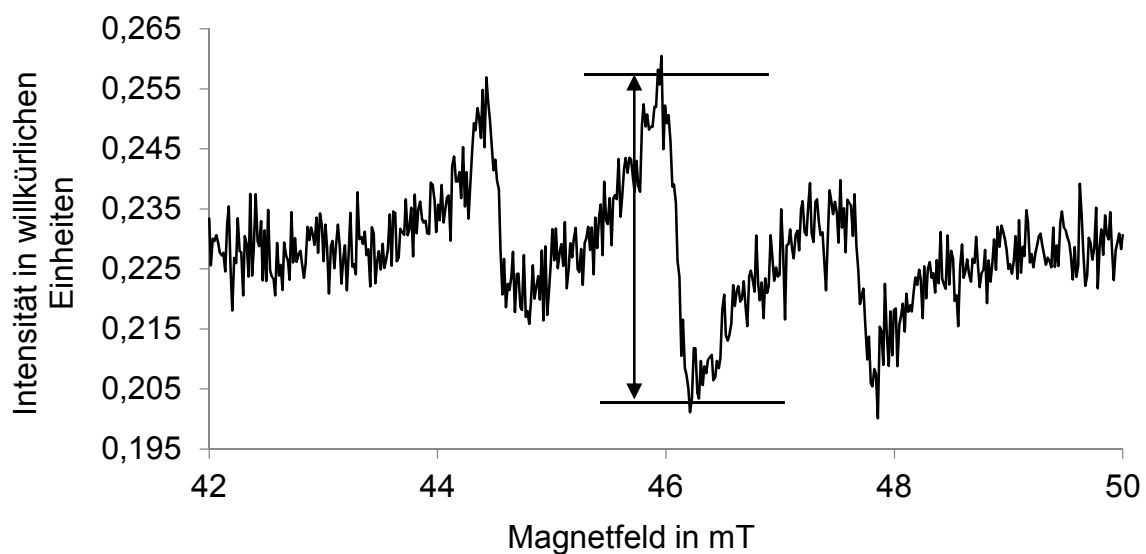


Abbildung 12 Beispiel eines akkumulierten ESR-Spektrums von PCA nach Penetration in die humane Haut

Die entsprechende Amplitudenhöhe des jeweiligen akkumulierten Spektrums wurde in Abhängigkeit von der Zeit für die ESR-Messung mit und ohne VIS-/NIR-Bestrahlung ermittelt. Für die Auswertung wurde jeweils der Mittelwert der Doppelmessung ermittelt. Zur besseren Vergleichbarkeit erfolgte die Berechnung der relativen ESR-Signalintensität. Hierbei wurden die entsprechenden Mittelwerte der akkumulierten Spektren auf den Ausgangswert zum Zeitpunkt $t=0$ durch Quotientenbildung bezogen. Abbildung 13 zeigt an einem Beispiel die graphische Darstellung der relativen ESR-Signalintensität mit und ohne VIS-/NIR-Bestrahlung. Hierbei wird die ESR-Signalabnahme während der VIS-/NIR-Bestrahlung im Vergleich zum relativ stabilen ESR-Signal im Messdurchgang ohne VIS-/NIR-Bestrahlung deutlich.

Anschließend wurden die Werte der Messungen mit Bestrahlung von den Werten der Messungen ohne Bestrahlung subtrahiert, um die kummulative Radikalbildung zu ermitteln (Abbildung 14).

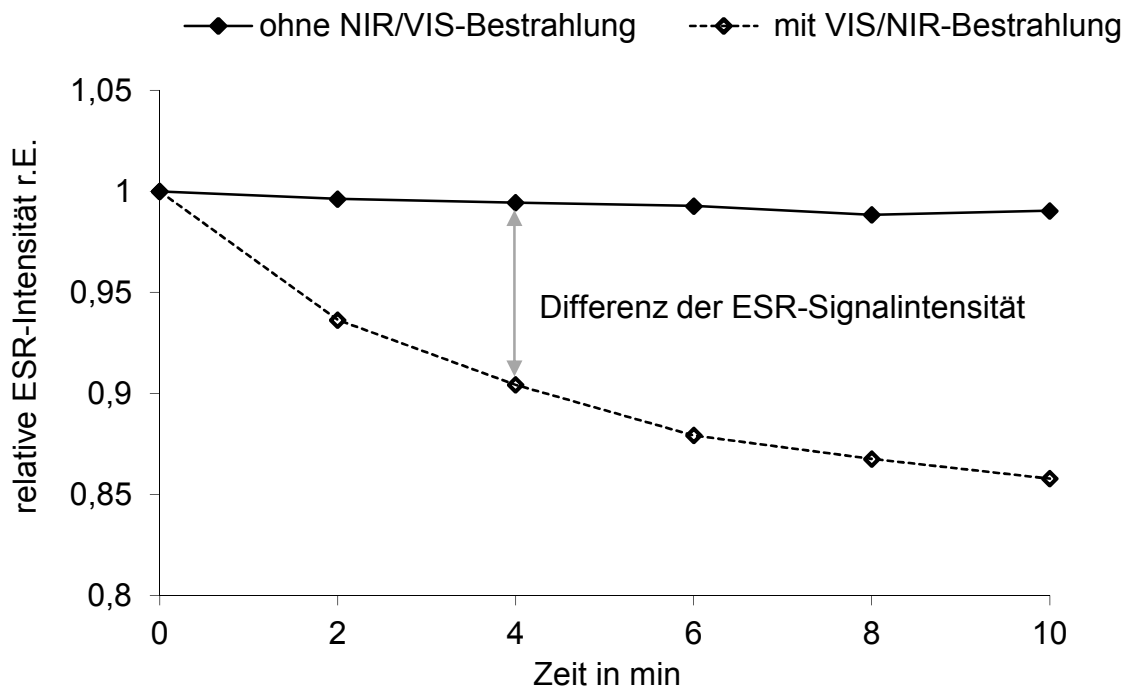


Abbildung 13 Mittelwerte relativ zum Ausgangswert der ESR-Intensität ohne VIS-/NIR-Bestrahlung und mit VIS-/NIR-Bestrahlung

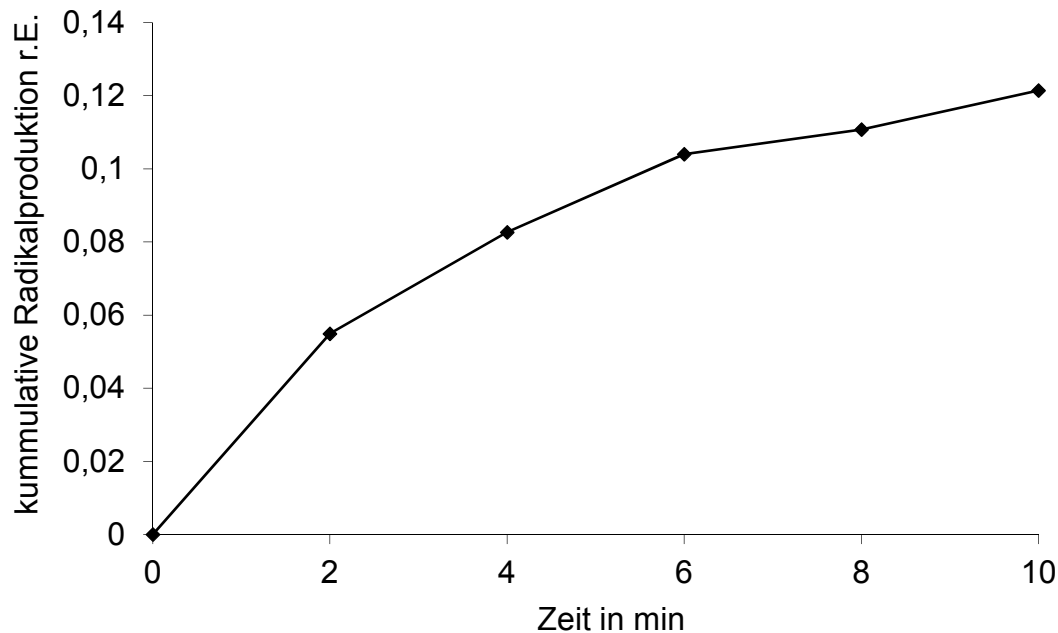


Abbildung 14 Differenz der relativen Mittelwerte der ESR-Intensität mit und ohne VIS-/NIR-Bestrahlung

2.2.8. Optische Messung der Absorptions- und Streueigenschaften der Cremes

Die entsprechenden Messungen erfolgten im Wellenlängenbereich zwischen 300-2000 nm mittels eines Zweistrahlenspektrometers mit einer Ulbrichtkugel (Lambda 1050, PerkinElmer, Rodgau-Jüdesheim Deutschland). Hierbei wird monochromatisches Licht über einen Strahlenteiler in zwei Teilstrahlen aufgespalten. Als Leuchtquelle dient im UV-Bereich eine Deuteriumlampe, im VIS-/NIR-Bereich eine Wolfram-Halogenlampe. Ein Teilstrahl wird durch die Probe geleitet, der andere Teilstrahl als Referenz von einem entsprechenden Detektor in der Ulbrichtkugel aufgenommen. Anschließend erfolgt der Vergleich der beiden Lichtstrahlenintensitäten. Als Detektor fungieren zum einen ein Photomultiplier-Detektor und zum anderen ein Indium-Galliumarsenid-Detektor. Für Messungen der Transmission werden die Proben vor die Ulbrichtkugel justiert, unter Verschluss der Reflexionspforte durch einen Spektralon®-Standard. Für Messungen der Reflexion werden die Proben hinter der Kugel positioniert. Die Ulbrichtkugel besitzt durch eine Spektralon®-Beschichtung optimale Reflexionseigenschaften. Es werden sowohl die totale Transmission als auch die totale Remission vom Detektor erfasst.

Es wurden 500 µm Quarzküvetten mit zentraler Vertiefung verwendet, die in einem festen Abstand zur Ulbrichtkugel eingesetzt wurden. Zunächst erfolgten Messungen an der Placebo- und Verumcreme. Hierzu wurde die Küvette, möglichst unter Vermeidung von

Luftblasenbildung, vollständig mit der Testcreme gefüllt und anschließend im Spektrometer gemessen. In einem zweiten Versuchsablauf erfolgte die Messung der Testcremes auf 200 μm Spalthaut von zwei Schweineohren, die mittels Dermatome hergestellt wurde. Hierzu wurden zunächst Proben mit einer Stanze (16 mm Durchmesser) hergestellt und mit Placebo- bzw. Verumcreme nach dem Colipa-Standard (2 mg/cm^2) bedeckt und in die Küvette gelegt. Nach einstündiger Cremeeinwirkzeit erfolgen die Messungen im Spektrometer. Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit wurden jeweils mehrere Proben gemessen. Die Ermittlung des Absorptions- (μ_a) und effektiven Streukoeffizienten (μ_s') erfolgte mittels inverser Monte Carlo Simulation (iMCS) auf der Grundlage einer Phasenfunktion und der gemessenen Transmissions- (T_t^M) und Reflexionsparameter (R_t^M). Mit Hilfe eines Startsets an Absorptionskoeffizienten (μ_a) und effektivem Streukoeffizienten (μ_s') konnten die resultierenden simulierten Transmissions- (T_t^S) und Reflexionswerte (R_t^S) berechnet werden. Anschließend wurden die simulierten und gemessenen Parameter der Transmission und Reflexion verglichen und bei einer Abweichung die Koeffizienten μ_a und μ_s' bis auf einen Fehlerquotienten von 0,2% angepasst (Friebel et al. 2006: 34021, Krause 2011: 19, Haag et al. 2014: 227–233).

2.2.9. Hautlipidanalyse

2.2.9.1. Lipidextraktion

Bei jeder Visite wurden im Anschluss an die ESR-Messungen Lipide aus dem Stratum corneum mit Hilfe eines Ethanol-Cyclohexan-Lösungsmittels (v:v, 1:4) extrahiert. Die Extraktion wurde an den unbestrahlten und bestrahlten Messarealen (ohne Creme, mit Placebocreme, mit Verumcreme) bei allen Probanden durchgeführt. Die Extraktion nach Bestrahlung wurde jedoch erst im Verlauf der ersten Visite begonnen, sodass hier eine niedrigere Probandenanzahl von $n=6$ vorliegt.

Es wurde jeweils ein Zentrifugenröhrchen (Durchmesser: 7,3 cm), das mit 5 ml Lösungsmittel gefüllt war, auf das Messareal aufgesetzt und mit dem Arm 1 min geschüttelt (Abbildung 15). Dieser Vorgang wurde am selben Messareal zweimal wiederholt, sodass pro Messareal insgesamt 15 ml Extraktionslösung entstanden, die bis zum Transport bei -20°C gelagert wurden. Außerdem wurde jeweils eine Probe der im Lösungsmittel gelösten Placebo- bzw. Verumcreme zur Lipidanalyse und zum Vergleich der verwendeten Lipide mit dem Hautlipidprofil hergestellt.



Abbildung 15 Hautlipidextraktion am Unterarm an einem unbehandelten Hautareal mittels eines sich im Zentrifugenröhrchen befindenden Ethanol-Cyclohexan-Lösungsmittels

2.2.9.2. Lipidanalyse mittels automatisierter mehrstufiger Hochleistungsdünnschichtchromatographie (AMD-HPTLC)

Die anschließenden Analyseschritte wurden extern am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg durchgeführt.

Zunächst wurden die extrahierten Lipide unter Stickstoff getrocknet, in 300 µl Hexan/Methanol (2:3 (v:v)) erneut gelöst und bei -20°C bis zur Verwertung gelagert.

Für die chromatographische Analyse (Durchführung erfolgte nach Farwanah et al. 2005: 514-521 und Schellenberg et al. 2010: 10-12) wurden Standardsubstanzen, gelöst in Methanol/Chloroform (v:v, 1:1), sowie 10 µl des Lipidextrakts auf 6 mm lange Banden auf vorgewaschene HPTLC-Platten (20 x 10 cm Kieselgel 60, Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen.

Die chromatographische Auftrennung erfolgte automatisiert im Neunstufengradient im AMD- 2 System (CAMAG, Muttenz, Schweiz). Die einzelnen Stufen sind zusammengesetzt aus: Methanol, Chloroform, Toluol, n-Hexan und Essigsäure.

Anschließend wurden die Platten in ein Kupfersulfat-Reagenz, eine wässrige Lösung aus 10% Kupfersulfat und 8% Orthophosphorsäure, getaucht und für 8 min bei 180°C im Trockenschrank erwärmt. Zur quantitativen Analyse wurden alle Bahnen bei 366 nm und 600 nm gescannt und ausgewertet. Die Hautlipide wurden hierbei in Lösung und in reiner

Form mit den folgenden Standardsubstanzen verglichen und quantifiziert: L- α -Phosphatidylcholin und Sphingomyelin (als Summe ermittelt), Cholesterol-3-sulfat, Cholesterol, Cholesterololeat, Glyceroltrioleat, Ölsäure, Squalen (Sigma, Steinheim, Deutschland), Ceramide [NS] (Sederma, Nettetal, Deutschland), Ceramide [NP] (zur Ermittlung von [NP1] und [NP2]) und Ceramide [AP] (Evonik, Essen, Deutschland) (vgl. Farwanah et al. 2005: 514-521, Schellenberg et al. 2010: 10-12).

3. Ergebnisse

3.1. Datenanalyse und statistische Auswertung

Die Auswertung der ESR- Spektren erfolgte mit Hilfe der Auswertungssoftware Multiplot (Magnettech, Berlin, Deutschland). Für die Ermittlung der statistischen Ergebnisse und zur graphischen Darstellung wurden die Programme SPSS® 19 für Windows und Microsoft® Office Excel verwendet. Weiterhin erfolgte das Fitten der Messkurven mit dem Programm Origin® 9G 32bit. Die deskriptive explorative Datenanalyse der unverbundenen Variablen wurde mit dem Mann-Whitney-U Test und Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Für die verbundenen Variablen erfolgte die Auswertung mit dem Friedman und Wilcoxon Test sowie der verallgemeinerten Schätzungsgleichung. Ein signifikanter Unterschied bestand bei $p \leq 0,05$ (Markierung: * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$), ein Trend bei $p \leq 0,1$ (Markierung: (*)).

3.2. Fragebogen

Die statistische Auswertung der Fragebögen, die vor jeder Visite von den Probanden ausgefüllt wurden, erfolgte mittels des Wilcoxon Test für verbundene Variablen. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der untersuchten Entitäten Stress ($p=0,279$), Obst- ($p=0,571$), Gemüse- ($p=0,258$) und Nikotinkonsum ($p=1,0$) zwischen Visite 1 und 2 ermittelt werden. Auch wurden von den Probanden im Studienzeitraum neben der Testcreme keine weiteren antioxidantienhaltigen Bodylotions angewendet. Schwerwiegende Erkrankungen im Untersuchungszeitraum, veränderter Alkoholkonsum und starke Exposition der Haut bezüglich Sonnenlichtes wurden ebenfalls verneint. Somit konnte sichergestellt werden, dass die Probanden im Untersuchungszeitraum die Lebens- und Ernährungsgewohnheiten bezüglich der untersuchten Entitäten nicht stark geändert haben. Dadurch sollte ein unerwünschter Einfluss auf das antioxidative Potential der Probanden durch zusätzliches Zuführen von relevanten Mengen an Antioxidantien bzw. die Produktion von freien Radikalen durch die aufgeführten Einflussfaktoren während der Studie größtenteils ausgeschlossen werden.

3.3. ESR-Messungen

3.3.1. *In vivo* ESR-Messungen

3.3.1.1. Messungen nach einmaliger Auftragung und einstündiger Einwirkzeit

In Visite 1 wurden Messungen an unbehandelten und einmalig mit Verum- bzw. Placebocreme behandelten Messarealen durchgeführt. Die Penetrationszeit der Testcremes, die bei diesem Messdurchgang vom Untersucher aufgetragen wurden, betrug jeweils eine Stunde.

Die nachfolgenden Berechnungen und Darstellungen bezüglich der Messungen am ESR-Gerät basieren auf den Differenzen aus den Messwerten ohne und mit VIS-/NIR-Bestrahlung nach gleicher Messdauer, die der kumulativen Radikalbildung entsprechen.

Die ESR-Signalintensität der unbehandelten Messareale wies während der Messung ohne VIS-/NIR-Bestrahlung kaum Veränderungen auf. Innerhalb der Bestrahlungsphase wurde jedoch ein im Vergleich zu den mit Creme behandelten Arealen größerer Abfall der ESR-Signalintensität über die Zeit gemessen. Demnach ist eine deutliche Zunahme der kumulativen Radikalbildung auf der unbehandelten Haut zu erkennen, dargestellt als oben genannte Differenz der ESR-Intensität ohne und mit VIS-/NIR-Bestrahlung. Der Kurvenverlauf entspricht am ehesten einer exponentiellen Funktion (siehe Abbildung 16). Die Radikalbildung über die Zeit, die der 1. Ableitung der kumulativen Radikalbildung entspricht, ist auf der unbehandelten Haut in den ersten beiden Messminuten am größten und nimmt mit der Zeit ab. Dies ist in der Abbildung 17 ersichtlich, in der die 1. Ableitung der in Abbildung 16 abgebildeten giffitteten Kurven der kumulativen Radikalbildung dargestellt ist.

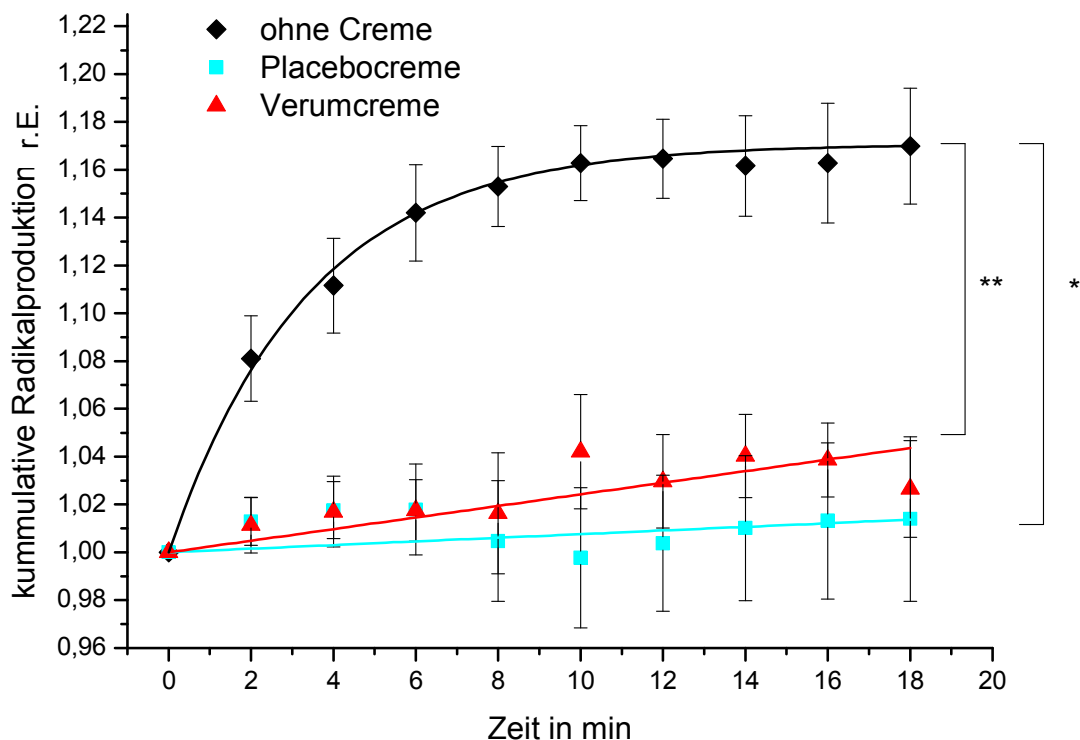


Abbildung 16 Kummulative Radikalbildung in Visite 1, dargestellt als Mittelwerte der Differenzen aus der ESR-Signalintensität der unbestrahlten und bestrahlten Messungen \pm mittlerer Standardfehler, $n = 11$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

In den Messungen der mit Placebo- bzw. Verumcreme behandelten Hautareale ist die Differenz aus der ESR-Signalintensität ohne und mit VIS-/NIR-Bestrahlung im Vergleich zu der der unbehandelten Hautareale nur sehr niedrig bei nahezu konstanter Radikalbildung über die Zeit (siehe Abbildung 16).

Die gemessene kummulative Radikalproduktion nach Placebo- ($p = 0,001$) bzw. Verumcremeanwendung ($p = 0,013$), die der o.g. Differenz entspricht, ist im Vergleich zur unbehandelten Haut signifikant geringer im Vergleich zu den Messungen der unbehandelten Hautareale. Zwischen den mit Verum- und Placebocreme ermittelten Messergebnissen konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden ($p = 0,342$; Abbildung 16). Die verbundenen Variablen wurden mittels verallgemeinerter Schätzungsgleichung statistisch analysiert.

Der gefittete Kurvenverlauf der kummulativen Radikalbildung unter Verum- bzw. Placebocremeapplikation entspricht am ehesten einer linearen Funktion (siehe Abbildung

16). Ein entsprechender exponentieller Kurvenfit wies ein niedrigeres Bestimmtheitsmaß R^2 auf und wurde daher nicht ausgewählt.

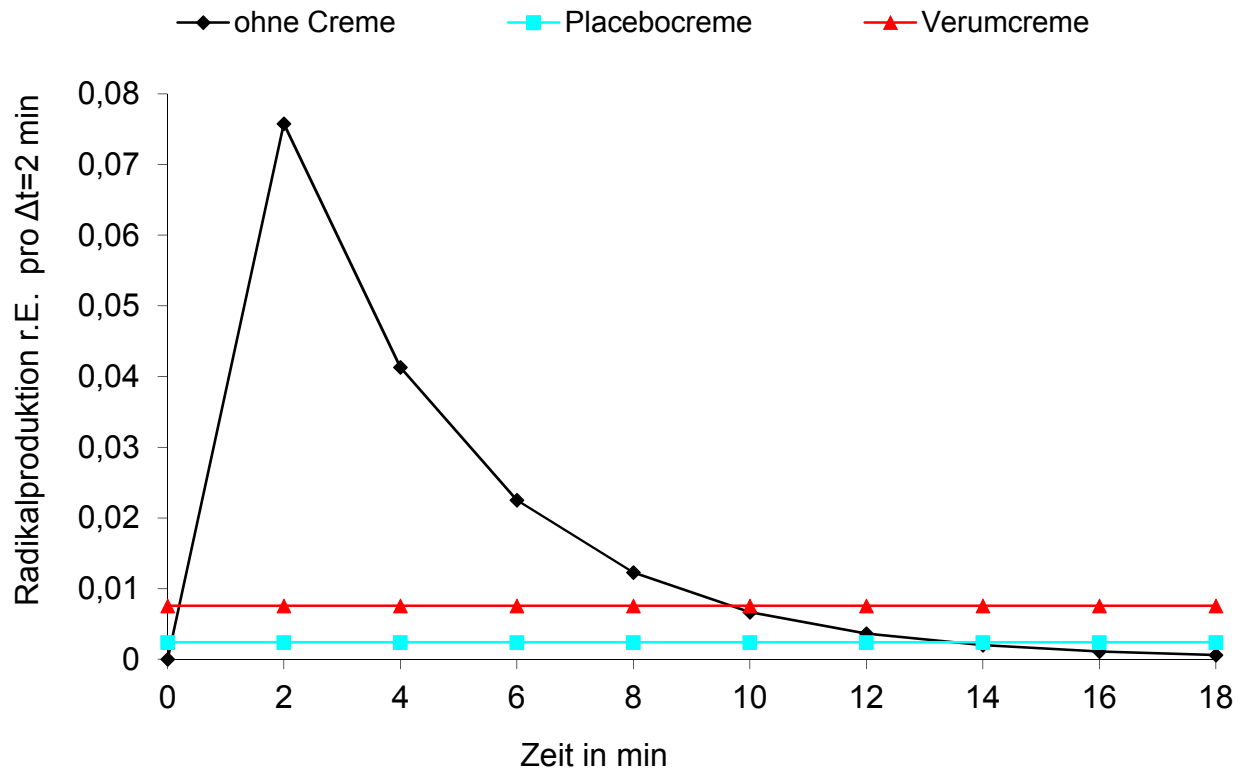


Abbildung 17 Radikalanstieg *in vivo* Visite 1 in relativer Einheit pro 2 min, n=11, Daten entsprechen der 1. Ableitung der in Abbildung 16 dargestellten gefitteten Kurven

Betrachtet man die prozentuale Radikalbildung nach zweiminütiger Messung auf den Cremehautarealen bezogen auf die Messwerte der unbehandelten Haut, so ist kaum ein Unterschied zwischen den beiden Testcremes zu verzeichnen (Tabelle 4). Nach 10- bzw. 18-minütiger Messung wurde die geringste prozentuale Radikalbildung in den Placebocreamearealen gemessen.

Tabelle 4 Relative Radikalbildung in % bezogen auf die kummulative Radialbildung der unbehandelten Messareale nach 2,10 und 18 min Messdauer, \pm mittlerer Standardfehler in %, n=11, Visite 1

	t= 2 min	t= 10 min	t= 18 min
Ohne Creme	100	100	100
Basiscreme	15,8 \pm 2,8	< 0 \pm 4,5	8,2 \pm 5,9
hyperforinhaltige Creme (1,5%)	14 \pm 3,0	25,8 \pm 4,0	15,6 \pm 4,4

Da in den Messungen in Visite 1 nach etwa 10- bis 12-minütiger Messzeit kaum noch eine Änderung der Radikalproduktion zu ermitteln ist (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17), wurde die Messdauer in Visite 2 auf 10 Minuten verkürzt.

3.3.1.2. Messungen nach einmaliger Auftragung und fünf- bzw. vierzehnstündiger Einwirkzeit

Weiterhin erfolgten an der Unterarmhaut von je drei Probanden ESR- Messungen nach einmaliger topischer Applikation der Testcremes unter Verlängerung der Penetrationszeit auf 5 bzw. 14 Stunden sowie zum Vergleich auch auf unbehandelter Haut unter gleichen Messbedingungen wie in Visite 2. Hierbei konnten jedoch zwischen den Messungsergebnissen der unbehandelten Kontrollareale und der Cremeareale keine deutlichen Unterschiede bezüglich der kumulativen Radikalbildung ermittelt werden (Abbildung 18, Abbildung 19). Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Studie die Radikalschutzwirkung an Probanden ausschließlich nach einstündlicher Einwirkzeit bzw. vierwöchiger Cremeanwendung gemessen.

Eine statistische Datenauswertung der Messergebnisse wurde aufgrund der geringen Probandenzahl (n=3) nicht durchgeführt.

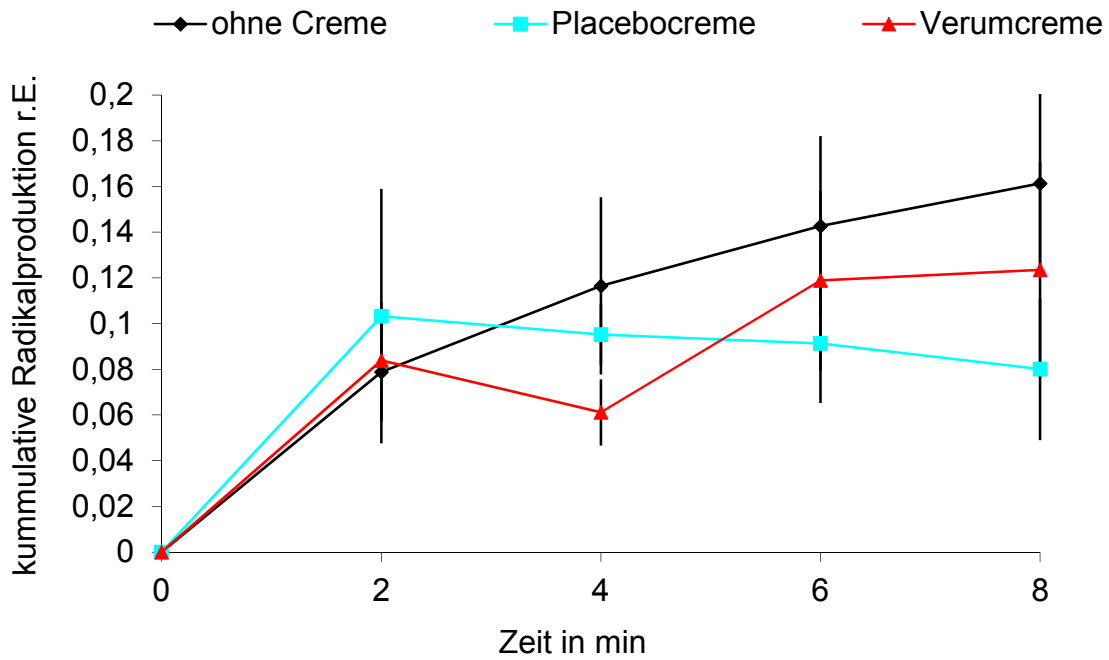


Abbildung 18 kummulative Radiaklproduktion nach fünfständiger Cremeeinwirkzeit, dargestellt als Mittelwerte der Differenzen aus der ESR-Signalintensität der unbestrahlten und bestrahlten Messungen \pm mittlerer Standardfehler, $n = 3$

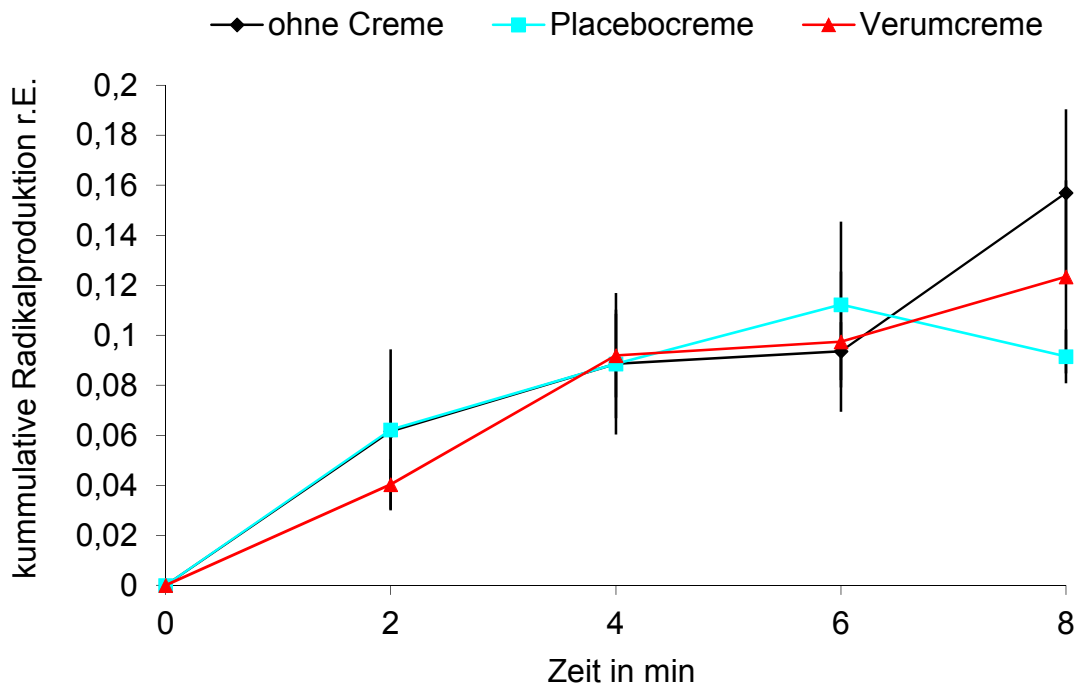


Abbildung 19 kummulative Radiaklproduktion nach 14-stündiger Cremeeinwirkzeit, dargestellt als Mittelwerte der Differenzen aus der ESR-Signalintensität der unbestrahlten und bestrahlten Messungen \pm mittlerer Standardfehler, $n = 3$

3.3.1.3. Messung nach Langzeitanwendung

Visite 2 wurde nach vierwöchigem, zweimal täglichem Eincremen der Probandenunterarme mit Verum- und Placebocreme durchgeführt. Im Unterschied zu Visite 1 und den *ex vivo* Messungen wurden die Testcremes von den Probanden selbstständig in subjektiv ermessener Crememenge aufgetragen.

Die Messungen wurden an unbehandelten sowie an mit Verum- bzw. Placebocreme behandelten Hautarealen durchgeführt.

Zur Vermeidung optischer Einflüsse der Cremes fand die Messung 5 bis 14 Stunden (im Mittel 8,5 Stunden) nach der letzten Cremeapplikation statt.

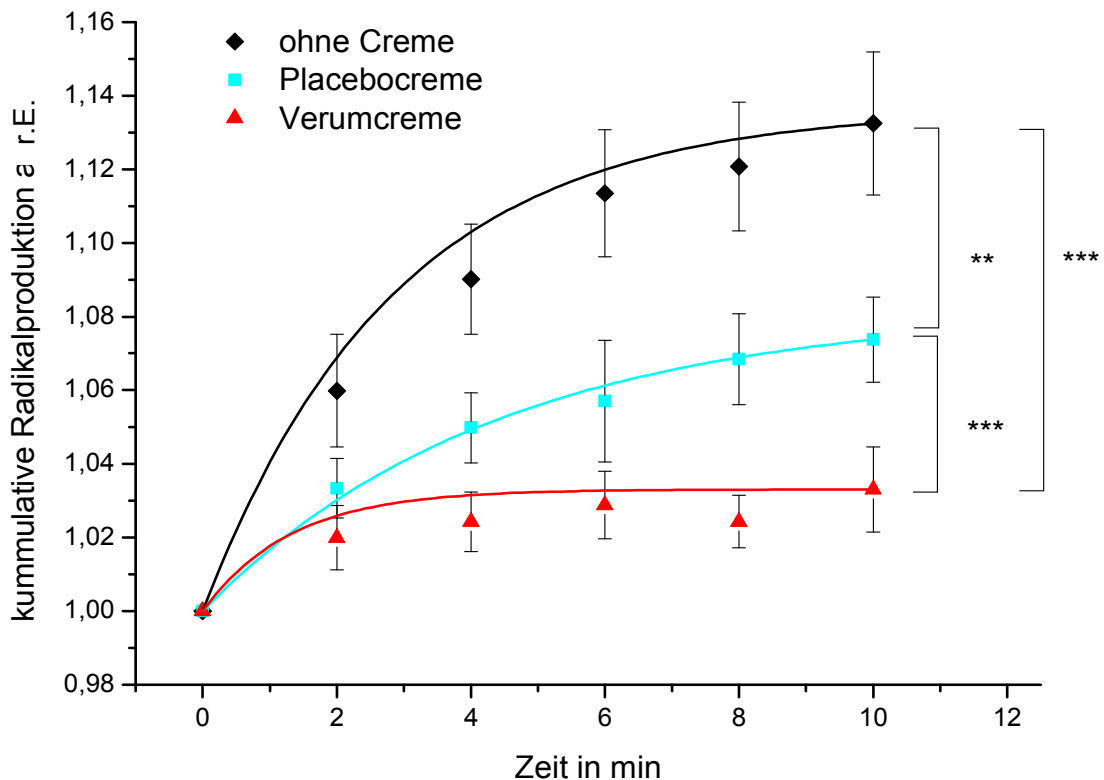


Abbildung 20 Kummulative Radikalproduktion in Visite 2, dargestellt als Mittelwerte der Differenzen der ESR-Signale der unbestrahlten und bestrahlten Messungen \pm mittlerer Standardfehler, $n = 11$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

Während der Messungen ohne VIS-/NIR-Bestrahlung blieb die ESR-Signalintensität relativ konstant und sank während der Bestrahlungsphase je nach Messentität in

unterschiedlicher Stärke ab. Für die nachfolgenden Darstellungen und Berechnungen wurden die Differenzen aus den ESR-Messwerten ohne und mit VIS-/NIR-Bestrahlung nach gleicher Messdauer gebildet, die der kumulativen Radikalbildung entsprechen.

Die statistische Auswertung erfolgte analog zu Visite 1 mittels der verallgemeinerten Schätzungsgleichung.

Die kummulative Radikalbildung ist über die Zeit betrachtet an den unbehandelten Hautproben signifikant größer als an den placebo- ($p < 0,01$) bzw. den verumbehandelten Hautproben ($p < 0,001$). Außerdem konnte bei diesen Messungen im Unterschied zu Visite 1 auch ein signifikanter Unterschied in der kummulativen Radikalbildung zwischen der mit Placebo- und der mit Verumcreme behandelten Haut gemessen werden ($p < 0,001$). Die geringste kummulative Radikalbildung wurde auf den mit Verumcreme behandelten Hautarealen gemessen (siehe Abbildung 20).

Die gefitteten Kurven in Abbildung 20 zeigen einen exponentiellen Kurvenverlauf.

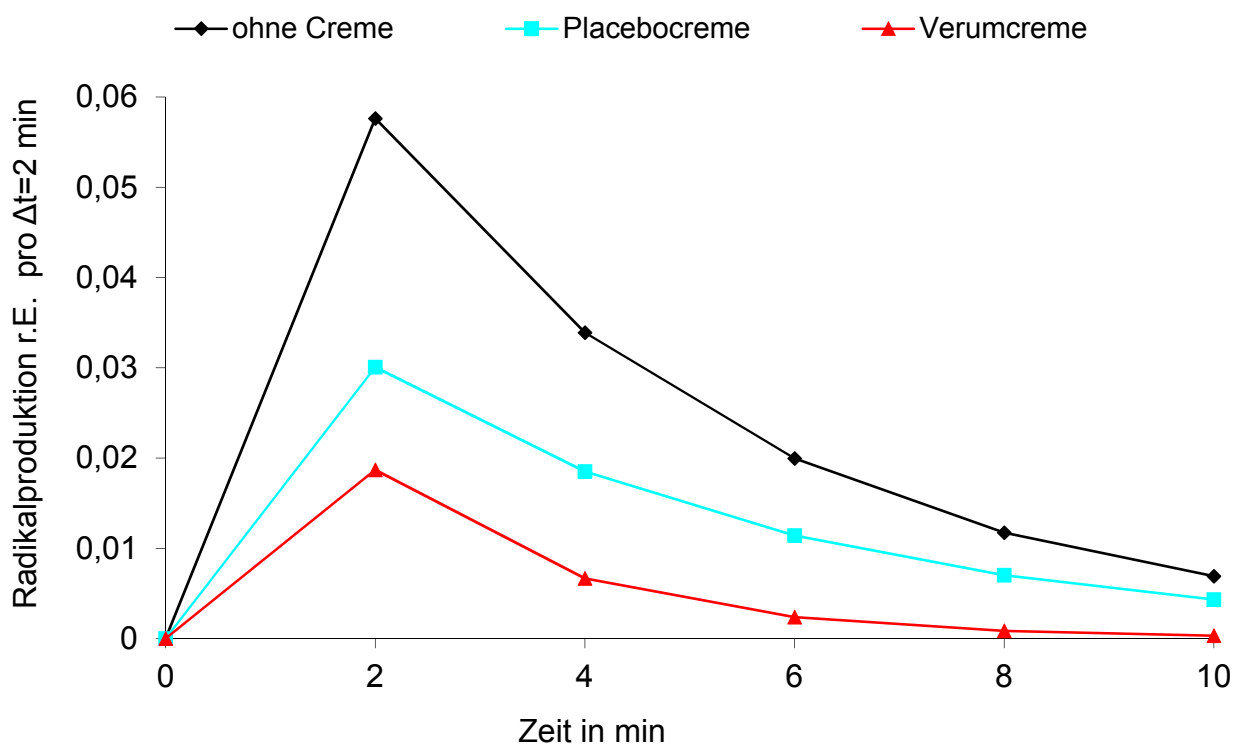


Abbildung 21 Radikalanstieg *in vivo* Visite 2 in relativer Einheit pro 2 min, $n=11$, Daten entsprechen der 1. Ableitung der in Abbildung 20 dargestellten gefitteten Kurven

Der höchste Anstieg der Radikalbildung wurde sowohl auf der unbehandelten, als auch auf der mit Placebo- bzw. Verumcreme behandelten Hautareale in den ersten zwei

Minuten gemessen. Mit zunehmender Messzeit stagniert der Kurvenanstieg (Abbildung 21). Die Berechnung des Radikalanstiegs (Abbildung 21) erfolgte hierbei abweichend von der Darstellung in der Teilpublikation der Messdaten (Haag et al. 2014: 227-233) anhand der 1. Ableitung der in Abbildung 20 dargestellten gefitteten Kurven für den Zeitintervall von je 2 Minuten. Daher ist die graphische Darstellung nicht identisch.

Nach zehnmünütiger Messdauer konnte in Visite 2 mit Hilfe der Placebocreme eine Reduktion der Radikalbildung von 44,3% und mit der hyperforinhaltigen Creme von 75,1% im Vergleich zur unbehandelten Haut beobachtet werden (Tabelle 5).

Im Vergleich zu Visite 1 ist die prozentuale Radikalbildung in Visite 2 in den mit Placebocreme behandelten Hautarealen sowohl nach den ersten beiden Messminuten, als auch nach 10 Minuten größer. Auf den mit Verumcreme behandelten Arealen ist die prozentuale Radikalbildung nach 2 Minuten in Visite 2 nach Langzeitcremeanwendung größer als nach Einmalapplikation in Visite 2. Nach 10 minütiger Messung liegt die prozentuale Radikalbildung jedoch in beiden Testdurchläufen im ähnlichen Niveau, wie in Tabelle 4 und Tabelle 5 ersichtlich ist.

Tabelle 5 Relative Radikalbildung in % bezogen auf die unbehandelten Messareale nach 2 und 10 min Messdauer, ± mittlerer Standardfehler in %, n=11, Visite 2

	t= 2 min	t= 10 min
Ohne Creme	100	100
Basiscreme	55,7±2,3	55,7±3,1
hyperforinhaltige Creme (1,5%)	33,3±2,4	24,9±3,1

Vergleicht man die Restinhalte der Cremetuben nach Versuchsende, so fällt auf, dass interindividuell unterschiedlich viel Creme aufgetragen wurde. Betrachtet man die Mittelwerte, so wurden in vier Wochen insgesamt 17,8 g ± 20,4 (4,7 bis 77,7 g) Verumcreme und 13,2 g ± 10,3 (2,4 bis 36,9 g) Placebocreme pro Proband verbraucht. Die Probanden wurden zu Versuchsbeginn dazu angehalten, die Testcremes gleichmäßig und wie eine gewohnte Hautcreme aufzutragen. Die meisten Probanden gaben an, dass sich die Verumcreme leichter verteilen ließ.

3.3.2. *Ex vivo* ESR-Messungen an Schweineohrhaut

Die ESR-Signalintensitäten blieben während der Messung ohne VIS-/NIR-Bestrahlung auch bei den Schweineohrhautmodellen nahezu stabil. Innerhalb der Bestrahlungsphase war je nach untersuchter Formulierung ein unterschiedlich starker Abfall der ESR-Signalintensität über die Zeit manifestierbar. Daraus wurden die in Abbildung 22 dargestellten jeweiligen Mittelwerte der Differenzen der ESR-Signale der unbestrahlten und bestrahlten Hautproben berechnet, die als kummulative Radikalbildung bezeichnet wird.

Zur Ermittlung statistischer Unterschiede diente die verallgemeinerte Schätzungsgleichung.

Die kummulative Radikalbildung über die Zeit ist auch bei dem *ex vivo* Schweinehautmodell an den unbehandelten Hautproben am höchsten und unterscheidet sich signifikant zu den Messergebnissen der mit Verumcreme behandelten Haut ($p=0,0001$) und der mit Placebo behandelten Haut ($p=0,02$). Die niedrigste kummulative Radikalbildung wurde auf den mit der hyperforinreichen Verumcreme behandelten Hautproben gemessen. Diese unterscheidet sich ebenfalls signifikant von den Messergebnissen mit Placebocreme ($p < 0,05$, Abbildung 22).

Am Schweinehautmodell lässt sich die kummulative Radikalbildung in Abhängigkeit von der Zeit im Fit als lineare Kurve mit nahezu konstanter Zunahme der Radikalproduktion darstellen (Abbildung 22). In Abbildung 23 ist die Radikalbildung dargestellt, die der 1. Ableitung der in Abbildung 22 abgebildeten gefitteten Kurven der kumulativen Radikalbildung entspricht. Diese ist in der unbehandelten Haut am größten und in der mit Verumcreme behandelten Haut am niedrigsten.

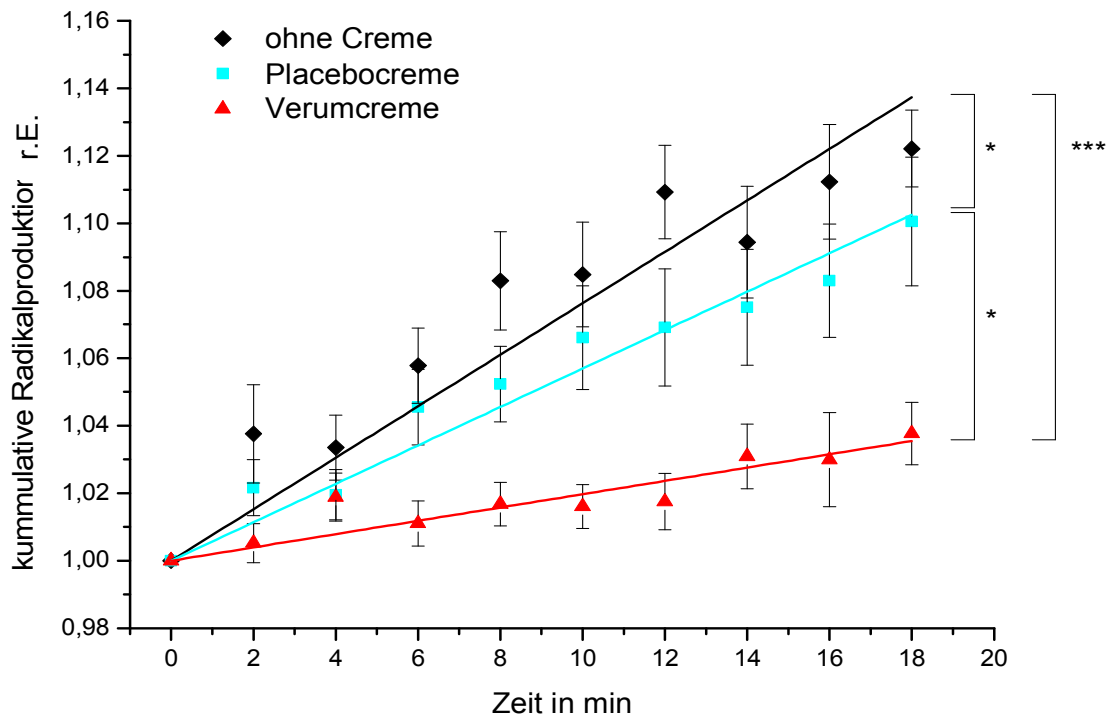


Abbildung 22 Kummulative Radikalbildung ex vivo, dargestellt als Mittelwerte der Differenzen der ESR-Signale der unbestrahlten und bestrahlten Messungen \pm mittlerer Standardfehler, $n=9$, *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$

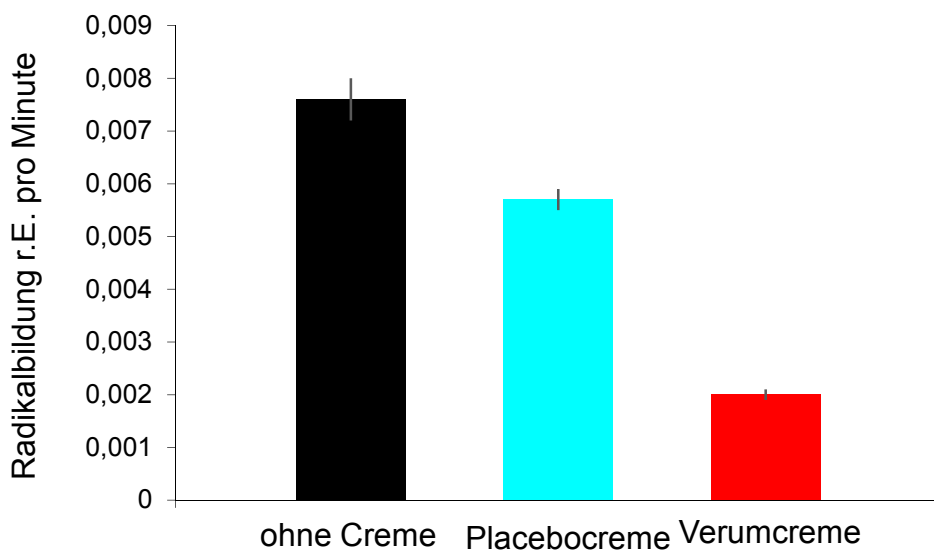


Abbildung 23 Radikalanstieg ex vivo in relativer Einheit \pm Standardabweichung, $n=9$, Daten entsprechen der 1. Ableitung der in Abbildung 22 dargestellten gefitteten Kurven

Die prozentuale Radikalbildung unter Stressinduktion durch VIS-/NIR-Bestrahlung ist am Schweineohrhautmodell auf den mit der hyperforinhaltigen Verumcreme behandelten Proben am niedrigsten. In den Placebocreme-Hautproben wurde eine höhere prozentuale Radikalbildung ermittelt (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6 Relative Radikalbildung in % bezogen auf die unbehandelten Messareale nach 2 min, 10 min und 18 min Messdauer, \pm mittlerer Standardfehler in %, n=9

	t= 2 min	t= 10 min	t= 18 min
Ohne Creme	100	100	100
Basiscreme	57,6 \pm 2,3	77,9 \pm 3,1	82 \pm 3,0
hyperforinhaltige Creme (1,5%)	13,9 \pm 2,0	18,9 \pm 2,2	30,8 \pm 2,1

Ausgehend von der Temperatur vor der Messung, die im Mittelwert 24,3 \pm 2,6 °C betrug, konnte nach der VIS-/NIR-Bestrahlung eine leichte Temperaturerhöhung der Proben ohne Cremebehandlung von +1,4 \pm 1,1°C gemessen werden. Auf den gecremten Hautproben wurde ein Temperaturanstieg von +1,5 \pm 0,7°C unter Verumcreme sowie von +1,6 \pm 0,6°C unter Placebocreme gemessen.

Im Vergleich der ESR-Messergebnisse der *in vivo* Versuchsdurchführung der Visite 2 an humaner Haut mit den *ex vivo* Messergebnissen an porciner Haut fällt auf, dass die absolute kummulative Radikalbildung nach zehninütiger Messdauer *ex vivo* geringer ist als *in vivo*. Dies zeigte sich sowohl in der unbehandelten Haut als auch in der mit Verum- bzw. Placebocreme behandelten Haut.

Die kummulative Radikalbildung steigt jedoch im *ex vivo* Versuch mit der Zeit an (siehe Abbildung 24), sodass die *ex vivo* Radikalbildung zum Zeitpunkt t=18 min in unbehandelten Hautareal auf einem ähnlichen Niveau ist, wie zum Zeitpunkt t=10 min im *in vivo* Versuch.

Die kummulative Radikalproduktion unter VIS-/NIR-Bestrahlung unterscheidet sich sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* nach 10 min bzw. 18 min Messung signifikant zum einen zwischen den unbehandelten und mit Verumcreme behandelten Arealen sowie zum anderen auch zwischen den Verum- und Placebocreme-Arealen. Die Berechnung erfolgte mittels des FriedmanTest. Ein signifikanter Unterschied zwischen den mit

Placebocreme behandelten und unbehandelten Hautarealen besteht zu den untersuchten Zeitpunkten nur *in vivo* nach 10 min Messdauer.

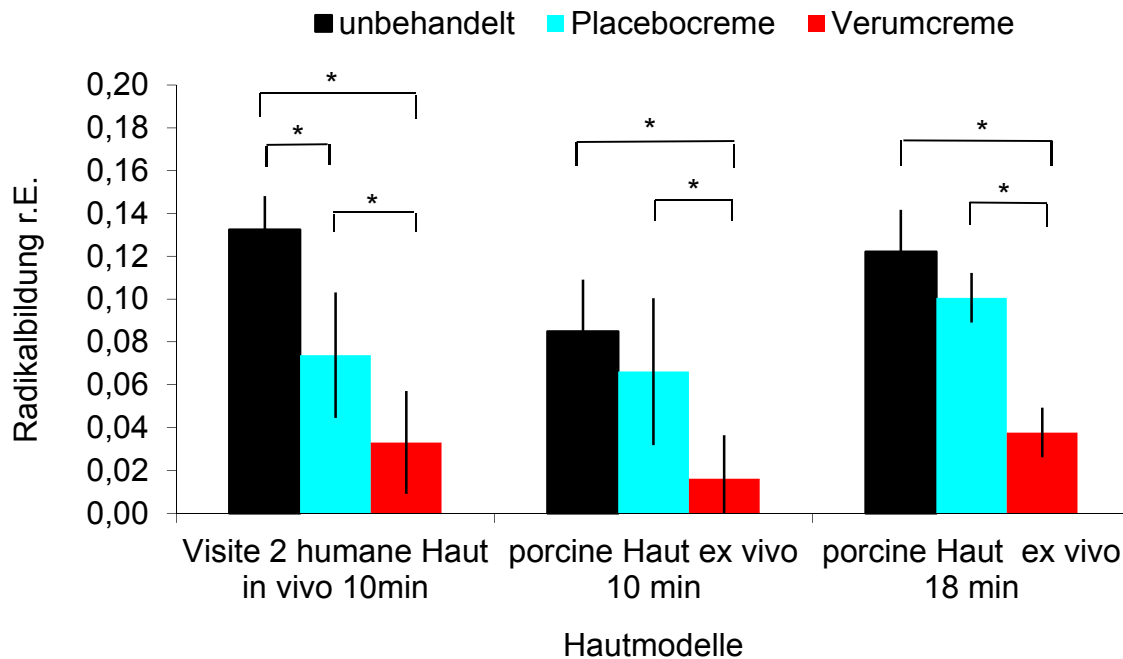


Abbildung 24 Vergleich der absoluten kummulativen Radikalbildung zwischen *ex vivo* und *in vivo* Visite 2, Darstellung der Mittelwerte der Differenzen \pm mittlerer Standardfehler, *in vivo* n= 11, *ex vivo* n= 9, * p< 0,05.

Die prozentuale Radikalbildung nach 10 min Messdauer, die durch die Bezugnahme der *in vivo* und *ex vivo* ESR-Messergebnisse auf die Messwerte der unbehandelten Haut berechnet wurde, unterscheidet sich sowohl in den Verumcreme-Hautarealen als auch in den Placebocreme-Hautarealen nicht signifikant im *in vivo* und *ex vivo* Vergleich (siehe Abbildung 25).

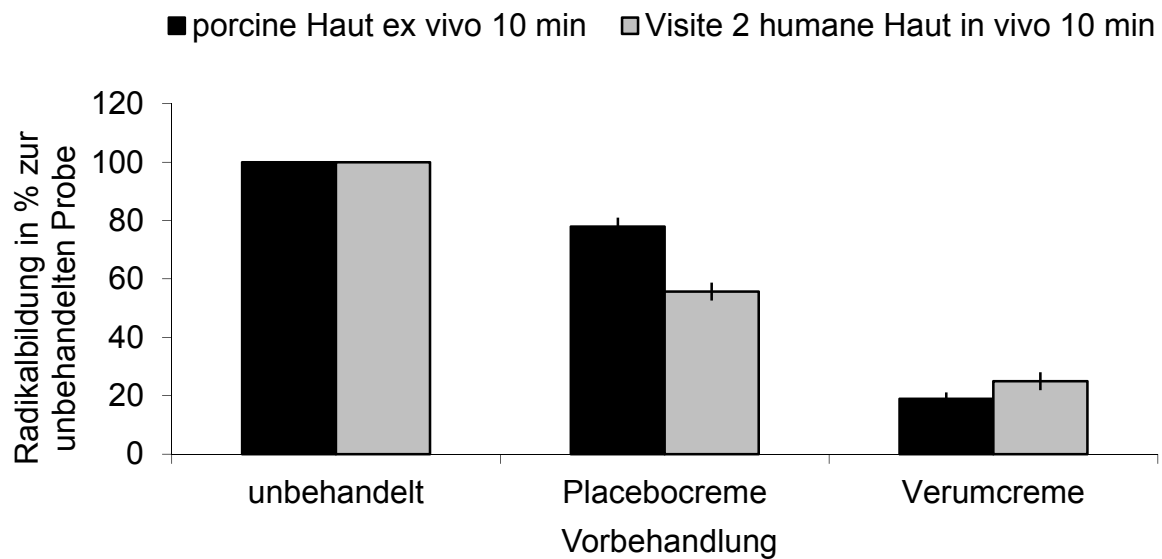


Abbildung 25 Vergleich der prozentualen Radikalbildung zwischen *ex vivo* und *in vivo* Visite 2 Messungen nach 10 min, *in vivo* n= 11 Darstellung der Mittelwerte der Differenzen bezogen auf die Messwerte ohne Behandlung \pm mittlerer Standardfehler, *in vivo* n= 11, *ex vivo* n= 9.

3.4. Optische Messung der Absorptions- und Streueigenschaften

Die beiden Testcremes zeigen deutliche Ähnlichkeiten bezüglich der Absorptions- und Streueigenschaften. Kleine Unterschiede sind eher im kurzwelligen Wellenlängenbereich zu erkennen. Der Streukoeffizient der Placebocreme liegt im Wellenlängenbereich zwischen 400-800 nm leicht unterhalb von dem der Verumcreme. Letztere zeigt eine etwas höhere Absorptionsfähigkeit im Bereich zwischen 400-530 nm. Die Streuung ist bei beiden Cremes im untersuchten Wellenlängenspektrum größer als die Absorption, bis auf den Bereich zwischen 1900-2000 nm, der neben den Bereichen zwischen 1400-1500 nm und 1700-1800 nm Wasserabsorptionsbanden darstellt (Abbildung 26).

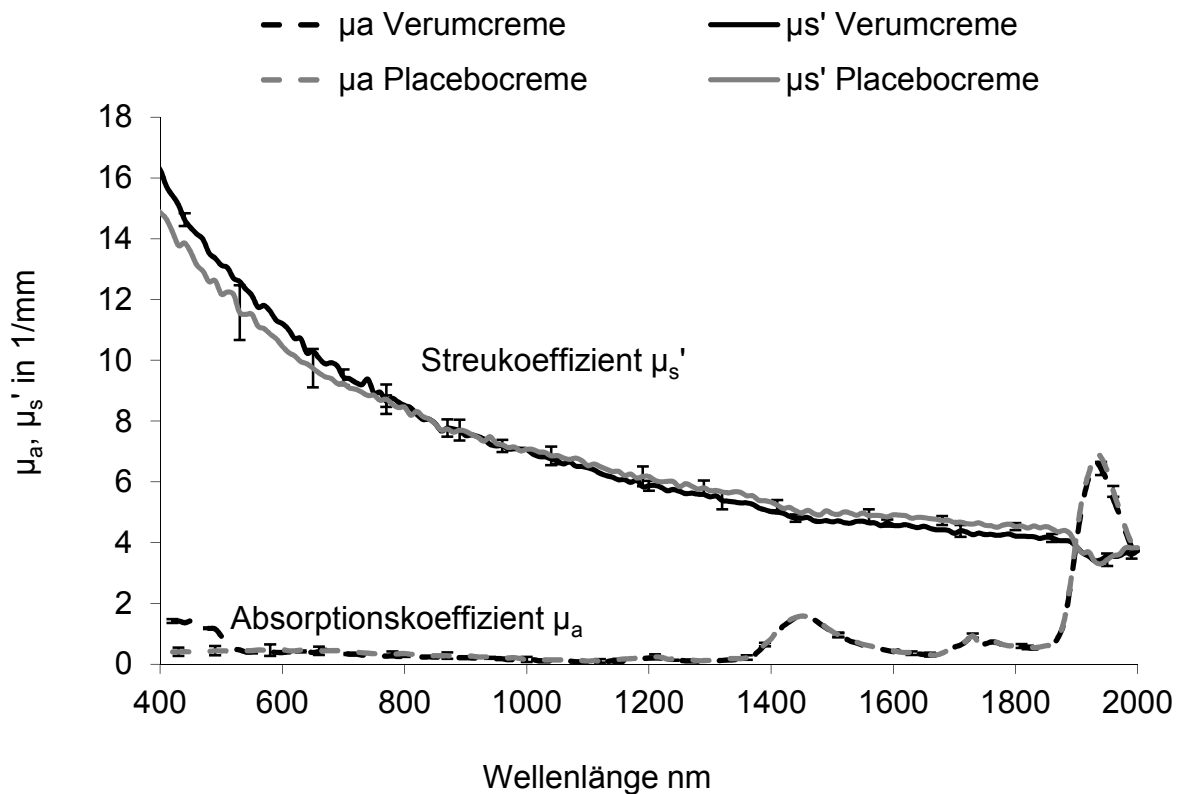


Abbildung 26 Vergleich der Streu- (μ_s') und Absorptionskoeffizienten (μ_a) der Placebo- und Verumcreme zwischen 400-2000 nm, dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung, n= 3

Weiterhin wurden die Streu- und Absorptionseigenschaften der Cremes nach einstündiger Einwirkzeit auf 200 μ m dicker Spalthaut untersucht. Bei dieser Methode konnten keine Unterschiede zwischen Verum-, Placebocreme und unbehandelter Haut festgestellt werden. Vermutlich ist dies durch die nur sehr dünne Cremeschicht im Vergleich zur Hautdicke bedingt, sodass die optischen Eigenschaften der Creme auf der Haut mittels der verwendeten Messmethode nicht ausreichend quantifiziert werden können. Verglichen mit den Ergebnissen der Untersuchung der reinen Cremes liegen die Streueigenschaften deutlich im niedrigeren Bereich, jedoch noch höher als der Absorptionskoeffizient des entsprechenden Wellenlängenbereiches mit Ausnahme der vorbeschriebenen Wasserabsorptionsbanden (Abbildung 27).

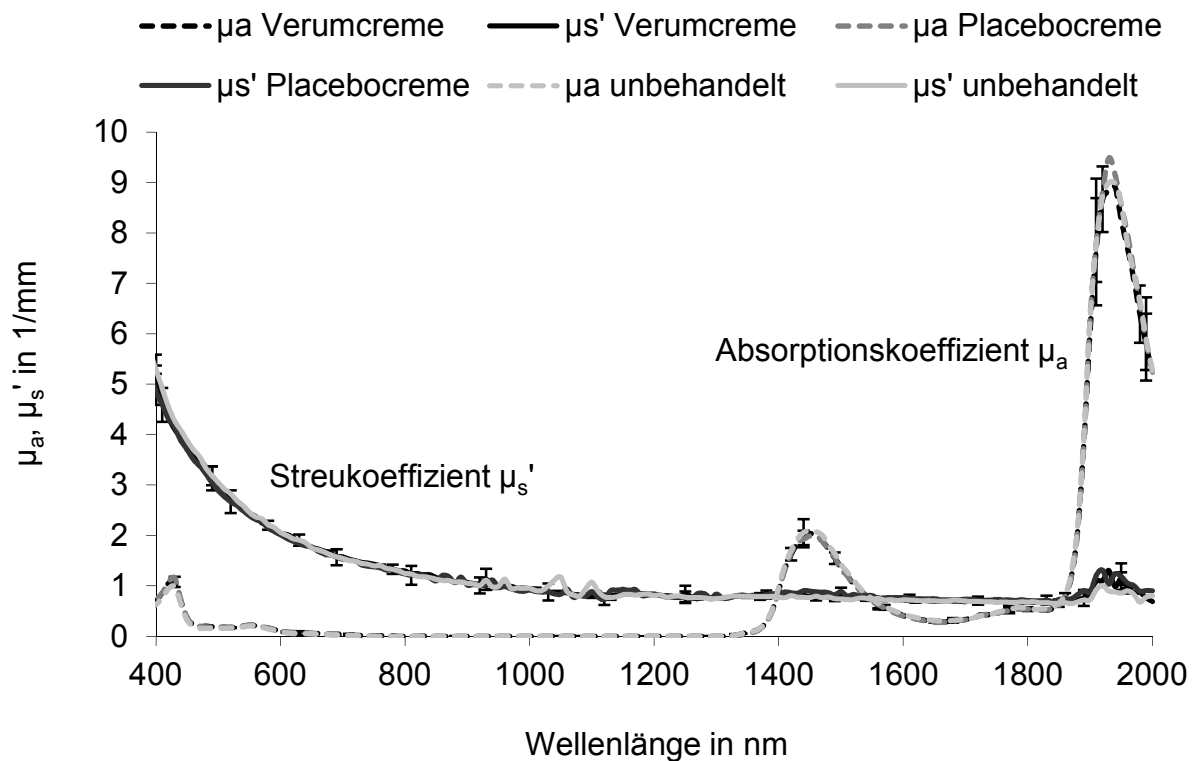


Abbildung 27 Vergleich der Streu- (μ_s') und Absorptionskoeffizienten (μ_a) porciner Spalthaut mit Placebo-, Verumcreme und ohne Creme zwischen 400-2000 nm, dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=3

3.5. Lipide

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die topische Applikation einer Verum- und Placebocreme nach 1 Stunde Einwirkzeit bzw. vierwöchiger Langzeitapplikation und die zusätzliche Bestrahlung im VIS-/NIR-Bereich einen Effekt auf die extrazellulären Lipide der menschlichen Haut haben. Die Trennung und Quantifizierung der einzelnen Hautlipide aus den zuvor hergestellten Lipidextrakten wurde mittels HPTLC von Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg durchgeführt. Die Zuordnung der einzelnen Lipide auf den HPTLC-Platten erfolgte im Vergleich zu den entsprechenden Banden einer Standardlösung. Bei der Analyse der Placebo- und Verumcremeextrakte zeigte sich, dass sowohl die Verum- als auch die Placebocreme viele verschiedene Lipide enthalten und diese der Lipidzusammensetzung der humanen Haut sehr ähnlich sind, wie in Abbildung 28 ersichtlich ist.

(1) (2) (3) (4) (5)

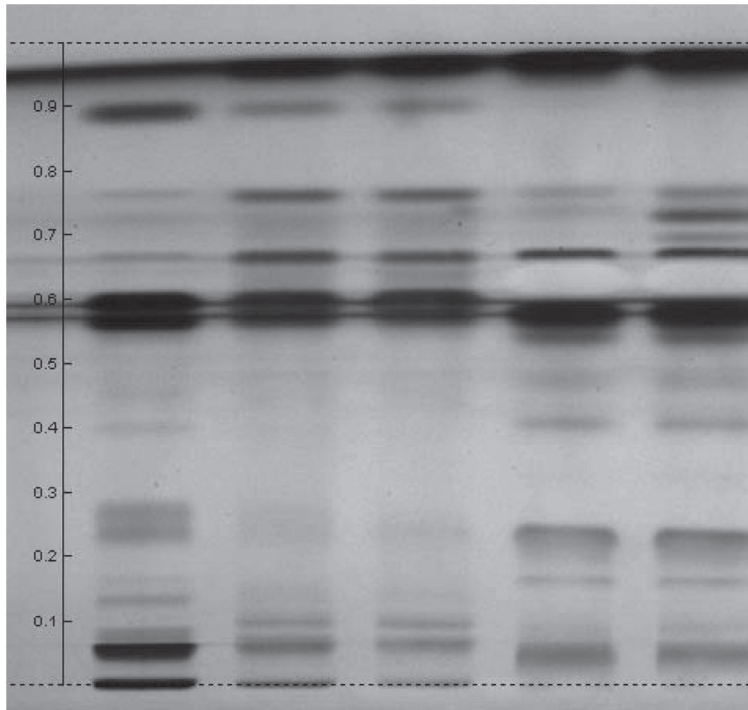


Abbildung 28 HPTLC-Platte nach der Derivatisierung, (1) Standardlipidlösung, (2, 3) Hautlipidextrakt, (4) Placebocremeextrakt, (5) Verumcremeextrakt (Haag et al. 2014: 227-233)

Aufgrund dessen fiel eine Unterscheidung der Lipidherkunft vor allem in Visite 1 nach kurz zuvor erfolgter Cremeapplikation schwer. Eindeutig von den Cremelipiden zu unterscheiden sind die Banden von Lecithin/ Sphingomyelin, Ceramid [AP], Ceramid [NP1], Ceramid [NP2] und Squalen.

Vergleicht man die Lipidkonzentration der humanen Haut vor der VIS-/NIR-Bestrahlung mit den Werten nach der VIS-/NIR-Bestrahlung, so fällt auf, dass in Visite 1 keine signifikanten Unterschiede bestehen (Abbildung 29). Die Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon Test anhand der Mittelwerte der absoluten Lipidkonzentrationen. Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse in Abbildung 29 und Abbildung 30 auf die unbestrahlten Messergebnisse normiert dargestellt. Lipidarten, bei denen die Probenanzahl $n < 6$ aufgrund von nicht auswertbaren Proben wegen einer Lipidkonzentration außerhalb der Kalibrierung beträgt, wurden nicht statistisch ausgewertet.

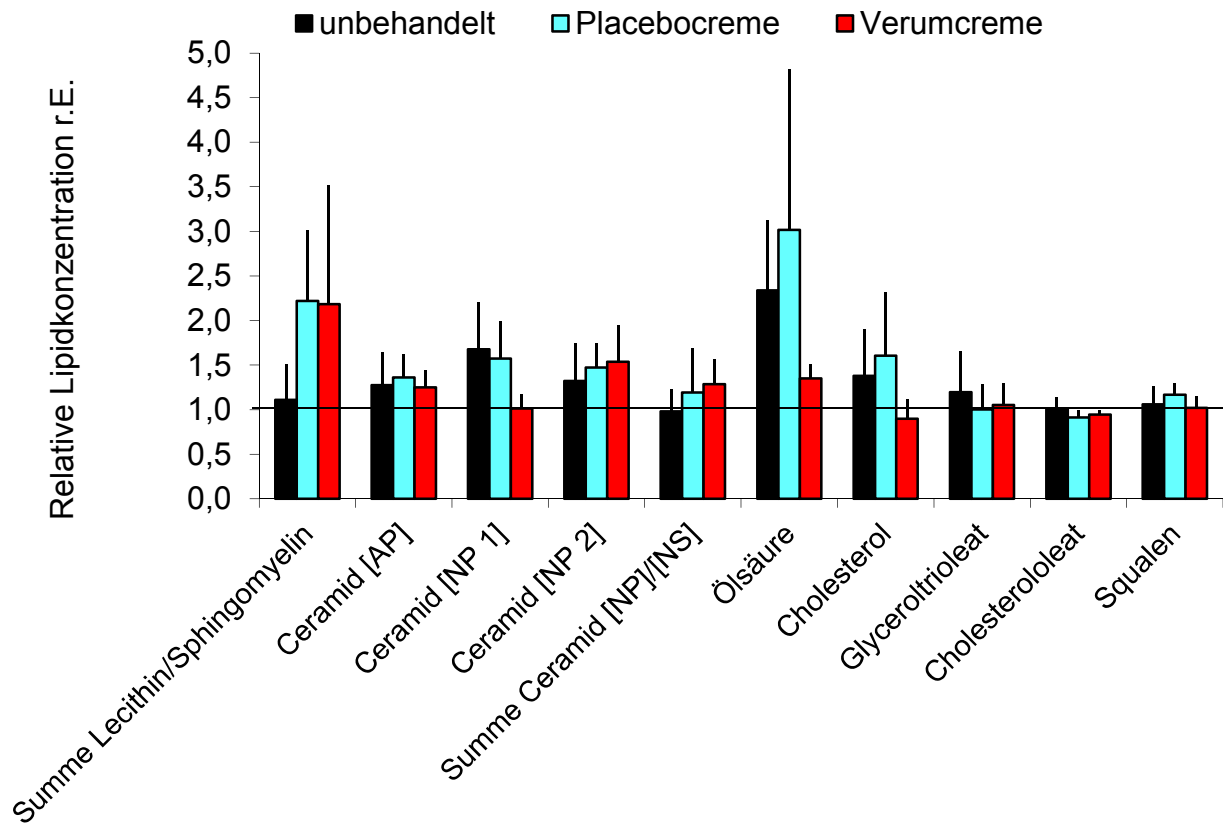


Abbildung 29 Relative Lipidkonzentration in Visite 1 nach der Bestrahlung, bezogen auf die Werte ohne Bestrahlung, dargestellt als Mittelwerte \pm mittlerer Standardfehler (n= 6 mit Ausnahme von: Lecithin/Sphingomyelin: unbehandelt n=4, Verumcreme n=5; [NP]/[NS]: Placebo- und Verumcreme n=2; Glyceroltrioleat: unbehandelt und Verumcreme n=5)

Bezüglich der Lipidextrakte aus Visite 2 waren teilweise signifikante Unterschiede in der extrahierten Lipidkonzentration zwischen den Proben vor der Bestrahlung und den Proben nach der Bestrahlung nachweisbar. Entsprechende signifikante Unterschiede ergaben sich für: Lecithin/Sphingomyelin und Ölsäure an unbehandelter Haut sowie für Ceramid [NP1], Ceramid [NP2] und Ceramid [NP]/ Ceramid [NS] an mit Verumcreme behandelter Haut und für Ceramid [NP2] auch an mit Placebocreame behandelten Arealen. Ein Trend zeigte sich bei Ceramid [NP]/ Ceramid [NS] in den Placebocreamebeproben (Abbildung 30).

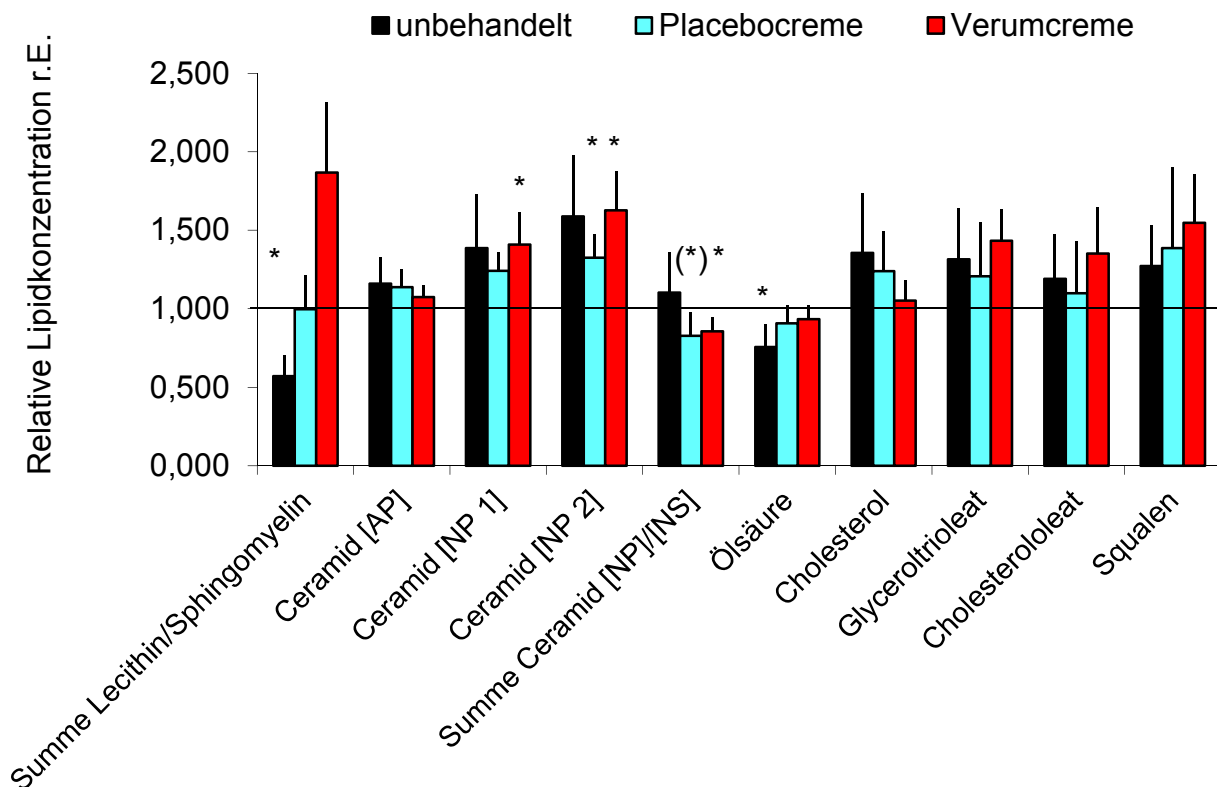


Abbildung 30 Relative Lipidkonzentration in Visite 2 nach der Bestrahlung, bezogen auf die Werte ohne Bestrahlung, dargestellt als Mittelwerte \pm mittlerer Standardfehler (n= 11 mit Ausnahme von: Lecithin/Sphingomyelin: unbehandelt n= 8, Verum n= 10, Placebo n= 8; Ölsäure: unbehandelt und Verum n= 9, Placebo n= 7); statistische Auswertung der absoluten Lipidkonzentrationen vor und nach Bestrahlung (nicht abgebildet), * p< 0,05, (*) p< 0,10.

Beim Vergleich der Lipidkonzentrationen zwischen den unterschiedlich behandelten Hautarealen bestehen sowohl in den Messungen in Visite 1 als auch in Visite 2 nur vereinzelt signifikante Unterschiede. Für die Signifikanzberechnung anhand der absoluten Mittelwerte der Lipidkonzentrationen fand der Wilcoxon Test Anwendung. Dargestellt wurden jedoch auch hier zur besseren Übersicht die jeweiligen Mittelwerte der Lipidkonzentration der unterschiedlich behandelten Hautareale, die auf die Werte der unbehandelten Haut normiert wurden (Abbildung 31 und Abbildung 32).

In der Visite 1 ließen sich signifikante Unterschiede der Lipidkonzentration zwischen der unbehandelten und mit Placebocreme behandelten Haut bei Squalen, einer Vorstufe von Cholesterin sowie bei Ceramid [AP], Ceramid [NP1] und Cholesteroleoleat ermitteln. In den Proben der unbehandelten und der mit Verumcreme behandelten Haut zeigten sich

bei Squalen, Lecithin/ Sphingomyelin und Cholesteroleat signifikante Unterschiede und ein Trend des Unterschieds bei Ceramid [AP] (Abbildung 31).

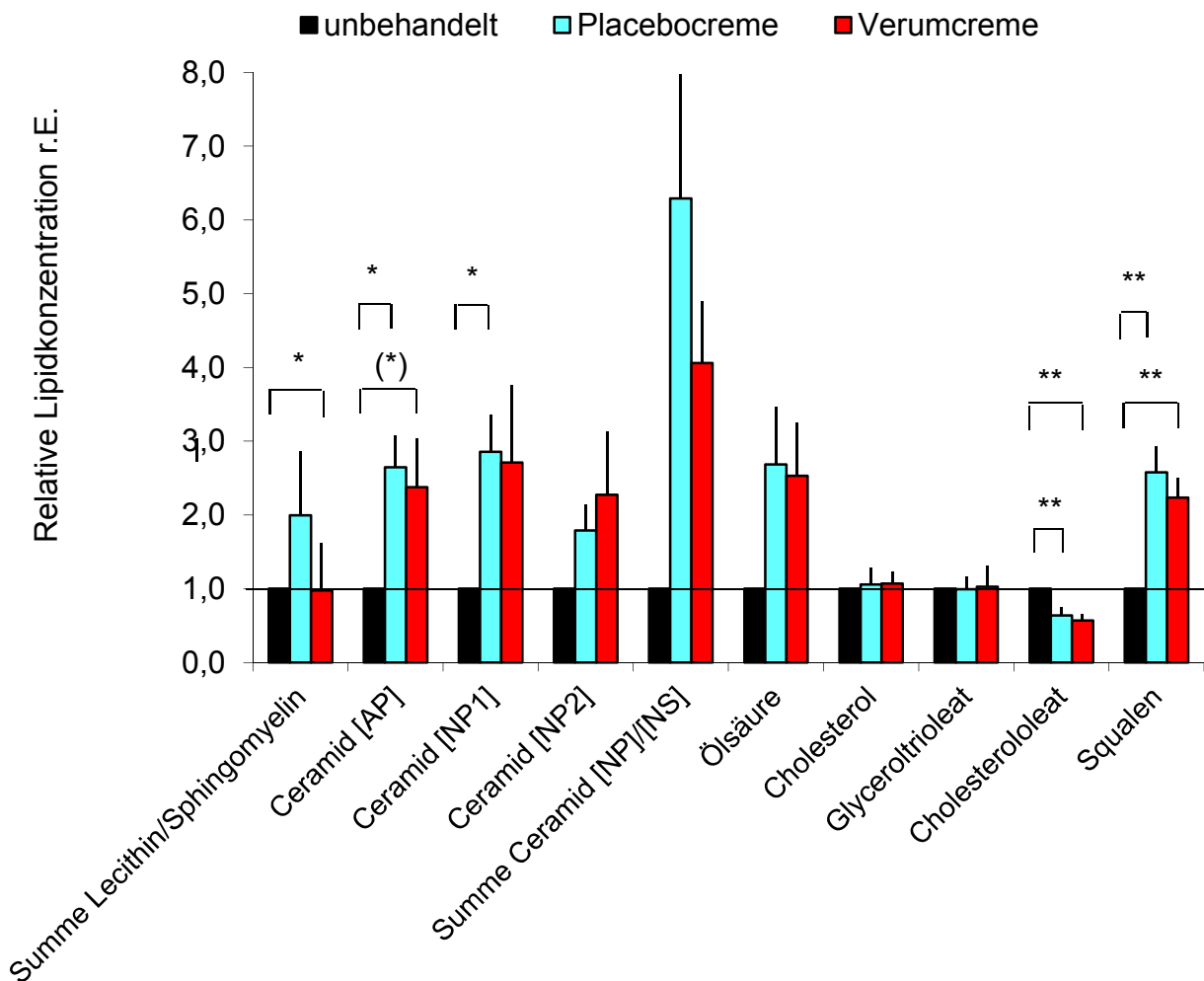


Abbildung 31 Relative Lipidkonzentration Visite 1 ohne Bestrahlung, normiert auf die Werte ohne Behandlung, dargestellt als Mittelwerte \pm mittlerer Standardfehler (n=11, mit Ausnahme von: Lecithin/Sphingomyelin: n=7; Ceramid [NP]/[NS]: Verum n=5, Placebo n=6; Ölsäure: n=10), statistische Auswertung erfolgte anhand der Werte der absoluten Lipidkonzentrationen (nicht abgebildet), ** p< 0,01,* p< 0,05, (*) p< 0,10.

Zwischen den Arealen, die mit Verum- und Placebocreme behandelt wurden, konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Da in Visite 1 jedoch nur kurze Zeit vor der Lipidextraktion die Cremeformulierung aufgetragen wurde und da die Cholesteroleat-Banden auf der HPTLC-Platte nicht eindeutig zwischen der Creme und der humanen Haut zu unterscheiden waren, ist dieses Ergebnis nur eingeschränkt aussagekräftig.

Bei der Auswertung der in Visite 2 ermittelten Lipidgehalte konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben der unbehandelten Haut, mit Verumcreme behandelten Haut und mit Placebocreme behandelten Arealen gefunden werden. Es zeigte sich lediglich ein Trend des Unterschieds in der Konzentration des Ceramids [NP2] zwischen der Proben nach Placebocreme- und Verumcreme-Anwendung (Abbildung 32).

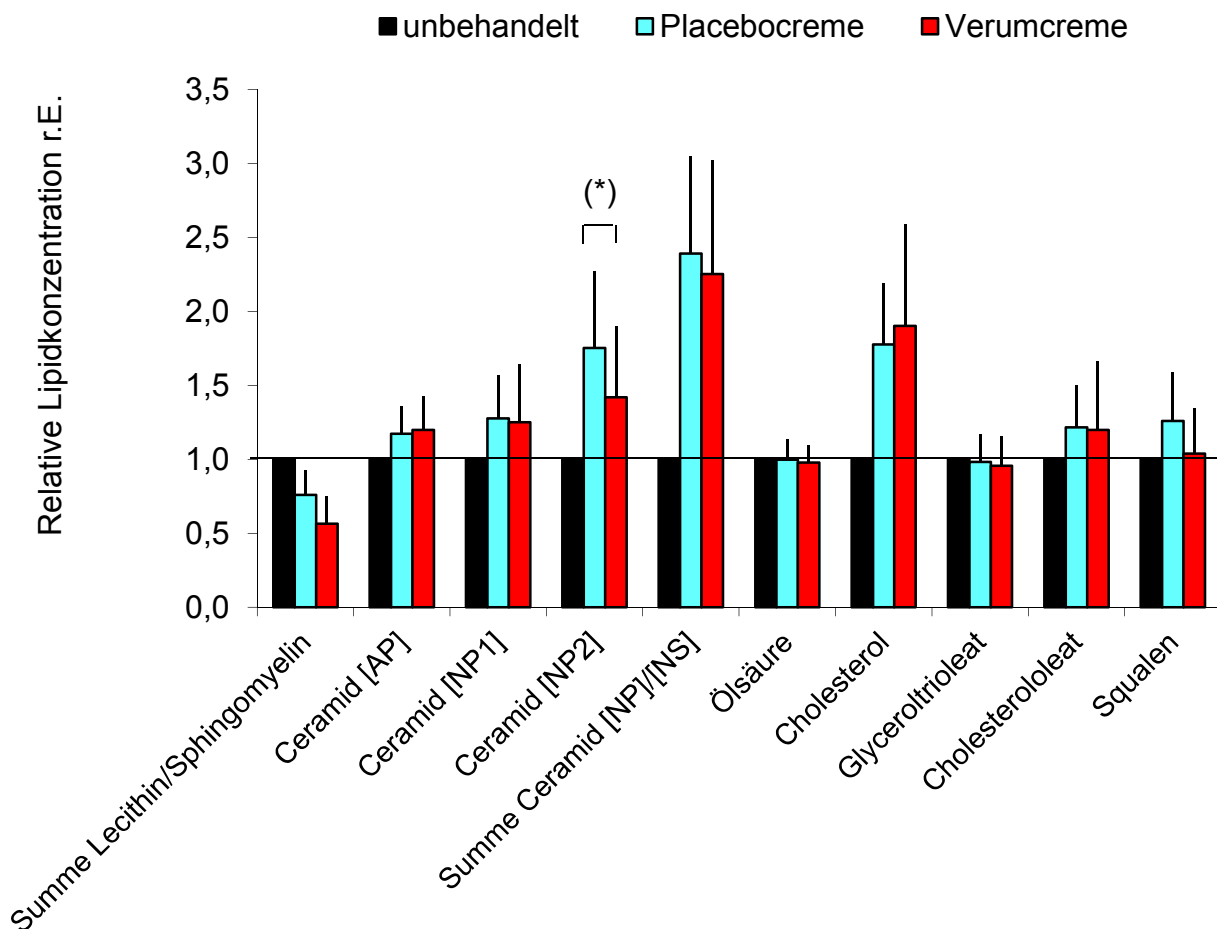


Abbildung 32 Relative Lipidkonzentration Visite 2 ohne Bestrahlung, normiert auf die Werte ohne Behandlung, dargestellt als Mittelwerte \pm mittlerer Standardfehler (n=11 mit Ausnahme von: Lecithin/Sphingomyelin: n=8; Ölsäure: unbehandelt, Verum n=10, Placebo n=8), statistische Auswertung erfolgte anhand der Werte der absoluten Lipidkonzentrationen (nicht abgebildet) (*) $p < 0,10$.

Bei der Gegenüberstellung der Mittelwerte der absoluten Lipidgehalte in Visite 1 und 2 wurden nur die Lipide untersucht, deren Banden auf den HPTLC-Platten zwischen den unterschiedlichen Extrakten sicher zu unterscheiden waren (siehe oben). Hierbei konnten

mittels Wilcoxon Test für fast alle untersuchten Lipidarten signifikant höhere Konzentrationen in der mit Verum- bzw. Placebocreme behandelten Haut in Visite 1, verglichen mit Visite 2, bestimmt werden. Bei den Lipiden Lecithin/ Sphingomyelin wurde nur ein Trend des Unterschieds der Lipidkonzentration zwischen Visite 1 und Visite 2 errechnet.

Auch die Lipidgehalte der unbehandelten Haut zeigten signifikant höhere Konzentrationswerte in Visite 1 für Ceramid [NP2] sowie einen Trend bei Lecithin/ Sphingomyelin und Ceramid [AP]. Die graphische Darstellung ist in Abbildung 33 ersichtlich.

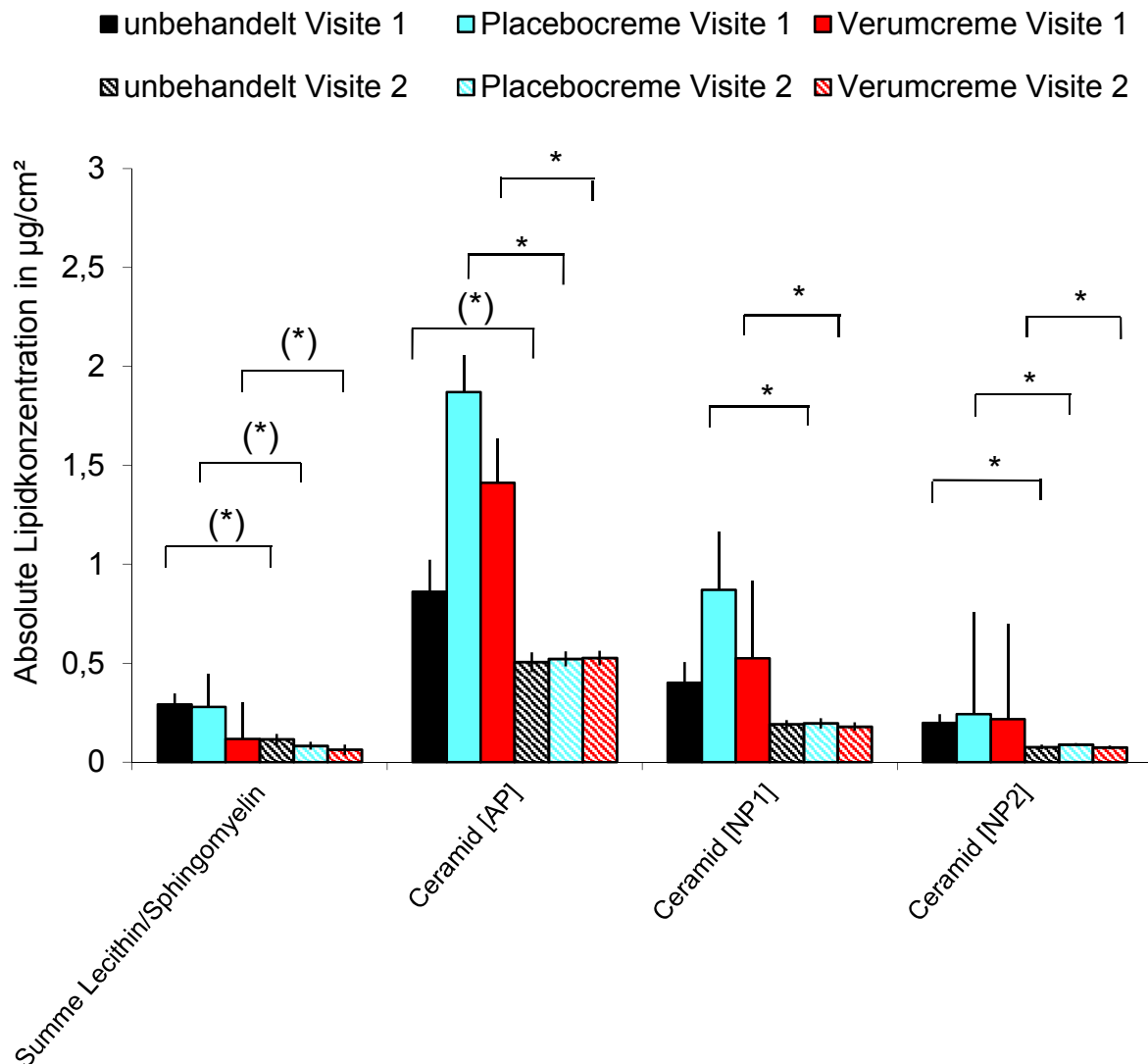


Abbildung 33 Absolute Lipidkonzentration Visite 1 und 2, dargestellt als Mittelwerte \pm mittlerer Standardfehler (n=11, mit Ausnahme von Lecithin/Sphingomyelin: Visite 1 unbehandelt und Verum, Visite 2 Verum und Placebo je =10, Visite 2 unbehandelt n=9)

4. Diskussion

4.1. Bildung freier Radikale in der Haut unter Stressinduktion durch VIS-/NIR-Bestrahlung und antioxidative Wirkung der 1,5% hyperforinhaltigen Testcreme

4.1.1. Bildung freier Radikale in der Haut unter VIS-/NIR-Bestrahlung ohne topische Applikationen

Ein Element dieser Studie ist die nicht-invasive Untersuchung der Auswirkung der VIS-/NIR-Bestrahlung auf die kutane Radikalbildung am *in vivo* und *ex vivo* Hautmodell mit Hilfe des ESR-Spektrometers.

Das sichtbare und infrarote Licht zusammen machen den Großteil der Gesamtbestrahlung durch das Sonnenlicht aus (Kochevar 1999: 220-229) und führen wie auch das UV-Licht zur Bildung von freien Radikalen (Zastrow et al. 2009: 31-44, Albrecht et al. 2016: 44-54, Lohan et al. 2016: 380-385). Dennoch ist die photobiologische Wirkung von VIS-/NIR-Strahlung im Vergleich zur UV-Strahlung bislang nur geringfügig erforscht.

Akhalaya et al. zeigten in Ihrer Übersichtsarbeit, dass Infrarot-Strahlung eine multidirektionale Wirkung auf die menschliche Haut in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis haben kann, sowohl eine therapeutische Wirkung als auch eine pathogene. Beide Wirkungsbereiche liegen einem unterschiedlichen Signalübertragungsweg zugrunde. Der therapeutische Wirkungsbereich liege im Niedrigdosisbereich (1-10 J/cm²) (Akhalaya et al. 2014: 1-11) und somit deutlich unter der durchschnittlichen IR-Exposition in der mittleren Breite von 75 J/cm²/h (Sommerzeit, München) (Schieke et al. 2003: 228-234). Pathogene Effekte würden bei einer IR-Bestrahlungs-Dosis >120 J/cm² auftreten (Akhalaya et al. 2014: 1-11).

Die in dieser Studie verwendete VIS-/NIR-Bestrahlungs-Dosis von 72 J/cm² (120 mW/cm² Bestrahlungsintensität) liegt demnach unterhalb der pathogenen IR-Bestrahlungs-Dosis. Die maximale IR-Bestrahlungsintensität durch Sonnenlicht beträgt in der mittleren Breite 200-250 W/m² zur Mittagszeit im Sommer. In den Tropen wurde ein Maximum von 350 W/m² gemessen (Piazena et al. 2010: 687-705).

Die Intensität der Sonnenlichtstrahlung im VIS-Bereich betrage 50 mW/cm² (Liebel et al. 2012; 1901-1907). Detailliertere entsprechende Angaben zur VIS-Bestrahlungsintensität wurden im Rahmen der Literaturrecherche nicht gefunden.

In einer vor kurzem veröffentlichten Studie von Lohan et al. zur Messung der Radikalbildung in unterschiedlichen Spektralbereichen mit Hilfe des ESR-Spektrometers

zeigte sich im *in vivo* Versuch an 33 Probanden unter VIS-Bestrahlung eine höhere Radikalbildung als unter NIR-Bestrahlung (Lohan et al. 2016: 380-385).

In der Haut reagieren die dermalen Fibroblasten am sensitivsten auf IR-Bestrahlung. Eine Beteiligung der Keratinozyten sei möglich, jedoch seien diese Zellen stabiler, u.a. aufgrund des höheren Antioxidantiengehalts (Akhalaya et al. 2014: 1-11, Applegate et al. 1995: 95-101, Hornig-Do et al. 2007: 1084-1093, Vermeij et al. 2011: 1435-41).

Ex vivo, *in vitro* und wenige *in vivo* Studien zeigten, dass die IR-Strahlung (Darvin et al. 2010a: 40-46, Darvin et al. 2010b: 629-631, Kim et al. 2006: 875-882) bzw. VIS-/NIR-Strahlung (Zastrow et al. 2009: 31-44, Cho et al. 2008: 123-133) sowohl indirekt durch eine Temperaturerhöhung der Haut, die durch den Infrarotstrahlenanteil evoziert wird, als auch in direkter Wirkungsweise zur Bildung von freien Radikalen führen kann (Darvin et al. 2010a: 40-46, Darvin et al. 2010b: 629-631, Zastrow et al. 2009: 31-44) bzw. zur Steigerung der Expression der proteolytischen Enzyme Matrixmetalloproteinase MMP-1 und MMP-9 sowie zur Reduktion der Procollagen-1-Expression (Cho et al. 2008: 123-133; Kim et al. 2006: 875-882). Allerdings variieren die Studienergebnisse in der Literatur dahingehend, ob und in welchem Maße die direkte Strahlenwirkung oder die IR-induzierte Hitzewirkung die Ursache der Radikalbildung durch (nahe) Infrarotbestrahlung darstellen. Piazena et al. untersuchten die Auswirkung von isolierter wassergefilterter IR-Bestrahlung (780-1400nm, 190mW/cm² für 30min) und hohen Temperaturen (bis 45°C) u.a. auf die Bildung freier Radikale und das antioxidative Potential im *ex vivo* Versuchsmodell am perfundierten Kuheuter. Dabei zeigte sich, dass die Radikalbildung eher temperaturindiziert als nicht-thermal durch die wIR-Strahlung bedingt sei. Für diese Studie wurde jedoch nur 1 Euter verwendet. Außerdem wurde die Zieltemperatur der beiden Versuchsreihen mit bzw. ohne wIR-Bestrahlung zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht (Piazena et al. 2014: 347-354), sodass die Beurteilbarkeit und Vergleichbarkeit der Daten eingeschränkt ist.

Eine Entwicklung einer zuverlässigen Methodik zur Messung der nicht-thermalen IR-Wirkung scheint jedoch schwierig zu sein, wie die Studie von Jung et al. zeigt, in der ein Luft- und Wasserkühlungs-Setup für wassergefilterte IRA-Strahlung bis 300W/cm² an Säugetierzellkulturen getestet wurde (Jung et al. 2012: 371-380).

Die physiologische Hautoberflächentemperatur im lebenden humanen Organismus liegt bei 27,6-33,1°C, am volaren Unterarm zwischen 31°C und 32°C (Kleesz et al. 2012: 25-33). Unter direkter IR-Bestrahlung kann die humane Hauttemperatur auf >40°C steigen (Lee et al. 2006: 148-152, Zastrow et al. 2009: 31-44).

Mit steigender IR-Bestrahlungsintensität wurde in der *in vivo* Studie von Lee et al. und in der *ex vivo* Studie von Zastrow et al. auch ein höherer Temperaturanstieg gemessen (Lee et al. 2006: 148-152, Zastrow et al. 2009: 31-44). Allerdings betrug die IR-Bestrahlungsintensität bei Lee et al. 1,71-3,22 W/cm² und ist damit deutlich höher als die in dieser Studie verwendete VIS-/NIR-Bestrahlungsintensität von 120mW/cm². Zastrow et al. hingegen verwendeten eine geringere IR-Intensität von 40-80 mW/cm². In der Studie von Zastrow et al. führten sowohl eine Erhöhung der Temperatur bis 45°C als auch eine Erhöhung der NIR-Bestrahlungsdosis zum Anstieg der Bildung freier Radikale (Zastrow et al. 2009: 31-44).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit blieb die Bestrahlungsintensität konstant bei 120 mW/cm². Die Temperaturveränderung unter VIS-/NIR-Einfluss wurde nur an exzidierte SWO-Haut gemessen und nicht während der *in vivo* Messungen. Die Ausgangstemperatur der Hautproben direkt vor der ESR-Messung lag bei durchschnittlich 24,3 ± 2,6°C, also unter der durchschnittlichen Hautoberflächentemperatur am menschlichen Oberarm. Nach den Ergebnissen der Studie von Albrecht et al., die ebenfalls an exzidierte porciner Haut durchgeführt wurde, hat die Inkubationstemperatur im Bereich zwischen 22-37°C allerdings keinen signifikanten Einfluss auf die im ESR-Spektrometer gemessene Radikalbildung unter *in situ* VIS-/NIR- und UV-Bestrahlung (Albrecht et al. 2016: 44-54).

Nach VIS-/NIR-Bestrahlung kam es in der hiesigen Studie nur zu einer geringen Temperaturerhöhung, die an den eingecremten Hautproben etwas höher war (Probe mit Placebocreme: durchschnittlich 1,6 ± 0,6°C Temperaturerhöhung, Probe mit Verumcreme: durchschnittlich 1,5 ± 0,7°C Temperaturerhöhung) als an den unbehandelten Hautproben (durchschnittlich 1,4 ± 1,1°C Temperaturerhöhung).

Zastrow et al. zeigten, dass die Radikalgenerierung *ex vivo* in humaner Haut wie die Fieberkurve im menschlichen Körper verläuft (Zastrow et al. 2009: 31-44). Bei 37°C kam es zu einer Zunahme der Radikalbildung mit steilem Anstieg bis 41°C und Stagnation ab circa 43°C. Daraus schlussfolgerten sie, dass Enzyme oder enzymgesteuerte Photochrome (Hong et al. 1998: 1293–1298) für die Bildung von ROS verantwortlich seien und die Plateaubildung bei 43°C durch den strukturellen Wirksamkeitsverlust der Enzyme und Proteine durch Denaturierung erklärt werden kann (Zastrow et al. 2009: 31-44). Dass Enzyme am Entstehungsprozess freier Radikale beteiligt sind, ist bekannt (Dröge et al. 2002: 47-95).

Sowohl bei den *in vivo* als auch *ex vivo* Messungen dieser Studie zeigte sich in den unbehandelten Hautproben nach VIS-/NIR-Bestrahlung im Vergleich zur unbestrahlten Haut eine deutliche Abnahme der ESR-Signalintensität, die mit der Bildung freier Radikale korreliert. Die kummulative Radikalbildung unter VIS-/NIR-Bestrahlung war in den *in vivo* Messungen in den ersten beiden Messminuten am höchsten (siehe Abbildung 17, Abbildung 21). Diese nahm nach 2 Minuten kontinuierlich ab, sodass nach 10-12 Minuten nur noch eine sehr geringe Radikalbildung zu messen war. Bei den *ex vivo* Messungen ist der Anstieg der Radikalbildung nahezu linear. Hierauf soll im unten genannten Absatz 4.1.4 näher eingegangen werden.

Ein Methodikdefizit dieser Studie liegt in der fehlenden Temperaturkontrolle bei der *in vivo* Messung. Daher ist fraglich, ob während der VIS-/NIR-Bestrahlung eine durch hohe Temperaturen $>40^{\circ}\text{C}$ evozierte Denaturierung von Enzymen bzw. Proteinen stattgefunden hat, die zum einen Einfluss auf die Bildung freier Radikale haben (Zastrow et al. 2009: 31-44) und zum anderen Teil des antioxidativen Systems sind.

Ein weiterer Kritikpunkt ist die *in vivo* Verwendung dünner Glasobjektträger zwischen der Haut und der ESR-Leiterschleife, die bei den *ex vivo* Messungen nicht erfolgte. Es ist daher möglich, dass bei den *in vivo* Messungen durch vorzeitige Reflexion am Glasobjektträger weniger VIS-/NIR-Strahlung auf die Haut gelangt ist und folglich eine geringere Radikalmenge gebildet wurde. Daher sollte in gegebenenfalls nachfolgenden Untersuchungen die *in vivo* und *ex vivo* Messmethodik entsprechend angepasst werden.

4.1.2. Radikalschutzwirkung *in vivo* nach einmaliger Cremeapplikation und optische Eigenschaften der Cremes

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die radikalprotektive Wirkung einer hyperforinreichen Creme im Vergleich zur Placebocreme und zur unbehandelten Haut unter VIS-/NIR-Strahlung *in vivo* und *ex vivo* am ESR-Spektrometer untersucht.

In vivo ließ sich sowohl ein radikalschützender Kurzzeit- als auch Langzeiteffekt der Verumcreme nachweisen.

Eine Stunde nach einmaliger Cremeapplikation war unter VIS-/NIR-Bestrahlung der Hautproben nur eine sehr niedrige Radikalbildung sowohl in den mit hyperforinhaltiger Creme als auch mit Placebocreme behandelten Hautarealen messbar, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Cremearten.

Die Placebo- und Verumcreme unterscheiden sich nicht hinsichtlich der Streuungs- und Absorptionseigenschaften. Als Messproben dienten hierbei sowohl die reinen Testcremes als auch die auf Spalthaut aufgetragenen Cremes. Da die Streuung bzw. Absorption hauptsächlich in den obersten Zellschichten des SC stattfindet, waren die Spalthautproben vermutlich zu dick, sodass die optischen Eigenschaften auf der Haut eventuell nur eingeschränkt messbar waren. Es gelang jedoch nicht, dünnere Spalthautproben $<200\mu\text{m}$ mittels eines Dermatoms herzustellen, ohne dabei die Spalthautlappen zu zerreißen. Eine Optimierung der Methodik diesbezüglich wäre in Zukunft erstrebenswert.

Im Vergleich zu Sonnencremes, deren radikalprotektive Eigenschaften im IR-Bereich in einer früheren Studie getestet wurden und bei denen eine hohe Lichtstreuung erwünscht ist (Meinke et al. 2011: 452-456), ist der Streukoeffizient μ_s' der hiesigen Testformulierungen nur etwas niedriger.

Es liegt daher die Vermutung nahe, dass nach einer Stunde Cremeeinwirkzeit noch eine oberflächliche Cremeschicht auf der Haut verblieben ist. Somit wäre die sehr gute Sofortschutzwirkung der Placebo- und hyperforinreichen Creme nach einstündiger Einwirkzeit am ehesten durch die hohe Streueigenschaft der Cremes zu erklären.

Der Wirkstoff Hyperforin in der Verumcreme scheint daher nach Einmalapplikation keinen messbaren Einfluss auf die Radikalschutzwirkung unter Stressinduktion durch VIS-/NIR-Bestrahlung zu haben.

Auffallend ist bei den Messungen nach 5 bzw. 14 Stunden Cremeeinwirkzeit, dass hinsichtlich der Menge der kumulativen Radikalbildung sowohl zwischen den Messarealen der mit Verum- bzw. Placeocreme behandelten Haut als auch im Vergleich zur unbehandelten Haut kein deutlicher Unterschied messbar war.

Dies kann zum einen durch eine vollständige Penetration der Creme in die Haut nach 5 bzw. 14 Stunden Einwirkzeit begründet sein. Zum anderen erfolgte die Ethanol-Hautreinigung, die zum besseren Einwirken des ESR-Markers diente, hierbei erst nach der Cremeapplikation, sodass verbliebene Cremerückstände vor der ESR-Messung entfernt wurden. Diese Hautreinigung wurde bei dem Messversuch nach einstündiger Cremepenetration (Visite 1) bereits vor der Cremeapplikation durchgeführt, sodass eventuelle Cremerückstände während der ESR-Messung auf der Haut erhalten blieben. Anzumerken ist, dass aufgrund der geringen Probandenzahl ($n=3$) keine statistische Datenauswertung der ESR-Messungen nach 5 bzw. 14 Stunden Cremeeinwirkzeit durchgeführt wurde, sodass diese Ergebnisse eingeschränkt beurteilbar sind.

4.1.3. *In vivo* Langzeitwirkung der applizierten Testcremes auf den Radikalschutz

Die Methodik des selbstständigen Eincremens eines umschriebenen Hautareals über einen Zeitraum von 4 Wochen wurde für die Untersuchung der radikalprotektiven Wirkung der hyperforinreichen Creme zum einen gewählt, um eine alltägliche individuelle Creme-Anwendung zu simulieren. Zum anderen wäre eine permanente Hautmarkierung über 4 Wochen in der Sommerzeit zum Auftragen abgewogener Crememengen schwer durchzuführen gewesen. Die Probanden wurden zum Versuchsbeginn dazu angehalten, die Testcremes gleichmäßig und bezüglich der Dosierung wie eine gewöhnliche Hautcreme aufzutragen. Dadurch entstanden jedoch deutliche Differenzen in der verwendeten Crememenge. Zum einen war das einzucremende Placeboareal um ein Drittel kleiner als das Verumareal (siehe Abbildung 9) und die Größe der Probandenarme unterschiedlich. Zum anderen wiesen die Cremes eine leicht unterschiedliche Konsistenz auf, sodass dies auch eine Ursache des geringeren Verbrauchs an Placebocreme im Vergleich zur Verumcreme sein kann.

Um optische Einflüsse der Creme zu vermeiden und die Cremewirkung nach einer gewissen Cremekarenz zu messen, erfolgte die Messung erst durchschnittlich 8,5 Stunden nach dem letzten Eincremen.

Es besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den Messergebnissen nach der Langzeitanwendung der Testcremes (Visite 2) und nach einmaliger Cremeapplikation. Vergleichbar mit Visite 1 wurde auch nach der vierwöchigen Cremeanwendung sowohl auf den mit Verum- als auch mit Placebocreme behandelten Hautarealen eine signifikant geringere Radikalgenerierung im Vergleich zur unbehandelten Haut gemessen. Die kummulative Radikalbildung war in den Cremearealen jedoch nach Langzeitanwendung der Cremes etwas höher als nach der einstündigen Cremeapplikation, was möglicherweise durch die fehlende Streuungswirkung der Cremes zu begründen ist. Unter Verumlangzeitbehandlung zeigte sich ein signifikant höherer Hautradikalschutz als auf den mit Placebocreme behandelten Arealen. Dies ist am ehesten durch den Inhaltsstoff Hyperforin zu erklären, bei dem bereits in einer früheren Studie antioxidative Eigenschaften im UV- und IR-Strahlenbereich nachgewiesen wurden. Hierbei wurde ein *in vivo* UV-Erythematest sowie *in vitro* ESR-Messungen unter externer IR-Bestrahlung angewendet (Meinke et al. 2012: 346-350). Meinke et al. zeigten weiterhin, dass die hyperforinhaltige Verumtestcreme einen Radikalschutzfaktor (RPF) von $425 \cdot 10^{14}$ Radikale/mg] aufweist. Bei der hyperforinfreien Placebocreme, die wie auch die

Verumcreme Panthenol, Tocopherol, Tocopherol Acetate und Allantoin beinhaltet, wurde zwar auch ein Radikalschutzfaktor von $39 \cdot 10^{14}$ Radikale/mg] gemessen, dieser ist jedoch deutlich niedriger als bei der Verumcreme (Meinke et al. 2012: 346-350). Hierdurch ist nachvollziehbar, dass auch durch die Langzeitanwendung der Placebocreme unter Stressinduktion durch VIS-/NIR-Bestrahlung weniger freie Radikale als auf der unbehandelten Haut entstehen.

Aufgrund dieser Messergebnisse kann angenommen werden, dass die hyperforinhaltige Hautcreme bei regelmäßiger Langzeitanwendung (4 Wochen) einen ganz täglichen kutanen Hautschutz bietet. Nach einmaliger Cremeapplikation ist zwar die radikalprotektive Wirkung durch die Verum- und auch Placebocreme sehr hoch (siehe Absatz 3.3.1.1), jedoch ist diese bereits nach 5 Stunden nicht mehr nachweisbar gewesen.

4.1.4. Vergleich der Radikalschutzwirkung der Testcremes *in vivo* und *ex vivo*

Vergleicht man die *in vivo* Messergebnisse aus Visite 2 nach der Cremelangzeitanwendung mit den *ex vivo* Ergebnissen, zeigt sich unter der hyperforinhaltigen Verumcreme in beiden Versuchsmodellen der beste Radikalschutz. Allerdings schützt auch die hyperforinfreie Basiscreme (Placebocreme), die wie bereits o.g. in geringerer Menge auch Antioxidantien beinhaltet, im Vergleich zur unbehandelten Haut sowohl in den *in vivo* als auch *ex vivo* Messungen in geringerem Maße als die hyperforinreiche Creme vor freien Radikalen.

Die beiden Hautmodelle weisen jedoch auch Unterschiede auf.

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, steigt die Radikalbildung in der *in vivo* Messung innerhalb der ersten 2 Messminuten unter Stressinduktion durch VIS-/NIR-Bestrahlung sowohl an der unbehandelten, als auch an der mit Verum- und Placebocreme behandelten Haut steil an mit anschließend zunehmend niedrigerem Anstieg.

Auch in einer kürzlich veröffentlichten Studie von Lohan et al. zur Untersuchung der Radikalproduktion unter UV-, VIS- und NIR-Bestrahlung mittels ESR-Spektrometer zeigte sich in der *in vivo* Messung an 33 Probanden ein ähnlicher Kurvenverlauf der kumulativen Radikalbildung mit Sättigungseffekt nach 2 minütiger Messung in allen gemessenen Spektralregionen (Lohan et al. 2016: 380-385).

Dies führt zu der Annahme, dass *in vivo* durch die initiale Radikalbildung im menschlichen Organismus eine Aktivierung des antioxidativen Netzwerkes erfolgt und die durch die VIS-/NIR-Bestrahlung generierten freien Radikale mit den körpereigenen Antioxidantien reagieren und somit abgebaut werden. Das Hyperforin in der Verumcreme und in geringerem Ausmaß auch die Antioxidantien in der Basiscremeformulierung scheinen mit dem antioxidativen Netzwerk des SC zu interagieren und es zu stabilisieren, sodass die freien Radikale stärker reduziert werden als in der unbehandelten Haut. Dies wurde bereits in einer Teilveröffentlichung dieser Arbeit diskutiert (Haag et al. 2014: 227-233). *Ex vivo* hingegen wurde zwar auch in den ersten 2 Messminuten ein hoher Anstieg der Radikalbildung gemessen, jedoch blieb der Anstieg im Zeitverlauf eher stabil. Bereits in einer vorangegangenen *ex vivo* Studie an Schweineohrhaut von Darwin et al. zeigte sich nach IR-Bestrahlung ebenfalls ein linearer Kurvenverlauf der im L-Band-ESR-Spektrometer gemessenen kumulativen Radikalbildung (Darwin et al. 2010a: 40-46). Weiterhin fällt auf, dass in dieser Arbeit die kumulative Radikalbildung unter VIS-/NIR-Bestrahlung zum gleichen Untersuchungszeitpunkt *in vivo* höher war als *ex vivo*. Lohan et al. führten die *ex vivo* Messungen an exzidiert humaner Haut und Schweineohrhaut mit einer ähnlichen Messmethodik wie in der hiesigen Arbeit mit Hilfe des ESR-Spektrometers durch. Die geringste kumulative Radikalproduktion wurde von Lohan et al. an der exzidierten humanen Haut gemessen (Lohan et al. 2016: 380-385). Eine mögliche Begründung für die geringere Radikalproduktion im *ex vivo* Hautmodell ist u.a. die Reduktion der Enzym- und Zellaktivität nach der Schlachtung und der damit folgenden Unterbrechung der Gewebedurchblutung bzw. der Signaltransduktion. Dadurch ließe sich sowohl eine geringere Radikalproduktion als auch eine Reduktion der antioxidativen Wirkung erklären, da Enzyme bei der Radikalentstehung und im antioxidativen Netzwerk eine entscheidende Rolle spielen (Masaki et al. 2010: 85-90, Schroeder et al. 2008: 2491-2497). Es ist auch möglich, dass der Anteil des nicht zerfallenen PCAs in den *in vivo* Hautmodellen durch die größere Menge an induzierten Radikalen schneller aufgebraucht wird als in den *ex vivo* Proben und daher das ESR-Signal *in vivo* nach 2 Minuten Messungszeit im Gegensatz zu den *ex vivo* Messungen dieser Studie deutlich abfällt. Betrachtet man die relative Radikalproduktion unter Verum- und Placebocreme in Bezug zur Radikalbildung in den unbehandelten Hautarealen, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der *in vivo* und *ex vivo* Messungen. Daher stellt

die *ex vivo* Messung am Schweineohrhautmodell eine gute Alternative zur teilweise aufwändigeren und für die Probanden strapaziösen *in vivo* ESR-Messungen dar.

In den *ex vivo* Messungen ist die mittlere Standardabweichung geringer als *in vivo*. Das kann darin zu begründen sein, dass sich die Lokalisation der *ex vivo* Proben während des gesamten Messdurchgangs ohne und mit VIS-/NIR-Bestrahlung im ESR-Spektrometer nicht geändert hat. Während der *in vivo* Messung hingegen wurden im Falle von unbequemer Sitzposition oder Taubheitsgefühlen des Arms Pausen mit Entfernung des Arms aus der Versuchsanordnung gemacht.

4.2. Lipidextraktion

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Soforteffekt der applizierten Cremes auf die extrazelluläre SC-Lipidkonzentration (Visite 1) sowie die entsprechende Langzeitcremewirkung (Visite 2) untersucht. Außerdem erfolgte die Messung des Einflusses von VIS-/NIR-Bestrahlung auf die extrazelluläre Lipidkonzentration der unbehandelten Haut und der mit den Testcremes vorbehandelten Haut.

In Visite 1 zeigte sich bei der Untersuchung der zunächst nicht bestrahlten Cremehautareale ein schneller Anstieg einiger extrazellulärer SC-Lipidkonzentrationen durch die Cremes. Das kann darin begründet sein, dass die endogene Produktion der extrazellulären Hautlipide durch die Vermischung von endogenen SC-Lipiden mit den exogenen Cremelipiden gesteigert wurde (Man et al. 1996: 1096-1101).

Da in Visite 1 sowohl die Placebo- als auch Verumcreme einen Effekt auf die Lipidkonzentration zeigte (ohne signifikanten Unterschied in den Cremearealen), ist davon auszugehen, dass nach kurzer Einwirkzeit schon die Grundzusammensetzung der Creme ohne den Hyperforin-Zusatz die Lipidkonzentration im SC erhöht und eventuell dadurch die Hautbarriere verbessert, wie bereits in einem veröffentlichten Artikel zu dieser Arbeit diskutiert wurde (Haag et al. 2014: 227-233). Das Ergebnis ist vergleichbar mit der radikalprotektiven Wirkung der beiden Testcremes in Visite 1.

Auf den Hautarealen, die mit der Verumcreme behandelt wurden, zeigt sich jedoch im Vergleich zu den unbehandelten Arealen eine signifikante Erniedrigung von Sphingomyelin, einer Vorstufe der SC-Ceramide, was auf eine gesteigerte Ceramid-Biosynthese hindeuten kann. Da Sphingomyelin in hohen Mengen zu einem höheren kutanen Wasserverlust führt, scheint eine Anpassung des Sphingomyelin-Gehalts in Relation zum kutanen Ceramidgehalt vor der Austrocknung der Haut zu schützen

(Pullmannová et al. 2014: 2115-2126). Ein Zusammenhang bzw. eine Interaktion zwischen Hyperforin und den SC-Lipiden wurde im Rahmen der Literaturrecherche nicht gefunden.

In Visite 2 sind in den unterschiedlich behandelten Hautarealen ohne Stresseinfluss von VIS-/NIR-Bestrahlung keine signifikanten Unterschiede der Lipidmenge zu erkennen. Es zeigt sich lediglich ein Trend zwischen Verum und Placebo bezüglich des Cer [NP2].

Die Ceramidkonzentrationen in den Cremearealen sind erhöht, jedoch nicht signifikant, und der Sphingomyelingehalt ist etwas erniedrigt im Vergleich zu den unbehandelten Hautarealen, was, wie bereits oben erwähnt, durch eine erhöhte Ceramidsynthese unter Cremeeinwirkung bedingt sein kann. Die fehlenden signifikanten Unterschiede können bedeuten, dass die Hautcremes entweder keinen ausreichend messbaren Effekt auf die Lipidzusammensetzung im SC haben, oder dass die Testcremes durch Langzeitanwendung auch die Lipidzusammensetzung in den angrenzenden nicht behandelten Hautarealen beeinflusst haben und somit zu einem Langzeitschutz der Hautbarriere führen.

Weiterhin zeigte sich in Visite 2 ein nicht signifikanter Anstieg von Cholesterol und Cholesterol-Oleat sowie der Vorstufe Squalen, was auf eine Stimulation der Cholesterolbiosynthese durch die langfristig angewendeten Cremes schließen lassen könnte. Da die Cholesterol- und Cholesterol-Oleat-Banden auf den HPTLC-Platten jedoch nicht sicher zwischen Haut- und Cremeursprung unterschieden werden können, ist die Beurteilbarkeit reduziert. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Lipide aus dem SC und nicht aus der Creme stammen, da in Visite 1 keine Erhöhung der Cholesterin- bzw. Cholesterol-Oleat-Werte nach einstündiger Cremeeinwirkung zu ermitteln war. Dies wurde auch in einer Teilveröffentlichung dieser Arbeit diskutiert (Haag et al. 2014: 227-233).

In einer kürzlich publizierten Studie von Meinke et al. wurde die Wirkung einer ebenfalls topisch applizierten 1,5% hyperforinhaltigen Hautcreme (t=2-4 Wochen) an Probanden mit atopischer Haut und an gesunden Probanden mit trockener Haut mittels SC-Hautlipidextraktion und Laserscan-Mikroskopie untersucht (Meinke et al. 2015: (051013-) 1-7). Das angewendete Lipid-Extraktionsverfahren war im Vergleich zu dieser Arbeit nur leicht aberriert. Im Vergleich zur Ausgangsmessung zeigte sich auch bei Meinke et al. nach 4 Wochen Cremeapplikation eine Erhöhung von Cer[NS] und Cholesterol. Anders als in der vorliegenden Arbeit war die Erhöhung von Cholesterol sogar signifikant ($p < 0,05$) bzw. zeigte im Falle von Cer[NS] einen Trend ($p < 0,1$) (Meinke et al. 2015:

(051013-) 1-7). Insgesamt ist in der hiesigen Studie die absolute Konzentration der statistisch ausgewerteten Lipide auf den mit Creme behandelten und unbehandelten Hautarealen in Visite 2 signifikant geringer im Vergleich zu Visite 1, ausgenommen von Ceramid [NP1] auf dem unbehandelten Hautareal. Dies könnte unter anderem in den vorbeschriebenen jahreszeitlichen Schwankungen des SC-Lipidprofils begründet sein (Rogers et al. 1996: 765-770, Yoshikawa et al. 1994: 207- 214), da die Messungen von Visite 1 und Visite 2 48-82 Tage zeitlich auseinander lagen.

Bei der Auswertung des Einflusses von VIS-/NIR-Bestrahlung auf die Hautlipidkonzentration zeigen sich in Visite 1 keine signifikanten Unterschiede. Anzumerken ist hier jedoch die sehr kleine Probandenanzahl von max. n=6, bei denen die Lipide bestimmt wurden. Lipide, die nur bei weniger als 6 Probanden nachgewiesen wurden bzw. Lipidkonzentrationen außerhalb der Kalibrierung wurden nicht ausgewertet, weshalb die Aussagekraft dieser Ergebnisse erheblich eingeschränkt ist. Des Weiteren beginne nach Feingold et al. die Ceramidsynthese erst 6 Stunden nach der Barrierschädigung und demnach deutlich nach der Postbestrahlungs-Extraktionszeit in Visite 1 (Feingold 2009: 417-422).

In Visite 2 konnten in den einzelnen Hautarealen nach VIS-/NIR-Bestrahlung wenige signifikante Änderungen der Lipidkonzentration gemessen werden. In den unbehandelten Hautarealen zeigt sich eine signifikante Reduktion der Ölsäure- und Sphingomyelinkonzentration. Der reduzierte Ölsäuregehalt scheint entweder durch oxidative Veränderung oder aber auch durch die o.g. schwankende Probandenanzahl bedingt zu sein und ist aufgrund mehrerer Einflussfaktoren eingeschränkt zu bewerten.

Es ist bekannt, dass eine gesteigerte Neusynthese von Ceramiden nach UVB-Bestrahlung zur Induktion von Apoptose in Zellkulturen aus Keratinozyten führt und gleichzeitig zur Neusynthese von Sphingomyelin und Glucosylceramiden anregt (Charruyer et al. 2008: 16682-16692, Uchida et al. 2003: 662–669).

Charruyer et al. fanden weiterhin heraus, dass oxidativer Stress in humanen Keratinozyten-Zellkulturen und *in vivo* zur Bildung eines stabilen inaktiven Homotrimers des Ceramid-Transport-Proteins (CERT) mit folglich Reduktion des Ceramid-Transports und Sphingomyelingehalts führt. Der Gehalt an CERT-unabhängigen Glucosylceramiden stieg, obgleich sowohl die Aktivität der Glucosylceramid- als auch die der Sphingomyelinsynthase durch UVB-Bestrahlung sank. Begründet wird dies durch den dadurch bedingten größeren Pool an Ceramiden, der für die Glucosylceramidsynthese zur Verfügung steht (Charruyer et al. 2008: 16682-16692).

In den mit Verum und Placebo behandelten Hautarealen zeigen sich in untersuchten Ceramiden der hiesigen Arbeit hingegen keine signifikanten Unterschiede im Sphingomyelingehalt nach VIS-/NIR-Bestrahlung. Dies kann bedeuten, dass der oxidative Stress in der Haut durch die Cremes reduziert wurde.

In einer früheren Studie von Hamanaka wurde herausgefunden, dass die Bildung der SC-Ceramide nach Freisetzung aus den "Odland bodies" hauptsächlich aus Glucosylceramiden und nur in geringem Ausmaß aus Sphingomyelin hervorgeht (Hamanaka et al. 2002: 416-423, Farwanah et al. 2005: 514-521). In der vorliegenden Studie zeigt sich in Visite 2 in den analysierten Lipidextrakten der gecremten Hautareale eine entsprechende signifikante Erhöhung der Glucosylceramide Cer [NP1] in den Verumarealen und Cer [NP2] auf den mit Verum- bzw. Placebocreme behandelten Arealen nach VIS-/NIR-Bestrahlung. Weiterhin zeigt sich eine Erniedrigung mit einem Trend von Cer [NP/NS] nach Bestrahlung. Die Cer [NS]-Bildung erfolgt teilweise auch aus Sphingomyelin, dessen Gehalt, wie bereits beschrieben, in Folge von oxidativem Stress sinkt.

Die in dieser Arbeit angewendete Methodik der Lipidextraktion und -Analyse bedarf noch einiger Optimierungen.

Es bestehen viele Einflussfaktoren auf das individuell unterschiedliche Haut-Lipidprofil, wie Alter (Saint Léger et al. 1988: 159-164) Geschlecht (De Paepe et al. 2004: 23-30), Körperareal (Lampe, 1983: 120-130), Erkrankungen und die Jahreszeit (Rogers et al. 1996: 765-770, Yoshikawa et al. 1994: 207-214, Farwanah, 2005: 514-521, Ghadially et al. 1996: 1064-1069, Hayashi et al. 2003: 13-17). Das kleine Probandenkollektiv ist in dieser Studie diesbezüglich relativ inhomogen.

Weiterhin wurde nach der Bestrahlung zusätzlich zum Bestrahlungsareal von 11 mm Durchmesser auch teilweise auf dem angrenzenden unbestrahlten Gewebe extrahiert, da der Durchmesser des Extraktionsröhrchens 50 mm betrug. Demzufolge kann keine eindeutige Aussage bezüglich der Lipidprofiländerung nach Bestrahlung getroffen werden.

Eine weitere Einschränkung besteht in der fehlenden Bestimmung extrahierter Lipide außerhalb der Kalibrierung, sodass bezüglich Ölsäure eine reduzierte Beurteilbarkeit besteht.

Mangels entsprechender Referenzlösungen wurden zusätzliche Ceramide, die laut anderen Studien einen wichtigen Faktor in der Hautbarriere darstellen (Coderch et al. 2003: 107-129, Motta et al. 1993: 147-151, Yamamoto et al. 1991: 219-223, Warren et

al. 2011: 294-299, Hill et al. 2003: 121-126, de Jager et al. 2006: 951-960, Bouwstra, 2002: 606-617), nicht untersucht, sodass nur ein unvollständiger Anteil der extrazellulären Hautlipide im Rahmen dieser Arbeit beurteilt werden konnte. Insbesondere wäre eine Analyse der ω -Acylceramide (Cer[EO]), die eine wichtige Rolle in der Organisation der Lipide, der Lipid-Permeabilität und damit auch im Hautbarriereschutz spielen (van Smeden und Bouwstra 2016: 8-26), sehr interessant gewesen und in der Zukunft anzustreben. Auch eine quantitativ ausführlichere Analyse der FFS der extrazellulären SC-Lipide wäre in anschließenden Studien sinnvoll, insbesondere der langkettigen FFS, gesättigten FFS und Hydroxy-FFS. Denn laut der Übersichtsarbeit von van Smeden und Bouwstra gibt es neben der Lipid-Organisation auffällige Veränderungen der FFS und Ceramide bei Patienten mit einem Hautbarriereschaden bei atopischer Dermatitis (van Smeden und Bouwstra 2016:8-26).

4.3. Klinische Relevanz

Die ESR ist eine wichtige und gut etablierte *in vitro*- und *ex vivo*-Methode in der Dermatologie zur Messung freier Radikale und des antioxidativen Potentials. Bezüglich der *in vivo* ESR-Messungen liegen Studien zur Radikalentwicklung in der Haut unter systemischer Applikation von Antioxidanten vor (Meinke et al. 2013a: 365-73, Lauer et al. 2013: 1102-1104). In dieser Studie konnte nun erstmals auch für topische Applikationen eine reproduzierbare Messmethode entwickelt werden.

Die *ex vivo* ESR-Messung der Radikalbeeinflussung topischer Applikationen stellt eine gute Untersuchungsalternative zur *in vivo* Methodik dar, insbesondere bei ungünstigen Untersuchungsbedingungen, wie beispielsweise langer Messungszeit verbunden mit unbequemer Sitzposition. Allerdings sind Studien zu Langzeitanwendungen von lokal applizierten Substanzen *ex vivo* nicht durchführbar, ebenso wenig, wie Aussagen über die Cremewirkung im behandlungsfreien Intervall gemacht werden können. Dies wurde bereits in einer Teilveröffentlichung der Messergebnisse dieser Arbeit diskutiert (Arndt et al. 2013: 354-357). Außerdem scheint bei *ex vivo* Messungen eine vergleichsweise längere Bestrahlungszeit notwendig zu sein als *in vivo*.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen einmal mehr das radikalerzeugende Potential von VIS-/NIR-Bestrahlung. Daher sollte bei der Anwendung von IR-Strahlung im medizinischen Bereich neben dem positiven Therapieeffekt, wie beispielsweise der Wundheilung und Therapie von Entzündungen, der Nebeneffekt der Radikalbildung

beachtet werden. Auch ist die Nutzung von IR-Strahlung im Wellnessbereich als Wärmequelle aufgrund der möglichen gesundheitlichen Risiken zu überdenken.

Freie Radikale sind wichtig für Signal- und Abwehrmechanismen im menschlichen Organismus. Sie sollten jedoch im Gleichgewicht mit dem antioxidativen Netzwerk stehen, um destruirende Prozesse bis hin zu Hautkrebs zu vermeiden.

Wichtig erscheint der Schutz insbesondere vor dauerhafter bzw. exzessiver VIS-/NIR-Bestrahlung. In der Studie von Kim et al. war erst nach mehrmaliger IR-Exposition ein Anstieg der MMP-1-Expression und eine Reduktion der Expression von Typ I Prokollagen zu beobachten. Nach einmaliger NIR-/VIS-Bestrahlung kam es hingegen zur Erhöhung der Expression von Typ I Prokollagen ohne Effekt auf die MMP-1-Expression (Kim et al. 2006: 875-882).

Auch in der Studie von Randhawa et al. zeigt sich erst nach mehreren Tagen VIS-Exposition eine Steigerung der Tyrosinase-Genexpression und der persistierenden Hautpigmentierung, währenddessen eine einmalige VIS-Exposition nur zur geringen und <1Tag persistierenden Pigmentierung führten (Randhawa et al. 2015: 1-14).

Aufgrund des hohen Anteils der VIS-/NIR-Strahlung im Sonnenlicht sollte in Sonnenschutzmitteln neben den mittlerweile standardmäßigen UV-Filtern auch das Einbringen von VIS-/IR-Filtern bzw. Antioxidantien erwogen werden. Meinke et al. zeigten in Studien, in denen verschiedene Sonnencremes untersucht wurden, dass eine Kombination aus verschiedenen Filtern und Antioxidantien am effektivsten vor IR-induzierter Radikalentstehung schützt (Meinke et al. 2011: 452-6, Meinke et al. 2013b: 1079-84).

In der aktuellen Studie von Souza et al. wurde die radikalprotektive Wirkung einer Sonnencreme, die UV-Filter beinhaltet und mit Antioxidantien angereichert wurde, im gesamten Sonnenlichtspektrum nachgewiesen verglichen mit einer Sonnencreme ohne Antioxidantien (Souza et al. 2017: 81-89).

Die applizierten Sonnencremes weisen allerdings nur eine eingeschränkte Eindringtiefe in die Haut auf (Darvin et al. 2012: 219-26, Souza et al. 2017: 81-89). Es sollte daher neben der möglichen topischen Antioxidantienapplikation vor allem auf eine ausgewogene systemische, z.B. diätetische Zufuhr von Antioxidantien durch Obst- und Gemüsekonsum (Palombo et al. 2007: 199-210), sowie eine gesunde Lebensweise geachtet werden.

Viele Hauterkrankungen stehen im Zusammenhang mit einer Barrierestörung bzw. Homöostasestörung des antioxidativen Netzwerkes mit erhöhtem oxidativen Stress, wie

beispielsweise atopische Dermatitis, Psoriasis, Akne, irritative Kontaktdermatitis und Vitiligo (Briganti et al. 2003: 663-669, Antille et al. 2002: 69-71). Die topische Cremeapplikation scheint eine positive Wirkung auf den Barrierschutz zu haben, wie bereits mehrere Studien verdeutlichten. Schempp et al. untersuchten die Wirkung einer antioxidantienhaltigen Creme, Basis- und Barrierschutzcreme auf eine chemisch induzierte Kontaktdermatitis im Vergleich zur unbehandelten Haut bezüglich Hydratation des SC und des Blutflusses (Schempp et al. 2012: 234-237). Die beste Wirkung wurde mit der antioxidativen Creme erzielt, die schlechtesten Werte wurden an der unbehandelten Haut gemessen.

Auch andere Versuche mit topisch applizierten Cremes, die Antioxidantien beinhalten, zeigten positive Hauteffekte, wie Luteolin (Schempp et al. 2012: 234-237) oder N-Acetylcystein bezüglich Kontaktallergie (Senaldi et al. 1994: 934-937, Schempp et al. 2012: 234-237) sowie Vitamin E-Salbe mit Verbesserung der chemisch induzierten irritativen Kontaktdermatitis an Rattenhaut (Kuriyama et al. 2002: 483-489).

Die Wirkung einer 1,5%-hyperforinhaltigen Hautcreme wurde unabhängig von dieser Arbeit zuvor in einer placebokontrollierten randomisierten Studie von Schempp et al. ebenfalls im Halbseitenvergleich bei Patienten mit subakuter atopischer Dermatitis getestet. Beide Testcremes erzielten eine Symptomreduktion, die Verumcreme zeigt jedoch signifikant bessere Ergebnisse bemessen anhand des SCORAD (Severity Scoring of Atopic Dermatitis) (Schempp et al. 2003: 248-253), vergleichbar mit den hiesigen Ergebnissen der o.g. Langzeituntersuchungen der Testcremes an gesunden Probanden.

Da die Placebocreme in beiden Studien einen deutlichen Schutzeffekt zeigt, sollte eher von einer Grundlagencreme ausgegangen werden. Die positive Auswirkung einer langfristig angewendeten Basistherapie auf den Krankheitsverlauf, u.a. auch mit möglicher Einsparung von topischen Kortikosteroiden wurde mittlerweile mehrmals bestätigt (Schempp et al. 2003: 248-253, Patzelt-Wenczler und Ponce-Pöschl 2000: 171-175, Kezic et al. 2014: 542-556, Werfel et al. 2009: 1-46).

In der Studie von Meinke et al. an atopischer bzw. trockener Haut (Meinke et al. 2015: (051013)-1-7), zeigten sich große Unterschiede in der Laser-Scan-Mikroskopie zwischen gesunder Haut und entzündeter atopischer Haut, u.a. mit Störung der oberflächlichen Hautfurchenanordnung, Corneozytenstruktur und verdickter Haut durch Spongiosis des Stratum spinosum in der atopischen Haut. Nach längerfristiger (2-4 Wochen) Applikation der 1,5%-hyperforinhaltigen Hautcreme, die auch in der hiesigen Studie verwendet

wurde, konnte eine signifikante Verbesserung der subjektiven Beschwerden und der Hautfeuchtigkeit ermittelt werden sowie mit einem Trend eine Reduktion der Spongiosis gemessen werden. Weiterhin konnte eine leichte Änderung des Hautlipidprofils festgestellt werden (siehe Kapitel 4.2), sodass auch hier eine cremeinduzierte Verbesserung der Hautbarriere anzunehmen ist.

Bezüglich der Lipidprofiländerungen der Haut bei Hauterkrankungen mit Barrierestörungen sind die Studienergebnisse noch relativ inhomogen. Viele Studien liegen diesbezüglich zur atopischen Dermatitis vor. In der Studie von Farwanah et al. wurde an nicht-involvierter Haut von AD- und Psoriasis- Patienten im Vergleich zur Haut gesunder Probanden kein Unterschied in der Ceramid-, FFS- und Cholesterol-Menge festgestellt und demnach keine Barrierestörung angenommen (Farwanah et al. 2005: 514-521). Auch in einigen weiteren Publikationen wurde keine Barrierestörung an nicht-involvierter Haut nachgewiesen (Berardesca et al. 1990: 400-404, Matsumoto et al. 2000: 178-182). In mehreren anderen Studien an nicht-involvierter Haut von AD- bzw. Psoriasis-Patienten fielen hingegen Barrierestörungen auf (Bleck et al. 1999: 894-900, Jungersted et al. 2010: 911-918, Imokawa et al. 1991a:523-526; Alessandrini et al. 2001: 394-400, Di Nardo et al. 1998: 27-30) sowie auch an involvierter Haut (Imokawa et al. 1991a: 523-526; Alessandrini et al. 2001: 394-400, Motta et al. 1993: 147-151). Matsumoto et al. sahen die Veränderungen bei den SC-Ceramiden ausschließlich auf die involvierten Hautarealen bei atop. Dermatitis beschränkt (Matsumoto et al. 2000: 178-182). In einer aktuellen Publikation von Thyssen et al. wird eine Lipidprofilstörung durch eine bei Atopikern häufig zugrunde liegende Filaggrin-Mutation angenommen. Zum einen führe ein Filaggrin-Mangel zur Reduktion der Beladung und Sekretion der lamellar bodies (Thyssen et al. 2014: 792-799), zum anderen zur pH-Werterhöhung mit daraus resultierender Hemmung der Enzyme für die Ceramidbildung (Thyssen et al. 2014: 792-799, Imokawa et al. 2009: 1-9, Hachem et al. 2006: 1609-1621).

In der Übersichtsarbeit von van Smeden und Bouwstra wird ein Überblick über eine Vielzahl von Veränderungen der SC-Lipide bei Patienten mit atopischer Dermatitis im Vergleich zu gesunden Probanden gegeben, wobei die Veränderungen an involvierter Haut mehr als an nicht-involvierter Haut der Atopiker nachgewiesen wurden. Hierzu zählen neben Veränderungen der lateralen und lamellären Organisation der Lipide auch ein Anstieg kurzkettiger FSS \leq C18 und einfach ungesättigter FSS sowie eine Reduktion langkettiger FSS \geq C24 und der Hydroxy-FSS. Bezüglich der Ceramide würden auch vermehrt kurzkettige Ceramide $<$ C42 und Ceramide der Subklasse NS und der an α -

Hydroxyfettsäure gebundene vorliegen sowie analog zu den FSS eine Reduktion der langkettigen Ceramide >C44, der Acyl-Ceramide, CER[NP] und CER[NH] (van Smeden und Bouwstra 2016:8-26).

Die in dieser Arbeit verwendeten Testcremes ähneln dem humanen Lipidprofil sehr stark und scheinen zur Lipid-Neusynthese anzuregen. Außerdem werden Auswirkungen auf die Lipidzusammensetzung durch VIS-/NIR-Bestrahlung durch die vorherige Cremeapplikation vermutlich abgeschwächt.

Beide Testcremes können somit eine Behandlungsoption vor allem in der Basistherapie darstellen, insbesondere die Verumcreme jedoch ggf. auch in der Akutphase, da sie den Barrierehautschutz zum einen durch Radialprotektion und zum anderen durch positive Beeinflussung des Lipidprofils des SC stärkt. Hierzu bedarf es jedoch noch ausführlicherer Erforschungen. Bei entzündeter atopischer Haut scheint ein vierwöchiger Anwendungsintervall der 1,5%-hyperforinhaltigen Hautcreme jedoch nicht für eine vollständige Befundverbesserung der Hautläsionen auszureichen. In der laserscanmikroskopischen Untersuchung von Meinke et al. zeigt sich danach nur eine oberflächliche Besserung bei weiterhin bestehenden Entzündungszeichen in den tieferen Schichten der Dermis/Epidermis (Meinke et al. 2015: (051013-) 1-7).

Perspektivisch wäre eine ESR-Untersuchung der in dieser Arbeit getesteten Formulierungen an Patienten mit Hautbarrierestörungen mit gleichzeitiger Lipidextraktion in einem größeren Patientenkollektiv zu therapeutischen Zwecken und v.a. auch im Vergleich zu den bisherigen Studienergebnissen interessant (Meinke et al. 2015: (051013-) 1-7). Bei der Lipidanalyse wäre dann, wie bereits in Kapitel 4.2 aufgeführt, eine Erweiterung der zu untersuchenden Ceramide und freien Fettsäuren empfehlenswert.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals für topische Cremeapplikationen eine reproduzierbare *in vivo* ESR-Messmethodik entwickelt werden, die eine nicht-invasive Untersuchung der radikalschützenden Eigenschaften in der Haut unter Stressinduktion in Form von *in situ* VIS-/NIR-Bestrahlung erlaubt. Für die *ex vivo* Versuchsdurchführung fand eine vorbestehende Messmethodik in leichtgradig abgewandelter Form Anwendung. Untersuchungsgegenstand dieser Studie war eine 1,5%-hyperforinhaltige Testcreme sowie zum Vergleich eine hyperforinfreie Basiscreme.

Nach einmaliger Cremeapplikation war die Radikalbildung *in vivo* sowohl auf den mit der Verumcreme als auch auf den mit der Basiscreme behandelten Hautarealen sehr gering und ohne signifikanten Unterschied. Die Radikalschutzwirkung gegenüber der unbehandelten Haut war jedoch bereits nach 5 Stunden nicht mehr nachweisbar. Es wird vermutet, dass der radikalprotektive Soforteffekt am ehesten durch die hohe Streuungseigenschaft der Testcreme bedingt ist.

Nach Langzeitanwendung der Testcremes über 4 Wochen zeigt sich auf der mit der hyperforinreichen Verumcreme behandelten Haut ein signifikant höherer Radikalschutz als auf den Basiscreme-Hautarealen und der unbehandelten Haut. Daher kann angenommen werden, dass die hyperforinhaltige Hautcreme bei regelmäßiger Langzeitanwendung einen ganztägigen kutanen Radikalhautschutz im VIS-/NIR-Bereich bietet.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei den *ex vivo* ESR-Untersuchungen, jedoch ist die Kinetik verschieden. In der *ex vivo* Messung stieg die Radikalbildung über die Zeit nahezu linear, in der *in vivo* Messung exponentiell mit initial hohem und über die Zeit zunehmend niedrigem Kurvenanstieg.

Die Radikalbildung war zum gleichen Untersuchungszeitpunkt *in vivo* höher als *ex vivo*. Betrachtet man die prozentuale Radikalproduktion, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der *in vivo* und *ex vivo* Messungen. Daher stellt das Schweineohrhautmodell eine gute Alternative zu teilweise aufwendigeren und für die Probanden strapaziösen *in vivo* ESR-Messungen dar und bietet die Möglichkeit auch nicht zugelassene Substanzen zu untersuchen. Allerdings sind Studien zu Langzeitanwendungen *ex vivo* nicht durchführbar, ebenso wenig, wie Aussagen über die Radikalschutzwirkung topischer Applikationen im behandlungsfreien Intervall gemacht werden können.

Des Weiteren wurde ein Verfahren zur Messung der extrazellulären Hautlipide im SC entwickelt. Auf den mit Creme behandelten Hautarealen ist vor allem nach einmaliger Cremeapplikation, aber auch nach Langzeitcremeanwendung im Vergleich zur unbehandelten Haut eine Erhöhung der Lipidkonzentration der Mehrzahl der getesteten Hautlipiden zu beobachten, jedoch nur in wenigen Fällen signifikant. Zwischen den mit Verum- und Placebocreme behandelten Arealen zeigte sich dabei kein signifikanter Unterschied. Die Lipidvorstufe Squalen war in der Verumcreme- und Placebocreme-Gruppe nach der Langzeitcremeanwendung reduziert. Nach VIS-/NIR-Bestrahlung waren nur in Visite 2 wenige signifikante Änderungen der Lipidkonzentrationen erruierbar. Zusammenfassend zeigen beide Testcremes einen positiven Effekt auf die extrazelluläre SC-Lipidkonzentration und damit auf den Hautbarriereschutz, wobei der Wirkstoff Hyperforin hierbei von geringerer Relevanz zu sein scheint.

6. Literaturverzeichnis

- Akaike, T. (2001) 'Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation', *Rev Med Virol*, 11(2), pp. 87-101.
- Akhalaya, M. Y., Maksimov, G. V., Rubin, A. B., Lademann, J. and Darvin, M. E. (2014) 'Molecular action mechanisms of solar infrared radiation and heat on human skin', *Ageing Res Rev*, 16, pp. 1-11.
- Albrecht, S., Ahlberg, S., Beckers, I., Kockott, D., Lademann, J., Paul, V., Zastrow, L. and Meinke, M. C. (2016) 'Effects on detection of radical formation in skin due to solar irradiation measured by EPR spectroscopy', *Methods*, 109, pp. 44-54.
- Alessandrini, F., Stachowitz, S., Ring, J. and Behrendt, H. (2001) 'The level of prosaposin is decreased in the skin of patients with psoriasis vulgaris', *J Invest Dermatol*, 116(3), pp. 394-400.
- Antille, C., Sorg, O., Lübke, J. and Saurat, J. H. (2002) 'Decreased oxidative state in non-lesional skin of atopic dermatitis', *Dermatology*, 204(1), pp. 69-71.
- Applegate, L. A. and Frenk, E. (1995) 'Oxidative defense in cultured human skin fibroblasts and keratinocytes from sun-exposed and non-exposed skin', *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 11(3), pp. 95-101.
- Arikawa, J., Ishibashi, M., Kawashima, M., Takagi, Y., Ichikawa, Y. and Imokawa, G. (2002) 'Decreased levels of sphingosine, a natural antimicrobial agent, may be associated with vulnerability of the stratum corneum from patients with atopic dermatitis to colonization by *Staphylococcus aureus*', *J Invest Dermatol*, 119(2), pp. 433-9.
- Arndt, S., Haag, S. F., Kleemann, A., Lademann, J. and Meinke, M. C. (2013) 'Radical protection in the visible and infrared by a hyperforin-rich cream-in vivo versus ex vivo methods', *Exp Dermatol*, 22(5), pp. 354-7.
- Baltes, W. (2004) Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen. 3. vollst. überarb. Aufl. edn. Hamburg : Behr.
- Benech-Kieffer, F., Wegrich, P., Schwarzenbach, R., Klecak, G., Weber, T., Leclaire, J. and Schaefer, H. (2000) 'Percutaneous absorption of sunscreens in vitro: interspecies comparison, skin models and reproducibility aspects', *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 13(6), pp. 324-35.
- Benninghoff Drenckhahn, D. (2008) *Anatomie Band 1*, 17. Aufl. edn. München; Elsevier Urban und Fischer München.
- Berardesca, E., Fideli, D., Borroni, G., Rabbiosi, G. and Maibach, H. (1990) 'In vivo hydration and water-retention capacity of stratum corneum in clinically uninvolved skin in atopic and psoriatic patients', *Acta Derm Venereol*, 70(5), pp. 400-4.

- Bibel, D. J., Aly, R. and Shinefield, H. R. (1992) 'Antimicrobial activity of sphingosines', *J Invest Dermatol*, 98(3), pp. 269-73.
- Bibel, D. J., Aly, R. and Shinefield, H. R. (1995) 'Topical sphingolipids in antiseptis and antifungal therapy', *Clin Exp Dermatol*, 20(5), pp. 395-400.
- Black, H. S. (1987) 'Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage', *Photochem Photobiol*, 46(2), pp. 213-21.
- Bleck, O., Abeck, D., Ring, J., Hoppe, U., Vietzke, J. P., Wolber, R., Brandt, O. and Schreiner, V. (1999) 'Two ceramide subfractions detectable in Cer(AS) position by HPTLC in skin surface lipids of non-lesional skin of atopic eczema', *J Invest Dermatol*, 113(6), pp. 894-900.
- Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., Dubbelaar, F. E. and Ponc, M. (2002) 'Phase behavior of stratum corneum lipid mixtures based on human ceramides: the role of natural and synthetic ceramide 1', *J Invest Dermatol*, 118(4), pp. 606-17.
- Briganti, S. and Picardo, M. (2003) 'Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new', *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 17(6), pp. 663-9.
- Burke, K. E. and Wei, H. (2009) 'Synergistic damage by UVA radiation and pollutants', *Toxicol Ind Health*, 25(4-5), pp. 219-24.
- Cameron, D. J., Tong, Z., Yang, Z., Kaminoh, J., Kamiyah, S., Chen, H., Zeng, J., Chen, Y., Luo, L. and Zhang, K. (2007) 'Essential role of Elovl4 in very long chain fatty acid synthesis, skin permeability barrier function, and neonatal survival', *Int J Biol Sci*, 3(2), pp. 111-9.
- Charruyer, A., Bell, S. M., Kawano, M., Douangpanya, S., Yen, T. Y., Macher, B. A., Kumagai, K., Hanada, K., Holleran, W. M. and Uchida, Y. (2008) 'Decreased ceramide transport protein (CERT) function alters sphingomyelin production following UVB irradiation', *J Biol Chem*, 283(24), pp. 16682-92.
- Cho, S., Lee, M. J., Kim, M. S., Lee, S., Kim, Y. K., Lee, D. H., Lee, C. W., Cho, K. H. and Chung, J. H. (2008) 'Infrared plus visible light and heat from natural sunlight participate in the expression of MMPs and type I procollagen as well as infiltration of inflammatory cell in human skin in vivo', *J Dermatol Sci*, 50(2), pp. 123-33.
- Coderch, L., López, O., de la Maza, A. and Parra, J. L. (2003) 'Ceramides and skin function', *Am J Clin Dermatol*, 4(2), pp. 107-29.
- Danso, M. O., van Drongelen, V., Mulder, A., van Esch, J., Scott, H., van Smeden, J., El Ghalbzouri, A. and Bouwstra, J. A. (2014) 'TNF- α and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents', *J Invest Dermatol*, 134(7), pp. 1941-50.
- Darvin, M. E., Haag, S., Meinke, M., Zastrow, L., Sterry, W. and Lademann, J. (2010a) 'Radical production by infrared A irradiation in human tissue', *Skin Pharmacol Physiol*, 23(1), pp. 40-6.

- Darvin, M. E., Haag, S. F., Lademann, J., Zastrow, L., Sterry, W. and Meinke, M. C. (2010b) 'Formation of free radicals in human skin during irradiation with infrared light', *J Invest Dermatol*, 130(2), pp. 629-31.
- Darvin, M. E., König, K., Kellner-Hoefer, M., Breunig, H. G., Werncke, W., Meinke, M. C., Patzelt, A., Sterry, W. and Lademann, J. (2012) 'Safety assessment by multiphoton fluorescence/second harmonic generation/hyper-Rayleigh scattering tomography of ZnO nanoparticles used in cosmetic products', *Skin Pharmacol Physiol*, 25(4), pp. 219-26.
- de Jager, M., Groenink, W., Bielsa i Guivernau, R., Andersson, E., Angelova, N., Ponec, M. and Bouwstra, J. (2006) 'A novel in vitro percutaneous penetration model: evaluation of barrier properties with p-aminobenzoic acid and two of its derivatives', *Pharm Res*, 23(5), pp. 951-60.
- De Paepe, K., Weerheim, A., Houben, E., Roseeuw, D., Ponec, M. and Rogiers, V. (2004) 'Analysis of epidermal lipids of the healthy human skin: factors affecting the design of a control population', *Skin Pharmacol Physiol*, 17(1), pp. 23-30.
- Di Nardo, A., Wertz, P., Giannetti, A. and Seidenari, S. (1998) 'Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis', *Acta Derm Venereol*, 78(1), pp. 27-30.
- Drake, D. R., Brogden, K. A., Dawson, D. V. and Wertz, P. W. (2008) 'Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface', *J Lipid Res*, 49(1), pp. 4-11.
- Dröge, W. (2002) 'Free radicals in the physiological control of cell function', *Physiol Rev*, 82(1), pp. 47-95.
- Elias, P. M. (2005) 'Stratum corneum defensive functions: an integrated view', *J Invest Dermatol*, 125(2), pp. 183-200.
- Elias, P. M., Williams, M. L., Holleran, W. M., Jiang, Y. J. and Schmuth, M. (2008) 'Pathogenesis of permeability barrier abnormalities in the ichthyoses: inherited disorders of lipid metabolism', *J Lipid Res*, 49(4), pp. 697-714.
- European Medicines Agency, Committee on herbal medical products (2009): Community herbal monograph on *Hypericum perforatum* L., herba (traditional use), [online] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2010/01/WC500059149.pdf [07.12.2016].
- Farwanah, H., Raith, K., Neubert, R. H. and Wohlrab, J. (2005) 'Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin', *Arch Dermatol Res*, 296(11), pp. 514-21.
- Feingold, K. R. (2007) 'Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis', *J Lipid Res*, 48(12), pp. 2531-46.

- Feingold, K. R. (2009) 'The outer frontier: the importance of lipid metabolism in the skin', *J Lipid Res*, 50 Suppl, pp. 417-22.
- Fitzpatrick, T. B. (1988) 'The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI', *Arch Dermatol*, 124(6), pp. 869-71.
- Friebel, M., Roggan, A., Müller, G. and Meinke, M. (2006) 'Determination of optical properties of human blood in the spectral range 250 to 1100 nm using Monte Carlo simulations with hematocrit-dependent effective scattering phase functions', *J Biomed Opt*, 11(3), pp. 34021.
- Fuchs, J., Groth, N., Herrling, T. and Zimmer, G. (1997) 'Electron paramagnetic resonance studies on nitroxide radical 2,2,5,5-tetramethyl-4-piperidin-1-oxyl (TEMPO) redox reactions in human skin', *Free Radic Biol Med*, 22(6), pp. 967-76.
- Gallo, R. L., Murakami, M., Ohtake, T. and Zaiou, M. (2002) 'Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides', *J Allergy Clin Immunol*, 110(6), pp. 823-31.
- Ghadially, R., Brown, B. E., Hanley, K., Reed, J. T., Feingold, K. R. and Elias, P. M. (1996) 'Decreased epidermal lipid synthesis accounts for altered barrier function in aged mice', *J Invest Dermatol*, 106(5), pp. 1064-9.
- Haag, S. F., Bechtel, A., Darvin, M. E., Klein, F., Groth, N., Schäfer-Korting, M., Bittl, R., Lademann, J., Sterry, W. and Meinke, M. C. (2010) 'Comparative study of carotenoids, catalase and radical formation in human and animal skin', *Skin Pharmacol Physiol*, 23(6), pp. 306-12.
- Haag, S. F., Tscherch, K., Arndt, S., Kleemann, A., Gersonde, I., Lademann, J., Rohn, S. and Meinke, M. C. (2014) 'Enhancement of skin radical scavenging activity and stratum corneum lipids after the application of a hyperforin-rich cream', *Eur J Pharm Biopharm*, 86(2), pp. 227-33.
- Hachem, J. P., Wagberg, F., Schmuth, M., Crumrine, D., Lissens, W., Jayakumar, A., Houben, E., Mauro, T. M., Leonardsson, G., Brattsand, M., Egelrud, T., Roseeuw, D., Clayman, G. L., Feingold, K. R., Williams, M. L. and Elias, P. M. (2006) 'Serine protease activity and residual LEKTI expression determine phenotype in Netherton syndrome', *J Invest Dermatol*, 126(7), pp. 1609-21.
- Hamanaka, S., Hara, M., Nishio, H., Otsuka, F., Suzuki, A. and Uchida, Y. (2002) 'Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides', *J Invest Dermatol*, 119(2), pp. 416-23.
- Hayashi, N., Togawa, K., Yanagisawa, M., Hosogi, J., Mimura, D. and Yamamoto, Y. (2003) 'Effect of sunlight exposure and aging on skin surface lipids and urate', *Exp Dermatol*, 12 Suppl 2, pp. 13-7.
- Heilmann, J., Winkelmann, K. and Sticher, O. (2003) 'Studies on the antioxidative activity of phloroglucinol derivatives isolated from hypericum species', *Planta Med*, 69(3), pp. 202-6.

- Herrling, T., Fuchs, J., Rehberg, J. and Groth, N. (2003) 'UV-induced free radicals in the skin detected by ESR spectroscopy and imaging using nitroxides', *Free Radic Biol Med*, 35(1), pp. 59-67.
- Herrling, T., Rehberg, J., Jung, K. and Groth, N. (2002) 'SURF_ER--surface electron spin resonance (ESR) of the surface domain of large objects', *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 58(6), pp. 1337-44.
- Hill, J. R. and Wertz, P. W. (2003) 'Molecular models of the intercellular lipid lamellae from epidermal stratum corneum', *Biochim Biophys Acta*, 1616(2), pp. 121-6.
- Hong, J. E., Santucci, L. A., Tian, X. and Silverman, D. J. (1998) 'Superoxide dismutase-dependent, catalase-sensitive peroxides in human endothelial cells infected by *Rickettsia rickettsii*', *Infect Immun*, 66(4), pp. 1293-8.
- Hornig-Do, H. T., von Kleist-Retzow, J. C., Lanz, K., Wickenhauser, C., Kudin, A. P., Kunz, W. S., Wiesner, R. J. and Schauen, M. (2007) 'Human epidermal keratinocytes accumulate superoxide due to low activity of Mn-SOD, leading to mitochondrial functional impairment', *J Invest Dermatol*, 127(5), pp. 1084-93.
- Iannone, A., Marconi, A., Zambruno, G., Giannetti, A., Vannini, V. and Tomasi, A. (1993) 'Free radical production during metabolism of organic hydroperoxides by normal human keratinocytes', *J Invest Dermatol*, 101(1), pp. 59-63.
- Imokawa, G. (2009) 'A possible mechanism underlying the ceramide deficiency in atopic dermatitis: expression of a deacylase enzyme that cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide', *J Dermatol Sci*, 55(1), pp. 1-9.
- Imokawa, G., Abe, A., Jin, K., Higaki, Y., Kawashima, M. and Hidano, A. (1991a) 'Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin?', *J Invest Dermatol*, 96(4), pp. 523-6.
- Imokawa, G., Kuno, H. and Kawai, M. (1991b) 'Stratum corneum lipids serve as a bound-water modulator', *J Invest Dermatol*, 96(6), pp. 845-51.
- Jensen, J. M., Schütze, S., Förl, M., Krönke, M. and Proksch, E. (1999) 'Roles for tumor necrosis factor receptor p55 and sphingomyelinase in repairing the cutaneous permeability barrier', *J Clin Invest*, 104(12), pp. 1761-70.
- Jung, T., Höhn, A., Lau, A. M., Piazena, H. and Grune, T. (2012) 'An experimental setup for the measurement of nonthermal effects during water-filtered infrared A-irradiation of mammalian cell cultures', *Photochem Photobiol*, 88(2), pp. 371-80.
- Jungersted, J. M., Scheer, H., Mempel, M., Baurecht, H., Cifuentes, L., Høgh, J. K., Hellgren, L. I., Jemec, G. B., Agner, T. and Weidinger, S. (2010) 'Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema', *Allergy*, 65(7), pp. 911-8.

- Kezic, S., Novak, N., Jakasa, I., Jungersted, J. M., Simon, M., Brandner, J. M., Middelkamp-Hup, M. A. and Weidinger, S. (2014) 'Skin barrier in atopic dermatitis', *Front Biosci (Landmark Ed)*, 19, pp. 542-56.
- Kim, M. S., Kim, Y. K., Cho, K. H. and Chung, J. H. (2006) 'Regulation of type I procollagen and MMP-1 expression after single or repeated exposure to infrared radiation in human skin', *Mech Ageing Dev*, 127(12), pp. 875-82.
- Kleesz, P., Darlenski, R. and Fluhr, J. W. (2012) 'Full-body skin mapping for six biophysical parameters: baseline values at 16 anatomical sites in 125 human subjects', *Skin Pharmacol Physiol*, 25(1), pp. 25-33.
- Klotz, L. O., Holbrook, N. J. and Sies, H. (2001) 'UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events', *Curr Probl Dermatol*, 29, pp. 95-113.
- Kochevar, I. E. 1999. Photophysics, photochemistry, and photobiology. In: Pathak, M.A., Parrish, J. A. (ed.). New York: McGraw-Hill: *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*.
- Krause, S. (2011) *Die Rolle des Netzwerkwandlers in Samarium-dotierten Boratgläsern für Fluoreszenzanwendungen*, Diplomarbeit, Halle, p. 19.
- Kuriyama, K., Shimizu, T., Horiguchi, T., Watabe, M. and Abe, Y. (2002) 'Vitamin E ointment at high dose levels suppresses contact dermatitis in rats by stabilizing keratinocytes', *Inflamm Res*, 51(10), pp. 483-9.
- Lampe, M. A., Burlingame, A. L., Whitney, J., Williams, M. L., Brown, B. E., Roitman, E. and Elias, P. M. (1983) 'Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations', *J Lipid Res*, 24(2), pp. 120-30.
- Lauer, A. C. (2015), *Messung der Effekte carotinoidfreier Nahrungsergänzungsmittel auf die radikalfangenden Eigenschaften der menschlichen Haut mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie und Resonanz Raman-Spektroskopie; vergleichende Untersuchung von Vitamin C und einem Aroniabeerenpräparat*, Dissertation, Berlin, pp. 10-11.
- Lauer, A. C., Groth, N., Haag, S. F., Darvin, M. E., Lademann, J. and Meinke, M. C. (2013) 'Radical scavenging capacity in human skin before and after vitamin C uptake: an in vivo feasibility study using electron paramagnetic resonance spectroscopy', *J Invest Dermatol*, 133(4), pp. 1102-4.
- Lee, H. S., Lee, D. H., Cho, S. and Chung, J. H. (2006) 'Minimal heating dose: a novel biological unit to measure infrared irradiation', *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 22(3), pp. 148-52.
- Liebel, F., Kaur, S., Ruvolo, E., Kollias, N. and Southall, M. D. (2012) 'Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes', *J Invest Dermatol*, 132(7), pp. 1901-7.

- Lohan, S. B., Müller, R., Albrecht, S., Mink, K., Tscherch, K., Ismaeel, F., Lademann, J., Rohn, S. and Meinke, M. C. (2016) 'Free radicals induced by sunlight in different spectral regions - in vivo versus ex vivo study', *Exp Dermatol*, 25(5), pp. 380-5.
- Lüllmann-Rauch, R. (2006) *Taschenlehrbuch Histologie. 2.*, komplett überarb. Aufl. edn. Stuttgart: Thieme.
- Lund, A., Shiotani, M. and Shimada, S. (2011) Principles and applications of ESR spectroscopy. Dordrecht, NL : Springer Science+Business Media.
- Maeda, H. and Akaike, T. (1998) 'Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer', *Biochemistry (Mosc)*, 63(7), pp. 854-65.
- Man MQ, M., Feingold, K. R., Thornfeldt, C. R. and Elias, P. M. (1996) 'Optimization of physiological lipid mixtures for barrier repair', *J Invest Dermatol*, 106(5), pp. 1096-101.
- Masaki, H. (2010) 'Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects', *J Dermatol Sci*, 58(2), pp. 85-90.
- Matsumoto, M., Sugiura, H. and Uehara, M. (2000) 'Skin barrier function in patients with completely healed atopic dermatitis', *J Dermatol Sci*, 23(3), pp. 178-82.
- Meinke, M. C., Friedrich, A., Tscherch, K., Haag, S. F., Darvin, M. E., Vollert, H., Groth, N., Lademann, J. and Rohn, S. (2013a) 'Influence of dietary carotenoids on radical scavenging capacity of the skin and skin lipids', *Eur J Pharm Biopharm*, 84(2), pp. 365-73.
- Meinke, M. C., Haag, S. F., Schanzer, S., Groth, N., Gersonde, I. and Lademann, J. (2011) 'Radical protection by sunscreens in the infrared spectral range', *Photochem Photobiol*, 87(2), pp. 452-6.
- Meinke, M. C., Richter, H., Kleemann, A., Lademann, J., Tscherch, K., Rohn, S. and Schempp, C. M. (2015) 'Characterization of atopic skin and the effect of a hyperforin-rich cream by laser scanning microscopy', *J Biomed Opt*, 20(5), pp. 051013.
- Meinke, M. C., Schanzer, S., Haag, S. F., Casetti, F., Müller, M. L., Wölfle, U., Kleemann, A., Lademann, J. and Schempp, C. M. (2012) 'In vivo photoprotective and anti-inflammatory effect of hyperforin is associated with high antioxidant activity in vitro and ex vivo', *Eur J Pharm Biopharm*, 81(2), pp. 346-50.
- Meinke, M. C., Syring, F., Schanzer, S., Haag, S. F., Graf, R., Loch, M., Gersonde, I., Groth, N., Pflücker, F. and Lademann, J. (2013b) 'Radical protection by differently composed creams in the UV/VIS and IR spectral ranges', *Photochem Photobiol*, 89(5), pp. 1079-84.
- Meyer-Hoffert, U., Wu, Z. and Schröder, J. M. (2009) 'Identification of lympho-epithelial Kazal-type inhibitor 2 in human skin as a kallikrein-related peptidase 5-specific protease inhibitor', *PLoS One*, 4(2), pp. e4372.

- Mirza, R., Hayasaka, S., Takagishi, Y., Kambe, F., Ohmori, S., Maki, K., Yamamoto, M., Murakami, K., Kaji, T., Zadworny, D., Murata, Y. and Seo, H. (2006) 'DHCR24 gene knockout mice demonstrate lethal dermopathy with differentiation and maturation defects in the epidermis', *J Invest Dermatol*, 126(3), pp. 638-47.
- Miyazaki, M., Dobrzyn, A., Elias, P. M. and Ntambi, J. M. (2005) 'Stearoyl-CoA desaturase-2 gene expression is required for lipid synthesis during early skin and liver development', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(35), pp. 12501-6.
- Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Caputo, R., Carelli, S. and Ghidoni, R. (1993) 'Ceramide composition of the psoriatic scale', *Biochim Biophys Acta*, 1182(2), pp. 147-51.
- Müller, M., Essin, K., Hill, K., Beschmann, H., Rubant, S., Schempp, C. M., Gollasch, M., Boehncke, W. H., Harteneck, C., Müller, W. E. and Leuner, K. (2008) 'Specific TRPC6 channel activation, a novel approach to stimulate keratinocyte differentiation', *J Biol Chem*, 283(49), pp. 33942-54.
- Offord, E. A., Gautier, J. C., Avanti, O., Scaletta, C., Runge, F., Krämer, K. and Applegate, L. A. (2002) 'Photoprotective potential of lycopene, beta-carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts', *Free Radic Biol Med*, 32(12), pp. 1293-303.
- Palombo, P., Fabrizi, G., Ruocco, V., Ruocco, E., Fluhr, J., Roberts, R. and Morganti, P. (2007) 'Beneficial long-term effects of combined oral/topical antioxidant treatment with the carotenoids lutein and zeaxanthin on human skin: a double-blind, placebo-controlled study', *Skin Pharmacol Physiol*, 20(4), pp. 199-210.
- Patzelt-Wenczler, R. and Ponce-Pöschl, E. (2000) 'Proof of efficacy of Kamillosan(R) cream in atopic eczema', *Eur J Med Res*, 5(4), pp. 171-5.
- Piazena, H. and Kelleher, D. K. (2010) 'Effects of infrared-A irradiation on skin: discrepancies in published data highlight the need for an exact consideration of physical and photobiological laws and appropriate experimental settings', *Photochem Photobiol*, 86(3), pp. 687-705.
- Piazena, H., Pittermann, W., Müller, W., Jung, K., Kelleher, D. K., Herrling, T., Meffert, P., Uebelhack, R. and Kietzmann, M. (2014) 'Effects of water-filtered infrared-A and of heat on cell death, inflammation, antioxidative potential and of free radical formation in viable skin--first results', *J Photochem Photobiol B*, 138, pp. 347-54.
- Prost-Squarcioni, C. (2006) '[Histology of skin and hair follicle]', *Med Sci (Paris)*, 22(2), pp. 131-7.
- Pullmannová, P., Staňková, K., Pospíšilová, M., Skolová, B., Zbytovská, J. and Vávrová, K. (2014) 'Effects of sphingomyelin/ceramide ratio on the permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes', *Biochim Biophys Acta*, 1838(8), pp. 2115-26.

- Randhawa, M., Seo, I., Liebel, F., Southall, M. D., Kollias, N. and Ruvolo, E. (2015) 'Visible Light Induces Melanogenesis in Human Skin through a Photoadaptive Response', *PLoS One*, 10(6), pp. 1-14.
- Rassner, G. (2002) *Dermatologie Lehrbuch und Atlas*. 7. Aufl. edn. München; Elsevier Urban und Fischer.
- Rogers, J., Harding, C., Mayo, A., Banks, J. and Rawlings, A. (1996) 'Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons', *Arch Dermatol Res*, 288(12), pp. 765-70.
- Saint Léger, D., François, A. M., Lévêque, J. L., Stoudemayer, T. J., Grove, G. L. and Kligman, A. M. (1988) 'Age-associated changes in stratum corneum lipids and their relation to dryness', *Dermatologica*, 177(3), pp. 159-64.
- Schellenberg, I., Kabrodt K. (2010) 'Optimierung einer AMD 2-Methode zur Bestimmung von Stratum corneum-Lipiden' *CAMAG Bibliography Service*, 105, pp. 11-12
- Schempp, C. M., Kirkin, V., Simon-Haarhaus, B., Kersten, A., Kiss, J., Termeer, C. C., Gilb, B., Kaufmann, T., Borner, C., Sleeman, J. P. and Simon, J. C. (2002) 'Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis', *Oncogene*, 21(8), pp. 1242-50.
- Schempp, C. M., Pelz, K., Wittmer, A., Schöpf, E. and Simon, J. C. (1999) 'Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant Staphylococcus aureus and gram-positive bacteria', *Lancet*, 353(9170), pp. 2129.
- Schempp, C. M., Winghofer, B., Lüdtkke, R., Simon-Haarhaus, B., Schöpf, E. and Simon, J. C. (2000) 'Topical application of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells', *Br J Dermatol*, 142(5), pp. 979-84.
- Schempp, C. M., Hezel, S. and Simon, J. C. (2003) '[Topical treatment of atopic dermatitis with *Hypericum* cream. A randomised, placebo-controlled, double-blind half-side comparison study]', *Hautarzt*, 54(3), pp. 248-53.
- Schempp, C. M., Meinke, M. C., Lademann, J., Ferrari, Y., Brecht, T. and Gehring, W. (2012) 'Topical antioxidants protect the skin from chemical-induced irritation in the repetitive washing test: a placebo-controlled, double-blind study', *Contact Dermatitis*, 67(4), pp. 234-7.
- Schieke, S. M., Schroeder, P. and Krutmann, J. (2003) 'Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms', *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 19(5), pp. 228-34.
- Schroeder, P., Lademann, J., Darvin, M. E., Stege, H., Marks, C., Bruhnke, S. and Krutmann, J. (2008) 'Infrared radiation-induced matrix metalloproteinase in human skin: implications for protection', *J Invest Dermatol*, 128(10), pp. 2491-7.

- Senaldi, G., Pointaire, P., Piguet, P. F. and Grau, G. E. (1994) 'Protective effect of N-acetylcysteine in hapten-induced irritant and contact hypersensitivity reactions', *J Invest Dermatol*, 102(6), pp. 934-7.
- Sigma Aldrich: 253324 - 3-Carboxy-PROXYL, [online] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/92071?lang=de®ion=DE> [10.12.2016].
- Souza, C., Maia Campos, P., Schanzer, S., Albrecht, S., Lohan, S. B., Lademann, J., Darvin, M. E. and Meinke, M. C. (2017) 'Radical-Scavenging Activity of a Sunscreen Enriched by Antioxidants Providing Protection in the Whole Solar Spectral Range', *Skin Pharmacol Physiol*, 30(2), pp. 81-89.
- Steinert, P. M. and Marekov, L. N. (1995) 'The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope', *J Biol Chem*, 270(30), pp. 17702-11.
- Tawada, C., Kanoh, H., Nakamura, M., Mizutani, Y., Fujisawa, T., Banno, Y. and Seishima, M. (2014) 'Interferon- γ decreases ceramides with long-chain fatty acids: possible involvement in atopic dermatitis and psoriasis', *J Invest Dermatol*, 134(3), pp. 712-8.
- Thyssen, J. P. and Kezic, S. (2014) 'Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis', *J Allergy Clin Immunol*, 134(4), pp. 792-9.
- Uchida, Y., Nardo, A. D., Collins, V., Elias, P. M. and Holleran, W. M. (2003) 'De novo ceramide synthesis participates in the ultraviolet B irradiation-induced apoptosis in undifferentiated cultured human keratinocytes', *J Invest Dermatol*, 120(4), pp. 662-9.
- van Smeden, J. and Bouwstra, J. A. (2016) 'Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients', *Curr Probl Dermatol*, 49, pp. 8-26.
- Vermeij, W. P., Alia, A. and Backendorf, C. (2011) 'ROS quenching potential of the epidermal cornified cell envelope', *J Invest Dermatol*, 131(7), pp. 1435-41.
- Warren, R., Wertz, P. W., Kirkbride, T., Brunner, M. and Gross, M. C. (2011) 'Comparative analysis of skin surface lipids of the labia majora, inner thigh, and forearm', *Skin Pharmacol Physiol*, 24(6), pp. 294-9.
- Weerheim, A. and Ponec, M. (2001) 'Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography', *Arch Dermatol Res*, 293(4), pp. 191-9.
- Welsch, U. and Deller, T. (2010) *Lehrbuch Histologie*. 3. Aufl. edn. München: Elsevier Urban & Fischer.

- Werfel, T., Aberer, W., Augustin, M., Biedermann, T., Fölster-Holst, R., Friedrichs, F., Gieler, U., Heratizadeh, A., Kapp, A., Przybilla, B., Rietschel, E., Schlaeger, M., Schmid-Grendelmeier, P., Sitters, H., Staab, D., Szczepanski, R., Vieluf, D., Voigtmann, I. and Worm, M. (2009) '[Atopic dermatitis: S2 guidelines]', *J Dtsch Dermatol Ges*, 7 Suppl 1, pp. 1-46.
- Wrona, M., Korytowski, W., Rózanowska, M., Sarna, T. and Truscott, T. G. (2003) 'Cooperation of antioxidants in protection against photosensitized oxidation', *Free Radic Biol Med*, 35(10), pp. 1319-29.
- Yamamoto, A., Serizawa, S., Ito, M. and Sato, Y. (1991) 'Stratum corneum lipid abnormalities in atopic dermatitis', *Arch Dermatol Res*, 283(4), pp. 219-23.
- Yoshikawa, N., Imokawa, G., Akimoto, K., Jin, K., Higaki, Y. and Kawashima, M. (1994) 'Regional analysis of ceramides within the stratum corneum in relation to seasonal changes', *Dermatology*, 188(3), pp. 207-14.
- Zastrow, L., Groth, N., Klein, F., Kockott, D., Lademann, J., Renneberg, R. and Ferrero, L. (2009) 'The missing link--light-induced (280-1,600 nm) free radical formation in human skin', *Skin Pharmacol Physiol*, 22(1), pp. 31-44.

7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sophia Arndt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „In vivo- und ex vivo-Bestimmung der kutanen radikalfangenden Eigenschaften einer hyperforinhaltigen Hautcreme mittels eines L-Band Elektronen-Spin-Resonanz-Spektrometers und Messung der Cremewirkung auf die extrazelluläre Lipidmatrix“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

8. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9. Publikationsliste

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Sophia Arndt hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

S. Arndt, S.F. Haag, A. Kleemann, J. Lademann, M.C. Meinke, Radical protection in the visible and infrared by a hyperforin-rich cream-*in vivo* versus *ex vivo* methods, Experimental Dermatology, 2013:

100% Messung, 90% Auswertung, 50% Schreiben, 50% Ideen- und Methodenentwicklung

Publikation 2:

S. F. Haag, K. Tscherch, S. Arndt, A. Kleemann, I. Gersonde, J. Lademann, S. Rohn, M.C. Meinke, Enhancement of skin radical scavenging activity and stratum corneum lipids after the application of a hyperforin-rich cream, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2014:

80% Messung, 60% Auswertung, 40% Schreiben, 40% Ideen- und Methodenentwicklung

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

10. Danksagung

Ich möchte mich bei dem gesamten Team vom „Center of Experimental & Applied Cutaneous Physiology“ unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. J. Lademann für die angenehme Zusammenarbeit, die warmherzige Aufnahme in das Team und die Unterstützung herzlich bedanken.

Meiner Betreuerin, Frau Prof. Dr. rer. nat. M. Meinke, gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des spannenden Arbeitsthemas, die durchgehend herzliche starke Unterstützung und Motivation sowie die vielen anregenden, wertvollen und wegweisenden Diskussionen.

Außerdem möchte ich mich bei S. Schanzer, Dr. rer. nat. St. Haag, St. Albrecht und Dr. rer. nat. S. Lohan herzlich für die Einführung in die Arbeit am ESR-Gerät, die Hilfe bei den Arbeiten mit der Computer-Software, die Unterstützung bei der Auswertung und die ständige Diskussionsbereitschaft herzlich bedanken.

Frau Dr. rer. nat. A. Kleemann und der Firma Klosterfrau möchte ich für die Unterstützung und die Herstellung bzw. Überlassung der Testcremes danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. S. Rohn und Frau Dr. rer. nat. K. Tscherch für die kooperative Zusammenarbeit und die Auswertung der Lipidproben.

Auch bei den Probanden, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, möchte ich mich herzlich bedanken für die recht zeitaufwändige Mitarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinen Mitdotorandinnen Annette, Anna und Monika, sowie meinen Freunden Thomas, Susann, Anne, Jan, Tobias, Ksenia, Marius, Nadja und Antje für Ihre tatkräftige Unterstützung bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, Anna, meinen Omas und René, die mir in jeglicher Lebenslage liebevoll, unterstützend und bedingungslos zur Seite stehen und mich immer wieder motivieren.