

Aus dem Leibniz-Institut für
umweltmedizinische Forschung (IUF)
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jean Krutmann

**Eine Interventionsstudie mit dem
Nahrungsergänzungsmittel Pycnogenol® und dessen
physiologische und molekular-genetische
Auswirkungen auf postmenopausale Frauen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Annapia Formann

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. J. Windolf

Referent: Prof. Dr. med. J. Krutmann

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. G. Fritz

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Marini A, Grether-Beck S, Jaenicke T, Weber M, Burki C, Formann A, Brenden H, Schönlau F, Krutmann J, (2012), Pycnogenol® effects on skin elasticity and hydration coincide with increased gene expressions of collagene type I and hyaluronic acid synthase in women. *Skin Pharmacology and Physiology*, 25(2):86-92.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Die menschliche Haut	1
1.2 Das Sonnenlicht und dessen schädliche Wirkung auf die Haut	2
1.3 Ultraviolett induzierte molekulare Marker	4
1.4 Freie Radikale	6
1.5 Intrinsische und extrinsische Hautalterung	7
1.6 Antioxidantien als Bestandteil von Nahrungsergänzungsmitteln	8
1.6.1 Carotinoide	8
1.6.2 Lycopene	9
1.6.3 Flavonoide	9
1.6.4 Grüner Tee	10
1.5.5 Botanische Antioxidantien	11
1.7 Einfluss der Antioxidantien auf die Lebensmittelindustrie	12
1.8 Wirkstoff Pycnogenol®	13
1.8.1 Die Geschichte	13
1.8.2 Inhaltsstoffe	14
1.8.3 Wirkungen und Eigenschaften Pycnogenols®	16
1.8.4 Einsatzbereiche von Pycnogenol®	19
1.9 Wissenschaftliche Fragestellung	20
2. Methodik	22
2.1 Studiendesign	22
2.2. Mögliche unerwünschte Nebenwirkungen	25
2.3 Geräte und untersuchte Parameter	26
2.3.1 Sellamed 2000 (UVA-Bestrahlung)	27
2.3.2 Corneometer CM 825 (Hautfeuchtigkeit)	27
2.3.3 Cutometer MPA 580 (Hautelastizität)	29
2.3.4 Colorimetrie- Chromameter CR 300 (Hautfarbe)	32

Inhaltsverzeichnis

2.3.5 Visioscan VC 98 (Hautoberflächenprofil)	34
2.3.6 Hautbiopsie (molekulare Marker)	35
2.3.7 Ultraschall- Dermascan C (Hautdicke und –dicke)	36
2.4 Statistik	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Antioxidativer Status der Probanden	38
3.2 Corneometrie	40
3.3 Cutometrie	42
3.4 Colorimetrie des Gesäßes	45
3.5 Colorimetrie des linken Unterarms	48
3.6 Visioscan-Oberflächenprofil	50
3.7 Ultraschall	54
3.8 Hautbiopsie/PCR	56
3.8.1 Bestandteile der extrazellulären Matrix	56
3.8.2 Marker für oxidativen Stress	57
4. Diskussion	60
4.1 Wirkungen auf Hautparameter	61
4.2 Wirkung auf die extrazelluläre Matrix	62
4.3 Wirkungen auf UV-induzierte Marker	64
4.4 Wirkung Pycnogenols®	64
4.5 Kritische Betrachtung und weiterführende Gedanken	65
5. Zusammenfassung	67
6. Offenlegung	68
Literaturverzeichnis	69

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der menschlichen Haut	2
Abbildung 2: Procyanidine	15
Abbildung 3: Cutometer- Parameter	30
Abbildung 4: Antioxidativer Zustand der Probanden	39
Abbildung 5: Hautfeuchtigkeit	40
Abbildung 6: Hautfeuchtigkeit sortiert nach vorheriger Feuchte	41
Abbildung 7: Hautfeuchte sortiert nach Studienbeginn	42
Abbildung 8: Hautelastizität	43
Abbildung 9: Hautelastizität R2 und R7 nach Hautfeuchte sortiert	44
Abbildung 10: Colorimetrie vor Pycnogenolgabe Tag 8/9	46
Abbildung 11: Colorimetrie nach Pycnogenolgabe Tag 91/92	46
Abbildung 12: Colorimetrie des linken Arms	48
Abbildung 13: Rauigkeit	50
Abbildung 14: Schuppigkeit	51
Abbildung 15: Weichheit	52
Abbildung 16: Faltigkeit	53
Abbildung 17: Hautdicke und –dicke	55
Abbildung 18: PCR-Ergebnisse Col1A1/Col1A2/HAS-1	56
Abbildung 19: PCR-Ergebnisse ICAM-1/HO-1/MMP-1/IL-1/IL-6	58

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusatzstoffe von Pycnogenol.....	15
Tabelle 2: Methodik und Wirkung über Pycnogenolhaltige Nahrungsergänzungsmittel	21
Tabelle 3: Studienablauf 1	24
Tabelle 4: Studienablauf 2	25
Tabelle 5: Inhaltsstoffe der angewendeten Pycnogenolkapsel	25
Tabelle 6: ITA° Werte mit Pigmentierungsgrad	33
Tabelle 7: Gene und Primer der real-time PCR	36
Tabelle 8: Punktestand des jeweiligen Probanden.....	39
Tabelle 9: Hautfeuchtigkeit	41
Tabelle 10: R2 und R7	44
Tabelle 11: Röte am Gesäß	47
Tabelle 12: Bräunung am Gesäß.....	47
Tabelle 13: Helligkeit am Gesäß	47
Tabelle 14: Röte am Unterarm.....	49
Tabelle 15: Bräune am Unterarm.....	49
Tabelle 16: Helligkeit am Unterarm	49
Tabelle 17: Rauigkeit.....	50
Tabelle 18: Schuppigkeit	51
Tabelle 19: Weichheit	52
Tabelle 20: Faltigkeit	53
Tabelle 21: Dicke und Dichte	55
Tabelle 22: Col1A1/Col1A2/HAS-1	57
Tabelle 23: ICAM-1/HO-1/MMP-1/IL-1/IL-6	59

1. Einleitung

1. Einleitung

1.1 Die menschliche Haut

Die Haut ist mit einer Fläche von circa 1,5-2 m² das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie übt eine Schutz- und Barrierefunktion aus: vor Umweltexpositionen wie Sonnenlicht oder Kälte, vor zu viel Feuchtigkeitsverlust und vor Infektions- und Verletzungsgefahren. Weitere Aufgaben sind die Absorption von Strahlung, die Temperaturregulierung, die Sinneswahrnehmung, die immunologische Überwachung und die Bildung von Vitamin D unter dem Einfluss von Sonnenlicht. Ihre leicht saure Oberfläche mit einem pH-Wert von 5,7 gewährleistet das Zurückhalten eindringender Keime. Durch Schwitzen sichert sie die Temperaturregulierung, da sie bis zu 10 Liter Flüssigkeit am Tag abgeben kann. Sie ermöglicht die Resorption gelöster Stoffe, indem diese entlang der Haarfollikel in die tiefen Hautschichten vordringen (1). Die Haut ist ein lebenswichtiges Organ des Körpers - bei zum Beispiel Verbrennungen von über 20 % kann sich ein lebensbedrohlicher Zustand durch zu hohen Salz- und Wasserverlust entwickeln (2).

Die Haut besteht aus mehreren strukturellen Bereichen und ist anatomisch eingeteilt in Cutis und Subkutis. Zur Cutis gehören die Epidermis und die Dermis, welche sich beide wiederum in mehrere Schichten unterteilen lassen und fest miteinander verzahnt sind (1). Eine schematische Darstellung der Haut zeigt Abbildung 1.

Die Epidermis ist ein an der Oberfläche gelegenes, mehrschichtig verhorntes Plattenepithel, welches durchschnittlich 50 µm dick ist und hauptsächlich aus Keratinozyten besteht. Sie gliedert sich in Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum (nur in der Leistenhaut zu finden) und Stratum corneum. Stratum basale und spinosum werden als Stratum germinativum zusammengefasst, welche als Regenerationsschicht der Epidermis diese circa alle 30 Tage komplett erneuert (1) (3). Die Wachstumsstimulation der Keratinozyten im

1. Einleitung

Stratum basale ist unter anderem abhängig von Zytokinen, sowie von UV-Licht (4).

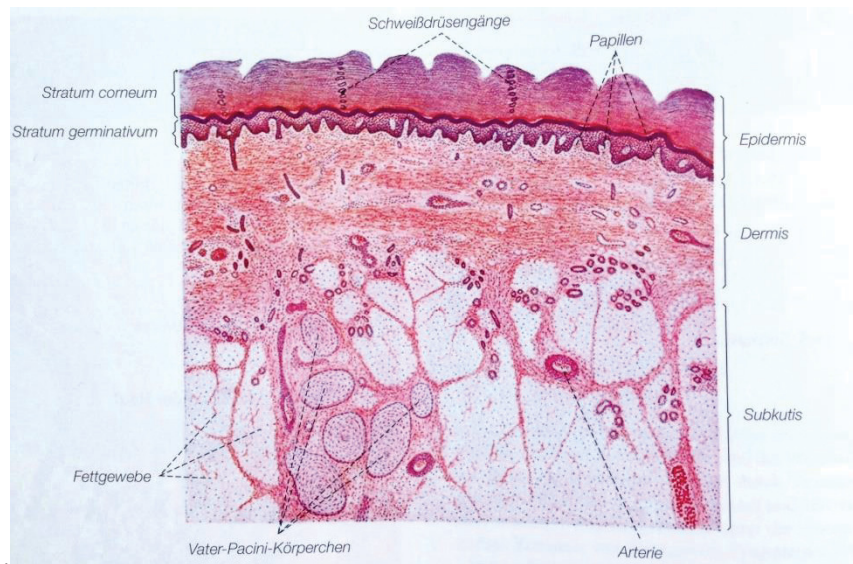


Abbildung 1: Aufbau der menschlichen Haut, aus (1)

Die Dermis dient der Ernährung und der Verzahnung der gefäßfreien Epidermis. Sie besteht vorwiegend aus Bindegewebsfasern (Kollagen und Elastin) und wird eingeteilt in ein Stratum papillare und reticulare. In ihr liegen außer Blut- und Lymphgefäßen die Talgdrüsen, die Haarwurzeln und zahlreiche Sinnesrezeptoren (3) (2).

Die aus lockerem Binde- und Fettgewebe bestehende Subcutis führt die größeren Blutgefäße und die Nerven für die oberen Hautschichten. Sie dient vor allem der Verschieblichkeit der Haut. Bestandteile der Dermis wie Haarwurzeln und Drüsen können in sie hineinragen (2).

1.2 Das Sonnenlicht und dessen schädliche Wirkung auf die Haut

Das Sonnenlicht unterteilt sich in sichtbares, Infrarot- und UV-Licht. Ultraviolettes Licht gliedert sich in drei Anteile. Es besteht aus einem UVC-Anteil mit einer Wellenlängen von 200-290 nm, welches bis zur Ozonschicht reicht und somit

1. Einleitung

keinen Einfluss auf die Haut ausübt. Ein ebenfalls hoher energetischer Anteil bildet das UVB-Spektrum mit einer Wellenlänge von 290-320 nm, welches bis zur Epidermis gelangt. An die Dermis kommen nur Strahlen mit einer Länge von 320-400 nm, diese werden als UV-A bezeichnet (5).

Das Stratum basale der Epidermis reagiert auf UVB-Strahlen mit der Induktion der Melanogenese (Bräunung) sowie mit der Reaktion des Sonnenbrandes. Das Erythem (Hautrötung) entwickelt nach acht Stunden sein Maximum (6). Das Melanin ist für die Hautfarbe verantwortlich und besteht aus dem Eu- und dem Phaeomelanin und soll die Haut vor UV-Licht schützen (7). Des Weiteren schädigt das UVB-Licht jedoch vor allem die DNA-Strukturen, sodass es durch Anhäufungen von Mutationen auf genetischer Ebene zur Entstehung von Hautkrebs kommen kann (8).

Das zur Dermis gelangende UVA-Licht induziert ein verzögertes Erythem, da es sein Maximum erst nach 24 Stunden erreicht. Im Gegensatz zur UVB-Strahlung schädigt es die DNA-Strukturen nicht direkt, sondern indirekt über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Diese greifen bei Ungleichgewicht die DNA an- man spricht von oxidativem Stress (9). Genauer in Kapitel 1.4 Freie Radikale.

Somit stellt das Sonnenlicht für die Haut einen exogenen Stressfaktor dar. Eine zu starke UV-Licht-Exposition kann zu einer direkten Schädigung der DNA führen oder indirekt über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bzw. freier Radikale. Diese Modifikation an DNA, Lipiden und Proteinen kann zu weitreichenden Folgen wie Hautkrebs, Dermatosen, Hautalterung und Erythemen führen. Des Weiteren können Hyperpigmentation, Sonnenbrand, Ödeme und Immunsuppression Folge von zu starker Sonnenlichteinwirkungen sein (5) (10).

1. Einleitung

1.3 Ultraviolett induzierte molekulare Marker

Wie im voran gegangenen Kapitel dargestellt, verfügt die UV-Strahlung über eine schädliche Wirkung gegenüber der Haut. Die durch die UV-Strahlung hervorgerufene molekulare Antwort und dessen Beeinflussung durch ein Antioxidans werden in dieser Arbeit untersucht. Die in der Studie untersuchten molekularen Marker für UV-induzierte Hautschäden werden in diesem Kapitel vorgestellt.

Hämoxygenase-1 (HO-1): Hämoxygenasen existieren im menschlichen Körper in zwei Isoformen: der induzierbaren (HO-1) und der konstitutiven (HO-2) Form. Die induzierbare HO-1 wird durch diverse Stimuli wie zum Beispiel TGF- β , Platelet-derived-growth-factor(PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), NO, Lipidperoxide, Hypoxie, UVA-Strahlen und oxidativen Stress hochreguliert. In der vorliegenden Studie sind die beiden zuletzt genannten Stimuli am bedeutendsten. Die konstitutive HO-2 wird unabhängig von exogenen und endogenen Faktoren in Gehirn, Endothel und Hoden gebildet. Das Enzym Hämoxygenase baut das im Hämoglobin enthaltene Häm zu Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid ab (11). Biliverdin und dessen Abbauprodukt Bilirubin dienen als physiologische Antioxidantien (12). Viele Studien geben Hinweise darauf, dass die HO-1 Induktion *in vivo* an die schnelle Schutzreaktion vor oxidativem Stress an die Ferritinsynthese assoziiert ist (13).

Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1): Die MMP-1 spaltet vor allem Kollagen I und III und ist ein Schlüsselenzym für den Abbau der extrazellulären Matrix im Kollagen und Bindegewebe (14). Die Expression dieser Protease erhöht sich rasch durch UV-A-, UV-B- und Infrarot-A-Strahlen und hängt mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zusammen. Die durch UV-induzierten ROS führen zu einer Stimulation des AP-1 Transkriptionsfaktors, welcher als Teil einer Signalkette die MMP-1 Expression hochreguliert (15). Einen gegenteiligen Effekt auf

1. Einleitung

die MMP-1 Expression übt die intrazelluläre Oxidoreduktase Thioredoxin-1 aus, welche durch die Herabregulation der MMP-1 die schädlichen Effekte von UV-A-Strahlen in den dermalen Fibroblasten abpuffert (16).

Collagen type 1 alpha 1 und 2 (Col1A1 und Col1A2): Diese beiden Gene sind die Vorstufen des im Bindegewebe enthaltenen Kollagens. In der gesunden Haut hat sich ein Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau hergestellt. Durch physiologisches Hautaltern, aber genauso durch exogene Faktoren wie zum Beispiel UV-Strahlen, reduziert sich die Col1A1/2 Expression und kann somit zu verstärkter Faltenbildung führen. Dieser Reaktion wirkt wie schon in der MMP-1 Expression, die Oxidoreduktase Thioredoxin-1 entgegen, indem sie die UV-B induzierte Reduzierung der Kollagenexpression unterdrückt (16).

Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1): Dieses Adhäsionsmolekül spielt für das Eindringen von inflammatorischen Zellen wie den neutrophilen Granulozyten eine zentrale Rolle. Die Transkription von ICAM-1 ist durch oxidativen Stress, Interleukin-1 sowie durch den Tumornekrosefaktor- α induzierbar und ist abhängig von der Aktivität der reaktiven Sauerstoffspezies (17). *In vitro* Versuche zeigten, dass die ICAM-1-Expression durch UV-Strahlen erhöht wurden, man aber durch Zugabe von Antioxidans diese aber auch senken konnte (18).

Hyaluronsäuresynthase-1 (HAS-1): Das Enzym HAS ist wichtig für die Produktion der Hyaluronsäure und hängt daher mit der Hautfeuchtigkeit zusammen. Es ist das Schlüsselenzym in Bezug auf die Hautfeuchtigkeit und liegt in drei verschiedenen Formen vor (HAS-1/2/3) (19). Die Hyaluronsäure ist in allen Geweben der Wirbeltiere und sogar in einigen Bakterien zu finden. Die Carboxylgruppe der Hyaluronsäure ist neben anderen chemischen Gruppen an der Wasserbindungskapazität beteiligt. Ihr kommt somit eine tragende Rolle in Bezug auf die Elastizität und Viskosität der Haut zu (20). Verschiedene Wachstumsfaktoren wie

1. Einleitung

PDGF-BB, TGF-beta-1 und Insulinwachstumsfaktor, sowie auch chronische UV-B-Belastung, beeinflussen und modulieren die Transkription der HAS (21) (22).

Interleukin 1 und 6 (IL-1/6): Die Zytokine IL-1 und 6 sind Teil des Immunsystems und durch verschiedene Stimuli, unter anderem UV-Strahlen, induzierbar. IL-1 wird aus Keratinozyten sezerniert und besitzt eine proinflammatorische Eigenschaften (23). IL-6 wird vor allem aus Makrophagen sezerniert und ist beteiligt an der Synthese von MMP-1 aus Fibroblasten (24).

1.4 Freie Radikale

Freie Radikale sind chemisch instabile hochreaktive Moleküle. Sie besitzen ein Elektron oder mehrere ungepaarte Elektronen und sind bestrebt, ihren instabilen Zustand durch das Entreißen von Elektronen aus anderen Molekülen auszugleichen. Freie Radikale haben vielzählige Angriffsziele. An der DNA führen sie zu Brüchen und Mutationen, an Lipiden stören sie durch deren Veränderung den Transport und die Zellfunktion, und an Proteinen verändern sie deren biologische Aktivität. Bei vermehrter Radikalbildung überwiegen die prooxidativen Prozesse - man spricht von oxidativem Stress. Freie Radikale sind an der Pathogenese verschiedener Krankheiten wie zum Beispiel neurodegenerativer und kardiovaskulärer Leiden, aber genauso an Hautalterung und Krebs beteiligt (25). Zwei Arten von Schutzmechanismen wirken den freien Radikalen entgegen. Zum einen gibt es DNA-Reparaturenzyme, die den durch die Radikale verursachten DNA-Schaden beheben sollen. Zum anderen gibt es antioxidative Systeme, die die freien Radikale abfangen sollen, bevor schädliche Prozesse einsetzen. Das antioxidative System unterteilt sich in enzymatische und nicht-enzymatische Radikalfänger (26). Enzyme wie die Katalase und die Glutathionperoxidase reduzieren zum Beispiel Wasserstoffperoxide, die Superoxiddismutase wandelt Superoxide um und schützt so die Zelle vor Oxidation. Nicht-enzymatische Radikalfänger sind unter anderem Vitamin C und E, die aufgrund ihrer hohen Oxidationsfreude

1. Einleitung

als starke Reduktionsmittel fungieren und so freie Elektronen binden und die von ihnen ausgehende Gefahr beseitigen (25).

Aufgrund dieser Eigenschaft kommt den antioxidativen Systemen verstärkte Aufmerksamkeit zuteil, da sie natürlichen Schutz bieten und problemlos in der Nahrung oder als Ergänzungsmittel zu sich genommen werden können. Einige ausgewählte Ergänzungsmittel werden in Kapitel 1.6 Antioxidantien als Bestandteil von Nahrungsergänzungsmitteln vorgestellt.

1.5 Intrinsische und extrinsische Hautalterung

Grundsätzlich muss die intrinsische von der extrinsischen Hautalterung abgegrenzt werden. Die intrinsische Alterung spiegelt die „normale“, chronologische Alterung wider, wohingegen die extrinsische durch exogene Faktoren wie zum Beispiel ultraviolettes Licht vorzeitig hervorgerufen wird. Die dabei beobachtbaren klinischen und morphologischen Charakteristika dieser beiden Prozesse unterscheiden sich voneinander. So sind unter anderem feine Falten, gleichmäßige Pigmentierung, geringe Zelldysplasien und ein normaler Melaniningehalt kennzeichnend für die intrinsische Hautalterung. Im Gegensatz dazu stehen für die extrinsische Hautalterung Merkmale wie grobe Falten, unregelmäßig gefleckte Pigmentierung, ausgedehnte Zelldysplasien und ein vermehrter Melaniningehalt. Sowohl UVA- als auch UVB-Strahlung spielen eine ursächliche Rolle in der extrinsisch bedingten Hautalterung. UVA dringt wie oben genannt bis zur fibroblastenreichen Dermis vor und erzeugt so in dieser reaktive Sauerstoffspezies, welche direkt zur Expressionsinduktion der Matrixmetalloproteinase führen. Weitere Arbeiten zeigen auch, dass eine UVB induzierte DNA-Schädigung eine erhöhte Matrixmetalloproteinasetranskription und -expression auslöst (27).

1. Einleitung

1.6 Antioxidantien als Bestandteil von Nahrungsergänzungsmitteln

1.6.1 Carotinoide

Als Carotinoide bezeichnet man eine große Gruppe an natürlich vorkommenden Farbstoffen. Unterteilt sind sie in die Carotine und die Xanthophylle. Das prominenteste und am häufigste vorkommende Carotinoid ist das β -Carotin. Obst und Gemüse, welches reich an Carotinoiden ist, bewirkt basierend auf epidemiologischen Beobachtungen einen Abfall des Risikos für verschiedene Leiden, insbesondere in Hinblick auf bestimmte Krebsarten und Augenerkrankungen (28).

Strukturell handelt es sich zumeist um ungesättigte Kohlenwasserstoffketten und deren Oxidationsprodukten. Die Kohlenstoffdoppelbindungen sind vor allem für die antioxidative Eigenschaft der Carotinoide verantwortlich und besitzen somit eine starke Scavenger-Funktion. Sie schützen als protektives Agens durch Quenching Zellen vor freien Radikalen, indem sie selber mit den freien Radikalen reagieren. In nun durch das aufgenommene freie Elektron angeregtem Zustand, wandelt sie dessen Energie in Wärme um und geben es an ihre Umgebung ab und gehen so unverändert aus der Reaktion hervor. Lycopon wird dabei als effektivster Quencher betrachtet (29).

Studien mit Zellkulturen unterstützen die Annahme, dass Carotinoide die zellulären Signalwege modulieren (30). Sie greifen direkt über Gap junctions in die Signalwege ein, sie beeinflussen die Zellzyklusprogression, die Membran-Rezeptor-abhängigen Pathways und haben Einfluss auf die Genexpression durch Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren. Diese biologischen Effekte sind bei der Hautprotektion von Bedeutung und könnten sich auf die Hautstruktur auswirken (31). Des Weiteren zeigten verschiedene Studien, dass Carotinoid in Blutplasma und Haut, UV-Licht absorbieren und somit die Haut vor dessen schädlicher Wirkung schützen kann (32). Als oraler Sonnenprotektor ist β -Carotin der bekannteste. Basierend auf Interventionsstudien zeigt β -Carotin präventive Eigenschaften gegen-

1. Einleitung

über UV-induzierten Erythemen (33). Es ist in seiner Effektivität jedoch nicht mit normaler Sonnencreme vergleichbar (34).

1.6.2 Lycopene

Lycopene sind der Klasse der Carotinoide zuzuordnen und finden sich als Farbgeber in hoher Konzentration in Tomaten. Reife Tomaten besitzen einen Lycopengehalt von 3,9-5,6 mg pro 100 g Frucht. Phytofluene und Phytoene sind Lycopenvorläufer, sie sind im Gegensatz zu Lycopenen farblos, aber absorbieren genauso UV-Licht (35).

Die protektive Wirkung von Lycopenen gegen UV-induzierte Erytheme untersuchten u.a. W. Stahl, H. Sies et al. 2005 in Düsseldorf: 36 gesunde Probanden nahmen über zwölf Wochen verschiedene lycopenhaltige Nahrungsergänzungsmittel zu sich. Es konnte in der *in vivo* Studie belegt werden, dass Lycopenen, Phytofluene und Phytoene eine UV-Absorption unterbinden bzw. vermindern und so einen sonnenschützenden Effekt besitzen (35).

1.6.3 Flavonoide

Flavonoide sind eine Untergruppe der Polyphenole und reich an die für die Scavenger-Funktion wichtigen Hydroxylgruppen (36). Aufgrund ihrer gegenüber Vitamin C und E stärkeren höheren antioxidativen Aktivität wird ihnen eine entsprechende hohe Wertigkeit zugeschrieben (37). Flavonoide-enthaltende Phytomedikamente werden als antiinflammatorisch und antiallergisch wirkende Ergänzungsmittel verkauft. Des Weiteren werden sie präventiv gegenüber einigen Krebsarten und kardiovaskulären Fehlregulationen suggeriert (38). Angewandt in vielzähligen *in vitro* Experimenten erwiesen sie sich als effektives Antioxidans gegen Singulett-Sauerstoff, Peroxylradikale oder Hydroxylradikale, deren pro-

1. Einleitung

oxidativen Reaktionen in der Lage sind der DNA, Lipiden oder auch Proteinen Schaden zuzufügen - Prozesse, die in Verbindung mit degenerativen Erkrankungen stehen (39).

Die Bioverfügbarkeit spielt bezüglich der Effektivität der Flavonoide eine entscheidende Rolle. Die in unserer Ernährung vorkommenden Flavonoide sind nicht unbedingt diejenigen, die die beste Bioverfügbarkeit aufweisen - viele Flavonoide unterliegen dem *First Pass Effekt* (40). Weitere Betrachtungen der Flavonoide, die auch in Pycnogenol® enthalten sind, folgen im Kapitel 1.8.

1.6.4 Grüner Tee

Durch die Protektion in Bezug auf maligne Veränderungen in verschiedenen Organsystemen gewann Grüner Tee an Berühmtheit (41). Dieser Effekt beruht auf den polyphenolischen Bestandteilen des grünen Tees, insbesondere Epicatechin (42). Daneben besitzen auch andere enthaltene Komponenten wie Flavonoide und Caffeine chemoprotektive Eigenschaften (43). Eines der vier Hauptepicatechine im grünen Tee ist Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), welches für die Photoprotektion wirksamste. Der Evidenznachweis der inhibierenden Wirkung gegenüber der Karzinogenese und Hautalterungserscheinungen basiert auf Tierversuchen. Die protektive Eigenschaft des EGCG gegenüber UV-induzierten Erythemen, DNA-Schäden und der Hautalterung ist auch in Studien mit Menschen belegt. Diese resultiert unter anderem durch die Hemmung der Matrixmetalloproteinase und schützt vor extrazellulärem Matrixabbau und vor Verschlechterung der Hautstruktur (44).

1. Einleitung

1.5.5 Botanische Antioxidantien

Zu den wichtigsten botanischen Antioxidantien gehören neben grünem Tee, Granatapfel, Resveratrol, Mariendistel (Silymarin), Genistein und Kurkumin.

Der Granatapfel ist reich an zwei polyphenolischen Komponenten: Anthocyaninen und Tanninen. Er besitzt starke antioxidative, antiinflammatorische und antikanzerogene Eigenschaften (45). Die Vorbehandlung rekonstruierter menschlicher Haut mit Granatapfel bewirkt eine Inhibition von UV-induzierten Erythemen, von Sonnenbrandzellen, von DNA-Schäden und von Matrixmetalloproteinasen (46).

Resveratrol gehört zu den polyphenolischen Flavonoiden und ist unter anderem in Rotwein enthalten. Es besitzt antioxidative, antiinflammatorische und antiproliferative Fähigkeiten (47). Die Vorbehandlung humaner Keratinozyten mit Resveratrol inhibiert die UV-vermittelte Aktivität von NF- κ B, der ansonsten Immunzellen pro-inflammatorisch moduliert (48).

Silymarin ist ein polyphenolisches Flavonoid, es reduziert den oxidativen Stress, die Peroxidation, DNA-Schäden und die Produktion von Radikalen (49). Die antioxidativen und antikanzerogenen Effekte des Silymarins sind in Mausmodellen erprobt. Silymarin inhibiert die UV-induzierte Immunsuppression, indem es die Produktion des Immunstimulator Interleukin-12 steigert (50).

Genistein ist ein Soja enthaltendes Isoflavonoid, dass viel Aufsehen durch seine antioxidativen und antikanzerogenen Eigenschaften in der Haut erregt. Nach topischer Behandlung von Mäusen mit Genistein vor UV-B-Bestrahlung reduzierten sich die Sonnenbrandzellen (51). Genistein zeichnet sich durch ein starkes Potenzial inflammatorische Ödemreaktionen zu reduzieren aus (52). Die mit Genistein behandelte rekonstruierte menschliche Haut behält nach UVB-Exposition in höherem Maße die Fähigkeit zur kutanen Proliferation und zur Reparatur von DNA-Schäden (53).

1. Einleitung

Kurkumin ist der Farbgeber des gelben Kurkumas. Es besitzt vielfältige pharmakologische Aktivitäten und somit ein breites klinisches Anwendungsgebiet: antiinflammatorisch, antioxidativ, antiproliferativ, antikanzerogen, antimikrobiell und wundheilungsfördernd (54). Die molekulargenetische Basis für seine chemoprotektiven Effekte gründet auf verschiedenen Targets: Transkriptionsfaktoren, Apoptosegene, Wachstumsregulatoren, Angiogeneseregulatoren und Zelladhäsionsmolekülen (55).

Da multiple Pathways und Targets in die Prozesse der Hautalterung und der Fotokarzinogenese involviert sind, könnte eine Mixtur verschieden wirkender botanischer Antioxidantien eine effektive Strategie dagegen bilden.

1.7 Einfluss der Antioxidantien auf die Lebensmittelindustrie

Das Wissen über die vielfältigen, protektiven Fähigkeiten der Antioxidantien trug dazu bei Untersuchungen hinsichtlich deren Nutzbarkeit für die Lebensmittelindustrie anzustellen. Roberfroid prägte so in den späten 90ern den Begriff „*functional food*“ – Essen sollte, egal ob es nährstoffreich oder essentiell ist, einen fördernden Effekt auf die physiologischen Funktionen im Körper ausüben und positive Wirkungen auf das Wohlbefinden und die Gesundheit haben bzw. Krankheitsrisiken reduzieren (56).

Aus diesem Grund gerieten auch UV-Radiation und oxidativer Stress zunehmend ins Blickfeld, da durch den heutigen Lebensstil neben einer schneller voranschreitenden Hautalterung ebenso ein Anstieg der an Hautkrebs und Dermatosen Erkrankten zu verzeichnen ist. So wächst das Interesse an neuen Entwicklungen, die gesundheitsschädliche und alterserzeugende Prozesse abschwächen können, wobei die Antioxidantien immer mehr an Bedeutung gewinnen. Unter anderem untersuchten Afaq und Mukhtar die Schutzwirkung einer erhöhten Zufuhr natürlicher flavonoidreicher Antioxidantien mit der Nahrung, die sie bei oben genannten botanischen Antioxidantien feststellten (10).

1. Einleitung

Bekanntermaßen zeigt der Verzehr von Obst und Gemüse durch die darin enthaltenen Antioxidantien eine positive Wirkung gegenüber freien Radikalen. Um die Effektivität der verschiedenen Antioxidantien weiter zu verstärken, sollten diese bei der Nahrungsaufnahme in Kombination zugeführt werden, da die Wirksamkeit von nur einem unter dem einer Mixtur bleibt. Auch sind die niedriger konzentrierten Antioxidantien den stärker konzentrierten überlegen (57).

Durch dieses stetig wachsende Interesse an antioxidativen Substanzen konnte sich die Lebensmittelindustrie diesen vielversprechenden Erkenntnissen nicht mehr verwehren. DeFelice kündete schon 1995 Veränderungen in der industriellen Lebensmittelproduktion an - Nahrungsmitteln sollten antioxidative Substanzen zugesetzt werden. Die Aufgabe der Industrie sei es, die Verarbeitung von Nahrungsergänzungsmitteln auszubauen und deren klinische Bedeutung dem Verbraucher zu demonstrieren. Zum Einsatz sollen gesundheitsfördernde, krankheitsreduzierende und schönheitsfördernde Substanzen kommen (58). Dieses hat die Lebensmittelindustrie auch schon teilweise umgesetzt - einigen Getreide- und Vollkornprodukten sind Antioxidantien zugefügt (59).

1.8 Wirkstoff Pycnogenol®

1.8.1 Die Geschichte

Die an der Küste Nordamerikas lebenden Indianer benutzten Pflanzen, um verschiedenen Arten von Krankheiten vorzubeugen bzw. diese zu heilen, darunter auch der Strandkieferrindenextrakt. Bei einer Expedition 1535 kam Jaques Cartier mit dem Rindenextrakt in Kontakt und schrieb sein neu erlangtes Wissen nieder (60). Dieser Bericht brachte 1951 Jaques Masquelier, welcher schon drei Jahre zuvor die antioxidative Wirkung der Procyanidine in Erdnusshäuten feststellte, nun dazu auch die wertvollen Procyanidine in dem Kieferrindenextrakt zu isolieren. Durch die bessere Zugriffsmöglichkeit boten die Kiefern eine nützliche Al-

1. Einleitung

ternative und wurden in die manufaktorielle Herstellung integriert (61). Mittlerweile nutzt man Pycnogenol® eher seltener zu therapeutischen Maßnahmen als zu diätetischen bzw. kosmetischen Zwecken. Das Anbaugebiet der Kiefer befindet sich in Süd-West-Frankreich und unterliegt den dortigen Standardkontrollen (60).

1.8.2 Inhaltsstoffe

Pycnogenol® ist ein Extrakt aus der Strandkieferrinde und reich an Polyphenolen. An besonders wichtigen Polyphenolen sind die Flavonoide (Procyanidine), Tannine, Phenolsäure und Stilbenes enthalten (61).

Polyphenole sind Benzolderivate, die in freier Form oder an Glukose verestert vorliegen können. Sie sind Antioxidantien und gelten als krebsvorbeugend und haben Einfluss auf die Immunreaktion (60). Es handelt sich um aromatische Verbindungen, die am aromatischen Ring eine oder mehrere Hydroxylgruppen tragen. Somit sind sie wasserlöslich und können gut mit der Nahrung aufgenommen werden (62).

Procyanidine sind natürlich vorkommende Stoffe, die zur Gruppe der Flavonoide gehören. Als Oligomere sind sie meist an C4→C6 bzw. C4→C8 mit Katechin- und/oder Epicatechineinheiten verknüpft, welche die monomeren Grundbausteine darstellen. Die Abbildung 2 zeigt die Strukturformel der Procyanidine. Sie und die Flavonole sind nicht wie die anderen Flavonoide an Zuckermoleküle gebunden. Durch ihren ungesättigten Strukturcharakter besitzen sie eine antioxidative Stärke (61). Procyanidine lassen sich nicht nur in der Kieferrinde finden, sondern unter anderem auch in schwarzem bzw. grünem Tee, Heidelbeeren, Erdbeeren, schwarzen Kirschen, Moosbeere, Rotkohl, Rotwein und Traubenkernen (63).

1. Einleitung

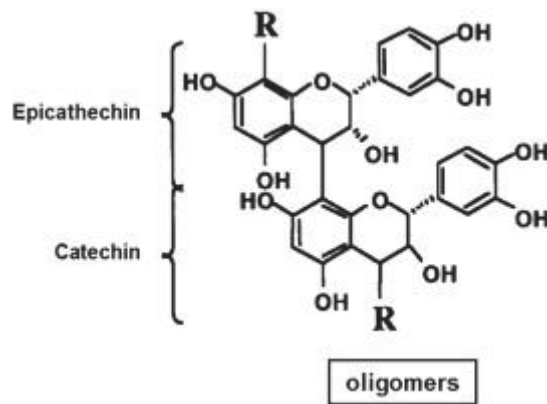


Abbildung 2: Procyanidine, aus (61)

In der Pycnogenolextraktanalyse werden die folgende Phenole identifiziert: Ferulasäure, Kaffeesäure, Taxifolin und Katechin (61).

Die Ferulasäure ist ein potentes Antioxidans und ein starker UV-Absorbierer. Sie wirkt synergistisch mit Vitamin C, E und β -Carotin. In Kombination bewirkt sie einen verdoppelten Hautschutz (37).

Kaffeesäure gehört genau wie die Ferulasäure zu den Hydroxycimtsäuren. In Tierversuchen zeigt sich eine hemmende Wirkung auf induziertem Magenkrebs und ein inhibierender Effekt auf die endogene kanzerogene Nitrosebildung (64).

Taxifolin ist ein Flavanonol, eine Untergruppe der Flavonoide. Es besitzt aufgrund seiner ungesättigten Strukturverbindungen einen antioxidativen Charakter (65).

Zusätzlich enthält Pycnogenol® noch andere anorganische Stoffe, die sich aus Tabelle 1 entnehmen lassen.

Tabelle 1: Zusatzstoffe von Pycnogenol

Stoff	Menge (mg/g)	Stoff	Menge(mg/g)
Procyanidine	80%	Selen	0,002
Wasser	8%	Magnesium	0,004
Eisen	0,065	Kupfer	0,003

1. Einleitung

Zink	0,004	Calcium	0,9
Kalium	0,5		

Die Metabolisierung der in Pycnogenol® enthaltenen Phenole beschrieben Düweler und Rohdewald im Jahr 2000: die Ferulasäure und das Taxifolin sind nach 18 Stunden aus dem menschlichen Organismus mit dem Urin ausgeschieden. Der Peak der Exkretion ist jedoch bereits 2-3 Stunden nach der Einnahme zu beobachten. Die Ausscheidung von Ferulasäure im Urin beträgt 36-43% und die des Taxifolins 7-8%. Zwei weitere Metaboliten ließen sich zusätzlich im Urin identifizieren: Delta-3,4-dihydroxy-phenyl-Gamma-Valerolactone und Delta-3-methoxy-4-hydroxyphenyl-Gamma-Valerolactone. Beide sind mit Glucuronsäure und/oder Sulfat konjugiert. Das Maximum der Ausscheidung findet sich nach 8 bis 12 Stunden und die komplette Exkretion nach 28-34 Stunden. Diese Studie demonstriert somit, dass die Substanzen aus der Strandkieferrinde vom menschlichen Körper metabolisiert bzw. genutzt werden können (66).

1.8.3 Wirkungen und Eigenschaften Pycnogenols®

Das Nahrungsergänzungsmittel Pycnogenol® besitzt aufgrund der reichen Anzahl an Antioxidantien vielfältige Wirkungen, sodass im Folgenden auf einige eingegangen wird.

Antioxidative Wirkung zeigt Pycnogenol®, indem es antioxidative Enzyme wie die Katalase und die Glutathionperoxidase steigert bzw. verdoppelt und so den enzymatischen Schutz gegenüber oxidativem Stress verstärkt (60). Die Studie von Sironova et al. 2006 belegte, dass Pycnogenol® zusätzlich einen synergistischen und additiven Effekt in Kombination mit anderen Antioxidantien entfaltet (67).

Antiinflammatorischen Charakter zeigt Pycnogenol® dadurch, dass es die Produktion bzw. die Sekretion von proinflammatorischen Botenstoffen wie Interleukin-1, Leukotrienen, Histamin und ICAM-1 supprimiert (60). In Makrophagen wird durch die Einnahme die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-

1. Einleitung

1 inhibiert- beide sind bedeutend für die Bildung von Interleukin-1 (68). Eine schützende Wirkung gegenüber UV-Licht induzierter Inflammation und Sonnenbrand wurde 2001 von C. Saliou et al. belegt (69).

Positiven Einfluss auf das Hautbild übt Pycnogenol® aus, indem es die wichtigsten Bestandteile der dermalen extrazellulär Matrix- Kollagen und Elastin- vor dessen Abbau schützt. Heute wird davon ausgegangen, dass gerade der durch UV-Licht induzierte Elastizitätsverlust der extrazellulären Matrix zu einem gealterten Hautbild führt (70). In diesem Kontext ist die Fähigkeit Pycnogenols die Enzyme Elastase und Kollagenase zu supprimieren von Bedeutung (60). Pycnogenol® verhindert nicht nur die Degradation von Kollagen und Elastin, sondern besitzt auch noch eine hohe Affinität zu diesen und bindet sie so fester in die Haut ein (71). Weiterer Baustein der extrazellulären Matrix wie die Hyaluronsäure werden durch Aktivitätsreduktion der Hyaluronidase vor zu schnellem Abbau geschützt und tragen so zusätzlich zu einer verbesserten Hautstruktur bei (60). Das Resultat ist somit eine verbesserte Protektion der Haut vor Alterung und UV-Licht.

UV-induzierte Hautschäden werden nicht nur über die genannte Enzymhemmung vermindert- Pycnogenol® greift auch in die Signalwege ein. Der durch UVB-aktivierte Transkriptionsfaktor AP-1, welcher für die Apoptose der Keratinozyten benötigt wird, wird supprimiert. Gleichzeitig induziert Pycnogenol die Proliferation der Keratinozyten, sodass eine gesteigerte Anzahl zu einer verstärkten Schutz- und Barrierefunktion der Haut führt. Die UVA-induzierte COX-Aktivierung bildet reaktive Sauerstoffspezies, die durch Pycnogenolbehandlung abgefangen werden und somit Hautschäden verhindern (72).

Antimikrobielle Wirkung zeigt Pycnogenol® in einer Studie von Rohdewald und Beil, in der die Inkubation von gastrischen Zellen eine Reduktion des Helicobacters pylori um 70 % aufwies (73). Ein mit Staphylokokken beimpftes Fleisch als Nährmedium wurde Pycnogenol® zugegeben, wodurch sich die Keimzahl reduzierte. Dies deutet darauf hin, dass Pycnogenol® auch antimikrobielles Potenzial für die Lebensmittelherstellung birgt (74).

1. Einleitung

In mehreren Interventionsstudien mit flavonoidreichen Nahrungsmitteln lässt sich ein positiver Effekt auf kognitive Leistungen erkennen. Flavonoide verbessern das Erinnerungs- und Lernvermögen durch verstärkte Langzeitpotenzierungen. Auch fand sich ein Zusammenhang zwischen dem fortschreitenden Verlust kognitiver Fähigkeiten an Alzheimer-Demenz Erkrankter und dem Ausmaß an oxidativem Stress, welchem sie ausgesetzt waren. Flavonoide können Neurone schützen, da sie in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke aufgrund ihres Lipidgehaltes zu überwinden. So stellten Ishrat et al. 2009 eine Verminderung des kognitiven Defizites und des oxidativen Schadens im Bereich des Hippocampus von Rattenzellen nach Pycnogenolvorbehandlung fest (75). Darüber hinaus interagieren Flavonoide mit dem MAP-Kinase-Pathway, erhöhen die CREB-Expression und -Aktivität, welche zu einer verbesserten Lern- und Gedächtnisfunktion führen. Diese Forschungen wurde an kortikalen Neuronen von Mäuseembryonen durchgeführt (76).

Pycnogenol® verzeichnet unter anderem auch kardiovaskuläre Wirkungen. Es supprimiert die Plättchenaggregation durch eine verminderte Anzahl an Thromboxanen im Blutplasma. Eine verbesserte Mikrozirkulation wird durch eine erhöhte Konzentration des Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO) erreicht, welcher auch zur Behandlung der Angina pectoris eingesetzt wird. Die durch Pycnogenol® aktivierte NO-Synthase vermittelt somit den vaskulären Effekt (77). Die Pycnogenolbehandlung wirkt sich positiv auf den Sauerstoffpartialdruck aus- er steigt um circa vierzehn Prozent- wodurch eine bessere Hautvitalität bzw. –atmung gewährleistet wird (78).

Pycnogenol® birgt Potenzial für die Behandlung der Psoriasis, da es die betroffenen Calcium-Bindungsproteine beeinflussen kann. Es könnte eine Alternative zur nebenwirkungsreichen UVB-Therapie bieten (79) (80).

1. Einleitung

1.8.4 Einsatzbereiche von Pycnogenol®

Das vielfältige Wirkspektrum Pycnogenols® ergibt einen großen Einsatzbereich. Nachfolgend sind einige Indikationen und Wirkungen von Pycnogenol® aufgelistet:

- bei chronisch venöser Insuffizienz werden Schwellungen, Varizen und Krämpfe reduziert
- bei Asthma bronchiale bzw. COPD nehmen die Symptome ab
- bei Frauen, die unter dem prämenstruellen Syndrom leiden, verringern sich die Unterleibsbeschwerden
- bei Rauchern wird durch Senkung der Thromboxankonzentration die durch Rauchen erhöhte Plättchenaggregation verringert
- bei Bluthochdruck wird durch ACE-Hemmung die hypertensive Aktivität gesenkt
- bei diabetischer Retinopathie wird eine Verbesserung der Ausgangssituation erreicht (81)
- bei ADHS wurde die Konzentrationsleistung gesteigert
- bei Zahnfleischbluten wurden die Symptome gelindert
- bei Migräne konnten Anfallsdauer und Häufigkeit des Auftretens reduziert werden
- bei Sonnenbrand verringerte sich die Erythemanzahl und -größe
- bei Lupus erythematosus wurde eine Symptomlinderung erreicht (61)

Eine weitere interessante, ausbaufähige Anwendung findet sich im Bereich der kognitiven Störungen wie zum Beispiel bei der Alzheimer-Demenz, bei der einige Studienergebnisse positive Wirkungen belegten (76).

Diese vielfältigen Einsatzmöglichkeiten verdeutlichen das Potenzial, welches Pycnogenol® birgt, und unterstreichen die Notwendigkeit der weiteren Erforschung dieser in der Natur vorkommenden Substanz.

1. Einleitung

1.9 Wissenschaftliche Fragestellung

Während der letzten Jahre sind Anzahl und Einsatz von Nahrungsergänzungsmitteln gestiegen. Sie verfolgen u.a. die Intention der Hautalterung vorzubeugen. Bisherige Aussagen über die Wirksamkeit von Nahrungsergänzungsmitteln basieren auf *in vitro* Studien oder limitierten *in vivo* Studien ohne Erhebung molekularer Daten, vgl. Tabelle 2. Hautalterung ist jedoch begleitet und instrumentiert von einer Anzahl bekannter molekularer Veränderungen, welche physiologische Relevanz für die Findung von *Anti-Aging*-Strategien ermöglichen (82) (36).

Pycnogenol® ist ein Kiefernindenextrakt, welches aus den französischen Strandkiefern gewonnen wird. Durch die beinhaltenden Polyphenole, Flavonoide und Epicatechine weist Pycnogenol® eine Vielzahl von biologisch aktiven Substanzen auf, welche bekannt sind für ihren positiven Einfluss auf die Hautalterung (60). In Betracht dazu zeigt Pycnogenol® eine hohe Affinität zu den in der extrazellulären Matrix enthaltenen Proteinen Kollagen und Elastin, welche stark an der Hautalterung involviert sind (71). Entsprechend zeigte eine doppelblind placebokontrollierte Studie mit einem Pycnogenol enthaltendem Medikament an 62 Frauen über sechs Wochen eine starke Verbesserung der visuellen Hautalterungserscheinungen, -weichheit und -elastizität (83).

Die vorliegende Studie soll nun eine Antwort darauf geben, ob das Nahrungsergänzungsmittel Pycnogenol® dieselben positiven Auswirkungen auf molekularer Ebene hervorruft, insbesondere der Einfluss auf die Genexpression der Moleküle Kollagen, Elastin und Hyaluronsäuresynthase. Diese stehen in direkter Verbindung zur Hautelastizität, -feuchtigkeit und -dichte. Des Weiteren wird die protektive Wirkung von Pycnogenol® vor UVA-Strahlen betrachtet.

Über die alleinige chromametrische Bestimmung der Erythementwicklung nach UVA-Bestrahlung hinaus, wird mit Hilfe einer Hautbiopsie die Beeinflussung der

1. Einleitung

molekularen Marker genetisch untersucht. Gleichzeitig wird die antioxidative, antiinflammatorische Wirkung Pycnogenols® auf die Hautbeschaffenheit im Verlauf der Studie untersucht und auch auf genetischer Ebene bestimmt.

Tabelle 2: Methodik und Wirkung über Pycnogenolhaltige Nahrungsergänzungsmittel

Studie	Wirkung	Methodik
(60)	Hyaluronidase sinkt (Kakegawa et al)	Mesenteriale Mastzellen der Ratte (<i>in vitro</i>)
	Elastase supprimiert (Jonade et al)	Schweinepankreas (<i>in vitro</i>)
	Inhibition von ICAM-1	HaCaT-Zelllinie aus human Keratinozyten (<i>in vitro</i>)
(84)	Antioxidative Wirkung	Tierversuch (<i>in vivo</i>)
(72)	Stimulation der Keratinozytenproliferation	Hautzellen der Ratte (<i>in vivo</i>)
	Verhinderung der UVB-induzierten Apoptose in Keratinozyten	HaCaT-Zellen aus humanen Keratinozyten (<i>in vitro</i>)
(69)	Sonnenschützender Effekt	Visuelle Evaluation der an Probanden UV-induzierten Erytheme (<i>in vivo</i>)
	Reduktion des NF-κB	HacaT-Zellen aus humanen Keratinozyten (<i>in vitro</i>)
(68)	Reduktion des NF-κB	Humane Plasmauntersuchung (<i>in vivo</i>)
(71)	Affinität zu Kollagen und Elastin erhöht	Humane Monozyten aus Blutplasma (<i>in vitro</i>)
	Inhibition der MMP-1	Humane Monozyten aus Blutplasma (<i>in vitro</i>)
(85)	Il-1, AP-1, NF-κB in Aktivität inhibiert	Mäusemakrophagen, humane t-Lymphozyten (<i>in vitro</i>)
(86)	Antioxidative, intrazelluläre Glutathionerhöhung	Humane Neuroblastomzellen (<i>in vitro</i>)
(83)	Verbesserte Hautelastizität	Visuelle Evaluation (<i>in vivo</i>)

2. Methodik

2. Methodik

Die vorliegende Interventionsstudie betrachtet während zwölfwöchiger Einnahme des Nahrungsergänzungsmittels Pycnogenol® die kosmetische Wirkung auf die Haut unter besonderer Beobachtung der physiologischen und molekularbiologischen Parameter bei zwanzig postmenopausalen Frauen. Das Alter der Probanden lag zwischen 55-68 Jahren.

Die Studie soll Aufschluss darüber geben, inwieweit Pycnogenol® der UV-induzierten Hautalterung vorbeugen und oxidativen Stress abwehren kann. Gleichzeitig wird der Einfluss auf die physiologischen Hautparameter wie Dicke, Dichte, Farbe, Feuchtigkeit, Oberflächenprofil und Elastizität gemessen. Durch Hautbiopsien wurden molekulare Marker gemessen, die mit zuvor genannten Hauteigenschaften korrelieren.

2.1 Studiendesign

Die Studiendauer betrug 92 Tage. Insgesamt besuchten die zwanzig Probanden das Leibniz Institut für umweltmedizinische Forschung der Universität Düsseldorf gGmbH sechs Mal. Zuerst wurde eine ausführliche Anamnese erhoben, die unter anderem auch die Ernährungsgewohnheiten der Probanden beinhaltete. Es wurden die Einschlusskriterien überprüft: postmenopausale, gesunde Frau zwischen 55-68 Jahren, unauffällige Krankengeschichte, keine Einnahme mit Pycnogenol® interagierender Medikamente, normaler *Bodymass-Index* (BMI zwischen 19-30), Hauttyp II oder III nach Fitz-Patrick-Klassifikation, Kaukasier, normale Essgewohnheiten ohne Einnahme von Vitaminen oder anderen diätetischen Mitteln. Ausschlusskriterien wurden ebenfalls untersucht: Schwangerschaft oder Stillzeit, Genuss von Alkohol, vegetarische Ernährung, Vorliegen von Photodermatosen oder Infektionskrankheiten, bekannte Hautkrebserkrankungen in der Eigen- oder Fremdanamnese, Vorliegen von kardiovaskulären, metabolischen oder endokrinen Erkrankungen, Vorliegen von Hauttyp I, Allergien auf Betäubungsmittel oder

2. Methodik

Nahrungsergänzungsmittel, UV-Bestrahlung durch Urlaub oder Solarien während der gesamten Studiendauer, Vorliegen von Blutgerinnungsstörungen, Vorliegen von Nävi oder Narben sowie Wunden im Bereich des Bestrahlungsareals, regelmäßiger Verzehr von Obst- oder Vitaminsäften.

Nach dem Einschluss der Probanden wurden diese an Tag 8 zur Begutachtung der physiologischen Hautparameter einbestellt. Es wurde jeweils die linke Unterarminnenseite untersucht. Bewertet wurden die Hautfeuchtigkeit, die Hautelastizität, die Hautdicke und -dicke und das Hautoberflächenprofil. Die Hautfarbe (Röte, Bräune, Helligkeit) wurde nicht nur am linken Arm bestimmt, sondern zusätzlich am Gesäß, jeweils vor und nach UVA-Bestrahlung. Das Erythem am Gesäß (4x4 cm groß) wurde mit 100 J/cm² UV-A- Licht induziert. Am nächsten Tag wurde erneut die Hautfarbe des bestrahlten Areals am Gesäß beurteilt und es wurden zwei je vier mm Durchmesser große Hautbiopsien entnommen. Eine Biopsie lag im bestrahlten Areal, die andere außerhalb davon. Ab diesem Zeitpunkt begann die Einnahme von Pycnogenol® bis zum Studienende an Tag 92. Es wurde dreimal täglich eine Kapsel eingenommen. An Tag 49 wurden zum zweiten Mal die physiologischen Hautparameter am linken Unterarm überprüft: die Hautfeuchtigkeit, die Hautelastizität, das Hautoberflächenprofil und die Hautfarbe. An Tag 91 wurde neben den genannten physiologischen Hautparametern von Tag 8 auch das Gesäß erneut mit UVA-Licht bestrahlt. Das bestrahlte Areal wurde dann an Tag 92 erneut auf dessen Hautfarbe hin untersucht, sowie zwei je vier mm Durchmesser große Biopsien entnommen. Eine im bestrahlten Areal, die andere außerhalb. Somit waren die Tage 8 und 91 identisch bzw. Tag 9 und 92. Eine Studienübersicht über die dreizehn Untersuchungswochen zeigen die Tabellen 3 und 4.

2. Methodik

Tabelle 3: Studienablauf 1	
Studientag	Ablauf
1	Einschlusscreening, Anamnese, Erhebung demographischen Daten und die Ernährungsgewohnheiten
8	Begutachtung der physiologischen Hautparameter: Hautfeuchtigkeit, Hautelastizität, Hautdicke und -dichte, Hautoberflächenprofil und Hautfarbe Bestrahlung des 4x4 cm großen Hautareals am Gesäß mit anschließender Beurteilung der Hautfarbe
9	Erneute Beurteilung des bestrahlten Gesäßareals Entnahme zweier vier mm großen Hautareale am Gesäß, eins im bestrahlten Areal, eins außerhalb Beginn der Einnahme von Pycnogenol® dreimal täglich eine Kapsel
49	Begutachtung der physiologischen Hautparameter: Hautfeuchtigkeit, Hautelastizität, Hautoberflächenprofil und Hautfarbe
91	Begutachtung der physiologischen Hautparameter: Hautfeuchtigkeit, Hautelastizität, Hautdicke und -dichte, Hautoberflächenprofil und Hautfarbe Bestrahlung des 4x4 cm großen Hautareals am Gesäß mit anschließender Beurteilung der Hautfarbe
92	Erneute Beurteilung des bestrahlten Gesäßareals Entnahme zweier vier mm großen Hautareale am Gesäß, eins im bestrahlten Areal, eins außerhalb Letzte Einnahme der Pycnogenolkapseln

2. Methodik

Tabelle 4: Studienablauf 2

	Tag 1	Tag 8	Tag 9	Tag 49	Tag 91	Tag 92
Einschlusskriterien, antioxidativer Status	X					
Cutometrie		X		X	X	
Corneometrie		X		X	X	
Ultraschall		X			X	
Visioscan		X		X	X	
Colorimetrie		X	X	X	X	X
UVA-Bestrahlung		X			X	
Hautbiopsie			X			X

In dem Nahrungsergänzungsmittel sind 25 mg Pycnogenol® enthalten, wodurch die Probanden bei drei Mal täglicher Verabreichung auf eine Tagesdosis von 75 mg einnehmen. Eine quantitative und qualitative Inhaltsliste der in der Studie verwendeten Pycnogenolkapsel ist aus der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Inhaltsstoffe der angewendeten Pycnogenolkapsel

	mg/ Kapsel	g/100 g
Acerola (17 % Vitamin C)	323,5	73,858
pflanzliche Kapsel Typ 1	78	17,808
Pycnogenol®	25	5,708
Magnesiumstearat	6	1,37
Kieselsäure	5,5	1,256
Total	438 mg	100 g

2.2. Mögliche unerwünschte Nebenwirkungen

Da Pycnogenol® blutdrucksenkend wirkt, sollte eine Komedikation mit anderen antihypertensiv wirkenden Medikamenten unterbleiben, um Interaktionen zu ver-

2. Methodik

meiden. Aufgrund seiner die Blutungsneigung fördernden Wirkung sollte es auch nicht in Kombination mit gerinnungs- oder die Plättchenaggregation hemmende Medikamenten genommen werden, um mögliche Komplikationen zu verhindern. Diese Eventualitäten wurden vorher mit den Probanden abgeklärt.

Unerwünschte Nebenwirkungen ließen sich in einer Studie an 2000 Personen bei 1,5 % beobachten, welche sich in Kopfschmerzen, Magen-Darm-Beschwerden, Übelkeit und Schwindel äußerten (60).

Insgesamt ist Pycnogenol® ein als sicher (GRAS) eingestuftes Nahrungsergänzungsmittel, wie ein unabhängiges Expertengremium 2003 belegte (81).

Im Ames-Test zeigt sich keine kanzerogene Aktivität von Pycnogenol®. Man stellte keine gefährdenden Veränderungen im Blutbild, Verhalten, Körpergewicht oder in den Essgewohnheiten fest. Die Fertilität ist nicht beeinträchtigt, es bestehen auch keine teratogenen Effekte. Außerdem zeigte die dermatologische Toxizitätsprüfung keine Haut- und Augenirritationen. Allergische Reaktionen wurden bislang nicht beobachtet (60).

2.3 Geräte und untersuchte Parameter

Um die hautphysiologischen Parameter zu erfassen, benutzten wir folgende Geräte: für die Hautfeuchtigkeitsmessung das Corneometer CM 825 (von Courage Khazaka Electronic GmbH, Köln, Deutschland), für die Hautelastizität das Cutometer MPA 580 (von CK Electronic GmbH, Köln, Deutschland), für die Hautdicke und -dicke den Ultraschall Derascan C (von Cortex Technology, Hadsund, Dänemark), für das Oberflächenprofil den Visioscan VC 98 (von CK Electronic GmbH, Köln, Deutschland) und für die Hautfarbe das Chromameter CR 300 (von Konica Minolta, Japan). Die UVA-induzierten Hautareale wurden mit Hilfe des Sellamed 2000 (von Sellas GmbH, Gevelsberg, Deutschland) bestrahlt.

2. Methodik

2.3.1 Sellamed 2000 (UVA-Bestrahlung)

Den Probanden wurde insgesamt zweimal ein 4x4 cm großes Quadrat durch UVA-Bestrahlung am Gesäß induziert- an Tag 8 und 91. Es wurde eine Stelle oberhalb des Gesäßes ausgewählt, in der keine Nävi, Narben oder andere kontra-indizierte Merkmale lagen. Die umliegende Haut wurde abgedeckt. Das Hautareal wurde mit 100 J/cm² UVA-Strahlen für 45 Minuten durch die Teilkörperbestrahlungsanlage Sellamed 2000 bestrahlt. Der Spektralbereich der Anlage liegt zwischen 340-440 nm, was eine UVB-Bestrahlung somit ausschließt. Die Hautareale wurden jeweils vor und 24 Stunden nach Bestrahlung chromametrisch untersucht.

2.3.2 Corneometer CM 825 (Hautfeuchtigkeit)

Das Corneometer misst die Hautfeuchtigkeit bzw. den Wassergehalt im Stratum corneum, welches als Schutzfaktor u.a. der Austrocknung vorbeugt. Die Corneometrie basiert auf dem Kondensatorprinzip. Als Messsonde dient ein Plattenkondensator, der durch eine dünne Folie von der Haut getrennt ist und mit einem konstanten Druck auf die Haut aufgebracht wird. In dieser Studie wurde die linke Unterarmseite genutzt. Das im Stratum corneum enthaltene Wasser beeinflusst nun die Kapazität des Plattenkondensators, da die Hornschicht ein dielektrisches Medium ist, welche eine andere Dielektrizitätskonstante als Wasser besitzt. Somit lassen sich proportionale Veränderungen mit zunehmender Hautfeuchtigkeit der Epidermis feststellen. Die Sensitivität dieser Methode ist bei trockener Haut sehr hoch und nimmt mit zunehmender Feuchtigkeit der Haut ab. Ebenfalls kann die Aktivität der Schweißdrüsen die Messergebnisse beeinflussen, sodass die Messungen in einem klimatisierten und wohltemperierten Raum (24 °C) vollzogen werden sollten (87). Die Dielektrizitätskonstante von Wasser ist 81 und die von anderen Stoffen liegt zumeist unter sieben. So reagiert der Messkondensator auf die in sein Messvolumen eingebrachten Proben mit verschiedenen Kapazitätsänderungen, je nach Wassergehalt, der vorliegenden Probe. Durch das Messobjekt

2. Methodik

fließt kein Strom, da die metallische Leiterbahn auf dem Sondenkopf von der Haut durch die dünne Folie abgetrennt ist. So entsteht auf der einen Seite durch Elektronenüberschuss ein negatives Potential und gleichzeitig auf der anderen ein positives Potential aufgrund Elektronenmangels. Somit kann sich ein elektrisches Feld zwischen den Bahnen mit wechselseitiger Anziehungskraft aufbauen. Während der Messung durchdringt ein elektrisches Streufeld die oberste Hautschicht und die Dielektrizität wird gemessen. Es entstehen keine galvanischen Verbindungen zwischen dem Messkreis und dem Messobjekt sowie keine Polarisations-effekte (88).

Andere Messmethoden, die Hautfeuchtigkeit zu erfassen, wären über die Resonanzfrequenzmessung, die nukleare magnetische Resonanzmessung, die Desquamation und die Impedanzmessung möglich gewesen. Jedoch besitzt die Benutzung des Corneometers einige Vorteile gegenüber den anderen Methoden. Sie ist unbeeinflussbarer gegenüber chemischen Verbindungen, Salzen und auf der Haut aufgetragenen Produkten im Gegensatz zur Impedanzmessung. Die Eindringtiefe des elektrischen Streufeldes ist sehr gering, sodass lediglich die Oberflächenfeuchtigkeit gemessen wird. Außerdem ist die Sonde sehr temperaturstabil und benötigt nur eine kurze Messzeit von einer Sekunde, was einen möglicherweise verfälschenden Okklusionseffekt vermeidet (88). Diese Gründe führten dazu, die Hautfeuchtigkeit mittels Corneometer zu überprüfen.

Die Hautfeuchtigkeit soll nicht unmittelbar nach Auftragen von kosmetischen Produkten wie Cremes und Puder gemessen werden, da diese die Werte verfälschen. Auch bei zu hoher Luftfeuchtigkeit (über 80 %) und zu hohen Temperaturen (über 35 °C) müssen die Aussagen des Hautzustandes relativiert werden (88).

Zur Interpretation der Messergebnisse an der linken Unterarminnenseite sind folgende Unterteilungen vorgenommen worden: bei Werten kleiner 30 liegt eine sehr trockene Haut vor, Werte zwischen 30 und 45 sprechen für eine trockene Haut, Werte über 45 stehen für feuchte Haut (88).

2. Methodik

Des Weiteren folgen hier die technischen Daten des Corneometers CM 825: Messprinzip: kapazitiv, Sonde: 11cm lang, 41 g, Messzeit: 1 Sekunde, Messfrequenz: 0,9-1,2 MHz, Genauigkeit: $\pm 3 \%$ (88).

2.3.3 Cutometer MPA 580 (Hautelastizität)

Das Cutometer misst die Hautelastizität, welche die Haut vor mechanischen Irritationen schützt. Durch Alterung, UV-Strahlen und verschiedene Krankheitsprozesse kann die Elastizität beeinträchtigt werden. Das Verfahren beruht auf einem Vakuum-Saugprinzip. Zur Messung wird ein Messkopf auf das betreffende Areal - in dieser Studie die linke Unterarminnenseite - gesetzt und mit Hilfe einer Vakuumpumpe ein Unterdruck von 20-500 mbar aufgebaut. Die Eindringtiefe bzw. die Ausdehnung der Haut in die Messsonde bei Unterdruck wird optisch über Spiegel und Lichtdetektoren erfasst. Anschließend folgt die Entlastung ohne Vakuum, sodass die Haut je nach Zustand schneller oder langsamer wieder ihre Ausgangssituation erreicht. Die dabei entstehende Deformationskurve ist charakterisiert durch einen elastischen, einen viskösen und einen viskoelastischen Bereich (87).

Anhand der Kurve lassen sich verschiedene Parameter bestimmen, wie in Abbildung 3 zu sehen ist:

2. Methodik

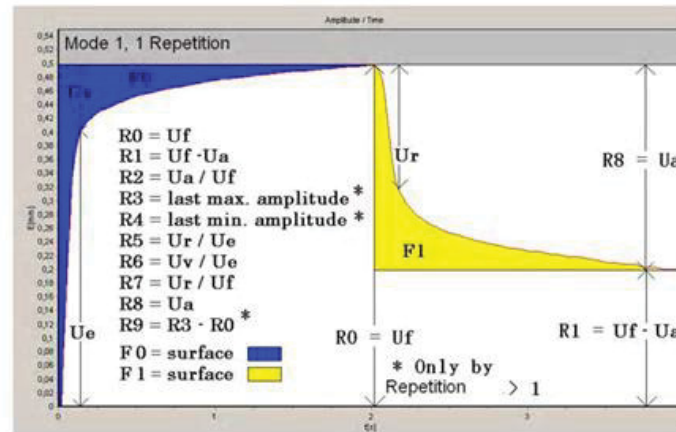


Abbildung 3: Cutometer- Parameter

„R-Parameter“

R0= ist der höchste Punkt der ersten Kurve und gibt Aufschluss über die Festigkeit der Haut; je niedriger dieser Wert, desto fester die Haut.

R1= niedrigster Wert der ersten Kurve: gibt Auskunft über die Rückbildungsfähigkeit der Haut; je kleiner der Wert ist, desto höher ist die Rückstellkraft.

R2= spiegelt die Bruttoelastizität wider und gilt als wichtigster Parameter; je näher er an dem Wert 1 (100%) ist, desto elastischer ist die Haut.

R3= höchster Punkt der letzten Kurve; durch Vergleich mit der ersten Kurve erhält man Rückschlüsse auf die Ermüdungserscheinung der Haut; je kleiner der Wert, desto kleiner ist die Ermüdungserscheinung.

R4= letzter Messpunkt; wird verglichen mit der minimalen Amplitude der ersten Kurve und gibt wie R3 Auskunft über die Ermüdungserscheinung; je kleiner der Wert, desto kleiner ist die Ermüdung.

R5= spiegelt die Nettoelastizität wider; je näher an 1, desto elastischer ist die Haut.

R6= ist der Anteil der Viskoelastizität am elastischen Teil der Kurve; je kleiner der Wert, desto höher die Elastizität.

2. Methodik

R7= ist Anteil der Elastizität an der Gesamtkurve; je näher der Wert an 1, desto elastischer die Haut.

R8= je ähnlicher sich die Werte von R8 und R0 sind, desto höher die Rückbildungsfähigkeit.

R9= gibt die Ermüdungserscheinung der Haut nach mehrmaligem Ansaugen wieder; je kleiner der Wert, desto niedriger die Ermüdung der Haut.

„F(lächen)-Parameter“

F0= Fläche innerhalb des Rechtecks oberhalb der Kurve; je näher der Wert an 0, desto elastischer die Haut.

F1= Fläche innerhalb des Rechtecks unterhalb der Kurve; je näher der Wert an 0, desto elastischer die Haut.

F2= Fläche oberhalb der oberen Envelop-Kurve.

F3= Fläche innerhalb der Envelop-Kurve.

F4= Fläche innerhalb und unterhalb der Envelop-Kurve; je kleiner der Wert, desto fester die Haut (88).

Die Studie von Dobrev et al. 2005 misst die Ermüdungserscheinung der Haut mit Hilfe eines Cutometers. Er verglich junge Haut mit alter und stellte fest, dass die alte Haut ermüdet war als die jüngere. Dies spiegelte sich durch eine Erhöhung von R4, R9 und F2 und einen Abfall von F3 bei älterer Haut wider. Die Parameter R4 und F3 sind indikativ für die Ermüdungserscheinung der Haut (89). Um die Elastizität zu bewerten, sind R2 und R7 die wichtigsten Parameter, wie man der Studie 2007 von S. Ahn et al. entnehmen kann (90). Deshalb wird bei der späteren Auswertung besonderer Wert auf diese Parameter gelegt.

Des Weiteren folgen hier die technischen Daten des Cutometers MPA 580: Spannung: 100-240 Volt, 50-60 Hz, 0,4 Ampere, Sonde: 12,8 cm lang, Genauigkeit:

2. Methodik

ab: 200 µm Eindringtiefe ca. 3 %, unter 100 µm keine Linearität, Auflösung: 1 mbar (88).

2.3.4 Colorimetrie- Chromameter CR 300 (Hautfarbe)

Die Beurteilung der Hautfarbe wird mit dem Chromameter erfasst. Das Verfahren beruht auf einer Tristimulusanalyse von Licht, welches nach Beleuchtung der Haut reflektiert wird. Die Farben werden in einem 3-D-Koordinatensystem mit schwarz-weiß-Achse (L^*), grün-rot-Achse (a^*) und blau-gelb-Achse (b^*) ausgedrückt.

Der L^* -Wert gibt Aufschluss über die Helligkeit. Der a^* -Wert über die Rötung, wie sie zum Beispiel beim Erythem entsteht. Der b^* -Wert spiegelt die Bräunung der Haut wider (87). Bei totaler Dunkelheit (schwarz) nimmt L^* den Wert 0 an, bei sehr starker Helligkeit (weiß) nähert sich L^* dem Wert 100 an.

Die grün-rot-Achse ist so zu deuten, dass bei positiven a^* Werten mehr Rot vorhanden ist und bei negativen a^* Werten mehr Grün. Die blau-gelb-Achse verhält sich ähnlich: positive b^* -Werte sprechen für Gelb, negative für Blau (91).

Zur Quantifizierung der Colorimetrie dienen folgende Größen: Individual Typological Angle (ITA°) und ΔE^* .

ΔE^* ist aus den Parametern L^* , a^* und b^* definiert:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})}.$$

Er gilt als wichtiger Faktor, um das Gesamtbild der Hautfarbe und -reflektion hinsichtlich Veränderungen zu beurteilen (92). ΔE^* sollte im Verlauf der Studie unter Pycnogenoleinnahme abnehmen, damit ein kleinerer Farbunterschied zwischen den Ergebnissen vor und nach UVA-Bestrahlung vorliegt. Da der a^* -Wert Aussage über die Hautröte (Erythem) gibt, sollte er auch im Verlauf der Studie sinken, falls eine protektive Eigenschaft gegenüber UVA-Strahlen vorliegt.

2. Methodik

Der ITA° wird genutzt, um den Hautpigmentierungsgrad zu bestimmen. Er ist definiert durch L* und b*:

$$\text{ITA}^\circ = \arcsin \tan \left(\frac{L^* - 50}{b^*} \times \frac{180}{\pi} \right).$$

Die dabei errechneten Winkelgrade dienen zur Einteilung der jeweilig vorliegenden Hautpigmentierung, vgl. Tabelle 6.

Tabelle 6: ITA° Werte mit Pigmentierungsgrad

ITA° Wert	Hautpigmentierungsgrad
>10 °	stark dunkel
10-28°	dunkel
28-41°	mittel
41-55°	hell, klar
<55°	Sehr hell, klar

Das Chromameter CR300 ist ein kompakter Tristimulus-Farbenanalysator. Die Kopfsonde hat einen Durchmesser von 8 mm für die zu messende Hautoberfläche und hat als Lichtquelle eine „pulsed xenon arc“-Lampe, welche einen Blickwinkel von 0° benutzt. Des Weiteren besitzt er sechs Photorezeptoren: jeweils drei für die Messung der Reflektion und für die Messung der Lichtquelle, sodass man nur das reflektierte Licht für die Farbanalyse nutzt (93). Das Lichtsignal wird von den Photosensoren erfasst und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Dieses gelangt dann zu einem integrierten Mikroprozessor, welcher daraus die Koordinaten des jeweiligen Farbbereiches berechnet (92). Dieser Datenoutput wird in dem oben genannten Koordinatensystem L*, a* und b* wiedergegeben. Diese Bestimmung der Farben in dreidimensionaler Form empfahl 1976 die „*Commission Internationale d’Eclairage*“ (91). Das Chromameter bietet fünf verschiedene Farbsysteme zur Messung der Chromazität und vier Systeme, um die Farbunterschiede zu bewerten (93).

2. Methodik

Des Weiteren folgen hier die technischen Daten des Chromameter CR 300: Rezeptoren: 6 Silikonphotorezeptoren, Lichtquelle: Pulsedxenonarc Lampe, 0°C Blickwinkel, Messfläche: 8 mm Durchmesser, Gewicht: 670 g.

2.3.5 Visioscan VC 98 (Hautoberflächenprofil)

Mit dem Visioscan-Verfahren lässt sich das Hautoberflächenprofil auf die SELS-Parameter hin untersuchen: *Surface Evaluation oft the Living Skin*. Diese sind Weichheit (*smoothness*), Rauigkeit (*roughness*), Faltigkeit (*wrinkles*) und Schuppigkeit (*scaliness*). Die Weichheit berechnet sich mit Hilfe des Durchschnittes von Breite und Tiefe der Falten. Man bestimmt die Schuppigkeit anhand der Trockenheit des Stratum corneum und die Faltigkeit mittels der Proportionen der horizontalen und vertikalen Falten. Die Anreicherung mit Wasser im Stratum corneum führte in Experimenten zu einer Minderung der Falten und Schuppen und zu einer Zunahme der Weichheit. Die Rauigkeit bleibt dadurch hingegen unbeeinflusst. Beeinflussbar ist die Hautoberfläche durch physiologische Faktoren wie Alter und gemessene Körperstelle, genauso jedoch durch externe Faktoren wie Rauchen, Alkohol und Schlaf. Eine hohe Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur können alle Parameter verfälschen, deshalb sollte idealerweise bei 20 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 % gemessen werden (94).

Man benutzt eine Kamera mit einer hohen Auflösung, welche eine ungefährliche UVA-Quelle zur Hautausleuchtung hat (95). Die Ausleuchtung wird erreicht durch zwei spezielle Halogenlichter, welche gleichmäßig und mit einem bestimmten Lichtspektrum arbeiten, sodass nur das Stratum corneum und keine tiefer gelegene Schicht eine Reflektion hervorrufen kann. Die Ausmessungsfläche umfasst ein 6*8 mm großes Areal. Man nimmt das Bild mit einer CCD-Kamera auf. Durch die Verbindung zum PC kann das Bild digitalisiert werden, indem eine 256 Pixel umfassende Skala Pixel um Pixel zuordnet. 0 entspricht schwarz und 256

2. Methodik

weiß. Die Analyse der Hautoberfläche bzw. die Messung benötigt nur 1 Sekunde, die Ergebnisse können in 3D-Bildern dargestellt werden (94).

Des Weiteren folgen hier die technischen Daten des Visioscan VC 98: Spannung: 100-240 Volt, Videokamera: 12,5*5,5*4,5 cm, Lichtquelle: UV-A Kaltlicht (380-395 nm), Ausmessungsfläche: 6*8 mm.

Die gemessenen Daten sind wie folgt zu interpretieren: die Faltigkeit nimmt mit zunehmender Wertgröße zu, genauso verhält es sich mit der Rauigkeit und der Schuppigkeit. Bei den Weichheitswerten gilt: je kleiner der Wert, desto weicher die Haut (94).

2.3.6 Hautbiopsie (molekulare Marker)

Den Probanden wurden in zwei Sitzungen zwei jeweils vier mm Durchmesser große Hautproben entnommen. Das zu entnehmende Areal wurde vorher desinfiziert und mit einem Lokalanästhetikum (Meavarin®) behandelt. Anschließend wurde mit jeweils einem Stich pro Stanzentnahme genäht. Die Aufbewahrung der insgesamt vier entnommenen Gewebeproben pro Proband erfolgte nach Entnahme in flüssigem Nitrogen bei -81°C bis zur weiteren Analyse. Anschließend wurden diese in 600 µl Lysepuffer des RNA-Isolationskits (PeqLab, Erlangen) bei 30 Hz für drei Minuten in einem Mixermill MM300 (Retsch, Haan) aufgeschlossen. Nach RNA-Isolierung schloss sich die photometrische Konzentrationsbestimmung mit 260/280 nm an. Die Umwandlung der gewonnenen RNA zu cDNA geschah mittels reverser Transkriptase. Die anschließende real-time PCR wurde mit der Taq-Polymerase durchgeführt; jede Hautprobe lief als Doppelbestimmung mit entsprechendem Primer ab, vgl. Tabelle 7. Die Untersuchung der jetzt möglichen Genexpression erfolgte auf folgende Marker: Hämoxygenase (HO-1), ICAM-1, Interleukin-1 und 6, Matrixmetalloprotease-1 (MMP-1), Hyaluronsäuresynthase (HAS-1), Col1A1 und Col1A2.

2. Methodik

Tabelle 7: Gene und Primer der real-time PCR

Gen	Primerpaar	Referenz
HO-1	5'-CTGCGTTCCTGCTCAACATC-3' 5'-GCAGAATCCTTGCACTTTGTTGCT-3'	(96)
IL-1	5'-TGTATGTGACTGCCCAAGATGAA-3' 5'-ACTACCTGTGATGGTTTTGGTATC-3'	(97)
IL-6	5'-AGCCGCCCCACACAGA-3' 5'-CCGTCGAGGATGTACCGAAT-3'	(98)
ICAM-1	5'-CCTGGCACCCAGCACAAAT-3' 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'	(99)
MMP-1	5'-GGGAGATCATCGGGACAACCTC-3' 5'-GGGCCTGGTTGAAAAGCAT-3'	(100)
Col1A1	5'-CCTGCGTGTACCCCACTGA-3' 5'-ACCAGACATGCCTGTTGTCCTT-3'	(101)
Col1A2	5'-GATTGAGACCCTTCTTACTCCTGAA-3' 5'-GGGTGGCTGAGTCTCAAGTCA-3'	(102)

2.3.7 Ultraschall- Dermascan C (Hautdicke und -dichte)

Das Ultraschallgerät misst nicht-invasiv die Hautdicke und -dichte mit einer Frequenz von 20 MHz. Das Prinzip basiert auf dem hergestellten Echo: bei der Anwendung des 20 MHz B-Scan, wandelt er jedes Echosignal in Pixel um, welches er dann in einer fiktionalen Farbskala von 256 Farben wiedergibt. Der Wert 0 korreliert mit der Abwesenheit von Echogenität und 256 mit dem Maximum an Echogenität. So entsteht ein repräsentatives Bild der Hautdicke und -dichte. Die Positionierung jedes Pixels von der Oberfläche zur Tiefe ist entsprechend zum Intervall zwischen Echotransmission und Echoantwort angesiedelt, wobei eine konstante Geschwindigkeit von 1580 m/s durch das Gewebe gegeben ist. Abhängig von der Oberflächenstruktur, pathologischen Modifikationen, verschieden

2. Methodik

physikalischen Phänomenen wie Reflektion, Zerstreuung, Refraktion sind die erhaltenen Ergebnisscans zu interpretieren.

Der Hauptentstehungsort der Echogenität der Dermis befindet sich in den Kollagenbündeln, welche als mäßig bis hoch reflektierende Strukturen erscheinen. Die unterschiedlichen Dicken sind der Grund der verschiedenen Echostrukturen des Corneums; wobei meist die obere Schicht mehr Echogenität hervorruft. Die Echogenität verhält sich jedoch invers gegenüber dem Wassergehalt - alle inflammatorischen Prozesse und auch der Wassergehalt erscheinen echoarm. Das heißt, die Dichte würde abnehmen, falls während der Studienzeit der Wassergehalt der Haut ansteigt.

Die Ausarbeitung des B-Scans transformiert den Ultraschall von einer morphologischen zu einer quantitativen Abschätzungsmethode. Es ist möglich, die Bilder zu evaluieren, die visuellen Daten zu quantifizieren und sie so zu statistischen Evaluationen einzusetzen. Diese Methode nutzt man zur Abschätzung des Wassergehaltes der Haut, da eine Wasserabsorption im Stratum corneum zu einer Schalldämpfung des Eingangsechos führt. Die Erhöhung der Hydratation der Haut entspricht einem Verlust der Echogenität der Epidermis, welcher begleitet wird von einer Reduktion der Pixelzahl (103).

2.4 Statistik

Zur Auswertung der Studienergebnisse wurde das Programm Excel 2010 (Microsoft Office) benutzt. Die Grafiken stellen den jeweiligen Mittelwert plus Standardfehler der Daten dar. Zur Signifikanzberechnung wurde der zweiseitige, gepaarte t-Test verwendet. Bei den molekularen Markern wurde der *Wilcoxon signed -rank Test* eingesetzt. Unterschiede wurden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0,05$ war.

3. Ergebnisse

3. Ergebnisse

Alle Teilnehmer waren postmenopausale, gesunde, nicht rauchende Frauen mit dem Hauttyp II (n=13) oder III (n=7) - eingeteilt nach der Fitzpatrick-Klassifikation. Das Alter lag zwischen 55 und 68 Jahren, wobei der Mittelwert des Alters 57,05 Jahre betrug. Alle eingeschlossenen Probanden beendeten die Studie.

3.1 Antioxidativer Status der Probanden

Um vor Beginn der Studie den antioxidativen Status der Probanden zu bestimmen, beantworteten sie einen Ernährungsfragebogen. Dieser gab Aufschluss darüber, wie gesund sie sich ernähren und inwiefern sie schon vor Studienbeginn antioxidative Nährstoffe zu sich nahmen, welche die Ergebnisse der durch Pycnogenolgabe erzielbaren Veränderungen verfälschen könnten. Der Fragebogen war so konzipiert, dass er den Konsum verschiedener Lebensmittel und deren Aufnahmehäufigkeit pro Tag, Woche, Monat oder Jahr erfragte. So erhielt der Proband für zum Beispiel täglichen Genuss von Schokolade 5 Punkte, wohingegen der tägliche Verzehr von Gemüse und Obst mit 0 Punkten bewertet wurde. Je höher die erreichte Punktzahl, desto niedriger war der antioxidative Status des Probanden. Alle Probanden erfüllten das geforderte Einschlusskriterium eines niedrigen antioxidativen Ausgangszustandes. So waren Veränderungen des antioxidativen Status bei Pycnogenolgabe nicht auf andere mit der Nahrung aufgenommene Stoffe zurückzuführen. Die Abbildung 4 gibt den Probandenstatus und die Tabelle 8 die jeweilig erreichte Punktzahl wieder.

3. Ergebnisse

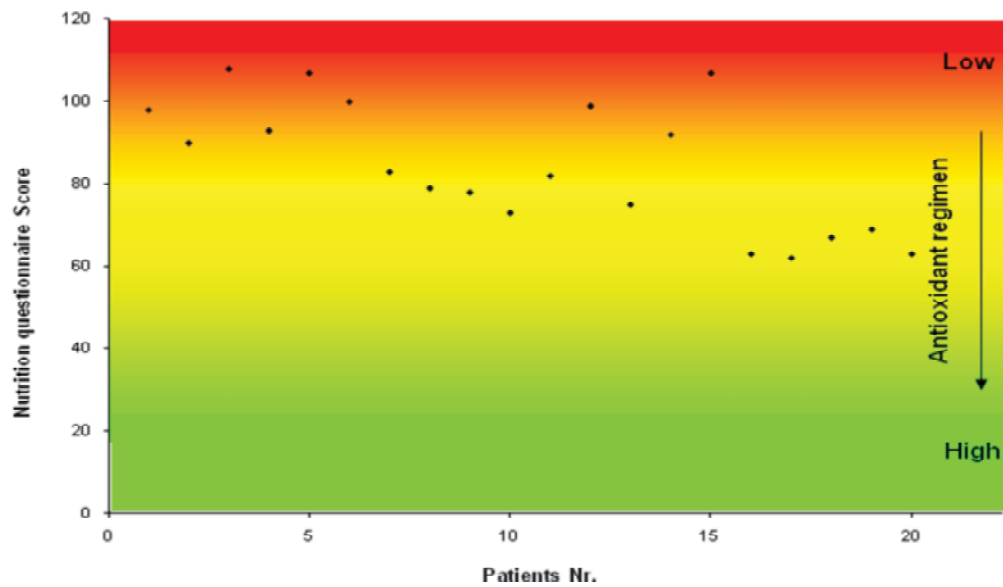


Abbildung 4: Antioxidativer Zustand der Probanden

Tabelle 8: Punktestand des jeweiligen Probanden

Proband	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Score	98	90	108	93	107	100	83	79	78	73
Proband	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Score	82	99	75	92	107	63	62	67	69	63

3. Ergebnisse

3.2 Corneometrie

Die Corneometrie bewertet die Hautfeuchtigkeit. Die Verteilung der jeweiligen Hautfeuchte zu Beginn der Studie sieht wie folgt aus: sehr trockene Haut (n=3), trockene Haut (n=10), feuchte Haut (n=7).

Im Verlauf der Studie zeigte sich in der Hälfte der Zeit eine Verbesserung der Hautfeuchtigkeit (Tag 49 um 7,96 %), welche jedoch zum Studienende hin wieder abnahm (Tag 91 0,3 %), vgl. Abbildung 5 und Tabelle 9. Diese Veränderung war nicht signifikant ($p=0,961$).

Durch Gruppierung in die Subtypen trockene und feuchte Haut ließ sich eine Steigerung der Hautfeuchtigkeit für Probanden mit trockener Haut bis zum Studienende belegen (Tag 49 +20,6 % und Tag 91 +12,31 %). Die Ergebnisse waren fast im signifikanten Bereich ($p=0,104$). Probanden mit feuchter Haut nahmen jedoch konstant an Hautfeuchte ab (Tag 49 -8,78%, Tag 91 -15,02 %), vgl. Abbildung 6. Der t-Test war nicht signifikant ($p=0,1$).

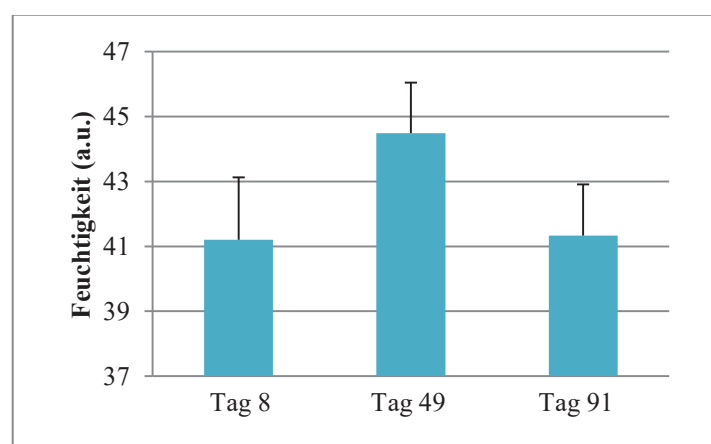


Abbildung 5: Hautfeuchtigkeit

3. Ergebnisse

Tabelle 9: Hautfeuchtigkeit

	Tag 8	Tag 49	Tag 91
Mittelwert Feuchtigkeit	41,21	44,49	41,33
Verbesserung in % in Bezug auf Tag 8	-	7,96	0,3
t-Testung in Bezug auf Tag 8	-	0,206	0,961
Standardfehler	1,92	1,55	1,57

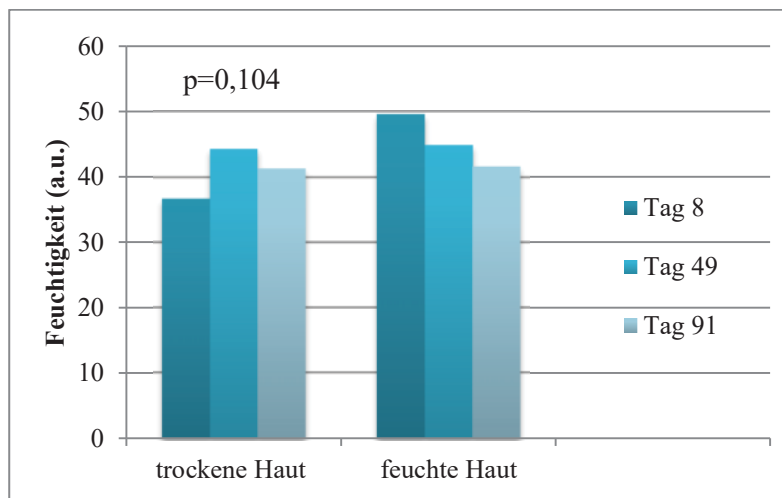


Abbildung 6: Hautfeuchtigkeit sortiert nach vorheriger Feuchte

Unter Berücksichtigung des Eintrittzeitpunktes der Probanden in die Studie war feststellen, dass die Probanden, welche im April begonnen hatten, fast signifikante Verbesserungen der Hautfeuchtigkeit aufwiesen ($p= 0,0613$) und sich bei den jeweiligen Messungen kontinuierlich gesteigert hatten, vgl. Abbildung 7.

3. Ergebnisse

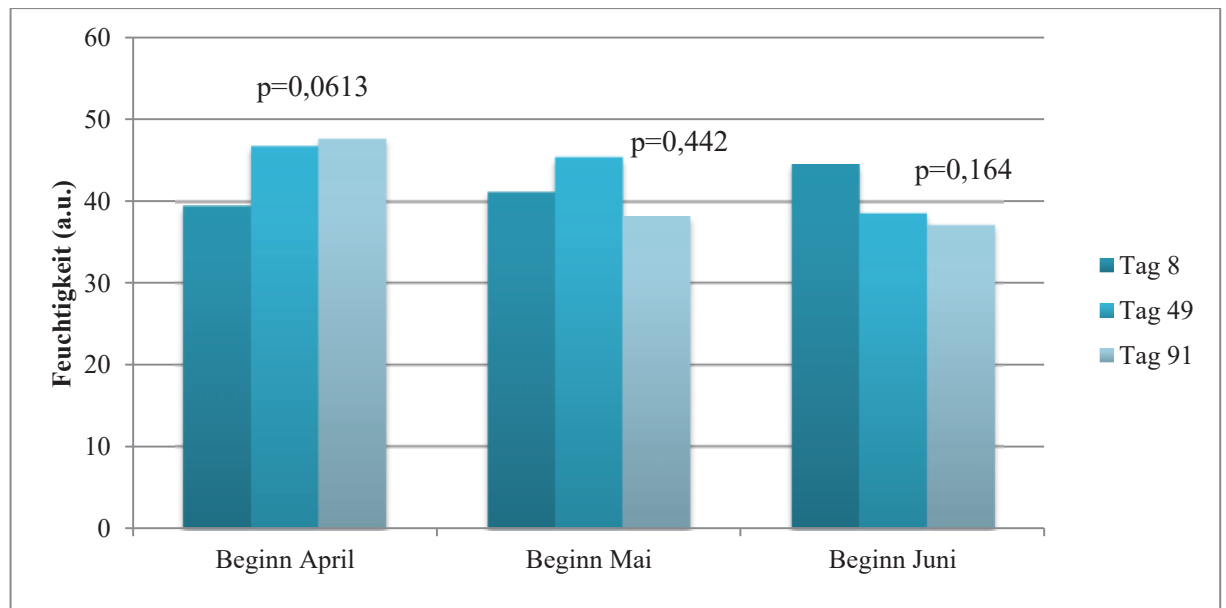


Abbildung 7: Hautfeuchte sortiert nach Studienbeginn

3.3 Cutometrie

Das Cutometer misst die Hautelastizität und reflektiert die Veränderungen und Kompositionen der Hautstruktur, vgl Kapitel 2.3.3

Der R0-Parameter gibt Aufschluss über die Festigkeit: je niedriger er ist, desto fester ist die Haut.

R2 gibt die Bruttoelastizität wieder und wird elastischer, je näher er dem Wert 1 kommt.

R4 spiegelt die Ermüdungserscheinung wider, je kleiner, desto geringer die Ermüdung der Haut.

R5 stellt die Nettoelastizität dar, je näher er dem Wert 1 kommt, desto elastischer.

R6 gibt Auskunft über die Viskoelastizität und wächst durch kleinere Werte.

R7 gibt die Elastizität wieder und je näher er dem Wert 1 kommt, desto elastischer die Haut.

3. Ergebnisse

Alle Parameter, ausschließlich R6, zeigen im Verlauf eine verbesserte Elastizität, vgl. Abbildung 8. Diese sieht im Durchschnitt wie folgt aus: R0 (+9,54 %), R2 (+12,53%), R4 (+24,8%), R5 (+24,68 %), R7 (+21,5%). Bis auf den R0-Parameter sind alle Ergebnisse signifikant: R2 ($p=0,011$), R4 ($p=0,0087$), R5 ($p=0,01$), R6 ($p=0,04$), R7 ($p=0,02$).

Tabelle 10 beinhaltet die wichtigsten Ergebnisse der R2- und R7-Parameter.

Die Abbildung 9 verdeutlicht, dass Probanden mit trockener und sehr trockener Haut erneut einen stärker positiven Pycnogeneffekt aufwiesen (R2: +17,2 % und R7: +32,4 %), im Gegensatz zu Probanden mit feuchter Haut (R2: +4,96% und R7: +0,88%).

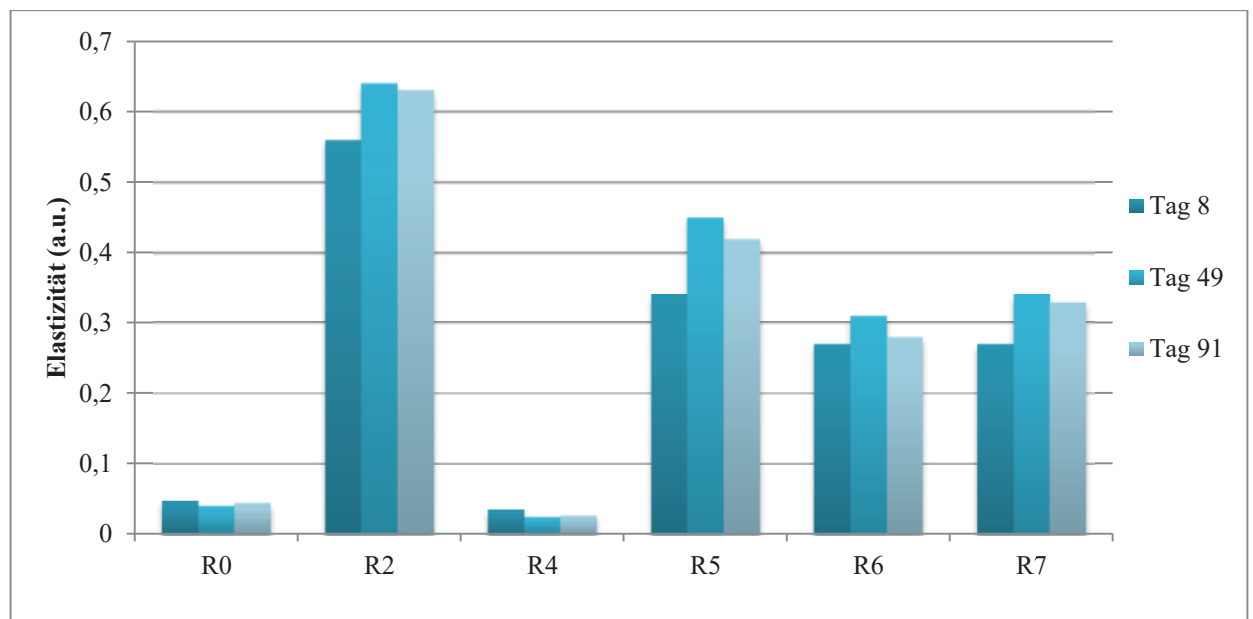


Abbildung 8: Hautelastizität

3. Ergebnisse

Tabelle 10: R2 und R7

	Tag 8	Tag 49	Tag 91
Mittelwert R2	0,56	0,64	0,63
Verbesserung in % in Bezug auf Tag 8	-	14,29	12,55
t-Testung in Bezug auf Tag 8	-	0,0006	0,011
Standardfehler	0,022	0,012	0,013
Mittelwert R7	0,27	0,34	0,328
Verbesserung in % in Bezug auf Tag 8	-	25,9	21,5
t-Testung in Bezug auf Tag 8	-	0,002	0,02
Standardfehler	0,016	0,012	0,014

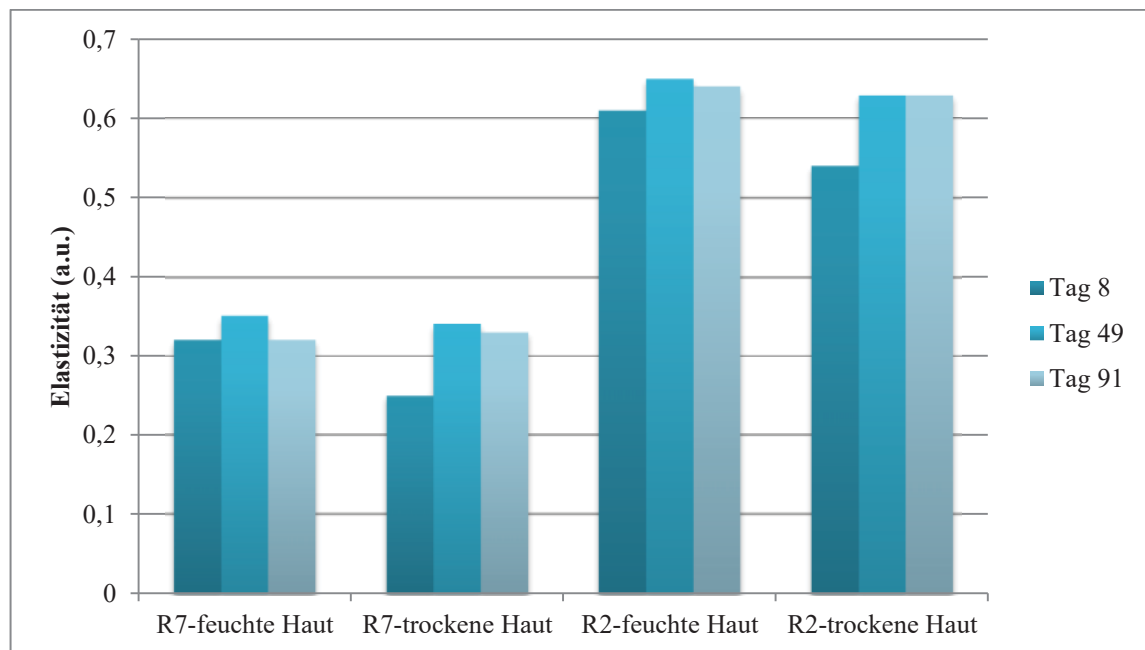


Abbildung 9: Hautelastizität R2 und R7 nach Hautfeuchte sortiert

3. Ergebnisse

3.4 Colorimetrie des Gesäßes

Die Colorimetrie beurteilt die Hautfarbe und mit Hilfe des ITA° und des ΔE^* können die Ergebnisse weiter quantifiziert werden, vgl. Kapitel 2.3.4.

Die Parameter L^* (Helligkeit), b^* (Bräune) und a^* (Röte) zeigten keine Unterschiede vor (Tag 8 und 9) und nach (Tag 91 und 92) Pycnogenoleinnahme. Es ergaben sich keine Veränderungen vor und nach UVA-Bestrahlung, die darauf hinweisen würden, dass ein sonnenprotektiver Schutz von Pycnogenol® ausgehe, vgl. Abbildung 10, 11 und Tabelle 11, 12, 13. Die Ergebnisse waren, ausschließlich bei Parameter b^* , signifikant.

Diese Nicht-Beeinflussung der Hautfarbe/röte unter Pycnogenoleinnahme spiegelt sich auch in der Berechnung des ITA° und des ΔE^* wider.

Die Pigmentierung aller Probanden an Tag 8 vor und nach UV-A-Exposition und an Tag 9 war der Kategorie klare und helle Haut zuzuordnen. Auch war im Vergleich an Tag 91 vor und nach UV-A-Bestrahlung und an Tag 92 dieselbe Kategorie wie vor der Pycnogenoleinnahme gegeben. Die Reaktionen vor und nach Pycnogenoleinnahme zeigten auch keine Veränderungen zu den einzelnen Messzeitpunkten: zum Beispiel verlor an Tag 8 vor und nach UV-A-Bestrahlung der ITA-Wert 29,8 % und an Tag 91 vor und nach UV-A-Belastung 29,7 %. Somit bestätigt der ITA die unveränderte Reaktion nach Pycnogenoleinnahme am Gesäß.

Durch Berechnung des ΔE^* von Tag 8 vor UV-A-Belastung zu Tag 9 erhielt man den Wert 9,6. Das ΔE^* von Tag 91 vor UV-A-Exposition zu Tag 92 ergab den Wert 10,25. Dies lässt erkennen, dass sich die Hautfarbe/röte unter Pycnogenol® nur vernachlässigbar veränderte.

Bei Betrachtung von abhängigen Faktoren wie Hautfeuchte, Alter, Studienbeginn, *Bodymass-Index* zeigte sich nur bei letzteren Korrelationen in den Rötungswerten a^* . Adipöse Probanden reagierten mit einer deutlich stärkeren Erythembildung auf

3. Ergebnisse

die UVA-Bestrahlung als Normalgewichtige vor Pycnogenolgabe (Tag 8 und 9 +14,52% oberhalb des Mittelwertes). Nach Pycnogenolgabe blieb jedoch eine protektive Wirkung aus, die adipösen Probanden lagen wiederholt über dem Mittelwert der Normgewichtigen.

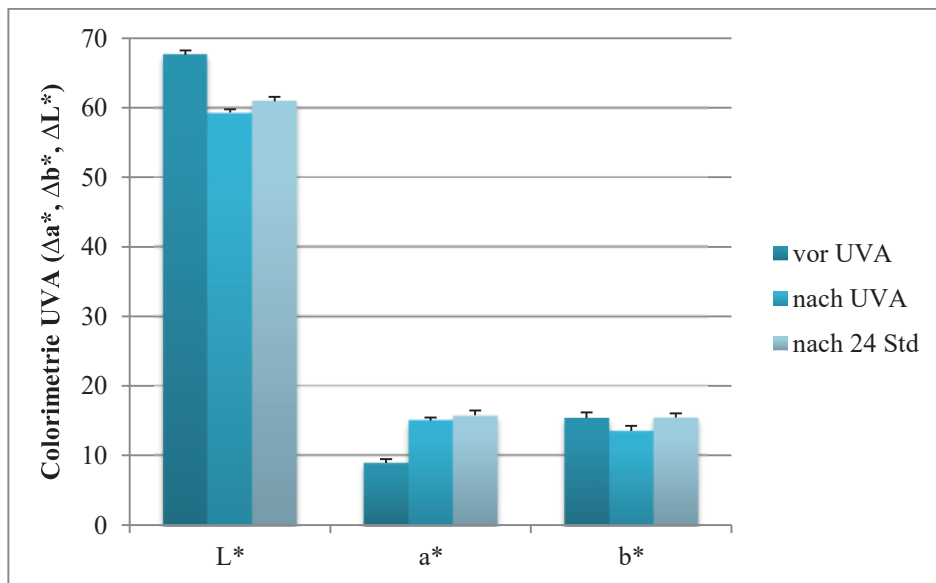


Abbildung 10: Colorimetrie vor Pycnogenolgabe Tag 8/9

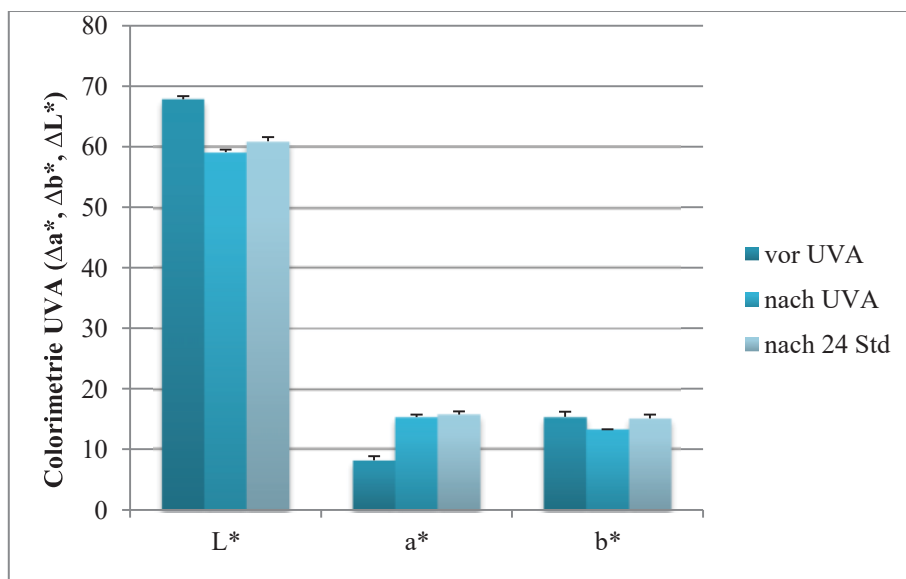


Abbildung 11: Colorimetrie nach Pycnogenolgabe Tag 91/92

3. Ergebnisse

Tabelle 11: Röte am Gesäß

Röte am Gesäß	Tag 8	Tag 8 nach UVA	Tag 9	Tag 91	Tag 91 nach UVA	Tag 92
Mittelwert Δa^*	8,92	15,04	15,77	8,17	15,32	15,76
Steigerung in % in Bezug auf Tag 8	-	68,61	76,7	-	87,52	92,9
Standardfehler	0,603	0,474	0,652	0,497	0,45	0,733

Tabelle 12: Bräunung am Gesäß

Bräunung am Ge- säß	Tag 8	Tag 8 nach UVA	Tag 9	Tag 91	Tag 91 nach UVA	Tag 92
Mittelwert Δb^*	15,19	13,5	15,46	15,35	13,28	15,11
Steigerung in % in Bezug auf Tag 8	-	-11,13	1,78	-	-13,49	-1,56
Standardfehler	0,535	0,44	0,701	0,7	0,415	0,489

Tabelle 13: Helligkeit am Gesäß

Helligkeit am Ge- säß	Tag 8	Tag 8 nach UVA	Tag 9	Tag 91	Tag 91 nach UVA	Tag 92
Mittelwert ΔL^*	67,62	59,3	60,9	67,85	59,1	60,98
Steigerung in % in Bezug auf Tag 8	-	-12,23	-9,4	-	-12,9	-10,13
Standardfehler	0,856	0,753	0,588	0,887	0,872	0,624

3. Ergebnisse

3.5 Colorimetrie des linken Unterarms

Die Colorimetrie beurteilt die Hautfarbe und mit Hilfe des ITA° und des ΔE^* können die Ergebnisse weiter quantifiziert werden, vgl. Kapitel 2.3.4.

Die Parameter L^* (Helligkeit), b^* (Bräune) und a^* (Röte) zeigten keine Unterschiede vor (Tag 8 und 9) und nach (Tag 91 und 92) Pycnogenoleinnahme am linken Unterarm, vgl. Abbildung 12 und Tabellen 14, 15, 16. Alle Ergebnisse der Messungen am linken Unterarm waren nicht signifikant.

Die ITA Berechnung am Unterarm ergab an Tag 8 eine klare, helle Pigmentierung, die unter Pycnogenoleinnahme bis Tag 91 unverändert blieb. Die Berechnung des ΔE^* ergab ebenfalls keinen Hinweis auf Veränderungen nach Pycnogenoleinnahme.

Um einen protektiven Effekt Pycnogenols gegenüber UVA-Strahlen zu beweisen, hätte sich die Erythembildung, die sich in a^* widerspiegelt, reduzieren müssen, genau wie die Berechnung des ΔE^* einen Farbunterschied aufzeigen müsste.

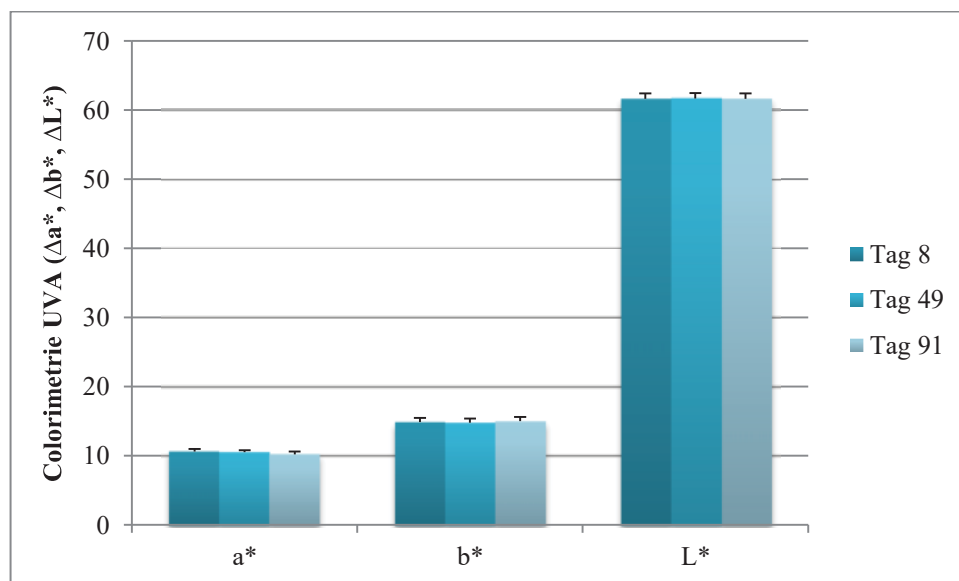


Abbildung 12: Colorimetrie des linken Arms

3. Ergebnisse

Tabelle 14: Röte am Unterarm

Röte am Unterarm	Tag 8	Tag 49	Tag 91
Mittelwert Δa^*	10,59	10,495	10,19
t-Testung in Bezug auf Tag 8	-	0,77	0,362
Abnahme in % in Bezug auf Tag 8	-	0,9	3,78
Standardfehler	0,4	0,316	0,433

Tabelle 15: Bräune am Unterarm

Bräune am Unterarm	Tag 8	Tag 49	Tag 91
Mittelwert Δb^*	14,85	14,75	14,99
t-Testung in Bezug auf Tag 8	-	0,768	0,719
Steigerung in % in Bezug auf Tag 8	-	-0,67	0,943
Standardfehler	0,606	0,608	0,619

Tabelle 16: Helligkeit am Unterarm

Helligkeit am Unterarm	Tag 8	Tag 49	Tag 91
Mittelwert ΔL^*	61,61	61,66	61,63
Steigerung in % in Bezug auf Tag 8	-	0,08	0,03
t-Testung in Bezug auf Tag 8	-	0,915	0,957
Standardfehler	0,783	0,76	0,75

3. Ergebnisse

3.6 Visioscan-Oberflächenprofil

Das Oberflächenprofil gliedert sich in die Parametern Rauigkeit, Schuppigkeit, Faltigkeit und Weichheit/Geschmeidigkeit.

Die Rauigkeit verbesserte sich im Verlauf unter Pycnogenol® bis zum Studienende und nahm im Mittel um 1,75 % ab, vgl. Abbildung 13 und Tabelle 17. Die Ergebnisse waren nicht signifikant. Durch Gruppierung in Subtypen feuchte und trockene Haut zeigten sich positivere Wirkungen bei den Probanden mit trockener Haut (Abnahme von 7,17 %) im Gegensatz zu Probanden mit feuchter Haut (Zunahme von 7,87 %) (nicht abgebildet).

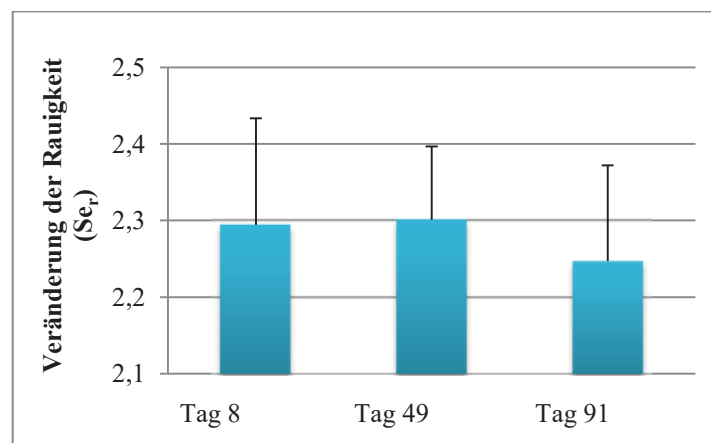


Abbildung 13: Rauigkeit

Tabelle 17: Rauigkeit

Rauigkeit	Tag 8	Tag 49	Tag 91
Mittelwert Se _r	2,29	2,3	2,25
Verbesserung in % in Bezug auf Tag 8	-	-0,44	1,75
t-Testung in Bezug auf Tag 8	-	0,958	0,767
Standardfehler	0,139	0,096	0,125

Die Schuppigkeit nahm unter Pycnogenoleinnahme ab, zeigte jedoch in der Studienhälfte noch bessere Resultate als am Studienende (Tag 49 Abnahme von 9,64

3. Ergebnisse

%, Tag 91 Abnahme von 3,6 %), vgl. Abbildung 14 und Tabelle 18. Die Ergebnisse waren nicht signifikant.

Die Unterteilung in die Subtypen trockene und feuchte Haut zeigten gegensätzliche Reaktionen: Probanden mit trockener Haut verloren 11,24 % an Schuppigkeit, Probanden mit feuchter Haut hingegen nahmen um 15,98 % zu (nicht abgebildet).

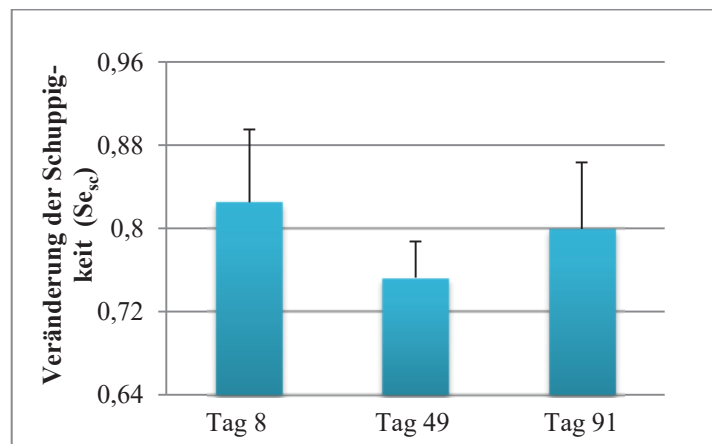


Abbildung 14: Schuppigkeit

Tabelle 18: Schuppigkeit

Schuppigkeit	Tag 8	Tag 49	Tag 91
Mittelwert Se_{sc}	0,83	0,75	0,8
Verbesserung in % in Bezug zu Tag 8	-	9,64	3,6
t-Testung in Bezug auf Tag 8	-	0,35	0,74
Standardfehler	0,07	0,035	0,064

In der SELS-Analyse verhalten sich die Werte der Weichheit genau gegensätzlich zu den anderen Parametern: je kleiner der wert, desto weicher die Haut, vgl. Kapitel 2.3.5.

Im Verlauf der Studie erzielte die Pycnogenoleinnahme eine Steigerung der Weichheit, die jedoch in der Hälfte der Studienzeit zuerst zu eine Verschlechterung dieser führte (Tag 49 Verlust von 4,51 %, Tag 91 Gewinn von 2,41 %), vgl. Abbildung 15 und Tabelle 19. Die Ergebnisse waren nicht signifikant.

3. Ergebnisse

Die Unterteilung in Subgruppen trockene und feuchte Haut ergab, dass Probanden mit feuchter Haut eine Verbesserung der Weichheit aufzeigten (Tag 91 +2,58 %), wohingegen Probanden mit trockener Haut ihre Weichheit einbüßten (Tag 91 -2,2 %) (nicht abgebildet).

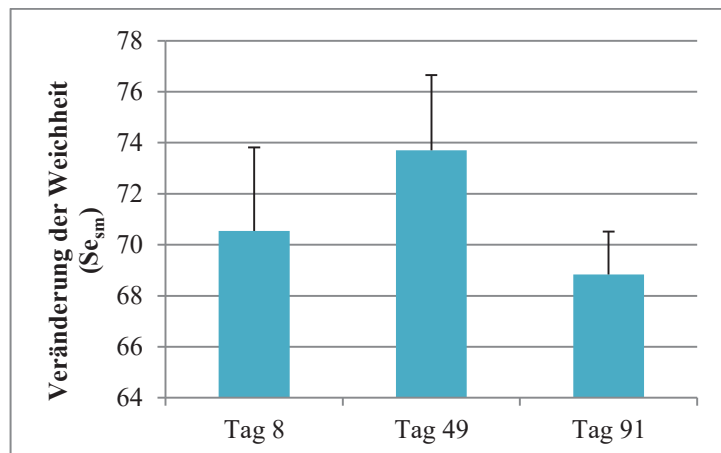


Abbildung 15: Weichheit

Tabelle 19: Weichheit

Weichheit	Tag 8	Tag 49	Tag 91
Mittelwert Se _{sm}	70,54	73,72	68,55
Verbesserung in % in Bezug zu Tag 8	-	-4,51	2,41
t-Testung in Bezug auf Tag 8	-	0,197	0,595
Standardfehler	3,28	2,94	1,68

Die Faltigkeit zeigte im Studienverlauf eine Reduzierung, jedoch war diese, genau wie schon die Schuppigkeit, zur Hälfte der Studienzeit größer als am Studienende (Tag 49 Faltigkeitsverlust von 3,83 % und an Tag 91 nur noch 0,024%), vgl. Abbildung 16 und Tabelle 20. Die Ergebnisse waren nicht signifikant.

3. Ergebnisse

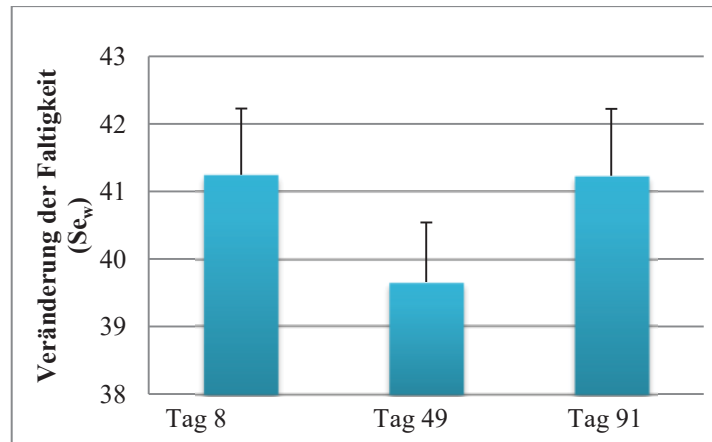


Abbildung 16: Faltigkeit

Tabelle 20: Faltigkeit

Faltigkeit	Tag 8	Tag 49	Tag 91
Mittelwert Se_w	41,24	39,66	41,23
Verbesserung in % in Bezug auf Tag 8	-	3,83	0,024
t-Testung in Bezug auf Tag 8	-	0,1	0,985
Standardfehler	0,98	0,88	0,99

Alle Parameter der *SELS*-Analyse zeigten eine Verbesserung am Studienende unter der Einnahme von Pycnogenol®. Bei Schuppigkeit und Faltigkeit wurden in der Hälfte der Studienzeit noch positivere Effekte erzielt. Die Unterteilung in feuchte und trockene Haut ergab, dass Probanden mit trockener Haut verstärkt die Schuppigkeit und Raue verbesserten.

3. Ergebnisse

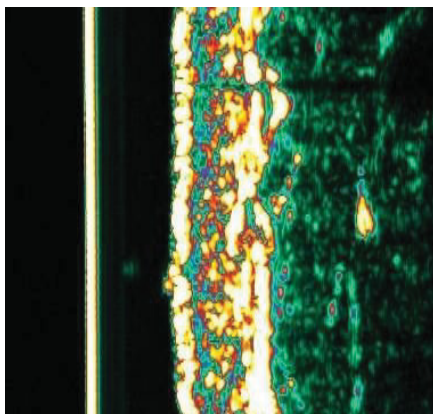
3.7 Ultraschall

Die zweimalig durchgeführten Ultraschalluntersuchungen bewerten die Hautdicke und –dicke vor (Tag 8) und nach (Tag 91) Pycnogenoleinnahme im Verlauf der Studie. Der sich im Ultraschall darstellende Wassergehalt verhält sich invers zur Hautdicke: eine Abnahme der Dichte spiegelt eine Zunahme des Wassergehalts wider, vgl. Kapitel 2.3.7.

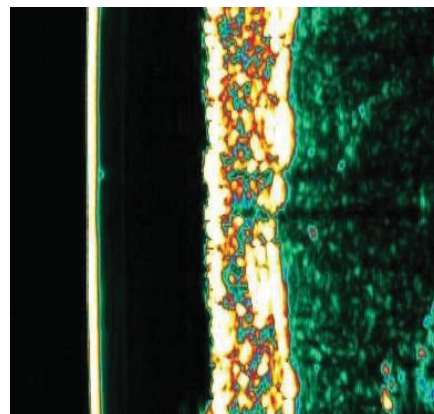
Die Einnahme Pycnogenols® resultierte in einem gesteigerten Wassergehalt, welcher sich in einer Dichteabnahme von 2 % an Tag 91 zeigte. Die Hautdicke nahm im Verlauf um 1 % zu, vgl. Abbildung 17 und Tabelle 21. Das Ergebnis der Hautdicke war signifikant ($p = 0,0279$). Dieses positive Ergebnis korreliert mit der Verbesserung der Hautfeuchtigkeit in der Corneometrie, vgl. Kapitel 3.2.

Die Unterteilung in Subgruppen feuchte und trockene Haut ergab sogar eine Steigerung des Wassergehaltes von 2,8 % bei Probanden mit trockener Haut, welches durch die Inversität in einer Dichteabnahme resultierte (nicht abgebildet). Die Ergebnisse der Hautdicke nach Subtypen erreichten das Signifikanzniveau jedoch nicht ($p = 0,971$). Zur Demonstration der Veränderungen im Ultraschall folgen hier die Bilder von Proband 17 vor und nach Pycnogenoleinnahme:

Vor Pycnogenol® (Tag 8)



Nach Pycnogenol® (Tag 91)



3. Ergebnisse

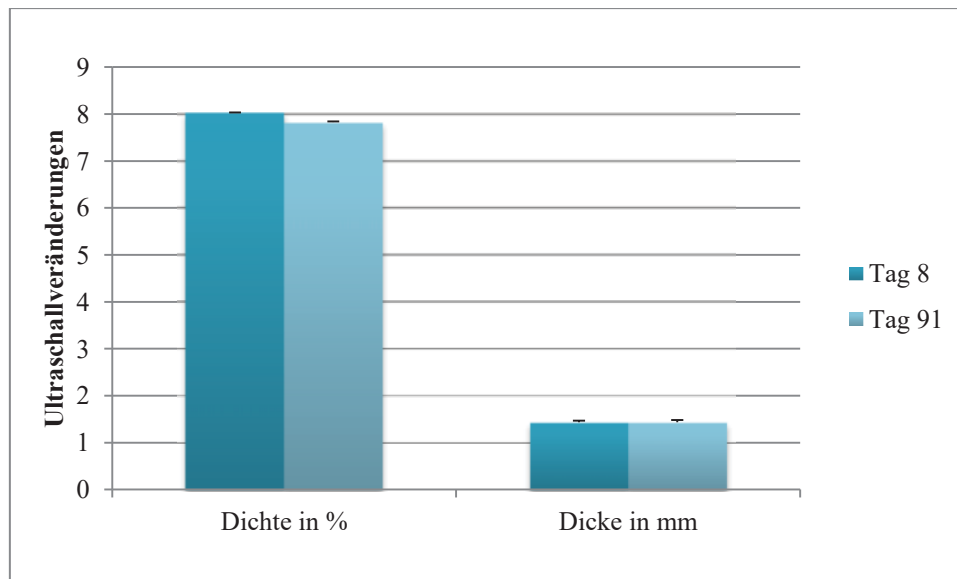


Abbildung 17: Hautdicke und –dichte

Tabelle 21: Dicke und Dichte

Dicke	Tag 8	Tag 91
Mittelwert mm	1,432	1,434
Verbesserung in % in Bezug auf Tag 8	-	1
t-Testung in Bezug auf Tag 8	-	0,971
Standardfehler	0,009	0,014
Dichte	Tag 8	Tag 91
Mittelwert %	8,02	7,83
Verbesserung in % in Bezug auf Tag 8	-	2
t-Testung in Bezug auf Tag 8	-	0,0279
Standardfehler	0,036	0,05

3. Ergebnisse

3.8 Hautbiopsie/PCR

3.8.1 Bestandteile der extrazellulären Matrix

Wichtige Bestandteile der extrazellulären Matrix sind unter anderem Kollagen und Hyaluronsäure. Diese spielen eine wichtige Rolle in der Hautalterung vgl. Kapitel 18.3.

Durch die Hautbiopsie vor (Tag 9) und nach (Tag 92) Pycnogenoleinnahme mit anschließender *real-time* PCR können Auswirkungen des Nahrungsergänzungsmittels auf molekularer Ebene überprüft werden. Die Resultate im Verlauf der Studie sind durchweg positiv. Die Genexpressionen der Hauptkollagene der Haut Col1A1 und Col1A2 stiegen um 40 % bzw. um 29 % an. Die Ergebnisse waren nicht signifikant. Die Genexpression der Hyaluronsäuresynthase HAS-1 erhöhte sich um signifikante 44 %, vgl. Abbildung 18 und Tabelle 22.

Einen Zusammenhang zwischen Alter, BMI, Hauttypen oder -feuchtigkeit war nicht festzustellen.

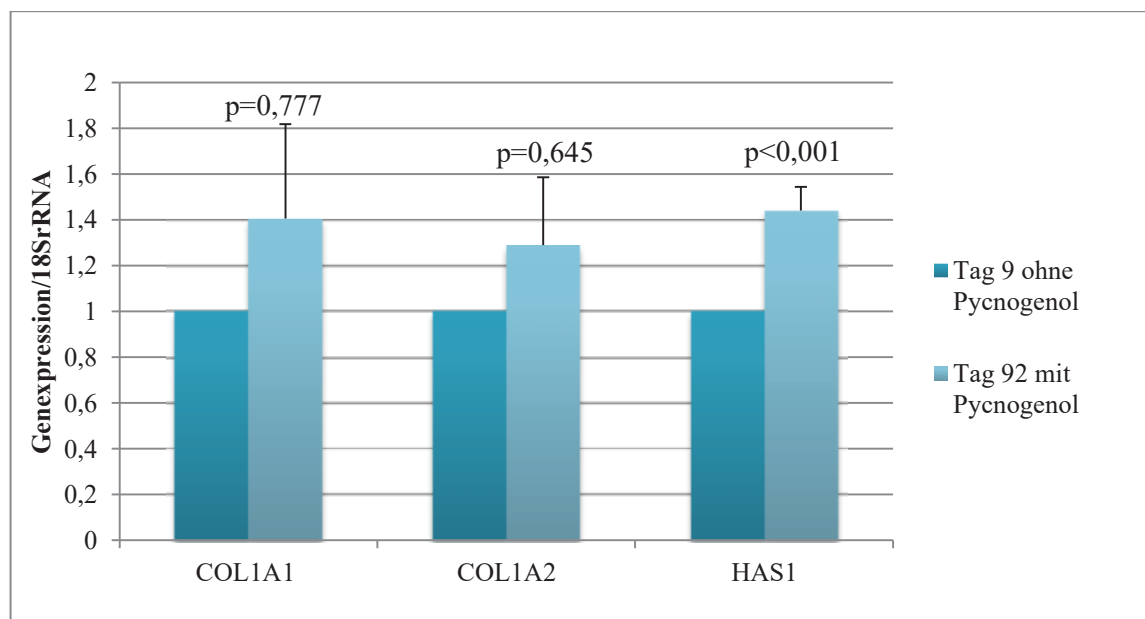


Abbildung 18: PCR-Ergebnisse Col1A1/Col1A2/HAS-1

3. Ergebnisse

Tabelle 22: Col1A1/Col1A2/HAS-1

COL1A1	Tag 9 ohne Pycnogenol®	Tag 92-mit Pycno- genol®
t-Testung in Bezug auf Tag 9	-	0,777
Anstieg des Ausgangswertes in %	-	40
Standardfehler	0	0,413
COL1A2		
t-Testung in Bezug auf Tag 9	-	0,645
Anstieg des Ausgangswertes in %	-	29
Standardfehler	0	0,296
HAS-1		
t-Testung in Bezug auf Tag 9	-	<0,001
Anstieg des Ausgangswertes in %	-	44
Standardfehler	0	0,104

3.8.2 Marker für oxidativen Stress

Oxidativer Stress, der unter anderem durch UV-Belastung entsteht, greift mit der Entstehung von Sauerstoffradikalen in viele Prozesse ein- Hautalterung, DNA-Mutationen bzw. Brüche, Entwicklung von Hautkrebs, Veränderung von Transportwegen und Zellfunktionen. Viele UV-induzierte Botenstoffe sind bekannt, die Marker des oxidativen Stresses verkörpern, vgl. Kapitel 1.3 und 1.4.

In vorliegender Arbeit wurden folgende Marker vor(Tag 9) und nach (Tag 92) Pycnogenolgabe untersucht: ICAM-1, HO-1, MMP-1, IL-1 und 6.

Die Genexpression des ICAM-1 und der MMP-1 stiegen im Verlauf an (+6,4 % bzw. +11,55 %). Die Expression der HO-1 sank um 2,3 % unter Pycnogenolgabe,. Die Ergebnisse waren nicht signifikant. Die Expression der Entzündungsreaktion Il-1 und 6 zeigte nach Pycnogenolgabe eine signifikant verstärkte Reaktion im Vergleich zum Studienanfang- erhöhte Genexpression um 29,6 % bzw. um 66,3 %, vgl. Abbildung 19 und Tabelle 23.

Assoziationen zu Alter, BMI, Hautfeuchtigkeit oder –typ lagen nicht vor.

3. Ergebnisse

Die UVA-induzierte Hochregulierung der Genexpression konnte nicht durch die Einnahme Pycnogenols® unterdrückt werden und zeigte sogar negativen Einfluss, indem es die Bildung UV-induzierterter Marker steigerte. Diese molekular gewonnen Ergebnisse korrelieren mit denen der physiologischen aus der Colorimetrie, die ebenfalls keine UV-protective Wirkung bestätigten.

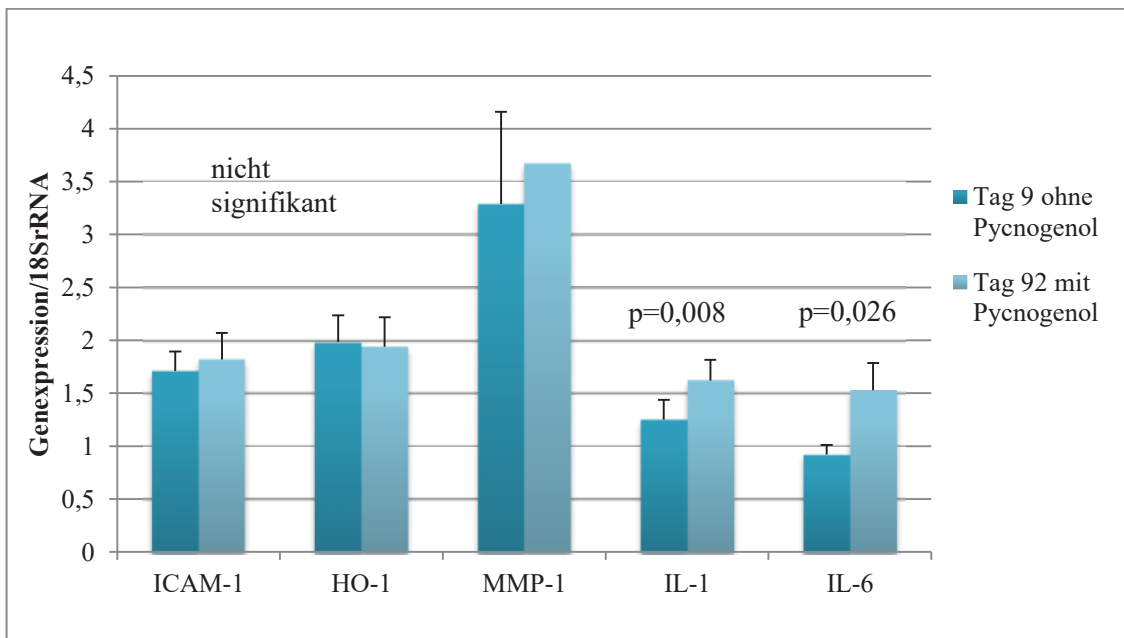


Abbildung 19: PCR-Ergebnisse ICAM-1/HO-1/MMP-1/IL-1/IL-6

3. Ergebnisse

Tabelle 23: ICAM-1/HO-1/MMP-1/IL-1/IL-6

ICAM-1	Tag 9 ohne Pycnogenol®	Tag 92 mit Pycnogenol®
t-Testung in Bezug auf Tag 9	-	nicht signifikant
Anstieg des Ausgangswertes in %	-	6,4
Mittelwert	1,71	1,82
Standardfehler	0,184	0,25
HO-1		
t-Testung in Bezug auf Tag 9	-	n.s.
Anstieg des Ausgangswertes in %	-	-2,3
Mittelwert	1,985	1,94
Standardfehler	0,252	0,279
MMP-1		
t-Testung in Bezug auf Tag 9	-	n.s.
Anstieg des Ausgangswertes in %	-	11,55
Mittelwert	3,29	3,67
Standardfehler	0,87	15,353
IL-1		
t-Testung in Bezug auf Tag 9	-	0,008
Anstieg des Ausgangswertes in %	-	29,6
Mittelwert	1,25	1,62
Standardfehler	0,187	0,196
IL-6		
t-Testung in Bezug auf Tag 9	-	0,026
Anstieg des Ausgangswertes in %	-	66,3
Mittelwert	0,92	1,53
Standardfehler	0,09	0,257

4. Diskussion

4. Diskussion

Die Exposition von UV-Strahlen ist dafür bekannt DNA-Läsionen und auch freie Radikale zu induzieren, welche vielzählige Hauterkrankungen verursachen. UVA-Strahlen sind in der Lage die Dermis zu subkutanen Geweben zu penetrieren und Auswirkungen auf epidermale und dermale Strukturen auszuüben. Hyperplasien, Erytheme, Hautalterung und Hautkrebs können Folgen der UVA-Belastung sein. Um solche Schäden zu mindern, besitzt die Haut effektive Abwehrsysteme, inklusive enzymatischen und nicht-enzymatischen Systemen. Topische und systemische Behandlung mit Antioxidantien-enthaltenden Nahrungs(ergänzungs)mitteln erzielen die selbigen Wirkungen. Viele Studien zeigten die Effizienz natürlicher Antioxidantien, wie Carotinoiden, Silymarin, grünem Tee und Erdbeeren gegenüber UVA-Belastung und ihren Folgen entgegen zu wirken (104). UV-A-Bestrahlung induziert eine verstärkte Genexpression der Matrixmetallomproteinase-1 (MMP-1), dessen Hauptwirkung in der Degradation von Kollagen-1 liegt und so zu Schäden der extrazellulären Matrix ebenso wie dem Hautbild führt. Natürlich vorkommende Saponine, die genau wie Flavonoide reich an Carboxyl- und Hydroxylgruppen sind, supprimieren diese erhöhte Aktivität über den MAP-Kinase Pathway (105). Involviert in die UVA-induzierte Expression der MMP-1 sind die Zytokine Interleukin 1 und 6. IL-1 α und -1 β steigern rapide nach UV-A-Bestrahlung ihre Bioaktivität und induzieren nachträglich die Expression von IL-6. Beide Interleukine stimulieren die Biosynthese der MMP-1 (106).

Diese vorliegende Studie bietet erstmalig molekulare Evidenz, dass das Nahrungsergänzungsmittel Pycnogenol® positiven Einfluss auf die menschliche Haut besitzt. Die Pycnogenoleinnahme wurde von allen Probanden gut vertragen und verursachte keine Nebenwirkungen.

4. Diskussion

4.1 Wirkungen auf Hautparameter

In der Corneometrie nahm die Hautfeuchtigkeit mit einem Maximum in der Hälfte der Studienzeit um 7,96 % zu. Probanden mit trockener Haut profitierten stärker. Der Gewinn an Feuchtigkeit spiegelte sich auch in der Ultraschalluntersuchung wider, hier nahm die sich invers zum Wassergehalt verhaltene Dichte signifikant um 2 % ab. Ebenfalls stärkere Verbesserungen des Wassergehaltes zeigten Probanden mit trockener Haut. Dieser positive Einfluss Pycnogenols® auf die Hautfeuchtigkeit bzw. den Wassergehalt lässt sich durch eine erhöhte Aktivität der HAS-1 erklären. Die daraus resultierende gesteigerte Synthese von Hyaluronsäure verschafft der extrazellulären Matrix durch ihre Wasser zu bindende Fähigkeit zu mehr Feuchtigkeit (107). Diese Eigenschaft Pycnogenols® ließ sich durch die Hautbiopsie auf molekularer Ebene bestätigen, in dem die Genexpression der mRNA der HAS-1 signifikant um 44 % stieg.

Die Cutometrie zeigte signifikant gesteigerte Ergebnisse der Hautelastizität. Die Berücksichtigung der vorliegenden Feuchte ergab erneut einen stärker positiven Effekt für Probanden mit trockener Haut. Diese Wirkung Pycnogenols® führt auf eine Hemmung der Enzyme Kollagenase und Elastase hin, welche für den Abbau der beiden verantwortlich sind. Außerdem erhöht Pycnogenol® die Affinität von Elastin in der Haut (60). Durch diese beiden Mechanismen liegt Elastin erhöht vor und sorgt als Strukturprotein der Haut für deren Dehnungsfähigkeit, Formgebung, Halt und verhilft somit der Haut zu einer verbesserten Elastizität (108). Zusätzlich trägt der ebenfalls erhöhte Kollagengehalt zu einer elastischeren Haut bei. Dieses Phänomen wurde bereits 2004 in einer Studie von D. Segger et al. bestätigt (83), jedoch ohne Grundlage molekulargenetischer Daten. Die nun mögliche *in vivo* Aussage über Pycnogenols® belegte diese Annahme, da es zu einer erhöhten Genexpression von Col1A1 und Col1A2 kam.

Die Oberflächenanalyse des Visioscans ergab in allen vier Parametern eine Verbesserung. Die Faltigkeit und die Schuppigkeit zeigten eine stärkere Verbesserung nach nur der Hälfte der Studienzeit. Probanden mit trockener Haut profitierten

4. Diskussion

stärker in Hinblick auf Rauigkeit und Schuppigkeit als die mit feuchter Haut. Hier zeigt sich der antioxidative Charakter Pycnogenols® (84) (72). Der Schutz vor freien Radikalen kann den oxidativen Stress, der eine schnellere Hautalterung mit Bildung von Falten, Schuppen, Raue sowie einem Verlust von Weichheit als Folge nach sich zieht, verringern und somit, wie es auch die Ergebnisse widerspiegeln, zu dem Erscheinungsbild einer „jüngeren, strafferen“ Haut führen. Ein weiterer Erklärungsansatz liegt in der Stimulation der Keratinozytenproliferation durch Pycnogenol® (72). Die Keratinozyten befinden sich in der Epidermis, üben eine Barriere- bzw. Schutzfunktion aus und können so auch zu einer Verbesserung des Hautbildes führen (109).

Dieser antioxidative Charakter Pycnogenols® zeigte sich nicht nur in den verbesserten Parametern der Hautoberflächenanalyse, sondern auch auf molekularer Ebene. Die Genexpression der HO-1, welche unter anderem durch oxidativen Stress induzierbar ist, vgl. Kapitel 1.3, zeigte unter Pycnogenoleinnahme eine Suppression von 2,3 %. Das als Antioxidans wirkende Pycnogenol® reduzierte die Bildung reaktiver Radikale und schützte so die Zelle vor oxidativem Stress, was in einer Suppression der Expression der HO-1 messbar war.

In vorherigen Studien konnten der Einfluss der Expression der HO-1 durch Antioxidantien belegt werden: unter β -Carotin zeigte sich in humanen Fibroblasten ein antioxidativer Effekt (*in vitro*), das Isoflavonoid Equol besitzt ebenso die Fähigkeit die HO-1-Aktivität in Mäusen zu vermindern (*in vivo*) (110). Das nun vorliegende Resultat dieser Arbeit zeigt erstmalig auf mRNA-Ebene den antioxidativen Charakter Pycnogenols® und belegt somit eine systemische *in vivo* Wirkung auf humane Zellen.

4.2 Wirkung auf die extrazelluläre Matrix

Wichtige Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Kollagen, Elastin und Hyaluronsäure tragen eine entscheidende Rolle zu Prozessen der Hautalterung bei, vgl.

4. Diskussion

Kapitel 1.8.3. Alle genannten Bestandteile erzielten unter Einnahme von Pycnogenol® Verbesserungen. Auf physiologischer Ebene ergab sich eine Steigerung der Feuchtigkeit (Corneometrie, Ultraschall), die Elastizität nahm zu (Cutometrie) und das Oberflächenprofil der Haut verbesserte sich (Visioscan). Auf molekularer Ebene bestätigten sich diese Veränderungen, sodass ein Einfluss Pycnogenols® auf die mRNA belegt wurde. Die Genexpression von Col1A1 und Col1A2 stieg um 40 % bzw. um 29 % an. Dass die Ergebnisse nicht signifikant waren, könnte an der geringen Probandenanzahl gelegen haben. Die Genexpression der HAS-1 stieg signifikant um 44 %, was die Aussage der physiologisch verbesserten Parameter unterstützt. Aus welchem Grund nur die HAS-1 untersucht wurde, soll Folgendes erklären.

Die Hyaluronsäuresynthase (HAS) liegt in verschiedenen Isoformen vor. Alle drei Formen synthetisieren, die aus Disacchariden an der inneren Plasmamembran von Fibroblasten und Keratinozyten entstehende Hyaluronsäure. Die Transkription aller Isoformen ist unter anderem durch UV-Belastung beeinflussbar.

Die HAS-1 und -2 produzieren hohe Molekularmassen an Hyaluronsäure ($2-4 \times 10^6$ Dalton) im Gegensatz zur HAS-3, die nur kleinere Molekularmassen synthetisiert ($0,2-2,5 \times 10^5$ Dalton) (21). In Dermis und Epidermis werden die Isoformen HAS-1 und 2 exprimiert, die HAS-2 jedoch mehr in der Dermis als die HAS-1. Trotzdem konnte festgestellt werden, dass die HAS-1 im Gegensatz zur HAS-2, nicht nur in Fibroblasten transkribiert wird, sondern zusätzlich noch in Keratinozyten (111). Dieser Unterschied war der Grund für die Analyse lediglich der HAS-1.

Die Genexpression der MMP-1, welche vor allem für den Abbau Kollagens verantwortlich ist, wurde jedoch nicht unter Pycnogenoleinnahme reduziert. Da die MMP-1 sehr stark auf UV-Belastung reagiert und durch diese schnell in ihrer Proliferation hochreguliert wird, vgl. Kapitel 1.3, könnte dies die ausbleibende Reduktion erklären, da Pycnogenol® keinen sonnenschützenden Effekt zeigte, vgl. Kapitel 4.3.

4. Diskussion

4.3 Wirkungen auf UV-induzierte Marker

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Wirkungen Pycnogenols nicht nur auf seinen Einfluss der hautphysiologischen Parameter, sowie den antioxidativen Charakter, sondern auch auf dessen UV-protective Wirkung. Dazu dienten auf molekularer Ebene die UV-induzierbaren Marker und auf physiologischer Ebene die Colorimetrie.

Die durch UV-induzierbaren Marker wie ICAM-1, IL-1 und 6, MMP-1 zeigten unter Pycnogenolgabe keine Suppression ihrer Expression. Die Colorimetrie des Gesäßes und des Unterarms ergaben keine wesentlichen Veränderungen.

Die an der Inflammation beteiligten Moleküle ICAM-1, Interleukin 1 und 6 (vgl. Kapitel 1.3) zeigten keinen Einfluss unter Pycnogenol®. Dies wird unter anderem in der Hautrötung a^* der Colorimetrie widerspiegelt, in der sich keine Reduktion des induzierten, inflammatorischen Erythems zeigte. Die zur weiteren Bewertung herangezogenen Berechnungen des ITA° und des ΔE^* bestätigten ebenfalls keine protektive Wirkung gegenüber der UVA-Belastung, da sich keine Unterschiede in Pigmentierung sowie in Hautfarbe vor und nach Pycnogenoleinnahme wiederfanden. Die Ergebnisse der Genexpression und der Colorimetrie korrelieren miteinander und zeigten übereinstimmende Ergebnisse, die Pycnogenol® einen sonnenschützenden Effekt absprechen.

4.4 Wirkung Pycnogenols®

Es konnte gezeigt werden, dass unter Einnahme von Pycnogenol® als Nahrungsergänzungsmittel ein verbessertes Hautbild sowie Hautstruktur hervorgeht und ein protektiver Schutz vor oxidativem Stress ausgeht. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass unter oraler Einnahme Pycnogenols die Folgen antioxidativen Stresses wie Hautalterungserscheinungen in *in vivo* Reaktionen der menschlichen Haut verhindert werden. Im Gegensatz zu bereits vorliegenden Studien wird hier erst-

4. Diskussion

malig der positive Effekt auf die menschliche Haut des Nahrungsergänzungsmittels auf molekularer Ebene belegt.

Die sich unter Pycnogenol® entwickelte gesteigerte Hautfeuchtigkeit, die „verjüngte“ Hautoberfläche und die verbesserte extrazelluläre Matrix resultieren in einer gestärkten Hautbarriere und in einem guten Hautgesamtbild.

Eine UV-protektive Wirkung blieb jedoch aus.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse hautphysiologische und molekulare Evidenz dafür, dass Pycnogenol® ein wirksames Nahrungsergänzungsmittel für Frauen in der Postmenopause ist, welches vorbeugend in Hinsicht auf Hautalterungsvorgänge wirkt.

4.5 Kritische Betrachtung und weiterführende Gedanken

Bei Betrachtung der Studienmethodik fällt auf, dass es keine Kontrollgruppe mit Placeboeinnahmen gab. Diese Entscheidung wurde aus ethischen Gründen bewusst getroffen, um Komplikationen durch Biopsieentnahmen möglichst gering zu halten. Vergleichbar mit der hier vorliegenden Studie sei die von D.Segger et al. - doppelblind, placebokontrolliert - genannt. Durch das ähnliche Studiendesign ist eine bedingte Vergleichbarkeit zulässig, sodass die Annahme, die Verbesserung des Hautbildes wäre auf externe Faktoren zurückzuführen, ausgeschlossen werden könnte.

Dass Probanden mit trockener Haut ausgeprägter positivere Effekte nach der Pycnogenolbehandlung in der Hautfeuchtigkeit, Rauigkeit, Schuppigkeit und Dichte aufwiesen, könnte vielleicht mit der Hyaluronsäure zusammen hängen. Diese zeichnet sich durch die Fähigkeit Wasser zu binden aus und ist bei trockener Haut im Gegensatz zu feuchter Haut geringer vorhanden (20). Die „Wasserkapazität“ ist somit bei trockener Haut noch nicht vollständig ausgeschöpft und könnte so schneller und besser auf die Pycnogenolbehandlung reagieren.

4. Diskussion

Wieso die durchschnittliche Hautfeuchtigkeit, Faltigkeit und Schuppigkeit nach zwölf Wochen Pycnogenoleinnahme geringerer war als nach sechs Wochen, ist schwer zu interpretieren. Es könnte aus saisonalen Veränderungen der Haut resultieren, welche während der Belastung im Sommer vorkommen.

Es lässt sich erkennen, dass Pycnogenol® in einer kürzeren Studiendauer und bei Probanden mit trockener Haut zu stärkeren Verbesserungen des Hautbildes führte. Interessant wäre deshalb für folgende Forschungsarbeiten die Veränderung des Studiendesigns mit einer kürzeren Studiendauer, sowie das Einschlusskriterium trockene Haut.

5. Zusammenfassung

5. Zusammenfassung

Während der letzten Jahre sind Anzahl und Einsatz von Nahrungsergänzungsmitteln gestiegen, auch mit der Intention der Hautalterung vorzubeugen. Bisherige Aussagen über die Wirksamkeit von Nahrungsergänzungsmitteln basieren auf *in vitro* Studien oder limitierten *in vivo* Studien ohne Erhebung molekularer Daten. In der vorliegenden Studie wurde untersucht inwiefern das Nahrungsergänzungsmittel Pycnogenol® die kosmetische Erscheinung der Haut und die Genexpression der damit korrespondierenden Marker beeinflusst. Für dieses Vorhaben nahmen 20 gesunde postmenopausale Frauen das Nahrungsergänzungsmittel Pycnogenol® für 12 Wochen ein. Vor der ersten Pycnogenoleinnahme erfolgte eine *Run-in-Phase*, um den antioxidativen Status der Probanden zu ermitteln. An Tag 8 und 91 bestrahlten wir ein 4 cm² großes Hautareal des Gesäßes mit UVA-Strahlen (100 J/ cm²). Bevor, während und nach der Pycnogenolbehandlung wurden die Hautgegebenheiten der Probanden durch nicht invasive biophysikalische Methoden, einschließlich Corneometer, Cutometer, Ultraschall, Visioscan und Colorimeter, und durch zweimalige Entnahme von zwei Hautbiopsien am Gesäß analysiert. Die an den Biopsien mittels PCR erhobene Genexpression der verschiedenen Moleküle, die in Zusammenhang mit der Hautalterung, der extrazellulären Matrix und der Inflammation stehen, ermöglicht nun Aussagen auf molekularem Niveau.

Die Einnahme von Pycnogenol® resultierte in einer gesteigerten Hautfeuchtigkeit und Elastizität, einer verbesserten Hautoberfläche sowie einer gestärkten extrazellulären Matrix. Diese physiologischen Parameter wurden auf molekularer Ebene von einem signifikanten Hyaluronsäuresynthase-1 Anstieg und einer gesteigerten Kollagensynthese (Col1A1/1A2) begleitet. Des Weiteren sprach die Reduktion der Genexpression der Hämoxygenase-1 für den antioxidativen Charakter Pycnogenols®. Eine UV-protective Wirkung stellte sich nicht ein.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse hautphysiologische und erstmalig molekulare Evidenz, dass Pycnogenol® ein wirksames Nahrungsergänzungsmittel für Frauen in der Postmenopause ist, welches vorbeugend in Hinsicht auf Hautalterungsvorgänge wirkt.

6. Offenlegung

6. Offenlegung

Diese Studie wurde unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft SFB 728 TPC1 und von Horphag Research, Cointrin/Genf, Schweiz.

Literaturverzeichnis

1. **Welsch, Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ulrich.** *Lehrbuch Histologie*. München : Urban & Fischer , 1. Auflage 2003.
2. **Schiebler T, Schmidt W.** *Anatomie*. Berlin : Springer, 2003.
3. **Kardoff B.** *Gesunde Haut – Lexikon von A bis Z*: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2004.
4. **Silbernagl S, Despopoulos A.** *Taschenatlas der Physiologie-6. Auflage*. Thieme, 2003.
5. **Krutmann J.** Inhibitory effects of sunscreens on the development of skin cancer. *Hautarzt*. 2001, 52:62-63.
6. **Moll I.** *Dermatologie*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2010.
7. **Meredith P. und Riesz J.** Radiative Relaxation Quantum Yields for Synthetic Eumelanin. *Journal of Photochemistry and Photobiology* . 2004, 2:211-216.
8. **Berneburg M, Krutmann J.** Photoimmunology, DNA repair and photocarcinogenesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 2000, 54:87-93.
9. **Auletta M, Gange RW, Tan OT, Matzinger E.** Effect of cutaneous hypoxia upon erythema and pigment responses to UVA, UVB and PUVA (8-MOP+ UVA) in human skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 1986, 86:649-652.
10. **Afaq F, Mukhtar H.** Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Experimental Dermatology*. September 2006, 15(9):678-84.
11. **Dulak J et al.** Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis. *Circulation*. 2008, Nr. Jan 15, 117(2); 231–241.
12. **Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh A et al.** Bilirubin is an anti-oxidant of possible physiological importance . *Science*. 1987, 235:1043-1046.
13. **Nath K.** The functional significance of induction of heme oxygenase by oxidant stress. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* . 1994, 123; Seite 461-463.
14. **Dong KK, Damaghi N, Picart SD et al.** UV-induced DNA damage initiates release of MMP-1 in human skin. *Experimental Dermatology*.. 2008, 17:1037-1044.

Literaturverzeichnis

15. **Rittié L, Fisher GJ.** UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Research Review*. September 2002, 1(4):705-720.
16. **Krutmann J et al.** Changes of MMP-1 and collagen type I α 1 by UVA, UVB and IRA are differentially regulated by Trx-1. *Experimental Gerontology*. Juli 2008, 43(7):633-637.
17. **Roebuck K.** Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *International Journal of Molecular Medicine*. September 1999, 4(3):223-230.
18. **Krutmann J.** Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. *Journal of Dermatological Science*. 2000, 23:22-S26.
19. **Tzellos TG et al.** Extrinsic ageing in the human skin is associated with alterations in the expression of hyaluronic acid and its metabolizing enzymes. *Experimental Dermatology*. Dezember 2009, 18:1028–1035.
20. **Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB.** Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internatinal Medicine*. Juli 1997, 242:27-33.
21. **Guang Dai et al.** Chronic Ultraviolet B Irradiation Causes Loss of Hyaluronic Acid from Mouse Dermis Because of Down-Regulation of Hyaluronic Acid Synthases. *The American Journal of Pathology*. November 2007, 171:1451-61.
22. **Jacobson A et al.** Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli. *Biochemical Journal*. Mai 2000, 348: 29-35.
23. **Park J, Seok JK, Suh HJ, Boo YC.** Gardenia jasminoides Extract Attenuates the UVB-Induced Expressions of Cytokines in Keratinocytes and Indirectly Inhibits Matrix Metalloproteinase-1 Expression in Human Dermal Fibroblasts. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014, 429246.
24. **Reeve VE, Tyrrell RM, Allanson M et al.** The Role of Interleukin-6 in UVA Protection against UVB-Induced Immunosuppression. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009, 129:1539-1546.
25. **Gröber U.** *Orthomolekulare Medizin*. Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft , 2000.
26. **Schmidt R et al.** *Physiologie des Menschen*. Springer, 2007.
27. **Krutmann J, Diepgen T, Billmann-Krutmann C.** *Hautalterung*. Heidelberg, Springer Medizin Verlag, 2008.

Literaturverzeichnis

28. **Krinsky N, Johnson E.** Carotenoid actions and their relation to health and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*. 2005, 26:459-516.
29. **Seren S et al.** Lycopene in cancer prevention and treatment. *American Journal of Therapeutics*. 2008, 15:66-81.
30. **Sharoni Y et al.** Carotenoids and transcription. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2004, 430:89-96.
31. **Humbert P, Krutmann J.** *Nutritional for healthy skin*. Berlin : Springer, 2011. S. 66-67.
32. **Ribaya-Mercado J et al.** Skin lycopene is destroyed preferentially over β -carotene during UV irradiation in humans. *Journal of Nutrition*. 1995, 125:1854-1859.
33. **Kopcke W, Krutmann J.** Protection from sunburn with beta-carotene-a-meta-analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 2008, 84:284-288.
34. **Humberts P, Krutmann J.** *Nutrition for healthy skin*. Berlin : Springer, 2011. S. 69.
35. **Aust O, Stahl W. Sies H et al.** Supplementation with tomato-based products increases lycopene, phytofluene, and phytoene levels in human serum and protects against UV-light-induced erythema. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2005, 75:54-60.
36. **Humbert P, Krutmann. J** *Nutrition for healthy skin*. Berlin : Springer, 2011. S.15-24.
37. **Baumann LS.** Less-known botanical cosmeceuticals. *Dermatological Therapy*. 2007, 20:330-342.
38. **Boots A et al.** Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*. 2008, 585:325-337.
39. **Valko M et al.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and cell Biology* . 2007, 39:44-84.
40. **Manach C et al.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of clinical nutrition*. 2004, 79:727-747.
41. **Katyiari S, Mukhtar H.** Tea in chemoprevention of cancer: epidemiologic and experimental studies. *International Journal of Oncology*. 1996, 8:221-238.

Literaturverzeichnis

42. **Katiyar S, Elmets C.** Green tea polyphenolic antioxidants and skin protection. *International Journal of Oncology*. 2001, 18:1307-1313.
43. **Lu Y et al.** Topical applications from caffeine or epigallocatechin gallate inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice . *Proceedings of the National Academy of Science*. 2002, 99:12455-460.
44. **Humbert P, Krutmann J.** *Nutrition for healthy skin*. Berlin : Springer, 2011. S. 71-75.
45. **Afaq F, Mukhtar H, Khan N.** Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2008, 10:474-510.
46. **Afaq F, Mukhtar H et al.** Protective effect of pomegranate-derived products on UVB-mediated damage in human reconstituted skin. *Experimental dermatology*. 2009, 18:553-561.
47. **Adhami V et al.** Phytochemicals for prevention of solar UV-radiation-induced damages. *Photochemistry and Photobiology*. 2008, 84:489-500.
48. **V.Adhami V et al.** Suppression of UVB-exposure mediated activity of NF-kappaB in normal human keratinocytes by resveratrol. *Neoplasia*. 2003, 5:74-82.
49. **Svobodová A et al.** Attenuation of UVA-induced damage to human keratinocytes by silymarin. *Journal of dermatological Science*. 2007, 46:21-30.
50. **Meeran S et al.** Silymarin inhibits UV radiation-induced immunosuppression through augmentation of interleukin-12 in mice. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006, 5:1660-1668.
51. **Brand R et al.** Topical treatment with EGCG and genistein after a single UV exposure can reduce skin damage. *Journal of dermatological Science*. 2008, 50:69-72.
52. **Widyarini S et al.** isoflavonoid compounds from red clover protect from inflammation and immune suppression induced by UV radiation. *Photochemistry & Photobiology*. 2001, 74:465-470.
53. **Moore J et al.** Photoprotective effect of isoflavonoid genistein. *Carcinogenesis*. 2006, 27:1627-1635.
54. **Maheshwari R et al.** Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Science*. 2006, 78:2081-87.

Literaturverzeichnis

55. **Aggarwal B et al.** Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*. 2003, 23:363-398.
56. **Roberfroid MB.** Concepts in Functional Foods: The Case of Inulin and Oligofructose. *Journal of Nutrition*. 1999, 129:1398-1401.
57. **Darvin M, Zastrow L, Sterry W, Lademann W.** Effect of supplemented and topically applied antioxidant substances on human tissue. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2006, 19(5):238-247.
58. **DeFelice S.** The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. *Trends Food Science and Technology*. 1995, 6:59-61.
59. **Andlauer W, Fürst P.** Antioxidative power of phytochemicals with special reference to cereals. *Cereals Foods World*. 1998, 43:356-360.
60. **Rohdewald P.** A review of the french maritime pine bark extract, a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2002, 40(4):158-168.
61. **D'Andrea G.** Pycnogenol: A blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*. 20.Juni 2010, (7):724-36.
62. **Aviram M et al.** Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition*. 2004, 23(3):423-33.
63. **Reeve VE Sime S.** Protection from inflammation, immunosuppression and carcinogenesis induced by UV radiation in mice by topical Pycnogenol. *Journal of Photochemistry Photobiology*. 2004, 79:193-198.
64. **Hirose M, Takesada Y, Tanaka H, Tamano S et al.** Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4- methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis*. 1998, 19:207–212.
65. **Böhm H, Boeing H.** Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*. 1998, Bd. 37, 147–163.
66. **Düweler K, Rohdewald P.** Urinary metabolites of French pine bark extract in humans. *Pharmazie*. 2000, 55:364-368.

Literaturverzeichnis

67. **Sivonova M et al.** The combined effect of pycnogenol with ascorbic acid and trolox on the oxidation of lipids and proteins. *General Physiology and Biophysics*. Dezember 2006, 25:379-96.
68. **Grimm T et al.** Inhibition of NF-kB activation and MMP-9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract. *Journal of Inflammation*. 2006, 3:1-15.
69. **Saliou C et al.** Solar ultraviolet-induced erythema in human skin and NF-kB-dependent gene expression in keratinocytes are modulated by a French maritime pine bark extract. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001, 30:154-160.
70. <http://www.uni-duesseldorf.de/Jahrbuch/2002/PDF/pageskrutmann.pdf>. [Online] 2002. [Zitat vom: 29. März 2012.]
71. **Grimm T, Schäfer A, Högger P.** Antioxidant activity and inhibition of matrix-metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004, 36:811-822.
72. **Hsu S.** Green tea and the skin. *American Academy of Dermatology*. 2005, 52:1049-1059.
73. **Rohdewald P, Beil W.** In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* growth and adherence to gastric mucosal cells by Pycnogenol. *Phytotherapy research*. Mai 2008, 22:685-8.
74. **Kocabas H et al.** Antimicrobial activity of pine bark extract and assessment of potential application in cooked meat. *GIDA*. 2008, 33:123-7.
75. **Ishrat T et al.** Effects of Pycnogenol and vitamin E on cognitive deficits and oxidative damage induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Behavioural Pharmacology*. Oktober 2009, 20:567-75.
76. **Spencer J.** Food for thought: the role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neuro-cognitive performance. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2008, 76:238-252.
77. **Nishioka K et al.** Pycnogenol, French maritime pine bark extract, augments endothelium-dependent vasodilation in humans. *Hypertension Research*. September 2007, 30:775-80.
78. **Belcaro G et al.** Venous ulcers: microcirculatory improvement and faster healing with local use of Pycnogenol. *Angiology*. 2005, 56:699-705.
79. **Rihn B et al.** From Ancient Remedies to Modern Therapeutics: Pine Bark Uses in Skin Disorders Revisited. *Phytotherapy Research*. 2001, 15:76-78.

Literaturverzeichnis

80. **Belcaro G et al.** Improvement in signs and symptoms in psoriasis patients with Pycnogenol® supplementation. *Panminerva Medicine*. 2014, 56(1):41-48.
81. **Borzelleca J.F., Burdock G.A. und Thomas J.A.** *Opinion of an expert panel on the generally recognized as safe status of french maritime pine bark extract as a flavoring agent*. April 2003.
82. **Gilchrest B, Krutmann J.** *Photoaging of skin*. Berlin : Springer, 2006. S. 33-44.
83. **Segger D et al.** Supplementation with Evelle improves skin smoothness and elasticity in a doubleblind, placebo-controlled study with 62 women. *Journal of Dermatology*. 2004, 15:222-226.
84. **Katiyar S.** Silymarin and skin cancer prevention: anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects. *International Journal of Oncology*. 2005, 26:169-176.
85. **Cho KJ et al.** Inhibition mechanisms of bioflavonoids extracted from the bark of *Pinus maritima* on the expression of proinflammatory cytokines. *Annals of the New York Academy of Science*. April 2001, 928:141-56.
86. **Ansari MA et al.** Protective effect of Pycnogenol in human neuroblastoma SH-SY5Y cells following acrolein-induced cytotoxicity. *Free radical biology and medicine*. Dezember 2008, 45:1510-19.
87. **Hanau A, Stütcke M.** Nichtinvasive Diagnostik von Hautfunktionen. *Hautarzt*. 2003, 54:1221-1223.
88. **CK electronic GmbH.** *Information und Gebrauchsanweisung zum Cutometer MPA 580 und Corneometer CM 825*. November 2004.
89. **Dobrev H.** Application of Cutometer area parameters for the study of human skin fatigue. *Skin Research and Technology*. 2005, 11:120-122.
90. **Ahn S et al.** Correlation between a Cutometer and quantitative evaluation using Moiré topography in age-related skin elasticity. *Skin Research and technology*. 2007, 13:280-284.
91. **Trujillo O et al.** Photometric assesment of skin colour and lightness using a tristimulus colorimeter: reliability of inter and intra-investigator observations in healthy adult volunteers. *Forensic Science International*. 1996, 81:1-10.
92. **Muizzuddin N, Marenus K, Maes D, Smith W.** Use of a chromameter in assessing the efficacy of anti-irritants and tanning accelerators. *Journal of Society of Cosmetic Chemists*. 1990, 41:369-378.

Literaturverzeichnis

93. **Konica Minolta**. *Instruction manual Chromameter CR 300*. März 2003.
94. **CK electronic GmbH**. Information and Operating Instruction Visioscan vc98. September 2009.
95. http://www.courage-khazaka.de/products/p_vc_98.htm. [Online] [Zitat vom: 25. Juli 2010.]
96. **Yoshida T, Biro P, Cohen T et al**. Human heme oxygenase cDNA and induction of its mRNA by hemin. *European Journal of Biochemistry*. 1988, 171:457-461.
97. **Nishida T, Nishino N, Takano M et al**. cDNA cloning of IL-1 alpha and IL-1 beta from mRNA of U937 cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 1987, 143(1):345-52.
98. **May LT, Helfgott DC, Sehgal PB**. Anti-beta-interferon antibodies inhibit the increased expression of HLA-B7 mRNA in tumor necrosis factor-treated human fibroblasts: structural studies of the beta 2 interferon involved. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986, 83(23):8957-61.
99. **Staunton DE et al**. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*. 1988, 52(6):925-33.
100. **Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A et al**. Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *Journal of Biology and Chemistry*. 1986, 261(14):6600-5.
101. **Tromp G et al**. Structure of a full-length cDNA clone for the prepro alpha 1(I) chain of human type I procollagen. *Biochem Journal*. 1988, 253(3):919-22.
102. **Kuivaniemi H1, Tromp G, Chu ML, Prockop DJ**. Structure of a full-length cDNA clone for the prepro alpha 2(I) chain of human type I procollagen. Comparison with the chicken gene confirms unusual patterns of gene conservation. *Biochem Journal*. 1988, 252(3):633-40.
103. **Fluhr JW, Elsner P, Berardesca E, Maibach HI**, *Bioengineering of the Skin: Water and the Stratum Corneum, 2nd Edition*, Kapitel 6: Ultrasound and water in the Stratum Corneum. CRC Press LLC, 2. Auflage 2005.
104. **Giampieri F et al**. Photoprotective Potential of Strawberry (*Fragaria × ananassa*) Extract against UV-A Irradiation Damage on Human Fibroblasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. März 2012, 60:2322-7.

-
105. **Hwang YP et al.** Saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* suppress ultraviolet A-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAPKs and NF- κ B/AP-1-dependent signaling in HaCaT cells. *Food and chemical toxicology*. Dezember 2011, 49:3374-82.
106. **Vielhaber G, Grether-Beck S, Koch O, Johncock W, Krutmann J.** Sunscreens with an absorption maximum of $>$ or $\approx$ 360 nm provide optimal protection against UVA1-induced expression of matrix metalloproteinase-1, interleukin-1, and interleukin-6 in human dermal fibroblasts. *Photochemical and photobiological Science*. März 2006, 5:275-82.
107. **Hubbard C, McNamara JT et al.** The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan. *Journal of molecular biology*. 2012, 418(2):21–31.
108. **Halper J, Kjaer M.** Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol*. 2014, 802:31-47.
109. **Varkey M et al.** The effect of keratinocytes on the biomechanical characteristics and pore microstructure of tissue engineered skin using deep dermal fibroblasts. *Biomaterials*. 2014, 35(36):9591-8.
110. **Widyarini S et al.** Photoimmune protective effect of the phytoestrogenic isoflavonoid equol is partially due to its antioxidant activities. *Photochemical and photobiological science*. März 2012, 11(7):1186-92.
111. **Sugiyama Y et al.** Putative hyaluronan synthase mRNA are expressed in mouse skin and TGF-beta upregulates their expression in cultured human skin cells. *Journal of investigative dermatology*. Februar 1998, 110:116-21.

Anhang

Anhang

Die dieser Promotionsarbeit zugrunde liegenden erhobenen Probandendaten befinden sich auf der beiliegenden CD.

Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den

(Annapia Formann)